

DETERMINATION RESIDUE SULFANAMIDES IN SEAFOODS, FOODS & HONEY BY LC-MS/MS

Biên soạn	Xem xét	Phê duyệt
Nguyễn Văn Lên	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

[illegible]

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định dư lượng kháng sinh họ Sulfonamides trong thủy sản, thực phẩm và mật ong bằng LC/MS/MS.

Giới hạn của phương pháp:

LOD: 3 µg/kg

LOQ: 10 µg/kg

II. Tài liệu tham khảo

- BS EN 15662: 2008.
- CLG – SUL4.04: Screening, Quantitation and Confirmation of Sulfonamides by Liquid Chromatography – tandem mass spectrometry. Revision 04, 03/14/2016

III. Nguyên tắc

Mẫu được chiết lên pha hữu cơ, cô quay, định mức lại và được định tính và định lượng trên LC/MS/MS.

IV. An toàn phòng thử nghiệm

- Nhân viên phải tuân thủ nội quy phòng thử nghiệm.
- Nhân viên vào phòng thử nghiệm bắt buộc phải mặc áo Blouse.
- Khi thao tác với hóa chất độc hại phải được thao tác trong tủ hút, nhân viên phải mang găng tay, kính bảo hộ và mang khẩu trang.
- Tất cả hóa chất sau khi sử dụng phải được thu hồi vào thùng chứa theo đúng quy định để thực hiện tiêu hủy theo đúng quy định pháp luật.
- Tuyệt đối không được ăn uống trong khu vực thử nghiệm.

B. PHÂN TÍCH

I. thiết bị và dụng cụ phân tích.

1. Thiết bị

- Cân phân tích độ chính xác 0,1 mg.
- Cân phân tích độ chính xác 0.01mg
- Máy ly tâm
- Máy lắc Vortex.
- Màng lọc PTFE/ Nilon, 13 mm, 0,45 µm
- Ống ly tâm 15mL, 50mL có nắp đậy
- Bình định mức: 10mL, 25 mL
- Pipet vạch: 0.1mL, 0.5mL, 1mL

- Dụng cụ thủy tinh các loại

2. Thiết bị phân tích:

Hệ thống LC/MS/MS

- Hệ thống LC/MS/MS bao gồm Accela 1250 Pump, Accela autosampler và đầu dò khối phổ 3 tứ cực TSQ Quantum Ultra (Thermal Scientific).
- Cột sắc ký lỏng pha đảo pha đảo: C₁₈, 150mm x 2.0mm, kích thước hạt 5µm (hoặc tương đương).

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất.

1. Hóa chất

- Nước cất khử ion LC/MS (hoặc tương đương type I)
- Acetonitrile, HPLC
- HCOOH: Tkpt
- Bột C18 (size 40 – 60A⁰)
- Bột PSA (Diamine) (size 40 – 60A⁰)
- Sodium chloride – Tkpt
- Magnesium sulfate anhydrous – Tkpt.
- Chuẩn phân tích: Sulfaguanidine, Sulfacetamide, Sulfadimidine (Sulfathiazine), Sulfamethoxazole, Sulfamethoxypyridazine, Sulfamethoxazole, Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfabenzamide, Sulfamerazine, Sulfadimethoxine, Sulfamethizole, Sulfameter, Sulfadoxine, Sulfamoxole, Succinyl – Sulfathiazole, Sulfaclozine (Sulfachloropyrazine), Sulfachloropyridazine, Sulfisomidine, Sulfamonomethoxine, Sulfisoxazole, Sulfaphenazole, Sulfapyridine, Sulfasalazine, Sulfisoxazole sodium và Sulfanilamide của Sigma – aldrich hoặc chuẩn tương đương có giấy chứng nhận COA, nồng độ rõ ràng.

2. Dung dịch hóa chất

❖ Dung dịch pha động:

- H₂O (0.1% HCOOH): Cho 1ml acid Formic vào 1L nước LC/MS.
- Acetonitrile (0.1% HCOOH): Cho 1ml acid Formic vào 1L Acetonitrile.

❖ Dung dịch chuẩn

a. Dung dịch chuẩn gốc: (Bảo quản trong ngăn đá, sử dụng trong 01 năm)

- Các dung dịch chuẩn 1000 mg/L được pha đơn.
- Cân khoảng 10 mg chuẩn vào các bình định mức 10 mL, định mức đến vạch Acetonitrile. Ghi nhận khối lượng đã cân và lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn.
- Nồng độ chuẩn Sulfonamides được tính theo công thức sau:

$$C = \frac{m_{mg} * 1000}{V_{ml}} * pure\%$$


$$C = \frac{m.M_{base}}{V.M_{salt}}.pure\%$$

Trong đó:

- o m: Khối lượng chuẩn.
- o V: Thể tích định mức
- o M_{base}: khối lượng mol phân tử của chất chuẩn ở dạng base.
- o M_{Salt}: Khối lượng mol phân tử chất chuẩn ở dạng muối, ngậm nước,...

- b. Dung dịch chuẩn trung gian: (bảo quản trong ngăn mát, sử dụng trong 03 tháng)
- Dung dịch chuẩn 40 mg/L: Rút 1.0 mL chuẩn gốc (1000 mg/L) vào bình 25 mL, định mức đến vạch bằng methanol.
 - Dung dịch chuẩn 2.0mg/L: Rút 0.5 mL chuẩn 40 mg/L vào bình 10 mL, định mức đến vạch bằng hỗn hợp pha động acetonitrile/H₂O (1:3)
 - Dung dịch chuẩn 200µg/L: Rút 1.0ml chuẩn 2.0mg/L vào bình 10 ml, định mức lên bằng hỗn hợp pha động acetonitrile/H₂O (1/3).

- c. Dung dịch chuẩn làm việc: (bảo quản trong ngăn mát, sử dụng trong 15 ngày)

 Chiết chuẩn trên nền mẫu với nồng độ 2µg/kg - 100µg/kg

Đối với nền mẫu thủy sản, thịt:

STT	Thể tích chuẩn µL	Nồng độ chuẩn sử dụng, µg/L	Khối lượng mẫu, g	Nồng độ đường chuẩn, µg/kg
Std1	50	200	5.0	2
Std2	100	200	5.0	4
Std3	25	2000	5.0	10
Std4	50	2000	5.0	20
Std5	100	2000	5.0	40
Std6	250	2000	5.0	100

Đối với nền mẫu Mật ong, sữa

STT	Thể tích chuẩn µL	Nồng độ chuẩn sử dụng, µg/L	Khối lượng mẫu, g	Nồng độ đường chuẩn, µg/kg
Std1	20	200	2.0	2
Std2	40	200	2.0	4
Std3	10	2000	2.0	10

Std4	20	2000	2.0	20
Std5	40	2000	2.0	40
Std6	100	2000	2.0	100

🌈 Chuẩn được chiết giống mẫu theo B.IV.

❖ **Ghi chú:**

- Do khối lượng cân chuẩn rắn có thể không đúng 10mg vì vậy nhân viên pha chuẩn phải sử dụng số liệu cân chuẩn để tính lại nồng độ thật của chuẩn.
- Các chuẩn trung gian phải được tính để pha được nồng độ như qui định.

III. Quy trình phân tích.

1. Thực hiện QA/QC

Khi thực hiện phân tích mẫu phải thực hiện các mẫu sau:

- Mẫu Blank hoá chất: Sử dụng tất cả các hoá chất chiết mẫu, nhưng không có mẫu nhằm kiểm soát độ sạch của hoá chất và dụng cụ.
- Mẫu blank sample (nếu có)

2. Xử lý mẫu

❖ Mẫu được đồng nhất theo mục 4.2 của HD.KT.022

Cân m (g) mẫu [Mật ong, sữa: 2g; các sản phẩm còn lại: 5g] vào ống tâm 50 ml, sau đó thêm vào 10ml nước cất lắc đều cho mẫu tơi ra, dùng pipet thêm vào 10 ml Acetonitrile (1% Formic acid), siêu âm 5 phút, lắc mạnh trong 3 phút, siêu âm 30 phút. Sau đó thêm vào 1.5g NaCl, lắc mạnh trong 2 phút, thêm vào 4g MgSO₄ khan, lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm 3000 vòng/ phút. Rút 3ml lớp trên cho vào ống ly tâm 15ml có chứa 0.05mg PSA + 0.05mg C18 + 0.15g MgSO₄ khan, vortex trong 1 phút, ly tâm. Sau đó lấy 2.0ml lớp trên cho vào bình cầu cô quay khô, định mức lại bằng 1.0ml pha động, lọc phần dung dịch qua màng lọc 0.45µm vào lọ phân tích vial và phân tích trên LC/MS/MS. Nếu mẫu có hàm lượng lớn, nồng độ Sulfanamides trong dịch chiết vượt ngoài khoảng nồng độ dãy chuẩn thì pha loãng dịch chiết bằng nước.

3. Phân tích trên thiết bị LC/MS/MS:

🌈 Điều kiện LC/MS/MS

Cột sắc ký	Autosampler	LC				Sắc ký - MS
C ₁₈ : 150mm x 2.0mm x 5µm Hoặc cột tương đương	Injection: 20µL	Thời gian (min)	Tốc độ dòng (µL/min)	H ₂ O 0.1% FA (%)	Acetonitril e 0.1% FA (%)	✓ Interface: H-ESI (-) ✓ CID: 1.2 mTorr ✓ Tune file: tune file gần nhất
		0	450	80	20	
		2.5		80	20	
		5		70	30	
		7.5		5	95	
		11		5	95	
		11.2		80	20	
		12		80	20	

Hoạt chất	Ion mẹ	Ion con	CE
Sulfadimidine	279	92;108	20;20

🌈 Trình tự phân tích trên LC/MS/MS

- Mobile phase – Pha động định mức mẫu.
- Dây chuẩn.
- Mobile phase – Pha động định mức mẫu.
- Chuẩn check.
- Mẫu Blank.
- Mẫu
- Mẫu QC
- Chuẩn check

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm xen kẽ một điểm chuẩn sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc là một điểm chuẩn.

C. TÍNH KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích pic ion định lượng Sulfonamides với nồng độ tương ứng.

Hàm lượng Sulfonamides trong mẫu kiểm được tính theo công thức sau:

$$C = C_0$$

Trong đó:

- C: hàm lượng Sulfonamides có trong mẫu kiểm, $\mu\text{g/kg}$
- C_0 : nồng độ Sulfonamides trong dịch chiết tính từ đường chuẩn, $\mu\text{g/kg}$

Lưu ý: Với những mẫu không phát hiện, không cần xây dựng đường chuẩn mà chỉ cần tiêm chuẩn ở một nồng độ duy nhất để xác nhận và so sánh

D. BẢO ĐẢM KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

- Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (ít nhất là 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R^2) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995.
- Tỷ số ion của ion kém nhạy hơn so với ion nhạy nhất trong mẫu dương tính không được khác biệt quá giới hạn quy định so với tỷ số tương đương của chuẩn trong cùng một điều kiện phân tích.

Tỷ số cường độ ion đối với ion base peak	Mức sai biệt tối đa cho phép	ΔR_t
>50%	$\pm 20\%$	$\leq 2.5\% (\leq 12s)$
>20 đến 50%	$\pm 25\%$	
>10 đến 20%	$\pm 30\%$	
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	

- Mẫu Blank không phát hiện hoặc phát hiện $\leq \text{LOD}$.
- Hiệu suất mẫu QC phải nằm trong khoảng hiệu lực phương pháp 70-120%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích BM.15.04a và BM.15.06.