

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.051 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: 1/7
--	----------------------------------	---

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CARBENDAZIME TRONG MẬT ONG
BẰNG HỆ THỐNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ KHỐI
PHỔ BA TỬ CỰC (LC/MS/MS)**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
TỪ HIẾU HẬU	DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI	TRẦN THÁI VŨ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	30/03/2018

A. TỔNG QUAN

I. PHẠM VI ÁP DỤNG

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng carbendazim trong nền mẫu mật ong. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 1µg/kg.

II. TÀI LIỆU THAM KHẢO

AOAC Official Method 2007.01- Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.

III. NGUYÊN TẮC

Mẫu sau khi được đồng nhất sẽ được chiết với Acetonitril/đệm acetate và magie sulfat theo AOAC 2007.01. Dịch chiết được pha loãng trong nước cất và được xác định trên máy LC/MS/MS.

IV. THÔNG TIN AN TOÀN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động phòng thí nghiệm

Sử dụng tủ hút, kính bảo hộ và găng tay khi cần thiết.

Các dung môi hữu cơ và các chất thải như Acetonitril (ACN) phải được thu hồi vào các thùng chứa có dán nhãn và lưu giữ như các hóa chất thải độc hại.

B. PHÂN TÍCH

I. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ PHÂN TÍCH HÓA CHẤT

1. Dụng cụ và thiết bị cơ bản

Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg,

Máy li tâm 50ml và 15mL

Bình định mức 10 mL

Micropipet các loại 20 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL

Ống ly tâm 50 mL, 15 mL.

Màng lọc 0.45µm, vial và xy lạnh.

2. Thiết bị phân tích

Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ ba tứ cực TSQ7000 hoặc tương đương

II. HÓA CHẤT VÀ CHẤT CHUẨN

1. Hóa chất

Nước cất khử ion.

Acetonitril, Acid acetic, Dimetilformamide - J.Backer hoặc tương đương

Acetonitril 1% acid acetic: Pha 40 ml Acid acetic vào 4 L Acetonitril.

Hỗn hợp muối magie sulfat khan 4g và natri acetat 1g

2. Chất chuẩn

Carbendazim, Carbendazim-D3 của Dr. Ehrenstofer hoặc tương đương.

Dung dịch chuẩn Carbendazim 1000 mg/kg: cân chính xác khoảng 10 mg vào bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng Dimetilformamide.

Dung dịch nội chuẩn Carbendazim-D3 500 mg/kg: cân khoảng 5mg cho vào bình định mức 10ml, hoà tan và định mức đến vạch bằng Dimetilformamide.

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 (mg/L).

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

V là thể tích định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

Dung dịch chuẩn carbendazime 10 mg/kg: Rút 0.1mL dung dịch chuẩn 1000 mg/kg cho vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch bằng acetonitrile.

Dung dịch chuẩn carbendazime 500 µg/kg: Rút 0.5mL dung dịch chuẩn 10 mg/kg cho vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch bằng acetonitrile.

Dung dịch nội chuẩn Carbendazim-D3 500 µg/kg: Rút 0.1 mL dung dịch nội chuẩn Carbendazim-D3 500 mg/kg vào bình định mức 100mL, định mức đến vạch bằng acetonitrile.

Pha các dung dịch dãy chuẩn có nồng độ theo bảng sau:

Nồng độ dãy chuẩn (µg/kg)	0.1	0.2	0.5	1	2.5	5	10
Thể tích dung dịch chuẩn trung gian 100 µg/kg (µL)	10	20	50	100	250	500	1000
Carbendazim-D3 500 µg/kg (µL)	20						
Thể tích định mức ACN:DI (1:9) (mL)	10						

Bảo quản và lưu trữ:

Dung dịch chuẩn gốc được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, lưu ở -18°C, sử dụng trong thời gian 3 năm theo SANTE/11945/2015.

Dung dịch chuẩn trung gian 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. Dung dịch đường chuẩn được sử dụng trong vòng 3 tháng.

III. KIỂM SOÁT QA/QC

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích.

Mẫu Blank matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.

Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu blank với nồng độ kiểm soát 10 µg/kg

1. Mẫu Blank matrix: Mẫu blank không phát hiện chất phân tích hoặc phát hiện ở nồng độ nhỏ hơn LOD

2. Mẫu thêm chuẩn (QC)

Tiến hành xử lý mẫu blank theo quy trình.

Nồng độ chuẩn thêm vào ở mức 10 µg/kg, khoảng 10 mẫu thông thường thì thực hiện kèm theo 1 mẫu QC.

Tính toán độ thu hồi theo phương trình

$$R(\%) = \frac{C_s - C}{S} \times 100$$

Trong đó:

R = Độ thu hồi

C_s = Nồng độ mẫu thêm chuẩn

C = Nồng độ của mẫu nền

S = Nồng độ của chất phân tích thêm vào mẫu

IV. XỬ LÝ MẪU

Lắc đều và cân 5 ± 0.05 g mẫu cho vào ống ly tâm 50 mL.

Thêm 100 μ L dung dịch nội chuẩn Carbendazime-D3 500 μ g/kg.

Thêm 100 μ L dung dịch chuẩn Carbendazime 500 μ g/kg đối với mẫu QC để kiểm tra hiệu suất thu hồi.

Thêm vào 10 mL DI và 10mL Acetonitrile (1% acid acetic), đậy nắp, lắc trong 2 phút.

Thêm tiếp vào hỗn hợp MgSO₄ (4 ± 0.2 g) và CH₃COONa (1 ± 0.1 g), lắc trong 2 phút. Ly tâm 3500 vòng /phút (3-5 phút).

Lấy 200 μ L lớp trên cho vào ống ly tâm 15mL.

Thêm 800 μ L nước cất khử ion, vortexed 30s. Lọc mẫu qua màng lọc 0.45 μ m vào vial 2mL.

Phân tích trên LC/MS/MS.

V. PHÂN TÍCH

1. Thông số thiết bị

Điều kiện phân tích LC/MS/MS

Cột phenomenex C18 (150 x 2.1 mm, 5 μ m).

Pha động: methanol (0.1% acid formic) và H₂O (0.1% acid formic+0.1% amonia).

Tốc độ dòng: 0.3ml/phút

Thể tích tiêm 20µL

🌈 Điều kiện MS

Nguồn ion hóa: ESI(+)

Nhiệt độ capillary: 350°C

Sheath gas: 40 psi , Aux gas: 4 abs

Spray voltage: 4.0kV

CID gas: 1.5mT

St t	Hợp chất	Ion mẹ	Q1 ion	Q3 ion
1	Carbendazim	192	160(25)	132(35)
2	Carbendazim D3	195	160(25)	132(25)

2. 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

Hàm lượng chất phân tích trong mẫu được tính toán theo công thức:

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

C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/kg. (ppb)

C_o : nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, $\mu\text{g/L}$

V_{extract} : thể tích dịch chiết

f: hệ số pha loãng

m: khối lượng cân, g

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với $R^2 \geq 0.99$

Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.

Độ lệch của thời gian lưu không quá 2.5%.

Độ lệch của dung dịch chuẩn kiểm tra không quá 15%

Cường độ tương đối của ion định tính so với ion định lượng phải nằm trong khoảng cho phép 30%.

Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart):
Giá trị hiệu suất thu hồi được ghi nhận vào control chart sau mỗi lô mẫu phân tích ở mức spike 10 $\mu\text{g/kg}$.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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