

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 1/9
--	----------------------------	---

**ĐỊNH LƯỢNG CÁC CHẤT CHUYỂN HÓA THUỘC NHÓM NITROFURAN TRONG
THỦY SẢN VÀ SẢN PHẨM THỦY SẢN, THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT, THỨC ĂN
CHĂN NUÔI, NƯỚC TIỂU BẰNG SẮC KÝ LÔNG GHÉP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA
TỬ CỰC (LC/MS/MS)**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Văn Lên	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
01		Thay đổi Header	04/01/2017
02	B.IV	Bổ sung phần xử lý mẫu thịt, sản phẩm thịt và TĂCN	04/05/2018

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 2/9
--	----------------------------	---

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

- Tài liệu này qui định phương pháp xác định hàm lượng của các chất chuyển hóa thuộc nhóm nitrofurantoin bao gồm furazolidone, furaltadone, nitrofurantoin và nitrofurazone trong thủy sản và sản phẩm thủy sản, Thịt và sản phẩm thịt, Thức ăn chăn nuôi, Nước tiểu bằng sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).
- Giới hạn phát hiện của phương pháp cho bốn chất thuộc họ nitrofurantoin là:

Chỉ tiêu	Nền mẫu	LOD, $\mu\text{g/kg}$	LOQ, $\mu\text{g/kg}$
AOZ	-	0.1	0.3
AMOZ	-	0.1	0.3
AHD	Tôm, Cá, TẮCN	0.4	1.2
	Nước tiểu	0.7	2.2
SEM		0.5	1.8

II. Tài liệu tham khảo

- FDA April 1, 2004: Detection of Nitrofurantoin metabolites in Shrimp

III. Nguyên tắc

- Dư lượng của các chất chuyển hoá nhóm nitrofurantoin liên kết với mô trong sản phẩm thủy sản được thủy phân bằng axit clohydric loãng để thu được mạch nhánh của các chất nhóm nitrofurantoin. Các mạch nhánh này được dẫn xuất hoá bằng 2-nitrobenzaldehyde. Định tính và định lượng các chất dẫn xuất bằng thiết bị LC/MS/MS.

IV. An toàn phòng thử nghiệm

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.
- Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ.

1. Thiết bị

- Cân phân tích, độ chính xác 0,01 mg
- Máy ly tâm
- Máy lắc Vortex.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 3/9
--	----------------------------	---

- Màng lọc PTFE, 13mm, 0,45µm
- Máy pH
- Ống ly tâm 50mL, polypropylen, có nắp đậy
- Bình định mức: 10mL
- Pipet vạch: 0.1mL, 0.5mL, 1mL
- Pipet bầu: 1mL, 2mL, 5mL
- Micropipet: 200 µL và 1000 µL
- Dụng cụ thủy tinh các loại: ống Hatch, becher, erlen, ...
- Tủ ẩm (có thể điều chỉnh được khoảng nhiệt độ 37±2⁰C).
- Hệ thống cô quay

2. Hệ thống LC/MS/MS

- Hệ thống sắc kí lỏng: LC – MS/MS
- Cột sắc kí lỏng pha đảo XDB C18, 4.6x150mm, 5µm hay tương đương

II. HÓA CHẤT VÀ DUNG DỊCH THỬ

1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion, HPLC
- Methanol, HPLC
- Axit clohydric (HCl) 37%, d=1.18, P.A
- 2-nitrobenzaldehyt (C₇H₅NO₃) viết tắt là NB
- Natri hydroxyt khan (NaOH), P.A
- Ethyl axetat (CH₃COOC₂H₅), P.A
- Axit formic (HCOOH), Merck
- Di-kalihydrophosphat (K₂HPO₄), P.A

2. Dung dịch thử

- Axit clohydric 0,125M: hoà tan 5.2 mL HCl trong 500mL nước cất
- Natri hydroxit 0.8M: hoà tan 3.2g NaOH khan vào 100mL nước
- 2-nitrobenzaldehyt 50mM trong Methanol: hoà tan 0.0755g NBA vào 10mL MeOH.
- Di-kalihydrophosphat 0.1M: hoà tan 17,418g K₂HPO₄ vào 1000mL nước cất

3. Chất chuẩn

- a. Thông tin về chất chuẩn
 - 3-amino-2-oxazolidinon (AOZ) VETRANAL hoặc tương đương.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 4/9
--	----------------------------	---

- 5-metylmorfolino-3-amino-2-oxazolidinon (AMAZ) VETRANAL hoặc tương đương.
- 1-aminohydantoin hydrochloride (AHD) Dr. Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Semicarbazide- hydrochloride (SEM) Dr. EhrenstoferL hoặc tương đương.
- AOZ-d4 VETRANAL hoặc tương đương.
- AMAZ-d5 VETRANAL hoặc tương đương.
- AHD-3C13 VETRANAL hoặc tương đương.
- SEM D3 VETRANAL hoặc tương đương.

b. Dung dịch chuẩn

- Dung dịch chuẩn gốc (AOZ, AMAZ, SEM, AHD) (1000 mg/L) (*Bảo quản trong ngăn đá, hạn sử dụng 01 năm*): Cân chính xác 10 mg các chất chuẩn nói trên vào các bình định mức 10 mL riêng biệt, định mức đến vạch bằng metanol, lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn.
- Dung dịch chuẩn hỗn hợp 10 mg/L: (*Bảo quản trong ngăn đá, hạn sử dụng 06 tháng*): Từ mỗi dung dịch gốc AOZ, AMAZ, SEM, AHD (1000 mg/L) tương ứng, lấy 100 µL của AOZ, AMAZ (1000mg/L) và 500µl SEM, AHD (1000mg/L) cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với metanol .
- Hỗn hợp chuẩn (0.4mg/L): (*Sử dụng trong 01 tháng*): Từ chuẩn hỗn hợp 10 mg/L rút 1mL vào bình định mức 25mL, định mức đến vạch bằng MeOH.
- Hỗn hợp chuẩn 40 µg/L: rút 1.0mL chuẩn 0.4mg/L vào bình định mức 10mL, định mức lên đến vạch bằng nước.

c. Dung dịch nội chuẩn

- Dung dịch nội chuẩn gốc 200 mg/L (*Bảo quản trong ngăn đá, hạn sử dụng 01 năm*): Cân chính xác khoảng 2.0 mg AOZ-d4, AMAZ-d5, AHD-3C13 vào các bình định mức 10mL riêng biệt và định mức đến vạch bằng MeOH.
- Dung dịch nội chuẩn hỗn hợp 2.0 mg/L: (*Bảo quản trong ngăn mát, hạn sử dụng 06 tháng*): Lấy 1.0 ml của AOZ-d4, AMAZ-d5 (200mg/L) và 2.0 mL AHD-3C13 (200mg/L) vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch.
- Dung dịch nội chuẩn 0.1mg/L: (*Bảo quản trong ngăn mát, hạn sử dụng 03 tháng*): Từ hỗn hợp nội chuẩn 2.0mg/L rút 500µL vào bình định mức 10ml và định mức đến vạch bằng dung dịch HCl 0.125N.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 5/9
--	----------------------------	---

d. Đường chuẩn làm việc:

STT	Thể tích Chuẩn 40 µg/ L	Thể tích nội chuẩn 100µg/ L	Thể tích định mức, mL	Nồng độ chuẩn, µg/L
Std1	0.05 mL	0.2 mL	2.0	1.0
Std2	0.1 mL	0.2 mL	2.0	2.0
Std3	0.2 mL	0.2 mL	2.0	4.0
Std4	0.5 mL	0.2 mL	2.0	10.0
Std5	1.0 mL	0.2 mL	2.0	20.0
Std6	2.0 mL	0.2 mL	2.0	40.0

III. Thực hiện QA/QC

Trong quá trình phân tích mẫu, nhân viên phân tích phải thực hiện phân tích các mẫu sau để đảm bảo chất lượng phân tích:

- Blank.
- Mẫu QC

Mẫu được thực hiện theo mục B.IV.

IV. Thực hiện phân tích

1. Chuẩn bị mẫu

- Lượng mẫu được lấy ít nhất 250 g và xay nhuyễn.
- Chứa mẫu trong vật chứa kín khí có dung tích vừa đủ.
- Bảo quản mẫu ở -18 °C nếu chưa phân tích ngay.

2. Xử lý mẫu

a. Cân mẫu:

Cân m (g) mẫu vào ống ly tâm 50mL:

- Mẫu thủy sản, sản phẩm thủy sản, thịt, sản phẩm thịt: 5.0g
- Mẫu thức ăn chăn nuôi: 5.0g
- Nước tiểu: 5.0mL

b. Thủy phân và dẫn xuất hoá

- Thêm 10 mL axit clohydric 0.125M và 400µL dung dịch 2-NBA trong MeOH

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 6/9
--	----------------------------	---

vào các ống nghiệm chứa mẫu. Thêm 0.1ml hỗn hợp dung dịch nội chuẩn AOZ-D4, AMOZ-d5 và AHD-3C13 có nồng độ khoảng 100µg/L.

- Đậy nắp ống và vortex khoảng 2 phút. Kiểm tra lại pH ≤ 3.
- Ủ mẫu qua đêm (16 giờ) ở nhiệt độ 37 ± 2°C.

c. Trung hoà

- Lấy mẫu ra, để ổn định ở nhiệt độ phòng, thêm 1mL dung dịch K₂HPO₄ 0.1M và 1mL NaOH 0.8M, lắc đều. Điều chỉnh pH về (7.1 ÷ 7.5) bằng NaOH 0.8M (kiểm tra bằng máy đo pH). Vortex và ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 4000 vòng/phút. Kiểm tra lại pH phần dịch trong và điều chỉnh thêm nếu cần thiết. Vortex và ly tâm mẫu trong 10 phút ở tốc độ 4000 vòng/phút, lọc lấy phần trong (dung dịch A).

d. Chiết.

- Lọc phần trong vào ống ly tâm 50mL, thêm vào 2.0g NaCl, Chiết mẫu bằng Ethyl acetate (20mL x 2), chuyển lớp Ethyl acetate vào bình cầu 100mL. Cô quay và định mức lại bằng (**mẫu: 1mL; Chuẩn: 2.0mL**) dung dịch Methanol/nước: 1/4. Lọc mẫu qua màng lọc Nilon 0.45µm vào Vial và phân tích trên LC – MS/MS.

3. Điều kiện phân tích LC – MS/MS.

 Điều kiện cho bơm:

<i>Thời gian</i>	<i>A, % (ammonium acetate 10mM)</i>	<i>B, % MeOH</i>	<i>Tốc độ dòng, mL/phút</i>
0	70	30	0.4
1	70	30	
2	0	100	
5.2	0	100	
5.5	70	30	
7	70	30	

 Điều kiện cho hệ thống tiêm mẫu tự động:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 7/9
--	----------------------------	---

- Injection type: Full loop
- Injection volume: 100µl
- Needle height from bottom: 0.5
- Flush volume: 500
- Tray temp control: off
- Column oven control: off

Điều kiện MS

- Tune file name: tune file gần nhất
- Q2 gas pressure: 1.2mT
- MS acquire time: 7
- Ion source : H-ESI
- Polarity: positive
- Scan type: SRM

Ion định lượng và ion xác nhận của các chất họ nitrofurane

Chất cần phân tích	Chất đo đạt	Ion chính	Ion định lượng	Ion xác nhận
AOZ	2_NB_AOZ	236	134	104
AMOX	2_NB_AMOX	335.1	291	262
SEM	2_NB_SEM	209	192	166
AHD	2_NB_AHD	249	134	104
AHD3-C13	2_NB_AHD3C13	252	134	-
AOZ - d4	2_NB_AOZ_d4	240	134	-
AMOX -d5	2_NB_AMOX_d5	340.1	296	-
SEM – D3	2_NB_SEM_d3	212	168	-

Trình tự tiêm mẫu

- Pha động
- Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao.
- Pha động;
- Mẫu trắng;
- Mẫu cần phân tích;
- Mẫu thêm chuẩn.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 8/9
--	----------------------------	---

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

C. TÍNH KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỉ lệ diện tích pic ion định lượng của chất chuẩn và nội chuẩn thu được với nồng độ các chất chuẩn tương ứng. Kết quả chất cần phân tích trong mẫu được tính toán thông qua tỉ lệ diện tích của các ion định lượng tương ứng so với đường chuẩn, theo công thức sau:

$$C = \left(\frac{C_0 \times 1}{m} \right)$$

- Trong đó: - C: hàm lượng chất cần phân tích có trong mẫu kiểm, µg/kg
 - C₀: nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, µg/L
 - m: khối lượng mẫu phân tích, g

Riêng đối với Nitrofurantoin thì phải có một hệ số chuyển đổi từ Nitrofurantoin sang AHD (M_wNitrofurantoin = 238, M_wAHD = 115): C_{AHD} = C_{Nitrofurantoin} *115/238

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 QA\QC

- Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (ít nhất là 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R²) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995.
- Độ lệch tương đối thời gian lưu của chất phân tích trong mẫu và chuẩn (hoặc chuẩn trên nền mẫu nếu thời gian lưu chịu ảnh hưởng của nền mẫu) không được lệch quá ±5%.
- Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá ±20 % giá trị thật.
- Hiệu suất thu hồi mẫu QC nằm trong khoảng cho phép:

Nồng độ	Hiệu suất thu hồi
1 ppb	40 – 120
10 ppb	60 - 115
100 ppb	80 - 110

- Tỷ số ion:

Tỷ số ion	Độ lệch cho phép
> 50%	± 20%

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.003 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 04/05/2018 Trang: 9/9
--	----------------------------	---

Tỷ số ion	Độ lệch cho phép
> 20% - 50%	± 25%
> 10% - 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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