**ĐỊNH LƯỢNG DƯ LƯỢNG BRILLIENT GREEN TRONG THỶ SẢN** **BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ KHỐI PHỔ BA TỨ CỰC (LC/MS/MS)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nhân viên biên soạn** | **Nhân viên xem xét** | **Nhân viên phê duyệt** |
| **Nguyễn Thị Kiều Diễm** | **Trần Thái Vũ** | **Trần Thái Vũ** |

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| STT | Vị trí | Nội dung sửa đổi | Ngày sửa đổi |
| **01** |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

# GIỚI THIỆU

# Phạm vi áp dụng

* Phương pháp này được áp dụng xác định dư lượng Brillient 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** |
| Brillient green | 0.3 | 1.0 |

# Tài liệu tham khảo

* **BS EN 15662 (2008)**

1. **Nguyên tắc:**

* Dư lượng Brillient 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.

1. **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.

1. **PHÂN TÍCH**
2. **Dụng cụ và thiết bị**
3. **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
  + Bộ cô quay chân không.

1. **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.
2. **Hóa chất và Chất chuẩn**

### **Hóa chất**

### Nước cất 2 lần khử ion

### Acetonitril HPLC

### Methanol, HPLC.

### NH3, Merck

### HCOOH, Merck.

### Ammonium Acetate, Merck

### **Dung dịch thử**

### Dung dịch pha động

### A: H2O 0.1% formic acid

B: Acetonitrille 0.1% formic acid

1. **Chất chuẩn**
   1. Chất chuẩn

* Brillient green của Dr. Ehrentofer hoặc tương đương..

1. 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:



Đối với chuẩn gốc là dạng Base:



*Trong đó: m: khối lượng chất chuẩn (mg)*

*Mbase: 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*

### Cân 10.0mg chuẩn rắn Brillient green vào bình định mức 10mL, định mức lên bằng Acetonitrile. Votex cho chuẩn tan hết.

### Chuẩn được đựng trong ống nghiệm thủy tinh, bảo quản ở nhiệt độ ≤ 00C.

### Chuẩn sử dụng trong 01 năm.

### **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)*

1. **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.

# 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.

1. **Xử lý mẫu**

### Chuẩn bị mẫu

### Lượng mẫu được lấy ít nhất là 50 g (đối với mẫu rắn).

### Mẫu được xay đồng nhất.

### Nếu mẫu chưa phân tích ngay, bảo quản mẫu ở ≤ –10oC.

### Phương pháp tiến hành

### Mẫu Blank thuốc thử: Lấy 10ml nước cất cho vào ống ly tâm 50mL.

### Mẫu và mẫu QC: Cân 5 ± 0.2g 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 MgSO4 + 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 MgSO4 + 0.05g C18 + 0.05g PSA), votex 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.

### **Phân tích**

### Thông số thiết bị

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ***Điều kiện AS*** |  | | ***Điều kiện LC*** | | | | |
| ***Column*** | | ***Thời gian*** | ***A*** | ***B*** | | ***Tốc độ dòng, mL/phút*** |
| * Injiection type: Full loop * Needle height from bottom: 1.0 * Flush volume: 100µL * Tray temp control: off * Column oven control: off * Wash column: 500µL | 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 | | | | | | | |
| * Q2 gas pressure: 1.2mT * MS acquire time: 6 * Ion source : ESI * Polarity: Negative * Scan type: SRM * Capillary temp: 350oC * Vaporizer temperature: 200 * ESI spray voltage: ≥ 3000V * Sheath gas:30 * Aux gas : 5 | | Ion chính | | Ion định lượng | | Ion xác nhận | |
| Brillient green | | | | | |
| 385.2 | | 341 | | 297 | |
|  | | | | | |
|  | |  | |  | |
|  | | | | | |
|  | |  | |  | |
|  | | | | | |
| 336.18 | | 239.08 (30) | |  | |

### 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.*

1. **TÍNH KẾT QUẢ**

Công thức tính kết quả:

C = C0xF

Trong đó:

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

1. **KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC**

* Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn ( bao gồm điểm 0) với R2 ≥ 0.995
* Độ lệc thời gian lưu ± 15s
* Nồng độ QC trong khoảng 80 – 120%
* Tỷ số ion:

|  |  |
| --- | --- |
| Tỉ số ion | Độ lệch cho phép |
| > 50% | ± 20 % |
| >20 đến 50% | ± 25 % |

# 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