

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.053 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/11/2017 Trang: 1/6
--	--------------------------------	---

**ĐỊNH LƯỢNG ETHOXYQUIN TRONG THỦY SẢN VÀ SẢN PHẨM
THỦY SẢN BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHEP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA
TỬ 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		Thay đổi Header	02/11/2017
		Bổ sung qui định thực hiện QA/QC	

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng ethoxyquin trong thủy sản và sản phẩm thủy sản bằng sắc kí lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).

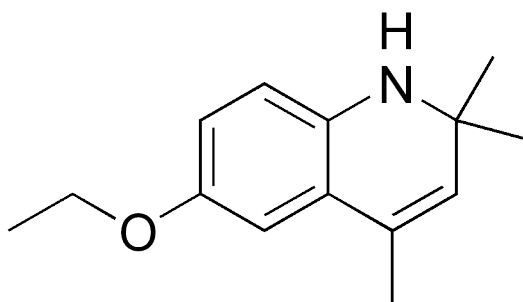
Giới hạn định lượng ethoxyquin của phương pháp là 2 ppb

II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng theo: AOAC 2007.01 (2011)

III. Nguyên tắc

Công thức:



Mw: 217.31g/mol

Mẫu được hòa tan trong acetonitile, ethoxyquin được định tính và định lượng trên 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 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

- Cân phân tích, độ chính xác 0,01 mg và 0.1 mg
- Máy ly tâm
- Máy lắc Vortex.
- Bộ lọc dung môi tương thích với màng lọc 0.45 μ m
- Màng lọc PTFE, 13 mm, 0,45 μ m

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.053 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/11/2017 Trang: 3/6
---	------------------------	---

- Ống ly tâm 15mL có nắp đậy
- Bình định mức (CCX A): 10mL, 25 mL
- Pipet vạch (CCX A): 0.1mL, 0.5mL, 1mL
- Pipet bầu (CCX A): 1mL, 2mL, 5mL
- Dụng cụ thủy tinh các loại

2. Hệ thống LC/MS/MS

- 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: C₁₈, 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
- Acetonitrile, HPLC
- HCOOH, HPLC
- NH₃, HPLC
- CH₃COOH, AR

2. Dung dịch pha động:

- Dung dịch X: Pha dung dịch chứa 0.75ml NH₃, 5ml HCOOH và thêm nước cất cho đủ 500ml.
- Dung dịch acetonitrile (đệm HCOONH₄): Thêm 100 mL dung dịch X, 90ml nước cất khử ion và thêm acetonitrile vào thành 1lít. Đánh siêu âm 15 phút để loại bọt khí trước khi sử dụng.
- Dung dịch H₂O (đệm HCOONH₄): Thêm 100 mL dung dịch X, 90ml acetonitrile và thêm nước cất khử ion vào thành 1 lít. Đánh siêu âm 15 phút để loại bọt khí trước khi sử dụng.

3. Chất chuẩn

a. Chất chuẩn

Ethoxyquin (% - Fluka)

b. Dung dịch chuẩn

- Dung dịch chuẩn gốc ethoxyquin: (Hạn sử dụng 01 năm, bảo quản lọ nâu ngăn đá): Cân khoảng 10 mg (chính xác 0.01 mg) chuẩn ethoxyquin vào các bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril. Ghi nhận khối lượng đã cân và lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn.
- b. Dung dịch chuẩn trung gian: (Hạn dùng 03 tháng, bảo quản lọ nâu ngăn đá)
 - 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 acetonitrile.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.053 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 02/11/2017 Trang: 4/6
--	--------------------------------	---

- o Dung dịch chuẩn 2.0 mg/L: Rút 0.5 mL chuẩn 40 mg/L vào bình 10 mL, định mức đến vạch bằng hỗn hợp pha động acetonitrile:H₂O (7:3).
- o Dung dịch chuẩn 100 ppb: Rút 0.5 ml chuẩn 2.0 mg/L vào bình 10 ml, định mức lên bằng hỗn hợp pha động acetonitrile/H₂O (7/3).
- c. Dung dịch chuẩn làm việc: (pha mới mỗi khi phân tích mẫu)

d. Dãy chuẩn được pha từ dung dịch chuẩn 100 (µg/L)				
No.	V _{Rút chuẩn} mL	V _{Định mức} mL	C ₀ (µg/L)	Dụng cụ pha chuẩn
Std 01	0.025	10.0	0.25	Micropipete 200µL
Std 02	0.05		0.5	
Std 03	0.1		1.0	
Std 04	0.2		2.0	
Std 05	0.5		5.0	Pipet 2ml
Std 06	1.0		10.0	
Std 07	2.0		20.0	

Bảo quản: Bảo quản dung dịch chuẩn gốc ở 4°C, trong lọ tối, sử dụng trong 1 năm. Bảo quản dung dịch chuẩn làm việc ở 4°C, sử dụng trong 3 tháng.

Lưu ý: Việc cân chuẩn không thể chính xác khối lượng như trên vì vậy nhân viên pha chuẩn phải tính lại nồng độ chuẩn dựa trên khối lượng cân chuẩn thực tế.

III. Thực hiện QA/QC

- Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích phải thực hiện các công việc sau để bảo đảm QA/QC:
 - o Blank thuốc thử
 - o Blank matrix
 - o QC trên nền mẫu
 - o Mẫu được xử lý và phân tích theo mục B.IV.

IV. Thực hiện phân tích

1. Xử lý mẫu

- Cân vào ống tâm 50 ml 5 ± 0.1g mẫu đã đồng nhất và 0.02mg Ascorbic acid, sau đó thêm vào 5ml nước cất lắc đều cho mẫu tơi ra, dùng pipet thêm vào 10 ml Acetonitrile (1% Acetic acid) lắc mạnh trong 3 phút. Làm lạnh mẫu 30 phút trong tủ đá sau đó thêm vào hỗn hợp muối 4g MgSO₄ khan+1g CH₃COONa, lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm 3000 vòng/ phút. Rút 2ml lớp trên cho vào ống ly tâm 15ml có chứa

0.025mg PSA + 0.025mg C₁₈ + 0.15g MgSO₄ khan, vortex trong 1 phút, ly tâm sau đó pha loãng 10 lần trong ACN và lọc phần dung dịch qua màng lọc 0.45µm vào lọ phân tích vial và phân tích trên LC/MS/MS. Nếu mẫu có hàm lượng lớn, nồng độ ethoxyquin trong dịch chiết vượt ngoài khoảng nồng độ dãy chuẩn thì pha loãng dịch chiết bằng Acetonitrile.

2. Phân tích

a. Điều kiện LC

- Cột sắc ký: C₁₈, 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm (hoặc tương đương).
- Tốc độ dòng: 400 µL/phút
- Thể tích tiêm: 20µL
- Pha động: Pha động:

A: Acetonitril (đệm HCOONH₄).

B: : H₂O(đệm HCOONH₄).

Thời gian (min)	Tốc độ dòng (µL/min)	A (%)	B (%)
0	400	70	30
1		70	30
1.5		100	0
3.5		100	0
4		70	30
6		70	30

Lưu ý: Với các cột sắc ký lỏng C₁₈ 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.

b. Điều kiện MS

- Interface: H-ESI (+)
- Capillary temp: 350°C
- Vaporizer temp: 400°C
- Electron Spray: 3000mV
- CID: 1.2 mTorr
- Sheath gas: 40
- Aux. gas: 10

Chất đo đạt	Ion mẹ	Ion định lượng (CE)	Ion xác định (CE)
Ethoxyquine	218.20	174 (32)	148 (30) ^(#) , 202 (30), 188 (32)

CE-Collision Energy: Năng lượng bắn phá

^(#)Nếu nền mẫu có sự cản nhiễu ion 174 thì dùng ion 148 để định lượng

3. Trình tự tiêm 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;
- Mẫu cần kiểm nghiệm.

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 diện tích pic ion định lượng ethoxyquin (m/z 174 hoặc m/z 148) với nồng độ tương ứng.

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

- Hàm lượng ethoxyquin 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 ethoxyquin có trong mẫu kiểm, mg/kg
 - C_0 : nồng độ ethoxyquin trong dịch chiết tính từ đường chuẩn, $\mu\text{g/L}$
 - V_{dm} : 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. ĐẢM BẢO 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.
- Tỷ số ion của ion kém nhạy hơn so với ion nhạy nhất trong mẫu dương tính:

Tỷ số cường độ ion đối với ion base peak	Mức sai biệt tối đa cho phép
>50%	$\pm 20\%$
>20 đến 50%	$\pm 25\%$
>10 đến 20%	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$

- 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 $\pm 5\%$.
- Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá $\pm 10\%$ giá trị thật.

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: