**ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG THUỐC KHÁNG SINH HỌ FLUOROQUINOLONES TRONG THỦY SẢN, SẢN PHẨM THỦY SẢN, THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA TỨ CỰC (LC/MS/MS)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nhân viên biên soạn** | **Nhân viên xem xét** | **Nhân viên phê duyệt** |
| **Nguyễn Văn Lên** | **Trần Thái Vũ** | **Trần Thái Vũ** |

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| STT | Vị trí | Nội dung sửa đổi | Ngày sửa đổi |
| **01** |  | Thay đổi Formate SOP | **30/03/2018** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

# TỔNG QUAN

# Phạm vi áp dụng

* Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng thuốc kháng sinh họ fluoroquinolone (xem bảng 1) trong nền mẫu ***Thủy sản, sản phẩm thủy sản, thịt và sản phẩm thịt*** 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)* |
| Enrofloxacin  Ciprofloxacin  Norfloxacin  Gatifloxacin  Sarafloxacin  Danofloxacin  Nalidixic acid  Flumequine | 1 | 3.0 |

# Tài liệu tham khảo

* Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: ***BS EN 15662:2008***

1. **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.

# Thông tin an toàn phòng thử 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.

1. **PHÂN TÍCH**
2. **Thiết bị và dụng cụ**
3. **Thiết bị**

* Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg

### 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

1. **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 kí lỏng pha đảo C18: Cosmosil 2.5C18 – MS – II (hoặc cột tương đương)

1. **Hóa chất và dung dịch hóa chất**

### **Hóa chất**

### Nước cất 2 lần khử ion

### Acetonitril (ACN, HPLC)

### Formic acid 99%(P.A)

### Sodium chloride (PA)

### Trisodium Citrate dihydrate (PA)

### Magienium Sulfate (PA)

### Disodium hydrogencitrate sesquihydrate (PA)

### Bột C18

### Bột PSA

### **Dung dịch thử**

### Dung dịch Methanol (0.1% HCOOH) (v/v): thêm 1mL HCOOH vào 1 lit Acetonitril. Đánh siêu âm 15 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.

### Dung dịch H2O (0.1% HCOOH) (v/v): thêm 1mL HCOOH vào 1 lit nước cất 2 lần khử ion. Đánh siêu âm 15 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.

### **Chất chuẩn**

### **Thông tin về chất chuẩn**

### Các chất chuẩn của sigma aldrich, Dr. Ehrentofer, Acros, TRC,...

### Danofloxacin, Enrofloxacin, Difloxacin, Sarafloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Marbofloxacin, Oxolinic acid, Nalidixic acid, Flumequine, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Norfloxacin –d5, Lomefloxacin, Enrofloxacin – d5, Sparfloxacin, Flumequine 3C13

### **Dung dịch chuẩn 1000 mg/L**

### Nồng độ dụng dịch chuẩn gốc được tính theo công thức sau:

### 

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

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

### *Pure: độ tinh khiết của chuẩn*

### *Mbase: khối lượng phân tử của chất chuẩn ở dạng cơ bản*

### *M: khối lượng phân tử ở dạng đóng gói ( của nhà sản xuất)*

### *Ví dụ:Cân 10mg chất chuẩn Enrofloxacin - d5 có độ tinh khiết 98% vào bình định mức 10mL, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:*

### 

### *Ví dụ: Cân 10mg chất chuẩn Sarafloxacin hydrochloride có độ tinh khiết 98% vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:*

### 

### *Dụng dịch chuẩn gốc:(được bảo quản trong ngăn đá, hạn sử dụng 01 năm)*

### *Cân 10.0g mỗi chuẩn rắn vào mỗi bình định mức 10ml tương ứng. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 1000ppm.*

### *Enrofloxacin – d5: Cân 2g chuẩn rắn Enrofloxacin – d5 vào bình định mức 10ml. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 200ppm.*

### *Norfloxacin – d5: Cân 2g chuẩn rắn Norfloxacin – d5 vào bình định mức 10ml. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 2ppm.*

### *Flumequine – 3C13: Cân 1g chuẩn rắn vào bình định mức 10ml. Định mức đến vạch bằng Acetonitril, ta được dung dịch chuẩn gốc 100ppm.*

### **Dung dịch chuẩn trung gian**

### Dung dịch chuẩn hỗn hợp 40mg/L *(bảo quản ngăn đá, hạn sử dụng 06 tháng):* Dùng pipet 1ml, rút từng chuẩn gốc (mỗi chuẩn 1 pipet) cho vào bình định mức 25ml, định mức lên đến vạch mức bằng Acetonitrile. Được dung dịch chuẩn có nồng độ 40mg/L.

### Dung dịch chuẩn trung gian 1.6mg/L (*bảo quản ngăn mát, hạn sử dụng 03 tháng):* Dùng pipet 1mL, rút 1mL dung dịch chuẩn 40mg/L cho vào bình định mức 25mL, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 1.6mg/L.

### Dung dịch chuẩn trung gian 80µg/L (*bảo quản ngăn mát, hạn sử dụng 01 tháng):* Dùng pipet 1.0mL, rút 0.5mL dung dịch chuẩn 1.6mg/L cho vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile: nước (1/9), thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 80µg/L.

### Dung dịch hỗn hợp nội chuẩn 0.8mg/L (*bảo quản ngăn mát, hạn sử dụng 01 tháng):* Dùng micropipet rút 0.1mL mỗi nội chuẩn cho vào bình định mức 25ml. Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, thu được dung dịch hỗn hợp nội chuẩn 0.8mg/L.

### Dung dịch chuẩn làm việc (*bảo quản ngăn mát, hạn sử dụng 01 tuần)*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Dãy chuẩn được pha từ dung dịch chuẩn 80 (µg/L) | | | | | |
| No. | V Rút chuẩn mL | V Định mức mL | IS (mL) | C0 (µg/L) | Dụng cụ pha chuẩn |
| Std 01 | 0.05 | 10.0 | 0.1 ml nội chuẩn 0.8ppm | 0.4 | Kim 0.1mL |
| Std 02 | 0.1 | 0.8 | Kim 0.1mL |
| Std 03 | 0.2 | 1.6 | Kim 0.5mL |
| Std 04 | 0.5 | 4 | Kim 0.5ml |
| Std 05 | 1 | 8 | Pipet 1ml |
| Std 06 | 2 | 16 | Pipet 2ml |

### Thực hiện QA/QC

### Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích phải thực hiện các mẫu sau nhằm kiểm soát QA/QC:

### Blank thuốc thử

### Blank matrix

### QC.

### Tất cả các mẫu được thực hiện theo muc B.IV.

### **IV. Thực hiện phân tích**

### Tách chiết mẫu

### Cân khoảng 5 ± 0.1 g mẫu đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 mL.

### Thêm 5mL nước cất vào ống ly tâm đựng mẫu, vortex đều. Thêm vào *0.05mL hỗn hợp nội chuẩn 0.8mg/L*. Thêm tiếp 10ml ACN 5% formic acid, vortex thật kỹ trong 2 phút, làm lạnh 5 phút trong tủ đông. Cho vào hỗn hợp muối (1g NaCl + 4g MgSO4+1g Trisodium citrate dihydrate + 0.5g disodium hydrigencitrate 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 2mL lớp trên cho vào bình cầu. Đem cô quay chân không ở 40oC đến khô. Hòa tan cặn khô bằng chính xác 1mL dung dịch pha động, vortex 20giây. Lọc dịch đục qua màng lọc 13mm, 0.45µm và thu dịch lọc vào lọ vial cho HPLC.

### **Phân tích trên**

Các điều kiện phân tích dưới đây chỉ mang tính chất tham khảo và có thể thay đổi trên mỗi thiết bị cụ thể.

### Điều kiện máy LC

### Chương trình gradient dung môi theo thời gian:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ***Thời gian*** | ***Methanol(0.1 %HCOOH)*** | ***H2O(0.1%HCOOH)*** | ***Tốc độ dòng, mL/phút*** |
| 0 | 10 | 90 | 0.4 |
| 1 | 10 | 90 |
| 2 | 95 | 5 |
| 4.5 | 95 | 5 |
| 5 | 10 | 90 |
| 6.5 | 10 | 90 |

### *Điều kiện cho hệ thống tiêm mẫu tự động*

### Injiection type: Full loop

### Injiection volume:20µl

### Needle height from bottom: 1.0

### Flush volume: 1000µL

### Tray temp control: off

### Column oven control: off

### Wash column: 2000µL

### Điều kiện MS

### Tunefile: tune file gần nhất

### Q2 gas pressure: 1.2mT

### MS acquire time: 6

### Ion source : ESI

### Polarity: positive

### Scan type: SRM

### Capillary temp: 350oC

### Vaporizer temperature: 450

### ESI spray voltage: 3000V

### Sheath gas:50

### Aux gas : 5

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| *Bảng2: Ion định lượng* | | | |
| *Chất phân tích* | *Ion chính (ion sơ cấp)* | *Ion định lượng* | *Ion xác nhận* |
| Enrofloxacin | 360 | 316 | 245 |
| Ciprofloxacin | 332 | 288 | 203 |
| Norfloxacin | 320 | 276 | 233 |
| Sarafloxacin | 386 | 342 | 299 |
| Ofloxacin | 362 | 261 | 318 |
| Danofloxacin | 358 | 340 | 314 |
| Difloxacin | 400 | 356 | 299 |
| Marbofloxacin | 363 | 320 | 72 |
| Levofloxacin | 362 | 221 | 318 |
| Oxolinic acid | 262 | 216 | 244 |
| Nalidixic acid | 233 | 187 | 215 |
| Flumequine | 262 | 202 | 244 |
| Moxifloxacin | 402 | 261 | 384 |
| Sparfloxacin | 393 | 292 | 349 |
| Pefloxacin | 334 | 290 | 233 |
| Orbifloxacin | 396 | 295 | 352 |
| Enoxacin | 321 | 303 | 324 |
| Lomefloxacin | 352 | 265 | 308 |
| Gatifloxacin | 376 | 261 | 332 |
| Norfloxacin – d5 | 325 | 281 |  |
| Enrofloxacin – d5 | 365 | 321 |  |

### 

### **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*.

1. *TÍNH KẾT QUẢ*

|  |  |
| --- | --- |
| ***Chỉ tiêu phân tích*** | ***Nội chuẩn*** |
| Enrofloxacin  Ciprofloxacin  Norfloxacin  Gatifloxacin  Sarafloxacin  Danofloxacin  Nalidixic acid  Flumequine | Enrofloxacin – d5 |
| Enrofloxacin – d5 |
| Norfloxacin – d5 |
| Enrofloxacin – d5 |
| Enrofloxacin – d5 |
| Enrofloxacin – d5 |
| Flumeqine 3C13 |

### 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:

### 

### *Trong đó:*

### *- C: lượng chất cần phân tích có trong mẫu, µg/kg.*

### *- Co: nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, μg/L*

### *- m: khối lượng mẫu phân tích, g.*

### *- Vdm: thể tích định mức sau cô quay, ml.*

### *- Vchiet: thể tích chiết mẫu, ml.*

### *- Vco quay: 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*
* *Nếu mẫu có phát hiện Norfloxacin, nhân viên phân tích phải tiến hành pha lại đường chuẩn Norfloxacin từ chuẩn gốc (1000ppm)*

1. **BẢO ĐẢM QA/QC**

* Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (ít nhất là 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R2) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995.
* Tỉ 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 tỉ số tương ứng của chuẩn trong cùng một điều kiện phân tích.

|  |  |
| --- | --- |
| Tỉ số cường độ tương đối so với ion base peak | Mức sai biệt tối đa cho phép |
| > 50% | ± 20 % |
| >20 đến 50% | ± 25 % |
| > 10 đến 20 % | ± 30 % |
| ≤ 10 % | ± 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 ±5%.
* Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá ±20 % giá trị thật.
* Mẫu thêm chuẩn được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≤20 mẫu). Hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn phải nằm trong khoảng 70-120 %.

# Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≤20 mẫu). Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại không quá ±30 %.

# BÁO CÁO KẾT QUẢ

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