

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi

## **A. TỔNG QUAN**

### **I. Phạm vi áp dụng.**

- Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng tinopal trong sản phẩm từ gạo như bún, bánh tráng, phở,....
- Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0.01 mg/kg.

### **II. Tài liệu tham khảo.**

- Food Additives & Contaminants: Vol. 31, No. 9, 1451–1459.: Determination of Tinopal CBS-X in rice papers and rice noodles using HPLC with fluorescence detection and LC-MS/MS

### **III. Nguyên tắc.**

- Mẫu sau khi được đồng nhất sẽ được chiết siêu âm với dung môi MeOH và nước ở nhiệt độ cao. Sau đó phân tích trên máy LC/MS/MS.

### **VI. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.**

- Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động trong phòng thí nghiệm.
- Báo cáo tất cả các vấn đề gây tổn thương tới con người và các sự cố gây đổ vỡ hóa chất.
- Dung môi hữu cơ ACN và acetic acid được thu hồi vào trong thùng chứa có dán nhãn dung môi thải.

## **B. PHÂN TÍCH**

### **I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.**

#### **1. Thiết bị cơ bản.**

- Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg
- Bình định mức 5ml, 25ml, 50 ml
- Máy ly tâm cho ống 50ml
- Micropipet các loại 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L.
- Pipet thủy tinh

#### **2. Thiết bị phân tích**

- Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ ba tứ cực TSQ7000 Quantum Ultra hoặc tương đương.

### **II. Hoá chất và chất chuẩn.**

#### **1. Hoá chất.**

- Nước cất khử ion (nước DI)
- Methanol, Acetonitril, Acid acetic của Fisher hoặc tương đương
- 75% Methanol: Pha 750 ml Methanol vào 250 ml DI.

## 2. **Chất chuẩn.**

### **a. Chuẩn gốc:**

- Chuẩn Tinopal của Dr. Ehrenstofer hoặc tương đương.
- Bảo quản và lưu trữ: Các chuẩn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

### **b. Dung dịch chuẩn gốc**

- Dung dịch chuẩn gốc 1000 µg/mL: Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn vào bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng MeOH:DI (1:1). Lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Khi đó nồng độ chất chuẩn trong dung dịch được tính được theo công thức sau:

$$C (mg/L) = \frac{m (mg) \times 1000}{V (ml)} \times P$$

Trong đó: C là nồng độ chất chuẩn có trong dung dịch (µg/mL).

m là khối lượng cân của chất chuẩn (mg).

V là thể tích định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

- Bảo quản và lưu trữ: Dung dịch chuẩn gốc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 8°C), sử dụng trong thời gian 1 năm.

### **c. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc**

- Chuẩn 10 µg/mL: Từ dung dịch gốc trên (1000 µg/mL) tương ứng lấy 0.1 mL cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với MeOH:DI (1:1).
- Chuẩn 1.0 µg/mL: Rút 1.0 mL dung dịch chuẩn 10 µg/mL ở trên vào bình mức 10 mL, định mức tới vạch bằng MeOH:DI (1:1).

- Bảo quản và lưu trữ: Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4-8°C), sử dụng trong thời gian 6 tháng.
- Pha dãy chuẩn làm việc:
  - + Định tính: Nếu mẫu không phát hiện chỉ cần chạy một điểm chuẩn định tính.
  - + Định lượng:

V (μL) Tinopal 1.0 μg/mL	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
	20	50	10	200	500	
C (μg/L)	2	5	10	20	50	
V (μL) MeOH:Di (8:2)	Định mức 10ml					

- Bảo quản và lưu trữ: Dãy chuẩn làm việc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 8°C), sử dụng trong thời gian 3 tháng.

### III. Kiểm soát QA/QC.

- Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện mẫu:
  - o Blank
  - o QC: Mẫu spike trên nền mẫu Blank matrix

## VI. Phân tích mẫu

### 1. Xử lý mẫu.

- Cân  $2 \pm 0.02$  g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL, thêm 20ml MeOH 75%. Vortex đều mẫu 3 phút. Đun mẫu ở 80°C trong 30 phút (10 phút lắc đều mẫu 1 lần)
- Để mẫu nguội về nhiệt độ phòng. Lọc vào vial và phân tích trên LC/MS/MS

- Mẫu QC-spike: Spike chuẩn trên nền mẫu.

## 2. Phân tích

### a. Điều kiện LC

- Cột C18 (150 x 2.1 mm, kích thước hạt 5µm)
- Pha động: MeOH (0.1% HCO<sub>2</sub>H) và DI (0.1% HCO<sub>2</sub>H +0.1% HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>)
- Tốc độ dòng: 400 µl/phút
- Thể tích tiêm: 20µL

Thời gian, phút	MeOH (0.1% HCO <sub>2</sub> H)	DI (0.1% HCO <sub>2</sub> H +0.1% HCO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> )
0	10	90
0.5	10	90
8	100	0
11.5	100	0
11.6	10	90
13	10	90

### b. Điều kiện MS

- Nguồn ion hóa: ESI(+)
- Nhiệt độ capillary: 350°C
- Sheath gas: 50 abs , Aux gas: 5 abs
- Spray voltage: 4000V
- CID gas: 1.3mT

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

- Dung môi trắng → Các chuẩn có nồng độ từ thấp tới cao → Dung môi trắng → Mẫu cần kiểm nghiệm → Mẫu thêm chuẩn → Chuẩn kiểm tra.

## C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

### 1. Công thức tính toán:

- Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỷ lệ diện tích của chuẩn và nồng độ chuẩn.

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

- o C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/mL
- o C<sub>o</sub>: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/mL
- o V<sub>extract</sub>: Thể tích dịch chiết
- o f: hệ số pha loãng
- o m: khối lượng cân (g)

## 2. Ion định lượng, định tính

Hợp chất	Ion mẹ	Ion định tính	C <sub>E</sub> 1 (µg/mL)	Ion định lượng	C <sub>E</sub> 2 (µg/mL)
Tinopal	258.1	226.1	20	371.1	36

### D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- Độ thụ tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với  $R^2 \geq 0.99$
- Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
- Tỷ số ion: Cường độ tương đối của ion định tính so với ion định lượng phải nằm trong khoảng cho phép

Cường độ tương đối (so với ion định lượng)	Sai số cho phép
>50%	±20%
20-50%	±25%
10%-20%	±30%
<10%	±50%

- Độ lệch của thời gian lưu không quá 2.5% cho LC
- Độ lệch của dung dịch chuẩn kiểm tra không quá 15%

### E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu: BM.15.04a, BM.15.06

