

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 10137:2013
ISO/TS 27106:2009**

Xuất bản lần 1

**PHOMAT – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NISIN A
BẰNG SẮC KÍ LỎNG-PHỔ KHỐI LƯỢNG (LC-MS) VÀ
SẮC KÍ LỎNG-PHỔ KHỐI LƯỢNG HAI LẦN (LC-MS-MS)**

Cheese – Determination of nisin A content by LC-MS and LC-MS-MS

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 10137:2013 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 27106:2009;

TCVN 10137:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Phomat – Xác định hàm lượng nisin A bằng sắc kí lỏng-phổ khối lượng (LC-MS) và sắc kí lỏng-phổ khối lượng hai lần (LC-MS-MS)

Cheese – Determination of nisin A content by LC-MS and LC-MS-MS

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nisin A trong phomat.

Phương pháp này thích hợp cho việc đo các mức thấp của nisin A có giới hạn định lượng 1 mg/kg.

CHÚ THÍCH: Nisin là một peptid được tạo thành bởi một số loại vi khuẩn (ví dụ: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) gây ức chế hoặc phá hủy các vi sinh vật khác. Nisin thường được sử dụng rộng rãi làm chất bảo quản tự nhiên cho các loại thực phẩm như rau, phomat, thịt và cacao. Trong chế biến phomat, nisin được sử dụng để ngăn ngừa sự phồng khí về sau. Việc sử dụng nisin phải đúng theo mức tối đa quy định trong sản phẩm. Nisin có ở hai dạng là dạng A và dạng Z, hai dạng này khác nhau một axit amin. Phương pháp này chỉ xác định nisin A.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

2.1

Hàm lượng nisin A (nisin A content)

Phần khối lượng của chất xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng nisin A được biểu thị bằng miligam trên kilogam sản phẩm.

3 Nguyên tắc

Mẫu được nghiền và được chiết bằng axit formic loãng ở 80 °C. Sau khi li tâm siêu tốc, các protein gây nhiễu được tách ra bằng cách lọc qua màng siêu lọc (UF). Trong dịch chiết đã tinh sạch, nisin A được tách bằng cách sử dụng pha tĩnh trùng hợp và được phát hiện bằng đo phổ khối lượng (việc sử dụng phổ khối lượng hai lần là tùy chọn).

4 Thuốc thử và chất chuẩn

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Dung dịch gốc albumin huyết thanh bò (BSA)

Hòa tan 10 mg BSA (có độ tinh khiết > 96 % khối lượng) trong 10 ml nước.

4.2 Dung dịch đệm albumin huyết thanh bò (BSA)

Hòa tan 80 ml nước với 20 ml axetonitril (4.6), 0,5 ml axit formic (4.3), 0,01 ml axit trifloaxetic (4.5) và 1 ml dung dịch gốc BSA (4.1).

4.3 Axit formic (HCOOH).

4.4 Dung dịch axit formic, $\rho_{\text{HCOOH}} = 5 \text{ g/l}$. Dùng pipet lấy 0,41 ml axit formic (4.3) cho vào bình định mức một vạch 100 ml (5.12). Thêm nước đến vạch và trộn.

4.5 Axit trifloaxetic (CF₃COOH).

4.6 Axetonitril (CH₃CN), "tinh khiết".

4.7 Metanol (CH₃OH).

4.8 Nisin A, có độ tinh khiết > 95 % khối lượng ¹⁾.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm và các thiết bị, dụng cụ sau:

5.1 Máy li tâm phòng thử nghiệm, có thể tạo gia tốc hướng tâm ít nhất là 3 000g.

5.2 Máy li tâm siêu tốc, có thể tạo gia tốc hướng tâm 20 800g.

5.3 Màng siêu lọc, cỡ lỗ 30 kD ²⁾.

5.4 Bộ lọc màng, cỡ lỗ 0,22 μm ³⁾.

¹⁾ Ambicin N là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm nêu trên.

²⁾ Millipore Centricon YM-30 là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm nêu trên.

³⁾ Millipore Millex-GV PVDF 0,22 μm là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm nêu trên.

- 5.5 **Cân**, có thể cân chính xác đến 10 mg và có thể đọc được đến 1 mg.
- 5.6 **Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 0,1 mg, có thể đọc được đến 0,01 mg.
- 5.7 **Nồi cách thủy**, có thể lãc được và duy trì nhiệt độ ở $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.8 **Bể siêu âm**, có thể lãc được và duy trì nhiệt độ ở $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.9 **Máy nghiền phomat**, có cỡ lỗ khoảng 2 mm.
- 5.10 **Thiết bị sắc kí lỏng-phổ khối lượng (LC-MS)**.
- 5.10.1 **Hệ thống bơm gradient rửa giải**, có thể hoạt động ở 0,25 ml/min.
- 5.10.2 **Bơm thủ công hoặc bơm tự động**, có thể bơm được các thể tích 5 μl .
- 5.10.3 **Bộ phận làm nóng cột**, có thể duy trì nhiệt độ cột ở $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.10.4 **Cột pha đảo**, PLRP-S, 300 Å⁴⁾, cỡ hạt 3 μm , kích thước 150 mm x 2 mm.
- 5.10.5 **Detector phổ khối lượng**, có thể vận hành theo chế độ ion ESI+ ở m/z 839,6.
- 5.11 **Thiết bị sắc kí lỏng-phổ khối lượng hai lần (LC-MS-MS) (tùy chọn)**.
- 5.11.1 **Bộ bơm gradient rửa giải**, có thể bơm với tốc độ 0,2 ml/min.
- 5.11.2 **Bộ bơm mẫu thủ công hoặc tự động**, có thể bơm được các thể tích 10 μl .
- 5.11.3 **Bộ phận làm nóng cột**, có thể duy trì nhiệt độ cột ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.11.4 **Cột dùng cho sắc ký pha đảo**, PLRP-S, 300 Å⁴⁾, cỡ hạt 3 μm , kích thước 150 mm x 2 mm.
- 5.11.5 **Detector phổ khối lượng**, có thể vận hành theo chế độ ion ESI+ MS-MS ở m/z 672/672, 672/811, 672/649, 840/840.
- 5.12 **Bình định mức một vạch**, dung tích 100 ml, loại A quy định trong TCVN 7153 (ISO 1042)^[2].

6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện, không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)^[1].

⁴⁾ PLRP-S, 300 Å là sản phẩm của Polymer Lab Ltd. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm nêu trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 10137:2013

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn nisin A

7.1.1 Dung dịch chuẩn gốc nisin A, $\rho_{nA} = 100 \text{ mg/l}$

Cân 10,00 mg nisin A (4.8), chính xác đến 0,01 mg, cho vào bình định mức một vạch 100 ml (5.12). Thêm dung dịch axit formic (4.4) đến vạch và trộn.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc này trong ngày sử dụng.

7.1.2 Dung dịch chuẩn làm việc nisin A, $\rho_{nA} = 300 \text{ } \mu\text{g/l}$

Dùng pipet lấy 300 μl dung dịch chuẩn gốc nisin A (7.1.1) cho vào bình định mức một vạch 100 ml (5.12). Thêm dung dịch đệm BSA (4.2) đến vạch và trộn. Dung dịch chuẩn làm việc thu được chứa 300 μg nisin A trên lít.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc này trong ngày sử dụng.

7.2 Chiết phần mẫu thử

Trước khi cân, nghiền mẫu phomat bằng máy nghiền (5.9).

Cân 2,50 g mẫu thử, chính xác đến 0,01 g, cho vào bình định mức một vạch 100 ml (5.12). Thêm 70 ml nước và 0,5 ml axit formic (4.3) và trộn.

Đặt bình định mức trong nồi cách thủy (5.7) ở 80 °C và lắc trong 30 min hoặc đặt bình trong bể siêu âm (5.8) ở 80 °C và lắc trong 10 min. Sau khi để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm nước đến vạch và trộn.

CHÚ THÍCH: Phomat mềm có thể nghiền được sau khi làm lạnh đông.

7.3 Lọc phần mẫu thử bằng màng UF

Dùng pipet lấy khoảng 1,5 ml chất chiết cho vào ống nghiệm 1,5 ml (ví dụ: ống Eppendorf) và li tâm bằng máy li tâm siêu tốc (5.2) ở 20 800g trong 10 min.

Xác định khối lượng bì của bình thu nhận với màng siêu lọc (5.3) trên cân phân tích (5.6). Đặt màng siêu lọc lên bình thu nhận và chỉnh cân phân tích về zero.

Lọc từ 0,6 ml đến 0,7 ml dịch chiết đã li tâm qua bộ lọc màng (5.4) vào màng lọc siêu lọc đã cân.

Cân lượng dịch chiết trên màng siêu lọc bằng cân phân tích. Cho li tâm màng siêu lọc trong máy li tâm phòng thử nghiệm (5.1) ở 3 000g trong 45 min. Xác định tổng khối lượng của bình chứa bộ lọc.

Bổ sung nước vào phần dịch lọc đến khối lượng ban đầu đã cân trong khi hiệu chỉnh về sự phân bố peptid trong màng siêu lọc.

CHÚ THÍCH: Thông thường, lượng nước được thêm vào xấp xỉ 15 % dịch chiết được dùng để li tâm. Tham khảo thêm thông tin của nhà sản xuất màng lọc.

Chuyển dịch lọc thu được vào lọ HPLC và đo.

7.4 Xác định bằng LC-MS và LC-MS-MS

7.4.1 Dung môi rửa giải cho LC-MS

Sử dụng các dung môi rửa giải sau đây:

Chất rửa giải A: dùng pipet lấy 2,5 ml axit formic (4.3) và 0,05 ml axit trifloaxetic (4.5) cho vào 500 ml nước.

Chất rửa giải B: trộn 350 ml axetonitril (4.6) với 150 ml nước, 2,5 ml axit formic (4.3) và 0,05 ml axit trifloaxetic (4.5).

7.4.2 Dung môi rửa giải dùng cho LC-MS-MS

Có thể chọn các dung môi rửa giải sau đây:

Chất rửa giải C: trộn 50 ml axetonitril (4.6) với 450 ml nước và 2,5 ml axit formic (4.3).

Chất rửa giải D: trộn 400 ml axetonitril (4.6) với 100 ml nước và 2,5 ml axit formic (4.3).

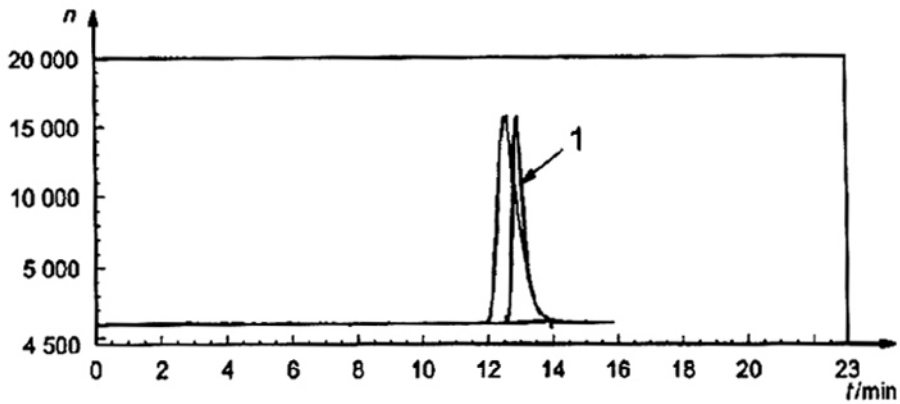
7.4.3 Các điều kiện LC-MC và LC-MS-MS

Bảng 1 – Các điều kiện thích hợp

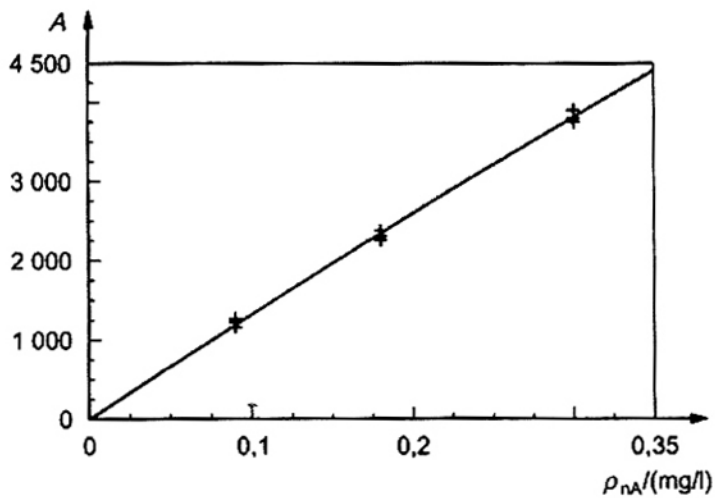
Điều kiện	LC-MS			LC-MS-MS		
Thể tích bơm, μl	5			10		
Cột	PLRP-S ⁴⁾ 150 mm x 2 mm, 300 Å, 3 μm					
Nhiệt độ cột, $^{\circ}\text{C}$	40			30		
Detector khối lượng	Chế độ ion ESI+ Nhiệt độ mẫu 500 $^{\circ}\text{C}$ Điện áp 3,5 kV			Chế độ ion ESI+ Nitơ 8 l/min 350 $^{\circ}\text{C}$		
Phát hiện	m/z 839,6 ^{a)} span 0,5 thời gian dừng 1,0 min Cone 60 V			m/z Q1/ m/z Q3, 672/672 ^{b)} 672/811 ^{c)} (chuyển dịch chọn lọc nhất) 672/649 840/840 ^{b)}		
Tốc độ dòng, ml/min	0,25			0,20		
Thời gian lưu nisin A, min	~ 13			~ 5,7		
Gradient ^{d)}	Min.	%A	%B	Min.	%C	%D
	0	70	30	0	85	15
	13	50	50	1	85	15
	13,1	0	100	4	65	35
	17	0	100	6	65	35
	17,1	70	30	9	10	90
	23	70	30	12	10	90
				12,1	85	15
			16	85	15	
Về tổng thể, các thông số MS hoặc MS-MS là tối hạn và phải được kiểm soát chặt để đạt được độ nhạy và độ lặp lại vì có nhiều yếu tố phân tích khác nhau. Tối ưu hóa thiết bị để tạo ra tín hiệu cao nhất đối với nisin.						
^{a)} Độ nhạy cao hơn đối với các ion m/z 1 118,9+3 ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$) hoặc m/z 1 677,7+2 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$) đã quan sát được trong nhiều phòng thử nghiệm và có thể sử dụng thay thế nhau.						
^{b)} Tương tự tín hiệu m/z , thiết bị MS-MS cần được tối ưu hóa.						
^{c)} Do sự trao đổi ion thấp hơn nên tín hiệu m/z cao hơn có thể xuất hiện trong Q3.						
^{d)} Gradient rửa giải có thể cần được điều chỉnh để đạt được độ phân giải như trong Hình 1.						

7.4.4 Hiệu chuẩn LC-MS

Một ví dụ về sắc ký đồ của dung dịch chuẩn nisin A được nêu trong Hình 1. Sắc ký đồ này thu được bằng cách đo dung dịch chuẩn làm việc nisin A (7.1.2) ba lần. Ví dụ cho thấy hiệu chuẩn tuyến tính đối với toàn bộ dải đo (xem Hình 2). Tuy nhiên, độ tuyến tính của thiết bị cần được kiểm tra định kỳ.

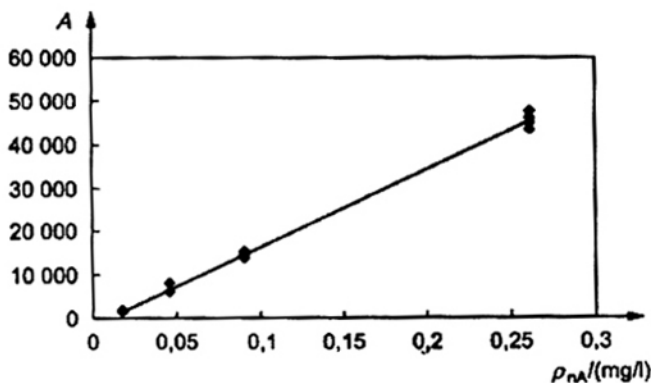
**CHÚ DẪN:** n số đếm t thời gian

1 nisin A

SIM_01 60,0 dương; 839,34 đến 839,84 m/z .**Hình 1 – Dung dịch chuẩn làm việc nisin A được phân tích bằng LC-MS****CHÚ DẪN:** A diện tích (thời gian giữa các lần đếm, tính bằng phút) ρ_{nA} nồng độ khối lượng nisin A $[\text{nisin} + 4\text{H}]^{4+}$ ngoài SIM_01**Hình 2 – Hiệu chuẩn nisin A ở m/z 839,6 bằng LC-MS**

7.4.5 Hiệu chuẩn LC-MS-MS

Sự chuyển dịch m/z 672 đến 811 là nhạy nhất đối với nisin A, do đó, cần được hiệu chuẩn. Hình 3 cho thấy kết quả hồi quy tuyến tính thu được sử dụng bốn nồng độ.



CHÚ DẪN:

A diện tích

ρ_{nA} nồng độ khối lượng nisin A

$$A = 180\,342\rho_{nA} - 1\,621,2$$

$$r^2_{\rho_{nA}} = 0,996\,7$$

Hình 3 – Hiệu chuẩn nisin A bằng LC-MS-MS

7.4.6 Xác định hàm lượng nisin A trong mẫu

Luôn luôn thực hiện quy trình hiệu chuẩn một điểm trong mỗi dãy phân tích. Nếu cần, hiệu chuẩn lại hệ thống và kiểm tra mẫu trắng thuốc thử.

8 Tính và biểu thị kết quả

8.1 Tính kết quả

Tính hàm lượng nisin A có trong mẫu thử, w_{nA} , bằng miligam nisin A trên kilogam mẫu thử, sử dụng công thức sau:

$$w_{nA} = \frac{H_t \times \rho_{nA,s} \times V_t}{H_s \times m_t}$$

Trong đó:

ρ_{nA} nồng độ của dung dịch chuẩn làm việc, tính bằng miligam trên lít (mg/l);

H_i là chiều cao pic hoặc diện tích pic của dung dịch thử;

H_s là chiều cao pic hoặc diện tích pic của dung chuẩn làm việc;

m_i là khối lượng phomat được dùng để chuẩn bị dung dịch thử, tính bằng gam (g);

V_i là thể tích dung dịch thử, tính bằng mililit (ml);

8.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến một chữ số thập phân. Biểu thị các kết quả thấp hơn 1 mg/kg là "nhỏ hơn 1 mg/kg".

9 Độ chụm

Tiêu chuẩn này chưa được đánh giá liên phòng thử nghiệm. Do đó, chưa quy định giới hạn phát hiện của phương pháp.

Theo kinh nghiệm, giới hạn thấp nhất về định lượng nisin A là 1 mg/kg.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm ít nhất phải bao gồm các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các thao tác chi tiết không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được hoặc kết quả cuối cùng nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
- [2] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*
- [3] Kuze, N., Takashi, M. Analysis of nisin in processed cheese using mass spectrometry coupled with liquid chromatography. *Foods Food Ingredients J. Jpn.* 2003, 208,12, pp. 1032-1036
- [4] Berger, T., BOTikofer, U., Muralt, L, Rieder, K., Rhyn, P., ZOst, C. Bestimmung von Nisin A in Kase mit LC/MS und LC/MS-MS [Determination of nisin A in cheese with LC-MS and LC-MS-MS]. *Mitt. Lebensm.Hyg.* 2005, 96, pp. 336-350. Available (2009-10-16) at: http://www.agroscope.admin.ch/data/publikationen/pub_BerqerT_2005_15903.pdf
-