

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11836:2017

**MẬT ONG - PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG
CARBAMATE BẰNG SẮC KÝ KHỐI PHỔ**

Honey - Determination of carbamate residues by gas chromatography mass spectrometry

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 11836:2017 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 - Phương pháp xác định dư lượng carbamate bằng sắc ký khí khối phổ

Honey - Determination of carbamate residues by gas chromatography mass spectrometry

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định dư lượng carbamate trong mật ong bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ.

Giới hạn định lượng của phương pháp là 10 µg/kg.

2 Nguyên tắc

Dư lượng carbamate được chiết bằng axetonitril. Sau đó, dịch chiết được làm sạch bằng chiết phân tán pha rắn (d-SPE) để loại các axit hữu cơ, nước còn dư và các thành phần khác nhờ phối hợp chất hấp phụ PSA (amin bậc 1 và amin bậc 2) và MgSO₄.

Dư lượng nhóm carbamate có trong mẫu được xác định và định lượng bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ.

3 Thuốc thử

Trong tiêu chuẩn này chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích.

3.1 Axetonitril.

3.2 Nước cất 2 lần khử ion.

3.3 Magie sulphat khan (MgSO₄).

3.4 Natri clorit khan (NaCl).

TCVN 11836:2017

3.5 Tri natri xitrat dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$).

3.6 Di natri hydro xitrat 1,5 hydrat ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$).

3.7 Axit formic.

3.8 Bột làm sạch primary secondary amine (PSA).

3.9 Khí mang (Heli), độ tinh khiết 99,999 %.

3.10 Chất chuẩn carbaryl, độ tinh khiết 98,0 %.

3.11 Chất chuẩn methiocarb, độ tinh khiết 99,5 %.

3.12 Chất chuẩn pirimicarb, độ tinh khiết 99,0 %.

3.13 Chất nội chuẩn carbaryl d₇, khối lượng 0,01g, độ tinh khiết 98,4 %.

3.14 Dung dịch chuẩn gốc carbaryl 1000 µg/ml

Cân 50 mg chất chuẩn carbaryl (3.10) chính xác đến $\pm 0,1$ mg vào bình định mức dung tích 50 ml (4.7). Hòa tan và định mức tới vạch bằng axetonitril (3.1).

3.15 Dung dịch chuẩn gốc methiocarb 1000 µg/ml

Cân 50 mg chất chuẩn methiocarb (3.11) chính xác đến $\pm 0,1$ mg vào bình định mức dung tích 50 ml (4.7). Hòa tan và định mức tới vạch bằng axetonitril (3.1).

3.16 Dung dịch chuẩn gốc pirimicarb 1000 µg/ml

Cân 50 mg chất chuẩn pirimicarb (3.12) chính xác đến $\pm 0,1$ mg vào bình định mức dung tích 50 ml (4.7). Hòa tan và định mức tới vạch bằng axetonitril (3.1).

CHÚ THÍCH: Lượng cân được điều chỉnh theo giấy chứng nhận độ tinh khiết của nhà sản xuất. Dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C trong 1 năm.

3.17 Dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian, 10 µg/ml

Hút chính xác 100 µl các dung dịch chuẩn gốc (3.14, 3.15, 3.16) vào bình định mức 10 ml (4.7). Định mức tới vạch bằng axetonitril (3.1).

CHÚ THÍCH: Dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C trong 3 tháng.

3.18 Dung dịch nội chuẩn gốc carbaryl d₇, 984 µg/ml

Hòa tan chất nội chuẩn carbaryl d₇, khối lượng 0,01 g (3.13) bằng axetonitril (3.1), vào bình định mức 10 ml (4.7) và định mức tới vạch.

CHÚ THÍCH: Dung dịch nội chuẩn gốc được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C trong 1 năm.

3.19 Dung dịch nội chuẩn trung gian carbaryl d₇, 10 µg/ml

Hút chính xác 102 µl dung dịch nội chuẩn gốc (3.18) vào bình định mức 10 ml (4.7). Định mức tới vạch bằng axetonitril (3.1).

CHÚ THÍCH: Dung dịch nội chuẩn trung gian được bảo quản ở nhiệt độ âm 20 °C trong 3 tháng.

3.20 Dung dịch 5 % axit formic trong axetonitril

Hút 5 ml axit formic (3.7) định mức đến 100 ml bằng axetonitril (3.1).

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Hệ thống sắc ký khí khối phổ GC-MS; bao gồm thiết bị GC, thiết bị MS, bộ phận bơm mẫu tự động, cột sắc ký DB – 5MS (Nhiệt độ tối đa của cột 325 °C; kích thước cột: 30 m x 250 µm x 0,25 µm). Máy tính và phần mềm phân tích.

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

4.3 Máy ly tâm, tốc độ 4000 r/min.

4.4 Bể siêu âm.

4.5 Máy lắc ngang, tốc độ 300 r/min.

4.6 Máy vortex, 400 r/min.

4.7 Bình định mức, dung tích 10 ml, 50 ml và 100 ml.

4.8 Micropipet, dung tích 100 µl và 1000 µl.

4.9 Ống ly tâm, dung tích 15 ml và 50 ml.

4.10 Lọ đựng mẫu, dung tích 1.5 ml có nắp đậy PTFE.

5 Lấy mẫu

Lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Mẫu phân tích tại phòng thí nghiệm phải là mẫu đại diện, không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

6 Chuẩn bị mẫu

6.1 Đồng hóa mẫu thử

Đồng nhất mẫu: Trộn đều bằng máy lắc ngang (4.5) để đồng nhất mẫu trước khi tiến hành phân tích.

Cân chính xác 10,0 g (± 0.1 g) mẫu đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm dung tích 50 ml (4.9).

6.2 Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu thử (6.1). Thêm 200 μ l dung dịch nội chuẩn carbaryl d_7 nồng độ 10 μ g/ml (3.19). Trộn đều bằng máy vortex (4.6), sau đó để yên 15 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

Mẫu trắng là mẫu mật ong đã được xác định không nhiễm dư lượng carbamate.

6.3 Chuẩn bị mẫu kiểm soát

Mẫu kiểm soát được chuẩn bị từ mẫu trắng (6.2) nhưng sau khi cân mẫu bổ sung thêm 100 μ l dung dịch chuẩn carbamate có nồng độ 10 μ g/ml (3.17) và 200 μ l dung dịch nội chuẩn carbaryl d_7 nồng độ 10 μ g/ml (3.19) vào mẫu. Trộn đều bằng máy vortex (4.6), sau đó để yên 15 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

6.4 Chuẩn bị mẫu để dựng đường chuẩn

Mẫu xây dựng đường chuẩn được chuẩn bị từ mẫu trắng (6.2) nhưng sau khi cân mẫu, bổ sung dung dịch chuẩn carbamate có nồng độ 10 μ g/ml (3.17) và nội chuẩn carbaryl d_7 có nồng độ 10 μ g/ml (3.19) vào tất cả các điểm chuẩn để được các điểm chuẩn như Bảng 1. Trộn đều bằng máy vortex (4.6), sau đó để yên 15 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

Bảng 1 – Dung dịch để dựng đường chuẩn

Chuẩn tương đương trên mẫu (ng/ml)	$C_1 = 0$	$C_2 = 10$	$C_3 = 25$	$C_4 = 50$	$C_5 = 100$	$C_6 = 200$
Thể tích carbaryl 10 μ g/ml thêm vào (μ l)	0	10	25	50	100	200
Thể tích pirimicarb 10 μ g/ml thêm vào (μ l)	0	10	25	50	100	200
Thể tích methiocarb 10 μ g/ml thêm vào (μ l)	0	10	25	50	100	200
Thể tích carbaryl d_7 10 μ g/ml thêm vào (μ l)	200	200	200	200	200	200

6.4.1 Tính hệ số tín hiệu

Tính cho chất cần phân tích theo phương trình: $RF = \frac{Sp}{Sp_{IS}}$

Trong đó: RF: hệ số tín hiệu của chất phân tích trên chất nội chuẩn;

Sp: diện tích pic của chất cần phân tích;

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

6.4.2 Xây dựng đường chuẩn

Xây dựng phương trình bậc nhất giữa hệ số tín hiệu với nồng độ chất chuẩn bổ sung vào mẫu và chuẩn bị mẫu theo mục 6.4. Phương trình có dạng: $RF = ax + b$. Trong đó:

RF: hệ số tín hiệu của chất phân tích trên chất nội chuẩn;

x: nồng độ chất chuẩn thêm vào mẫu;

b: điểm cắt của đường chuẩn với trục tung;

a: hệ số góc của đường chuẩn.

7 Tiến hành thử nghiệm

7.1 Chiết mẫu và làm sạch mẫu

7.1.1 Chiết mẫu:

Cân 10,0 g (± 0.1 g) mẫu đã được đồng nhất (6.1) cho vào ống ly tâm dung tích 50 ml (4.9). Thêm 10 ml nước cất (3.2), lắc bằng máy vortex (4.6) cho tan. Thêm 10 ml axetonitril (3.1), lắc 1 min bằng máy vortex (4.6), siêu âm 10 min trong bể siêu âm (4.4);

Thêm 1 g NaCl khan (3.4), 1 g C₆H₉Na₃O₉ (3.5), 0,5 g C₆H₈Na₂O₇·1,5H₂O (3.6), lắc bằng máy lắc ngang (4.5) 10 min;

Thêm 4 g MgSO₄ khan (3.3), lắc mạnh 2 min;

Ly tâm ống bằng máy ly tâm (4.3) trong 5 min ở tốc độ 4000 r/min.

7.1.2 Làm sạch mẫu:

Hút 5 ml dịch chiết lớp trên (7.1.1) sang ống ly tâm 15 ml (4.9);

Thêm 0,3 g PSA (3.8), 0,6 g MgSO₄ (3.3), lắc 1 min bằng máy vortex (4.6);

Ly tâm ống bằng máy ly tâm (4.3) trong 5 min ở tốc độ 4000 r/min;

TCVN 11836:2017

Hút 1 ml dịch chiết và thêm 10 µl dung dịch 5 % axit formic trong axetonitril (3.20) vào lọ đựng mẫu (4.10), lắc 30 s bằng máy vortex (4.6);

Tiến hành phân tích trên hệ thống GC-MS.

7.2 Tiến hành phân tích trên GC-MS

7.2.1 Điều kiện chung đối với hệ thống GC-MS

Tối ưu hóa các thông số hoạt động của hệ thống sắc ký khí khối phổ (GC-MS) trong phân tích dư lượng nhóm carbamate (xác định độ đặc hiệu của thiết bị đối với nhóm carbamate. Thực hiện chuẩn hóa các điều kiện của sắc ký khí như chương trình nhiệt độ, thể tích bơm mẫu, tốc độ dòng khí, nhiệt độ buồng chuyển tiếp, nhiệt độ ion source, thời gian tắt/mở bộ phận tạo điện tử để mỗi chất phân tích thu được tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu nền (S/N) lớn hơn 3 cho các phân mảnh ion và luôn tồn tại 1 ion định lượng, 2 ion định tính không có pic nhiễu tại vị trí của pic phân tích.

7.2.2 Điều kiện đối với GC

Bơm mẫu:

Chế độ rửa và bơm tự động (dung dịch rửa axeton) được thực hiện trước khi bơm mẫu 3 lần và sau bơm mẫu 3 lần;

Rửa bằng mẫu 3 lần;

Bơm mẫu, thể tích bơm mẫu là 2 µl.

Buồng bơm mẫu:

Nhiệt độ: 250 °C;

Áp suất: 9,4 psi;

Tốc độ dòng: 1 ml/min;

Chế độ: không chia dòng.

Chế độ lò cột:

Nhiệt độ: 80 °C;

Thời gian ổn định: 1 min;

Nhiệt độ tối đa: 310 °C.

Chương trình nhiệt độ cột tách như sau:

Giữ ở 80 °C trong 1 min, tăng từ 80 °C đến 150 °C với tốc độ 40°C/min, tăng từ 150 °C đến 250 °C với tốc độ 5 °C/min, tăng từ 250 °C đến 280 °C với tốc độ 40 °C/min và giữ ở 280 °C trong 5 min.

7.2.3 Điều kiện đối với MS

Nhiệt độ bộ phận kết nối phổ khối lượng: 280 °C;

Chế độ ion hóa: chế độ va chạm điện tử (EI);

Nhiệt độ nguồn MS: 230 °C;

Nhiệt độ tứ cực: 150 °C;

Thời gian cất dung môi: 4 min;

CHÚ THÍCH: nếu không cất dung môi sẽ làm bộ phận tạo điện tử (filament) nhanh bị cháy.

Chế độ: chế độ chọn lọc ion (SIM) theo Bảng 2.

Bảng 2 – Các phân mảnh ion

STT	Tên chất	Ion định lượng (m/z)	Ion định tính 1 (m/z)	Ion định tính 2 (m/z)	Thời gian lưu
1	Carbaryl đ ₇	122	123	151	7,122
2	Carbaryl	115	116	144	7,167
3	Pirimicarb	166	72	238	12,137
4	Methiocarb	168	153	109	14,019

7.3 Trình tự bơm mẫu

- Bơm dung môi kiểm tra máy (ACN);
- Bơm các dung dịch lập đường chuẩn;
- Bơm mẫu trắng;
- Bơm mẫu kiểm soát;
- Bơm mẫu thử;
- Bơm dung môi kiểm tra máy (ACN).

8 Tính và biểu thị kết quả

8.1 Tính kết quả

Dư lượng carbamate cần phân tích trong mẫu được tính theo phương pháp đường chuẩn. Hàm lượng chất phân tích có trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

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

Trong đó:

C là hàm lượng chất phân tích có trong mẫu, tính bằng microgam trên kilogram ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_x là nồng độ chất phân tích được suy ra từ đường chuẩn, tính bằng microgam trên lít ($\mu\text{g}/\text{l}$);

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).

8.2 Biểu thị kết quả

Kết quả được biểu thị bằng đơn vị $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) đến hai số 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] Qui trình QuEChERS: Assessment of Pesticide Residues in Honey Samples from Portugal and Spain – EN 15662.
 - [2] AOAC_2007_01 QuEChERS.
 - [3] Document SANCO/12071/2013, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for Pesticide residues analysis in food and feed.
 - [4] Qui trình nội bộ của Trung tâm Kiểm tra vệ sinh thú y Trung ương I.
-