

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.139 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/11/2017 Trang: 1/8
--	----------------------------	---

XÁC ĐỊNH CYCLAMAT TRONG THỰC PHẨM BẰNG THIẾT BỊ SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ 3 TỬ CỰC (LC/MS/MS)

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Văn Lên	Trần Thái Vũ	Trịnh Thị Minh Nguyệt

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
01	B.III	Bổ sung QA/QC	20 – 11 - 2017

A. TỔNG QUAN

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.TN.139 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/11/2017 Trang: 2/8</p>
---	-----------------------------------	---

I. Phạm vi áp dụng

- Phương pháp này áp dụng để phân tích chất tạo ngọt tổng hợp Cyclamate trong thực phẩm bằng LC/MS/MS.
- Giới hạn phát hiện của phương pháp LOD (MDL): 2 ppm
- Giới hạn định lượng của phương pháp LOQ: 10 ppm

II. Tài liệu tham khảo

- Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo:
 - o Food Sci. Biotechnol. 22(S): 233-240(2013)
 - o Juornal of food and drug analysis XXX (2014) 1 – 11
 - o TCVN 8472: 2010

III. Nguyên lý phương pháp

- Mẫu thực phẩm xác định cyclamate được chiết hoặc pha loãng bằng nước khử ion/MeOH (4/1) đến khoảng nồng độ giới hạn phát hiện, rồi xác định trực tiếp bằng sắc kí lỏng cột pha đảo ghép nối đầu dò khối phổ.

IV. An toàn phòng thí nghiệm

- Sử dụng tủ hút, kính bảo hộ và găng tay khi cần thiết.
- Các hoá chất thải như dung môi acetonitril, methanol chạy máy 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 - dụng cụ chuẩn bị mẫu

- Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg,
- Máy ly tâm cho ống 50ml và 15ml
- Bình định mức 10, 100, 200, 500 ml
- Micropipet các loại 20 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Pipet các loại 1 ml, 2 ml, 5ml, 10 ml.
- Ống ly tâm 50 ml, 15 ml.
- Màng lọc 0.45µm, vial và xylanh.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.139 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/11/2017 Trang: 3/8
--	----------------------------	---

2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ ba tứ cực TSQ Quantum Ultra.
- Cột sắc ký C₁₈: 150mm x 2.1mm x 5A⁰ hoặc tương đương.

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất

- Nước cất một lần và nước cất khử ion (nước DI)
- Methanol: HPLC
- Acid Formic: TKPT

2. Chất chuẩn

a. Thông tin chất chuẩn:

- Chất chuẩn Sodium Cyclamat: của Sigma Aldrich hoặc tương đương.

b. Dung dịch chuẩn 1000 mg/L

- Nồng độ chuẩn được tính theo công thức sau:

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

Trong đó: m: khối lượng chất chuẩn (mg)

M_{base}: khối lượng phân tử của chất chuẩn ở dạng cơ bản.

M: khối lượng phân tử ở dạng đóng gói (của nhà sản xuất).

V: Thể tích bình định mức pha chuẩn (L)

Pure: độ tinh khiết của chuẩn

- Cân chính xác khoảng 11.2 mg chất chuẩn vào bình định mức 10 ml, hoà tan và định mức đến vạch bằng MeOH, Vortex cho tan hết chuẩn.
- Chất chuẩn được cho vào ống nghiệm bằng thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ < 0°C và sử dụng tối đa 06 tháng.
- Lưu ý: Nhân viên pha chuẩn cần phải tính lại nồng độ chuẩn dựa trên khối lượng chuẩn cân thực tế.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.139 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/11/2017 Trang: 4/8
--	----------------------------	---

c. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc

- Chuẩn **100 mg/l**: Từ dung dịch gốc trên (**1000 mg/l**) tương ứng lấy 1ml cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch với DI.
- Chuẩn hỗn hợp (**40 mg/l**): Rút 1.00 ml của dung dịch chuẩn 1000 mg/L ở trên vào bình mức 10 ml, định mức tới vạch bằng DI.
- Chuẩn hỗn hợp (**1.6 mg/l**): Rút 1.00 ml của dung dịch chuẩn 1000 mg/L ở trên vào bình mức 10 ml, định mức tới vạch bằng MeOH-DI (1:4)
- Bảo quản và lưu trữ: Dung dịch chuẩn làm việc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống nhựa, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (8°C), sử dụng trong thời gian 3 tháng.

d. Dung dịch dãy chuẩn làm việc: (Bảo quản ngăn mát, sử dụng trong 1 tuần)

No.	Chuẩn sử dụng	Thể tích lấy	Thể tích định mức	Dụng cụ pha chuẩn	C ₀ (µg/L)
Std1	1600µg/L	0.05	10	Micropipet 200 µL	8
Std2		0.10			16
Std3		0.20			32
Std4		0.50		Pipet 2mL	80
Std5		1.00			160
Std6		2.00			320

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.
 - o Mẫu Blank hóa chất:
 - o Mẫu Blank matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.
 - o Mẫu QC.
- Mẫu được thực hiện theo mục B.IV

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.139 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/11/2017 Trang: 5/8
--	----------------------------	---

IV. Phân tích mẫu

1. Chiết mẫu

- Mẫu thực phẩm dạng rắn, sệt: Cân 1g mẫu vào ống ly tâm 50mL, chiết mẫu 2 lần với Methanol/nước: 1/1. Lọc mẫu vào bình định mức 50mL, định mức lên bằng nước DI. Mẫu được pha loãng 5 lần với hỗn hợp H₂O. Lọc mẫu qua màng lọc 0.45µm vào Vial. Phân tích trên thiết bị LC/MS/MS.
- Mẫu thực phẩm dạng lỏng: Lấy 1mL mẫu vào ống ly tâm 50mL, chiết mẫu 2 lần với Methanol/nước: 1/1. Lọc mẫu vào bình định mức 50mL, định mức lên bằng nước DI. Mẫu được pha loãng 5 lần với hỗn hợp H₂O. Lọc mẫu qua màng lọc 0.45µm vào Vial. Phân tích trên thiết bị LC/MS/MS.

2. Phân tích trên thiết bị LC/MS/MS

Điều kiện AS	Điều kiện LC				
	Column	Thời gian	Ammonium formate 20mM	Methanol 0.1%FA	Flow, mL/phút
<ul style="list-style-type: none">- Injection type: Full loop- Needle height from bottom: 1.0- Flush volume: 100µL- Tray temp control: off- Column oven control: off- Wash column: 500µL	C18 150mm x 2.1mm x 5A ^o (hoặc cột tương đương)	0	90	10	0.45
		1	90	10	
		2	0	100	
		4.5	0	100	
		4.8	90	10	
		6	90	10	
Điều kiện MS/MS					
<ul style="list-style-type: none">- Q2 gas pressure: 1.2mT- MS acquire time: 6- Ion source : HESI- Polarity: Negative- Scan type: SRM			<ul style="list-style-type: none">- Capillary temp: 350°C- Vaporizer temperature: 200- ESI spray voltage: ≥ 3000V- Sheath gas:30- Aux gas : 5		
Chỉ tiêu phân tích	Ion chính	Ion định lượng	Ion định tính	CE	
Cyclamate	178	80	80, 178	28; 26; 8	

3. Trình tự phân tích trên LC/MS/MS

- Dung dịch pha động
- Các điểm chuẩn từ thấp đến cao
- Dung dịch pha động

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.139 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/11/2017 Trang: 6/8
--	----------------------------	---

- Mẫu Blank
- Mẫu
- QC
- Chuẩn check
- Lưu ý: Nếu mẫu không phát hiện thì có thể không cần chạy hết đường chuẩn.

C. TÍNH KẾT QUẢ

- Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối liên hệ giữa diện tích peak m/z 81 với nồng độ chất chuẩn.
- nồng độ cyclamate được tính như sau:

$$C = C_0 * f$$

Trong đó:

- o C₀: Nồng độ Cyclamate tính theo đường chuẩn (mg/L)
- o f: Hệ số pha loãng.

D. BẢO ĐẢM QA/QC

- Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn (bao gồm điểm Zero) với r² ≥ 0.995.
- Hiệu suất thu hồi: 80 — 110%
- Độ lệch của RT ≤ 2.5% (< 12s)
- Tỷ số ion:

Cường độ tương đối (so với ion định lượng)	Sai số cho phép LC/MS/MS
>50%	± 30%
20-50%	± 30%
10%-20%	± 30%
<10%	± 30%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.139 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 20/11/2017 Trang: 7/8
--	----------------------------	---

o BM.15.06