### XÁC ĐỊNH TINOPAL TRONG SẢN PHẨM TỪ GẠO BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ BA TỨ CỰC (LC/M/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. **TỔNG QUAN**
2. **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.

1. **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

1. **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.

1. **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.

1. **PHÂN TÍCH**
2. **Thiết bị và dụng cụ phân tích.**
3. 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 µL, 200 µL, 1000 µL.
* Pipet thủy tinh

1. Thiết bị phân tích

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

1. **Hoá chất và chất chuẩn.**
2. 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.

1. 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:

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 tính 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 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 (4-80C), 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 - 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:
* Blank
* QC: Mẫu spike trên nền mẫu Blank matrix

**VI. Phân tích mẫu**

1. **Xử lý mẫu.**

* Cân 2 ± 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 800C 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.

1. **Phân tích**

## Điều kiện LC

* Cột C18 (150 x 2.1 mm, kích thước hạt 5μm)
* Pha động: MeOH (0.1% HCO2H) và DI (0.1% HCO2H +0.1% HCO2NH4)
* Tốc độ dòng: 400 µl/phút
* Thể tích tiêm: 20µL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Thời gian, phút** | MeOH (0.1% HCO2H) | DI (0.1% HCO2H +0.1% HCO2NH4) |
| 0 | 10 | 90 |
| 0.5 | 10 | 90 |
| 8 | 100 | 0 |
| 11.5 | 100 | 0 |
| 11.6 | 10 | 90 |
| 13 | 10 | 90 |

## Điều kiện MS

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

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:**

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

# C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/mL

# Co­: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/mL

# Vextract: Thể tích dịch chiết

# f: hệ số pha loãng

# m: khối lượng cân (g)

1. **Ion định lượng, định tính**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Hợp chất** | **Ion mẹ** | **Ion  định tính** | **CE 1  (eV)** | **Ion  định lượng** | **CE 2  (ev)** |
| Tinopal | 258.1 | 226.1 | 20 | 371.1 | 36 |

1. **KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC**

* Đồ thịtuyến 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 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 dich chuẩn kiểm tra không quá 15%

1. **BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

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