

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 10114:2013**

**ISO 15302:2007**

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG BENZO[A]PYREN –  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO PHA ĐẢO**

*Animal and vegetable fats and oils – Determination of  
benzo[a]pyrene – Reverse-phase high-performance liquid  
chromatography method*

HÀ NỘI - 2013

**Lời nói đầu**

TCVN 10114:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 15302:2007;

TCVN 10114:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F2  
*Dầu mỡ động vật và thực vật biến. soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo  
lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.*

**Dầu mỡ động vật và thực vật –  
Xác định hàm lượng benzo[a]pyren –  
Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo**

*Animal and vegetable fats and oils – Determination of benzo[a]pyrene –  
Reverse-phase high-performance liquid chromatography method*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng benzo[a]pyren trong dầu và mỡ thô hoặc đã tinh luyện bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo sử dụng detector huỳnh quang trong dải từ 0,1 µg/kg đến 50 µg/kg.

## 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6128 (ISO 661), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị mẫu thử*.

## 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

### 3.1

**Hàm lượng benzo[a]pyren (benzo[a]pyrene content)**

Phần khối lượng của benzo[a]pyren trong mẫu thử, xác định được bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng benzo[a]pyren biểu thị bằng microgam trên kilogam.

#### 4 Nguyên tắc

Phân mẫu thử được hòa tan trong dầu nhẹ và benzo[*b*]chrysen được bổ sung vào làm chất chuẩn nội. Một lượng mẫu thích hợp được hấp phụ lên cột nhôm oxit, sau đó được rửa giải bằng dầu nhẹ để thu được benzo[*a*]pyren có mặt.

#### 5 Thuộc thử

Sử dụng các thuộc thử tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác. Khi sử dụng các dung môi phân tích khác với khuyến cáo thì cần tiến hành phép thử trắng và báo cáo các kết quả của phép thử trắng này.

**CẢNH BÁO AN TOÀN – Cần chú ý đến các quy định đối với việc xử lý các chất nguy hại. Người sử dụng phải hiểu biết và phải tuân thủ các biện pháp kỹ thuật an toàn đối với tổ chức và cá nhân.**

**5.1 Nước**, đã được cất hai lần, và được lọc qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 µm; có thể sử dụng nước đã loại ion thu được bằng hệ thống tinh lọc loại khoáng.

**5.2 Dầu nhẹ**, (dãi sôi từ 40 °C đến 60 °C) hoặc hexan đã được chưng cất lại trên kali hydroxit dạng viên (4 g/l).

**5.3 Axetonitril**, thích hợp dùng cho HPLC.

**5.4 Tetrahydrofuran**, thích hợp dùng cho HPLC.

**5.5 Hỗn hợp axetonitril-tetrahydrofuran**, được chuẩn bị bằng cách trộn 90 ml axetonitril (5.3) và 10 ml tetrahydrofuran (5.4).

**5.6 Toluene**, thích hợp dùng cho HPLC.

**5.7 Natri sulfat**, dạng hạt, khan.

**5.8 Nhôm oxit hoạt độ loại 4**, được chuẩn bị từ nhôm oxit trung tính, hoạt độ loại 1<sup>1)</sup>, được khử hoạt tính bằng cách bổ sung 10 ml nước cất (5.1) vào 90 g nhôm oxit.

Do sự khác nhau về hoạt độ của các loại nhôm oxit nên cần phải kiểm tra để khẳng định qui trình khử hoạt tính thích hợp đối với độ thu hồi tổng số của benzo[*a*]pyren từ mẫu chuẩn.

---

<sup>1)</sup> "Nhôm oxit trung tính 90" là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

**CẢNH BÁO – Phản ứng khử hoạt tính có thể tỏa nhiệt và tạo áp lực.**

Lắc vật chứa khoảng 15 min và để cho cân bằng trong 24 h. Bảo quản nhôm oxit trong bình chứa kín ở nhiệt độ môi trường.

**5.9 Benzo[a]pyren<sup>2)</sup>, có độ tinh khiết 99,0 % khối lượng.**

**CẢNH BÁO - Benzo[a]pyren là chất gây ung thư, cần tiến hành mọi thao tác trong tủ hút, mang găng tay để giảm thiểu việc tiếp xúc.**

**5.9.1 Dung dịch gốc benzo[a]pyren trong toluen 0,5 mg/ml**

Cân khoảng 12,5 mg benzo[a]pyren, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình chia vạch 25 ml. Hòa tan trong toluen (5.6) và thêm dung môi đến vạch.

Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C ở nơi tối có thể bền ít nhất 6 tháng.

**5.9.2 Dung dịch chuẩn benzo[a]pyren**

Chuẩn bị hai dung dịch chuẩn chứa khoảng 0,2 µg/ml và 0,01 µg/ml benzo[a]pyren tương ứng, bằng cách pha loãng dung dịch gốc (5.9.1) với axetonitril.

**5.10 Dung dịch chất chuẩn nội benzo[b]chrysen<sup>3)</sup> trong axetonitril**

Chuẩn bị dung dịch gốc chứa khoảng 10 ng/µl. Pha loãng dung dịch này với hệ số pha loãng bằng 10 trong bình định mức, chính xác đến nanogram, để thu được dung dịch chuẩn nội có nồng độ khoảng 1 ng/µl.

CHÚ THÍCH: Dung dịch này có thể được chuẩn bị bằng cách hòa tan benzo[b]chrysen<sup>3)</sup> 99,0 % khối lượng trong axetonitril.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

**6.1 Cột thủy tinh dùng cho sắc ký, dài 300 mm, đường kính trong 15 mm, được gắn với đĩa thủy tinh thiêu kết và van khóa bằng polytetrafluoroetylen (PTFE).**

<sup>2)</sup> Vật liệu chuẩn thích hợp có bán sẵn từ Trung tâm nghiên cứu của Ủy ban châu Âu, Viện nghiên cứu về Vật liệu và các phép đo chuẩn (IRMM). Thông tin đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

<sup>3)</sup> Vật liệu chuẩn thích hợp có bán sẵn từ Trung tâm nghiên cứu của Ủy ban châu Âu, Viện nghiên cứu về Vật liệu và các phép đo chuẩn (IRMM) hoặc Dr Ehrenstorfer. Thông tin đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

## TCVN 10114:2013

**6.2 Nồi cách thủy**, một nồi duy trì được nhiệt độ ở  $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$  và một nồi khác duy trì ở  $(65 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

### 6.3 Bộ cô quay

Có thể sử dụng bộ cô quay chân không và nồi cách thủy duy trì được nhiệt độ ở  $40^\circ\text{C}$ . Cần tiến hành cẩn thận tránh bị nhiễm chéo. Làm sạch hoàn toàn hệ thống sau mỗi lần xác định.

**6.4 Sắc ký lỏng hiệu năng cao**, gồm có bơm HPLC, van bơm với vòng lấy mẫu 50  $\mu\text{l}$ , cột pha đảo, bộ tích phân điện tử và bộ ghi biểu đồ.

Nếu dùng bộ lấy mẫu tự động thì vòng bơm mẫu phải được rửa bằng axetonitril giữa các lần bơm liên tiếp.

### 6.5 Cột dùng cho phân tích HPLC

**6.5.1 Cột bảo vệ pha đảo**, có thể phân giải benzo[a]pyren ra khỏi các chất chiết cùng, có tiền cột thích hợp [ví dụ: tiền cột bằng thép không gỉ dài 75 mm và đường kính trong 4,6 mm, được nhồi bằng Lichrosorb RP-18 (kích cỡ hạt 5  $\mu\text{m}$ )]<sup>4)</sup>.

**6.5.2 Cột pha đảo HPLC**, dài 250 mm, đường kính trong 4,6 mm (thép không gỉ), dùng cho hydrocacbon thơm đa vòng (PAH) (ví dụ: Chromspher 5 PAH hoặc Vydac 201 TP5)<sup>4)</sup>.

**6.6 Detector huỳnh quang**, có bước sóng phát xạ ở 406 nm (độ rộng khe 10 nm) và bước sóng kích thích ở 384 nm (độ rộng khe 10 nm). Detector phải thích hợp để thực hiện các yêu cầu của phép phân tích.

**6.7 Lọ nhỏ có nắp dập**, dung tích khoảng 1 ml, có septum lót màng PTFE và nắp dập bằng nhôm.

**6.8 Dụng cụ dập nắp lọ**, dùng để dập nắp vào lọ nhỏ.

**6.9 Pipet dùng một lần.**

## 7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555)<sup>(1)</sup>.

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6128 (ISO 661).

---

<sup>4)</sup> Ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Làm sạch mẫu

9.1.1 Cân khoảng 0,400 g mẫu dầu hoặc mỡ, chính xác đến 0,001 g, cho vào cốc có mô bằng thủy tinh và hòa tan trong 2 ml dầu nhẹ (5.2). Dùng microxyranh thêm 20 µl dung dịch chất chuẩn nội (5.10). Dung dịch này tương đương 50 µg/kg khi tính theo khối lượng mẫu. Nếu dự kiến mức benzo[a]pyren cao hơn thì thêm 50 µl dung dịch chất chuẩn nội (5.10). Dung dịch này tương đương 125 µg/kg khi tính theo khối lượng mẫu.

9.1.2 Đổ dầu nhẹ (5.2) vào cột sắc ký (6.1) đến nửa chiều cao cột. Cân nhanh 22 g nhôm ôxit (5.8) cho vào cốc có mô nhỏ và chuyển ngay nhôm ôxit vào cột, gõ nhẹ cột để nén chặt nhôm ôxit.

9.1.3 Thêm natri sulfat khan (5.7) lên đỉnh cột để tạo một lớp dày khoảng 30 mm.

9.1.4 Mở khóa và để cho dầu nhẹ chảy đến mức ngang bằng lớp natri sulfat.

9.1.5 Đặt bình chia vạch 20 ml vào dưới cột.

9.1.6 Chuyển dung dịch dầu (9.1.1) lên cột. Tráng cột bằng các lượng nhỏ dầu nhẹ (5.2), để cho lớp dung môi chảy vào lớp natri sulfat giữa mỗi lần tráng rửa.

9.1.7 Rửa giải cột bằng dầu nhẹ với tốc độ dòng khoảng 1 ml/min, loại bỏ 20 ml dịch rửa giải đầu tiên và thu lấy khoảng 60 ml dịch rửa giải tiếp theo cho vào bình cầu đáy tròn 100 ml.

9.1.8 Cho bay hơi dịch rửa giải trên nồi cách thủy ở nhiệt độ 65 °C cho đến khi thể tích còn khoảng 0,5 ml đến 1,0 ml và chuyển dung dịch đã cô đặc vào lọ nhỏ có nắp đậy (6.7) đã được cân trước, chính xác đến 0,1 mg.

9.1.9 Tiếp tục cho bay hơi ra khỏi lọ nhỏ trên nồi cách thủy (6.2) ở nhiệt độ 35 °C dưới dòng nitơ nhẹ (khoảng 25 ml/min) cho đến khi gần khô. Tráng bình đáy tròn với khoảng 1 ml dầu nhẹ và chuyển lượng tráng vào lọ nhỏ, tiếp tục cho bay hơi dưới dòng khí nitơ. Lặp lại quá trình tráng và chuyển hết vào lọ nhỏ.

9.1.10 Tiếp tục bay hơi ở 35 °C dưới dòng khí nitơ đến khô.

9.1.11 Cân lọ, chính xác đến 0,1 mg và tính khối lượng của cặn. Đậy nắp lọ bằng septum có lớp PTFE và nắp đậy bằng nhôm và bảo quản ở 4 °C.

### 9.2 Sắc ký lỏng hiệu năng cao

9.2.1 Dùng hỗn hợp 880 ml axetonitril (5.3) và 120 ml nước (5.1) làm dung môi rửa giải. Loại khí dung môi rửa giải để loại bỏ ôxi sao cho tránh tắt huỳnh quang. Sử dụng heli tinh khiết hoặc bình khử khí chân không trực tiếp.

9.2.2 Rửa giải ở tốc độ dòng khoảng 1 ml/min.

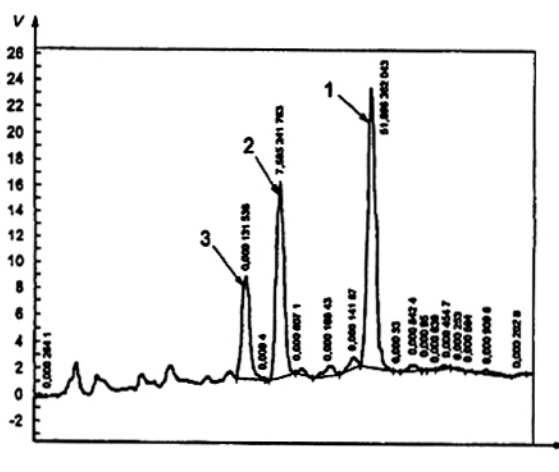
9.2.3 **Đường chuẩn và phép xác định hệ số đáp ứng tương đối:** Chuẩn bị năm dung dịch pha loãng của dung dịch chuẩn benzo[a]pyren (5.9.2) sao cho khi bơm 50 µl từng dung dịch sẽ cho các số đọc tương ứng 0,01 ng, 0,04 ng, 0,2 ng, 1,0 ng và 2,0 ng benzo[a]pyren. Thêm vào dung dịch chuẩn này 0,5 ng chất chuẩn nội. Từ đó, dựng đường chuẩn của năm điểm sử dụng diện tích pic từ máy tích phân và máy ghi biểu đồ. Đường chuẩn này cũng được sử dụng để tính hệ số đáp ứng tương đối (10.1) giữa benzo[a]pyren và chất chuẩn nội.

### 9.3 Phân tích mẫu

9.3.1 Bơm 250 µl hỗn hợp axetonitril-tetrahydrofuran (5.5) vào lọ nhỏ chứa cặn đã làm sạch (9.1.11). Hòa tan cặn bằng cách khuấy cẩn thận, tránh để dung môi tiếp xúc với septum.

Với đường chuẩn (9.2.3) có thể xác định được benzo[a]pyren với mức từ 0,1 µg/kg đến 50 µg/kg. Đối với nồng độ trên 10 µg/kg, phải pha loãng tiếp dung dịch cặn (9.3.2) bằng dung dịch axetonitril-tetrahydrofuran (5.5), hoặc bơm lượng nhỏ hơn 50 µl (9.3.2).

9.3.2 Bơm một lượng khoảng 50 µl cặn đã hòa tan lên trên cột HPLC và bắt đầu chạy sắc ký. Tiến hành cẩn thận để đảm bảo rằng không đưa quá 1,5 mg cặn vào cột. Nếu có mặt lượng cặn lớn hơn thì cần điều chỉnh lượng tetrahydrofuran (5.4) hoặc phải lặp lại bước làm sạch.



### CHÚ DẪN

V HPLC hấp thụ, tính bằng mV

t thời gian, tính bằng phút

1 benzo[b]chrysen (chất chuẩn nội)

2 benzo[a]pyren

3 benzo[k]fluoranthen

Hình 1 – Sắc ký đồ điển hình



## 10 Biểu thị kết quả

### 10.1 Tính hệ số đáp ứng tương đối

Từ dữ liệu thu được (9.2.3), tính hệ số đáp ứng tương đối,  $f_{rr}$ , tính trung bình cộng của năm điểm chuẩn, sử dụng Công thức (1):

$$f_{rr} = \frac{A_{is} \rho_{BaP}}{A_{BaP} \rho_{is}} \quad (1)$$

Trong đó:

$A_{BaP}$  là diện tích pic của benzo[a]pyren;

$A_{is}$  là diện tích pic của dung dịch chất chuẩn nội;

$\rho_{BaP}$  là nồng độ của benzo[a]pyren, tính bằng microgam trên lít ( $\mu\text{g/l}$ );

$\rho_{is}$  là nồng độ của dung dịch chất chuẩn nội, tính bằng microgam trên lít ( $\mu\text{g/l}$ );

### 10.2 Tính hàm lượng benzo[a]pyren

Tính hàm lượng benzo[a]pyren,  $w_{BaP}$ , của mẫu thử, tính bằng microgam trên kilogam, sử dụng Công thức (2):

$$w_{BaP} = \frac{A_{BaP}}{A_{is}} \rho_{is} \frac{1}{m} f_{rr} \quad (2)$$

Trong đó:

$f_{rr}$  là hệ số đáp ứng trung bình, tính được từ các dung dịch chuẩn (10.1);

$m$  là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

$\rho_{is}$  là nồng độ của dung dịch chất chuẩn nội được bổ sung để rửa giải, tính bằng nanogam trên lít ( $\text{ng/l}$ );

Hàm lượng benzo[a]pyren được biểu thị đến một chữ số thập phân đối với hàm lượng từ 0  $\mu\text{g/kg}$  đến 10  $\mu\text{g/kg}$ , tính bằng microgam trên kilogam, và chính xác đến số nguyên đối với các hàm lượng lớn hơn 10  $\mu\text{g/kg}$ .

## 11 Độ chụm

### 11.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập, đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực

## **TCVN 10114:2013**

hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại,  $r$ , nêu trong Bảng A.1.

### **11.2 Độ tái lập**

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống thử giống hết nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập,  $R$ , nêu trong Bảng A.1.

## **12 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) các kết quả thu được;
- f) nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm**

Phép thử cộng tác quốc tế bao gồm 16 phòng thử nghiệm của 7 quốc gia tham gia, tiến hành trên ba mẫu với các hàm lượng benzo[a]pyren khác nhau (cao, trung bình và thấp). Các kết quả của năm phòng thử nghiệm không được xem xét vì không theo qui trình của phương pháp, mà sử dụng phương pháp nội bộ.

Phép thử được Dutch Member Body tổ chức năm 2006 và cho các kết quả thống kê theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)<sup>[2]</sup> về dữ liệu độ chụm nêu trong Bảng A.1.

**Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng**

Mẫu	Thấp	Trung bình	Cao
Số phòng thử nghiệm tham gia	11	11	11
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	9	9	9
Số lượng kết quả từ các phòng thử nghiệm được giữ lại	18	18	18
Giá trị trung bình, $\mu\text{g/kg}$	2,12	38,02	58,30
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ , $\mu\text{g/kg}$	0,12	0,76	2,04
Hệ số biến thiên lặp lại, $CV(r)$ , %	5,8	2,0	3,5
Giới hạn lặp lại, $r (= 2,8 s_r)$ , $\mu\text{g/kg}$	0,34	2,12	5,72
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , $\mu\text{g/kg}$	0,55	6,23	8,37
Hệ số biến thiên tái lập, $CV(R)$ , %	26,9	16,4	14,4
Giới hạn tái lập, $R (= 2,8 s_R)$ , $\mu\text{g/kg}$	1,54	17,44	23,4

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 2625 (ISO 5555), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
  - [2] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
-