

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.133 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 11/12/2017 Trang: 1/11
---	----------------------------------	--

XÁC ĐỊNH PHTHALATE TRONG THỰC PHẨM BẰNG THIẾT BỊ SẮC KÝ KHÍ TỬ CỰC (GC/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

TT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	11/12/2017

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng.

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng Phthalate trong mẫu thực phẩm.

STT	Hợp chất	Ký hiệu Phthalate	Thiết bị phân tích	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
1	Bis (2-methoxyethyl) phthlate	DMEP	GC/MS	1.1	3.5
2	Butyl benzyl Phthalate	BBP	GC/MS	1.0	3.4
3	Diisobutyl Phthalate	DIBP	GC/MS	1.0	3.3
4	di-n-butyl Phthalate	DNBP	GC/MS	1.2	4.1
5	Di-n-octyl Phthalate	DNOP	GC/MS	1.0	3.4
6	Bis (2-ethylhexyl) phthlate	DEHP	GC/MS	0.4	1.2

II. Tài liệu tham khảo.

1. AOAC Official Method 2007.01- Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.
2. Agilent Technologies, Application note (2012): Rapid, sensitive, and robust detection of Phthalates in food using GC/MS or LC/MS.
3. Food Additives & Contaminants: Part A (2014): Determination of 16 Phthalate esters in tea samples using a modified QuEChERS sample preparation method combined with GC-MS/MS.

III. 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 MgSO_4 -PSA-C18 tỷ lệ 3:1:1. Dịch chiết được xác định trên GC/MS.

VI. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.

- a. Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động trong phòng thí nghiệm.
- b. Báo cáo tất cả các vấn đề gây tổn thương tới con người và các sự cố gây đổ vỡ hóa chất.
- c. Dung môi hữu cơ ACN 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.
 - Pipet thủy tinh (thể tích 5 mL và 10mL)
 - Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg,
 - Máy ly tâm cho ống 50ml và 15mL
 - Bình định mức 10 mL
 - Micropipet các loại 20 μL , 200 μL , 1000 μL .

- Pipet các loại 1 mL, 2 mL, 5mL, 10 mL.
 - Ống thủy tinh 60 mL, 10 mL.
2. Thiết bị phân tích
- Hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ một tứ cực GC 6890 – MS 5973 hoặc tương đương.

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá chất.
- **Hỗn hợp muối QuEChERS:** Cân 4g muối $MgSO_4$ và 1g muối CH_3COONa vào ống ly tâm 50 ml.
 - **Hỗn hợp muối clean up:** Cân 150mg $MgSO_4$, 50mg PSA và 50mg C_{18} vào ống thủy tinh 15 ml.
 - **Dung dịch chiết ACN (1% acetic acid):** Pha 40 ml acetic acid vào 4L dung môi ACN
2. Chất chuẩn.

a. Chuẩn gốc:

- Các hóa chất chuẩn Phthalate, Triphenylphosphate có độ tinh khiết trên 90% của Chem-service hoặc tương đương.
- Bảo quản và lưu trữ: Các chuẩn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất: Chuẩn lưu tủ mát ($8^{\circ}C$) và chuẩn lưu ở nhiệt độ phòng ($20^{\circ}C$).

b. Dung dịch chuẩn gốc

- Dung dịch chuẩn gốc các chất Phthalate: Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn vào các bình định mức 10 mL riêng biệt, hoà tan bằng và định mức đến vạch bằng isooctan. 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 (mg/L).

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: Các dung dịch chuẩn gốc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ lạnh (-18°C), sử dụng trong thời gian 1 năm.

c. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc

- Tất cả các dung dịch chuẩn làm việc đều được pha trong dung môi ACN tinh khiết phân tích.
- Chuẩn hỗn hợp (10 $\mu\text{g/mL}$): Từ mỗi dung dịch gốc trên (1000 $\mu\text{g/mL}$) tương ứng lấy 0.1 mL cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với Acetonitrile.
- Chuẩn hỗn hợp (10 $\mu\text{g/mL}$): Rút 1.0 mL hỗn hợp chuẩn 10 $\mu\text{g/mL}$ ở trên vào bình mức 10 mL, định mức tới vạch bằng Acetonitrile.
- 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 ($4-8^{\circ}\text{C}$), sử dụng trong thời gian 6 tháng.
- Pha dãy chuẩn làm việc:
 - + Định tính: Nếu mẫu thường không phát hiện chỉ cần pha điểm chuẩn định tính 1.0 $\mu\text{g/mL}$.
 - + Định lượng:
GC/MS : Pha các điểm chuẩn có nồng độ 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 2.0 $\mu\text{g/mL}$ theo bảng sau:

V (μL) Chuẩn hỗn hợp	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	
10.0 mg/L	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	

V (μL) ACN	Định mức 10ml
---------------	---------------

III. Kiểm soát QA/QC.

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

- Mẫu Blank hóa chất:
- Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu Blank matrix với nồng độ kiểm soát: 3.0 mg/kg

a. Mẫu blank hóa chất

- Phân tích ít nhất một mẫu blank hóa chất trong mỗi lần thực hiện phân tích. Đánh giá kết quả dựa vào giới hạn $0 \pm 0.1 \text{ mg/L}$.
- Nếu mẫu blank hóa chất ngoài giới hạn kiểm soát, kiểm tra xem dụng cụ, hoá chất, chất chuẩn có bị nhiễm bẩn không. Nếu bị nhiễm bẩn, làm sạch dụng cụ bằng acetone hoặc metanol. Kiểm tra chất lượng nguồn nước của phòng thí nghiệm. Sử dụng hóa chất và chất chuẩn mới nếu thấy cần thiết.

c. Mẫu thêm chuẩn (QC)

- Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn với nồng độ thêm là 0,01 mg/L 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

VI. Xử lý mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu:

Theo “ Hướng dẫn công việc đồng nhất mẫu trong phòng thí nghiệm – HD.KT.022”

2. Phương pháp tiến hành.

- Cân 5 ± 0.05 g mẫu đã đồng nhất vào ống thủy tinh 60 mL.
- Mẫu QC-spike: Thêm 50 μ L dung dịch chuẩn phthalatenồng độ 100 mg/L vào mẫu blank để kiểm soát hiệu suất thu hồi.
- Bổ sung từ 2 – 5 mL nước cất trong trường hợp mẫu có ít nước hoặc sệt, vortex 15-30 giây). Nếu mẫu chứa 80% hàm lượng nước thì bỏ qua bước này.
- Thêm vào 10 mL ACN (1% CH₃COOH), đậy nắp, lắc mạnh trong 1 phút.
- Thêm tiếp vào hỗn hợp MgSO₄ (4 ± 0.2 g) và CH₃COONa (1 ± 0.05 g), lắc mạnh trong 1 phút, để yên 30 phút.
- Làm sạch dịch chiết: Rút 1.0 mL dịch chiết thô ACN cho vào ống thủy tinh 10mL chứa sẵn hỗn hợp muối 150 mg MgSO₄ khan + 50 mg bột PSA + 50 mg bột C₁₈, vortex 1-2 phút, ly tâm 3000 vòng /phút (3-5phút).
- Xác định trên GC/MS: Dùng pasteur pipette hút dịch chiết sạch sau ly tâm vào vial.

V. Phân tích

1. Thông tin thiết bị

a. Điều kiện GC

- Cột HP-5MS (30 m x 0.25mm x 0.25 μ m)
- Khí mang: Heli
- Chương trình nhiệt: 100⁰C (1 phút), tăng 15 ⁰C/phút đến 300 ⁰C (5 phút).
- Chế độ tiêm: không chia dòng
- Tốc độ dòng: 2.0 ml/phút ở chế độ đẳng áp P=22.6 PSI tại 90 ⁰C.
- Nhiệt độ buồng tiêm: 280 ⁰C
- Nhiệt độ transferline: 300 ⁰C

b. Điều kiện MS

- Nguồn ion hóa: EI , nhiệt độ 230 ⁰C

- Dòng phát xạ: 34.6 μ A

- Chế độ: SIM

Hợp chất		I o n đ i n h l ư ợ n g	I o n đ i n h t í n h 1	I o n đ i n h t í n h 2	I o n đ i n h t í n h 3
Di-isobutyl phthalte	D I B P	1 4 9	1 5 0	2 0 5	2 2 3 . 0
di-n-butyl phthalate	D N B P	1 4 9	1 5 0	2 0 5	2 2 3 . 0
Bis(2- methoxyethyl) phthlate	D M E P	1 4 9	1 0 4	2 0 7	5 9 . 0
Butyl benzyl phthalate	B B P	1 4 9	2 0 6	1 5 0	9 1 . 0
Bis (2-ethylhexyl) phthlate	D E H P	1 4 9	1 6 7	2 7 9	1 5 0
Di-n-octyl phthalate	D N O P	1 4 9	2 0 7	2 7 9	2 9 3

2. 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.

a. Công thức tính toán:

Xây dựng các đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích của chuẩn với nồng độ chuẩn. Hàm lượng PHTHALATE trong mẫu được tính toán theo công thức:

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

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, ppm
- C₀: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, ppm
- 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 $R^2 \geq 0.99$
- ✓ 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 GC-EI-MS
>50%	± 10%
20-50%	± 15%
10%-20%	± 20%
<10%	±50%

- ✓ Độ lệch của thời gian lưu không quá 0.5% cho GC
- ✓ Độ lệch của dung dịch chuẩn kiểm tra không quá 15%
- ✓ Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart).

Thực hiện kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (control chart) ở mức thêm chuẩn 3mg/kg DEHP sau mỗi lô mẫu phân tích.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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