

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.024 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 1/6
---	------------------------	--

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG URE TRONG THỰC PHẨM BẰNG SẮC
KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA TỬ CỰC (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
01		Thay đổi Formate SOP	04-01-2018

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.024 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 2/6
--	--------------------------------	--

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

- ✓ Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng urê trong Thực phẩm bằng sắc kí lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).
- ✓ Giới hạn định lượng của phương pháp 100 mg/kg

II. Tài liệu tham khảo

AOAC 967.07

III. Nguyên tắc

- ✓ Mẫu sau khi được chiết trong nước, pha loãng. Dịch chiết được định tính và định lượng trên LC/MS/MS.

IV. An toàn phòng thử nghiệm

- ✓ Các nội qui an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt: Áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.
- ✓ Các hóa 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

- Bồn siêu âm
- Máy ly tâm
- Máy Vortex.
- Màng lọc nylon, 13 mm, 0,45 µm
- Ống ly tâm 50 mL có nắp đậy
- Bình định mức (CCX A): 10mL, 50 mL
- Pipet vạch (CCX A): 2mL
- Dụng cụ thủy tinh các loại
- Cân phân tích có độ chính xác 0.001g

2. Hệ thống LC/MS/MS

- Hệ thống LC/MS/MS:
 - Autosampler: Accela
 - LC: Accela 1250pump
 - MS: TSQ Quantum Ultra
- Cột sắc ký lỏng pha đảo pha đảo: Cột Supelco 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm (hoặc tương đương).

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất

- Nước cất khử ion:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.024 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 3/6
--	--------------------------------	--

- MeOH: HPLC/LC/MS
 - HCOOH: Merck
 - NH₃: Merck.
 - K₄Fe(CN)₆.3H₂O: Tinh khiết (TQ)
 - Zn(CH₃COO)₂.2H₂O: Tinh khiết (TQ)
2. Dung dịch thử
- Methanol (0.1% Formic acid): Cho 4ml acid Formic vào bình Methanol (LC/MS) 4 lít.
 - H₂O (0.1% Formic acid): Cho 4ml acid Formic vào bình Nước cất LC/MS 4 lít.
 - Dung dịch Carez I: Hòa tan 10.6 g K₄Fe(CN)₆.3H₂O trong nước, định mức đến 100 mL bằng nước cất.
 - Dung dịch Carez II: Hòa tan 22 g Zn(CH₃COO)₂.2H₂O trong nước, thêm 3 mL axit acetic, định mức đến 100 mL bằng nước cất.
3. Chất chuẩn
- Ure: Độ tinh khiết 99.5% (Merck).
 - a. Dung dịch chuẩn gốc 1000mg/L: (*Bảo quản trong tủ mát, sử dụng trong 06 tháng*): Cân chính xác khoảng 25mg Ure vào bình định mức 25ml và định mức đến vạch bằng nước cất được dung dịch chuẩn gốc 1000mg/L.
 - b. Dung dịch chuẩn trung gian 20mg/L: (*Bảo quản trong tủ mát, sử dụng trong 03 tháng*): Dung dịch chuẩn 20 mg/L: Rút 0.5 mL chuẩn gốc (1000 mg/L) vào bình 25 mL, định mức đến vạch bằng nước.
 - c. Dung dịch chuẩn làm việc:

Stt	Thể tích dung dịch chuẩn trung gian (20 mg/L), mL	Thể tích định mức, mL	Nồng độ ure, mg/L
1	0.05	10	0.1
2	0.10	10	0.2
3	0.20	10	0.4
4	0.5	10	1
5	1	10	2
6	2	10	4

III. Kiểm soát QA/QC

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích phải thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích

- Blank thuốc thử.
- Blank matrix: Mẫu Blank phù hợp với nền mẫu phân tích

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.024 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 4/6
--	--------------------------------	--

- Mẫu QC: Mẫu Spike trên nền mẫu Blank matrix Thực hiện mẫu Blank, Blank matrix và QC theo mục IV.2.

IV. Thực hiện phân tích

1. Xử lý mẫu

- Cân khoảng 2 ± 0.1 (g) mẫu cho vào ống ly tâm 50ml, thêm vào 25ml nước, vortex đều, siêu âm 20 phút. Thêm 0.5mL carez I, vortex, thêm tiếp 0.5mL carez II, vortex, ly tâm ở 3000vòng/phút trong 10 phút. Lọc phần dung dịch này qua giấy lọc vào bình định mức 50mL, chiết lại phần rắn với 20mL nước tương tự như trên và gộp chung phần dung dịch này vào bình định mức ở trên, tráng giấy lọc và định mức đến vạch bằng nước cất (V_1). Rút 2 mL (V_2) dung dịch này cho vào bình định mức 10 mL (V_3), định mức đến vạch bằng nước, lắc đều.
- Lấy dung dịch sau pha loãng lọc qua màng lọc 0.45 μ m vào Vial. Phân tích trên LC/MS/MS

2. Phân tích trên LC/MS/MS

a. Điều kiện máy LC và bộ tiêm mẫu tự động:

- ✓ Cột sắc ký: Cột Supelco 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5 μ m (hoặc tương đương).
- ✓ Chương trình dung môi theo thời gian

Thời gian	A %	B%	Tốc độ dòng, mL/phút
0	30	70	0.4
1	30	70	

Điều kiện cho bộ bơm mẫu tự động

- ✓ Injection mode: full loop
- ✓ Injection volume: 20 μ l
- ✓ Needle height from bottom: 1mm
- ✓ Flush volume: 200 μ l
- ✓ Wash volumn: 500 μ l
- ✓ Tray temp control: off
- ✓ Column oven control: off

b. Điều kiện MS

- ✓ Interface: APCI
- ✓ Polarity: positive
- ✓ Capillary temp: 250°C
- ✓ Vaporizer temp: 350°C
- ✓ Corona discharge current: 4.0 μ A
- ✓ CID: 1.5 mTorr
- ✓ Sheath gas: 40
- ✓ Aux. gas: 5

Chất đo đạt	Ion mẹ	Ion định lượng (CE)	Ion xác định (CE)
-------------	--------	---------------------	-------------------

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.024 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/6
--	--------------------------------	--

Urê	60.96	60.96(5)	44.09(25)
<i>CE-Collision Energy: Năng lượng bắn phá</i>			

3. Trình tự tiêu mẫu

Các mẫu sẽ được phân tích theo trình tự sau:

- ✓ Dung môi pha động.
- ✓ Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao.
- ✓ Dung môi pha động.
- ✓ Chuẩn check
- ✓ Mẫu Blank
- ✓ Mẫu cần kiểm nghiệm.
- ✓ Chuẩn check
- ✓ Mẫu Spike/ QC
- ✓ Chuẩn Check

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêu xen kẽ một điểm chuẩn sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc là một điểm chuẩn.

C. TÍNH KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích pic ion định lượng urê (m/z 60.96) với nồng độ tương ứng.

Lưu ý: Cần quy đổi nồng độ theo độ tinh khiết của chuẩn.

Hàm lượng Urê trong mẫu kiểm được tính theo công thức sau:

$$C = \frac{C_o * V_1 * V_3}{V_2 * m} * f$$

- Trong đó:
- C: hàm lượng urê có trong mẫu kiểm, mg/kg
 - C_o: nồng độ urê trong dịch chiết tính từ đường chuẩn, mg/L
 - V₁: Thể tích định mức, mL
 - V₂: Thể tích lấy để pha loãng, mL
 - V₃: Thể tích định mức lúc pha loãng, mL
 - m: khối lượng mẫu phân tích, g
 - f: Hệ số pha loãng nếu có.

Lưu ý: Với những mẫu không phát hiện, không cần xây dựng đường chuẩn mà chỉ cần tiêu chuẩn ở một nồng độ duy nhất để xác nhận và so sánh.

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn (bao gồm điểm 0) với R² ≥ 0.995
- ✓ Độ lệch thời gian lưu ± 15s
- ✓ Nồng độ QC trong khoảng

Nồng độ (µg/Kg)	% H _{th}
-----------------	-------------------

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.024 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 6/6
--	--------------------------------	--

	Malachite green	Leucomalachite gree
0.15	72 – 118	70 – 120
0.48	82 – 120	80 – 110
1.0	78 – 115	80 – 120
2.0	78 – 114	80 – 120

Tỉ số ion	Độ lệch cho phép
> 50%	± 20 %
>20 đến 50%	± 25 %
> 10 đến 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích, bao gồm:

- BM.15.04a
- BM.15.06