

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 1/9
--	--------------------------------	--

**ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG THUỐC KHÁNG SINH HỌ
TETRACYCLINES TRONG THỰC PHẨM BẰNG SẮC KÝ
LỎNG GHEP 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	02/04/2018

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 2/9
---	------------------------	--

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng thuốc kháng sinh **họ Tetracycline** trong nền mẫu **Thực phẩm** 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:

Chất phân tích	Giới hạn phát hiện (LOD) ($\mu\text{g/kg}$)	Giới hạn định lượng (LOQ) ($\mu\text{g/kg}$)
Tetracycline		
Doxycycline	10	30
Chlortetracycline		
Oxytetracycline		

II. Tài liệu tham khảo

- Journal of Chromatography A, 928(2001) 177-186

III. Nguyên tắc

- Dư lượng thuốc kháng sinh họ Tetracyclines trong mẫu sau khi được tách chiết khỏi nền mẫu bằng SPE sẽ được rửa giải bằng dung môi thích hợp. Mẫu được hòa tan lại bằng pha động và định lượng bằng thiết bị LC/MS/MS.

IV. Thông tin 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. THÍ NGHIỆM

I. Thiết bị và dụng cụ

1. Thiết bị

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 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.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 3/9
--	--------------------------------	--

- Bộ lọc dung môi tương thích với màng lọc 0.45µm
- Màng lọc PTFE, 13mm, 0,45µm
- Ống ly tâm 50mL, 15mL polypropylen, có nắp đậy
- Bồn siêu âm.
- Bình định mức: 10mL
- Pipet vạch: 0.1mL, 0.5mL, 1mL, 2mL.
- Pipet bầu: 1mL, 2mL, 5mL
- Dụng cụ thủy tinh các loại: ống Hatch, becher, erlen, ...
- Hệ thống cô quay chân không
- Hệ thống chiết SPE
- Cột OASIS HLB 60mg/3cc

2. Hệ thống LC/MS/MS

- Hệ thống sắc ký lỏng: Hệ thống LC/MS/MS: TSQ Quantum Ultra, Accela 1250 pump, Accela Autosampler.
- Cột sắc ký lỏng pha đảo C₁₈: Supelco Ascentis C18 5µm/2.1µm (hoặc cột tương đương)

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion
- Acetonitril (ACN, HPLC)
- Methanol (HPLC)
- EDTA (tkpt)
- Citric acid (tkpt)
- Na₂HPO₄.12H₂O (tkpt)
- Oxalic acid (tkpt)

2. Dung dịch thử

- Đệm McIlvaine – EDTA (0.1 mol/LpH: 4): hòa tan 21.01g citric acid monohydrate, 44.78g Na₂HPO₄.12H₂O và 60.5g Na₂EDTA.2H₂O trong 1.625L nước. Chỉnh pH về 4 bằng dung dịch NaOH 0.1M.
- Dung dịch TCA 20%: Hòa tan 20g Trichloro acetic acid vào 80mL nước.

3. Chất chuẩn

a. Thông tin về chất chuẩn

- Tetracycline hydrochloride: của Sigma Aldrich hoặc tương đương.
- Doxycycline: của Sigma Aldrich hoặc tương đương.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 4/9
--	--------------------------------	--

- Chlotetracycline hydrochloride của Sigma Aldrich hoặc tương đương.
- Oxytetracycline hydrochloride của Sigma Aldrich hoặc tương đương.
- Demechlorycline hydrochloride của Sigma Aldrich hoặc tương đương.

b. Dung dịch chuẩn 1000 µg/L

- Nồng độ dung dịch chuẩn gốc được tính theo công thức sau:

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{m}{V} \times \frac{M_{\text{Base}}}{M} \text{ pure}$$

Trong đó: m : khối lượng chất chuẩn (mg)

V : thể tích bình định mức pha chuẩn (L)

M_{base} : khối lượng phân tử của chất chuẩn ở dạng cơ bản

M : khối lượng phân tử ở dạng đóng gói (của nhà sản xuất)

Pure: độ tinh khiết.

- *Tetracycline: Cân 11.1mg chất chuẩn Tetracycline hydrochloride vào bình định mức 10 ml, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000mg/Kg.*

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{11.1}{10} \times \frac{444.435}{480.9} * 0.975 * 1000 = 1000.19$$

- *Doxycycline: Cân 10.1mg chất chuẩn Doxycycline hydrochloride vào bình định mức 10 ml, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000mg/Kg.*

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{10.1}{10} * 0.995 * 1000 = 1004.95$$

- *Chlotetracycline: Cân 11.7mg chất chuẩn Chlotetracycline hydrochloride vào bình định mức 10 ml, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000mg/Kg.*

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{11.7}{10} * \frac{478}{515.5} * 0.927 * 1000 = 1005.69$$

- *Oxytetracycline: Cân 11.4mg chất chuẩn Oxytetracycline hydrochloride vào bình định mức 10 ml, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung*

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 5/9
--	--------------------------------	--

dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000mg/Kg.

$$C(\text{mg / L}) = \frac{11.4}{10} * \frac{460.434}{496.89} 0.95 * 1000 = 1003.54$$

- *Demechlocycline: Cân 11.0mg chất chuẩn Demechlocycline hydrochloride vào bình định mức 10 ml, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000mg/Kg.*

$$C(\text{mg / L}) = \frac{11.0}{10} * \frac{464.853}{501.31} * 0.985 * 1000 = 1004.7$$

Lưu ý: Vì khối lượng cân chuẩn có thể thay đổi nên nhân viên pha chuẩn phải tính lại nồng độ chuẩn dựa trên các số liệu chuẩn đã cân thực tế và thể tích định mức. Các dung dịch chuẩn trung gian phải pha đúng nồng độ qui định.

c. Dung dịch chuẩn trung gian

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp 40mg/L: Dùng pipet 1ml, rút 1mL của mỗi chuẩn 1000µg/L cho vào bình định mức 25ml, định mức lên đến vạch mức bằng Acetonitrile. Được dung dịch chuẩn có nồng độ 40mg/L. Chuẩn được đựng trong ống nghiệm thủy tinh tối màu, bảo quản ở nhiệt độ < 0°C, Sử dụng trong 03 tháng.
- Dung dịch chuẩn trung gian 2.0mg/L: Dùng pipet 1mL, rút 0.5mL dung dịch chuẩn 40mg/L cho vào bình định mức 10mL, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 2.0mg/L. Pha khi sử dụng.
- Dung dịch chuẩn trung gian 200µg/L: Dùng pipet 1mL, rút 1.0mL dung dịch chuẩn 2.0mg/L cho vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng hỗn hợp pha động (Acetonitrile/nước: 10/90 với 0.01% Citric acid + 0.01% Oxalic acid), thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 200µg/L. Pha khi sử dụng.

d. Dung dịch nội chuẩn trung gian.(Demechlocycline)

- Dung dịch nội chuẩn 20mg/L: Dùng pipet 1mL vạch, rút 0.5mL nội chuẩn 1000mg/L cho vào bình định mức 25ml. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, thu được dung dịch nội chuẩn 20mg/L. Chuẩn được đựng trong ống nghiệm thủy tinh tối màu, bảo quản ở nhiệt độ < 0°C, Sử dụng trong 03

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 6/9
--	--------------------------------	--

tháng.

- Dung dịch nội chuẩn 500µg/L: Dùng 1mL vạch, rút 0.25mL nội chuẩn 20mg/L cho vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, thu được dung dịch nội chuẩn 500µg/L. Pha khi sử dụng.

e. Dung dịch chuẩn làm việc: Pha khi phân tích.

No.	Thể tích Chuẩn 200µg/L mL	Thể tích Demeclocycline 500ppb	Thể tích định mức	Nồng độ chuẩn µg/L
Std 01	0.05	0.5 mL	10	1
Std 02	0.1		10	2
Std 03	0.20		10	4
Std 04	0.5		10	10
Std 05	1.0		10	20
Std 06	2.0		10	40

III. Thực hiện QA\QC

Trong mooi đợt phân tích, nhân viên phân tích phải thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng kết quả phân tích.

- Blank
- Mẫu QC.

Thực hiện mẫu giống mục B.IV.

IV. Thực hiện Phân tích.

1. Bảo quản mẫu.

- Lượng mẫu được lấy ít nhất là 100mL (hoặc 100g).
- Chứa mẫu trong vật chứa kín khí có dung tích vừa đủ.
- Nếu mẫu chưa phân tích ngay bảo quản mẫu ở tủ đông.

2. Phân tích

- Cân m (g) mẫu vào ống nghiệm 50mL:
 - Mẫu Thủy sản, thịt, sản phẩm thịt và thủy sản: 5g
 - Mẫu Trứng, sữa, TĂCN: 2g
- Thêm vào 0.5mL dung dịch Demeclocycline 500µg/L, Cho vào 25mL đệm McIlvaine – EDTA (pH: 4) vào, vortex mẫu trong 15 phút, ly tâm 3000 vòng/phút trong năm phút, lọc lớp trên vào bình định mức 50ml, chiết lại phần cặn với 15ml, 10ml đệm, thêm vào 3mL dung dịch TCA 20%, Sau đó định mức đến vạch 50ml. Ly tâm, Lấy 5.0ml dịch chiết cho qua cột Oasis HLB 60mg/3mL đã hoạt hóa bằng 3ml methanol, 3ml nước, 1.5ml đệm McIlvaine-EDTA(pH:4), rửa cột bằng 2ml

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 7/9
--	--------------------------------	--

nước, 2ml hỗn hợp (methanol/nước: 5/95). Rút khô cột trong 30 phút. Rửa giải với 15ml Methanol vào bình cầu, cô quay và định mức 1ml bằng pha động. Lọc qua màng lọc 0.45µm vào vial nâu. Phân tích trên LC/MS/MS.

3. Phân tích trên LC /MS/MS

Các điều kiện phân tích dưới đây chỉ mang tính chất tham khảo và có thể thay đổi trên mỗi thiết bị cụ thể.

a. Điều kiện máy LC

Thời gian	Acetonitril 0.1% FA	H ₂ O 0.1% FA	Tốc độ dòng, mL/phút
0	10	90	0.4
3	20	80	
4	90	10	
6	90	10	
6.5	10	90	
8	10	90	

b. Điều kiện cho hệ thống tiêm mẫu tự động

- Injection type: Full loop
- Injection volume: 20µl
- Needle height from bottom: 1.0
- Flush volume: 100µL
- Tray temp control: off
- Column oven control: off
- Wash column: 400µL

c. Điều kiện MS

- Tunefile: tunefile gần nhất
- Q2 gas pressure: 1.2mT
- MS acquire time: 8
- Ion source : H-ESI
- Polarity: Positive
- Scan type: SRM
- Capillary temp: 350°C
- Vaporizer temperature: 300
- ESI spray voltage: 3000V
- Sheath gas: 50
- Aux gas : 5

Bảng2: Ion định lượng

Chất phân tích	Ion chính (ion sơ cấp)	Ion định lượng	Ion xác nhận
Tetracycline	445	154	410
Doxycycline	445	267	321
Chlotetracycline	479	444	462
Oxytetracycline	461	426	444
Demechlodycline	465	289	430

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 8/9
--	--------------------------------	--

4. Trình tự tiêm mẫu

Các mẫu sẽ được phân tích theo trình tự sau:

- Pha động;
- Các dung dịch chuẩn làm việc, từ nồng độ thấp đến cao;
- Pha động
- Mẫu trắng;
- Mẫu cần kiểm nghiệm;
- Mẫu thêm chuẩn

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

C. TÍNH KẾT QUẢ

Kết quả chất cần phân tích trong mẫu được tính toán thông qua diện tích của các ion định lượng tương ứng so với đường chuẩn, theo công thức sau:

$$C = \frac{C_0 \times V_{dm} \times V_{chiet} \times f}{V_{coquay} \times m}$$

Trong đó:

- C : lượng chất cần phân tích có trong mẫu, $\mu\text{g/kg}$.
- C_0 : nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, $\mu\text{g/L}$
- m : khối lượng mẫu phân tích, g .
- V_{dm} : thể tích định mức sau cô quay, ml .
- V_{chiet} : thể tích chiết mẫu, ml .
- V_{coquay} : thể tích mẫu rút đem cô quay, ml .
- f : hệ số pha loãng.

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. KIỂM SOÁT QA\QC

- 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.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.094 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/4/2018 Trang: 9/9
--	--------------------------------	--

- Tỉ 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 tỉ số tương ứng của chuẩn trong cùng một điều kiện phân tích.

Tỉ số cường độ tương đối so với ion base peak	Mức sai biệt tối đa cho phép
> 50%	$\pm 20 \%$
>20 đến 50%	$\pm 25 \%$
> 10 đến 20 %	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$

- 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 $\pm 5\%$.
- Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá $\pm 20 \%$ giá trị thật.
- Mẫu thêm chuẩn được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≤ 20 mẫu). Hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn phải nằm trong khoảng 70-120 %.
- Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≤ 20 mẫu). Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại không quá $\pm 30 \%$.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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