

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.127 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 10/10/2017 Trang: 1/7
--	--------------------------------	---

**ĐỊNH LƯỢNG AURAMIN O TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC  
ĂN CHĂN NUÔI BẰNG LC/MS/MS**

<b>Biên soạn</b>	<b>Xem xét</b>	<b>Phê duyệt</b>
Nguyễn Văn Lên	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

<b>STT</b>	<b>Vị trí</b>	<b>Nội dung sửa đổi</b>	<b>Ngày sửa đổi</b>
<b>01</b>	<b>B. Phân tích</b>	Xử dụng Rhodamine B làm nội chuẩn để kiểm soát quá trình phân tích	<b>10/10/2017</b>

## A. GIỚI THIỆU

### I. Phạm vi áp dụng

- Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng AURAMINE O bằng LC/MS/MS.
- Giới hạn phát định lượng (LOQ): 25ppb
- Giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD – MDL): 5 ppb

### II. Tài liệu tham khảo

- Tiêu chuẩn này được xây dựng theo: BS EN 15662: 2008

### III. Nguyên tắc

- Mẫu được chiết lên pha hữu cơ, pha loãng và được định tính và định lượng trên LC/MS/MS.

### IV. An toàn phòng thử nghiệm

- Nhân viên phải tuân thủ nội quy phòng thử nghiệm.
- Nhân viên vào phòng thử nghiệm bắt buộc phải mặc áo Blouse.
- Khi thao tác với hóa chất độc hại phải được thao tác trong tủ hút, nhân viên phải mang găng tay, kính bảo hộ và mang khẩu trang.
- Tất cả hóa chất sau khi sử dụng phải được thu hồi vào thùng chứa theo đúng quy định để thực hiện tiêu hủy theo đúng quy định pháp luật.
- Tuyệt đối không được ăn uống trong khu vực thử nghiệm.

## B. PHÂN TÍCH

### I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.

#### 1. Thiết bị

- Cân phân tích 0- 200g, độ chính xác 0,1 mg.
- Cân phân tích 0 – 57g, độ chính xác 0.01mg
- Máy ly tâm (tốc độ  $\geq 2000$  vòng/ phút)
- Máy lắc Vortex.
- Màng lọc PTFE/ Nilon, 13 mm, 0,45  $\mu\text{m}$
- Ống ly tâm 15mL, 50mL có nắp đậy
- Bình định mức: 10mL, 25 mL
- Pipet vạch: 0.1mL, 0.5mL, 1mL
- Dụng cụ thủy tinh các loại

#### 2. Thiết bị phân tích:

- Hệ thống LC/MS/MS

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.127 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 10/10/2017 Trang: 3/7
---	------------------------	---

- Hệ thống LC/MS/MS bao gồm Accela 1250 Pump, Accela autosampler và đầu dò khối phổ 3 tứ cực TSQ Quantum Ultra (Thermal Scientific).
- Cột sắc ký lỏng pha đảo pha đảo: C<sub>18</sub>, 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 LC/MS (hoặc tương đương type I)
- Acetonitrile, HPLC
- HCOOH: Tkpt
- Bột C18 ( size 40 – 60A<sup>0</sup>)
- Bột PSA ( Diamine) (size 40 – 60A<sup>0</sup>)
- Trisodium citrate – Tkpt
- Sodium chloride – Tkpt
- Disodium tricitrate sesquihydrate – Tkpt.
- Magienium sulfate anhydrous – Tkpt.
- Auramine O – Acros hoặc tương đương, có COA và nồng độ rõ ràng.
- Rhodamine B – Chuẩn phân tích có COA rõ ràng.

### 2. Dung dịch hóa chất

- **Dung dịch pha động:**
  - o H<sub>2</sub>O (0.1% HCOOH): Cho 1ml acid Formic vào 1L nước LC/MS.
  - o Acetonitrile ( 0.1% HCOOH): Cho 1ml acid Formic vào 1L Acetonitrile.

#### a. Dung dịch chuẩn

##### **Rhodamine B**

- Dung dịch chuẩn Rhodamine B (1000mg/L): ( *Bảo quản trong ngăn đá, sử dụng trong 01/năm*)
  - o Cân khoảng 10 mg chuẩn Rhodamine B vào bình định mức 10mL, ghi lại khối lượng chuẩn đã cân, định mức lên bằng Methanol.
  - o Nồng độ Rhodamine B được tính theo công thức sau:  

$$C \text{ (mg/L)} = m \cdot \% \text{pure} / V$$
  - o Dung dịch chuẩn Rhodamine B trung gian 0.5mg/L: Rút 25µL dung dịch chuẩn 1000mg/L cho vào bình định mức 50mL, Định mức lên đến vạch bằng nước cất khử ion.

##### **Auramine O**

- Dung dịch chuẩn gốc Auramin O: ( *Bảo quản trong ngăn đá, sử dụng trong 01 năm*)
  - o Cân khoảng 10 mg chuẩn Auramin – O vào các bình định mức 10 mL,

định mức đến vạch Methanol. Ghi nhận khối lượng đã cân và lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn.

- o Nồng độ chuẩn Auramin – O được tính theo công thức sau:

$$C_{\text{Auramin O}} = \frac{m_{\text{mg}} * 1000}{V_{\text{ml}}} * \text{pure\%}$$

Trong đó:

m: Khối lượng chuẩn.

V: Thể tích định mức

- Dung dịch chuẩn trung gian: ( bảo quản trong ngăn mát, sử dụng trong 03 tháng)
  - o Dung dịch chuẩn 40 mg/L: Rút 1.0 mL chuẩn gốc (1000 mg/L) vào bình 25 mL, định mức đến vạch bằng methanol.
  - o Dung dịch chuẩn 1.6mg/L: Rút 1.0 mL chuẩn 40 mg/L vào bình 25 mL, định mức đến vạch bằng hỗn hợp pha động acetonitrile/H<sub>2</sub>O (1:3)
  - o Dung dịch chuẩn 160ppb: Rút 1.0ml chuẩn 1.6mg/L vào bình 10 ml, định mức lên bằng hỗn hợp pha động acetonitrile/H<sub>2</sub>O (1/3).

- b. Dung dịch chuẩn làm việc: ( bảo quản trong ngăn mát, sử dụng trong 15 ngày)

Dung dịch chuẩn làm việc được pha như sau:

STT	Nồng độ chất chuẩn sử dụng, ppb	Thể tích chất chuẩn, mL	Nội chuẩn sử dụng	Thể tích định mức, mL	Nồng độ điểm chuẩn, ppb	Dụng cụ rút chuẩn
Std 01	160	0.05	0.05ml của Rhodamine B 0.5mg/L	10	0.8	Kim Hamilto n 500µL
Std 02		0.10			1.6	
Std 03		0.20			3.2	
Std 04		0.50			8	
Std 05		1.00			16	Pipet 1mL
Std 06		2.00			32	Pipet 2mL
Lưu ý:	✓ Các thông số pha chuẩn phải được ghi chú rõ ràng trong sổ pha chuẩn. ✓ Các chuẩn phải có mã số theo "QT.18" để dễ truy xuất.					

- Ghi chú:
  - o Do khối lượng cân chuẩn rắn có thể không đúng 10mg vì vậy nhân viên pha chuẩn phải sử dụng số liệu cân chuẩn để tính lại nồng độ thật của chuẩn.
  - o Các chuẩn trung gian phải được tính để pha được nồng độ như qui định.

### III. Thực hiện QA/QC

- Khi thực hiện phân tích mẫu phải thực hiện các mẫu sau:

- Mẫu Blank hoá chất: Sử dụng tất cả các hoá chất chiết mẫu, nhưng không có mẫu nhằm kiểm soát độ sạch của hoá chất và dụng cụ.
- Mẫu blank sample ( nếu có): mẫu không phát hiện Auramin O hoặc có hàm lượng Auramin O dưới mức LOD đã biết trước.
- Mẫu QC: Có thể thực hiện Spike chuẩn trên dung môi hoặc trên nền mẫu hoặc một mẫu đã biết trước nồng độ ( có thể là mẫu CRM) nhằm đánh giá hiệu suất của quá trình phân tích hoặc độ lặp lại.
- Mẫu được phân tích theo mục B.IV.

#### IV. Quy trình phân tích.

##### 1. Xử lý mẫu

- Mẫu được đồng nhất theo mục 4.2 của HD.KT.022
- **Mẫu thực phẩm: ( măng, dưa muối, thịt gà):** Cân vào ống tâm 50 ml  $5 \pm 0.5$ g mẫu đã đồng nhất, sau đó thêm vào 0.2ml dung dịch chuẩn Rhodamine B ( 0.5mg/L), Vortex và để yên 30 phút, Sau đó thêm vào 10ml nước cất lắc đều cho mẫu tơi ra, dùng pipet thêm vào 10 ml Acetonitrile (5% Formic acid), siêu âm 5 phút, lắc mạnh trong 3 phút. Sau đó thêm vào hỗn hợp muối 4g  $\text{MgSO}_4$  khan+1g Trisodium Citrate + 1g NaCl + 0.5g Disodium tricitrate sesquihydrate, lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm 3000 vòng/ phút. Rút 4ml lớp trên cho vào ống ly tâm 15ml và loại béo bằng Hexans 2mlx2 (dùng cho mẫu thịt, TĂCN). Sau đó lấy 2ml dịch chiết sau khi loại béo cho vào ống ly tâm 15mL có chứa 0.05mg PSA + 0.05mg C18 + 0.15g  $\text{MgSO}_4$  khan, vortex trong 1 phút, ly tâm. Sau đó pha loãng mẫu 4 lần với nước, lọc phần dung dịch qua màng lọc PTFE 0.45 $\mu\text{m}$  vào lọ phân tích vial và phân tích trên LC/MS/MS. Nếu mẫu có hàm lượng lớn, nồng độ Auramin - O trong dịch chiết vượt ngoài khoảng nồng độ dãy chuẩn thì pha loãng dịch chiết bằng nước.
- **Mẫu thức ăn chăn nuôi:** Cân 2.0g mẫu vào ống ly tâm 50ml, thực hiện chiết mẫu giống trong thực phẩm.

##### 2. Phân tích trên thiết bị LC/MS/MS:

Điều kiện LC/MS/MS

Cột sắc ký	Autosampler	LC				Sắc ký - MS
C <sub>18</sub> : 150mm x 4.6mm x 5 $\mu\text{m}$ Hoặc cột tương đương	Injection: 20 $\mu\text{m}$	Thời gian (min)	Tốc độ dòng ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	H <sub>2</sub> O 0.1 % FA (%)	Acetonitrile 0.1% FA (%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Interface: H-ESI (+)</li> <li>✓ CID: 1.2 mTorr</li> <li>✓ Tune file: tune gần nhất</li> </ul>
		0	400	90	10	

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN.127 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 10/10/2017 Trang: 6/7
--	--------------------------------	---

		1		90	10		
		1.5		100	0		
		3.5		100	0		
		4		90	10		
		6		90	10		

Hoạt chất	Ion mẹ	Ion con	CE	Tube Lens
Auramin O	268	131; 147*; 252	46; 26; 30	99
Rhodamine B	443.4	399*	47	99
(*): Ion định lượng				

### 3. Trình tự phân tích trên LC/MS/MS

- Mobile phase – Pha động định mức mẫu.
- Dây chuẩn.
- Mobile phase – Pha động định mức mẫu.
- Chuẩn check.
- Mẫu Blank.
- Mẫu
- Mẫu QC
- Chuẩn check
- Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm 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 tỷ lệ diện tích pic ion định lượng Auramine - O (m/z 174 hoặc m/z 148)/ Rhodamine B (m/z 399) với nồng độ tương ứng.

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

Hàm lượng Auramin - O trong mẫu kiểm được tính theo công thức sau:

$$C = \left( \frac{C_0 \times V_{dm}}{1000 \times m} \times f \right)$$

Trong đó:

- C: hàm lượng Auramine - O có trong mẫu kiểm, mg/kg
- C<sub>0</sub>: nồng độ Auramine - O trong dịch chiết tính từ đường chuẩn, µg/L

- V<sub>dm</sub>: Thể tích định mức, mL
- m: khối lượng mẫu phân tích, g

- f: Hệ số pha loãng nếu có.
- 1/1000: Hệ số quy đổi từ ppb về ppm

*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. BẢO ĐẢM KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM**

- 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 đương của chuẩn trong cùng một điều kiện phân tích.

Tỉ số cường độ ion đối với ion base peak	Mức sai biệt tối đa cho phép	$\Delta R_t$
>50%	$\pm 20\%$	$\leq 2.5\% ( \leq 12s)$
>20 đến 50%	$\pm 25\%$	
>10 đến 20%	$\pm 30\%$	
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	

- Mẫu Blank không phát hiện hoặc phát hiện  $\leq LOD$ .
- Hiệu suất mẫu QC phải nằm trong khoảng
  - o Nồng độ < 100ppb: 60 – 115%
  - o Nồng độ  $\geq 100ppb$ : 80 – 110%

#### **E. BÁO CÁO KẾT QUẢ**

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích BM.15.04b và BM.15.06.