

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN. 256 Ngày ban hành: 15/6/2018 Lần ban hành: 01 Trang: 1/7
---	--	---

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ACRYLAMIDE TRONG NƯỚC VÀ THỰC PHẨM  
CÓ XỬ LÝ NHIỆT BẰNG LC/MS/MS**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Thị Kiều Diễm	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
<b>01</b>		Ban hành mới	<b>15-6-2018</b>

**A. TỔNG QUAN**

**I. Phạm vi áp dụng**

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN. 256 Ngày ban hành: 15/6/2018 Lần ban hành: 01 Trang: 2/7
---	--	---

- Hướng dẫn kỹ thuật này dùng để hướng dẫn việc xác định hàm lượng Acrylamide có trong nước và thực phẩm có xử lý nhiệt bằng kỹ thuật phân tích LC/MS/MS.
- Giới hạn của phương pháp

Nền mẫu	Giới hạn phát hiện µg/kg	Giới hạn định lượng µg/kg
Nước	2.4	7.8
Thực phẩm xử lý nhiệt	21	70

## II. Tài liệu tham khảo.

- J.Agric. Food Chem. 2006, 54, 7001 – 7008: Rapid sample preparation method for LC – MS/MS or GC – MS Analysis of Acrylamide in Various food matrices.

## III. Nguyên tắc.

- Hàm lượng Acrylamide trong mẫu được chiết lên pha hữu cơ, làm sạch và phân tích trên LC – MS/MS.

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

- Nhân viên phải thực hiện đầy đủ nội qui, an toàn của PTN.
- Các chất chuẩn phải được thu hồi đúng chỗ.

## B. PHÂN TÍCH

### I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.

#### 1. Thiết bị cơ bản.

- Ống ly tâm 15mL; 50mL
- Cân phân tích với d = 0.0001g
- Cân kỹ thuật với d = 0.001g
- Micropipet và đầu tip 200µL; 1000µL
- Bình định mức 10mL; 25mL
- Syringe lọc mẫu 3mL
- Đầu lọc mẫu Nilon 0.45µm x 130mm
- Vial 1.8mL

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN. 256 Ngày ban hành: 15/6/2018 Lần ban hành: 01 Trang: 3/7
---	----------------------------------	---

- Máy Votex; Ly tâm

## 2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống phân tích LC – MS/MS:
  - o Hệ thống tiêm mẫu tự động.
  - o Hệ thống LC chịu được áp suất  $\geq 300\text{Bar}$
  - o Hệ thống đầu dò khối phổ MS/MS

## II. Hoá chất và chất chuẩn.

### 1. Hoá chất.

- Acetonitrile: Tinh khiết phân tích.
- Acetonitrile: HPLC
- Nước Cất khử Ion
- NaCl: Tinh khiết phân tích
- $\text{MgSO}_4$  khan: Tinh khiết phân tích
- Hexanes: Tinh khiết phân tích
- Bột PSA

### 2. Chất chuẩn.

#### a. Chất chuẩn:

- Acrylamide: chuẩn của Dr. Ehrentofer hoặc tương đương
- Acrylamide –  $d_3$ : Cambrige isotop laboratories hoặc chuẩn tương đương.

#### b. Dung dịch chuẩn 1000mg/L

Nồng độ chuẩn được tính theo công thức sau:

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

Trong đó:

- o m: khối lượng chất chuẩn đã cân để pha chuẩn (mg)
- o V: thể tích định mức (L)

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN. 256 Ngày ban hành: 15/6/2018 Lần ban hành: 01 Trang: 4/7
---	----------------------------------	---

- o  $M_{\text{base}}$ : Khối lượng phân tử của chuẩn ở dạng base
  - o  $M$ : khối lượng phân tử của chuẩn theo nhà cung cấp.
  - Dung dịch chuẩn Acrylamide 1000 mg/L: Cân 10.0mg chuẩn rắn Acrylamide vào bình định mức 10mL, Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, Vortex cho tan hết. Chuẩn được chuyển vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ dưới 0°C. Chuẩn sử dụng không quá 01 năm.
  - Dung dịch chuẩn Acrylamide – d3: Cân 10.0mg chuẩn rắn Acrylamide vào bình định mức 10mL, Định mức lên đến vạch bằng Acetonitrile, Vortex cho tan hết. Chuẩn được chuyển vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ dưới 0°C. Chuẩn sử dụng không quá 01 năm.
  - **Lưu ý:** Vì độ tinh khiết của chuẩn của mỗi nhà sản xuất và mỗi lô có thể khác nhau, khối lượng cân chuẩn không thể chính xác 10.0mg. Vì vậy nhân viên pha chuẩn cần tính lại nồng độ chuẩn pha dựa trên khối lượng cân và độ tinh khiết thực tế của chuẩn.
- c. Dung dịch chuẩn trung gian.
- Dung dịch chuẩn 20mg/L: rút 0.5mL dung dịch chuẩn Acrylamide 1000mg/L cho vào bình định mức 25mL, định mức lên đến vạch bằng nước Acetonitrile. Vortex cho tan hết. Chuẩn được chuyển vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ 0°C – 20°C. Chuẩn sử dụng không quá 06 tháng.
  - Dung dịch chuẩn 1.0mg/L: rút 0.5mL dung dịch chuẩn Acrylamide 20mg/L cho vào bình định mức 10mL, định mức lên đến vạch bằng nước Nước DI. Vortex cho tan hết. Chuẩn được chuyển vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ 0°C – 20°C. Chuẩn sử dụng không quá 03 tháng.
  - Dung dịch nội chuẩn Acrylamide – d3 (2mg/L): rút 0.05mL dung dịch nội chuẩn Acrylamide 1000mg/L cho vào bình định mức 25mL, định mức lên bằng nước DI. Vortex cho tan hết. Chuẩn được chuyển vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ 0°C – 20°C. Chuẩn sử dụng không quá 03 tháng.
- d. Dãy chuẩn làm việc:

STT	Thể tích chuẩn (1.0 mg/L)	Thể tích nội	Thể tích	Nồng độ
-----	---------------------------	--------------	----------	---------

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN. 256 Ngày ban hành: 15/6/2018 Lần ban hành: 01 Trang: 5/7
---	----------------------------------	---

	mL	chuẩn 2mg/L	định mức, mL	chuẩn µg/L
1	0.05	0.25mL	10	5
2	0.1		10	10
3	0.2		10	20
4	0.5		10	50
5	1		10	100
6	2		10	200

### 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
- Thực hiện mẫu Blank, blank matrix và mẫu QC theo mục VI.2.

### VI. xử lý mẫu.

#### 1. Chuẩn bị mẫu.

- Mẫu được đồng nhất theo HD.KT.022.

#### 2. Phương pháp tiến hành.

##### a. Mẫu nước:

- Lấy 10mL nước cho vào ống ly tâm 50mL, spike vào 0.1mL nội chuẩn Acrylamide d3 ( 1mg/L), thêm vào 10.0mL Acetonitrile, vortex 5 phút sau đó thêm vào 5mL Hexanes và vortex 2 phút. Thêm vào 1.5g NaCl vortex 2 phút sau đó thêm vào 4g MgSO<sub>4</sub>, Vortex 4 phút. Ly tâm 5 phút ở tốc độ > 2000 vòng/phút. Lấy 6mL lớp giữa cho vào ống nghiệm 15mL chứa 0.3g MgSO<sub>4</sub> + 0.1g PSA, Vortex 1 phút, ly tâm và lấy 5mL lớp trên thổi khô và định mức lại 1mL pha động Methanol/ H<sub>2</sub>O: 1/9, lọc qua màng lọc 0.45µm vào Vial 1.8mL và phân tích trên thiết bị LC – MS/MS

##### b. Mẫu khô:

- Cân 1g vào ống ly tâm 50mL, Spike 0.5mL nội chuẩn Acrylamide – d3 (1mg/L), để yên 30 phút. Thêm vào 10ml nước cất DI, vortex 3 phút, siêu

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</b>	Mã số: HD.TN. 256 Ngày ban hành: 15/6/2018 Lần ban hành: 01 Trang: 6/7
--	--	---

âm 10 phút, thêm vào 10.0mL Acetonitrile, votex 5 phút sau đó thêm vào 5mL Hexanes và votex 2 phút. Thêm vào 1.5g NaCl votex 2 phút sau đó thêm vào 4g MgSO<sub>4</sub>, Votex 4 phút. Ly tâm 5 phút ở tốc độ > 2000 vòng/phút. Lấy 3mL lớp giữa cho vào ống nghiệm 15mL chứa 0.15g MgSO<sub>4</sub> + 0.05g PSA, Votex 1 phút, ly tâm và lấy 2mL lớp trên thổi khô và định mức lại 1mL pha động Methanol/ H<sub>2</sub>O: 1/9, lọc qua màng lọc 0.45µm vào Vial 1.8mL và phân tích trên thiết bị LC – MS/MS.

## V. Phân tích

### 1. Thông số thiết bị:

Điều kiện AS	Column	Điều kiện LC			Tốc độ dòng, mL/phút
		Thời gian	Methanol 0.1%FA	H <sub>2</sub> O 0.1% FA	
<ul style="list-style-type: none"><li>- Injection type: Full loop</li><li>- Needle height from bottom: 1.0</li><li>- Flush volume: 100µL</li><li>- Tray temp control: off</li><li>- Column oven control: off</li><li>- Wash column: 500µL</li></ul>	Water C18 5µm/2.1µm/5mm (hoặc cột tương đương)	0	5	95	0.3
		2	5	95	
		3.5	100	0	
		4.0	5	95	
		6.0	5	95	
Điều kiện MS/MS					
<ul style="list-style-type: none"><li>- Q2 gas pressure: 1.2mT</li><li>- MS acquire time: 6</li><li>- Ion source : APCI</li><li>- Polarity: Positive</li><li>- Scan type: SRM</li><li>- Capillary temp: 350°C</li><li>- Vaporizer temperature: 200</li><li>- E spray voltage: 4.0KV</li><li>- Sheath gas:30</li><li>- Aux gas : 5</li></ul>	Ion chính		Ion định lượng		Ion xác nhận
	Acrylamide				
	72		55		27
	Acrylamide d3				
	75		58		-

### 2. Trình tự của quá trình tiêm mẫu trên thiết bị phân tích.

- MP
- Các điểm chuẩn từ thấp đến cao
- MP
- Blank
- QC
- Mẫu
- Chuẩn check

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN. 256 Ngày ban hành: 15/6/2018 Lần ban hành: 01 Trang: 7/7
---	----------------------------------	---

### C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

- Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối liên hệ giữa tỷ lệ ion m/z 55/58 với nồng độ chất chuẩn.
- Công thức tính kết quả.

$$C = C_0 * f$$

Trong đó:

- o C: nồng độ Acrylamide có trong mẫu
- o C<sub>0</sub>: Nồng độ Acrylamide tính theo đường chuẩn.
- o F: hệ số pha loãng.

### D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Đồ thị tuyến tính tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với  $r^2 \geq 0.995$
- ✓ Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
- ✓ Độ lệch của thời gian lưu không quá 5%.
- ✓ Độ lệch của dung dịch chuẩn check không quá 15%

### E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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