

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.095 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 1/10
--	--------------------------------	--

**ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG THUỐC KHÁNG SINH CHLORAMPHENICOL,  
FLOFENICOL VÀ THIAMPHENICOL TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI BẰNG SẮC  
KÝ LÔNG GHEP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA TỬ CỤC (LC/MS/MS)**

<b>Nhân viên biên soạn</b>	<b>Nhân viên xem xét</b>	<b>Nhân viên phê duyệt</b>
<b>Nguyễn Văn Lên</b>	<b>Trần Thái Vũ</b>	<b>Trần Thái Vũ</b>

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

<b>STT</b>	<b>Vị trí</b>	<b>Nội dung sửa đổi</b>	<b>Ngày sửa đổi</b>
<b>01</b>		Thay đổi formate SOP	<b>04/01/2018</b>

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.095 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 2/10
---	--------------------------------	--

## A. TỔNG QUAN

### I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng thuốc kháng sinh Chloramphenicol, Flofenicol và Thiamphenicol 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 (LOD) (µg/kg)	Giới hạn định lượng (LOQ) (µg/kg)
Chloramphenicol	0.5	1
Flofenicol	1	3
Thiamphenicol	2	6

## II. Tài liệu tham khảo

- *ACTA Chromatographica.No.17,2006*

## III. Nguyên tắc

- Dư lượng thuốc kháng sinh Chloramphenicol, Flofenicol và Thiamphenicol 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. 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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.095 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 3/10
---	--------------------------------	--

- Máy ly tâm
- Máy lắc Vortex.
- 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

## 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 C<sub>18</sub>: Supelco Ascentis C18 5µm/2.1µm (hoặc cột tương đương)

## II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

### 1. Hoá chất.

- Acetonitrile: tinh khiết phân tích.
- NaCl: tinh khiết phân tích.
- Nước cất: nước cất 2 lần
- Bột C18: có kích thước hạt  $\leq 100^{\circ}\text{A}$
- Methanol: HPLC/ LC/MS
- Nước DI: LC/MS
- Dung dịch pha động định mức Methanol/H<sub>2</sub>O (4/6): Được pha theo tỷ lệ thể tích tương ứng.

### 2. Chất chuẩn.

#### a. Thông tin chất chuẩn:

- Chloramphenicol: Dr.Ehrentofer hoặc chuẩn tương đương.
- Chloramphenicol – D5: Cambridge isotope Laboratories, Inc hoặc chuẩn tương đương.

#### b. Dung dịch chuẩn:

- Dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 1000 mg/L

- ✓ Cân  $10.0 \pm 0.2$  mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết ( dung dịch trong suốt, không cặn). Chuyển dung dịch chuẩn vào ống nghiệm thủy tinh, dán tem

chuẩn theo BM.18.03

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

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 được bảo quản trong lọ thủy tinh ở nhiệt độ  $\leq 0^{\circ}\text{C}$  và sử dụng trong 01 năm.
- ✓ Lưu ý: 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 có nồng độ khoảng 20 mg/L:
  - ✓ Dùng pipet 1ml, rút 0.5mL chuẩn 1000mg/L cho vào bình định mức 25ml, định mức lên đến vạch mức bằng Acetonitrile, Vortex. Chuyển dung dịch chuẩn vào ống nghiệm thủy tinh, dán tem chuẩn theo BM.18.03
  - ✓ Bảo quản trong ngăn mát, hạn sử dụng 06 tháng
- Dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 0.4mg/L:
  - ✓ Dùng pipet 1mL, rút 0.5mL dung dịch chuẩn 20mg/L cho vào bình định mức 25mL, định mức lên đến vạch bằng methanol, Vortex. Chuyển dung dịch chuẩn vào ống nghiệm thủy tinh, dán tem chuẩn theo BM.18.03
  - ✓ Bảo quản trong ngăn mát, hạn sử dụng 03 tháng
- Dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 20μg/L:
  - ✓ Dùng pipet 1mL, rút 0.5mL dung dịch chuẩn 0.4mg/L cho vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng methanol: nước (4/6), thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 20μg/L.

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: HD.TN.095 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/10</p>
---	---------------------------------------	--

- ✓ Bảo quản trong ngăn mát, hạn sử dụng 02 Tuần.
- Dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 4.0µg/L:
  - ✓ Dùng pipet 2mL, rút 2mL dung dịch chuẩn 20µg/L cho vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng methanol: nước (4/6), thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 4µg/L.
  - ✓ Bảo quản trong ngăn mát, hạn sử dụng 02 Tuần.
- Dung dịch nội chuẩn Chloramphenicol có nồng độ khoảng 10µg/mL:
  - ✓ Dùng Kim 1mL, rút 1mL nội chuẩn 100µg/mL cho vào bình định mức 10ml. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, Vortex cho chuẩn tan hết ( dung dịch trong suốt, không cặn). Chuyển dung dịch chuẩn vào ống nghiệm thủy tinh, dán tem chuẩn theo BM.18.03
  - ✓ Dung dịch nội chuẩn được bảo quản trong ngăn mát, hạn sử dụng 11/2024.
- Dung dịch nội chuẩn có nồng độ khoảng 400µg/L:
  - ✓ Dùng pipet 1mL, rút 1.0mL nội chuẩn 10µg/mL cho vào bình định mức 25mL. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, thu được dung dịch nội chuẩn 400µg/L.
  - ✓ Dung dịch được bảo quản trong tủ mát, sử dụng trong 12 tháng.
- Dung dịch nội chuẩn có nồng độ khoảng 40µg/L:
  - ✓ Dùng pipet 1mL, rút 1mL nội chuẩn 400µg/L vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, thu được dung dịch nội chuẩn 40µg/L.
  - ✓ Dung dịch được bảo quản trong lọ thủy tinh ở tủ mát, sử dụng trong 03 tháng.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.095 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 6/10
--	--------------------------------	--

c. Dung dịch chuẩn làm việc:

Dãy chuẩn được pha từ dung dịch chuẩn ~20 (µg/L)					
No.	V <sub>Rút chuẩn</sub> mL	V <sub>Định mức</sub> mL	IS (mL)	C <sub>0</sub> (µg/L)	Dụng cụ pha chuẩn
Std 01	0.05	10.0	0.25ml nội chuẩn 40ppb	0.1	Micropipete 200µL
Std 02	0.1			0.2	
Std 03	0.20			0.4	
Std 04	0.5			1.0	Pipet 2ml
Std 05	1			2.0	
Std 06	2			4.0	

➤ Dây chuẩn làm việc được đựng trong lọ thủy tinh, bảo quản trong ngăn mát. Sử dụng trong 01 tuần.

3. Pha động chạy máy:

- Methanol 0.1% Formic acid: Lấy 4mL dung dịch Formic acid Merck cho vào chai Methanol (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
- Thực hiện mẫu Blank, blank matrix và mẫu QC theo mục VI.2.

### IV. Thực hiện Phân tích

1. chuẩn bị mẫu

- Lượng mẫu được lấy ít nhất là 100g.
- Chứa mẫu trong vật chứa kín khí có dung tích vừa đủ.
- Nếu mẫu chưa phân tích ngay, bảo quản mẫu ở nhiệt độ phòng.

2. Xử lý mẫu

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	<b>Mã số: HD.TN.095</b> <b>Lần ban hành: 02</b> <b>Ngày ban hành: 04/01/2018</b> <b>Trang: 7/10</b>
--	--------------------------------	--

- Cân khoảng  $2 \pm 0.1$  g mẫu đã được đồng nhất (theo 4.1 – HD.KT.0.22) cho vào ống ly tâm 50 mL. Thêm vào 0.125ml nội chuẩn CAP\_d5 có nồng độ 50ppb. Để yên 30 phút.
- Thêm 10mL nước cất vào ống ly tâm đựng mẫu, siêu âm 5 phút, vortex đều. Thêm tiếp 10ml ACN, vortex thật kỹ trong 2 phút. Cho vào 2g NaCl , lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm ở 3500 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 3mL lớp trên cho vào ống ly tâm 15mL có chứa (0.2g  $MgSO_4$ +0.1g C18 + 0.1g PSA), vortex 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 cặn khô bằng chính xác 1mL dung dịch pha động, vortex 20giây. Lọc dịch đục qua màng lọc 13mm, 0.45 $\mu$ m và thu dịch lọc vào lọ vial, 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

Chương trình gradient dung môi theo thời gian:

<i>Thời gian</i>	<i>Methanol</i>	<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>Tốc độ dòng, mL/phút</i>
0	40	60	0.3
1	0	100	
3.5	0	100	
4.0	40	60	
6.0	40	60	

#### b. Điều kiện cho hệ thống tiêm mẫu tự động

- Injection type: Full loop
- Injection volume: 20 $\mu$ l
- Needle height from bottom: 1.0
- Flush volume: 100 $\mu$ L
- Tray temp control: off
- Column oven control: off
- Wash column: 100 $\mu$ L

#### c. Điều kiện MS

- Q2 gas pressure: 1.2mT

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.095 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 8/10
--	--------------------------------	--

- MS acquire time: 6
- Ion source : ESI
- Polarity: Negative
- Scan type: SRM
- Capillary temp: 350°C
- Vaporizer temperature: 200
- ESI spray voltage: 3000V
- Sheath gas:50
- Aux gas : 5

<i>Bảng2: 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>
Chloramphenicol	321	194	257
Chloramphenicol_d5	326	157	
Thiamphenicol	334	185	290
Flofenicol	356	185.3	336

#### 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:



<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.095 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 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,  $\mu\text{g/kg}$ .

- $C_0$ : 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. YÊU CẦU VỀ ĐỘ TIN CẬY CỦA PHÉP PHÂN TÍCH**

- 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.
- 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.

Tỷ 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 ( $\leq 20$  mẫu). Hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn phải nằm trong khoảng giá trị hiệu lực hóa phương pháp.
- Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu ( $\leq 20$  mẫu). Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại không quá  $\pm 30 \%$ .

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.095 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 10/10
--	--------------------------------	---

## **E. BÁO CÁO KẾT QUẢ**

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