

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13072:2020

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
COLISTIN – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG
- PHỔ KHỐI LƯỢNG HAI LẦN**

Animal feed – Determination of colistin content – Liquid chromatography tandem mass spectrometry method

HÀ NỘI – 2020

Lời nói đầu

TCVN 13072:2020 do Cục Chăn nuôi 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.

Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng colistin – Phương pháp sắc ký lỏng – phổ khối lượng hai lần

Animal feed – Determination of colistin content – Liquid chromatography tandem mass spectrometry method

CẢNH BÁO AN TOÀN: Rửa tất cả dụng cụ thủy tinh bằng chất tẩy trước khi rửa bằng nước. Tất cả các giai đoạn phân tích cần được thực hiện trong tủ hút. Loại bỏ các dung môi thải theo các quy định về môi trường.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng – phổ khối lượng hai lần để xác định hàm lượng colistin trong thức ăn chăn nuôi.

Tiêu chuẩn này cũng có thể được áp dụng để xác định hàm lượng colistin dạng tự do trong thức ăn thủy sản.

Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp trong thức ăn chăn nuôi là 1,0 mg/kg.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 6952 Thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị mẫu.

3 Nguyên tắc

Colistin trong mẫu được chiết bằng dung dịch hỗn hợp axit trichloroaxetic 10% : axetonitril (40:60, theo thể tích). Dịch chiết được ly tâm, lọc và làm sạch qua cột chiết pha rắn trao đổi cation yếu (WCX). Hàm lượng colistin được xác định bằng hệ thống sắc ký lỏng – phổ khối lượng hai lần.

4 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, nước được sử dụng là nước cất hai lần đã loại ion hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

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

4.2 Axit trichloroaxetic (TCA), độ tinh khiết $\geq 98\%$.

4.3 Dung dịch axit trichloroaxetic 10% (theo khối lượng/thể tích), cân khoảng 10,0 g axit trichloroaxetic (4.2) vào bình định mức 100 ml, hòa tan bằng 50 ml nước, thêm nước đến vạch định mức và lắc đều.

4.4 Dung dịch axit trichloroaxetic 10% : axetonitril (40:60, theo thể tích), đong 40 ml dung dịch hỗn hợp axit trichloroaxetic 10% (4.3) và 60 ml axetonitril (4.1), trộn lẫn và lắc đều.

4.5 Metanol (CH_3OH), loại dùng cho LC-MS.

4.6 Dung dịch metanol : nước (50:50, theo thể tích), đong 50 ml metanol (4.5) và 50 ml nước, trộn lẫn và lắc đều.

4.7 Axit formic (HCOOH), độ tinh khiết $\geq 98\%$.

4.8 Dung dịch axit formic 5% trong nước, hút 5 ml axit formic (4.7) vào bình định mức 100 ml chứa khoảng 50-70 ml nước, định mức bằng nước đến vạch, lắc đều.

4.9 Dung dịch axit formic 20% trong metanol, hút 20 ml axit formic (4.7) vào bình định mức 100 ml chứa khoảng 30-50 ml metanol (4.5), định mức bằng metanol (4.5), lắc đều.

4.10 Dung dịch axit formic 0,5% trong nước, hút 5 ml axit formic (4.7) vào bình định mức 1000 ml chứa khoảng 500-700 ml nước, định mức bằng nước đến vạch, lắc đều.

4.11 Dung dịch axit formic 0,5% trong axetonitril, hút 5 ml axit formic (4.7) vào bình định mức 1000 ml chứa khoảng 500-700 ml axetonitril (4.1), định mức bằng axetonitril (4.1) đến vạch, lắc đều.

4.12 Chuẩn colistin sunfat, độ tinh khiết $\geq 95\%$.

Chú thích: chuẩn colistin bao gồm colistin A và colistin B

4.13 Dung dịch chuẩn gốc 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, cân khoảng 54,2 mg chuẩn (4.12), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 50 ml. Hoà tan và định mức đến vạch bằng nước. Dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở $2 + 8\text{ }^\circ\text{C}$, tránh ánh sáng, bền trong 12 tháng.

CHÚ THÍCH: Nồng độ của dung dịch chuẩn được hiệu chỉnh dựa vào độ tinh khiết và lượng cân thực tế và quy đổi về nguyên trạng về colistin.

4.14 Dung dịch chuẩn trung gian 100 µg/ml, hút 1 ml dung dịch chuẩn gốc 1000 µg/ml (4.13) vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng nước. Dung dịch chuẩn được bảo quản ở 2 + 8 °C, tránh ánh sáng, bền trong 1 tháng.

4.15 Natri hydroxit, độ tinh khiết ≥ 95%.

4.16 Dung dịch Natri hydroxit 1 M, cân khoảng 40,0 g natri hydroxit (4.15) vào bình định mức 1000 ml, hòa tan bằng 500 ml nước, thêm nước đến vạch định mức và lắc đều.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần, có thể sử dụng hệ thống gồm sắc ký lỏng kèm bộ bơm mẫu tự động ghép nối với detector khối phổ loại ba tứ cực với nguồn ion hóa phun điện tử (ESI).

5.2 Cột sắc ký lỏng, ví dụ cột C18 (150 mm x 2,1 mm; 3,5 µm) hoặc tương đương.

5.3 Máy lắc xoáy, tốc độ quay tối thiểu 1000 r/min.

5.4 Máy ly tâm, có thể ly tâm 6000 r/min đối với ống ly tâm 15 và 50 ml, có chế độ ly tâm lạnh.

5.5 Bộ bay hơi dung môi bằng nitor, có thể điều chỉnh được nhiệt độ đến 50 °C.

5.6 Cân kỹ thuật, có thể cân chính xác đến 0,01 g.

5.7 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

5.8 Máy đo pH.

5.9 Bộ chiết SPE, sử dụng được cho cột WCX 60 mg/3 ml.

5.10 Bình định mức các loại: dung tích 10, 20, 50, 100, 1000 ml.

5.11 Ống ly tâm các loại: dung tích 15, 50 ml; bằng nhựa polypropylen có nắp.

5.12 Ống nghiệm thủy tinh, có chia vạch, kích thước tối đa của 1 vạch là 1 ml, dung tích 6 ml.

5.13 Pipet tự động, điều chỉnh được thể tích trong khoảng 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl, 500 - 5000 µl.

5.14 Pipet pasteur, dung tích 3 ml.

5.15 Giấy lọc, đường kính 11 cm.

5.16 Màng lọc, loại PTFE, kích thước lỗ 0,22 µm.

TCVN 13072: 2020

5.17 Lọ đựng mẫu, dung tích 2 ml.

5.18 Cột WCX, 60 mg/3ml.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 4325.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi chất lượng trong suốt quá trình bảo quản và vận chuyển.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu sơ bộ

Mẫu được chuẩn bị theo TCVN 6952 Thức ăn chăn nuôi – hướng dẫn chuẩn bị mẫu.

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị 3 ống ly tâm 50 ml (5.11), cân 1,00 g mẫu thử chính xác đến 0,01 g vào ống ly tâm 50 ml thứ nhất, thêm 10 ml dung dịch axit trichloroaxetic 10% : axetonitril (40:60, theo thể tích), (4.4). Lắc xoáy trong 1 min và ly tâm với tốc độ 6000 r/min trong 10 min ở 2 °C. Chuyển lớp dịch phía trên sang ống ly tâm 50 ml thứ 2 (5.11). Thêm 10 ml dung dịch axit trichloroaxetic 10% : axetonitril (40:60, theo thể tích) vào ống ly tâm chứa phần cặn còn lại. Lắc xoáy trong 1 min và ly tâm với tốc độ 6000 r/min trong 10 min ở 2 °C. Chuyển lớp dịch phía trên sang ống ly tâm 50 ml chứa dịch chiết thu được từ lần chiết 1. Lắc đều, chỉnh về pH = 9 bằng dung dịch natri hydroxit 1M (4.16), ly tâm với tốc độ 6000 r/min trong 10 min ở 2 °C. Lọc qua giấy lọc (5.15) vào ống ly tâm 50 ml thứ 3 (5.11).

Cân 1,00 g mẫu thử chính xác đến 0,01 g vào ống ly tâm 50 ml (5.11), thêm 10 ml dung dịch axit trichloroaxetic 10% : axetonitril (40:60, theo thể tích), (4.4). Lắc xoáy trong 1 min và ly tâm với tốc độ 6000 r/min trong 10 min ở 2 °C. Chuyển lớp dịch phía trên sang ống ly tâm 50 ml thứ 2 (5.11). Chiết lặp phần cặn với 10 ml dung dịch axit trichloroaxetic 10% : axetonitril (40:60, theo thể tích) và gộp dịch vào ống ly tâm 50 ml thứ 2. Lắc đều, chỉnh về pH = 9 bằng dung dịch natri hydroxit 1M (4.16), ly tâm với tốc độ 6000 r/min trong 10 min ở 2 °C. Lọc qua giấy lọc (5.15) vào ống ly tâm 50 ml thứ 3 (5.11).

Hoạt hóa cột WCX (5.9) lần lượt với 3 ml metanol (4.5), 3 ml H₂O. Nạp 4 ml dịch chiết qua cột, tốc độ chảy không quá 1 ml/min. Rửa cột lần lượt bằng 3 ml H₂O, 3 ml metanol (4.5), 3 ml dung dịch axit formic 5% trong nước (4.8). Rửa giải bằng 5 ml dung dịch axit formic 20% trong metanol (4.9) vào ống nghiệm thủy tinh (5.12). Thổi khô bằng dòng khí nitơ ở 50°C với tốc độ khí phù hợp cho tới khi thể tích dung dịch trong ống còn ít hơn 1 mL. Định mức 1 ml bằng nước cất. Lọc mẫu qua màng lọc 0,22 µm (5.16) vào lọ đựng mẫu 2 ml (5.17).

Chú ý: Nếu hàm lượng colistin nằm ngoài đường chuẩn thì pha loãng mẫu với hệ số pha loãng phù hợp.

7.3 Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu âm tính với chất cần phân tích. Cân 1,00 g mẫu trắng và thực hiện các bước như mẫu thử (7.2).

7.4 Chuẩn bị mẫu kiểm soát

Mẫu kiểm soát được phân tích cùng mẫu thử để kiểm soát hiệu suất thu hồi của quá trình chuẩn bị mẫu.

Cân 1,00 g mẫu trắng trên cân phân tích (5.7) vào ống ly tâm nhựa 50 ml (5.11), bổ sung 50 µl chuẩn hỗn hợp 100 µg/ml (4.14). Lắc xoáy 1 min, sau đó để yên 30 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo như mẫu thử (7.2).

Hiệu suất thu hồi của mẫu kiểm soát phải đạt giá trị trong khoảng 80 + 110 %.

7.5 Chuẩn bị đường chuẩn trên nền mẫu

Cân 1,00 g mẫu trắng (7.3) lần lượt vào 6 ống ly tâm 50 ml (5.11). Sau đó, thêm lần lượt 10; 25; 37,5; 50; 75; 100 µl dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp 100 µg/ml (4.14) để được các mẫu chuẩn lần lượt tương ứng với các hàm lượng 1; 2,5; 3,75; 5; 7,5; 10 mg/kg và thực hiện các bước như mẫu thử (7.2).

7.6 Phân tích bằng LC-MS/MS

- Điều kiện phân tích bằng LC-MS/MS được đưa ra để tham khảo ở phụ lục A.

- Thứ tự tiêm mẫu: dung môi, dãy đường chuẩn trên nền mẫu, dung môi, mẫu trắng, mẫu thử, mẫu kiểm soát. Tối đa 10 mẫu thử thì tiêm lại dung dịch chuẩn trên nền mẫu 1 mg/kg.

8 Tính toán kết quả

Căn cứ vào đường chuẩn tương quan giữa tỷ lệ diện tích pic chuẩn với nồng độ và diện tích pic của mẫu, tính được hàm lượng colistin trong dung dịch mẫu (C).

Hàm lượng colistin trong mẫu thức ăn chăn nuôi, được ký hiệu là X (mg/kg), được tính theo công thức sau:

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

Trong đó: C: Nồng độ colistin trong dung dịch mẫu tính từ đường chuẩn (mg/l)

TCVN 13072: 2020

m: Khối lượng mẫu thức ăn chăn nuôi (g)

V: Thể tích dung dịch mẫu cuối cùng phân tích LC-MS/MS (ml)

k: Hệ số pha loãng ($k = 5$, theo tiêu chuẩn này).

Chú thích: - Diện tích pic colistin là tổng diện tích pic của colistin A và colistin B.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- a) Các thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) Phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- c) Phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) Các điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) Kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Ví dụ điều kiện phân tích colistin bằng thiết bị LC-MS/MS

A.1 Điều kiện LC

- Cột sắc ký C18 (150 mm x 2,1 mm; 3,5 μ m) và tiền cột tương ứng.
- Tốc độ dòng: 0,5 ml/min.
- Nhiệt độ cột: 40 °C.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l.
- Pha động: theo chế độ gradient như bảng dưới

Thời gian (min)	Axit formic 0,5 % trong nước (%)	Axit formic 0,5 % trong axetonitril (%)
0,01	90	10
1,00	90	10
5,00	0	90
8,00	0	90
8,50	90	10
12,00	90	10

A.2 Điều kiện khối phổ

- Khối phổ AB Sciex 5500 QQQ (Sciex)
- Nguồn ion hóa ESI, chế độ ion dương (+), thế phun 5,0 kV
- Nhiệt độ đầu phun (IS) 450 °C
- Curtain Gas (CUR) 30 psi
- Collision gas (CAD) 8 psi
- Ion source gas 1 (GS1) 35 psi
- Ion source gas 2 (GS2) 35 psi

TCVN 13072: 2020

- Declustering Potential (DP) 120

- Entrance Potential (EP) 10

- Chế độ phân tích MRM như sau:

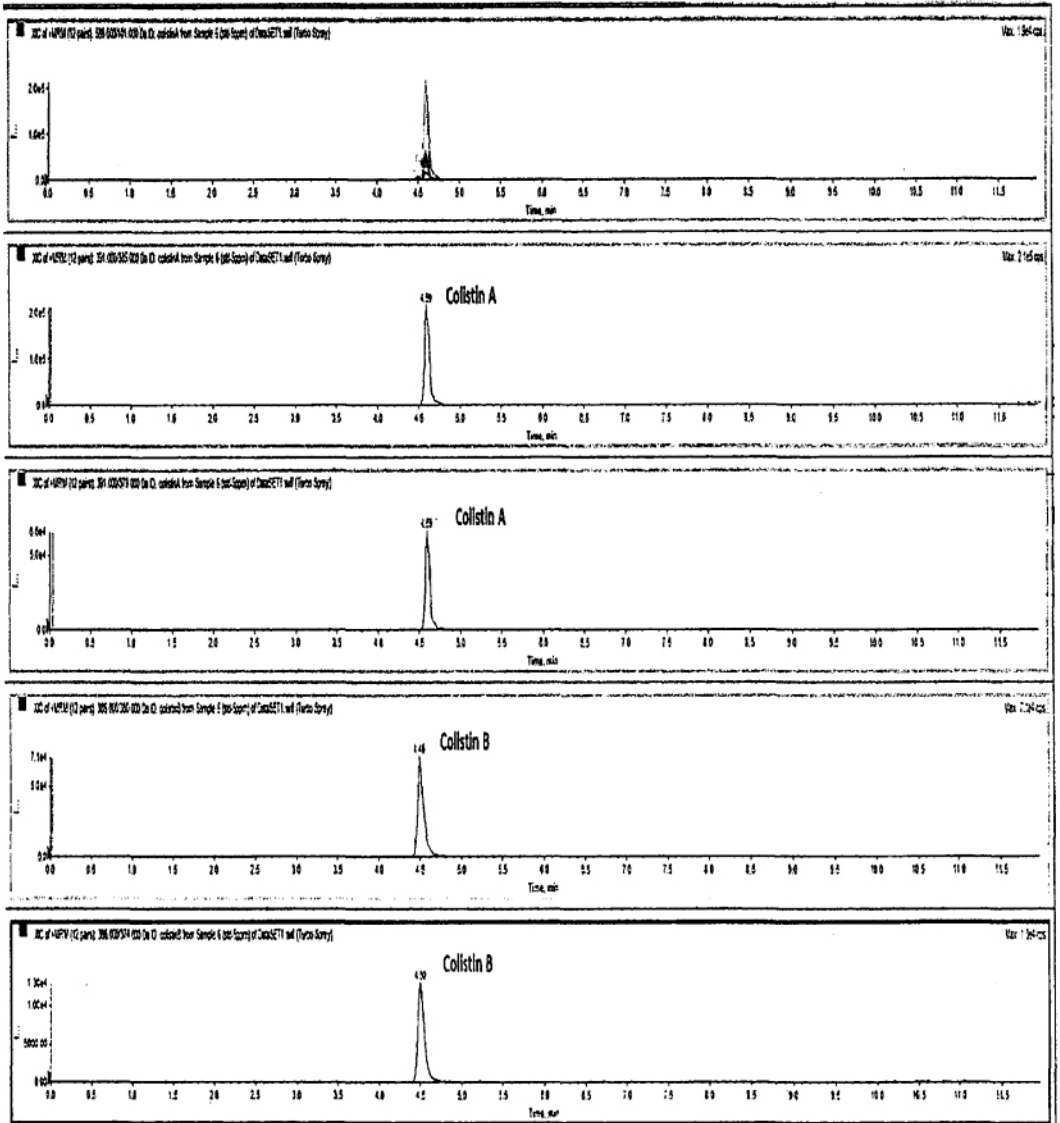
Tên chất phân tích	Mảnh mẹ (m/z)	Mảnh con (m/z)	Collision energy (eV)	Collision cell exit - CXP	Điện tích ion
Colistin A	391	385*	12	16	+ 3
	391	379	14	16	
	586	101	47	30	+ 2
	586	240*	32	16	
	586	202	30	10	
Colistin B	386	380*	12	11	+ 3
	386	374	13	11	
	579	101	51	14	+ 2
	579	227*	31	10	
	579	202	31	16	

Ghi chú:

- (*) mảnh định lượng

- Đối với mỗi thiết bị phân tích, chỉ được lựa chọn một giá trị điện tích ion là (+2) hoặc (+3). Điện tích nào cho tín hiệu chất phân tích cao và ổn định hơn thì lựa chọn.

Phụ lục B
(Tham khảo)
Sắc ký đồ chuẩn



Hình 1: Sắc ký đồ chuẩn của colistin

Chú thích:

- Colistin A (sử dụng điện tích ion +3): sắc ký đồ của colistin A (391/385 dùng để định lượng, 391/379 dùng để định tính).
- Colistin B (sử dụng điện tích ion +3): sắc ký đồ của colistin B (386/380 dùng để định lượng, 386/374 dùng để định tính).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] TCVN 4325 Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.

[2] Qin Fu, Xiaowei Li, Kangni Zheng, Yuebin Ke, Yingyu Wang, Lina Wang (2017): *“Determination of colistin in animal tissues, egg, milk, and fedd by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry”*, Food Chemistry.
