**ĐỊNH 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 (LC/MS/MS)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nhân viên biên soạn** | **Nhân viên xem xét** | **Nhân viên phê duyệt** |
| **Nguyễn Văn Lên** | **Trần Thái Vũ** | **Trần Thái Vũ** |

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| STT | Vị trí | Nội dung sửa đổi | Ngày sửa đổi |
| **01** |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

# 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 (µg/kg) | Giới hạn định lượng  LOQ (µg/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, 0,45μm

### Ống ly tâm 50mL, 15mL polypropylen, có nắp đậy

### Bồn siêu âm.

* Bình định mức: 10mL
* Pipet vạch: 0.1mL, 0.5mL, 1mL, 2mL.
* Micropipete 20µl; 200µl và 1000µL
* 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 kí lỏng pha đảo C18: Supelco Ascentis C18 5µm/2.1µm (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 H2O (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**

### Dụng dịch chuẩn 100ppb:Dùng kim 1.00mL rút 1.00mL chất chuẩn Aflatoxin M1 1µg/mL vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng Acetonitrile. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 100µg/L.

### Chuẩn được cho vào ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ < 00C, Chuẩn sử dụng trong 01 năm.

### **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 ± 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 MgSO4 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 MgSO4 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**

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** |
| C18:150mm x 4.6mm x 5µmHoắc cột tương đương | Injection: 20µm | Time, phút | H2O (0.1%FA) | MeOH (0.1FA) | Flowml/phút | Interface: H-ESI (+)CID: 1.2 mTorrTune file: tune gần nhất |
| 0 | 90 | 10 | 450 |
| 2 | 0 | 100 |
| 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:

### 

### *Trong đó:- C: lượng chất cần phân tích có trong mẫu, µg/kg.*

### *- Co: nồng độ chất cần phân tích tính từ đường chuẩn, μg/L*

*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 (R2) 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 tíchBM.15.04a và BM.15.06.