

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.075 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/10/2017 Trang: 1/7
--	--------------------------------	---

**ĐỊNH LƯỢNG ĐỘC TỔ NẤM MỐC OCHRATOXIN – A TRONG THỰC PHẨM VÀ
THỨC ĂN CHĂN NUÔI BẰNG LC - MS/MS
(HD.TN.075)**

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 Header	04/01/2017
02		Bổ sung thêm nền mẫu thực phẩm	20/10/2017

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.075 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/10/2017 Trang: 2/7
--	--------------------------------	---

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng độc tố nấm mốc Ochratoxin – A trong Thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bằng sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).
- Giới hạn của phương pháp:

<i>Chất phân tích</i>	<i>Giới hạn phát hiện (LOD) (µg/kg)</i>	<i>Giới hạn định lượng (LOQ) (µg/kg)</i>
Ochratoxin - A	0.5	2.0

II. Tài liệu tham khảo

- Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: Anal Bioanal Chem (2010) 397:765-776.

III. Nguyên tắc

- Độc tố nấm mốc được chiết lên pha hữu cơ, pha loãng mẫu và phân tích trên thiết bị LC/MS/MS.

IV. 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.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ

1. 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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.075 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/10/2017 Trang: 3/7
--	--------------------------------	---

- 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

2. 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 ký lỏng pha đảo C₁₈: Supelco Ascentis C18 5µm/2.1µm (hoặc cột tương đương)

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion
- Acetonitril (ACN, HPLC)
- Methanol (HPLC)
- Natri Acetate (PA)
- Magieum sulfate (PA)
- Bột C18.

2. Chất chuẩn

a. Thông tin về chất chuẩn

- Ochratoxin – A: Sigma aldrich hoặc tương đương.

b. Dung dịch chuẩn

- *Dung dịch chuẩn 1ppm: Dùng kim rút 0.2mL chất chuẩn Ochratoxin - A 50µg/mL vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1mg/Kg.*

- c. Dung dịch chuẩn trung gian 200 µg/L:** Dùng pipet 2mL, rút 2.0mL dung dịch chuẩn 1.0mg/L cho vào bình định mức 10mL. Định mức lên đến vạch bằng hỗn hợp pha động nước, thu được dung dịch chuẩn có nồng độ 200µg/L.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.075 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/10/2017 Trang: 4/7
--	--------------------------------	---

d. Dây chuẩn làm việc: Dụng và chiết chuẩn trên nền mẫu

- Thực phẩm

STT	Thể Chuẩn 200µg/L (mL)	Khối lượng mẫu, g	Nồng độ chuẩn, µg/kg
Std 01	0.05	5.0	2
Std 02	0.1	5.0	4
Std 03	0.15	5.0	6
Std 04	0.20	5.0	8
Std 05	0.50	5.0	12
Std 06	1.0	5.0	20
Std7	2.0	5.0	40

- Thức ăn chăn nuôi

STT	Thể Chuẩn 200µg/L (mL)	Khối lượng mẫu, g	Nồng độ chuẩn, µg/kg
Std 01	0.025	2.0	2.5
Std 02	0.05		5.0
Std 03	0.10		10
Std 04	0.20		20
Std 05	0.4		40
Std 06	0.8		80

Dụng 01 điểm chuẩn để phân tích. Nếu mẫu phát hiện thì phân tích lại mẫu và dụng dây chuẩn như trên.

III. Thực hiện QA/QC

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích phải thực hiện các mẫu sau để đảm bảo QA/QC

- Blank thuốc thử
- Blank matrix
- Mẫu QC.

Các mẫu được xử lý và phân tích giống mục B.IV.

IV. Thực hiện phân tích

1. Chiết mẫu

a. Mẫu thực phẩm

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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.075 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/10/2017 Trang: 5/7
---	------------------------	---

- Thêm 10ml nước vào, lắc đều sau đó cho 10.0mL Acetonitrile (1% Acetic acid) vào, vortex mẫu trong 1 phút. Cho thêm 1.67g Natri acetate vào, lắc mạnh trong **4 phút**, cho tiếp 4g MgSO₄ khan vào, lắc mạnh trong 1 phút, ly tâm 3000vòng/phút trong 5 phút. Lấy lớp trên cho vào ống 15ml có chứa hỗn hợp MgSO₄ và C18 (3:1), Vortex 2 phút. Lấy 0.5ml dung dịch pha loãng với 0.5 ml DI, vortex, lọc mẫu vào vial, phân tích trên hệ thống LC/MS/MS.

b. Mẫu Thức ăn chăn nuôi.

- Cân 2 ± 0.1 g mẫu vào ống ly tâm 50mL.
- Thực hiện chiết mẫu giống như trong ngũ cốc.
- Mẫu sau clean up, pha loãng 2 lần, lọc mẫu vào Vial, phân tích trên LC/MS/MS

2. 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

Chương trình gradient dung môi theo thời gian:

Thời gian	Acetonitril 0.1% FA	H ₂ O 0.1% FA	Tốc độ dòng, mL/phút
0	10	90	0.4
2	90	10	
2.8	90	10	
3.8	10	90	
5	10	90	

b. Điều kiện cho hệ thống tiêm mẫu tự động

- Injection type: Full loop
- Injection volume: 20µl
- Needle height from bottom: 1.0
- Flush volume: 100µL
- Tray temp control: off
- Column oven control: off
- Wash column: 400µL

c. Điều kiện MS

- Tunefile: tune file gần nhất

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.075 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/10/2017 Trang: 6/7
--	--------------------------------	---

- Q2 gas pressure: 1.2mT
- MS acquire time: 8
- Ion source : ESI
- Polarity: Negative
- Scan type: SRM
- Capillary temp: 350°C
- Vaporizer temperature: 300
- ESI spray voltage: 3000V
- Sheath gas:50
- Aux gas : 5

<i>Bảng2: Ion định lượng</i>			
<i>Chất phân tích</i>	<i>Ion chính (ion sơ cấp)</i>	<i>Ion định lượng</i>	<i>Ion xác nhận</i>
Ochratoxin - A	402	211	167

3. 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.

C. TÍNH KẾT QUẢ

- 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:

$$C = C_0$$

Trong đó: - C : lượng chất cần phân tích có trong mẫu, $\mu\text{g/kg}$.

- C_0 : nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, $\mu\text{g/L}$

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.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.075 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/10/2017 Trang: 7/7
--	--------------------------------	---

D. KIỂM SOÁT QA/QC

- Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (ít nhất là 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R^2) 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%	$\pm 20 \%$
>20 đến 50%	$\pm 25 \%$
> 10 đến 20 %	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$

- 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 $\pm 5\%$.
- Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá $\pm 20 \%$ 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 $\pm 30 \%$.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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