

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.054 Ngày ban hành: 27/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 1/8
---	----------------------------------	--

ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG THUỐC KHÁNG SINH HỌ TETRACYCLINES 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	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.054 Ngày ban hành: 27/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 2/8
---	----------------------------------	--

Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng thuốc kháng sinh họ Tetracycline 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:

Chỉ tiêu phân tích	LOD	LOQ
Tetracycline Doxycycline Oxytetracycline Chlotetracycline	0.6 µg/Kg	2 µg/Kg

II. Tài liệu tham khảo.

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo:

- Journal of Chromatography A, 928(2001) 177-186(*)
- EN 720002565, page 36
- AOAC 995.09

III. Nguyên tắc.

Dư lượng thuốc kháng sinh họ Tetracyclines trong mẫu sau khi được tách chiết khỏi nền mẫu bằng SPE sẽ được rửa giải bằng dung môi thích hợp. 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, 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, 0,45µm
- Ống ly tâm 50mL, 15mL polypropylen, có nắp đậy
- Bồn siêu âm.
- Bình định mức: 10mL; 25mL
- Pipet: 1.0mL, 2mL.
- Micropipet bầu: 200 µL, 1mL
- Syringe lọc mẫu.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.054 Ngày ban hành: 27/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 3/8
---	----------------------------------	--

- Vial nâu 1.8mL.
- Dụng cụ thủy tinh các loại: ống Hatch, becher, erlen, ...
- Hệ thống cô quay chân không
- Hệ thống chiết SPE

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 5µm/2.1µm (hoặc cột tương đương)

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá chất.

- Nước cất 2 lần khử ion
- Acetonitril (ACN, HPLC)
- Methanol (HPLC)
- EDTA (tkpt)
- Citric acid (tkpt)
- Na₂HPO₄.12H₂O (tkpt)
- Oxalic acid (tkpt)
- Đệm McIlvaine – EDTA (0.1 mol/L pH: 4): hòa tan 21.01g citric acid monohydrate, 44.78g Na₂HPO₄.12H₂O và 60.5g Na₂EDTA.2H₂O trong 1.625L nước. Chỉnh pH về 4 bằng dung dịch NaOH 0.1M.

2. Chất chuẩn.

- **Chất chuẩn:**
 - ✓ Tetracycline/ Tetracycline.HCl: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
 - ✓ Oxytetracycline.HCl: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
 - ✓ Doxycycline.HCl: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
 - ✓ Chlortetracycline.HCl: Sigma Aldrich hoặc chuẩn tương đương.
 - ✓ Demeclocycline: Dr.Ehrentofer hoặc chuẩn tương đương.
- **Dung dịch chuẩn:**
 - ✓ Nồng độ dung dịch chuẩn gốc được tính theo công thức sau:
Đối với chuẩn gốc là dạng base:

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

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)

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.054 Ngày ban hành: 27/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 4/8
---	----------------------------------	--

Pure: độ tinh khiết của chuẩn

- ❖ Tetracycline 1000 mg/L:
 - ✓ Cân khoảng 11.0 mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết (dung dịch trong suốt, không cặn). 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 < 0°C và sử dụng trong 06 tháng.
- ❖ Oxytetracycline 1000 mg/L:
 - ✓ Cân khoảng 11.0 mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết (dung dịch trong suốt, không cặn). 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 < 0°C và sử dụng trong 06 tháng.
- ❖ Chlotetracycline 1000 mg/L:
 - ✓ Cân khoảng 11.0 mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết (dung dịch trong suốt, không cặn). 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 < 0°C và sử dụng trong 06 tháng.
- ❖ Doxycycline 1000 mg/L:
 - ✓ Cân khoảng 11.0 mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết (dung dịch trong suốt, không cặn). 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 < 0°C và sử dụng trong 06 tháng.
- ❖ Demeclocycline 1000 mg/L:
 - ✓ Cân khoảng 11.0 mg chuẩn vào bình định mức 10mL. Định mức lên bằng Acetonitrile tới vạch. Vortex cho chuẩn tan hết (dung dịch trong suốt, không cặn). 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 < 0°C và sử dụng trong 06 tháng.
- ✓ 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 hỗn hợp 40 mg/L (Tetracycline, Chlotetracycline, Oxytetracycline và Doxycycline):
 - ✓ 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.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.054 Ngày ban hành: 27/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 5/8
---	----------------------------------	--

- ✓ Dung dịch được đựng trong ống nghiệm thủy tinh, bảo quản trong ngăn đá, sử dụng trong 02 tháng
 - ❖ Dung dịch chuẩn hỗn hợp 2.0 mg/L (Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline và Doxycycline):
 - ✓ Hút 1.25mL các dung dịch chuẩn 40mg/L của các chuẩn cho vào bình định mức 25mL, định mức đến vạch bằng Acetonitrile, Vortex đều.
 - ✓ Pha khi phân tích mẫu.
 - ❖ Dung dịch chuẩn hỗn hợp 0.2 mg/L (Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline và Doxycycline):
 - ✓ Hút 1.0mL dung dịch chuẩn 2.0mg/L của các chuẩn cho vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch bằng pha động, Vortex đều.
 - ✓ Pha khi phân tích mẫu.
 - ❖ Dung dịch chuẩn Demeclocycline 50 mg/L:
 - ✓ Hút 1.25mL dung dịch chuẩn 1000mg/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 đá, sử dụng trong 06 tháng.
 - ❖ Dung dịch chuẩn Demeclocycline 500 µg/L:
 - ✓ Hút 0.25mL dung dịch chuẩn 50mg/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 đá, sử dụng trong 02 tháng.
- Dây chuẩn làm việc: dây chuẩn làm việc được pha trên dung môi pha động như sau:

No.	Chuẩn sử dụng	Thể tích lấy	Demeclocycline 500 µg/L (IS)	Thể tích định mức	Dụng cụ pha chuẩn	C ₀ (µg/L)
Std1	200 µg/L	0.05	0.5 mL	10	Micropipet 200 µL	1.0
Std2		0.10				2.0
Std3		0.20				4.0
Std4		0.50				10.0
Std5		1.00			Pipet 2mL	20.0
Std6		2.00				40.0

📌 Lưu ý:

- ✓ Nếu mẫu có kiểm Demeclocycline thì không được dùng Demeclocycline làm nội chuẩn.
- ✓ Nếu mẫu có phát hiện (có peak dương tính) thì các chất có sử dụng Demeclocycline làm nội chuẩn trong tính kết quả phải xác nhận lại mẫu xem có Demeclocycline không.

3. Pha động chạy máy:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.054 Ngày ban hành: 27/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 6/8
---	----------------------------------	--

- Acetonitrille 0.1% Formic acid: Lấy 4mL dung dịch Formic acid Merck cho vào chai Acetonitrille (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 nồng độ kiểm soát:
Thực hiện ít nhất 01 trong các nồng độ kiểm soát sau:
 - ✓ 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.
 - 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 0.05ml nội chuẩn 500µg/L vào, sau đó cho khoảng 10mL đệm McIlvaine – EDTA (pH: 4) vào, vortex mẫu trong 5 phút, ly tâm 3000 vòng/phút trong năm phút, cho qua cột Oasis HLB 60mg/3mL đã hoạt hóa bằng 3ml methanol, 3ml nước, 1.5ml đệm McIlvaine-EDTA(pH:4), rửa cột bằng 2ml nước, 2ml hỗn hợp (methanol/nước: 5/95). Rút khô cột trong 30 phút (Cột phải khô hoàn toàn trước khi rửa giải).
 - Rửa giải với 15ml Ethyl acetate vào bình cầu, cô quay và định mức 1ml bằng pha động. Lọc qua màng lọc 0.45µm vào vial nâu. Phân tích trên LC/MS/MS.

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị:

Điều kiện AS	Điều kiện LC				
	Column	Thời i gian	Acetonitrille 0.1%FA	H ₂ O 0.1% FA	Tốc độ dòng, mL/phút

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.054 Ngày ban hành: 27/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 7/8
---	----------------------------------	--

<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	10	90	0.4
		2	20	80	
		3	90	10	
		5.5	90	10	
		6.0	10	90	
		8	10	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- Capillary temp: 350°C- Vaporizer temperature: 200- ESI spray voltage: ≥ 3000V- Sheath gas:30- Aux gas : 5	Chất phân tích	Ion chính	Ion định lượng	Ion xác nhận	
	Tetracycline	445	154	410	
	Doxycycline	445	267	321	
	Chlotetracycline	479	154	462	
	Oxytetracycline	461	426	201	
	Demeclocycline	465	289	430	

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.
- Lưu ý: Nếu mẫu KPH thì chỉ cần chạy 01 điểm chuẩn, Blank hóa chất, Blank matrix, QC tại LOQ và các peak của mẫu QC đều xuất hiện rõ ràng.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

1. Công thức tính kết quả.

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

Trong đó:


C₀: Nồng độ chất phân tích tính từ đường chuẩn (µg/L)

m: Khối lượng mẫu (g)

V: Thể tích định mức. (mL)

2. Thông tin tính toán:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.054 Ngày ban hành: 27/5/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 8/8
---	--	--

Chỉ tiêu phân tích	Nội chuẩn	Lưu ý	
Tetracycline	Sử dụng nội chuẩn	 Nếu mẫu có phát hiện thì phải kiểm tra lại mẫu có dương tính với Demeclocycline không bằng cách làm mẫu không Spike Demeclocycline.	Doxycycline ra sau Tetracycline .
Oxytetracycline	Không sử dụng nội chuẩn		
Doxycycline			
Chlotetracycline			

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

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

Chỉ tiêu phân tích	Nồng độ ppb	% H _{th}	Chỉ tiêu phân tích	Nồng độ ppb	% H _{th}
Tetracycline	2	61 - 116	Oxytetracycline	2	60 - 115
	5	61 – 110		5	
	10	63 – 99		10	
	20	60 - 90		20	
Doxycycline	2	63 – 115%	Chlotetracycline	2	70 – 120
	5			5	90 – 105
	10			10	65 – 104
	20			20	60 - 86

- ✓ 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