

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 1/9
--	----------------------------	---

**ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG THUỐC KHÁNG SINH HỌ FLUOROQUINOLONES
TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI 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 Thị Kiều Diễm	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	04-01-2018

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 2/9
--	----------------------------	---

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng thuốc kháng sinh Enrofloxacin trong nền mẫu **Thức ăn chăn nuôi** 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 (LOQ) ($\mu\text{g/kg}$)
Enrofloxacin	10 ppb

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 THÍ 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. Dụng cụ và thiết bị

1. Thiết bị

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg
- Máy ly tâm
- Máy lắc Vortex.
- Bộ lọc dung môi tương thích với màng lọc 0.45 μm
- Màng lọc PTFE, 13mm, 0,45 μm
- Ống ly tâm 50mL, 15mL polypropylen, có nắp đậy
- Bồn siêu âm.
- Bình định mức (CCX A): 10mL

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 3/9
--	----------------------------	---

- Pipet vạch (CCX A): 0.1mL, 0.5mL, 1mL, 2mL.
- Pipet bầu (CCX A): 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

a. Thông tin về chất chuẩn

- Enrofloxacin của sigma aldrich hoặc tương đương
- Enrofloxacin – d5 sigma aldrich hoặc tương đương

b. Dung dịch chuẩn 1000mg/L

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

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 4/9</p>
---	-----------------------------------	---

Đối với chuẩn gốc là dạng base:

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

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

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

Pure : độ tinh khiết của chuẩn

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:

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

Đối với chuẩn gốc dạng ngậm Acid hoặc muối:

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

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.

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:

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

- Enrofloxacin 99.6%: Cân 10.1g chuẩn rắn Enrofloxacin vào bình định mức 10ml. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 1005.96ppm.

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{m}{V} \times \text{pure} = \frac{10.1}{0.01} \times 0.996 = 1005.96$$

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/9
--	----------------------------	---

- *Enrofloxacin – d5 (99%): Cân 10.1g chuẩn rắn Enrofloxacin – d5 vào bình định mức 10ml. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 999.9ppm.*

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{m}{V} * \text{pure} = \frac{10.1}{0.01} * 0.99 = 999.9$$

c. Dung dịch chuẩn trung gian

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp 40mg/L: 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: 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 64µg/L: Dùng pipet 1mL, rút 1mL dung dịch chuẩn 1.6mg/L cho vào bình định mức 25mL. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile: nước (1/9), thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 64µg/L.
- Dung dịch hỗn hợp nội chuẩn 2mg/L: Dùng pipet 1mL vạch, rút 0.5mL mỗi nội chuẩn cho vào bình định mức 25ml. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, thu được dung dịch hỗn hợp nội chuẩn 2mg/L.

d. Dung dịch chuẩn làm việc:

Dãy chuẩn được pha từ dung dịch chuẩn 64 (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	0.05ml nội chuẩn 2ppm	0.32	Kim 0.1mL
Std 02	0.1			0.64	Kim 0.1mL
Std 03	0.25			1.6	Kim 0.5mL
Std 04	0.5			3.2	Kim 0.5mL
Std 05	1			6.4	Pipet 1ml
Std 06	2			12.8	Pipet 2ml

III. Kiểm soát QA/QC

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích phải thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích

- Blank thuốc thử.
- Blank matrix: Mẫu Blank phù hợp với nền mẫu phân tích
- Mẫu QC: Mẫu Spike trên nền mẫu Blank matrix

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 6/9
--	----------------------------	---

Thực hiện mẫu Blank, Blank matrix và QC theo mục IV.2.

IV. Thực hiện phân tích

1. Chuẩn bị mẫu

- Lượng mẫu được lấy ít nhất là 250 g.
- Chứa mẫu trong vật chứa kín khí có dung tích vừa đủ.
- Nếu mẫu chưa phân tích ngay bảo quản mẫu ở $\leq -15^{\circ}\text{C}$.

2. Xử lý mẫu

- Cân khoảng 2 ± 0.1 g mẫu đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 mL, thêm vào 0.05mL hỗn hợp nội chuẩn 2mg/L. Để yên 30 phút sau đó tiến hành xử lý mẫu.
- Thêm 10mL nước cất vào ống ly tâm đựng mẫu, vortex đều. 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 MgSO_4 + 1g Trisodium citrate dihydrate + 0.5g disodium hydri-gencitrate 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 MgSO_4 + 0.05g C18 + 0.05g PSA), vortex 30", ly tâm 3000 vòng/phút, rút 1mL lớp trên cho vào bình cầu. Đem cô quay chân không ở 40°C đến khô. Hòa tan cặn khô bằng chính xác 1mL dung dịch pha động, vortex 20giây. Lọc dịch đục qua màng lọc 13mm, 0.45 μm và thu dịch lọc vào lọ vial cho HPLC.

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 cho bơm

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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 7/9
--	----------------------------	---

- 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

- Q2 gas pressure: 1.2mT
- MS acquire time: 6
- Ion source : ESI
- Polarity: positive
- Scan type: SRM
- Capillary temp: 350°C
- Vaporizer temperature: 450
- ESI spray voltage: 3000V
- Sheath gas: 50
- Aux gas : 5

<i>Bảng 2: Ion định lượng</i>			
<i>Chất phân tích</i>	<i>Ion chính (ion sơ cấp)</i>	<i>Ion định lượng</i>	<i>Ion xác nhận</i>
Enrofloxacin	360	316	245
Enrofloxacin – d5	365	321	

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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 8/9
--	----------------------------	---

- Mẫu trắng;
- Mẫu cần kiểm nghiệm;
- Mẫu thêm chuẩn

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, thêm 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

Chỉ tiêu phân tích	Nội chuẩn
Enrofloxacin	Enrofloxacin – d5

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 thêm chuẩn ở một nồng độ duy nhất để xác nhận và so sánh

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn (bao gồm điểm 0) với $R^2 \geq 0.995$
- ✓ Độ lệch thời gian lưu $\pm 15\text{s}$
- ✓ Nồng độ QC trong khoảng

Nồng độ ($\mu\text{g/Kg}$)	% H_{th}	
	Malachite green	Leucomalachite gree

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.092 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 9/9
--	----------------------------	---

0.15	72 – 118	70 – 120
0.48	82 – 120	80 – 110
1.0	78 – 115	80 – 120
2.0	78 – 114	80 – 120

Tỉ số ion	Độ lệch cho phép
> 50%	± 20 %
>20 đến 50%	± 25 %
> 10 đến 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích, bao gồm:

- BM.15.04a
- BM.15.06