

- Cân phân tích, độ chính xác 0.1 mg
- Dụng cụ thủy tinh các loại
- Bồn siêu âm
- Màng lọc Nilon 13 mm, 0,45 μm
- Bình định mức: 10mL, 25mL
- Pipet bầu: 1mL, 2mL

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.076 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 3/6
---	---------------------	---

- h. Vial 1.5 mL
- i. Kim pha chuẩn thể tích 0.5mL, 1mL
- j. Micropipet 200 μ L và 1000 μ L

2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống HPLC/PDA của Thermo: gồm pump, đầu dò PDA, autosampler hoặc tương đương.
- Cột sắc ký lỏng pha đảo pha đảo C18 250mm x 4.6mm, kích thước hạt 5 μ m (hoặc tương đương).

II. Hóa chất và chất chuẩn

1. Hóa chất

- ✓ Nước cất 2 lần khử ion.
- ✓ MeOH
- ✓ H₃PO₄ , TKPT
- ✓ ACN
- ✓ MgSO₄ khan, TKPT

2. Pha động chạy máy:

MeOH: H₂O(pH=3.5) =35:65, đánh siêu âm loại bọt khí 5 phút trước khi chạy máy.

3. Chất chuẩn

Gibberellic acid (Sigma-Aldrich)

3.1 Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác khoảng 10mg (a) chuẩn vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng MeOH. Công thức tổng quát để tính nồng độ chuẩn gốc:

$$C(\text{ppm}) = \frac{m * \% \text{ pure}}{V * 100} * 1000$$

a: khối lượng chuẩn (mg)

V: thể tích bình định mức (mL)

Pure: độ tinh khiết của chất chuẩn, %

3.2 Dung dịch chuẩn trung gian 100mg/L

- Rút 1 mL của dung dịch chuẩn gốc 1000mg/L cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng pha động được chuẩn có nồng độ 50ppm.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.076 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 4/6
---	---------------------	---

3.3 Dung dịch chuẩn làm việc

Tiến hành pha loãng trung gian trong nước để được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ từ 0.5 đến 50 mg/L theo bảng sau:

C, ppm dãy chuẩn	50	20	10	5	2	1	0.5
C std trung gian, ppm	100				20	10	5
V, ml std trung gian	0.5	0.2	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1
Vdm, mL	1						
Dung môi	H ₂ O DI						

Lưu ý: Chuẩn làm việc được sử dụng trong ngày

III. Kiểm soát QA/QC

- Mẫu lặp
- Mẫu spike trên nền mẫu hoặc là mẫu QC do trưởng nhóm chỉ định.

IV. Xử lý mẫu:

1. Chuẩn bị mẫu

Mẫu được bảo quản nơi thoáng mát. Mẫu phải được xay mịn trước khi tiến hành phân tích.

2. Phương pháp tiến hành

Cân chính xác khoảng 2g mẫu vào ống ly tâm 50mL, thêm vào 8mL nước cất, kiểm tra và chỉnh về môi trường axit (nếu cần) bằng HCl (1:3), đánh siêu âm 10 phút, thêm 10mL Acetonitril, lắc mạnh 3 phút, thêm 4g MgSO₄ khan, lắc mạnh 3 phút, đem ly tâm ở 3000vòng/phút trong 3 phút. Lấy 3mL của lớp trên cho vào ống ly tâm 15mL đã chứa sẵn 0.45g MgSO₄ khan và 0.075g C18, vortex kỹ, ly tâm 3000 vòng/phút trong 3 phút. Lấy 2mL của dung dịch sau khi clean up cho vào bình cầu, cô quay, hòa tan lại bằng 2ml pha động, vortex, lọc qua màng lọc 0.45µm vào vial để phân tích trên HPLC-UV. Hoặc pha loãng với hệ số phù hợp sao cho cho nồng độ mẫu nằm trong dãy chuẩn.

V. Phân tích:

1. Thông số thiết bị

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.076 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/6
---	---------------------	---

- Cột sắc ký: cột C_{18} 250mm x 4.6mm, kích thước hạt 5 μ m. (hoặc tương đương)
- Thể tích tiêm: 20 μ l
- Pha động: MeOH: H₂O(pH=3.5) =35:65
- Tốc độ : 0.7 mL/phút
- Bước sóng: 210nm

Lưu ý: Với các cột sắc ký lỏng C_{18} phân cực khác nhau (chiều dài, đường kính cột, kích cỡ hạt...), tỉ lệ thành phần pha động hay tốc độ dòng có thể thay đổi.

2. Trình tự của quá trình tiêm mẫu trên thiết bị phân tích

Sau khi hệ thống cân bằng (khoảng 30 phút), các mẫu sẽ được phân tích theo trình tự sau:

- Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao;
- Mobile phase
- Mẫu cần kiểm nghiệm.
- Mẫu spike
- 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. Nếu mẫu không phát hiện có thể không cần dựng đường chuẩn mà chỉ cần chạy 1 điểm chuẩn, mẫu và mẫu spike tại ngay mức LOQ.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích thu được với nồng độ tương ứng. Kết quả chất cần phân tích trong mẫu được tính toán thông qua diện tích tương ứng so với đường chuẩn, theo công thức sau:

$$C = \left(\frac{C_0 \times V}{m} \right) \times f$$

- C: nồng độ GA₃ trong mẫu, ppm
- C₀: nồng độ GA₃ trong dịch chiết tính theo đường chuẩn, mg/L
- V: Thể tích chiết, mL
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng cân, g

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- 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.
- Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá $\pm 10\%$ giá trị thật.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.076 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 6/6
---	---------------------	---

3. Mẫu thêm chuẩn được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≥ 5 mẫu). Hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn phải phù hợp theo bảng 1:

4. Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≥ 5 mẫu). Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại phải phù hợp theo bảng 1:

Bảng 1: Giới hạn cho phép của hiệu suất thu hồi và độ lặp lại ở các khoảng nồng độ khác nhau

ST T	Hàm lượng	Đơn vị	Độ thu hồi, %	RSD, %
1	25-200	ppm	81-92	≤ 5.16
2	1	%	90	≤ 2.83

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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