**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TRICHLORFON TRONG THỦY HẢI SẢN KHÔ BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ (LC/MS/MS)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nhân viên biên soạn | Nhân viên xem xét | Nhân viên phê duyệt |
| LA THỊ TRẦM | DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI | TRỊNH THỊ MINH NGUYỆT |

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| STT | Vị trí | Nội dung sửa đổi | Ngày sửa đổi |
| 1 |  |  |  |
| 2 |  |  |  |
| 3 |  |  |  |
|  |  |  |  |

1. **TỔNG QUAN**
2. **Phạm vi áp dụng.**

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng Trichlorfon (TCF) trong thủy hải sản khô. Giới hạn phát hiện là 6.0 µg/kg.

1. **Tài liệu tham khảo.**

AOAC 2007.01: Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate

1. **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 làm sạch bằng hỗn hợp muối MgSO4 - C18 tỷ lệ 3:1và được xác định trên LC/MS/MS.

1. **Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.**
2. Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động trong phòng thí nghiệm.
3. Báo cáo tất cả các vấn đề gây tổn thương tới con người và các sự cố gây đổ vỡ hóa chất.
4. Dung môi hữu cơ ACN và acetic acid được thu hồi vào trong thùng chứa có dán nhãn dung môi thải.
5. **PHÂN TÍCH**
6. **Thiết bị và dụng cụ phân tích.**
7. Thiết bị cơ bản.

* Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg
* Bình định mức 5ml, 10ml, 50 ml
* Máy ly tâm cho ống 15ml, 50ml
* Micropipet các loại 20 µL, 200 µL, 1000µL.
* Pipet thủy tinh 1ml, 2ml

1. Thiết bị phân tích

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

1. **Hoá chất và chất chuẩn.**
2. Hoá chất.

* Nước cất khử ion (nước DI)
* Acetonitrile (ACN), Acid acetic của Fisher hoặc tương đương
* 1% Acid acetic trong Acetonitrile: Pha 40 ml Acid acetic vào 4 L Acetonitrile.
* Hỗn hợp muối QuEChERS: Cân 4g muối MgSO4 và 1g muối CH3COONa vào ống ly tâm 50 ml.
* Hỗn hợp muối clean up: Cân 300 mg MgSO4 và 100mg C18 vào ống ly tâm 15 ml.

1. Chất chuẩn.

***a. Chuẩn gốc:***

* Chuẩn Trichlorfon của Chem-service 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***

* Dung dịch chuẩn gốc 1000 µg/mL: Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn vào các bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng ACN. 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:

Trongđó: 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 - 80C), sử dụng trong thời gian 1 năm.

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

* Chuẩn TCF (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 ACN.
* Chuẩn TCF (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 ACN.
* Chuẩn TCF (0.1 µg/mL): Rút 1.0 mL dung dịch chuẩn 1.0 µg/mL ở trên vào bình mức 10 mL, định mức tới vạch bằng ACN.
* 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 (4-80C), sử dụng trong thời gian 6 tháng.
* Định tính: chạy 1 điểm chuẩn định tính với những mẫu thường không phát hiện
* Định lượng: Pha dãy chuẩn làm việc

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| STD | ST1 | ST2 | ST3 | ST4 | ST5 | ST6 | St7 |
| C (µg/L) | 0.2 | 1 | 5 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| V TCF 0.1 µg/mL (µL) | 20 | 100 | 500 |  |  |  |  |
| V TCF 1.0 µg/mL (µL) |  |  |  | 100 | 200 | 500 | 1000 |
| V (mL) DI | 8 | | | | | | |
| V (mL) 1% AcA/ACN | 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 - 80C), sử dụng trong thời gian 3 tháng.

1. **Kiểm soát QA/QC.**

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu Blank với nồng độ kiểm soát: 20.0 µg/kg

1. **Xử lý mẫu.**

* Cân 5 ± 0.1 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml
* Mẫu QC: Thêm 100 µL dung dịch chuẩn TCF 1µg/mL vào mẫu blank để kiểm soát hiệu suất thu hồi.
* Thêm 15 mL nước DI, vortex trong 2 phút, để yên khoảng 20 phút.
* Thêm 10 mL 1%Aca/ACN, lắc mạnh trong 5 phút.
* Thêm tiếp vào 5g hỗn hợp muối QuEChERS (4g MgSO4 và 1g CH3COONa), lắc mạnh trong 2 phút, ly tâm 3000 vòng /phút trong 5 phút.
* Làm sạch dịch chiết: Rút 2mL dịch chiết cho vào ống ly tâm 15 mL đã chứa sẵn 0.4 g hỗn hợp muối MgSO4 khan + C18 (3:1), vortex 1-2 phút, ly tâm 3000 vòng /phút (3-5phút).
* Pha loãng dịch chiết: rút 200 µL dịch chiết đã làm sạch vào ống ly tâm đã chứa sẵn 800 µL nước DI.
* Vortex, lọc vào vial qua màng lọc 0.45 µm. Phân tích trên LC/MS/MS

1. **Phântích**

## Điều kiện LC

* Cột C18 (150 x 2.1 mm, 5μm)
* Pha động: MeOH 0.1% acid formic,

DI 0.1 % acidformic + 0.1% amonia

* Tốc độ dòng: 350µl/phút
* Thể tích tiêm: 20µL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Thờigian, phút** | **% MeOH (formic)** | **% DI (amonì format)** |
| 0.0 | 10 | 90 |
| 0.5 | 10 | 90 |
| 8.0 | 0 | 100 |
| 9.0 | 0 | 100 |
| 9.5 | 10 | 90 |
| 11.5 | 10 | 90 |

## Điều kiện MS

* Nguồn ion hóa: ESI
* Nhiệt độ capillary: 350oC
* Sheath gas: 40, Aux gas: 4
* Spray voltage: 4000V
* CID gas: 1.5mT
  1. **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.

1. **TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.**
2. **Công thức tính toán:**

Hàm lượng Triclorfon trong mẫu được tính toán theo công thức:

* C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/kg
* Co: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/L
* Vextract: Thể tích dịch chiết (mL)
* f: hệ số pha loãng
* m: khối lượng cân (g)

1. **Ion địnhlượng, định tính**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Hợp chất | Ion mẹ | định tính | CE 1 (eV) | định lượng | CE 2 (eV) |
| Trichlorfon | 257 | 79 | 30 | 109 | 18 |

1. **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: 80-110%
* 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 20 µg/kg.

1. **BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

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