

| | | |
|--|--|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH | Mã số: HD.TN.132 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 31/10/2017 Trang: 1/8 |
|--|--|--|

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG METHANOL, ESTER VÀ RƯỢU BẠC
CAO TRONG RƯỢU VÀ THỨC UỐNG CÓ CỒN SỬ DỤNG THIẾT
BỊ HEADSPACE – GC/MS**

| Nhân viên biên soạn | Nhân viên xem xét | Nhân viên phê duyệt |
|---------------------|--------------------|---------------------|
| LA THỊ TRẦM | DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI | TRẦN THÁI VŨ |

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

| STT | Vị trí | Nội dung sửa đổi | Ngày sửa đổi |
|----------|----------|-----------------------------|--------------|
| 1 | | Thay đổi format SOP | 31/10/2017 |
| 2 | B.II.2.b | Thay đổi các điểm chuẩn | 31/10/2017 |
| 3 | B.V.2.2 | Thay đổi chương trình nhiệt | 31/10/2017 |
| 4 | | | |

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này áp dụng để xác định hàm lượng methanol, ester và rượu bậc cao trong thức uống có cồn. Hàm lượng rượu bậc cao được tính theo hàm lượng của Iso-butanol.

Hàm lượng ester được quy về hàm lượng của ethyl acetate.

Các hợp chất được khảo sát trong bảng sau:

| STT | Hợp chất | Thiết bị | LOD (mg/L) | LOQ (mg/L) |
|-----|------------------|----------|------------|------------|
| 1 | Methanol | GC/MS | 5.5 | 18.2 |
| 2 | 1-Propanol | GC/MS | 0.1 | 0.3 |
| 3 | 1-Butanol | GC/MS | 0.1 | 0.3 |
| 4 | Ethyl acetate | GC/MS | 0.2 | 0.6 |
| 5 | Iso-butanol | GC/MS | 0.1 | 0.3 |
| 6 | Iso amyl alcohol | GC/MS | 0.1 | 0.3 |

II. Tài liệu tham khảo

AOAC Official Method 972.11: Methanol in Distilled Liquors Gas Chromatographic Method.

AOAC Official Method 972.10: Alcohols (higher) and ethyl acetate in distilled liquors.

III. Nguyên tắc

Mẫu được xác định trực tiếp sử dụng kỹ thuật Headspace GC/MS.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

Đeo khẩu trang, găng tay khi thực hiện phân tích.

Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động phòng thí nghiệm.

Sử dụng tủ hút, kính bảo hộ và găng tay khi cần thiết.

Các dung môi hữu cơ và các chất thải phải được thu hồi vào các thùng chứa có dán nhãn và lưu giữ như các hóa chất thải độc hại.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ phân tích

1. Dụng cụ và thiết bị cơ bản

- Micropipet loại 20 μ L, 200 μ L và 1000 μ L

| | | |
|---|----------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH | Mã số: HD.TN.132 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 31/10/2017 Trang: 3/8 |
|---|----------------------------------|---|

- Vial headspace 20mL và nắp vial Headspace
- Bình định mức 10mL
- Pipet 1 mL

2. Thiết bị phân tích

- Headspace sampler Agilent 7694E hoặc tương đương.
- Agilent 6890GC / HP 5972MS hoặc tương đương.
- Rtx-VMS 30m x 0.25mm x 1.5 micron film hoặc tương đương.

II. Hóa chất và chất chuẩn

1. Hóa chất

Nước LC/MS/MS tinh khiết phân tích.

2. Chất chuẩn

a. Chuẩn gốc

- Methanol 100% của J.T. Backer hoặc tương đương.
- Methanol D4 (IS) của Chem service hoặc tương đương.
- 1-Propanol >99% của Fisher hoặc tương đương.
- n-Butanol >99% của Fisher hoặc tương đương.
- sec-Butanol (IS) >95% của Fisher hoặc tương đương.
- iso-Butanol >95% của Merk hoặc tương đương.
- iso-Amyl alcol của Merk hoặc tương đương.

Bảo quản và lưu trữ: Chuẩn được lưu trữ trong tủ mát (4-8°C)

b. Dung dịch chuẩn gốc

Dung dịch chuẩn rượu bậc cao Fuseloil 5000 mg/L: Cân chính xác khoảng 50 mg các chất chuẩn sau: isobutanol, isoamyl alcol, n-amyl alcol, n-propanol, n-butanol vào bình định mức 10 mL. Định mức đến 10mL bằng DI. 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).

| | | |
|---|----------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH | Mã số: HD.TN.132 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 31/10/2017 Trang: 4/8 |
|---|----------------------------------|---|

V là thể tích định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

Chuẩn hỗn hợp Fuseoil 100 mg/L và MeOH 3000 mg/L: Rút 200 μ L chuẩn rượu bậc cao Fuseloil 5000 mg/L, cân chính xác khoảng 30 mg MeOH vào cùng bình định mức 10 mL. Định mức tới vạch bằng DI.

Nội chuẩn hỗn hợp MeOH-d4 1500 mg/L và sec-Butanol 1000 mg/L: Cân chính xác khoảng 15 mg methanol-d4 100% và 10 mg sec-butanol vào cùng bình định mức 10 ml. Định mức đến vạch 10 mL bằng DI, vortex, lắc đều bình mức. Nồng độ nội chuẩn được tính toán theo công thức như trên.

Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn được lưu trữ trong tủ mát (4-8°C)

Đường chuẩn methanol, ester và rượu bậc cao như trong bảng sau:

| | | | | | | | |
|---|--|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| Nồng độ MeOH (mg/L) | 9 | 18 | 51 | 99 | 201 | 399 | 600 |
| Nồng độ Fuseloil (mg/L) | 0.3 | 0.6 | 1.7 | 3.3 | 6.7 | 13.3 | 20 |
| Nước cất (mL) | 1 | | | | | | |
| Chuẩn hỗn hợp Fuseoil 100 mg/L và MeOH 3000 mg/L | 3 | 6 | 17 | 33 | 67 | 133 | 200 |
| Nội chuẩn hỗn hợp Methanol-d4 và sec-butanol (μ L) | 50 | | | | | | |
| Phân tích | Đậy nắp Headspace, vortex 30 giây, phân tích bằng thiết bị Headspace GC/MS | | | | | | |

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 Blank matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.

| | | |
|---|----------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH | Mã số: HD.TN.132 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 31/10/2017 Trang: 5/8 |
|---|----------------------------------|---|

Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu blank với nồng độ kiểm soát mức LOQ.

a. Mẫu blank hóa chất

- Phân tích ít nhất một mẫu blank hóa chất trong mỗi lần thực hiện phân tích.
- 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 aceton sau đó bằng nước cất hoặc nước DI. Kiểm tra chất lượng nguồn nước của phòng thí nghiệm. Sử dụng hóa chất và chất chuẩn mới nếu thấy cần thiết. Trường hợp không thể loại bỏ hoàn toàn chất phân tích ra khỏi nền mẫu blank thì thực hiện blank lặp lại 3 lần và trừ nền.

b. Mẫu Blank matrix: Mẫu blank không phát hiện chất phân tích hoặc phát hiện ở nồng độ nhỏ hơn LOD

c. Mẫu thêm chuẩn (QC)

- Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn 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

IV. Xử lý mẫu

1. Chuẩn bị mẫu:

Lắc đều mẫu trước khi phân tích.

2. Phương pháp tiến hành

- Rút 1ml mẫu cho vào vial headspace.
- Thêm 50 μ L nội chuẩn MeOH-D4 1040 mg/L và sec-Butanol 1000 mg/L.
- Đóng nắp lại. Vortex 10-15 giây. Tiến hành phân tích trên headspace GC/MS.

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị

Điều kiện Headspace

| | |
|------------------------------------|--------------------------|
| Oven temp: 80°C | Loop Eq. time: 0.1 min. |
| Loop temp.: 150°C | Injection time: 0.5 min. |
| Transferline temp: 200°C | GC cycle time: 25 min. |
| Sample Equilibration time: 10 min. | Vial pressure: 10psi. |
| Pressuriz.Time: 0.15 min. | Shaking: 2 High |
| Loop fill time: 0.5 min. | |

Điều kiện GC/MS

Cột : Rtx-VMS 30m x 0.25mm x 1.5 micron film

Tốc độ dòng: 1 mL/phút.

Nhiệt độ Inlet: 220 °C; detector: 250 °C; chế độ tiêm chia dòng: 30:1.

Chương trình nhiệt:

- 40 °C giữ 4.5 phút
- Tăng 12°C/phút đến 100 °C
- Tăng 25°C/phút đến 150 °C

Solvent delay: 0 min

Chế độ: SIM

| STT | Hợp chất | Ion định lượng | Ion định tính |
|-----|------------------|----------------|---------------|
| 1 | Methanol | 31 | 29 |
| 2 | 1-Propanol | 31 | 60, 59, 42 |
| 3 | 1-Butanol | 56 | 41, 43 |
| 4 | Ethyl acetate | 43 | 88, 70 |
| 5 | Iso-butanol | 41 | 74, 42, 43 |
| 6 | Iso amyl alcohol | 70 | 55, 57, 42 |

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

Xây dựng các đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỉ lệ diện tích của từng chuẩn trong hỗn hợp với nồng độ chất phân tích.

Hàm lượng rượu bậc cao được quy về hàm lượng của Iso-butanol

Hàm lượng ester được quy về hàm lượng ethyl acetate.

Hàm lượng Methanol, ester và fuselol trong mẫu được tính toán theo công thức:

$$C = C_o \times f$$

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, mg/kg
- C_o : nồng độ chất phân tích xác định trên máy, mg/L
- f: hệ số pha loãng

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.

Độ lệch 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)

- 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 của GC-EI-MS |
|---|---------------------------------|
| > 50 % | ± 10 % |
| 20 – 50 % | ± 15 % |
| 10 – 20 % | ± 20 % |
| < 10 % | ± 50 % |

| | | |
|---|--|--|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH | Mã số: HD.TN.132 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 31/10/2017 Trang: 8/8 |
|---|--|--|

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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