

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 1/10
---	----------------------------------	---

ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG THUỐC KHÁNG SINH HỌ FLUOROQUINOLONES TRONG MẬT ONG BẰNG (LC/MS/MS)

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Trần Thái Vũ	Trịnh Thị Minh Nguyệt	Trịnh Thị Minh Nguyệt

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
01	B.	Bổ sung QA/QC	30-5-2017

A. TỔNG QUAN

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 2/10
---	----------------------------------	---

I. Phạm vi áp dụng.

Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng thuốc kháng sinh họ Fluoroquinolones trong nền mẫu mật ong 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:

<i>Bảng 1. Giới hạn phát hiện của phương pháp</i>		
<i>Chất phân tích</i>	<i>Giới hạn phát hiện (LOD) (µg/kg)</i>	<i>Giới hạn định lượng (LOQ) (µg/kg)</i>
Enrofloxacin Ciprofloxacin Norfloxacin Sparfloxacin Moxifloxacin Gatifloxacin Sarafloxacin Ofloxacin Danofloxacin Difloxacin Marbofloxacin Levofloxacin Oxolinic acid Nalidixic acid Flumequine Pefloxacin Orbifloxacin Enoxacin Lomefloxacin	0.6	2.0

II. Tài liệu tham khảo.

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo:

- BS.EN.15662:2008 (Extraction)
- Journal of Food and Drug Analysis, Vol.18, No.2,2010 (LC/MS/MS)

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.

VI. 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.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 3/10
---	--	---

- 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 phân tích.

1. Thiết bị cơ bản.

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg
- Cân kỹ thuật có độ chính xác $\leq 0.01g$
- Máy ly tâm có tốc độ ≥ 2000 vòng/ phút
- Máy lắc Vortex.
- Màng lọc Nilon, 13mm, 0,45 μ m
- Ống ly tâm 50mL, 15mL polypropylen, có nắp đậy
- Bồn siêu âm.
- Bình định mức: 10mL; 25mL
- Pipet: 1.0mL, 2mL.
- Micropipet: 200 μ L, 1mL
- Syringe lọc mẫu.
- Vial nâu 1.8mL.
- Dụng cụ thủy tinh các loại: ống Hatch, becher, erlen, ...
- Hệ thống cô quay chân không

2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống sắc ký LC/MS/MS gồm:
 - ✓ Đầu dò MS/MS: TSQ Quantum Ultra/ TSQ Vantage
 - ✓ Hệ thống LC: Accela 1250 pump/ Accela pump
 - ✓ Hệ thống tiêm mẫu tự động: Accela Autosampler.
- Cột sắc ký lỏng pha đảo C18: Supelco Ascentis C18 5 μ m/2.1 μ m (hoặc cột tương đương)

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá chất.

- Nước cất 2 lần khử ion (LC/MS)
- Acetonitril (ACN, HPLC)
- Methanol (HPLC)
- Bột PSA
- Bột C18
- Formic acid
- Sodium chloride (PA)
- Trisodium Citrate dihydrate (PA)
- Magienium Sulfate (PA)
- Disodium hydrogencitrate sesquihydrate (PA)

2. Chất chuẩn.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 4/10</p>
--	---	---

➤ **Chất chuẩn:**

- ✓ Danofloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Enrofloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Difloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Sarafloxacin hydrochloride: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Ofloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Norfloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Marbofloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Oxolinic acid: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Nalidixic acid: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Flumequine: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Ciprofloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Levofloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Enoxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Lomefloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Pefloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Sparfloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Orbifloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Moxifloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Gatifloxacin: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Flumequine $3C^{13}$: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Norfloxacin –d5: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Enrofloxacin – d5: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.

➤ **Dung dịch chuẩn:**

- ✓ Nồng độ dung dịch chuẩn gốc được tính theo công thức sau:
Đối với chuẩn gốc là không phải dạng Base:

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

Trong đó: *m*: khối lượng chất chuẩn (mg)
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).
V: Thể tích bình định mức pha chuẩn (L)
Pure: độ tinh khiết của chuẩn

Đối với chuẩn gốc là dạng Base:

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

Trong đó: *m*: khối lượng chất chuẩn (mg)
V: Thể tích bình định mức pha chuẩn (L)
Pure: độ tinh khiết của chuẩn

❖ **Chuẩn đơn 1000 mg/L:**

- ✓ Cân khoảng 10.0 mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết (dung dịch trong suốt, không


CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 5/10
---	--	---

cận). Chuyển dung dịch chuẩn vào ống nghiệm thủy tinh, dán tem chuẩn theo BM.18.03

- ✓ Chuẩn được bảo quản trong lọ thủy tinh ở nhiệt độ $\leq 0^{\circ}\text{C}$ và sử dụng trong 12 tháng.
- ✓ Lưu ý:
 - Dựa vào dạng chuẩn và độ tinh khiết, nhân viên pha chuẩn phải tính toán khối lượng cân chuẩn để pha được chuẩn có nồng độ khoảng 1000 mg/L.
 - Trong trường hợp cân không chính xác theo số liệu ở trên thì nhân viên phải tính toán lại nồng độ theo đúng khối lượng cân thực tế. Nhân viên phải tính toán để nồng độ chuẩn trung gian tương ứng với nồng độ quy định trong SOP.
- Dung dịch chuẩn hỗn hợp 40 mg/L (Flouroquinolones 19 chất):
 - ✓ Hút 1mL các dung dịch chuẩn 1000mg/L của các chuẩn cho vào bình định mức 25mL, định mức đến vạch bằng Acetonitrile, Vortex đều.
 - ✓ Dung dịch được đựng trong ống nghiệm thủy tinh, bảo quản trong ngăn đá, sử dụng trong 12 tháng
- Dung dịch chuẩn hỗn hợp 1.6 mg/L (Flouroquinolones 19 chất):
 - ✓ Hút 1.0mL các dung dịch chuẩn 40mg/L của các chuẩn cho vào bình định mức 25mL, định mức đến vạch bằng Acetonitrile, Vortex đều.
 - ✓ Dung dịch được đựng trong ống nghiệm thủy tinh, bảo quản trong ngăn đá, sử dụng trong 06 tháng
- Dung dịch chuẩn hỗn hợp 80 $\mu\text{g/L}$ (Flouroquinolones 19 chất):
 - ✓ Hút 0.5mL dung dịch chuẩn 1.6mg/L của các chuẩn cho vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch pha động, Vortex đều.
 - ✓ Dung dịch được đựng trong ống nghiệm thủy tinh, bảo quản trong ngăn mát, sử dụng trong 06 tháng.
- ❖ Chuẩn đơn nội chuẩn:
 - ✓ Enrofloxacin D5 và Norfloxacin D5 200 mg/L: Cân khoảng 2.0 mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết (dung dịch trong suốt, không cận). Chuyển dung dịch chuẩn vào ống nghiệm thủy tinh, dán tem chuẩn theo BM.18.03
 - ✓ Flumequine 3C¹³ 100mg/L: Cân khoảng 1.0 mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết (dung dịch trong suốt, không cận). Chuyển dung dịch chuẩn vào ống nghiệm thủy tinh, dán tem chuẩn theo BM.18.03
 - ✓ Chuẩn được bảo quản trong lọ thủy tinh ở nhiệt độ $\leq 0^{\circ}\text{C}$ và sử dụng trong 12 tháng.
- ❖ Dung dịch hỗn hợp nội chuẩn (Enrofloxacin d5; Norfloxacin d5 và Flumequine 3C13) 800 $\mu\text{g/L}$:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 6/10
---	----------------------------------	---

- ✓ Hút 0.1mL dung dịch nội chuẩn Enrofloxacin d5, Norfloxacin d5 200mg/L và Flumequine 3C13 100mg/L cho vào bình định mức 25mL, định mức đến vạch bằng Acetonitrile, Vortex đều.
- ✓ Dung dịch được đựng trong ống nghiệm thủy tinh bảo quản trong ngăn mát, sử dụng trong 06 tháng.
- Dãy chuẩn làm việc: dãy chuẩn làm việc được pha trên dung môi pha động như sau:

No.	Chuẩn sử dụng	Thể tích lấy	Nội chuẩn 800 µg/L (IS)	Thể tích định mức	Dụng cụ pha chuẩn	C ₀ (µg/L)
Std1	80 µg/L	0.05	0.1 mL	10	Micropipet 200 µL	0.4
Std2		0.10				0.8
Std3		0.20				1.6
Std4		0.50			Pipet 2mL	4
Std5		1.00				8
Std6		2.00				16
<div> Lưu ý:</div> <div>✓ Khi pha lại nội chuẩn phải pha lại toàn bộ dãy chuẩn làm việc.</div>						

3. Pha động chạy máy:

- Acetonitrile 0.1% Formic acid: Lấy 4mL dung dịch Formic acid Merck cho vào chai Acetonitrile (HPLC - 4L) lắc đều và đánh siêu âm đuổi bọt khí.
- Nước LC/MS 0.1% Formic acid: Lấy 4mL dung dịch Formic acid Merck cho vào chai nước cất (LC/MS - 4L), thêm 4mL Methanol – HPLC, lắc đều và đánh siêu âm đuổi bọt khí

III. Kiểm soát QA/QC.

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

- Mẫu Blank hóa chất:
- Mẫu Blank matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.
- Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu Blank matrix với ít nhất 1 trong các nồng độ kiểm soát:
 - ✓ Nồng độ: 2 µg/Kg.
 - ✓ Nồng độ: 5 µg/Kg.
 - ✓ Nồng độ: 10 µg/Kg.
 - ✓ Nồng độ: 20 µg/Kg.

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

VI. xử lý mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 7/10
---	----------------------------------	---

- Lượng mẫu tối thiểu 50g/ 50mL.
- Mẫu được lắc đều trong 2 phút để đồng nhất.
- Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

2. Phương pháp tiến hành.

- Cân 2 ± 0.1 g mẫu vào ống ly tâm 50mL.
- Thêm 0.1ml nội chuẩn 800 μ g/L vào, sau đó cho khoảng 8mL H₂O vào, votex mẫu trong 2 phút, thêm tiếp 10ml Acetonitrile 5% Formic acid, lắc mạnh trong 3 phút, sau đó cho vào hỗn hợp muối (1g NaCl + 4g MgSO₄+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 MgSO₄+0.05g C18 + 0.05g PSA), votex 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 sau votex qua màng lọc 13mm, 0.45 μ m và thu dịch lọc vào lọ vial và phân tích trên LC/MS/MS.

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị:

Điều kiện AS	Điều kiện LC					
	Column	Thời gian	Acetonitrill e 0.1%FA	Methano l 0.1%FA	H ₂ O 0.1% FA	Tốc độ dòng, mL/ phút
<ul style="list-style-type: none">- Injection type: Full loop- Needle height from bottom: 1.0- Flush volume: 100µL- Tray temp control: off- Column oven control: off- Wash column: 500µL	Supelco Ascentis C18 5µm/2.1µm (hoặc cột tương đương)	0	5	5	90	0.4
		1	5	5	90	
		2	10	85	5	
		4.5	10	85	5	
		4.8	5	5	90	
		6	5	5	90	
Điều kiện MS/MS						
<ul style="list-style-type: none">- Q2 gas pressure: 1.2mT- MS acquire time: 6- Ion source : HESI- Polarity: Possitive- Scan type: SRM			<ul style="list-style-type: none">- Capillary temp: 350°C- Vaporizer temperature: 200- ESI spray voltage: ≥ 3000V- Sheath gas:30- Aux gas : 5			
Chỉ tiêu phân tích	Ion chính		Ion định lượng	Ion định tính		CE
Oxolinic acid	262		216	244		29; 18
Flumequine	262		202	244		33; 18
Enrofloxacin	360		316	245		19; 26

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 8/10
---	----------------------------------	---

Ciprofloxacin	332	288	203	18; 36
Norfloxacin	320	276	233	20; 20
Nalidilic acid	233	187	215	25; 15
Enoxacin	321	206	257	27; 17
Sarafloxacin	386	342	299	27; 18
Ofloxacin + Levofloxacin	362	261	318	30; 18
Orbifloxacin	396	295	352	22; 16
Difloxacin	400	356	299	19; 28
Danofloxacin	358	340	314	24; 16
pefloxacin	334	290	233	17; 26
Sparfloxacin	393	292	349	25; 18
lomefloxacin	352	265	308	23; 15
Gatifloxacin	376	332	261	28; 29
Moxifloxacin	402	261	384	22; 20
Marbofloxacin	363	320	72	14; 22
Norfloxacin d5	325	281		20
Enrofloxacin d5	365	321		25
Flumequine 3C ¹³	265	247		32

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

- MP: pha động định mức mẫu.
- Các điểm chuẩn từ thấp đến cao.
- MP
- Blank hóa chất.
- Blank matrix
- Mẫu
- QC
- Chuẩn check.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 9/10
---	----------------------------------	---

- Lưu ý: Nếu mẫu KPH thì chỉ cần chạy 01 điểm chuẩn, Blank hóa chất, Blank matrix, QC tại LOQ.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

1. Công thức tính kết quả.

$$C = \frac{C_0 \times V \times V_2}{m \times V_1} \times f (\mu g / Kg)$$

Trong đó:

- C_0 : Nồng độ chất phân tích tính từ đường chuẩn ($\mu g/L$)
 m : Khối lượng mẫu (g)
 V : Thể tích chiết. (mL)
 V_1 : Thể tích cô quay (mL)
 V_2 : Thể tích định mức. (mL)
 f : Hệ số pha loãng.

2. Thông tin tính toán:

Chỉ tiêu phân tích	Nội chuẩn	Chỉ tiêu phân tích	Nội chuẩn
Oxolinic acid	Flumequin 3C ¹³	Orbifloxacin	Enrofloxacin D5
Flumequine	Flumequin 3C ¹³	Difloxacin	Enrofloxacin D5
Enrofloxacin	Enrofloxacin D5	Danofloxacin	Enrofloxacin D5
Ciprofloxacin	Enrofloxacin D5	pefloxacin	Enrofloxacin D5
Norfloxacin	Norfloxacin D5	Sparfloxacin	Flumequin 3C ¹³
Nalidilic acid	Enrofloxacin D5	lomefloxacin	Norfloxacin D5
Enoxacin	Flumequin 3C ¹³	Gatifloxacin	Flumequin 3C ¹³
Sarafloxacin	Enrofloxacin D5	Moxifloxacin	Enrofloxacin D5
Ofloxacin + Levofloxacin	Không nội chuẩn	Marbofloxacin	Norfloxacin D5

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn (bao gồm điểm Zero) với $r^2 \geq 0.995$.
- ✓ Hiệu suất thu hồi:

Chỉ tiêu phân tích	% H _{th}	Chỉ tiêu phân tích	% H _{th}
Oxolinic acid	60 - 116	Ofloxacin + Levofloxacin	69 – 100
Flumequine	90 – 112	Orbifloxacin	90 – 120

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.055 Ngày ban hành: 30/5/2017 Lần ban hành: 03 Trang: 10/10
---	--	---

Enrofloxacin	67 – 104	Difloxacin	85 – 114
Ciprofloxacin	84 – 115	Danofloxacin	61 – 102
Norfloxacin	88 – 115	Marbofloxacin	80 – 118
Nalidilic acid	81 – 110	Sparfloxacin	104 – 120
Enoxacin	71 – 115	lomefloxacin	72 – 117
Sarafloxacin	64 - 114	Gatifloxacin	73 - 113

- ✓ Độ lệch của dung dịch chuẩn check không quá 10%
- ✓ Tỷ số ion:

Tỷ số ion	Độ lệch cho phép
> 50%	± 20%
> 20% - 50%	± 25%
> 10% - 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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