

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.134 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 21/07/2017 Trang: 1/9
--	----------------------------------	---

XÁC ĐỊNH CHẤT CHỐNG OXY HÓA BHT, BHA, TBHQ TRONG THỰC PHẨM BẰNG THIẾT BỊ SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI PHỔ TỬ CỰC (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	07/08/2017
2	Mục A.I Phạm vi áp dụng	LOD-LOQ	07/08/2017
3	Mục E. Báo cáo kết quả	Biểu mẫu báo cáo kết quả	07/08/2017

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng chất chống oxy hóa gồm 3 chất BHA, BHT, TBHQ trong mẫu thực phẩm. Giới hạn định lượng của BHT và BHA là 1 mg/kg cho nền mẫu ít béo (bánh qui, nước ngọt, thạch,...), 10 mg/kg cho nền mẫu nhiều béo (dầu ăn, mì tôm, kẹo dừa,...); và giới hạn định lượng của TBHQ là 10 mg/kg cho tất cả các nền mẫu.

II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo:

- AOAC Official Method 2007.01- Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.

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 $MgSO_4$ - C18 tỷ lệ 3:1 và được xác định trên GC/MS.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

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 như acetonitril 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

- Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg,
- Máy ly tâm cho ống 50ml và 15mL
- Bình định mức 10 mL, 25 mL, 50 mL
- Micropipet các loại 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L.
- Pipet các loại 1 mL, 2 mL, 5mL, 10 mL.
- Ống hatch, vial
- Ống ly tâm 50 mL, 15mL

1. Thiết bị phân tích

Hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ một tứ cực GC 6890 – MS 5973 hoặc tương đương.

V. HÓA CHẤT VÀ CHẤT CHUẨN

1. Hóa chất

- Nước cất một lần và nước cất khử ion (nước DI)
- Magie sulfat khan (MgSO_4)
- Natri acetat khan (CH_3COONa)
- Hỗn hợp muối QuEChERS: Cân 4g muối MgSO_4 và 1g muối CH_3COONa vào ống ly tâm 50 ml.
- Dung dịch chiết ACN (1% acetic acid): Pha 40 ml acetic acid vào 4L dung môi ACN
- Bột C_{18} của Agilent

2. Chất chuẩn

a. Chuẩn gốc:

Chuẩn rắn BHT (Butylated hydroxytoluene), BHA (Butylated hydroxyanisole), TBHQ (tert-Butylhydroquinone), Triphenylphosphate (TPP) tinh khiết phân tích hãng Sigma hoặc tương đương.

Bảo quản và lưu trữ: Các chuẩn rắn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

b. Dung dịch chuẩn gốc

Dung dịch chuẩn gốc 5000 $\mu\text{g/mL}$ BHT, BHA: Cân chính xác khoảng 125 mg các chất chuẩn trên vào các bình định mức 25 mL riêng biệt, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetonitrile. 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:

$$C(\text{mg/L}) = \frac{m(\text{mg}) \times 1000}{V(\text{mL})} \times P$$

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 (%).

Dung dịch chuẩn gốc 10000 µg/mL TBHQ: Cân chính xác khoảng 250 mg các chất chuẩn trên vào các bình định mức 25 mL riêng biệt, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetonitrile. Lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Công thức tính toán nồng độ chất chuẩn như trên.

Chuẩn surrogate: Triphenylphosphate (TPP) được pha trong dung môi Acetonitril và tính toán nồng độ tương tự như trên.

Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn gốc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh bọc giấy bạc, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, sử dụng trong thời gian 3 tháng.

c. Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc

Chuẩn hỗn hợp mix BHA – BHT (**1000 µg/mL**): Từ mỗi dung dịch gốc trên tương ứng lấy 10.00 mL cho vào bình định mức 50 mL, định mức đến vạch với Acetonitrile

Chuẩn hỗn hợp mix BHA-BHT (**100 µg/mL**) và TBHQ (**1000 µg/mL**): Rút 1.00 mL mỗi chuẩn BHA và BHT 5000 µg/mL, và 5ml TBHQ 10000 µg/ml ở trên vào bình mức 50 mL định mức tới vạch bằng Acetonitrile.

Chuẩn hỗn hợp mix BHA-BHT (**10 µg/mL**) và TBHQ (**100 µg/mL**) Rút 0.10 mL mỗi chuẩn BHA và BHT 5000 µg/mL, và 0.50 ml TBHQ 10000 µg/mL ở trên vào bình mức 50 mL định mức tới vạch bằng Acetonitrile.

Chuẩn hỗn hợp mix 1000 BHA-BHT-TBHQ (**1000 µg/mL**): Rút 5.00 ml lần lượt mỗi chuẩn BHA-BHT 5000 µg/mL và 2.50 ml chuẩn TBHQ 10000 µg/mL ở trên vào bình định mức 25 mL.

Chuẩn hỗn hợp mix 100 BHA-BHT-TBHQ (**100 µg/mL**): Rút 1.00 ml chuẩn 1000 µg/mL ở trên vào bình định mức 10 mL.

Dung dịch surrogate TPP 20 **µg/mL**: Rút 200 µL TPP 1000mg/L vào bình định mức 10mL. Sau đó định mức bằng Acetonitril.

Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh bọc giấy bạc, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, sử dụng trong thời gian 1 tháng.

Pha dãy chuẩn làm việc:

GC/MS: Pha các điểm chuẩn có nồng độ 0.1 µg/mL , 0.2 µg/mL , 0.5 µg/mL , 1.0 µg/mL , 2.0 µg/mL , 5.0µg/mL.

Nồng độ dãy chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	0.1	0.2	0.5	1	2	5
$V_{\text{TPP } 20\text{mg/L}}(\mu\text{l})$	100					
$V_{100 \mu\text{g/mL}}(\mu\text{l})$	10	20	50	100	200	500
Thể tích định mức (mL) ACN	10					

VI. 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.
- Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu blank với nồng độ kiểm soát: 10 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 $0 \pm 0.1 \text{ mg/kg}$.
- 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 hoặc metanol. Kiểm tra chất lượng nguồn nước của phòng thí nghiệm. Sử dụng hóa chất và chất chuẩn mới nếu thấy cần thiết.

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 với nồng độ thêm là 10 mg/kg 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

$$H(\%) = \frac{C_s - C}{S} \times 100$$

Trong đó:

H = Độ thu hồi, %

C_s = Nồng độ mẫu thêm chuẩn

C = Nồng độ của mẫu

S = Nồng độ chuẩn spike vào.

VII. Xử lý mẫu

1. Chuẩn bị mẫu:

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

3. Phương pháp tiến hành

Cân 2g (mẫu nhiều béo) hoặc 5 g (mẫu ít béo) đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 mL, thêm 100 µl SS 20 µg/mL .

Mẫu QC-spike: Thêm 4-10 µL dung dịch chuẩn chất chống oxi hóa ở nồng độ 5000 ug/mL vào mẫu blank để kiểm soát hiệu suất thu hồi.

Thêm 10 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), đập nắp, lắc mạnh trong 1 phút.

Thêm tiếp vào 5g hỗn hợp muối MgSO₄ và CH₃COONa theo tỉ lệ MgSO₄:CH₃COONa (4:1), lắc mạnh trong 1 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 150 mg MgSO₄ khan + 0.05 g bột C₁₈, vortex 1-2 phút, ly tâm 3000 vòng /phút (3-5phút).

Hút dịch chiết sạch sau ly tâm vào vial. Phân tích mẫu trên máy GC/MS

VIII. Phân tích

1. Thông số thiết bị

🌈 Điều kiện phân tích GC/MS

- Cột DB-5MS 30m x 0.25mm x 0.25µm
- Khí mang: Heli
- Chương trình nhiệt: 100°C lưu 1 min. Tăng 15°C/min đến 250°C lưu 0min. Cân bằng lò cột 0.5 min. Solvent delay: 5min
- Chế độ tiêm: không chia dòng
- Nhiệt độ buồng tiêm: 250 °C
- Nhiệt độ detector: 280°C

🌈 Điều kiện MS

- Nguồn ion hóa: EI , nhiệt độ 230 °C
- Dòng phát xạ: 34.6 µA
- Chế độ: SIM

STT	Hợp chất	CAS Number	Ion định lượng	Ion định tính
1	BHA	121-00-6	165	137, 180
2	BHT	128-37-0	205	206 , 220
3	TBHQ	1948-33-0	151	123, 166

4. 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.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

Xây dựng các đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích của chuẩn và nồng độ của chuẩn

Hàm lượng chất chống oxy hóa trong mẫu được tính toán theo công thức:

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

C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, ppm

C_o: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, ppm

V_{extract}: thể tích dịch chiết, mL

f: hệ số pha loãng

m: khối lượng cân, g

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):
Giá trị hiệu suất thu hồi các chất được ghi nhận vào control chart sau mỗi lô mẫu phân tích ở mức spike 10 mg/kg .

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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

