

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.305 Ngày ban hành: 30/07/2018 Lần ban hành: 2 Trang: 1/7
---	----------------------------------	--

# XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CHOLESTEROL TRONG THỰC PHẨM BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ BA TỬ CỰC (LC/MS/MS)

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
TỪ HIẾU HẬU	DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI	TRẦN THÁI VŨ

## THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

TT	S	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1	1	Mục A. I	Nền mẫu thực phẩm	30/06/2018
2	2	Mục B. 1. 2	Thiết bị LC/MS/MS	30/06/2018
3	3	Mục B. V	Điều kiện phân tích	30/06/2018
4	4			

## **A. TỔNG QUAN**

### **I. Phạm vi áp dụng.**

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng cholesterol trong nền mẫu thực phẩm trên thiết bị LC/MS/MS. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 15 mg/kg.

### **II. Tài liệu tham khảo.**

- HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI, UV, and APCI-MS Detectors. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4107-4113.
- An improved method of cholesterol determination in egg yolk by HPLC. R.-Z. Zhang, S.-T. Lxu, R.-M. Chen and P.-F. Rao. *Institute of Biotechnology Fuzhou University Fuzhou, Fujian, P.R. China, 1998.*

### **III. Nguyên tắc.**

Mẫu được sà phòng hóa với KOH ở nhiệt độ cao. Sau đó được chiết với dung môi hexan và phân tích trên LC/MS/MS.

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

- a. Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động trong phòng thí nghiệm.
- b. Báo cáo tất cả các vấn đề gây tổn thương tới con người và các sự cố gây đổ vỡ hóa chất.
- c. Dung môi hữu cơ hexan được thu hồi vào trong thùng chứa có dán nhãn dung môi thải.

## **B. PHÂN TÍCH**

### **I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.**

#### **1. Thiết bị cơ bản.**

- Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg
- Bình định mức 10 ml, 50 ml
- Máy ly tâm cho ống 50ml
- Micropipet các loại 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L.

- Pipet thủy tinh
- Bếp đun

## 2. Thiết bị phân tích

Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ ba tứ cực TSQ Quantum Ultra hoặc tương đương.

## II. Hoá chất và chất chuẩn.

### 1. Hoá chất.

- Nước cất khử ion (nước DI)
- Hexan của Fisher hoặc tương đương
- Ethanol 99% của Chemservice hoặc tương đương
- KOH và Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan của Trung Quốc
- KOH 50%: Pha 50 g KOH vào 50ml nước cất.
- MEOW Fisher hoặc tương đương.

### 2. Chất chuẩn.

#### a. Chuẩn gốc:

- Chuẩn Cholesterol của Sigma hoặc tương đương. Chuẩn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

#### b. Dung dịch chuẩn gốc

- Dung dịch chuẩn gốc 2000 mg/L: Cân chính xác khoảng 20 mg chất chuẩn vào các bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng hexan.

Lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Khi đó nồng độ chất chuẩn trong dung dịch được tính được theo công thức sau:

$$C(mg/L) = \frac{m(mg) \times 1000}{V(ml)} \times P$$

Trong đó: C là nồng độ chất chuẩn có trong dung dịch (mg/L).

m là khối lượng cân của chất chuẩn (mg).

V là thể tích định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

- Bảo quản và lưu trữ: dung dịch chuẩn gốc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 8°C), sử dụng trong thời gian 1 năm.
- Chuẩn làm việc (100 mg/L): Từ dung dịch gốc trên (2000 mg/L) tương ứng lấy 0.5 mL cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với hexan.
- Bảo quản và lưu trữ: chuẩn làm việc được lưu trữ trong ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4-8°C), sử dụng trong thời gian 6 tháng.
- Pha dãy chuẩn làm việc:
  - + Định tính: Nếu mẫu thường không phát hiện chỉ cần pha điểm chuẩn định tính 1.0 mg/L.
  - + Định lượng: Dung dịch chuẩn 500 mg/L được chiết song song với mẫu thật và được dùng để pha đường chuẩn:

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5
V (μL) Cholesterol 500.0 mg/L	10	20	40	100	200
C (mg/L)	5	10	20	50	100
V (μL) MEOH	990	980	960	900	800

- Bảo quản và lưu trữ: Dãy chuẩn làm việc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 8°C), sử dụng trong thời gian 1 tháng.

### III. Kiểm soát QA/QC.

**a. Mẫu Blank matrix:** Mẫu blank không phát hiện chất phân tích hoặc phát hiện ở nồng độ nhỏ hơn LOD

#### **b. Mẫu thêm chuẩn (QC)**

Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn với nồng độ thêm là 40.0 mg/kg sau khi phân tích 20 mẫu hoặc một mẻ mẫu. Mẫu thêm chuẩn được thực hiện cùng lúc với lô mẫu phân tích.

- Tính toán độ thu hồi theo phương trình

$$R(\%) = \frac{C_s - C}{S} \times 100$$

Trong đó:

R = Độ thu hồi

C<sub>s</sub> = Nồng độ mẫu thêm chuẩn

C = Nồng độ của mẫu nền

S = Nồng độ của chất phân tích thêm vào mẫu

#### IV. **Xử lý mẫu.**

Cân 1g mẫu (0.5g đối với nền mẫu dầu ăn, thịt, tôm cá) cho vào ống ly tâm 50 mL, thêm vào 10 mL ethanol 99.5% và 10 ml KOH 50%. Đun cách thủy ở 80°C trong 90 phút. Mỗi 15 phút lắc đều 1 lần.

Để mẫu nguội về nhiệt độ phòng, thêm 5ml nước, lắc chiết với 20mL hexan (3 lần).

Chuyển lớp hexane (phía trên) vào phiếu chiết 250ml, rửa kiềm bằng nước cất, mỗi lần rửa khoảng 50ml đến khi pH trung tính, cho tất cả dịch chiết qua phiếu chứa Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan vào bình cầu.

Cô quay đến khô, Định mức lại 1mL MEOH. Lọc qua màng lọc 0.45 vào vial. Phân tích trên LC/MS/MS.

#### V. **Phân tích**

##### 1. **Điều kiện LC:**

- Cột : C18 water
- Tốc độ dòng: 0.4 mL/phút..

- Pha động:
  - + line A: MEOH 0.1% acid formic
  - + line B: DI 0.1 % acid formic
- Chương trình pha động:

Line A %	Line B %	Thời gian (phút)
10	90	0
10	90	3
100	0	3.5
100	0	10
10	90	10.5
10	90	12

## 2. Điều kiện MS:

- Nguồn ion hóa: ESI
- Chế độ: Sim

Hợp chất	Ion mẹ (m/z)	Ion định lượng (m/z)	C E	Ion định tính (m/z)	C E
Cholesterol	369.2	161.0	10	95.0	30

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

Dung môi trắng → Các chuẩn có nồng độ từ thấp tới cao → Dung môi trắng  
 → Mẫu cần kiểm nghiệm → Mẫu thêm chuẩn → Chuẩn kiểm tra.

## C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

### a. Công thức tính toán:

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích và nồng độ chuẩn.

$$C = \left( \frac{C_0 \times V_{\text{extract}}}{m} \times f \right)$$

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, mg/kg
- C<sub>o</sub>: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, mg/L
- V<sub>extract</sub>: Thể tích dịch chiết
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng cân (g) hoặc thể tích mẫu (mL)

#### **D.      KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC**

- ✓      Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với  $R^2 \geq 0.99$
- ✓      Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
- ✓      Sai số tỉ số cường độ tương đối của ion định tính so với ion định lượng: 30%
- ✓      Độ lệch của thời gian lưu không quá 0.5%
- ✓      Độ lệch của dung dịch chuẩn kiểm tra không quá 15%
- ✓      Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart) ở mức 40mg/kg.

#### **E.      BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

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