

[illegible]

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.217 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/3/2018 Trang: 2/7
--	--------------------------------	--

## **A. TỔNG QUAN**

### **I. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp này được áp dụng xác định hàm lượng độc tố nấm mốc Aflatoxin M1 trong sữa và sản phẩm sữa bằng sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).

Giới hạn của phương pháp:

Chỉ tiêu	Giới hạn phát hiện LOD ( $\mu\text{g/kg}$ )	Giới hạn định lượng LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ )
Aflatoxin M1	0.15	0.5

### **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, 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.
- Màng lọc Nilon, 13mm, 0,45 $\mu\text{m}$
- Ống ly tâm 50mL, 15mL polypropylen, có nắp đậy
- Bồn siêu âm.
- Bình định mức: 10mL
- Pipet vạch: 0.1mL, 0.5mL, 1mL, 2mL.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.217 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/3/2018 Trang: 3/7
--	--------------------------------	--

- Micropipete 20 $\mu$ l; 200 $\mu$ l và 1000 $\mu$ L
- Vial 1.8mL.
- 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 C<sub>18</sub>: Supelco Ascentis C18 5 $\mu$ m/2.1 $\mu$ m (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. Dung dịch thử

- Dung dịch Methanol (0.1% Formic acid)
- Dung dịch H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid)

## 3. Chất chuẩn

### a. Thông tin về chất chuẩn

- Aflatoxin M1 (1mg/L): Sigma aldrich hoặc tương đương.

### b. Dung dịch chuẩn

- Dung dịch chuẩn 100ppb: Dùng kim 1.00mL rút 1.00mL chất chuẩn Aflatoxin M1 1 $\mu$ g/mL vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 100 $\mu$ g/L.
- Chuẩn được cho vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ < 0°C, Chuẩn sử dụng trong 01 năm.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.217 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/3/2018 Trang: 4/7
---	------------------------	--

### c. Dung dịch chuẩn làm việc.

- Thực hiện chiết chuẩn trên nền mẫu như sau:

No.	Thể tích rút Chuẩn 100µg/L (µL)	Khối lượng mẫu	Nồng độ
Std 01	12.5	5.0g	0.25
Std 02	25.0		0.50
Std 03	37.5		0.75
Std 04	50		1.0
Std 05	100		2.0
Std 06	250		5.0

- Chuẩn được thực hiện giống mẫu theo mục B.IV
- Dựng 01 điểm chuẩn để phân tích. Nếu mẫu phát hiện thì phân tích lại mẫu và dựng dãy 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
- Các mẫu được xử lý và phân tích giống mục B.IV.

### IV. Thực hiện phân tích

#### 1. chiết mẫu

- Cân khoảng  $5 \pm 0.1$  g ( hoặc 5mL sữa lỏng) mẫu đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 mL.
- Thêm 10ml nước vào, lắc đều sau đó cho 10.0mL Acetonitrille (1% Acetic acid) vào, votex mẫu trong 1 phút, siêu âm 30 phút. Cho thêm 1.67g Natri acetate vào, lắc mạnh trong **4 phút**, cho tiếp 4g MgSO<sub>4</sub> khan vào, lắc mạnh trong 1 phút, ly tâm 3000vòng/phút trong 5 phút. Lấy 3.0ml lớp trên cho vào ống 15ml có chứa hỗn hợp MgSO<sub>4</sub> và C18 (3:1), Votex 2 phút. Lấy 2.0ml dung dịch cho vào bình cầu, cô quay khô và định mức lại bằng 1.0mL hỗn hợp Acetonitrile/ nước: 1/4, votex, lọc mẫu vào vial, phân tích trên hệ thống LC/MS/MS.

#### 2. Phân tích trên LC /MS/MS

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.217 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/3/2018 Trang: 5/7
--	--------------------------------	--

Các điều kiện phân tích dưới đây chỉ mang tính chất tham khảo và có thể thay đổi trên mỗi thiết bị cụ thể.

Cột sắc ký	Autosampler	LC				Sắc ký - MS
C <sub>18</sub> : 150mm x 4.6mm x 5µm Hoặc cột tương đương	Injection: 20µm	Time, phút	H <sub>2</sub> O (0.1%FA )	MeOH (0.1FA)	Flow ml/phút	✓ Interface: H-ESI (+)
		0	90	10	450	✓ CID: 1.2 mTorr
		2	0	100		✓ Tune file: tune gần nhất
		5.5	0	100		
		5.8	90	10		
		8	90	10		

Hoạt chất	Ion mẹ	Ion con	CE
Aflatoxin M1	329	259; 273*	32; 33
(*): Ion định lượng			

### 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;

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, µg/kg.

- C<sub>0</sub>: nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, µg/L

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.217 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 30/3/2018 Trang: 6/7
--	--------------------------------	--

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 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%	± 20 %
>20 đến 50%	± 25 %
> 10 đến 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 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 ±5%.
- Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá ±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 ±20 %.

#### **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.

