

Research Article**Study on production of reference material for plant protection chemicals: bifenthrin, carbofuran, chlorpyrifos, difenoconazole, imidacloprid in milk powder matrix**

Nguyen Thi Thu Ha¹, Pham Van Khue¹, Luu Thi Huyen Trang², Do Thi Thu Hang²,
Pham Thi Huong Giang³, Pham Hoang Thi², Nguyen Hoang Anh², Pham Nhu Trong²,
Nguyen Thi Thanh Thuy³, Nguyen Thi Anh Huong¹, Nguyen Thi Minh Hoa^{2*}

¹Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

²National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

³Vietnam National University of Agriculture, Hanoi, Vietnam

(Received: 17 Apr 2025; Revised: 11 Sep 2025; Accepted: 20 Sep 2025)

Abstract

Controlling pesticide residues in food is a top concern to ensure consumer health and safety. In testing, reference materials (RM) and certified reference materials (CRM) are essential tools used to calibrate equipment, control quality and confirm the reliability of analytical methods. This study focuses on the production, storage and evaluation of certified reference materials of five pesticides: bifenthrin, carbofuran, chlorpyrifos, difenoconazole, imidacloprid in powdered milk, in compliance with international standards ISO 17034:2016 and ISO 33405:2024. The RM after production and packaging were analyzed by gas chromatography (GC) (for bifenthrin and chlorpyrifos) and liquid chromatography (LC) (for carbofuran, difenoconazole and imidacloprid) using tandem mass spectrometry detector (MS/MS) to evaluate homogeneity, stability and estimate shelf life. The results showed that at room temperature, the RM was estimated to be stable with all five pesticides for at least 2 years. The RM after evaluation was used to successfully organize a proficiency testing program with the participation of 07 testing laboratories nationwide. The certified value is accompanied by the expanded measurement uncertainty of each pesticide: difenoconazole 77.90 ± 10.35 µg/kg; carbofuran 81.55 ± 10.02 µg/kg; bifenthrin 68.38 ± 8.47 µg/kg; imidacloprid 65.15 ± 8.22 µg/kg; chlorpyrifos 69.04 ± 13.97 µg/kg.

Keywords: Bifenthrin, carbofuran, chlorpyrifos, difenoconazole, imidacloprid, reference material, milk powder.

*Corresponding author: Nguyen Thi Minh Hoa (E-mail: nguyenthiminhhoa94@gmail.com)
<https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4542>

Copyright © 2025 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](#)

Nghiên cứu sản xuất mẫu chuẩn cho hóa chất bảo vệ thực vật: bifenthrin, carbofuran, clorpyrifos, difenoconazole, imidacloprid trên nền sữa bột

Nguyễn Thị Thu Hà¹, Phạm Văn Khuê¹, Lưu Thị Huyền Trang², Đỗ Thị Thu Hằng²,
Phạm Thị Hương Giang³, Phạm Hoàng Thi², Nguyễn Hoàng Anh², Phạm Như Trọng²,
Nguyễn Thị Thanh Thủy³, Nguyễn Thị Ánh Hoàng¹, Nguyễn Thị Minh Hòa²

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

²Viện kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Việc kiểm soát dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật (HCBVTV) trong thực phẩm là mối quan tâm hàng đầu nhằm đảm bảo an toàn sức khỏe cho người tiêu dùng. Trong kiểm nghiệm, mẫu chuẩn (Reference Material - RM) và mẫu chuẩn được chứng nhận (Certified Reference Material - CRM) là công cụ thiết yếu, được sử dụng để hiệu chuẩn thiết bị, kiểm soát chất lượng và xác nhận độ tin cậy của phương pháp phân tích. Nghiên cứu này tập trung vào quá trình sản xuất, bảo quản và đánh giá mẫu chuẩn được chứng nhận của năm loại HCBVTV gồm: bifenthrin, carbofuran, clorpyrifos, difenoconazole, imidacloprid trên nền sữa bột, tuân thủ theo các tiêu chuẩn quốc tế ISO 17034:2016 và ISO 33405:2024. Mẫu chuẩn sau khi sản xuất và đóng gói được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí (GC) (đối với bifenthrin và clorpyrifos) và sắc ký lỏng (LC) (đối với carbofuran, difenoconazole và imidacloprid) sử dụng detector khối phổ 2 lần (MS/MS) để đánh giá về độ đồng nhất, ổn định và ước tính thời hạn sử dụng. Kết quả cho thấy tại điều kiện nhiệt độ phòng, mẫu chuẩn được ước tính là ổn định với cả năm HCBVTV trong ít nhất 2 năm. Mẫu chuẩn sau khi đánh giá đã được sử dụng để tổ chức thành công chương trình thử nghiệm thành thạo với sự tham gia của 07 phòng thử nghiệm trên toàn quốc. Giá trị chứng nhận đi kèm độ không đảm bảo đo mở rộng của từng loại HCBVTV: difenoconazole $77,90 \pm 10,35 \mu\text{g/kg}$; carbofuran $81,55 \pm 10,02 \mu\text{g/kg}$; bifenthrin $68,38 \pm 8,47 \mu\text{g/kg}$; imidacloprid $65,15 \pm 8,22 \mu\text{g/kg}$; chlorpyrifos $69,04 \pm 13,97 \mu\text{g/kg}$.

Từ khóa: bifenthrin, carbofuran, clorpyrifos, difenoconazole, imidacloprid, mẫu chuẩn, sữa bột.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong bối cảnh hiện nay, sự gia tăng dân số, quá trình toàn cầu hóa và tốc độ đô thị hóa ngày càng mạnh mẽ đã đặt ra yêu cầu cấp thiết phải phát triển bền vững ngành nông nghiệp và các hệ thống sản xuất lương thực, thực phẩm. Trong đó, HCBVTV được ứng dụng rộng rãi nhờ khả năng gia tăng năng suất cây trồng và kiểm soát sâu bệnh hiệu quả. Tuy nhiên, HCBVTV đồng thời cũng là các hợp chất độc hại, có thể gây ô nhiễm ô nhiễm môi trường và tích lũy trong chuỗi thực phẩm, dẫn đến nguy cơ ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người.

Sữa bột - một sản phẩm dinh dưỡng thiết yếu cho trẻ nhỏ và người cao tuổi - cũng không nằm ngoài nguy cơ nhiễm HCBVTV. Các nghiên cứu đã được thực hiện và chỉ ra rằng tình trạng sữa bị ô nhiễm kim loại nặng và dư lượng HCBVTV chủ yếu bắt nguồn từ việc bò sữa tiêu thụ nước, thức ăn và có bị ô nhiễm. Lượng tồn dư HCBVTV trong nông sản và trong môi trường gây tác động ngay lập tức hoặc tiềm ẩn tích lũy trong cơ thể con người, dẫn đến một số vấn đề nghiêm trọng như suy giảm miễn dịch, tăng nguy cơ nhiễm vi sinh vật gây bệnh, vô sinh, dị tật bẩm sinh hay ung thư [1].

Việc xác định dư lượng HCBVTV trong thực phẩm là vấn đề cần thiết để kiểm soát chất lượng và an toàn thực phẩm. Ở Việt Nam, Bộ Y tế đã ban hành Thông tư 50/2016/TT-BYT quy định mức giới hạn tối đa cho dư lượng một số HCBVTV trong sữa, cụ thể là 0,05 mg/kg đối với bifenthrin và carbofuran, 0,02 mg/kg đối với clorpyrifos và imidacloprid, 0,005 mg/kg đối với difenoconazole [2].

Để xác định dư lượng HCBVTV, tùy thuộc vào tính chất của các chất, các phương pháp thường được sử dụng hiện nay là sắc ký khí (GC) hoặc sắc ký lỏng (LC) kết nối detector khối phổ hai lần (MS/MS) kết hợp với phương pháp xử lý mẫu nhanh, đơn giản, chi phí thấp, hiệu quả, ổn định và an toàn (QuEChERS) [3-7]. Một số phương pháp tiêu chuẩn của Hiệp hội hợp tác phân tích chính thức (AOAC) và Việt Nam cũng đã sử dụng các phương pháp để xác định dư lượng HCBVTV trong thực phẩm [8, 9]. Do đó, trong nghiên cứu này, phương pháp GC-MS/MS (đối với bifenthrin, clorpyrifos) và LC-MS/MS (đối với carbofuran, difenoconazole, imidacloprid) được lựa chọn kết hợp xử lý mẫu bằng QuEChERS để xác định hàm lượng các HCBVTV trong các giai đoạn sản xuất mẫu chuẩn.

Để thẩm định phương pháp và đảm bảo giá trị sử dụng của kết quả phân tích, việc sử dụng mẫu chuẩn là một trong những lựa chọn hàng đầu. Mẫu chuẩn là vật liệu đã được xác định đặc tính với độ chính xác và ổn định cao, đóng vai trò quan trọng hiệu chuẩn thiết bị, kiểm soát chất lượng và đảm bảo độ tin cậy của phương pháp đo lường. Mẫu chuẩn được chứng nhận (CRM) còn có thể dùng để gán giá trị cho các vật liệu khác, phục vụ hoạt động kiểm tra liên phòng và công nhận năng lực phân tích [10]. Tại Việt Nam, việc nghiên cứu sản xuất mẫu chuẩn HCBVTV trên nền thực phẩm (bao gồm cả sữa bột) còn hạn chế, cả về số lượng chất và đa dạng nền mẫu. Trong khi đó, trên thế giới, mẫu chuẩn HCBVTV đã được phát triển với nhiều nền mẫu khác nhau như đậu nành, hành lá và bắp cải, gạo lứt, sữa bột, trà xanh, táo [11-16]. Tuy nhiên, việc đặt mua các mẫu chuẩn này sẽ tốn nhiều thời gian, chi phí và khó khăn về đảm bảo điều kiện bảo quản nghiêm ngặt trong suốt quá trình vận chuyển. Do đó, việc nghiên cứu sản xuất mẫu chuẩn ở Việt Nam là cần thiết nhằm đáp ứng kịp thời nhu cầu sử dụng ngày càng cao của các phòng thử nghiệm.

Điều kiện bảo quản, đặc biệt là nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến độ ổn định và thời hạn sử dụng của mẫu chuẩn. Trong một nghiên cứu về độ ổn định của dư lượng HCBVTV trong xoài cho thấy, nhiệt độ bảo quản thấp hạn chế rất nhiều sự phân hủy của difenoconazole, quá trình này được thúc đẩy ở 4°C. Do đó, mẫu có thể được bảo quản ở nhiệt độ -20°C trong thời gian dài trước khi phân tích và 4°C chỉ thích hợp để lưu trữ tạm thời [17]. Nghiên cứu đánh giá sự phân hủy của năm loại HCBVTV phổ biến (imidacloprid, carbendazim, triadimefon, acetochlor và metolachlor) trong bột ngô dưới các điều kiện nhiệt độ và độ ẩm khác nhau cũng cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ và độ ẩm đến sự ổn định của mẫu [18]. Các mẫu bột ngô được bảo quản ở ba nhiệt độ: -20°C, 4°C và 25°C, với hai điều kiện độ ẩm. Kết quả cho thấy, ở nhiệt độ -20°C, không có sự phân hủy đáng kể của các HCBVTV, với thời gian bán hủy từ 69,3 đến 693,2 ngày. Ở nhiệt độ 25°C và độ ẩm 10%, thời gian bán hủy giảm mạnh xuống còn 5,8 đến 14,4 ngày. Tỷ lệ phân hủy dao động từ 40,6% đến 68,4% sau 10 ngày. Thứ tự phân hủy của các HCBVTV là carbendazim > imidacloprid > acetochlor > metolachlor > triadimefon. Các nghiên cứu trên đều bảo quản mẫu chuẩn ở nhiệt độ mát hoặc đông lạnh. Do đó, nghiên cứu này tập trung sản xuất và theo dõi mẫu chuẩn HCBVTV trên nền sữa bột khi được lưu giữ ở nhiệt độ thường nhằm giúp tiết kiệm chi phí bảo quản và vận chuyển mẫu chuẩn.

Trong nghiên cứu này, mẫu chuẩn năm HCBVTV (bifenthrin, carbofuran, chlorpyrifos, difenoconazole, imidacloprid) được sản xuất trên nền sữa bột. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng như đối với mẫu tự nhiên, đánh giá độ đồng nhất, độ ổn định và mô tả đặc tính của mẫu chuẩn theo hướng dẫn của ISO 33405:2024 [19]. Mẫu chuẩn sau khi được đánh giá sẽ được sử dụng trong tổ chức chương trình thử nghiệm thành thạo theo ISO 17043:2023 [20] với sự tham gia của 07 phòng thí nghiệm ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất và dung môi sử dụng trong nghiên cứu có độ tinh khiết phân tích, phù hợp dùng cho sắc ký khí và sắc ký lỏng - khối phổ hai lần (GC-MS/MS, LC-MS/MS). Các chất chuẩn của 5 loại HCBVTV (difenoconazole, carbofuran, bifenthrin, imidacloprid, chlorpyrifos) và chất nội chuẩn đồng vị chlorpyrifos (D10) cung cấp bởi LGC standard và được trình bày chi tiết trong **Bảng 1**. Các dung môi (acetonitrile, methanol) cùng với các hóa chất khác như acid, ammonium formate, magnesium sulfate khan, trisodium citrate dihydrate, disodium citrate sesquihydrate, sodium chloride được mua từ Merck. Bột PSA (primary secondary amine powder) và C18 được cung cấp bởi Agilent. Nước tinh khiết (Milli-Q Integral 3; Millipore, Billerica, MA) được sử dụng trong quá trình pha chế và chuẩn bị mẫu.

Bảng 1. Thông tin chất chuẩn HCBVTV sử dụng trong nghiên cứu

Tên chất chuẩn	Mã số (Code)	Độ tinh khiết	Số lô	Hạn sử dụng
Chuẩn difenoconazole	DRE-C12609000	99,33% (g/g)	G1388403	05/10/2029
Chuẩn carbofuran	DRE-C11010000	99,69% (g/g)	G1424056	01/12/2029
Chuẩn bifenthrin	DRE-C10584000	99,20% (g/g)	G1032032	11/10/2025
Chuẩn imidacloprid	DRE-C14283700	99,82% (g/g)	G1352978	13/04/2029
Chuẩn chlorpyrifos	DRE-C11600000	99,67% (g/g)	G1391881	26/10/2029
Nội chuẩn chlorpyrifos D10	DRE-C11600100	99,06% (g/g)	G1472621	22/08/2030

2.2. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị, dụng cụ chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Máy trộn lập phương (điều chỉnh được 6 tốc độ khác nhau), máy xay đa năng, máy xay nhỏ, tủ đông sâu (MDF-U700VX-PB, Panasonic), tủ lạnh và máy đông khô (MODULYOD), cân phân tích có độ chính xác $\pm 0,1$ mg, cân kỹ thuật có độ chính xác đến 0,1 g, cùng với các công cụ phòng thí nghiệm cơ bản khác.

Hệ thống GC-MS/MS Ultra Trace GC 1310 (Thermo) kết nối khối phổ ba tứ cực TSQ 9000 với cột sắc ký DB5-MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m) được sử dụng để phân tích hàm lượng hai chất bifenthrin và clorpyrifos. Trong khi đó, ba chất carbofuran, difenoconazole và imidacloprid được phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (LC) của Shimadzu kết nối với khối phổ (MS/MS) ba tứ cực (QQQ) AB 6500 của Applied Biosystem sử dụng cột XBrigde C18 (100 mm x 4,6 mm; 2,5 μ m).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân tích tìon

Hàm lượng các HCBVTV trong sữa bột được phân tích bằng phương pháp đã được thẩm định và công nhận theo ISO/IEC 17025 [21], dựa trên phương pháp AOAC 2007.01 [8] và phương pháp CEN 15662 [22].

*Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn xác định các HCBVTV được xây dựng bằng cách phân tích các dung dịch chuẩn hỗn hợp trong khoảng nồng độ từ 5 ng/mL đến 200 ng/mL trên hệ thống GC-MS/MS (đối với bifenthrin và clorpyrifos) và LC-MS/MS (đối với carbofuran, difenoconazole và imidacloprid). Dãy chuẩn được pha trong dung môi đã có chứa nội chuẩn với nồng độ là 100 ng/mL. Đường chuẩn được xây dựng với 7 điểm, thể hiện mối quan hệ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích peak của các HCBVTV.

* Quy trình phân tích các HCBVTV trong mẫu chuẩn

Mẫu chuẩn sau khi đồng nhất được cân chính xác khoảng 3 g trên cân phân tích. Thêm 100 μ L dung dịch nội chuẩn Chlorpyrifos D10 nồng độ 10 μ g/mL và 10 mL nước tinh khiết vào mẫu thử, lắc 1 phút bằng máy lắc xoáy. Thêm 10 mL acetonitrile vào ống ly tâm, đậy nắp kín và lắc 1 phút bằng máy lắc xoáy. Thêm từ từ hỗn hợp muối chiết gồm $4,0 \pm 0,5$ g MgSO_4 , $1,0 \pm 0,1$ g NaCl, $1,0 \pm 0,1$ g trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) và $0,5 \pm 0,1$ g disodium citrate sesquihydrate ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$). Đậy nắp kín và lắc đều bằng tay 1 phút. Ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút. Làm sạch bằng chiết pha rắn phân tán (d-SPE): Hút 1 mL lớp dịch phía trên cho vào từng ống ly tâm 2 mL đã chứa hỗn hợp chất làm sạch gồm 250 ± 25 mg PSA, 250 ± 25 mg bột C18 và 1500 ± 200 mg MgSO_4 . Đậy nắp, lắc 1 phút bằng máy lắc xoáy. Ly tâm ở tốc độ 13000 vòng/phút trong 2 phút. Hút lớp dịch trong phía trên cho vào lọ và phân tích trên GC-MS/MS, LC-MS/MS.

*Tính kết quả

Hàm lượng các HCBVTV trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

$$x = \frac{(A_{ES/IS} - b) \times V}{a \times m} \times k \quad (1)$$

Trong đó: x : Hàm lượng hóa chất bảo vệ thực vật trong mẫu (ng/g)

$A_{ES/IS}$: Tỷ lệ diện tích pic hóa chất bảo vệ thực vật và nội chuẩn

V: Thể tích dịch chiết (mL)

m: Khối lượng mẫu (g)

k: Hệ số pha loãng (nếu có)

a, b: Hệ số trong trong phương trình đường chuẩn $y = ax + b$

2.3.2. Phương pháp xử lý dữ liệu

Dữ liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Mỗi mẫu được phân tích lặp lại 2 lần. Phân tích phương sai (ANOVA) được sử dụng để đánh giá sự khác biệt về giá trị trung bình giữa các thời điểm khác nhau ở mức độ tin cậy 95%. Phân tích phương sai cho thấy sự khác biệt giữa các giá trị trung bình ở mức ý nghĩa 0,05. Đánh giá mẫu chuẩn được thực hiện theo ISO 33405:2024 [23].

2.3.2.1. Đánh giá độ đồng nhất

Việc đánh giá độ đồng nhất là quan trọng để xác định sự biến đổi của các đặc tính trong một đơn vị và giữa các đơn vị riêng biệt của lô mẫu chuẩn. Do đó, ngay sau khi đóng gói và chia lô, 10 mẫu chuẩn được lựa chọn ngẫu nhiên để đánh giá tính đồng nhất và được phân tích lặp lại 2. Dữ liệu được xử lý theo tiêu chuẩn ISO 17034:2016 và ISO 33405:2024 [23, 24]. Theo đó, số lượng mẫu tối thiểu (N_{min}) được chọn để đánh giá độ đồng nhất được tính theo công thức:

$$N_{min} = \max(10, \sqrt[3]{N_{prod}}) \quad (2)$$

Trong đó, N_{prod} là tổng số sản phẩm mẫu chuẩn được sản xuất. Trong nghiên cứu này, 10 mẫu đã được lựa chọn để đánh giá độ đồng nhất.

Độ không đảm bảo của giá trị được chứng nhận bao gồm độ không đảm bảo của kết quả đánh giá tính đồng nhất u_{hom} , được tính theo công thức:

$$u_{hom} = \sqrt{u_{bb}^2 + u_{wb}^2} \quad (3)$$

Trong đó: u_{bb} là độ lệch chuẩn giữa các đơn vị và u_{wb} là độ lệch chuẩn trong cùng đơn vị mẫu.

Độ đồng nhất của mẫu được đánh giá bằng phương pháp ANOVA một yếu tố (one-way ANOVA single factor). Mẫu được coi là đạt độ đồng nhất khi giá trị P-value > 0,05 (cho thấy sự khác biệt giữa các mẫu là không có ý nghĩa thống kê).

2.3.2.2. Đánh giá độ ổn định dài hạn

Để theo dõi độ ổn định dài hạn ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), các mẫu chuẩn đã được kiểm tra hàm lượng HCBVTV trong 6 tháng. Năm mẫu được chọn ngẫu nhiên và phân tích lặp cho mỗi thời điểm. Dữ liệu được thu thập tại 5 thời điểm: 12, 74, 104, 135, 165 ngày (kể từ ngày sản xuất). Phương trình hồi quy tuyến tính $y = b_1t + b_0$ được sử dụng để phân tích dữ liệu theo ISO 33405:2024 [23]. Trong đó :

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})^2} \quad (4)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{t} \quad (5)$$

$$s_{(b_1)} = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (t_i - \bar{t})^2}} \quad (6)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 t_i)^2}{n-2} \quad (7)$$

$$s_{(b_0)} = s_{b_1} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n t_i^2}{n}} \quad (8)$$

t : thời gian theo dõi độ ổn định (ngày)

b_1, b_0 : hệ số của phương trình hồi quy tuyến tính biểu diễn độ ổn định dài hạn

$s_{(b_1)}, s_{(b_0)}$: độ lệch chuẩn của hệ số b_1, b_0 tương ứng

y : giá trị hàm lượng của HCBVTV

n : số quan sát

Mức thay đổi chấp nhận được đối với chất phân tích trong quá trình theo dõi độ ổn định được xác định dựa trên độ không đảm bảo đo đồng nhất (u_{hom}). Giới hạn dưới được tính bằng giá trị ấn định trừ u_{hom} , và giới hạn trên là giá trị ấn định cộng u_{hom} . Để ước tính thời hạn sử dụng ($t_{shelf\ life}$), khoảng tin cậy 95% cho các giá trị dự đoán trong tương lai được tính đến và chọn thời gian ngắn nhất mà tại đó một trong các giới hạn tin cậy cắt giới hạn trên hoặc giới hạn dưới. Độ không đảm bảo đo do độ không ổn định trong quá trình bảo quản (u_{lts}) được tính bằng công thức:

$$u_{lts} = s_{b_1} \times t_{shelf\ life} \quad (9)$$

Trong đó: $t_{shelf\ life}$ là thời hạn sử dụng tính theo phương trình hồi quy (hoặc dự kiến) của mẫu chuẩn

2.3.2.3. Giá trị được chứng nhận và độ không đảm bảo đo

Giá trị được chứng nhận (y_{char}) được xác định là giá trị trung bình của các kết quả phân tích tại thời điểm ban đầu. Độ không đảm bảo đo của mẫu chuẩn được tính từ các thành phần độ không đảm bảo đo của tính đồng nhất (u_{hom}), Độ không đảm bảo đo liên quan tới xác định giá trị chứng nhận (u_{char}), độ không đảm bảo đo ổn định dài hạn (u_{lts}):

$$u_{lts} = u_{CRM} = \sqrt{u_{hom}^2 + u_{char}^2 + u_{lts}^2} \quad (10)$$

$$u_{\text{char}} = \frac{s(y)}{\sqrt{p}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (y_i - y_{\text{char}})^2}{p(p-1)}} \quad (11)$$

Trong đó: y là các giá trị thu được để tính giá trị chứng nhận

y_{char} là giá trị được chứng nhận

$s(y)$ là độ lệch chuẩn của y

p là số giá trị sử dụng trong tính toán

Độ không đảm bảo đo mở rộng của mẫu chuẩn ($U_{\text{CRM}} = 2 \times u_{\text{CRM}}$) có hệ số $k=2$.

Để kiểm chứng giá trị chứng nhận, các mẫu chuẩn trong nghiên cứu này được sử dụng trong chương trình thử nghiệm thành thạo do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia (NIFC) tổ chức phù hợp theo ISO 17043:2023 [20], với sự tham gia của 07 phòng thí nghiệm trên toàn quốc. Kết quả của các phòng thí nghiệm tham gia được kiểm tra bằng phép thử Grubbs để xác định và loại bỏ các giá trị ngoại lai theo ISO 5725-2:2019 [25]. Từ đó, giá trị ấn định của chương trình được tính từ thống kê đồng thuận của các phòng thí nghiệm tham gia. Giá trị ấn định (x_{pt}), độ lệch chuẩn (σ_{pt}) và độ không đảm bảo đo của chương trình thử nghiệm thành thạo được tính theo ISO 13528:2022 và AOAC INTERNATIONAL – Phụ lục F [26, 27]. Theo đó, các chỉ tiêu phân tích được xử lý bằng phương pháp Qn. Giá trị chứng nhận của mẫu chuẩn (x_{ref}) được so sánh với giá trị ấn định của chương trình (x_{pt}) theo biểu thức sau:

$$|x_{\text{ref}} - x_{\text{pt}}| \leq 2 \times \sqrt{u_{(x_{\text{ref}})}^2 + u_{(x_{\text{pt}})}^2} \quad (12)$$

Trong đó: u_{xref} là độ không đảm bảo đo của mẫu chuẩn

u_{xpt} là độ không đảm bảo đo của giá trị ấn định của chương trình thử nghiệm thành thạo

x_{ref} là giá trị chứng nhận của mẫu chuẩn

x_{pt} là giá trị ấn định của chương trình thử nghiệm thành thạo

Nếu sự khác biệt giữa giá trị chứng nhận của mẫu chuẩn và giá trị ấn định của chương trình lớn hơn 2 lần độ lệch chuẩn thì cần tiến hành xem xét nguyên nhân và đưa ra quyết định phù hợp.

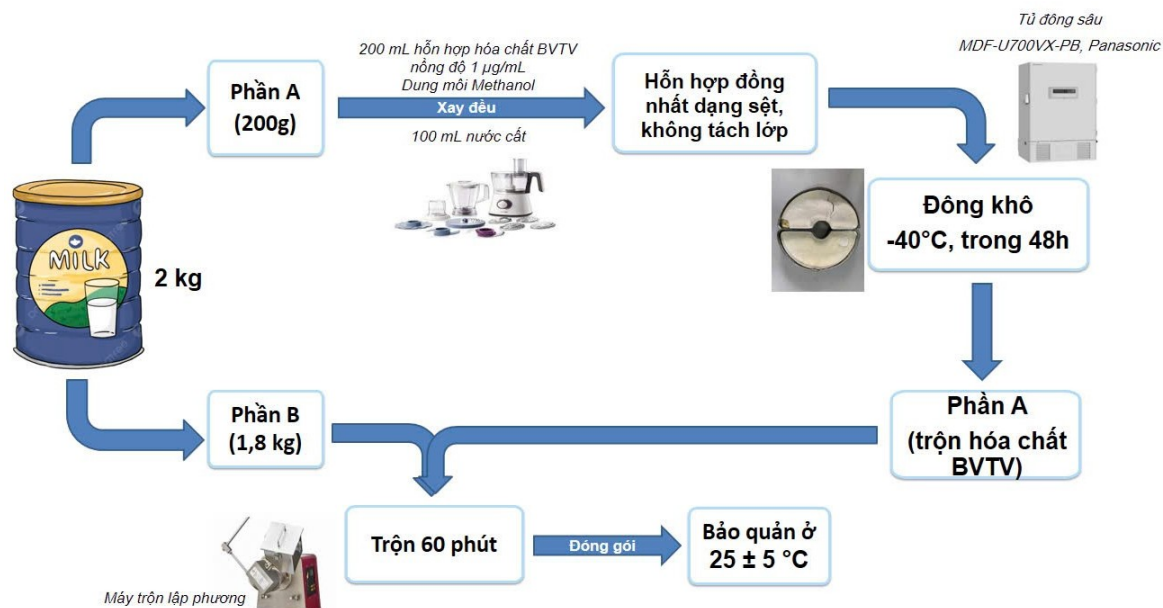
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Sản xuất mẫu chuẩn

Mẫu chuẩn trên nền sữa bột đã được sản xuất từ sữa bột đóng hộp thương mại, mua từ nhà cung cấp có uy tín. Để đảm bảo quá trình trộn được thực hiện nhanh tránh bị ẩm mốc, cũng như sự phân bố đồng đều của HCBVTV trong lô mẫu lớn, 2 kg sữa bột được chia thành 2 phần: phần A (200 g) bổ sung HCBVTV để tạo hỗn hợp “ướt” ban đầu, và phần B (1,8 kg) được giữ nguyên. Phần A sau đó được đồng nhất với phần B (**Hình 1**).

Chuẩn bị 200 mL hỗn hợp HCBVTV nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$ trong dung môi methanol: Cân chính xác 200 mg từng chất chuẩn, hòa tan bằng methanol và pha trong bình định mức 20 mL được các dung dịch chuẩn 10 mg/mL cho từng chất. Hút chính xác 100 μL từng dung dịch chuẩn vào bình định mức 10 mL, định mức bằng methanol được dung dịch hỗn hợp 1. Hút chính xác 2 mL dung dịch hỗn hợp 1 vào bình định mức 200 mL, định mức bằng methanol được hỗn hợp dung dịch chuẩn các chất có nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$.

Đồng nhất phần mẫu A với 100 mL nước cất và 200 mL dung dịch hỗn hợp chuẩn nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$ bằng máy xay đa năng. Hỗn hợp đồng nhất có dạng sệt, không tách lớp. Chia phần mẫu A vào 4 khay đông khô, bọc kín bằng màng bọc và đông sâu -80°C trong 24h. Mẫu được đông khô ở nhiệt độ -40°C trong 48h. Sau quá trình đông khô, mẫu A được xay lại thành dạng bột mịn bằng máy xay đa năng. Toàn bộ mẫu A tiếp tục được trộn với phần mẫu B, đồng nhất toàn bộ mẫu trong 60 phút ở tốc độ 40 vòng/phút bằng máy trộn lập phương (quá trình trộn được thực hiện trong phòng kín có máy hút ẩm kiểm soát độ ẩm dưới 50%). Đóng gói mẫu thủ công trong túi ghép mí, sau đó cho túi mẫu ghép mí vào túi hút chân không (**Hình 2**) và túi nhôm để tránh sáng. Khối lượng mỗi túi 40 g/mẫu. Mẫu được dán nhãn và bảo quản ở $25 \pm 5^\circ\text{C}$.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm quy trình sản xuất mẫu chuẩn



Hình 2. Hình ảnh mẫu sau công đoạn hút chân không, trước khi cho vào túi nhôm để tránh ánh sáng

3.2. Đánh giá độ đồng nhất

Trong nghiên cứu này, mười mẫu được chọn ngẫu nhiên để đánh giá độ đồng nhất và được phân tích lặp lại 2 lần cho mỗi loại HCBVTV. Độ đồng nhất của lô được đánh giá bởi phương pháp ANOVA một yếu tố. Kết quả đánh giá độ đồng nhất của chỉ tiêu Difenoconazole được trình bày trong **Bảng 2**. Các kết quả đánh giá độ đồng nhất cho các HCBVTV còn lại được thể hiện trong phụ lục kèm theo (**Bảng S1-S5**).

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ đồng nhất chỉ tiêu difenoconazole

Mẫu	Mã số	Kết quả ($\mu\text{g/kg}$)		Trung bình Kết quả ($\mu\text{g/kg}$)	Độ lệch (Wt)	(Wt) ²
		Lần 1	Lần 2			
1	15	80,2	72,3	76,25	-7,90	62,41
2	30	79,4	81,0	80,20	1,60	2,56
3	28	79,4	79,4	79,40	0,00	0,00
4	10	77,8	81,8	79,80	4,00	16,00
5	4	81,0	70,0	75,50	-11,00	121,00
6	29	81,0	70,7	75,85	-10,30	106,09
7	8	75,5	76,0	75,75	0,50	0,25
8	24	80,2	73,1	76,65	-7,10	50,41
9	16	81,8	81,8	81,80	0,00	0,00
10	5	77,0	78,6	77,80	1,60	2,56
Trung bình chung				77,90		
Độ lệch chuẩn của trung bình chung (s_x)				2,24		
Độ lệch chuẩn trong mẫu (s_w)				4,25		
Độ lệch chuẩn giữa các mẫu (s_s)				0,00	$u_{hom} =$	3,00

Sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê ($P\text{-value} > 0,05$) như thể hiện trong **Bảng 3**. Giá trị u_{hom} của từng HCBVTV được tính theo công thức (3) và trình bày trong **Bảng 3**. Kết quả này cho thấy, các mẫu chuẩn được sản xuất theo quy trình đạt yêu cầu về độ đồng nhất đối với cả 5 chỉ tiêu HCBVTV.

Bảng 3. Kết quả phân tích ANOVA-oneway và độ không đảm bảo đánh giá tính đồng nhất

STT	Chất phân tích	Giá trị trung bình ($\mu\text{g/kg}$)	MS _{between}	MS _{within}	P-value	u_{hom} ($\mu\text{g/kg}$)
1	Difenoconazole	77,90	10,05	18,06	0,804	3,00
2	Carbofuran	81,55	13,28	7,90	0,214	2,05
3	Bifenthrin	68,38	4,52	8,56	0,824	2,07
4	Imidacloprid	65,15	3,56	1,45	0,088	0,91
5	Chlorpyrifos	69,04	22,08	21,95	0,492	3,32

3.3. Điều kiện bảo quản và sử dụng mẫu trong chương trình thử nghiệm thành thạo

Trong nghiên cứu này, mẫu được đóng gói trong túi ghép mí và túi hút chân không để ngăn ngừa ảnh hưởng của độ ẩm của môi trường, sau đó được bảo quản ở nhiệt độ phòng $25 \pm 5^\circ\text{C}$. So với việc bảo quản mẫu ở điều kiện lạnh (4°C và -20°C) trong các nghiên cứu trước đây [17, 18], việc nghiên cứu và sản xuất thành công mẫu ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) góp phần đáng kể vào việc giảm chi phí bảo quản và vận chuyển mẫu.

Giá trị chứng nhận của mẫu chuẩn (**Bảng 4**) được tính từ kết quả 10 mẫu chuẩn lấy ngẫu nhiên phân tích lặp 02 lần bằng các phương pháp đã được thẩm định và chứng nhận đã nêu ở mục 2.3.1. Các giá trị chứng nhận của mẫu chuẩn được sản xuất gần với giới hạn dự lượng tối đa cho phép trong nền sữa bột theo Thông tư 50/2016/TT-BYT [2], phù hợp cho phép phân tích HCBVTV tại các phòng thí nghiệm.

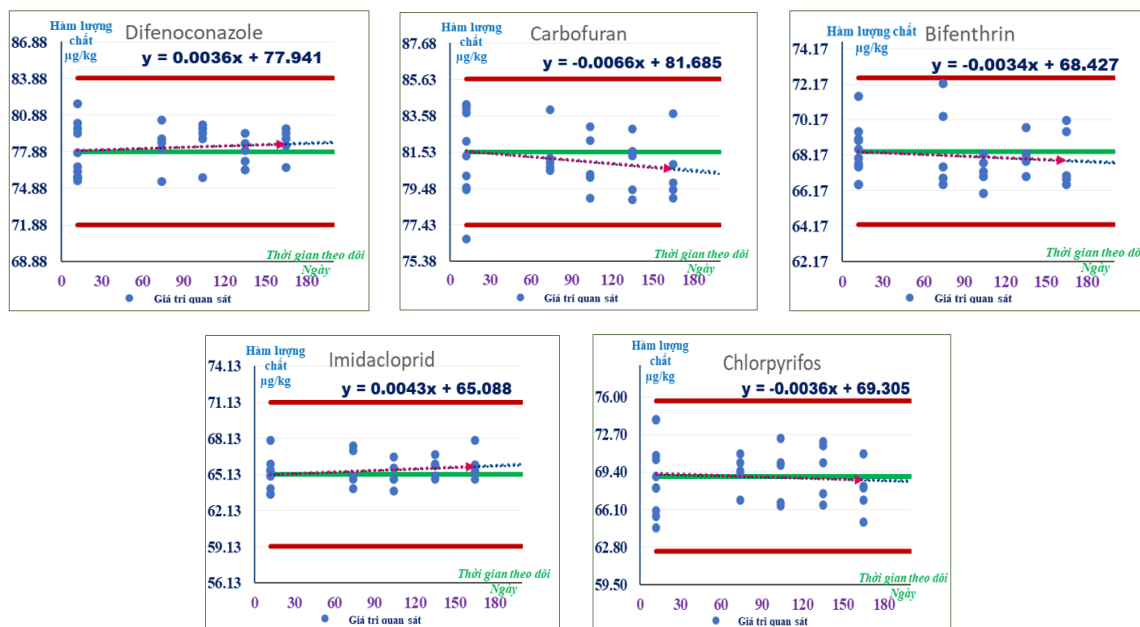
Mẫu chuẩn trong nghiên cứu này đã được sử dụng trong chương trình thử nghiệm thành thạo do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia tổ chức, với sự tham gia của 07 phòng thí nghiệm trên toàn quốc. Các phòng thí nghiệm tham gia sử dụng cả phương pháp sắc ký lỏng và sắc ký khí (**Bảng S6-S11**). Giá trị ấn định của chương trình được tính từ kết quả đồng thuận của các phòng thí nghiệm tham gia. Kết quả được thể hiện trong **Bảng 4**.

Bảng 4. Giá trị ổn định (x_{pt}), độ lệch chuẩn (σ_{pt}) của chương trình thử nghiệm thành thạo, độ không đảm bảo đo của giá trị ổn định (u_x) và giá trị được chứng nhận của mẫu chuẩn

STT	Chất phân tích	Giá trị ổn định x_{pt} ($\mu\text{g/kg}$)	σ_{pt} ($\mu\text{g/kg}$)	u_x ($\mu\text{g/kg}$)	Giá trị được chứng nhận ($\mu\text{g/kg}$)
1	Difenoconazole	77,90	9,07	2,34	77,90
2	Carbofuran	82,50	15,19	6,49	81,55
3	Bifenthrin	68,10	11,80	8,58	68,38
4	Imidacloprid	67,70	8,05	0,63	65,15
5	Chlorpyrifos	69,80	13,21	6,25	69,04

3.4. Đánh giá độ ổn định lâu dài và độ không đảm bảo đo

Biểu đồ theo dõi độ ổn định dài hạn của 5 HCBVTV trong mẫu chuẩn được trình bày trong **Hình 3**. Giá trị quan sát thực tế được biểu thị bằng các điểm màu xanh, phương trình hồi quy tuyến tính được thể hiện bằng đường mũi tên, 2 đường màu đỏ đại diện cho giới hạn trên và giới hạn dưới được tính bằng giá trị chứng nhận cộng/trừ khoảng chấp nhận (trong nghiên cứu này khoảng chấp nhận được tính bằng u_{hom}). Có thể thấy rằng các giá trị quan sát trong 6 tháng đều nằm trong khoảng chấp nhận. Mẫu cho thấy độ ổn định trong suốt thời gian theo dõi (6 tháng) (**Bảng S12, Hình S1**). Đồng thời, dựa trên cách đánh giá độ ổn định dài hạn nêu ở mục 2.3.2.2, thời hạn sử dụng ước tính của mẫu chuẩn là ít nhất là 2 năm. Từ đó, thời hạn 2 năm được sử dụng để tính độ không đảm bảo đo dài hạn (u_{lts}) của mẫu chuẩn theo công thức (9). Kết quả được trình bày trong **Bảng 5**. Ngoài ra, mẫu chuẩn sẽ tiếp tục được theo dõi độ ổn định thực tế theo thời gian.



Hình 3. Đồ thị theo dõi ổn định dài hạn của 5 HCBVTV trong sữa bột

Độ không đảm bảo đo của quá trình mô tả đặc tính này (u_{char}) được tính theo công thức (11), kết quả cũng được thể hiện trong **Bảng 5** cho từng HCBVTV. Độ không đảm bảo đo của mẫu chuẩn (u_{CRM}) được tính theo công thức (10) gồm 3 thành phần: Độ không đảm bảo đo đồng nhất (u_{hom}), độ không đảm bảo đo ổn định dài hạn (u_{lts}) và độ không đảm bảo đo mô tả đặc tính (u_{char}). Từ đó, có thể tính được độ không đảm bảo đo mở rộng của mẫu chuẩn ($U_{CRM} = 2 \times u_{CRM}$) có hệ số $k = 2$. Kết quả được thể hiện trong **Bảng 5**.

So sánh các giá trị ổn định của chương trình thử nghiệm thành thạo với giá trị chứng nhận của mẫu chuẩn có tính đến độ không đảm bảo đo theo phương trình 12 (mục 2.4) cho thấy sự phù hợp của các giá trị được chứng nhận của mẫu chuẩn với giá trị ổn định của chương trình thử nghiệm thành thạo. Điều này khẳng định độ tin cậy về giá trị được chứng nhận của mẫu chuẩn của nghiên cứu này, đồng thời chứng minh mẫu chuẩn có thể sử dụng hiệu quả cho quá trình phân tích 5 HCBVTV.

Bảng 5. Độ không đảm bảo đo của 5 loại HCBVTV trong mẫu chuẩn

STT	Chất phân tích	u_{hom} ($\mu\text{g/kg}$)	u_{char} ($\mu\text{g/kg}$)	u_{lts} ($\mu\text{g/kg}$)	Độ không đảm bảo đo mở rộng (U_{CRM}) ($\mu\text{g/kg}$) ($k=2$)
1	Difenoconazole	3,00	1,20	4,04	10,35
2	Carbofuran	2,05	1,03	4,46	10,02
3	Bifenthrin	2,07	0,83	3,61	8,47
4	Imidacloprid	0,91	0,52	2,76	8,22
5	Chlorpyrifos	3,32	1,49	5,97	13,97

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sản xuất thành công mẫu chuẩn 5 loại HCBVTV (difenoconazole, carbofuran, bifenthrin, imidacloprid, chlorpyrifos) trong sữa bột phù hợp theo tiêu chuẩn ISO 17034:2016. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), tương tự điều kiện bảo quản sữa bột trên thực tế, góp phần giảm đáng kể chi phí bảo quản và vận chuyển so với các mẫu chuẩn yêu cầu bảo quản lạnh. Theo kết quả nghiên cứu, mẫu chuẩn được dự đoán là ổn định với cả 5 HCBVTV trong ít nhất 2 năm. Độ tin cậy và ổn định của mẫu chuẩn đã được khẳng định thông qua việc tổ chức thành công chương trình thử nghiệm thành thạo với sự tham gia của 07 phòng thí nghiệm ở Việt Nam, sử dụng cả phương pháp sắc ký lỏng và sắc ký khí. Giá trị chứng nhận của mẫu phù hợp với giá trị ấn định từ sự đồng thuận của các phòng thí nghiệm tham gia.

TÀI LIỆU BỔ SUNG

Tài liệu bổ sung (Bảng S1-S12, Hình S1) được đăng tải tại <https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4543>

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. K. L. Bassil, C. Vakil, M. Sanborn, D. C. Cole, J. S. Kaur, and K. J. Kerr, "Cancer health effects of pesticides," *Canadian Family Physician*, vol. 53, no. 10, pp. 1704–1711, 2007.
- [2]. Ministry of Health, "50/2016/TT-BYT, Maximum Limits On Residues Of Pesticide In Food," 2016 (in Vietnamese) [Online]. Available <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/The-thao-Y-te/Thong-tu-50-2016-TT-BYT-gioi-han-toi-da-du-luong-thuoc-bao-ve-thuc-vat-trong-thuc-pham-337490.aspx>.
- [3]. Marcella Vitoria Galindo et al., "Comprehensive analysis of contaminants in Brazilian infant formulas: Application of QuEChERS coupled with UHPLC-QqQ-MS/MS and suspect screening-unknown analysis by UHPLC-Q-Orbitrap-MS," *Journal of Chromatography A*, vol. 1726, 464967, 2024.
- [4]. Vandana Tripathy et al., "Monitoring and dietary risk assessment of pesticide residues in brinjal, capsicum, tomato, and cucurbits grown in Northern and Western regions of India," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 110, 104543, 2022.
- [5]. M. M. Gómez-Ramos, C. Ferrer, O. Malato, A. Agüera, and A. R. Fernández-Alba, "Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies," *Journal of Chromatography A*, vol. 1287, pp. 24–37, 2013.
- [6]. H. V. Botitsi, S. D. Garbis, A. Economou, and D. F. Tsipi, "Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 30, no. 5, pp. 907–939, 2011.
- [7]. K. Pszczolińska and M. Michel, "The QuEChERS Approach for the Determination of Pesticide Residues in Soil Samples: An Overview," *Journal of AOAC International*, vol. 99, no. 6, pp. 1403–1414, 2016.
- [8]. AOAC Official Method 2007.01, "Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate," 2007.
- [9]. TCVN 9333:2012, "Foods - Determination of pesticides residue by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry - QuEChERS method," 2012 (in Vietnamese). [Online]. Available <https://thuvienphapluat.vn/tcvn/cong-nghe-thuc-pham/tcvn-9333-2012-thuc-pham-xac-dinh-du-luong-thuoc-bao-ve-thuc-vat-phuong-phap-912767.aspx>.
- [10]. TCVN 8245:2009, "Reference materials – General and statistical principles for certification," 2009 (in Vietnamese). [Online]. Available: <https://thuvienphapluat.vn/TCVN/Linh-vuc-khac/TCVN-8245-2009-mau-chuan-Nguyen-tac-chung-nguyen-tac-thong-ke-trong-chung-nhan-908063.aspx>.

- [11]. T. Yarita et al., "Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis," *Talanta*, vol. 119, pp. 255–261, 2014.
- [12]. T. Otake et al., "Development of green onion and cabbage certified reference materials for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 16, pp. 8568–8574, 2011.
- [13]. T. Otake et al., "Development of certified reference material for quantification of two pesticides in brown rice," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 18, pp. 8208–8212, 2009.
- [14]. J. K. Quirijns, K. G. Van Der Paauw, E. J. Mulders, and B. Griepink, "Development of Milk Powder Reference Materials BCR-CRM 187,188. Part I. Preparation, Homogeneity, and Stability," *Journal of Analytical chemistry and microbiology*, vol. 73, no. 5, pp. 773–776, 1990.
- [15]. Y. Chen et al., "Preparation of a reference material for tea containing five pesticide residues and its evaluation in an interlaboratory comparison study in China," *Accreditation and Quality Assurance*, vol. 27, no. 2, pp. 93–101, 2022.
- [16]. T. Otake et al., "Development of apple certified reference material for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides," *Food Chemistry*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1243–1249, 2013.
- [17]. F. Zhao, J. Liu, B. Han, and J. Luo, "Investigation and Validation of Detection of Storage Stability of Difenconazole Residue in Mango," *Journal of Food Quality*, vol. 2019, no. 1, 5641643, 2019.
- [18]. Y. Liu, X. Qin, Q. Chen, Q. Zhang, P. Yin, and Y. Guo, "Effects of moisture and temperature on pesticide stability in corn flour," *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 85, no. 2, pp. 191–201, 2020.
- [19]. ISO 33405:2024 Reference materials — Approaches for characterization and assessment of homogeneity and stability, Ed. 1, 2024.
- [20]. ISO/IEC 17043:2023 Conformity assessment — General requirements for the competence of proficiency testing providers, Ed. 2, 2023.
- [21]. ISO/IEC 17025:2017 General Requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 2017.
- [22]. CEN Method 15662 Foods of plant origin - Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - Modular QuEChERS-method, European Standard, 2018.
- [23]. ISO 33405:2024 Reference materials — Approaches for characterization and assessment of homogeneity and stability, Ed. 1, 2024.
- [24]. [24]. ISO 17034:2016 General requirements for the competence of reference material producers, Ed. 1, 2016.
- [25]. ISO 5725-2:2019 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method, Ed. 2, 2019.
- [26]. ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison, 2015.
- [27]. AOAC INTERNATIONAL – Appendix F (Table 7) Guidelines for Standard Method Performance Requirements, 2016.