

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.097 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành:30/03/2018 Trang: 1/9
---	----------------------------------	--

**XÁC ĐỊNH STREPTOMYCIN VÀ
DIHYDROSTREPTOMYCIN TRONG MẬT ONG**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
TỪ HIẾU HẬU	DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI	TRẦN THÁI VŨ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	30/03/2018

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng.

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng kháng sinh streptomycin, dihydrostreptomycin trong nền mẫu mật ong. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 5.0 µg/kg.

II. Tài liệu tham khảo.

Ref. Ana. Chimica Acta 672 (2010) 103 – 106: Confirmatory method for the determination of streptomycin in apples by LC–MS/MS.

III. Nguyên tắc.

Mẫu mật ong sau khi được đồng nhất sẽ được hòa tan trong nước. Phần dung dịch được làm sạch qua cột chiết trao đổi cation yếu và xác định trên máy LC/MS/MS.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.

- a. Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động trong phòng thí nghiệm.
- b. Báo cáo tất cả các vấn đề gây tổn thương tới con người và các sự cố gây đổ vỡ hóa chất.
- c. Dung môi hữu cơ ACN và acetic acid được thu hồi vào trong thùng chứa có dán nhãn dung môi thải.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.

1. Thiết bị cơ bản.
 - Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg
 - Bình định mức 5ml, 25ml, 50 ml
 - Máy ly tâm cho ống 50ml
 - Micropipet các loại 20 µL, 200 µL, 1000 µL.
 - Pipet thủy tinh
 - Cột Water sep-pak vac 6 cc accell plus CM cartridge
 - Bộ lên cột rút áp suất

2. Thiết bị phân tích

Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ ba tứ cực TSQ7000 Quantum Ultra hoặc tương đương.

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá chất.

- Nước cất khử ion (nước DI)
- Methanol, Acetonitril, Acid acetic của Fisher hoặc tương đương
- 2% Acid acetic trong nước DI: Pha 20 ml Acid acetic vào 1 L nước cất.
- 2% Acid acetic và ACN tỉ lệ 8:2: Pha 16 ml Acid acetic vào 200 ml ACN

và 800 ml nước cất.

2. Chất chuẩn.

a. Chuẩn gốc:

- Chuẩn streptomycin, dihydrostreptomycin của Dr. Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Bảo quản và lưu trữ: Các chuẩn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

b. Dung dịch chuẩn gốc

- Dung dịch chuẩn gốc 1000 µg/mL: Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn vào các bình định mức 10 mL riêng biệt, hoà tan và định mức đến vạch bằng MeOH:DI (1:1). Lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Khi đó nồng độ chất chuẩn trong dung dịch được tính được theo công thức sau:

$$C(mg/L) = \frac{m(mg) \times 1000}{V(ml)} \times P$$

Trong đó: C là nồng độ chất chuẩn có trong dung dịch (µg/mL).

m là khối lượng cân của chất chuẩn (mg).

V là thể tích định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

- Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn gốc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 8°C), sử dụng trong thời gian 1 năm.

c. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc

- Chuẩn hỗn hợp (10 µg/mL): Từ mỗi dung dịch gốc trên (1000 µg/mL) tương ứng lấy 0.1 mL cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với MeOH:DI (1:1).
- Chuẩn hỗn hợp (1.0 µg/mL): Rút 1.0 mL dung dịch chuẩn 10 µg/mL ở trên vào bình mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:DI (1:1).
- Bảo quản và lưu trữ: Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4-8°C), sử dụng trong thời gian 6 tháng.
- Pha dãy chuẩn làm việc:
 - + Định tính: Nếu mẫu không phát hiện chỉ cần chạy một điểm chuẩn định tính.
 - + Định lượng:

V (µL) Streptomycin	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
10.0 µg/mL	5 . 0	10	20	5 0	100	200
C (µg/mL)	0 . 0 0 5	0.010	0.02	0 . 0 5	0.10	0.20
V (uL) Dihydrostrepto 10.0 µg/mL	50					
V (µL) 2%	Định mức 10ml					

AcA/ACN (8:2	
--------------	--

- Bảo quản và lưu trữ: Dây chuẩn làm việc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 8⁰C), sử dụng trong thời gian 3 tháng.

III. Kiểm soát QA/QC.

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu Blank matrix với nồng độ kiểm soát: 10.0 µg/kg

. Mẫu thêm chuẩn (QC)

Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn với nồng độ thêm là 10.0 µg/kg sau khi phân tích 20 mẫu hoặc một mẻ mẫu. Mẫu thêm chuẩn được thực hiện cùng lúc với lô mẫu phân tích.

- Tính toán độ thu hồi theo phương trình

$$R(\%) = \frac{C_s - C}{S} \times 100$$

Trong đó:

R = Độ thu hồi

C_s = Nồng độ mẫu thêm chuẩn

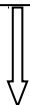
C = Nồng độ của mẫu nền

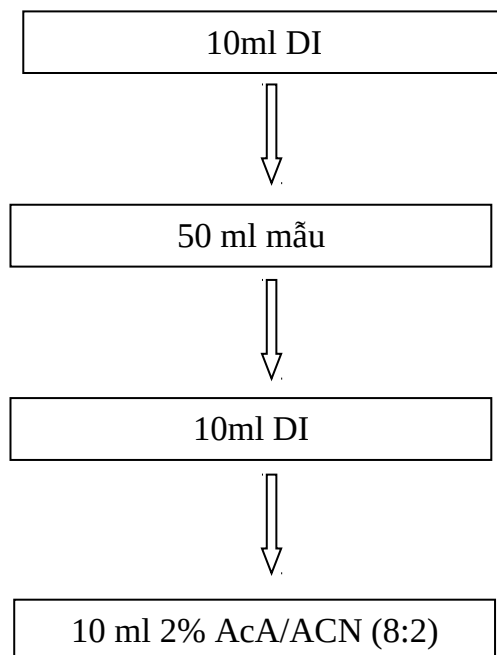
S = Nồng độ của chất phân tích thêm vào mẫu

VI. Xử lý mẫu.

- Cân 10 ± 0.1 g mẫu đã đồng nhất vào bình định mức 50 mL, thêm 50 µL IS dihydrostreptomycin 10 µg/mL.
- Mẫu QC-spike: Thêm 100 µL dung dịch chuẩn streptomycin 1µg/mL vào mẫu blank để kiểm soát hiệu suất thu hồi.
- Hòa tan mẫu mật ong và định mức lên 50ml bằng nước DI, chuyển mẫu qua ống ly tâm 50ml, ly tâm 3000 vòng /phút trong 5 phút.
- Qua cột sep-park CM:

10ml 2% AcA





V. Phân tích

1. Thông số thiết bị

a. Điều kiện LC

- Cột Water Silica (150 x 4.6 mm, kích thước hạt 5 μ m)
- Pha động: ACN (100mM HCO₂H) và DI (100mM HCO₂H +200mM HCO₂NH₄)
- Tốc độ dòng: 400 μ l/phút
- Thể tích tiêm: 20 μ L

Thời gian, phút	ACN (formic)	DI (amoni formic)
0.0	90	10
3.0	40	60
12.0	40	60
12.1	90	10

20.0	90	10
------	----	----

b. Điều kiện MS

- Nguồn ion hóa: ESI(+)
- Nhiệt độ capillary: 350°C
- Sheath gas: 50 abs , Aux gas: 5 abs
- Spray voltage: 4000V
- CID gas: 1.3mT

2. Trình tự của quá trình tiêm mẫu trên thiết bị phân tích.

Dung môi trắng → Các chuẩn có nồng độ từ thấp tới cao → Dung môi trắng
 → Mẫu cần kiểm nghiệm → Mẫu thêm chuẩn → Chuẩn kiểm tra.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

a. Công thức tính toán:

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỷ lệ diện tích của chuẩn và nội chuẩn so với tỷ lệ nồng độ của chuẩn và nội chuẩn.

$$C = \left(\frac{C_0 \times V_{extract}}{m} \times f \right)$$

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/mL
- C₀: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/mL
- V_{extract}: Thể tích dịch chiết
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng cân (g) hoặc thể tích mẫu (mL)

b. Ion định lượng, định tính

S T T	Hợp chất	Ion mẹ	Ion định tính	C E 1 (e V)	Ion định lượng	C E 2 (e v)
1	Streptomycin	582.06	263.2	30	246.2	42
2	Dihydrostreptomycin	584.06	263.2	28	246.2	38

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với $R^2 \geq 0.99$
- ✓ Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
- ✓ Tỷ số ion: Cường độ tương đối của ion định tính so với ion định lượng phải nằm trong khoảng cho phép ($\pm 30\%$)
- ✓ Độ lệch của thời gian lưu không quá 2.5% cho LC
- ✓ Độ lệch của dung dịch chuẩn kiểm tra không quá 15%
- ✓ Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart).

Thực hiện kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (control chart) ở mức thêm chuẩn 10 ug/kg sau mỗi lô mẫu phân tích.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu: BM.15.04a, BM.15.06

