

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.007 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/04/2017 Trang: <b>1/8</b>
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------

**ĐỊNH LƯỢNG ĐỘC TỐ *AFLATOXIN (B1, B2, G1, G2)*  
BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA  
TỬ CỰC (LC/MS/MS)**

***DETERMINATION OF AFLATOXIN (B1; B2; G1; G2)***

***BY LC/MS/MS***

<b>Biên soạn</b>	<b>Xem xét</b>	<b>Phê duyệt</b>
Trần Thái Vũ	Trịnh Thị Minh Nguyệt	Trịnh Thị Minh Nguyệt

**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 header	<b>20/04/2017</b>

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b></p>	<p>Mã số: HD.TN.007 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/04/2017 Trang: 2/8</p>
-------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------

## A. TỔNG QUAN

### I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này được áp dụng định lượng độc tố *Aflatoxin* (B1, B2, G1, G2 trong một số nền mẫu rau quả, ngũ cốc, thức ăn chăn nuôi bằng sắc kí lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).
- Giới hạn phát hiện của phương pháp:
  - Đối với các nền mẫu nhiều dầu như hạt điều, đậu phộng,.....: LOD: 0.2ppb
  - Đối với các nền mẫu khác: gạo, cafe, tiêu,.....:LOD: 0.1ppb
  - Thức ăn chăn nuôi: 1.0ppb

### II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: *AOAC Official Method 2005.08*

### III. Nguyên tắc

- Mẫu sau khi được đồng nhất sẽ được chiết với dung dịch chiết (MeOH:nước). Dịch chiết sau đó được làm sạch bằng phương pháp chiết pha rắn, sử dụng cột ái lực Aflatoxin. Dung dịch sau khi chiết sẽ được định tính và định lượng bằng thiết bị LC/MS/MS.

### IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.

- Aflatoxin có độc tố rất mạnh, 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 thực hiện thí nghiệm.
- 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.
- Cân kỹ thuật với sai số  $\leq 0.01g$ .
- Máy ly tâm
- Máy lắc Vortex.
- Màng lọc Nilon 0,45  $\mu m$ /0.22  $\mu m$
- Ống nghiệm 10 mL có nắp đậy
- Ống ly tâm nhựa 15, 50 mL
- Bình định mức: 10mL; 25mL
- Pipet vạch: 0.1mL, 0.5mL, 1mL
- Pipet bầu: 1mL, 2mL, 5mL

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VỮ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.007 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/04/2017 Trang: 3/8
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

- Dụng cụ thủy tinh các loại
- Hệ thống cô quay mẫu hoặc hệ thống thổi khô mẫu bằng khí Nitơ.
- Máy xay mẫu (dung tích 1 Lít)
- Bộ tách chiết pha rắn
- Cột ái lực Aflatoxin (Immunoaffinity column, Vicam - Watertown, MA) hoặc cột ái lực có khả năng lưu giữ Aflatoxin tương đương

## 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.
- Cột sắc kí lỏng pha đảo C18: Supelco Ascentis C18 5µm/2.1µm (hoặc cột tương đương)

## II. Hóa chất, chất chuẩn.

### 1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần.
- Nước cất LC/MS
- Methanol, HPLC
- Acetonitrile: HPLC
- HCOOH: Merck
- Cột ái lực aflatoxin (Immunoaffinity column-IAC)
- NaCl: Tinh khiết phân tích
- EDTA: Tinh khiết phân tích
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Tinh khiết phân tích
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Tinh khiết phân tích
- NaOH: Tinh khiết phân tích
- KCl: Tinh khiết phân tích
- HCl: Tinh khiết phân tích
- Dung dịch HCl ~ 0.1M: Lấy 2mL dung dịch HCl đậm đặc cho vào 250mL nước cất 2 lần.
- Dung dịch NaOH 0.1M: Hòa tan 4g NaOH trong 1L nước cất 2 lần.
- Đệm Phosphate buffered saline solution (PBS) khoảng pH 7.4: Hòa tan 0.20 g KCl, 0.20g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (hoặc 2.92 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O), và 8.00 g NaCl trong 900 mL nước. Điều chỉnh về khoảng pH 7.4 bằng HCl 0.1M hoặc NaOH 0.1M. Định

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.007 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/04/2017 Trang: 4/8
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

mức thành 1 lít bằng nước cất.

## 2. Chất chuẩn.

### a. Thông tin chuẩn.

- Chuẩn Aflatoxin mix: sigma – aldrich
- Hoặc chuẩn rắn của TRC.

### b. Dung dịch chuẩn.

#### ➤ Dung dịch chuẩn 100µg/L:

- ✓ Dùng pipet 1mL lấy 1mL dung dịch chuẩn gốc ( aflatoxin mix từ nhà sản xuất) cho vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch bằng Acetonitrile, votex đều, chuyển qua ống thủy tinh.
- ✓ Chuẩn được bảo quản ở nhiệt độ  $\leq 0^{\circ}\text{C}$ , Chuẩn sử dụng trong 01 năm.

#### ➤ Dung dịch chuẩn 20 µg/L:

- ✓ Dùng micropipet 200µL lấy 100µL dung dịch chuẩn 100µg/L cho vào 1.9mL dung dịch mẫu Blank matrix<sup>(\*)</sup>, votex đều.
- ✓ Pha khi sử dụng.

(\*): Blank matrix được chuẩn bị giống mẫu nhưng với nền mẫu không phát hiện.

#### ➤ Dãy chuẩn làm việc: Chuẩn được pha trên nền matrix

- Ngũ cốc.

No.	V <sub>Rút chuẩn</sub> mL	Nồng độ chuẩn sử dụng (µg/L)	V <sub>Blank matrix</sub> mL	C <sub>0</sub> (µg/L)	Dụng cụ pha chuẩn
Std 01	0.025	<b>2.0 (St6)</b>	0.475	0.1	Micropipet 200µL 1000µL
Std 02	0.05		0.45	0.2	
Std 03	0.10		0.40	0.4	
Std 04	0.20		0.30	0.8	
Std 05	0.25		0.25	1.0	
Std 06	0.10	20	0.9	<b>2.0</b>	

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.007 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/04/2017 Trang: 5/8
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

- Thức ăn chăn nuôi.

No.	V <sub>Rút chuẩn</sub> mL	Nồng độ chuẩn sử dụng (µg/L)	V <sub>Blank matrix</sub> mL	C <sub>0</sub> (µg/L)	Dụng cụ pha chuẩn
Std 01	0.025	<b>20 (St6)</b>	0.975	0.5	Micropipet 200µL 1000µL
Std 02	0.05		0.95	1.0	
Std 03	0.10		0.90	2.0	
Std 04	0.25		0.75	5.0	
Std 05	0.50		0.5	10	
Std 06	0.20	100	0.9	<b>20</b>	

### 3. Dung dịch pha động:

- Methanol (0.1 % HCOOH) (v/v): thêm 4 mL HCOOH vào 4 lít methanol HPLC. Đánh siêu âm 15 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.
- Dung dịch H<sub>2</sub>O (0.1 % HCOOH) (v/v): thêm 4mL HCOOH vào 4 lít nước cất LC/MS. Đánh siêu âm 15 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.

## 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 mẫu kiểm soát: 1.0µg/Kg. Thực hiện mẫu Blank, blank matrix và mẫu QC theo mục VI.2.

## IV. Xử lý mẫu.

### 1. Chuẩn bị mẫu.

Mẫu được say đồng nhất trong cối say.

### 2. Xử lý mẫu

- Cân mẫu vào ống ly tâm 50mL như sau:
  - Các mẫu có chứa nhiều dầu như hạt điều, đậu phộng: cân  $5 \pm 0.2$ g
  - Các nền mẫu khác: Cân  $5.0 \pm 0.2$ g
  - Thức ăn chăn nuôi: Cân  $2 \pm 0.1$ g
- Thêm vào 1 g NaCl và V<sub>1</sub> mL dung dịch chiết:

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.007 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/04/2017 Trang: 6/8
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

- Các mẫu có chứa nhiều dầu như hạt điều, đậu phộng: cho vào 20mL dung dịch MeOH/H<sub>2</sub>O (6/4).
  - Các nền mẫu khác: cho vào 20mL dung dịch MeOH/H<sub>2</sub>O (4/1).
- Xay mẫu trong 3 phút ( hoặc siêu âm 30 phút), ly tâm trong 10 phút (3000 vòng/phút). Lọc lấy dịch chiết. Dùng pipet, rút 10 mL (V<sub>2</sub>) cho vào ống ly tâm 50 mL, thêm tiếp vào 40 mL dung dịch đệm PBS pH 7.4. Lắc đều, cho qua cột ái lực aflatoxin (Immunoaffinity column-IAC) đã hoạt hóa bằng 10 mL dung dịch đệm PBS pH 7.4 với tốc độ 3 mL/phút (1 giọt/s). Rửa cột bằng 15 mL nước, rút khô cột bằng chân không trong 5-10 giây. Rửa giải bằng 0.5 mL methanol cho vào ống nghiệm 10 mL, đợi 1 phút, thêm tiếp vào 0.7 mL methanol, rút nhẹ chân không (để lấy hết dịch rửa giải methanol). Thêm vào ống nghiệm chứa dịch rửa giải 0.8 mL nước, lắc đều, lọc, chuyển vào lọ phân tích (vial) 1.5 mL và phân tích trên LC/MS/MS.

## 2. Mẫu thêm chuẩn:

- Các mẫu có chứa nhiều dầu như hạt điều, đậu phộng: Thêm 0.05 mL của chuẩn 100µg/L
- Các mẫu khác: Thêm 0.1 mL của chuẩn 100µg/L

## V. 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:

- Cột sắc ký: cột C<sub>18</sub> 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm. (hoặc tương đương)
- Thể tích tiêm: 100 µl
- Pha động: Methanol (0.1% HCOOH) (A): nước (0.1% HCOOH) (B)

Thời gian	A, %	B, %	Tốc độ dòng, mL/phút
0	30	70	0.5
1	30	70	
2	100	0	
4	100	0	
4.5	30	70	
6	30	70	

Lưu ý: Với các cột sắc ký lỏng C<sub>18</sub> khác nhau (chiều dài, đường kính cột, kích cỡ hạt...), tỉ lệ thành phần pha động hay tốc độ dòng có thể thay đổi.

### b. Điều kiện MS

- Interface: HESI (+)
- Capillary tem.: 250°C

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.007 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/04/2017 Trang: 7/8
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

- Vaporizer tem.: 350°C
- Corona discharge current: 4.5 µA
- Sheath gas: 40
- Aux. gas: 0

<i>Aflatoxin</i>	<i>Ion mẹ</i>	<i>Ion định lượng</i>	<i>Ion xác định</i>
<b>B1</b>	<b>313</b>	<b>241</b>	<b>285</b>
<b>B2</b>	<b>315</b>	<b>259</b>	<b>287</b>
<b>G1</b>	<b>329</b>	<b>200</b>	<b>283</b>
<b>G2</b>	<b>331</b>	<b>313</b>	<b>245</b>

*CE – Collision energy: năng lượng phân mảnh*

#### c. Trình tự tiêm mẫu

Các mẫu sẽ được phân tích theo trình tự sau:

- Dung môi pha động;
- Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao;
- Dung môi pha động;
- Mẫu cần kiểm nghiệm.
- Mẫu thêm chuẩn

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm xen kẽ một điểm chuẩn sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc là một điểm chuẩn.

### C. TÍNH KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích pic ion định lượng thu được với nồng độ các chất họ aflatoxin tương ứng. 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:

$$C = \left( \frac{C_0 \times 2 \times V_1}{m \times V_2} \right)$$

Trong đó:

- C: nồng độ aflatoxin trong mẫu, ng/g (ppb)
- C<sub>0</sub>: nồng độ aflatoxin trong dịch chiết, ng/mL
- 2: Thể tích định mức, mL
- V<sub>1</sub> và V<sub>2</sub> lần lượt là tổng thể tích dịch chiết và thể tích dịch chiết cho qua cột, mL
- m: khối lượng cân, g

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. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Đồ thị thuyến tính tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với  $r^2 \geq 0.995$

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN.007 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/04/2017 Trang: <b>8/8</b>
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------

- ✓ Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
- ✓ Tỷ số ion.
- ✓ Độ lệch của thời gian lưu không quá 5%.
- ✓ Độ lệch của dung dịch chuẩn check không quá 15%
- ✓ Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart).

**E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

- ✓ Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu:
  - BM.15.04a
  - BM.15.06