

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.004 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 10/8/2017 Trang: 1/9
--	----------------------------	--

**ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG KHÁNG SINH MALACHITE GREEN, LEUCO
MALACHITE GREEN VÀ CRYSTAL VIOLET TRONG THỦY SẢN, THỊT VÀ SẢN
PHẨM THỊT BẰNG SẮC KÝ LÔNG 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		Đánh giá và cập nhật lại phương pháp và bổ sung thêm nền mẫu Thịt, sản phẩm thịt	10-8-2017

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.004 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 10/8/2017 Trang: 2/9
--	----------------------------	--

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

- ✓ Phương pháp này được áp dụng xác định dư lượng thuốc kháng sinh trong thủy sản (tôm, cá, mực...) và sản phẩm thủy sản, Thịt và sản phẩm thịt bằng sắc kí lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).
- ✓ Giới hạn phát hiện và thông số đánh giá của phương pháp:

Chất phân tích	LOD, µg/kg	LOQ, µg/kg
MG	0.1	0.3
LMG	0.1	0.3

II. Tài liệu tham khảo

- ✓ **BS EN 15662 (2008)**
- ✓ Jeffrey M. Vande Riet, Cory J. Murphy, Johanna N. Pearce, Ross A. Potter, and B. Garth Burns, *Determination of Malachite green and Leucomalachite green in a variety of a quacultured products by liquid chromatography vith tandem mass spectrometry detection*, Journal of AOAC International Vol.88, No.3, 2005.

III. Nguyên tắc:

- ✓ Dư lượng kháng sinh trong mẫu sẽ được chiết lên Acetonitrille. Cô quay, định mức lại trong pha động, sau đó được định tính 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 cơ bản

- ✓ Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg.
- ✓ Cân kỹ thuật, độ chính xác 1mg.
- ✓ Máy ly tâm
- ✓ Máy lắc Vortex.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.004 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 10/8/2017 Trang: 3/9
--	----------------------------	--

- ✓ Màng lọc PTFE, 13mm, 0,45µm
- ✓ Ống ly tâm 50mL, 15mL, polypropylen, có nắp đậy
- ✓ Bột SPE C18.
- ✓ Bột PSA
- ✓ Bình định mức (CCX A): 10mL, 25mL
- ✓ Pipet: 1mL, 2mL
- ✓ Dụng cụ thủy tinh các loại: becher, bình cầu 100mL
- ✓ Bộ cô quay chân không.

2. Hệ thống LC/MS/MS

- ✓ Hệ thống sắc kí lỏng: Hệ thống LC/MS/MS bao gồm Accela 1250 Pump, Autosampler Accela và đầu dò khối phổ 3 tứ cực TSQ Quantum Ultra.
- ✓ Cột sắc kí lỏng pha đảo C₁₈: Supelco Ascentis C18 5µm/2.1µm hoặc tương đương.

II. Hóa chất và Chất chuẩn

1. Hóa chất

- ✓ Nước cất 2 lần khử ion
- ✓ Acetonitril HPLC
- ✓ N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride (TMDP), Merck.
- ✓ Methanol, HPLC.
- ✓ NH₃, Merck
- ✓ HCOOH, Merck.
- ✓ Ammonium Acetate, Merck

2. Dung dịch thử

Dung dịch pha động

A: Pha dung dịch Ammonium acetate 0.1mM (pH 4.5)

B: Acetonitrille 0.1% formic acid

3. Chất chuẩn

a. Chất chuẩn

- ✓ Malachite green oxalate của Dr. Ehrenstofer hoặc chuẩn tương đương
- ✓ Leucomalachite green của Dr. Ehrenstofer hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Crystal violet của Sigma-Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Malachite green- d5 của Sigma-Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
- ✓ Leucomalachite green-d5 của Sigma-Aldrich hoặc chuẩn tương đương.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.004 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 10/8/2017 Trang: 4/9
--	----------------------------	--

b. Dung dịch chuẩn và nội chuẩn gốc 1000 mg/L

❖ **Nồng độ chất chuẩn gốc được tính theo công thức sau:**

Đối với chuẩn gốc là không phải dạng Base:

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

Đối với chuẩn gốc là dạng Base:

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

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

❖ **Cách pha dung dịch chuẩn 1000 mg/L:** (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 1 năm)

- ✓ **Malachite green:** Cân chính xác 28.3mg chuẩn rắn Malachite green oxalate vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:

$$C_{Malachitegreen} = \frac{28.3 \times 364.911}{927.0} \times \frac{1000}{10} \times 0.90 = 1002.62 (mg/Kg)$$

- ✓ **Leucomalachite green:** Cân chính xác 10.1mg chuẩn rắn Leucomalachite green vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:

$$C_{leucomalachitegreen} = 10.1 \times \frac{1000}{10} \times 0.99 = 999.9 (mg/Kg)$$

- ✓ **Crystal violet:** Cân chính xác 11.3mg chuẩn rắn Crystal violet vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:

$$C_{Crystalviolet} = 11.3 \times \frac{1000}{10} \times 0.89 = 1005.7 (mg/Kg)$$

- ✓ **Malachite green d5:** Cân chính xác 15.4mg chuẩn rắn malachite green d5 picrate vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được chuẩn gốc có nồng độ:

$$C_{\text{Malachite-d5}} = \frac{17.0 \times 334.58}{562.58} \times \frac{1000}{10} \times 0.99 = 1000.92 \text{ (mg / Kg)}$$

- ✓ **Leucomalachite green d5**: Cân chính xác 10.1mg chuẩn rắn Leucomalachite green d5 vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:

$$C_{\text{Leucomalachite-d5}} = 10.1 \times \frac{1000}{10} \times 0.99 = 999.9 \text{ (mg / Kg)}$$

➤ **Dung dịch nội chuẩn hỗn hợp làm việc:** (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 06 tháng)

- ✓ Từ dung dịch 1000 mg/L, tiến hành pha loãng trong acetonitril để được các dung dịch nội chuẩn làm việc có nồng độ chính xác mong muốn.
- ✓ **Dung dịch nội chuẩn hỗn hợp 10 mg/L**: Rút lần lượt 0.1 mL và 0.1 mL dung dịch nội chuẩn MG-d5 và LMG-d5 1000 mg/L vào bình 10 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril.
- ✓ **Dung dịch nội chuẩn hỗn hợp 0.5 mg/L**: Rút 0.5 mL dung dịch nội chuẩn hỗn hợp 10 mg/L vào bình 10 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril.
- ✓ **Dung dịch nội chuẩn 25 µg/L**: Rút 0.5mL của dung dịch nội chuẩn 0.5mg/L vào bình định mức 10ml, định mức đến vạch bằng acetonitrille.
- ✓ **Lưu ý**: Nồng độ dung dịch nội chuẩn trung gian có thể thay đổi, nhưng nồng độ nội chuẩn làm việc (nồng độ nội chuẩn dùng để spike) phải có nồng độ 25 µg/L.

➤ **Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc:**

- ✓ **Dung dịch chuẩn hỗn hợp 100 mg/L**: Rút lần lượt 1.0 mL dung dịch chuẩn MG, LMG và CV 1000 mg/L vào bình 10 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril. (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 06 tháng)
- ✓ **Dung dịch chuẩn hỗn hợp 4 mg/L**: Rút lần lượt 1.0 mL dung dịch chuẩn 100 mg/L vào bình 25 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril. (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 03 tháng)
- ✓ **Dung dịch chuẩn hỗn hợp 160 mcg/L**: Rút 1 mL dung dịch chuẩn hỗn hợp 4.0 mg/L vào bình 25 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril. (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 01 tháng)
- ✓ **Dung dịch chuẩn hỗn hợp 8ppb**: Rút 0.5mL dung dịch chuẩn 160mcg/L vào bình định mức 10mL, định mức lên đến vạch bằng hỗn hợp pha động. (Pha khi sử dụng)

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.004 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 10/8/2017 Trang: 6/9
--	----------------------------	--

✓ *Dung dịch đường chuẩn làm việc được pha như sau:*

STT	Nồng độ chuẩn trung gian, ppb	Thể tích lấy, mL	Thể tích nội chuẩn 25ppb, mL	Thể tích định mức, mL	C, ppb
St1	8.0	0.05	0.2	10	0.04
St2		0.1			0.08
St3		0.2			0.16
St4		0.5			0.40
St5		1			0.80
St6		2			1.60

🌈 Lưu ý: Nồng độ chuẩn 1000 mg/L có thể thay đổi do quá trình cân chuẩn, Nhân viên pha chuẩn phải dùng số liệu cân chuẩn để tính lại nồng độ chuẩn.

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

IV. Xử lý mẫu

1. Chuẩn bị mẫu

- Lượng mẫu được lấy ít nhất là 100 g (đối với mẫu rắn).
- Mẫu được xay đồng nhất.
- Nếu mẫu chưa phân tích ngay, bảo quản mẫu ở $\leq -10^{\circ}\text{C}$.

2. Phương pháp tiến hành

- Mẫu Blank thuốc thử: Lấy 10ml nước cất cho vào ống ly tâm 50mL.
- Mẫu và mẫu QC: Cân $5 \pm 0.5\text{g}$ mẫu vào ống ly tâm 50mL.
- Thêm 0.1 mL nội chuẩn MG-d5 và LMG-d5 có nồng độ 25ppb và 100 μl TMDP/MeOH 1mg/mL vào mẫu thử. Lần lượt thêm tiếp vào 7 mL nước cất, lắc mạnh và 10 mL ACN (5%formic acid). Vortex mẫu khoảng 3 phút, để mẫu vào ngăn đá 30 phút, sau đó thêm tiếp vào hỗn hợp muối (4g MgSO_4 + 1g NaCl + 1g trisodium citrate dihydrate + 0.5g disodium sesquihydrate dihydrate), lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm 10 phút ở 3500 vòng/phút. Hút 3mL lớp trên cho vào ống ly tâm 15mL có chứa (0.3g MgSO_4 + 0.05g C18 + 0.05g PSA), vortex 1 phút, ly tâm 3000 vòng/ phút. Lấy 2ml dung dịch cho vào bình cầu, cô quay hoặc thổi khô bằng khí Nitơ. Định mức lại

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.004 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 10/8/2017 Trang: 7/9
--	----------------------------	--

bằng 1mL pha động, phân tích trên LC/MS/MS.

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị

Điều kiện AS	Điều kiện LC				
	Column	Thời gian	A	B	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	60	40	0.4
		1.5	60	40	
		2.0	0	100	
		5.5	0	100	
		6.0	40	60	
		8.0	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
	Malachite green				
	329.2		312.9 (39)		208 (38)
	Leucomalachite green				
	331.4		239 (30)		316 (30)
	Malachite green d5				
	334.13		318.11 (30)		
	Leucomalachite green d5				
	336.18		239.08 (30)		

2. Trình tự tiêm mẫu

- ✓ Pha động
- ✓ Các dung dịch chuẩn làm việc, từ nồng độ thấp đến cao
- ✓ Pha động
- ✓ Mẫu Blank hóa chất, Blank matrix
- ✓ Mẫu cần phân tích
- ✓ Mẫu QC
- ✓ Chuẩn check

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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.004 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 10/8/2017 Trang: 8/9
--	----------------------------	--

Công thức tính kết quả:

$$C = C_0 \times F$$

Trong đó:

- o C: hàm lượng chất phân tích có trong mẫu. (µg/Kg)
- o C_0 : hàm lượng chất phân tích từ đường chuẩn. (µg/Kg)
- o F: hệ số pha loãng (dilute factor) $F = (V_1 \times V_3) / (V_2 \times m)$
- o V_1 : Thể tích chiết (mL)
- o V_2 : Thể tích mẫu đem cô quay (mL)
- o V_3 : Thể tích định mức (mL)
- o M: Khối lượng mẫu (g)

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 $\pm 15s$
- ✓ Nồng độ QC trong khoảng

Nồng độ (µg/Kg)	% H_{th}	
	Malachite green	Leucomalachite gree
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%	$\pm 20 \%$
>20 đến 50%	$\pm 25 \%$
> 10 đến 20 %	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.004 Lần ban hành: 05 Ngày ban hành: 10/8/2017 Trang: 9/9
--	----------------------------	--

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