

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.017 Ngày ban hành: 20/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 1/9
--	--	--

**XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG KHÁNG SINH CHLORAMPHENICOL
TRONG MẬT ONG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LÒNG GHÉP
ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ 3 TỬ CỰC**

***DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL IN HONEY BY 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	20-5-2017

- A. TỔNG QUAN**
I. Phạm vi áp dụng.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.017 Ngày ban hành: 20/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 2/9
--	--	--

Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng thuốc kháng sinh Chloramphenicol trong nền mẫu **mật ong** bằng sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).

Chất phân tích	Giới hạn phát hiện (LOD) ($\mu\text{g/kg}$)	Giới hạn định lượng (LOQ) ($\mu\text{g/kg}$)
Chloramphenicol	0.04	0.12

II. Tài liệu tham khảo.

- ACTA Chromatographica.No.17,2006

III. Nguyên tắc.

- Dư lượng thuốc kháng sinh Chloramphenicol trong mẫu sau khi được tách chiết khỏi nền mẫu sẽ được 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.
- 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 4 số lẻ
- Cân kỹ thuật có sai số $\leq 0.01\text{g}$
- Bình cầu 100mL cổ 24/29
- Hệ thống cô quay.
- Bình định mức 10mL; 25mL
- Micropipet: 200 μL ; 1000 μL
- Pipet 1mL; 2mL.
- ống ly tâm PP: 15mL; 50mL
- Vial 1.8mL nắp vặn.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.017 Ngày ban hành: 20/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 3/9
--	--	--

- Syringe: 3mL
- Syringe filter: Nilon $\leq 0.45\mu\text{m}$.
- Máy ly tâm: tốc độ ≥ 2000 vòng/ phút.
- Máy Vortex.

2. Thiết bị phân tích

Hệ thống thiết bị LC/MS/MS:

- Hệ thống tiêm mẫu tự động.
- Hệ thống LC.
- Đầu dò khối phổ MS/MS.

II. Hoá chất và chất chuẩn.

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 $\leq 100^0\text{A}$
- Methanol: HPLC/ LC/MS
- Nước DI: LC/MS
- Dung dịch pha động định mức Methanol/H₂O (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 ± 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:

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

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

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

Pure: độ tinh khiết của chuẩn

- ✓ 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.
 - ✓ Bảo quản trong ngăn mát, hạn sử dụng 02 Tuần.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.017 Ngày ban hành: 20/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 5/9
--	--	--

- 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.

c. **Dung dịch chuẩn làm việc:**

Dãy chuẩn được pha từ dung dịch chuẩn ~20 (µg/L)					
No.	V _{Rút chuẩn} mL	V _{Định mức} mL	IS (mL)	C ₀ (µg/L)	Dụng cụ pha chuẩn

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.017 Ngày ban hành: 20/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 6/9
--	--	--

Std 01	0.05	10.0	0.25ml nội chuẩn 40ppb	0.1	Micropipete 200 μ L
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	

- Dãy 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 với ít nhất một trong các nồng độ mẫu kiểm soát sau:
 - ❖ LOQ: 0.12 μ g/Kg.
 - ❖ MRPL: 0.3 μ g/Kg.
 - ❖ Spike: 1.0 μ g/Kg.

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

VI. xử lý mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu.

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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.017 Ngày ban hành: 20/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 7/9
--	--	--

2. Phương pháp tiến hành.

- Cân khoảng 2 ± 0.1 g mẫu đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 mL.
- Thêm 8mL nước cất vào ống ly tâm đựng mẫu, vortex đều. Thêm vào 0.05mL nội chuẩn 40 μ g/L. Thêm tiếp 10ml ACN, vortex thật kỹ trong 2 phút. Cho vào hỗn hợp muối 1g NaCl, lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm ở ≥ 2000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 6mL lớp trên cho vào ống ly tâm 15mL có chứa (0.2g MgSO₄+0.025g C18), vortex 30", ly tâm 3000 vòng/phút, rút 5mL 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 μ m và thu dịch lọc vào lọ vial, phân tích trên LC/MS/MS.

3. Phân tích

Thông số thiết bị:

Điều kiện AS	Điều kiện LC				
	Column	Thời gian	Methano I 0.1%FA	H ₂ O 0.1% FA	Tốc độ dòng, mL/phút
<ul style="list-style-type: none">- Injiiection 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	40	60	0.4
		1	100	0	
		3.5	100	0	
		4.0	40	60	
		6.0	40	60	
Điều kiện MS/MS					
<ul style="list-style-type: none">- Q2 gas pressure: 1.2mT- 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:30- Aux gas : 5	Ion chính	Ion định lượng		Ion xác nhận	
	Chloramphenicol				
	321	194		152	
	Chloramphenicol – D5				
	326	157		-	

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.

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.

Công thức tính kết quả.

$$C = \frac{C_0 \times V_3 \cdot V_1}{m \times V_2}$$

Trong đó:

- o C: lượng chất cần phân tích có trong mẫu, µg/kg
- o C₀: nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, µg/L
- o m: khối lượng mẫu phân tích, g
- o V₁: Thể tích của dịch chiết, mL
- o V₂: Thể tích dịch chiết Cô quay, ml
- o V₃: Thể tích định mức sau thổi khô, ml

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

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

Nồng độ ppb	% H _{th}
0.12	69 – 120
0.3	76 – 120
1.0	80 - 120

- ✓ Độ lệch của thời gian lưu không quá 2.5%.
- ✓ Tỷ số ion.

Tỷ số ion	Độ lệch cho phép
> 50%	± 20%

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.017 Ngày ban hành: 20/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 9/9
--	--	---

> 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