

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.309 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: Trang: 2/6
--	----------------------------	--

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

- ✓ Phương pháp này được áp dụng xác định dư lượng Brilliant green trong thủy sản bằng sắc kí lỏng ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực (gọi tắt là LC/MS/MS).
- ✓ Giới hạn của phương pháp:

Chất phân tích	LOD, µg/kg	LOQ, µg/kg
Brilliant green	0.3	1.0

II. Tài liệu tham khảo

- ✓ BS EN 15662 (2008)

III. Nguyên tắc:

- ✓ Dư lượng Brilliant green trong mẫu sẽ được chiết lên Acetonitrille. Cô quay, định mức lại trong pha động, sau đó được định tính và định lượng bằng thiết bị LC/MS/MS.

IV. Thông tin an toàn Phòng thí 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 hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. Dụng cụ và thiết bị

1. Thiết bị cơ bản

- ✓ Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg.
- ✓ Cân kỹ thuật, độ chính xác 1mg.
- ✓ Máy ly tâm
- ✓ Máy lắc Vortex.
- ✓ Màng lọc PTFE, 13mm, 0,45µm
- ✓ Ống ly tâm 50mL, 15mL, polypropylen, có nắp đậy
- ✓ Bột SPE C18.
- ✓ Bột PSA
- ✓ Bình định mức: 10mL, 25mL
- ✓ Pipet: 1mL, 2mL
- ✓ Dụng cụ thủy tinh các loại: becher, bình cầu 100mL

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.309 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: Trang: 3/6
--	----------------------------	--

- ✓ Bộ cô quay chân không.

2. Hệ thống LC/MS/MS

- ✓ Hệ thống sắc kí lỏng: Hệ thống LC/MS/MS bao gồm Accela 1250 Pump, Autosampler Accela và đầu dò khối phổ 3 tứ cực TSQ Quantum Ultra.
- ✓ Cột sắc kí lỏng pha đảo C₁₈: Supelco Ascentis C18 5µm/2.1µm hoặc tương đương.

II. Hóa chất và Chất chuẩn

1. Hóa chất

- ✓ Nước cất 2 lần khử ion
- ✓ Acetonitril HPLC
- ✓ Methanol, HPLC.
- ✓ NH₃, Merck
- ✓ HCOOH, Merck.
- ✓ Ammonium Acetate, Merck

2. Dung dịch thử

Dung dịch pha động

A: H₂O 0.1% formic acid

B: Acetonitrille 0.1% formic acid

3. Chất chuẩn

a. Chất chuẩn

- ✓ Brilliant green của Dr. Ehrentofer hoặc tương đương..

b. Dung dịch chuẩn 1000 mg/L

- **Nồng độ chất chuẩn gốc được tính theo công thức sau:**

Đối với chuẩn gốc là không phải dạng Base:

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{m}{V} \times \frac{M_{\text{Base}}}{M} \text{ pure}$$

Đối với chuẩn gốc là dạng Base:

$$C(\text{mg} / \text{L}) = \frac{m}{V} \times \text{pure}$$

Trong đó:

m: khối lượng chất chuẩn (mg)

M_{base}: khối lượng phân tử của chất chuẩn ở dạng cơ bản.

M: khối lượng phân tử ở dạng đóng gói (của nhà sản xuất).

V: Thể tích bình định mức pha chuẩn (L)

Pure: độ tinh khiết của chuẩn

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.309 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: Trang: 4/6
--	----------------------------	--

- Cân 10.0mg chuẩn rắn Brilliant green vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng Acetonitrile. Vortex cho chuẩn tan hết.
- Chuẩn được đựng trong ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ $\leq 0^{\circ}\text{C}$.
- Chuẩn sử dụng trong 01 năm.

c. Dung dịch chuẩn trung gian: (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 06 tháng)

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp 20 mg/L: Rút lần lượt 0.5 mL dung dịch chuẩn 1000 mg/L vào bình 25 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril. (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 06 tháng)
- ✓ Dung dịch chuẩn hỗn hợp 1 mg/L: Rút lần lượt 0.5 mL dung dịch chuẩn 20 mg/L vào bình 10 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril. (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 03 tháng)
- ✓ Dung dịch chuẩn hỗn hợp 100 mcg/L: Rút 1 mL dung dịch chuẩn hỗn hợp 2.0 mg/L vào bình 10 mL, định mức đến vạch bằng acetonitril. (bảo quản trong ngăn đá tủ HV.018, sử dụng 01 tháng)

d. Dung dịch đường chuẩn làm việc được pha như sau: Chiết chuẩn trên nền mẫu.

STT	Nồng độ chuẩn trung gian, ppb	Thể tích lấy, mL	Khối lượng mẫu	C, ppb
St1	100	0.025	5.0g	0.5
St2		0.05		1.0
St3		0.1		2.0
St4	1 000	0.025		5.0
St5		0.05		10.0
St6		0.1		20.0

📌 Lưu ý: Nồng độ chuẩn 1000 mg/L có thể thay đổi do quá trình cân chuẩn, Nhân viên pha chuẩn phải dùng số liệu cân chuẩn để tính lại nồng độ chuẩn.

III. Kiểm soát QA/QC

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

- Blank thuốc thử.
- Blank matrix: Mẫu Blank phù hợp với nền mẫu phân tích
- Thực hiện mẫu Blank, Blank matrix và QC theo mục IV.2.

IV. Xử lý mẫu

1. Chuẩn bị mẫu

- Lượng mẫu được lấy ít nhất là 50 g (đối với mẫu rắn).
- Mẫu được xay đồng nhất.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.309 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: Trang: 5/6
--	----------------------------	--

- Nếu mẫu chưa phân tích ngay, bảo quản mẫu ở $\leq -10^{\circ}\text{C}$.

2. Phương pháp tiến hành

- Mẫu Blank thuốc thử: Lấy 10ml nước cất cho vào ống ly tâm 50mL.
- Mẫu và mẫu QC: Cân $5 \pm 0.2\text{g}$ mẫu vào ống ly tâm 50mL.
- Thêm 7 mL nước cất, lắc mạnh và 10 mL ACN (5%formic acid). Vortex mẫu khoảng 3 phút, để mẫu vào ngăn đá 30 phút, sau đó thêm tiếp vào hỗn hợp muối (4g MgSO_4 + 1g NaCl + 1g trisodium citrate dihydrate + 0.5g disodium sesquihydrate dihydrate), lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm 10 phút ở 3500 vòng/phút. Hút 2mL lớp trên cho vào ống ly tâm 15mL có chứa (0.3g MgSO_4 + 0.05g C18 + 0.05g PSA), vortex 1 phút, ly tâm 3000 vòng/ phút. Lấy 1ml dung dịch cho vào bình cầu, cô quay hoặc thổi khô bằng khí Nitơ. Định mức lại bằng 1mL pha động, phân tích trên LC/MS/MS.

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị

Điều kiện AS	Điều kiện LC				
	Column	Thời gian	A	B	Tốc độ dòng, mL/phút
<div><div>- Injection type: Full loop</div><div>- Needle height from bottom: 1.0</div><div>- Flush volume: 100μL</div><div>- Tray temp control: off</div><div>- Column oven control: off</div><div>- Wash column: 500μL</div></div>	Supelco Ascentis C18 5μm/2.1μm (hoặc cột tương đương)	0	60	40	0.4
		1.5	60	40	
		2.0	0	100	
		5.5	0	100	
		6.0	40	60	
		8.0	40	60	
		Điều kiện MS/MS			
<div><div>- Q2 gas pressure: 1.2mT</div><div>- MS acquire time: 6</div><div>- Ion source : ESI</div><div>- Polarity: Negative</div><div>- Scan type: SRM</div><div>- Capillary temp: 350°C</div><div>- Vaporizer temperature: 200</div><div>- ESI spray voltage: ≥ 3000V</div><div>- Sheath gas:30</div><div>- Aux gas : 5</div></div>	Ion chính		Ion định lượng		Ion xác nhận
	Brillient green				
	385.2		341		297
	336.18		239.08 (30)		

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.309 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: Trang: 6/6
--	----------------------------	--

2. Trình tự tiêm mẫu

- ✓ Pha động
- ✓ Các dung dịch chuẩn làm việc, từ nồng độ thấp đến cao
- ✓ Pha động
- ✓ Mẫu Blank hóa chất, Blank matrix
- ✓ Mẫu cần phân tích
- ✓ Mẫu QC
- ✓ Chuẩn check

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm xen kẽ một chuẩn và pha động sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc bằng một dung dịch chuẩn.

C. TÍNH KẾT QUẢ

Công thức tính kết quả:

$$C = C_0 \times F$$

Trong đó:

- o C: hàm lượng chất phân tích có trong mẫu. (µg/Kg)
- o C₀: hàm lượng chất phân tích từ đường chuẩn. (µg/Kg)
- o F: hệ số pha loãng nếu có

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn (bao gồm điểm 0) với $R^2 \geq 0.995$
- ✓ Độ lệch thời gian lưu $\pm 15s$
- ✓ Nồng độ QC trong khoảng 80 – 120%
- ✓ Tỷ số ion:

Tỉ số ion	Độ lệch cho phép
> 50%	$\pm 20 \%$
>20 đến 50%	$\pm 25 \%$

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích, bao gồm:

- BM.15.04a
- BM.15.06