

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9781 : 2012**

**ISO 834-3:1994**

Xuất bản lần 1

**MẬT ONG – XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG CÁC CHẤT CHUYỂN  
HÓA CỦA NITROFURAN (AOZ, AMOZ, AHD, SEM) BẰNG  
KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ LC-MS-MS**

*Honey – Determination of residues of nitrofuran metabolites (AOZ, AMOZ, AHD, SEM)  
by liquid chromatography mass – Spectrometry LC-MS-MS*

HÀ NỘI – 2013

## **Lời nói đầu**

TCVN 9781 : 2013 do Trung tâm kiểm tra vệ sinh Thú y TŪ1- Cục Thú y 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.

## Mật ong - Xác định dư lượng các chất chuyển hóa của nitrofuran (AOZ, AMOZ, AHD, SEM) bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS-MS

*Honey – Determination of residues of nitrofuran metabolites (AOZ, AMOZ, AHD, SEM) by liquid chromatography mass – Spectrometry LC-MS-MS*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định dư lượng các chất chuyển hoá của nitrofuran gồm furazolidone (AOZ), furaltadone (AMOZ), nitrofurantoin (AHD) và nitrofurazone (SEM) trong mật ong bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS-MS.

Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,3 µg / kg.

### 2 Nguyên tắc

Dư lượng các chất chuyển hoá nhóm nitrofuran trong mật ong được thủy phân bằng axit clohydric loãng để thu được mạch nhánh của các chất chuyển hoá nhóm nitrofuran gồm AOZ, AMOZ, AHD, SEM. Các mạch nhánh này được dẫn xuất hoá bằng 2-nitrobenzaldehyt để tạo thành NPAOZ, NPAMOZ, NPAHD, NPSEM. Xác định và định lượng các chất dẫn xuất này bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS-MS.

### 3 Thuốc thử

Trong tiêu chuẩn này, chỉ sử dụng thuốc thử có cấp độ tinh khiết, phân tích và nước cất hai lần đã loại ion.

- 3.1 Chuẩn 3-amino-2-oxazolidinon (AOZ), 99,0 %;
- 3.2 Chuẩn 5-metylmorfolino-3-amino-2-oxazolidinon (AMOZ), 99,0 %;
- 3.3 Chuẩn 1-amino-hydantoin hydroclorit (AHD), 99,0 %;
- 3.4 Chuẩn Semicarbazit (SEM) hydroclorit;
- 3.5 Chuẩn nội 1-amino-hydantoin-d<sub>2</sub> hydroclorid (AHD-d<sub>2</sub>);
- 3.6 Chuẩn nội Semicarbazit - <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N<sub>2</sub> (SEM-<sup>13</sup>C<sup>14</sup>N<sub>2</sub>);
- 3.7 Chuẩn nội 3-amino-2-oxazolidinon-d<sub>4</sub> hydroclorit (AOZ-d<sub>4</sub>);
- 3.8 Chuẩn nội 5-metylmorfolino-3-amino-2-oxazolidinon-d<sub>5</sub> (AMOZ-d<sub>5</sub>);

## TCVN 9781:2013

- 3.9 2-nitrobenzaldehyt ( $C_7H_5NO_3$ ), loại dùng cho phân tích;
- 3.10 Dimethyl sulfoxit, loại dùng cho phân tích;
- 3.11 Acetonitril, loại dùng cho LC/MS;
- 3.12 Methanol, loại dùng cho LC/MS;
- 3.13 Nước, loại dùng cho LC/MS;
- 3.14 Ethyl acetate, loại dùng cho phân tích;
- 3.15 Axit HCl 37 %, loại dùng cho phân tích;
- 3.16 NaOH, loại dùng cho phân tích;
- 3.17  $K_2HPO_4$ , loại dùng cho phân tích;
- 3.18 N-hexan, loại dùng cho phân tích;
- 3.19 Ammonium formate, loại dùng cho phân tích.
- 3.20 Dung dịch HCl 1 N trong nước:

Hoà tan 83,4 ml axit HCl 37 % (3.15) với nước cất hai lần đã loại ion, định mức trong bình định mức 1000 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 6 tháng.

- 3.21 Dung dịch 2-nitrobenzaldehyt 0,05 M trong dimethylsulfoxit:

Hoà tan 0,19 g 2-nitrobenzaldehyt (3.9) vào 25 ml dimethylsulfoxit (3.10). Dung dịch này chuẩn bị hàng ngày.

- 3.22 Dung dịch  $K_2HPO_4$  0,1 M trong nước:

Cân 1,78 g  $K_2HPO_4$  (3.17) vào cốc có mỡ, hòa tan trong 80 ml nước cất hai lần đã loại ion. Chính pH tới 7,4 và chuyển vào bình định mức 100 ml, sau đó thêm nước cất hai lần đã loại ion cho tới vạch. Bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 01 tháng.

- 3.23 Dung dịch NaOH 1 N trong nước:

Cân 4 g NaOH khan (3.16) vào cốc có mỡ, hòa tan bằng nước cất hai lần đã loại ion và chuyển vào bình định mức 100 ml, định mức bằng nước cất hai lần đã loại ion đến vạch. Bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 02 tháng.

- 3.24 Dung dịch chuẩn gốc AOZ, AMOZ, AHD, SEM, AOZ-d<sub>4</sub>, AMOZ-d<sub>5</sub>, SEM-<sup>13</sup>C<sup>14</sup>N<sub>2</sub>, AHD-d<sub>2</sub> 1000 µg / ml trong methanol:

Cân 50 mg mỗi loại chuẩn vào các bình định mức dung tích 50 ml riêng biệt (4.11). Hoà tan và định mức đến vạch bằng methanol (3.12) để được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000 µg / ml. Dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở -20 °C trong 6 tháng.

Hoà tan mỗi loại nội chuẩn đóng trong ampul bằng một thể tích methanol thích hợp để được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000 µg / ml. Dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở -20 °C trong 6 tháng.

**LƯU Ý:**

- Lượng chuẩn mỗi loại phải được điều chỉnh hợp lý để đạt nồng độ chuẩn gốc 1000 µg / ml sau khi tính toán và hiệu chỉnh theo giấy chứng nhận độ tinh khiết của nhà sản xuất.

- Thể tích methanol thích hợp phải được điều chỉnh hợp lý để đạt nồng độ chuẩn nội gốc 1000 µg / ml tùy theo quy cách đóng gói của nhà sản xuất.

**3.25 Dung dịch chuẩn hỗn hợp trung gian AOZ, AMOZ, AHD, SEM, 1000 µg / l trong methanol:**

Lấy 100 µl từ mỗi dung dịch chuẩn gốc (3.24) cho vào bình định mức 100 ml, định mức đến vạch với methanol (3.12). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở -20 °C trong 3 tháng.

**3.26 Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc AOZ, AMOZ, AHD, SEM, 100 µg / l trong methanol:**

Từ dung dịch chuẩn trung gian (3.25) lấy 1000 µL cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch với methanol (3.12). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở 4 °C trong 1 tuần .

**3.27 Dung dịch chuẩn nội hỗn hợp trung gian AOZ-d<sub>4</sub>, AMOZ-d<sub>5</sub>, SEM-<sup>13</sup>C<sup>14</sup>N<sub>2</sub>, AHD- d<sub>2</sub> 1000 µg / l trong methanol:**

Từ dung dịch nội chuẩn gốc (3.24), lấy 100 µL cho vào bình định mức 100 ml, định mức đến vạch với methanol. Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở -20 °C trong 3 tháng.

**3.28 Dung dịch chuẩn nội hỗn hợp làm việc AOZ-d<sub>4</sub>, AMOZ-d<sub>5</sub>, SEM-<sup>13</sup>C<sup>14</sup>N<sub>2</sub>, AHD- d<sub>2</sub>, nồng độ 100 µg / l trong methanol:**

Lấy 1000 µl dung dịch nội chuẩn hỗn hợp trung gian (3.27) cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng methanol. Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở 4 °C trong 1 tuần.

**3.29 Dung dịch pha động:**

Pha động A: Methanol (3.12);

Pha động B: Dung dịch ammonium formate 1 mM

Cân 0,0315 g ammonium formate (3.19) vào cốc có mỏ, hoà tan và chuyển vào bình định mức 1000 ml bằng nước (3.13). Dung dịch này chuẩn bị hàng ngày.

## **TCVN 9781:2013**

### **3.30 Dung dịch hòa tan mẫu:**

Hòa tan dung dịch pha động B và methanol theo tỉ lệ 1:1.

## **4 Thiết bị, dụng cụ**

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

### **4.1 Hệ thống máy sắc ký lỏng khối phổ LC/MS/MS**

- Bơm 2 kênh dung môi biến đổi dòng;
- Detector MS / MS;
- Máy tính và phần mềm phân tích;
- Cột sắc ký RP C18, đường kính trong là 2,1 cm, kích thước hạt nhồi là 1,7  $\mu\text{m}$ , độ dài của cột là 50 mm;

### **4.2 Ống ly tâm polypropylene, dung tích 50 ml có nắp;**

### **4.3 Máy ly tâm lạnh, tốc độ 4000 r / min;**

### **4.4 Máy lắc ngang, 400 r / min;**

### **4.5 Máy lắc vortex, tốc độ 400 r / min;**

### **4.6 Bộ cô quay chân không, có điều chỉnh nhiệt độ;**

### **4.7 Bình quả lê, dung tích 50 ml;**

### **4.8 Máy đo pH, độ chính xác đến 0,01;**

### **4.9 Tủ ấm, có điều chỉnh nhiệt độ;**

### **4.10 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,1 mg;**

### **4.11 Bình định mức, dung tích 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml và 1000 ml;**

### **4.12 Pipet tự động, dung tích 50 $\mu\text{l}$ , 100 $\mu\text{l}$ , 250 $\mu\text{l}$ ; 1000 $\mu\text{l}$ ; 5000 $\mu\text{l}$ ;**

### **4.13 Ống thủy tinh, dung tích 10 ml;**

### **4.14 Lọ đựng mẫu, dung tích 1,5 ml;**

### **4.15 Đầu lọc nylon, đường kính lỗ 45 $\mu\text{m}$ .**

## **5 Lấy mẫu**

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này nhưng mẫu phân tích tại phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

## 6 Chuẩn bị mẫu

### 6.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân 5,0 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm (4.2). Cho vào 50 µl hỗn hợp chuẩn nội nitrofurantoin 100 µg / l (3.28).

### 6.2 Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu mật ong đã được xác định không nhiễm chất chuyển hóa của nitrofurantoin. Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu thử.

### 6.3 Chuẩn bị mẫu kiểm soát

Mẫu kiểm soát được chuẩn bị từ mẫu trắng như mẫu thử nhưng sau khi cân có bổ sung 50 µL hỗn hợp chuẩn nitrofurantoin 100 µg / l (3.26) vào mẫu. Lắc 30 giây (4.5), sau đó để yên 15 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

### 6.4 Chuẩn bị mẫu xây dựng đường chuẩn

Mẫu thêm chuẩn được chuẩn bị từ mẫu trắng. Cân 5,0 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml (4.2); cho dung dịch chuẩn hỗn hợp nitrofurantoin 100 µg / l (3.26) và hỗn hợp chuẩn nội nitrofurantoin 100 µg / l (3.28) vào các ống nghiệm có chứa mẫu trắng theo bảng 1. Tiến hành lắc 15 giây (4.5), sau đó để yên 15 min trước khi thực hiện các bước tiếp theo.

**Bảng 1 - Xây dựng đường chuẩn**

STT	Nồng độ chuẩn thêm vào (µg / l)	Thể tích chuẩn thêm vào (µl)	Nồng độ chuẩn lý thuyết (µg / kg)	Nồng độ nội chuẩn thêm vào (µg / l)	Thể tích chuẩn nội thêm vào (µl)	Nồng độ chuẩn nội (µg / kg)
1	100	5	0,1	100	50	1
2	100	10	0,2	100	50	1
3	100	50	1	100	50	1
4	100	100	2	100	50	1
5	100	250	5	100	50	1

## 7 Tiến hành thử nghiệm

### 7.1 Chiết mẫu và làm sạch mẫu

Thêm 10 ml nước (3.13), 1 ml HCl 1 N (3.20) vào từng lọ mẫu. Lắc trong 15 giây (4.5), sau đó lắc 15 min trên máy lắc mẫu (4.4) ở tốc độ 300 r / min. Tiếp theo, thêm cho 400 µL 2-nitrobenzaldehyt 0,05

## TCVN 9781:2013

M (3.21) vào tất cả các mẫu. Lắc 15 giây (4.5), sau đó ủ bằng tủ ấm (4.9) ở 60 °C trong 3 h hoặc ở 37 °C trong 16 h.

Sau khi ủ, lấy ra để cho mẫu trở về nhiệt độ phòng. Sau khi mẫu đã trở về nhiệt độ phòng, cho vào mỗi mẫu 10 ml n-Hexan (3.18). Lắc 15 giây ở (4.5). Ly tâm mẫu ở 3000 vòng trong 5 min (4.3). Loại bỏ lớp trên và lập lại bước này lần 2.

Tiếp theo cho vào mỗi mẫu 1 ml NaOH 1 N (3.23), 2 ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M (pH = 7,4) (3.22) và lắc đều. Tiếp theo, thêm 20 ml ethyl acetate (3.14). Lắc trong 5 giây ở (4.5), sau đó lắc đảo lộn 20 lần. Ly tâm mẫu ở 3000 vòng trong 5 min (4.3). Hút lớp trên vào bình quả lê 50 ml (4.7). Sau đó cho 10 ml ethyl acetate (3.14) vào và lập lại bước này. Thu lớp ethyl acetate gộp vào bình quả lê (4.7), sau đó làm khô bằng cô quay chân không ở nhiệt độ 45 °C (4.6).

Hòa tan phần cặn bằng 0,5 ml dung dịch hòa tan mẫu methanol: Amonium formate (3.30). Lắc trong 30 giây ở (4.5). Dịch thu được lọc qua đầu lọc 0,45 µm (4.15) vào lọ đựng mẫu (4.14) để phân tích sắc ký.

### 7.2 Tiến hành thử nghiệm trên LC-MS-MS

#### 7.2.1 Điều kiện HPLC

- Cột sắc ký RP C18, đường kính trong là 2,1 cm, kích thước hạt nhồi là 1,7 µm, độ dài của cột là 50 mm;

- Nhiệt độ cột theo nhiệt độ phòng;

- Thể tích bơm mẫu: 10 µl;

- Thời gian phân tích: 4 min;

- Tốc độ dòng: 0,4 ml / min;

Pha động: chương trình gradient thể hiện theo bảng 2.

**Bảng 2 - Chương trình pha động**

Thời gian (min)	A % (Methanol LC/MS)	B % (Dung dịch ammonium formate 1 mM)
0	55	45
2,0	55	45
2,1	90	10
3,5	90	10
3,6	55	45



### 7.2.2 Điều kiện trên MS

Điều kiện trên MS như sau:

Kiểu ion hóa:	ESI (+);
Nhiệt độ nguồn ion hóa:	150 °C;
Nhiệt độ hóa hơi dung môi:	400 °C;
Tốc độ dòng khí làm bay hơi dung môi:	600 l / h;
Tốc độ dòng khí qua khối nón:	30 l / h;

Các điều kiện phân ly MS/MS như sau:

**Bảng 3 - Điều kiện phân ly MS/MS**

Thành phần	Ion sơ cấp (m /z)	Ion thứ cấp (m /z)	Năng lượng mặt nón (V)	Năng lượng va chạm (eV)
NPAMAZ	335	262	24	16
		291 (*)	24	11
NPAMAZ-d <sub>5</sub>	340	296	24	11
NPAZ	236	104(*)	24	20
		134	24	12
NPAZ-d <sub>4</sub>	240	104	24	20
NPSEM	209	166 (*)	20	9
		192	20	12
NP IS-SEM	212	169	20	9
NPAHD	249	194	20	11
		178 (*)	20	16
NP-AHD-d <sub>2</sub>	251	180	20	16

GHI CHÚ: ion có kí hiệu (\*) là ion dùng để định lượng;

### 7.3 Trình tự bơm mẫu

#### 7.3.1 Bơm dung môi kiểm tra máy, dung dịch hòa tan mẫu (3.201);

## TCVN 9781:2013

7.3.2 Bơm các dung dịch lập đường chuẩn;

7.3.3 Bơm mẫu trắng;

7.3.4 Bơm mẫu kiểm soát;

7.3.5 Bơm mẫu thử.

## 8 Tính toán và biểu thị kết quả

### 8.1 Tính hệ số tín hiệu

Tính cho từng chất cần phân tích theo phương trình:  $RF = \frac{Sp}{Sp_{IS}}$

Trong đó: RF: hệ số tín hiệu;

Sp: tổng diện tích pic của các ion thứ cấp của chất cần phân tích;

Sp<sub>IS</sub>: diện tích pic của ion thứ cấp của chất chuẩn nội tương ứng.

### 8.2 Xây dựng đường chuẩn

Xây dựng phương trình bậc nhất giữa hệ số tín hiệu với nồng độ chất chuẩn cho vào mẫu thực được chuẩn bị mẫu theo mục 6.4. Phương trình có dạng:  $RF = ax + b$ .

Trong đó:

- RF: Hệ số tín hiệu, tính theo mục 8.1;

- x: nồng độ chất chuẩn thêm vào mẫu, chuẩn bị theo mục 6.4;

- b: điểm cắt của đường chuẩn với trục tung;

- a: hệ số góc của đường chuẩn.

Phương trình đạt yêu cầu khi hệ số hồi quy  $R^2 \geq 0,99$ .

### 8.3 Hàm lượng chất phân tích trong mẫu

Dư lượng chất cần phân tích trong mẫu được tính theo phương pháp đường chuẩn xây dựng theo mục 8.2. Nồng độ trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot F}{a}$$

Trong đó:

C: là nồng độ chất phân tích có trong mẫu, tính bằng  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ;

$C_x$ : là nồng độ chất phân tích đo được suy ra từ đường chuẩn,  $\mu\text{g} / \text{l}$ ;

V: là thể tích định mức cuối cùng, tính bằng ml;

F: là hệ số pha loãng mẫu khi đo (nếu không pha loãng,  $F = 1$ );

a: là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g);

#### 8.4 Biểu thị kết quả

Kết quả được biểu thị bằng đơn vị  $\mu\text{g} / \text{kg}$  (ppb), hai số sau dấu phẩy.

### 9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- Thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- Phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả thử nghiệm;
- Độ lặp lại của phương pháp;
- Kết quả thử nghiệm thu được.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Quy trình chuyển giao phương pháp phân tích chất chuyển hóa của nitrofurantoin trong mật ong của Cơ quan dịch vụ phân tích quốc tế (QSI) – Cộng hòa liên bang Đức;
  - [2] Nitrofurantoin metabolites in Honey. Standard Operating Procedure, # M-H220. JR laboratories Inc.
  - [3] Decision 2002/657/ CE.
-