

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.254 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 10/6/2018 Trang: 1/7
--	----------------------------	---

ĐỊNH LƯỢNG PHẨM MÀU SUDAN I, II, IV TRONG TRỨNG VÀ ỚT BỘT BẰNG 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		Viết mới	

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.254 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 10/6/2018 Trang: 2/7
--	----------------------------	---

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này được áp dụng để xác định phẩm màu Sudan I, II, III và IV trong trường và bột ớt bằng sắc kí lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).
- Giới hạn của phương pháp:

Nền mẫu	LOD, µg/Kg	LOQ, µg/Kg
Trứng muối	0.5	2
Bột ớt	2	5

II. Tài liệu tham khảo

- Journal of food and drug analysis 23(2015) 456 – 462
- Effective SPE Strategies for LC – MS determination of Sudan dyes in chili products – Waters application.

III. Nguyên tắc

Mẫu được chiết lên Acetone, làm sạch bằng cột SPE sau đó cô quay và định mức lại trong pha động.

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 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

1. Thiết bị

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg.
- Máy ly tâm
- Máy Vortex.
- Máy siêu âm.
- Bộ chiết SPE
- Màng lọc PTFE, 13mm, 0,45µm
- Ống ly tâm 50mL, polypropylen, có nắp đậy
- Bình định mức: 10
- Pipet vạch: 0.5mL, 1mL, 2mL, 5mL.
- Micropipet 200 µL và 1000 µL
- Dụng cụ thủy tinh các loại: ống Hatch, becher, ...

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.254 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 10/6/2018 Trang: 3/7
--	----------------------------	---

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 (Thermal Finigan).
- Cột sắc kí lỏng pha đảo C₁₈: Cột C18, 3.5µm- 2.1 x 50mm hoặc tương đương.

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion
- Methanol (MeOH), p.a và HPLC
- HCOOH, Merck
- Acetonitrile (ACS)
- Acetone: PA
- Ethyl acetate
- NaOH

2. Dung dịch thử

- Dung dịch pha động
 - o (A): Thêm 1ml HCOOH vào 1L MeOH; đánh siêu âm 15 phút để loại bọt khí.
 - o (B): Thêm 1ml HCOOH vào 1L H₂O; đánh siêu âm 15 phút để loại bọt khí.

3. Chất chuẩn

a. Thông tin về chất chuẩn

- Sudan I , Dr. Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Sudan II, Dr.Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Sudan III, Dr.Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Sudan IV, Dr.Ehrenstofer hoặc tương đương.

b. Dung dịch chuẩn gốc 1000 mg/L

- Dung dịch chuẩn gốc

Nồng độ chuẩn gốc được tính theo công thức sau:

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

Trong đó:

- m: khối lượng chuẩn đã cân để pha chuẩn (mg)
- V: thể tích chuẩn định mức (L)
- M_{base}: khối lượng mol phân tử ở dạng base có trong công thức chuẩn của nhà sản xuất.
- M: khối lượng mol phân tử của chất chuẩn của nhà sản xuất.
- Pure%: độ tinh khiết của chất chuẩn.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.254 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 10/6/2018 Trang: 4/7
--	----------------------------	---

- Tiến hành kiểm tra cân trước khi cân chuẩn.
- Cân 10.0 mg chất chuẩn rắn cho vào các bình định mức 10 mL riêng, định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile. Vortex cho chuẩn tan hết.
- Chuẩn được đựng trong ống nghiệm thủy tinh và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ $< 0^{\circ}\text{C}$. Chuẩn sử dụng tối đa 12 tháng.

c. Dung dịch chuẩn trung gian

- Hỗn hợp chuẩn trung gian 20mg/L: Lấy 0.5ml từ mỗi dung dịch chuẩn gốc định mức lên 25ml được hỗn hợp chuẩn trung gian 20mg/L.
- Hỗn hợp chuẩn trung gian 2mg/L: Lấy 1.0ml từ hỗn hợp chuẩn trung gian 20mg/L vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng Acetonitrile.
- Hỗn hợp chuẩn trung gian 200 $\mu\text{g/L}$: Lấy 1mL từ hỗn hợp chuẩn 2mg/L vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng ACN:H₂O=90:10.
- *Lưu ý:* Vì khối lượng cân chuẩn có thể giao động. Vì vậy nhân viên pha chuẩn phải tính lại nồng độ chuẩn dựa trên khối lượng chuẩn thực cân. Nhưng các chuẩn trung gian phải pha đúng nồng độ như trên.

d. Dung dịch chuẩn làm việc: Chiết dãy chuẩn trên nền mẫu

- Pha dãy dung dịch chuẩn làm việc như sau:

No.	V Rút chuẩn mL	Chuẩn sử dụng	Khối lượng mẫu	C ₀ (µg/L)	Dụng cụ pha chuẩn
Std 01	0.025	200 µg/L	5 g	1	Micropipete 200µL
Std 02	0.05			2	
Std 03	0.10			4	
Std 04	0.2			8	Pipet 1ml
Std 05	0.5			20	
Std 06	1.0			40	
Chuẩn được chiết theo B.IV.1					

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.
 - o Blank thuốc thử.
 - o Blank matrix
 - o QC trên nền mẫu tương ứng.
 - o Thực hiện xử lý mẫu giống B.IV

IV. Phân tích mẫu.

- Xử lý mẫu
 - Chiết mẫu
 - Cân khoảng 5 (g) mẫu cho vào ống ly tâm, thêm vào 20 mL Acetone, vortex 2 phút,

lắc mạnh trong 5 phút. Sau đó ly tâm ở 3500vòng/ phút trong 10 phút, hút 2mL lớp trên vào ống ly tâm 50ml có chứa 15 mL dung dịch NaOH 0.1N, vortex trong 1 phút, ly tâm 3000 vòng/ phút. Cho toàn bộ qua cột Oasis MAX.

b. Làm sạch mẫu bằng SPE

- Hoạt hóa: 2 ml Ethyl acetate, 2 mL Methanol, 2 mL NaOH 0.1N, và 2 mL nước DI
- Cho toàn bộ mẫu qua cột với tốc độ 1 – 2mL/ phút.
- Rửa cột: 2 mL nước DI, 1 mL NaOH 1N, 2 mL Methanol và 1 mL Ethyl acetate.
- Rửa giải: 06 mL hỗn hợp Ethyl acetate/methanol/Formic acid: 89/9/2 vào bình cầu. Cô quay và định mức 0.5 mL với dung dịch Acetonitrile/ ược: 9/1.
- Lọc mẫu qua màng lọc PTFE 0.45 µm vào vial và phân tích trên LC – MS/MS.

2. Phân tích trên LC /MS/MS

• Điều kiện máy LC

o Điều kiện cho bơm

Chương trình gradient dung môi theo thời gian

Thời gian	MeOH(0.1%HCOOH)	H ₂ O(0.1%HCOOH)	Tốc độ dòng, mL/phút
0.0	80	20	0.4
6.0	95	5	
9	95	5	
9.5	80	20	
11	80	20	

o Điều kiện cho hệ thống tiêm mẫu tự động

- Injection type: Full loop
- Temp oven: 40°C

• Điều kiện MS

- o Ion source : H-ESI
- o Polarity: positive
- o Tune file : tune file gần nhất.

Chất phân tích	m/z	CE
Sudan I	259 → 93; 156	20; 14
Sudan II	277 → 121; 156	24; 20
Sudan III	353 → 77; 156	28; 24
Sudan IV	381 → 91; 106	24; 42

3. Trình tự tiêm mẫu

- Pha động
- Các dung dịch chuẩn làm việc, từ nồng độ thấp đến cao
- Pha động
- Mẫu blank

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.254 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 10/6/2018 Trang: 6/7
--	----------------------------	---

- 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

- Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỉ lệ của diện tích pic ion định lượng với nồng độ các chất chuẩn tương ứng.

Chất phân tích	Ion chính	Ion định lượng	Ion xác nhận
Sudan I	259	156	93
Sudan II	277	121	156
Sudan III	353	77	156
Sudan IV	381	91	106

$$C = C_o$$

Trong đó:

- o C: nồng độ Sudan I, II, III, IV có trong mẫu, tính theo µg/kg
- o C_o: nồng độ Sudan I, II, III, IV tính theo đường chuẩn, tính theo µg/kg

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. BẢO ĐẢM QA/QC

- Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (tối thiểu thực hiện trên 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R²) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995
- Tỉ số ion kém nhạy hơn so với ion nhạy nhất trong mẫu dương tính không được khác biệt quá giới hạn qui 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%

- 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 ± 2.5%.
- Hiệu suất thu hồi mẫu QC phải nằm trong khoảng 2 σ của biểu đồ kiểm soát kết quả.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.254 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 10/6/2018 Trang: 7/7
--	----------------------------	---

BM.15.06.