

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

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1			
2			
3			
4			

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng.

- Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng vitamin E trong thực phẩm và thực phẩm bổ sung vitamin.
- Giới hạn phát hiện của phương pháp là 10.0 mg/kg (trừ nền mẫu bột sữa là 1 mg/kg).

II. Tài liệu tham khảo.

- AOAC 992.03-1996(1997): Vitamin E activity (all-rac-tocopherol) in milk-based infant formula. Liquid chromatographic method

III. Nguyên tắc.

- Mẫu được sà phòng hóa với KOH. Sau đó được chiết với dung môi hexans và phân tích trên 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 hexan 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 10 ml, 50 ml
- Máy ly tâm cho ống 50ml
- Micropipet các loại 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L.
- Pipet thủy tinh
- Bếp đun

2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ ba tứ cực LC/MS/MS Quantum Ultra hoặc tương đương.

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá chất.

- Nước khử ion (nước DI), Hexan, MeOH của Fisher hoặc tương đương
- Ethanol 99% tinh khiết phân tích
- KOH và Na₂SO₄ khan tinh khiết phân tích
- KOH 50%: Pha 50 g KOH vào 50ml nước cất.

2. Chất chuẩn.

a. Chuẩn gốc:

- Chuẩn vitamin E của Sigma hoặc tương đương.
- Bảo quản và lưu trữ: Chuẩn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

b. Dung dịch chuẩn gốc

Các dung dịch chuẩn Vitamin E được chuẩn bị ngay trước khi thực hiện phân tích mẫu.

- Dung dịch chuẩn gốc 2000 µg/mL: Cân chính xác khoảng 20 mg chất chuẩn vào các bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng methanol.
- 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 (%).

- Chuẩn làm việc (100 µg/mL): Từ dung dịch gốc trên (2000 µg/mL) tương ứng lấy 0.5 mL cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với methanol.
- Pha dãy chuẩn làm việc:

V (µL) Vit E 100.0 µg/mL	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
	0	0.1	0.2	0	1.0	2.0

	· 0 5			· 5		
C (µg/mL)	0 · 5	1.0	2.0	5 · 0	10.0	20.0
V (µL) meoh	Định mức 10ml					

III. Kiểm soát QA/QC.

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

b. Mẫu thêm chuẩn (QC)

- Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn với nồng độ thêm là 10.0 mg/kg sau khi phân tích 20 mẫu hoặc một mẻ mẫu. Mẫu thêm chuẩn được thực hiện cùng lúc với lô mẫu phân tích.
- 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.

- Cân 2g mẫu cho vào ống ly tâm 50 mL. Thêm vào 20 mL ethanol 95% và 10 ml KOH 50%. Đun cách thủy ở 80°C trong 60 phút.
- Mẫu QC: Spike 0.2ml Vitamin E 100 mg/L vào 2 g mẫu trắng và thực hiện phân tích như mẫu thật.

- Để mẫu nguội về nhiệt độ phòng, cho thêm 10ml nước DI, lắc chiết mẫu với 10mL hexan (3 lần). Chuyển lớp hexan vào phễu chiết 250ml. Rửa lại với 20ml nước (3 lần).
- Chuyển toàn bộ lớp hexan vào bình cầu 100ml, cô quay đến khô và hòa tan lại với 2ml MeOH. Lọc vào vial và phân tích trên LC/MS/MS.

V. Phân tích

1. Điều kiện LC:

- Cột C-18 (150 x 2.1 mm, 5 μ m)
- Pha động: methanol (0.1% HCOOH) và H₂O khử ion (0.1% HCOONH₄)
- Tốc độ dòng: 350 μ l/phút
- Thể tích tiêm 20 μ L

Thời gian, phút	H ₂ O (0.1 %HCOONH ₄) %	MeOH (0.1 % HCOOH) %
0	90	10
1.5	90	10
5	20	80
8	10	90
9	0	100
11	0	100
11.5	90	10
13	90	10

2. Điều kiện MS:

- Nguồn ion hóa: ESI+
- Spray Voltage: 4kV
- Chế độ: SRM
- Capalary temperature: 350

Ion định lượng (m/z)	Ion định tính (m/z)	CE (eV)
431.4	137.2	49
431.4	165.2	25

3. Trình tự của quá trình tiêu 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.

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

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

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/mL
- C₀: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/mL
- V_{extract}: Thể tích dịch chiết
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng cân (g) hoặc thể tích mẫu (mL)

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với R² ≥ 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 sai số trong khoảng 30%
- Độ lệch của thời gian lưu không quá 2.5%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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