

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 1/10
--	--------------------------------	--

**ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG THUỐC KHÁNG SINH HỌ FLUOROQUINOLONES
TRONG THỦY SẢN, SẢN PHẨM THỦY SẢN, THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT BẰNG SẮC
KÝ LÔNG GHEP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA TỬ CỤC (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 Formate SOP	30/03/2018

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 2/10
---	------------------------	--

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng thuốc kháng sinh họ fluoroquinolone (xem bảng 1) trong nền mẫu **Thủy sản, sản phẩm thủy sản, thịt và sản phẩm thịt** bằng sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).
- Giới hạn của phương pháp:

Chất phân tích	Giới hạn phát hiện (LOD) ($\mu\text{g/kg}$)	Giới hạn Định lượng (LOQ) ($\mu\text{g/kg}$)
Enrofloxacin	1	3.0
Ciprofloxacin		
Norfloxacin		
Gatifloxacin		
Sarafloxacin		
Danofloxacin		
Nalidixic acid		
Flumequine		

II. Tài liệu tham khảo

- Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: **BS EN 15662:2008**

III. Nguyên tắc

- Dư lượng thuốc kháng sinh họ Fluoroquinolones trong mẫu sau khi được tách chiết khỏi nền mẫu sẽ được loại béo và cô quay chân không đến cạn. 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. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ

1. Thiết bị

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg
- Máy ly tâm

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 3/10
--	--------------------------------	--

- Máy lắc Vortex.
- Bộ lọc dung môi tương thích với màng lọc 0.45 μ m
- Màng lọc PTFE, 13mm, 0,45 μ m
- 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

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: Cosmosil 2.5C₁₈ – MS – II (hoặc cột tương đương)

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion
- Acetonitril (ACN, HPLC)
- Formic acid 99%(P.A)
- Sodium chloride (PA)
- Trisodium Citrate dihydrate (PA)
- Magnesium Sulfate (PA)
- Disodium hydrogencitrate sesquihydrate (PA)
- Bột C18
- Bột PSA

2. Dung dịch thử

- Dung dịch Methanol (0.1% HCOOH) (v/v): thêm 1mL HCOOH vào 1 lit Acetonitril. Đánh siêu âm 15 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.
- Dung dịch H₂O (0.1% HCOOH) (v/v): thêm 1mL HCOOH vào 1 lit nước cất 2 lần khử ion. Đánh siêu âm 15 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.

3. Chất chuẩn

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 4/10
--	--------------------------------	--

a. Thông tin về chất chuẩn

Các chất chuẩn của sigma aldrich, Dr. Ehrentofer, Acros, TRC,...

- Danofloxacin, Enrofloxacin, Difloxacin, Sarafloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Marbofloxacin, Oxolinic acid, Nalidixic acid, Flumequine, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Norfloxacin –d5, Lomefloxacin, Enrofloxacin – d5, Sparfloxacin, Flumequine 3C¹³

b. Dung dịch chuẩn 1000 mg/L

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

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

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

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

$Pure$: độ tinh khiết của chuẩn

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)

Ví dụ: Cân 10mg chất chuẩn Enrofloxacin - d5 có độ tinh khiết 98% vào bình định mức 10mL, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:

$$C(mg/L) = \frac{m}{V} \times pure = \frac{10}{0.01} \times 0.98 = 980mg/L$$

Ví dụ: Cân 10mg chất chuẩn Sarafloxacin hydrochloride có độ tinh khiết 98% vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:

$$C(mg/L) = \frac{m}{V} \times \frac{M_{Base}}{M} \times pure = \frac{10}{0.01} \times \frac{385.36}{421.83} \times 0.98 = 895.27mg/L$$

- Dung dịch chuẩn gốc: (được bảo quản trong ngăn đá, hạn sử dụng 01 năm)
- Cân 10.0g mỗi chuẩn rắn vào mỗi bình định mức 10ml tương ứng. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 1000ppm.
- Enrofloxacin – d5: Cân 2g chuẩn rắn Enrofloxacin – d5 vào bình định mức 10ml.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 5/10
--	--------------------------------	--

Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 200ppm.

- *Norfloxacin – d5: Cân 2g chuẩn răn Norfloxacin – d5 vào bình định mức 10ml. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 2ppm.*
- *Flumequine – 3C¹³: Cân 1g chuẩn răn vào bình định mức 10ml. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 100ppm.*

c. Dung dịch chuẩn trung gian

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp 40mg/L (bảo quản ngăn đá, hạn sử dụng 06 tháng):* Dùng pipet 1ml, rút từng chuẩn gốc (mỗi chuẩn 1 pipet) cho vào bình định mức 25ml, định mức lên đến vạch mức bằng Acetonitrile. Được dung dịch chuẩn có nồng độ 40mg/L.
- *Dung dịch chuẩn trung gian 1.6mg/L (bảo quản ngăn mát, hạn sử dụng 03 tháng):* Dùng pipet 1mL, rút 1mL dung dịch chuẩn 40mg/L cho vào bình định mức 25mL, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 1.6mg/L.
- *Dung dịch chuẩn trung gian 80µg/L (bảo quản ngăn mát, hạn sử dụng 01 tháng):* Dùng pipet 1.0mL, rút 0.5mL dung dịch chuẩn 1.6mg/L cho vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile: nước (1/9), thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 80µg/L.
- *Dung dịch hỗn hợp nội chuẩn 0.8mg/L (bảo quản ngăn mát, hạn sử dụng 01 tháng):* Dùng micropipet rút 0.1mL mỗi nội chuẩn cho vào bình định mức 25ml. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, thu được dung dịch hỗn hợp nội chuẩn 0.8mg/L.

d. Dung dịch chuẩn làm việc (bảo quản ngăn mát, hạn sử dụng 01 tuần)

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 6/10
---	------------------------	--

Dãy chuẩn được pha từ dung dịch chuẩn 80 (µg/L)					
No.	V Rút chuẩn mL	V Định mức mL	IS (mL)	C ₀ (µg/L)	Dụng cụ pha chuẩn
Std 01	0.05	10.0	0.1 ml nội chuẩn 0.8ppm	0.4	Kim 0.1mL
Std 02	0.1			0.8	Kim 0.1mL
Std 03	0.2			1.6	Kim 0.5mL
Std 04	0.5			4	Kim 0.5ml
Std 05	1			8	Pipet 1ml
Std 06	2			16	Pipet 2ml

III. Thực hiện QA/QC

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích phải thực hiện các mẫu sau nhằm kiểm soát QA/QC:

- Blank thuốc thử
- Blank matrix
- QC.

Tất cả các mẫu được thực hiện theo mục B.IV.

IV. Thực hiện phân tích

1. Tách chiết mẫu

- Cân khoảng 5 ± 0.1 g mẫu đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 mL.
- Thêm 5mL nước cất vào ống ly tâm đựng mẫu, vortex đều. Thêm vào *0.05mL hỗn hợp nội chuẩn 0.8mg/L*. Thêm tiếp 10ml ACN 5% formic acid, vortex thật kỹ trong 2 phút, làm lạnh 5 phút trong tủ đông. Cho vào hỗn hợp muối (1g NaCl + 4g MgSO₄+1g Trisodium citrate dihydrate + 0.5g disodium hydrigencitrate sesquihydrate), lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm ở 3500 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 2mL lớp trên cho vào ống ly tâm 15mL có chứa (0.1g MgSO₄+0.05g C18 + 0.05g PSA), votex 30", ly tâm 3000 vòng/phút, rút 2mL lớp trên cho vào bình cầu. Đem cô quay chân không ở 40°C đến khô. Hòa tan cạn khô bằng chính xác 1mL dung dịch pha động, vortex 20giây. Lọc dịch đục qua màng lọc 13mm, 0.45µm và thu dịch lọc vào lọ vial cho HPLC.

2. Phân tích trên

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 7/10
--	--------------------------------	--

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

Chương trình gradient dung môi theo thời gian:

Thời gian	Methanol(0.1 %HCOOH)	H ₂ O(0.1%HCOOH)	Tốc độ dòng, mL/phút
0	10	90	0.4
1	10	90	
2	95	5	
4.5	95	5	
5	10	90	
6.5	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: 1000µL
- Tray temp control: off
- Column oven control: off
- Wash column: 2000µL

c. Điều kiện MS

- Tune file:	Bảng 2: Ion định lượng				tune file gần nhất
- Q2 gas					pressure: 1.2mT
- MS	Chất phân tích	Ion chính (ion sơ cấp)	Ion định lượng	Ion xác nhận	acquire time: 6
- Ion source	Enrofloxacin	360	316	245	: ESI
- Polarity:	Ciprofloxacin	332	288	203	positive
- Scan type:	Norfloxacin	320	276	233	SRM
- Capillary	Sarafloxacin	386	342	299	temp: 350°C
- Vaporizer	Ofloxacin	362	261	318	temperature: 450
- ESI spray	Danofloxacin	358	340	314	voltage: 3000V
- Sheath	Difloxacin	400	356	299	gas: 50
- Aux gas :	Marbofloxacin	363	320	72	5
	Levofloxacin	362	221	318	
	Oxolinic acid	262	216	244	
	Nalidixic acid	233	187	215	
	Flumequine	262	202	244	
	Moxifloxacin	402	261	384	
	Sparfloxacin	393	292	349	
	Pefloxacin	334	290	233	
	Orbifloxacin	396	295	352	
	Enoxacin	321	303	324	
	Lomefloxacin	352	265	308	
	Gatifloxacin	376	261	332	
	Norfloxacin – d5	325	281		
	Enrofloxacin – d5	365	321		

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 8/10
---	------------------------	--

3. 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

<i>Chỉ tiêu phân tích</i>	<i>Nội chuẩn</i>
Enrofloxacin	Enrofloxacin – d5
Ciprofloxacin	Enrofloxacin – d5
Norfloxacin	Norfloxacin – d5
Gatifloxacin	Enrofloxacin – d5
Sarafloxacin	Enrofloxacin – d5
Danofloxacin	Enrofloxacin – d5
Nalidixic acid	Enrofloxacin – d5
Flumequine	Flumequine 3C ¹³

- 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:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.010 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 9/10
--	--------------------------------	--

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

Trong đó:

- *C: lượng chất cần phân tích có trong mẫu, µg/kg.*
- *C₀: nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, µg/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_{co quay}: 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*
- *Nếu mẫu có phát hiện Norfloxacin, nhân viên phân tích phải tiến hành pha lại đường chuẩn Norfloxacin từ chuẩn gốc (1000ppm)*

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.
- Tỷ 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 tỷ 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%	± 20 %
>20 đến 50%	± 25 %
> 10 đến 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 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 ±5%.
- Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá ±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 ±30 %.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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

