**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 LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA TỨ 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** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**A. GIỚI THIỆU**

1. **Phạm vi áp dụng**

* Tài liệu này qui định phương pháp xác định hàm lượng của các chất chuyển hóa thuộc nhóm nitrofuran 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 phưong pháp cho bốn chất thuộc họ nitrofuran là:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Chỉ tiêu | Nền mẫu | LOD, **µg/kg** | LOQ, **µg/kg** |
| AOZ | - | 0.1 | 0.3 |
| AMOZ | - | 0.1 | 0.3 |
| AHD | Tôm, Cá, TĂCN | 0.4 | 1.2 |
| Nước tiểu | 0.7 | 2.2 |
| SEM |  | 0.5 | 1.8 |

1. **Tài liệu tham khảo**

* FDA April 1, 2004: Detection of Nitrofuran metabolites in Shrimp

1. **Nguyên tắc**

* Dư lượng của các chất chuyển hoá nhóm nitrofuran liên kết với mô trong sản phẩm thủy sản được thuỷ phân bằng axit clohydric loãng để thu được mạch nhánh của các chất nhóm nitrofuran. 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.

1. **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.
* 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 ấm (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

### **Hóa chất**

### Nước cất 2 lần khử ion, HPLC

### Methanol, HPLC

### Axit clohydric (HCl) 37%, d=1.18, P.A

### 2-nitrobenzalđehyt (C7H5NO3) viết tắt là NB

### Natri hyđroxyt khan (NaOH), P.A

### Ethyl axetat (CH3COOC2H5), P.A

### Axit formic (HCOOH), Merck

### Di-kalihydrophosphat (K2HPO4), P.A

### **Dung dịch thử**

### Axit clohyđric 0,125M: hoà tan 5.2 mL HCl trong 500mL nước cất

### Natri hyđroxit 0.8M: hoà tan 3.2g NaOH khan vào 100mL nước

### 2-nitrobenzalđehyt 50mM trong Methanol: hoà tan 0.0755g NBA vào 10mL MeOH.

### Di-kalihydrophosphat 0.1M: hoà tan 17,418g K2HPO4 vào 1000mL nước cất

### **Chất chuẩn**

### Thông tin về chất chuẩn

* 3-amino-2-oxazolidinon (AOZ) VETRANAL hoặc tương đương.
* 5-metylmorfolino-3-amino-2-oxazolidinon (AMOZ) 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.
* AMOZ-d5 VETRANAL hoặc tương đương.
* AHD-3C13 VETRANAL hoặc tương đương.
* SEM D3 VETRANAL hoặc tương đương.

1. Dung dịch chuẩn

### Dung dịch chuẩn gốc (AOZ, AMOZ, 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, AMOZ, SEM, AHD (1000 mg/L) tương ứng, lấy 100 L của AOZ, AMOZ (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.

1. 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, AMOZ-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, AMOZ-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.

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 oC nếu chưa phân tích ngay.

### **Xử lý mẫu**

### 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

### Thuỷ phân và dẫn xuất hoá

### Thêm 10 mL axit clohyđric 0.125M và 400μL dung dịch 2-NBA trong MeOH 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 ± 2oC.

### 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.

### **Điều kiện phân tích LC – MS/MS.**

### Điều kiện cho bơm:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ***Thời gian*** | ***A, % (ammonium acetate 10mM)*** | ***B, %***  ***MeOH*** | ***Tốc độ dòng, mL/phút*** |
| 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:

### Injiection type: Full loop

### Injiection 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: tunefile gần nhất

### - Q2 gas pressure: 1.2mT

### - MS acquire time: 7

### - Ion source : H-ESI

### - Polarity: positive

### - Scan type: SRM

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| * Ion định lương và ion xác nhận của các chất họ nitrofuran | | | | |
| ***Chất cần phân tích*** | ***Chất đo đạt*** | ***Ion chính*** | ***Ion định lượng*** | ***Ion xác nhận*** |
| AOZ | 2\_NB\_AOZ | 236 | 134 | 104 |
| AMOZ | 2\_NB\_AMOZ | 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 | - |
| AMOZ -d5 | 2\_NB\_AMOZ\_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.

*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:

### Trong đó: - C: hàm lượng chất cần phân tích có trong mẫu kiểm, μg/kg

### - Co: 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 (MwNitrofurantoin = 238, MwAHD = 115**): C**AHD= CNitrofurantoin \*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 | Hiêu 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% - 50%  > 10% - 20%  ≤ 10% | ± 20%  ± 25%  ± 30%  ± 50% |

# E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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