

TCVN 11369:2016

Xuất bản lần 1

**THỦY SẢN VÀ SẢN PHẨM THỦY SẢN - XÁC ĐỊNH DƯ
LƯỢNG FLUOROQUINOLONE - PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ
LỎNG GHÉP HAI LẦN KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)**

*Fish and fishery products - Determination of fluoroquinolone residues -
Chromatography tandem mass spectrometric method (LC-MS/MS)*

HÀ NỘI - 2016

Standardization Administration of Vietnam

Lời nói đầu

TCVN 11369:2016 do Trung tâm Chất lượng nông lâm thủy sản vùng 1 - Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và thủy sản 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.

Thủy sản và sản phẩm thủy sản - Xác định dư lượng fluoroquinolone - Phương pháp sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ (LC-MS/MS)

*Fish and fishery products - Determination of fluoroquinolone residue - Liquid Chromatography
Tandem Mass Spectrometric method (LC-MS/MS)*

CẢNH BÁO – khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng hoặc các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng để xác định dư lượng các chất nhóm fluoroquinolone (ciprofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, oxonilic axit, flumequine) trong thủy sản và sản phẩm thủy sản bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ (LC-MS/MS).

Giới hạn phát hiện của phương pháp là:

Ciprofloxacin:	5,0 µg/kg
Enrofloxacin:	5,0 µg/kg
Sarafloxacin:	5,0 µg/kg
Oxonilic axit:	5,0 µg/kg
Flumequine:	5,0 µg/kg

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Nguyên tắc

Dư lượng nhóm fluoroquinolone trong mẫu thử được chiết bằng acetonitrile. Dịch chiết được làm sạch bằng magiê sulfat, bột C18 và đưa vào phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ LC-MS/MS để xác định và định lượng từng chất nhóm fluoroquinolone có trong mẫu.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích, nước loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác.

- 4.1 Chất chuẩn sarafloxacin, tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 95 %.
- 4.2 Chất chuẩn enrofloxacin, tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 95 %.
- 4.3 Chất chuẩn ciprofloxacin, tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 95 %.
- 4.4 Chất chuẩn flumequine, tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 95 %.
- 4.5 Chất chuẩn oxonilic acid, tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 95 %.
- 4.6 Chất chuẩn enrofloxacin D5, tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 95 %.
- 4.7 Axetonitril (CH_3CN), loại dùng cho LC-MS.
- 4.8 Nước (H_2O), loại dùng cho LC-MS.
- 4.9 Metanol (CH_3OH), loại dùng cho LC-MS.
- 4.10 Natri clorua (NaCl).
- 4.11 Kali dihydrogen phosphate (KH_2PO_4).
- 4.12 Magle sulfat (MgSO_4), khan.
- 4.13 Axít formic (HCOOH), tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 99 %.
- 4.14 Natri citrate tribasic dihydrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).
- 4.15 Natri hydrogencitrate sesquihydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$).
- 4.16 Bột C18, kích thước hạt 40 μm ;
- 4.17 Natri hydroxyt (NaOH).
- 4.18 Hỗn hợp A1

Cân ($2 \pm 0,1$) g magie sulfat khan (4.12); ($0,5 \pm 0,05$) g natri clorua (4.10); ($0,5 \pm 0,05$) g Natri citrate tribasic dihydrate (4.14) và ($0,25 \pm 0,05$) g Natri hydrogencitrate sesquihydrate (4.15) vào ống ly tâm nhựa 15 ml (5.11).

4.19 Hỗn hợp A2

Cân ($0,9 \pm 0,05$) g magie sulfat khan (4.12) và ($0,15 \pm 0,05$) g bột C18 (4.16) vào ống ly tâm nhựa 15 ml (5.11).

4.20 Dung dịch 5 % axit formic trong axetonitril

Lấy 5 ml axit formic (4.13) vào bình định mức 100 ml (5.18), bổ sung axetonitril tới vạch. Bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 250 ml (5.20) ở nhiệt độ phòng, dung dịch bền trong 6 tháng.

4.21 Dung dịch kali dihydrogen phosphate 30 mM

Cân 4,1 g kali dihydrogen phosphate (4.11) vào cốc thủy tinh 1000 ml (5.19), hòa tan với khoảng 900 ml nước (4.8), chỉnh pH 7.0 bằng dung dịch natri hydroxyt 1M (4.22). Chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức 1000 ml (5.18), định mức tới vạch bằng nước. Bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 1000 ml (5.20) ở nhiệt độ phòng, dung dịch bền trong 1 tháng.

4.22 Dung dịch natri hydroxyt 1 M

Cân 4 g natri hydroxyt (4.17) vào cốc thủy tinh 250 ml (5.19), hòa tan với khoảng 90 ml nước (4.8). Chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức 100 ml (5.18), định mức tới vạch bằng nước. Bảo quản trong chai nhựa tối màu 250 ml (5.20) ở nhiệt độ phòng, dung dịch bền trong 6 tháng.

4.23 Dung dịch chuẩn gốc nhóm fluoroquinolone 1000 mg/l

Cân khoảng 10 mg từng chuẩn đơn nhóm fluoroquinolone vào bình định mức 10 ml (5.18), thêm 7 ml metanol (4.9) và 0,1 ml natri hydroxyt 1 M (4.22). Đặt vào bể siêu âm cho đến khi chuẩn tan hoàn toàn, để dung dịch trở về nhiệt độ phòng, thêm metanol (4.9) đến vạch. Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ nhỏ hơn âm 18 °C, dung dịch bền trong 1 năm, thường xuyên kiểm tra độ bền của dung dịch chuẩn.

CHÚ THÍCH:

Tùy thuộc vào lượng cân, độ tinh khiết và gốc liên kết của từng chuẩn, tính toán lại nồng độ chuẩn thực tế.

4.24 Dung dịch chuẩn hỗn hợp nhóm fluoroquinolone trung gian 10 mg/l

Lấy 100 µl dung dịch từng chuẩn gốc nhóm fluoroquinolone 1000 mg/l (4.23) vào bình định mức 10 ml (5.18), thêm metanol (4.9) đến vạch. Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ nhỏ hơn âm 18 °C, dung dịch bền trong 3 tháng, thường xuyên kiểm tra độ bền của dung dịch chuẩn.

CHÚ THÍCH:

Tùy thuộc vào nồng độ chuẩn thực tế của các chuẩn đơn (4.7), điều chỉnh thể tích lấy cho phù hợp.

4.25 Dung dịch chuẩn hỗn hợp nhóm fluoroquinolone trung gian 1 mg/l

Lấy 1 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp nhóm fluoroquinolone trung gian 10 mg/l (4.24) vào bình định mức 10 ml (5.18), thêm metanol (4.9) đến vạch. Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, dung dịch bền trong 1 tháng.

4.26 Dung dịch chuẩn hỗn hợp nhóm fluoroquinolone trung gian 0,1 mg/l

Lấy 1 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp nhóm fluoroquinolone trung gian 1 mg/l (4.25) vào bình định mức 10 ml (5.18), thêm metanol (4.9) đến vạch. Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, dung dịch bền trong 1 tuần.

4.27 Dung dịch nội chuẩn enrofloxacin D5 1000-mg/l

Cân 10 mg nội chuẩn enrofloxacin D5 vào bình định mức 10 ml (5.18), thêm 7 ml metanol (4.9) và 0,1 ml natri hydroxyt 1M (4.22). Đặt vào bể siêu âm (5.6) cho đến khi chuẩn tan hoàn toàn, để dung dịch trở về nhiệt độ phòng, thêm metanol (4.9) cho đến vạch. Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ nhỏ hơn âm 18°C, dung dịch bền trong 1 năm.

CHÚ THÍCH:

Tùy thuộc vào lượng cân, độ tinh khiết và gốc liên kết của từng chuẩn, tính toán lại nồng độ chuẩn thực tế.

4.28 Dung dịch nội chuẩn enrofloxacin D5 trung gian 100 mg/l

Lấy 1 ml dung dịch nội chuẩn enrofloxacin D5 1000 mg/l (4.27) vào bình định mức 10 ml (5.18), thêm metanol (4.9) đến vạch. Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ nhỏ hơn âm 18°C, dung dịch bền trong 6 tháng.

CHÚ THÍCH:

Tùy thuộc vào nồng độ chuẩn thực tế của các chuẩn đơn (4.27), điều chỉnh thể tích lấy cho phù hợp.

4.29 Dung dịch nội chuẩn enrofloxacin D5 trung gian 10 mg/l

Lấy 1 ml dung dịch nội chuẩn enrofloxacin D5 100 mg/l (4.28) vào bình định mức 10 ml (5.18), thêm metanol (4.9) đến vạch. Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ nhỏ hơn âm 18°C, dung dịch bền trong 3 tháng, thường xuyên kiểm tra độ bền của dung dịch chuẩn.

4.30 Dung dịch nội chuẩn enrofloxacin D5 trung gian 1 mg/l

Lấy 1 ml dung dịch nội chuẩn enrofloxacin D5 10 mg/l (4.29) vào bình định mức 10 ml (5.18), thêm metanol (4.9) đến vạch. Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ nhỏ hơn âm 18°C, dung dịch bền trong 1 tháng.

4.31 Dung dịch axit formic 0,1 % (pha động A)

Lấy 1 ml axit formic (4.13) vào bình định mức 1000 ml (5.18) chứa sẵn 900 ml nước (4.8), lắc đều. Định mức tới vạch bằng nước (4.8), lọc bằng bộ lọc dung môi thủy tinh (5.15) và đuổi khí bằng cách siêu âm dung dịch trong bể siêu âm (5.6) 5 min trước khi sử dụng.

4.32 Dung môi hòa tan C

Lấy 10 ml metanol (4.9) cho vào bình định mức 100 ml (5.18), định mức tới vạch bằng dung dịch pha động A (4.31). Trộn đều, bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 100 ml (5.20) ở nhiệt độ phòng, dung dịch bền trong 1 tuần.

4.33 Dung dịch để dựng đường chuẩn

Pha hỗn hợp chuẩn nhóm fluoroquinolone ở các nồng độ: 0,0; 5,0; 15,0; 30,0; 60,0; 100,0 µg/l và nội chuẩn, enrofloxacin D5 ở nồng độ 25 µg/kg, cụ thể như sau:

Lấy 6 bình định mức 10 ml (5.18) ký hiệu S1, S2, S3, S4, S5, S6 thêm vào mỗi bình 250 µl nội chuẩn enrofloxacin D5 1 mg/l (4.30).

Thêm lần lượt 50; 150; 300; 600; 1000 µl hỗn hợp chuẩn fluoroquinolone 1 mg/l (4.25) vào các bình S2, S3, S4, S5, S6.

Định mức tới vạch các bình S1, S2, S3, S4, S5, S6 bằng dung dịch pha động A (4.31).

Bảo quản trong chai thủy tinh tối màu 15 ml (5.20) ở nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng 4 °C, dung dịch bền trong 1 tuần.

Hút lần lượt 1 ml các dung dịch S1, S2, S3, S4, S5, S6 vào 06 ống nghiệm chứa mẫu trắng (7.2.1) sau khi đã được làm khô ở bước 7.3.2.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Hệ thống máy sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS

- Bơm 2 kênh dung môi biến đổi dòng;
- Đầu dò MS-MS;
- Máy tính và phần mềm phân tích;

- Cột sắc ký pha đảo C18 1,8 μm , 2.1 x 100 mm có gắn cột bảo vệ cùng loại.

5.2 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,1 mg.

5.3 Cân kỹ thuật, có độ chính xác đến 0,01 g.

5.4 Tủ lạnh đông, có thể hoạt động liên tục ở nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng âm 18 °C.

5.5 Máy ly tâm, tốc độ tối thiểu 4000 r/min, ly tâm được ống 15 ml và 50 ml.

5.6 Bể siêu âm.

5.7 Hệ thống làm khô dung môi, hút chân không;

5.8 Máy lắc mẫu, tốc độ tối thiểu 3000 r/min.

5.9 Pipet pasteur, 150 mm, 3ml.

5.10 Ống ly tâm thủy tinh, dung tích 10 ml.

5.11 Ống ly tâm nhựa, dung tích 15; 50 ml có nắp.

5.12 Lọ đựng mẫu, dung tích 1,5 ml có nắp và đệm PTFE.

5.13 Đầu tip, dung tích 100; 200; 1000; 5000 μl ;

5.14 Máy xay mẫu;

5.15 Bộ lọc dung môi bằng thủy tinh;

5.16 Micropipet, dung tích 100; 200; 1000; 5000 μl ;

5.17 Bộ lấy dung môi tự động, thể tích 25 ml, điều chỉnh được;

5.18 Bình định mức thủy tinh, cấp chính xác loại A, dung tích 10; 100; 1000 ml;

5.19 Cốc thủy tinh, dung tích 250; 500; 1000 ml.

5.20 Chai thủy tinh tối màu, dung tích 15; 250; 500; 1000 ml.

5.21 Chai nhựa tối màu, dung tích 250 ml.

5.22 Màng lọc dung môi, đường kính 45 mm, kích thước lỗ 0,2 μm bằng PTFE;

5.23 Đầu lọc mẫu dùng ngay, đường kính 13 mm, kích thước lỗ 0,2 μm , làm bằng PTFE;

5.24 Xylanh tiêm, 1ml.

6 Lấy mẫu

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

Mẫu được bảo quản trong tủ đông ở nhiệt độ nhỏ hơn âm 18 °C cho đến khi xử lý

7 Cách tiến hành

7.1 Yêu cầu chung

Toàn bộ quy trình phân tích cần được thực hiện trong ngày.

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu trước khi đồng nhất phải được rã đông: Chuyển mẫu từ tủ đông để rã đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 min hoặc giữ nguyên bao gói kín xả dưới vòi nước trong 10 min.

Lấy phần ăn được của thủy sản và sản phẩm thủy sản cắt thành từng miếng nhỏ, đồng hóa mẫu bằng máy xay mẫu (5.15). Chuyển mẫu đã đồng nhất sang dụng cụ đựng mẫu, đậy nắp kín và lưu trữ ở nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng âm 18 °C. Khi thực hiện phân tích, phải đưa mẫu về nhiệt độ phòng.

Cân m gam ($2,0 \pm 0,1$) g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm nhựa 50 ml (5.11).

7.2.1 Chuẩn bị mẫu trắng và mẫu dụng đường chuẩn

Cân 07 mẫu, mỗi mẫu ($2,0 \pm 0,1$) g mẫu trắng đã đồng nhất vào 07 ống ly tâm nhựa 50 ml (5.11).

7.2.2 Chuẩn bị mẫu kiểm soát 20 µg/kg

Cân ($2,0 \pm 0,1$) g mẫu trắng đã đồng nhất vào ống ly tâm nhựa 50 ml (5.11), thêm 40 µl dung dịch chuẩn hỗn hợp fluoroquinolone 1 mg/l (4.25), trộn đều bằng máy lắc mẫu trong 2 min.

Thực hiện tối thiểu một mẫu kiểm soát trong một lô mẫu.

Độ thu hồi của mẫu kiểm soát tham khảo phụ lục A.

7.2.3 Bổ sung nội chuẩn enrofloxacin D5

Thêm vào 50 µl dung dịch nội chuẩn enrofloxacin D5 1 mg/l (4.30) vào tất cả các mẫu (bao gồm mẫu trắng, mẫu xây dựng đường chuẩn, mẫu kiểm soát và các mẫu thử). Lắc bằng máy lắc mẫu (5.8) trong 30 s, để 15 min trước khi tiến hành phân tích..

7.3 Chiết tách

7.3.1 Chiết mẫu

TCVN 11369:2016

Thêm 2 ml dung dịch kali dihydrogen phosphate 30 mM (4.21) vào các ống nghiệm chứa mẫu trắng, mẫu thử nghiệm, mẫu kiểm soát, đậy nắp, trộn đều trong 1 min trên máy lắc mẫu (5.8);

Thêm 5 ml (V_0) dung dịch 5% axit formic trong axetonitril (4.20), lắc đều trong 1 min;

Cho hỗn hợp A1 (4.18) vào, lắc đều 1 min, lắc trong 10 min ở 4500 r/min, siêu âm trong 10 min;

Lý tâm tại 4500 r/min trong 10 min ở nhiệt độ 10°C;

Chuyển 4,5 ml dịch phía trên vào ống 15 ml có chứa hỗn hợp A2 (4.19);

Lắc bằng máy lắc mẫu (5.8) trong 10 min, siêu âm trong 10 min, lý tâm mẫu tại 4500 r/min trong 10 min ở nhiệt độ 10 °C.

7.3.2 Xử lý dịch chiết

Lấy 2 ml dịch chiết vào ống thủy tinh 15 ml khác, đem thổi khô bằng hệ thống làm khô dung môi (5.7) ở nhiệt độ không quá 40 °C;

Hòa tan phần cặn còn lại bằng 0,8 ml dung môi hòa tan C (4.32), lắc mẫu trong 30 min bằng máy lắc mẫu (5.8). Lọc qua đầu lọc mẫu dùng ngay 0,2 μ m (5.23) bằng xylanh tiêm 1 ml (5.24) vào lọ đựng mẫu 1,5 ml (5.12), đậy kín nắp, phân tích trên LC-MS/MS.

7.4 Điều kiện phân tích trên LC-MSMS

7.4.1 Yêu cầu chung

Đảm bảo các pic sắc ký có dạng phân bố Gauss, thời gian lưu (t_R) của các chất phải bằng hoặc lớn hơn hai lần thể tích chết của cột. Mỗi chất phân tích thu được tỉ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) lớn hơn 3 cho các phân mảnh ion và luôn tồn tại 4 điểm nhận dạng (IP) bao gồm 1 ion mẹ, 2 ion con. không có pic nhiễu tại vị trí của pic phân tích.

7.4.2 Điều kiện phân tích trên LC (tham khảo phụ lục B)

7.4.3 Điều kiện phân tích trên đầu dò MSMS (tham khảo phụ lục C)

7.4.4 Thời gian lưu và các phân mảnh ion (tham khảo phụ lục D)

7.4.5 Trình tự bơm mẫu (tham khảo)

Dung môi (pha động); các dung dịch chuẩn; mẫu trắng; mẫu kiểm soát; mẫu thử. Sau 10 mẫu phải bơm lại một điểm chuẩn hoặc mẫu kiểm soát (7.2.2).

7.5 Xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn được xây dựng dưới dạng $y = ax + b$ dựa trên tỉ số S_S/S_{IS} (y) theo C_S/C_{IS} (x) với:

S_s, C_s là diện tích pic và nồng độ của chất chuẩn tương ứng;

S_{is}, C_{is} là diện tích pic và nồng độ chất nội chuẩn enrofloxacin D5 trong mẫu tương ứng.

Giá trị hệ số chặn nên gần giá trị 0 và hệ số tương quan hồi quy (r^2) phải lớn hơn hoặc bằng 0,99.

8 Tính kết quả

8.1 Hàm lượng từng chất trong nhóm fluoroquinolone trong mẫu thử

Hàm lượng từng chất trong nhóm fluoroquinolone, X , biểu thị bằng microgam trên kilogam ($\mu\text{g/kg}$), được tính theo công thức:

$$X = X_0 \times F$$

trong đó:

X_0 là nồng độ từng chất trong nhóm fluoroquinolone trong mẫu thử được xác định theo đường chuẩn (7.5), tính bằng microgam trên kilogam ($\mu\text{g/kg}$);

F là hệ số pha loãng mẫu.

CHÚ THÍCH:

Khi pha loãng mẫu cần pha bằng dung dịch C (4.32) có chứa enrofloxacin D5 nồng độ 25 $\mu\text{g/l}$.

8.2 Biểu diễn kết quả

Kết quả thử nghiệm được báo cáo với một chữ số thập phân, đơn vị tính là $\mu\text{g/kg}$.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- Mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- Kết quả thử nghiệm;
- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- Phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kiểm soát chất lượng kết quả thử nghiệm1. Hệ số hồi quy tuyến tính (r^2) của đường chuẩn:

Phải lớn hơn hoặc bằng 0,99.

2. Độ thu hồi của mẫu kiểm soát:

Độ thu hồi của mẫu kiểm soát phải nằm trong khoảng quy định trong bảng 1

Bảng 1 – Quy định về độ thu hồi

Nồng độ	Độ thu hồi (%)
0,1%	95 – 105
100ppm	90 – 107
10ppm	80 -110
1ppm	80 -110
100ppb	80 -110
10ppb	60 – 115
1ppb	40 - 120

3. Độ lệch cường độ ion tương đối:

Độ lệch cường độ ion tương đối phải nằm trong giới hạn theo bảng 2

Bảng 2 - Giới hạn tối đa độ lệch cường độ ion tương đối

Cường độ ion tương đối	Độ lệch cho phép
> 50 %	± 20 %
> 20 % đến 50 %	± 25 %
> 10 % đến 20%	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

PHỤ LỤC B

(Tham khảo)

Điều kiện phân tích trên LC

Thiết bị LC: HPLC hai kênh dung môi, có thể chạy gradient, có thể đạt áp suất tối đa 1034 bar.

Cột phân tích: Cột sắc ký pha đảo C18, dài 100 mm, đường kính trong 2,1 mm, kích thước hạt nhồi 1,8 μm ;

Nhiệt độ cột: 40 °C;

Thể tích bơm mẫu: 14 μl ;

Pha động: gradient hai kênh như Bảng 3.

Kênh A: Dung dịch pha động A: 0,1 % axit formic trong nước (4.31);

Kênh B: Metanol (4.9).

Bảng 3 – Điều kiện gradient cho hệ thống LC

Thời gian, min	Tốc độ dòng, (ml/min)	Kênh A, %	Kênh B, %
1	0,4	90	10
7	0,4	35	65
9	0,4	5	95
9,5	0,4	5	95
10	0,4	90	10

PHỤ LỤC C

(Tham khảo)

Điều kiện phân tích trên đầu dò MSMS

Chế độ ion hóa: ion hóa phun điện tử ESI, chế độ ion dương (ESI+)

Nhiệt độ nguồn ion hóa: 300 °C.

Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 350 °C.

Tốc độ khí mang: 7 L/min

Áp suất phun: 3,45 bar.

Chế độ quét: MRM, theo các điều kiện như bảng 4

Bảng 4 -- Điều kiện phân mảnh MS-MS

Chất phân tích	Ion sơ cấp (m/z)	Ion thứ cấp (m/z)	Điện thế (V)	Năng lượng va chạm (eV)
Sarafloxacin	386,1	368,1 342,1	110	18 14
Enrofloxacin	360,0	342,1 316,2	110	18 18
Ciprofloxacin	332,1	314,0 231,0	120	18 42
Flumequine	262,0	244,0 202,0	100	10 30
Oxonilic acid	262,1	160,0 216,0	110	29 41
Enrofloxacin D5	365,0	342,1	110	18

PHỤ LỤC D

(Tham khảo)

Thời gian lưu và phân mảnh ion

Bảng 5 – Ví dụ về thời gian lưu và phân mảnh ion

Chất phân tích	Ion sơ cấp (m/z)	Ion thứ cấp (m/z)	Thời gian lưu (min)
Sarafloxacin	386,1	368,1 342,1	5,32
Enrofloxacin	360,0	342,1 316,2	5,40
Ciprofloxacin	332,1	314,0 231,0	5,78
Flumequine	262,0	244,0 202,0	7,21
Oxonilic acid	262,1	160,0 216,0	8,30
Enrofloxacin D5	365,0	342,1	5,28

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Quy trình phân tích chuẩn NAF 051/12 "Xác hàm lượng Fluoroquinolone bằng LC/MSMS" của Cục Quản lý Chất lượng Nông lâm sản và Thủy sản.
- [2] Agilent, No.5990-5085EN Determination of Quinolone antibiotic in Bovine liver using Agilent Bont Elut Quechers Kit by LC-MS/MS.
- [3] Simultaneous Determination of 18 Quinolone Residues in Marine and Livestock Products by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (tạp chí Tạp chí Food and Drug Analysis, tập 18, số 2, 2010, trang 87-97).
-