

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.264 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 1/6
---	----------------------------------	---

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CHẤT CHỐNG OXY HÓA BHA-
BHT-TBHQ TRONG PHỤ GIA THỰC PHẨM BẰNG HỆ
THỐNG SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI PHỔ (GC/MS)**

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

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1			
2			
3			

A. TỔNG QUAN

I. PHẠM VI ÁP DỤNG

- Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng chất chống oxy hóa trong nền mẫu phụ gia thực phẩm.
- Danh sách các chất phân tích

STT	Hợp chất
1	BHT(Butylated hydroxytoluene)
2	BHA (Butylated hydroxyanisole)
3	TBHQ(tert-Butylhydroquinone)

II. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- QCVN 4-6:2010/BYT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phụ gia thực phẩm - chất chống oxy hóa.

III. NGUYÊN TẮC

- Mẫu được hòa tan trong dung môi Acetonitril (ACN) và được phân tích bằng hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ 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 ACN, aceton 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 50ml và 15mL
- Bình định mức 10 mL
- Micropipet các loại 20 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL
- Ống ly tâm 50 mL, 15 mL.
- Màng lọc 0.45µm, vial và xy lanh.
- Phễu lọc bằng thủy tinh.
- Bếp đun cách thủy.
- Bình cầu 100mL.
- Pipet 5mL.

2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống sắc ký khí ghép khối một tứ cực GCMS 5973 hoặc tương đương.

II. HÓA CHẤT VÀ CHẤT CHUẨN

1. Hóa chất

- Nước cất một lần và nước cất khử ion.
- Dung môi Acetone, Acetonitril hãng J.Backer.

2. Chất chuẩn

- Các chất chuẩn BHA, BHT, TBHQ của Merck hoặc tương đương.
- Các dung dịch chuẩn 100000 mg/kg: cân chính xác khoảng 1g chuẩn rắn vào bình định mức 10 mL riêng biệt, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetonitril.
- 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 (µg/mL).

m là khối lượng cân của chất chuẩn (mg).

V là thể tích định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

- Các dung dịch chuẩn 1000 mg/kg: cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn rắn vào bình định mức 10 mL riêng biệt, hoà tan và định mức đến vạch bằng Acetonitril.
- Bảo quản và lưu trữ:
 - Dung dịch chuẩn gốc lưu ở 2-8⁰C, sử dụng trong thời gian 1 năm.
 - Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc và đường chuẩn sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (8⁰C), sử dụng trong thời gian 6 tháng,

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.
- Mẫu QC: Mẫu spike trên nền mẫu blank với nồng độ kiểm soát 0.5 mg/kg

IV. Phân tích mẫu

1. Xử lý mẫu

- Cân chính xác khoảng 10 mg mẫu và chuẩn cho vào các bình định mức 10 mL riêng biệt.
- Hòa tan mẫu bằng Acetonitril và định mức lên 10 mL. Lọc mẫu vào vial

2. Phân tích trên GCMS.

a. Điều kiện phân tích GC/MS

- Cột DB-5MS (30 m x 0.25mm x 0.25 μ m)
- Khí mang: Heli

- Chương trình nhiệt: 60 °C (2 phút), tăng 12 °C/phút đến 120 °C (3 phút), tăng 12 °C/phút đến 220 °C (1 phút).
- Chế độ tiêm: không chia dòng.
- Tốc độ dòng: 2.3 ml/phút ở chế độ đẳng áp P=22.6 PSI tại 90 °C.
- Nhiệt độ buồng tiêm: 220 °C.
- Nhiệt độ transferline: 220 °C.

b. Điều kiện MS

- Nguồn ion hóa: EI , nhiệt độ 220 °C
- Dòng phát xạ: 34.6 μ A
- Tử cực: nhiệt độ 280 °C
- Chế độ: SIM

St t	Hợp chất	Ion định lượng	Ion định tính	
1	BHA	205	206	220
2	BHT	180	165	137
3	TBHQ	123	166	153

3. 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

- Hàm lượng chất phân tích trong mẫu được tính toán theo công thức:

$$C_m = \frac{S_m}{S_{STD}} \times C_{STD} \times f \times 100$$

- C_m : hàm lượng chất chống oxy hóa, %.
- C_{STD} : nồng độ chất chuẩn, %
- S_m : diện tích peak của mẫu

- S_{std} : diện tích peak của chuẩn
- f : hệ số pha loãng (nếu có)

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- %RSD bé hơn 15%
- Tỷ số ion: Cường độ tương đối của ion định tính 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%

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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