

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13520:2022

Xuất bản lần 1

**MẬT ONG – XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG CÁC SULFONAMID
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ
HAI LẦN (LC-MS/MS)**

*Honey – Determination of sulfonamids residues by liquid chromatography tandem
mass spectrometry LC-MS/MS*

HÀ NỘI – 2022

Lời nói đầu

TCVN 13520:2022 do Trung tâm Kiểm tra vệ sinh thú y Trung ương I - Cục Thú y biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Mật ong – Xác định dư lượng các sulfonamid bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Honey – Determination of sulfonamids residues by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định dư lượng các sulfonamid gồm: sulfadiazine, sulfamethazine, sulfaquinoxaline, sulfapyridine có trong mật ong bằng sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS).

Giới hạn định lượng của mỗi chất là 10 µg/kg.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi (nếu có).

3 Nguyên tắc

Mẫu thử được axit hóa, dư lượng các sulfonamid trong mật ong được chiết ra bằng axetonitril, làm sạch dịch chiết. Sau đó phân tích bằng sắc ký lỏng khối phổ hai lần.

4 Thuốc thử

Trong tiêu chuẩn này chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích trừ khi có yêu cầu khác. Nước cất được dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm theo TCVN 4851 : 1989 (ISO 3696 : 1987).

4.1 Axetonitril (CH_3CN), loại dùng cho LC-MS.

4.2 Axetonitril (CH_3CN), loại dùng cho HPLC.

4.3 Nước (H_2O), loại dùng cho LC-MS

4.4 Axit clohydric (HCl) 37 %.

4.5 Natri clorua (NaCl).

4.6 Axit xitric ngậm một phân tử nước ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), loại dùng cho phân tích.

4.7 Axit formic (HCOOH), loại dùng cho phân tích.

4.8 Metanol, loại dùng cho LC-MS.

4.9 Dung dịch axit xitric 0,3 M

Cân 63 g axit xitric ngậm một phân tử nước (4.6) vào bình định mức 1 000 ml (5.12) định mức tới vạch bằng nước cất, lắc kỹ. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 1 tháng.

4.10 Dung dịch axit clohydric 0,1 M

Lấy 8,3 ml axit clohydric (4.4) vào bình định mức 1 000 ml (5.12) định mức tới vạch bằng nước cất, lắc kỹ. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 1 tháng.

4.11 Dung dịch axetonitril 0,1 % axit formic theo thể tích

Lấy 1 ml axit formic (4.7) vào bình định mức 1 000 ml (5.12) định mức tới vạch bằng axetonitril (4.2), lắc kỹ. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 1 tháng.

4.12 Dung dịch metanol: nước (80:20)

Lấy 80 ml metanol (4.8) pha vào 20 ml nước (4.3) bằng ống đong (5.19) cho vào lọ thủy tinh 100 ml (5.15), lắc kỹ. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 1 tháng.

4.13 Dung dịch axetonitril: nước (30:70)

Lấy 30 ml axetonitril (4.1) pha vào 70 ml nước (4.3) bằng ống đong (5.19) cho vào lọ thủy tinh 100 ml (5.15), lắc kỹ. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 1 tháng.

4.14 Chất chuẩn sulfadiazine (SDA), độ tinh khiết $\geq 99,0$ %.

4.15 Chất chuẩn sulfamethazine (SMZ), độ tinh khiết $\geq 99,0$ %.

4.16 Chất chuẩn sulfaquinoxaline (SQX), độ tinh khiết $\geq 99,0$ %.

4.17 Chất chuẩn sulfapyridine (SPR), độ tinh khiết $\geq 99,0$ %.

4.18 Chất nội chuẩn sulfadiazine- d_4 (SDA- d_4), độ tinh khiết $\geq 99,0$ %.

4.19 Chất nội chuẩn sulfamethazine- d_4 (SMZ- d_4), độ tinh khiết $\geq 99,0$ %.

4.20 Dung dịch chuẩn gốc SDA, SQX, SMZ, SPR, nồng độ 1 000 µg/ml trong metanol

Cân 50 mg $\pm$ 0,1 mg mỗi loại chất chuẩn (4.14); (4.15); (4.16); (4.17) bằng cân phân tích (5.2) vào các bình định mức dung tích 50 ml (5.12) riêng biệt. Hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol (4.8) để được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1 000 µg/ml. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C có thể bền đến 3 tháng.

CHÚ THÍCH: Lượng cân trên phải được điều chỉnh hợp lý để đạt nồng độ chuẩn gốc 1000 µg/ml sau khi đã tính toán và hiệu chỉnh khối lượng theo giấy chứng nhận độ tinh khiết của nhà sản xuất.

4.21 Dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian (S1) SDA, SQX, SMZ, SPR, nồng độ 10 µg/ml trong axetonitril.

Hút 100 µl từ mỗi dung dịch chuẩn gốc SDA, SQX, SMZ, SPR (4.20) vào bình định mức 10 ml (5.12), định mức đến vạch bằng axetonitril (4.1). Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C có thể bền đến 1 tháng.

4.22 Dung dịch chuẩn hỗn hợp (S2) SDA, SQX, SMZ, SPR, 1 µg/ml trong dung dịch axetonitril: nước.

Hút 1 ml từ dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian (4.21) vào bình định mức 10 ml (5.12), định mức đến vạch với dung dịch axetonitril: nước (4.13). Dung dịch này được chuẩn bị trong ngày.

4.23 Dung dịch nội chuẩn gốc SDA-d₄, SMZ-d₄, nồng độ 1 000 µg/ml trong metanol

Cho 1 ml metanol (4.8) vào từng lọ có chứa 1 mg chất nội chuẩn (4.18); (4.19) thu được dung dịch nội chuẩn gốc có nồng độ 1000 µg/ml. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C có thể bền đến 6 tháng.

4.24 Dung dịch hỗn hợp nội chuẩn trung gian (IS1) SDA-d₄, SMZ-d₄, 10 µg/ml trong axetonitril.

Hút 100 µl từ mỗi dung dịch nội chuẩn gốc SDA-d₄, SMZ-d₄ (4.23) cho vào bình định mức 10 ml (5.12), định mức đến vạch với axetonitril (4.1). Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C có thể bền đến 3 tháng.

4.25 Dung dịch hỗn hợp nội chuẩn (IS2) SDA-d₄, SMZ-d₄, 1 µg/ml trong dung dịch axetonitril: nước.

Hút 1 ml dung dịch hỗn hợp nội chuẩn trung gian (4.24) cho vào bình định mức 10 ml (5.12), định mức đến vạch với dung dịch axetonitril: nước (4.13). Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C có thể bền đến 1 tháng.

4.26 Dung môi pha động kênh B, axetonitril chứa 0,1 % axit formic.

TCVN 13520:2022

Hút 1 ml axit formic (4.7) cho vào 1 000 ml axetonitril (4.1), khuấy đều. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 1 tuần.

4.27 Dung môi pha động kênh A, nước chứa 0,1 % axit formic.

Hút 1 ml axit formic (4.7) cho vào 1 000 ml nước (4.3), khuấy đều. Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 1 tuần.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường, cụ thể như sau:

5.1 Hệ thống máy sắc ký lỏng khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

- Bơm 2 kênh dung môi gradient;
- Đầu dò ba tứ cực với nguồn ion hóa ESI;
- Máy tính và phần mềm phân tích;
- Hệ thống bơm mẫu tự động.

5.2 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,01 mg.

5.3 Máy ly tâm lạnh, tốc độ 200 r/min đến 15 000 r/min.

5.4 Máy vortex, tốc độ tối đa 2 000 r/min.

5.5 Tủ sấy, dải nhiệt độ đến 250 °C.

5.6 Bộ bay hơi nitơ, có điều chỉnh nhiệt độ.

5.7 Máy lắc ngang.

5.8 Bể siêu âm.

5.9 Pipet pasteur, nhựa dung tích 5 ml.

5.10 Tủ lạnh âm sâu, dải nhiệt độ từ âm 20 °C đến âm 30 °C.

5.11 Micropipet, dung tích 5 µl đến 50 µl, 10 µl đến 100 µl, 20 µl đến 200 µl, 100 µl đến 1 000 µl và 1 ml đến 5 ml.

5.12 Bình định mức, dung tích 10 ml, 50 ml và 1 000 ml.

5.13 Ống ly tâm, dung tích 50 ml.

- 5.14 **Lọ đựng mẫu**, dung tích 1,5 ml.
- 5.15 **Lọ thủy tinh**, dung tích 100 ml, 1 000 ml.
- 5.16 **Màng lọc nylon**, kích thước lỗ 0,2 μm đường kính 13 mm.
- 5.17 **Lọ đựng dung dịch chuẩn**, dung tích 10 ml, 50 ml.
- 5.18 **Ống thủy tinh**, dung tích 8 ml.
- 5.19 **Ống đông thủy tinh**, dung tích 100 ml.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Mẫu phòng thử nghiệm nhận được phải là mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

7 Chuẩn bị mẫu

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân $1\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml (5.13). Thêm 100 μl dung dịch hỗn hợp nội chuẩn (4.25). Lắc đều bằng máy vortex (5.4) 30 s sau đó để yên 15 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

7.2 Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu mật ong không có sulfonamid. Trong một lô mẫu phân tích, chuẩn bị tối thiểu một mẫu trắng.

7.3 Chuẩn bị mẫu kiểm soát

Mẫu kiểm soát được chuẩn bị từ mẫu trắng có bổ sung 20 μl dung dịch chuẩn hỗn hợp (4.22) và 100 μl dung dịch hỗn hợp nội chuẩn (4.25) để có được nồng độ chuẩn của mẫu kiểm soát là 20 $\mu\text{g/kg}$ và nồng độ chất nội chuẩn là 100 $\mu\text{g/kg}$. Lắc đều bằng máy vortex (5.4) 30 s sau đó để yên 15 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

7.4 Chuẩn bị mẫu để dựng đường chuẩn

Đường chuẩn được dựng trên mẫu trắng (7.2) thêm chuẩn ở các nồng độ khác nhau 0, 10 $\mu\text{g/kg}$, 20 $\mu\text{g/kg}$, 50 $\mu\text{g/kg}$, 100 $\mu\text{g/kg}$ và 200 $\mu\text{g/kg}$.

Cho lần lượt các dung dịch chuẩn hỗn hợp (4.21), (4.22) và dung dịch hỗn hợp nội chuẩn (4.25) vào các ống ly tâm có chứa mẫu trắng theo Bảng 1, lắc 15 s bằng máy vortex (5.4), sau đó để yên 15 min

trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

Bảng 1 – Nồng độ các dung dịch chuẩn dùng để xây dựng đường chuẩn

Nồng độ chất chuẩn trong mẫu (µg/kg)	Thể tích dung dịch chuẩn (4.22) thêm vào (µl)	Thể tích dung dịch chuẩn (4.21) thêm vào (µl)	Thể tích dung dịch nội chuẩn (4.24) thêm vào (µl)
0	0	-	100
10	10	-	100
20	20	-	100
50	50	-	100
100	-	10	100
200	-	20	100

8 Cách tiến hành

8.1 Chiết mẫu và làm sạch mẫu

Cho vào mẫu 2 ml axit clohydric (4.10);

Đưa vào bể siêu âm (5.8) trong 30 min;

Thêm 3 ml axit xitric (4.9);

Lắc bằng máy vortex (5.4) 30 s;

Thêm 10 ml axetonitril 0,1% axit formic (4.11);

Lắc bằng máy lắc ngang (5.7) trong 10 min;

Thêm 2 g natri clorua (4.5);

Lắc bằng máy vortex (5.4) 30 s;

Ly tâm mẫu ở 4 500 r/min bằng máy ly tâm lạnh (5.3) trong 10 min;

Hút hết lớp dung dịch phía trên sang ống thủy tinh (5.18);

Thổi khô bằng bộ bay hơi nitơ (5.6) ở 50 °C;

Hòa tan cạn bằng 1 ml dung dịch metanol: nước (4.12);

Lọc bằng màng lọc nylon (5.16), đưa dịch chiết vào lọ đựng mẫu 1,5 ml (5.14);

Tiến hành phân tích trên hệ thống LC-MS/MS (5.1).

8.2 Tiến hành thử nghiệm trên LC-MS/MS

8.2.1 Yêu cầu chung

Tối ưu hóa các điều kiện của sắc ký lỏng như tốc độ dòng, thành phần pha động, nhiệt độ cột và các điều kiện của đầu dò MS/MS như điện thế, năng lượng, khí... để mỗi chất phân tích thu được tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) lớn hơn 3 cho các phân mảnh ion và luôn tồn tại 4 điểm nhận dạng (IP) bao gồm 1 ion mẹ, 2 ion con; không có pic nhiễu tại vị trí của pic phân tích.

8.2.2 Các điều kiện sau đây cho thấy phù hợp để phân tích

8.2.2.1 Điều kiện trên LC

Cột sắc ký: RP C18, đường kính trong 2,1 mm, chiều dài cột 150 mm, kích thước hạt 5 µm.

Nhiệt độ cột: (40 ± 5) °C.

Tốc độ dòng: 0,2 ml/min.

Thể tích bơm mẫu: 5 µl.

Thời gian phân tích: 25 min.

Pha động: Chạy theo chương trình gradient thể hiện theo Bảng 2.

Bảng 2 – Điều kiện gradient cho hệ thống LC

Thời gian (min)	Kênh A Nước chứa 0,1 % axit formic (4.27)	Kênh B Axetonitril chứa 0,1 % axit formic (4.26)
0	97	3
1	97	3
20	3	97
21	3	97
22	97	3
25	97	3

8.2.2.2 Điều kiện trên MS

Kiểu ion hóa: ESI (+)

Nhiệt độ nguồn ion hóa: 150 °C

Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 400 °C

TCVN 13520:2022

Tốc độ dòng khí làm bay hơi dung môi: 600 L/h

Tốc độ dòng khí qua khối nón: 20 L/h

Áp suất khí va chạm: Argon, $p = 2,93 \times 10^{-3}$ mbar

Điện thế mao quản: 2,0 kV

Bảng 3 – Điều kiện phân mảnh MS/MS

STT	Kháng sinh	Thời gian lưu (min)	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Năng lượng va chạm CE (eV)	Năng lượng (Sample Cone) (V)
1	Sulfadiazine	7,3	250,9	91,8*	24	22
				155,8	18	
2	Sulfamethazine	8,7	278,8	91,8	30	28
				155,8*	20	
3	Sulfaquinoxaline	11,3	300,8	91,8	32	28
				155,8*	16	
4	Sulfapyridine	7,8	249,8	91,8	28	28
				155,8*	16	
5	Sulfadiazine-d ₄	7,3	254,8	159,8	14	26
6	Sulfamethazine-d ₄	8,7	282,9	185,8	18	30

CHÚ THÍCH: ion ký hiệu (*) dùng để định lượng. Sulfadiazine-d₄ sử dụng cho sulfadiazine và sulfamethazine-d₄ sử dụng cho sulfamethazine, sulfapyridine và sulfaquinoxaline.

8.3 Trình tự bơm mẫu

- Bơm dung môi kiểm tra máy: axetonitril (4.1);
- Bơm các dung dịch lập đường chuẩn;
- Bơm mẫu trắng;
- Bơm mẫu kiểm soát;
- Bơm mẫu thử;

8.4 Tính toán và biểu thị kết quả

8.4.1 Dựng đường chuẩn

Dựng phương trình bậc nhất giữa hệ số tín hiệu RF với nồng độ chất chuẩn bổ sung vào mẫu (x) theo phương trình đường chuẩn: $RF = ax + b$.

Trong đó:

- b là điểm cắt của đường chuẩn với trục tung;
a là hệ số góc của đường chuẩn.

RF được tính theo công thức:

$$RF = \frac{Sp}{Sp_{IS}}$$

Trong đó:

Sp: diện tích pic của ion định lượng chất cần phân tích;

Sp_{IS}: diện tích pic của ion thứ cấp của chất nội chuẩn.

8.4.2 Tính và biểu thị kết quả

Hàm lượng chất phân tích trong mẫu, X, microgam trên kilogram (µg/kg) được tính theo Công thức sau:

$$X = \frac{C \times V \times F}{m}$$

Trong đó:

C là nồng độ chất phân tích trong dung dịch mẫu thử, tính bằng microgam trên lít (µg/l);

V là thể tích cuối cùng của mẫu thử, tính bằng mililit (ml);

F là hệ số pha loãng mẫu khi đo (nếu không pha loãng, F = 1);

m là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g).

Kết quả được biểu thị đến hai chữ số thập phân sau dấu phẩy.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- Thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu có;
- Phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả thử nghiệm;
- Kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Quy trình nội bộ VS1/QT/207/TD "Mật ong – Xác định dư lượng nhóm sulfonamid bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ hai lần".
 - [2] Quantitative LC/MS-MS Determination of Sulfonamides and Some Other Antib AOAC Vol.85, No 4, 2002.
 - [3] Analysis of Sulfonamides in Honey Using the SCIEX TripleQuad™ 3500 System.
-