

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9520:2012**

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH CROM, SELEN VÀ MOLYBDEN  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHỔ KHỐI LƯỢNG PLASMA  
CẢM ỨNG CAO TẦN (ICP-MS)**

*Foodstuffs – Determination of chromium, selenium and molybdenum  
by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)*

**HÀ NỘI – 2012**

## Lời nói đầu

TCVN 9520:2012 được xây dựng trên cơ sở AOAC 2011.19 *Chromium, selenium, and molybdenum in infant formula and adult nutritional products. Inductively coupled plasma/mass spectrometry.*

TCVN 9520:2012 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Thực phẩm – Xác định crom, selen và molybden bằng phương pháp phổ khối lượng plasma cảm ứng cao tần (ICP-MS)

*Foodstuffs – Determination of chromium, selenium and molybdenum by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phổ khối lượng plasma cảm ứng cao tần (ICP-MS) để xác định crom, selen và molybden trong thức ăn công thức và các sản phẩm dinh dưỡng dành cho trẻ nhỏ.

### 2 Nguyên tắc

Phản mẫu thử được phân hủy ở nhiệt độ cao bằng axit nitric trong lò vi sóng có bình kín ở nhiệt độ 200 °C. Dung dịch thử mẫu được phân hủy hoặc được pha loãng thích hợp, rồi đưa vào thiết bị ICP-MS đã được chuẩn hóa bằng axit phù hợp với dung dịch hiệu chuẩn.

Dung dịch đệm ion hóa (kali) được dùng để giảm thiểu ảnh hưởng của nguyên tố có thể dễ bị ion hóa (EIE). Metanol được thêm vào để ổn định hàm lượng cacbon; niken và telua được dùng làm chất chuẩn nội.

### 3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước sử dụng phải là nước có điện trở là 18 MΩ, trừ khi có quy định khác.

**CHÚ Ý** Cần có các cảnh báo an toàn trong phòng thử nghiệm thông thường (áo và kính an toàn) khi xử lý axit đậm đặc, bazơ đậm đặc và các dung môi hữu cơ. Ngoài ra, cần trang bị mặt nạ, găng tay cao su và tạp dề. Sử dụng tủ hút để tránh hít phải khí độc.

3.1 Axit nitric (HNO<sub>3</sub>) đậm đặc, nồng độ từ 65 % đến 70 %, không chứa các kim loại dạng vết.

3.2 Hydro peroxit ( $H_2O_2$ ), 30 %.

3.3 Metanol, độ tinh khiết 99,99 %.

3.4 Dung dịch kali trong axit nitric, nồng độ 10 000 mg/l.

3.5 Dung dịch chuẩn đa nguyên tố Cr, Mo và Se trong axit nitric

3.5.1 Dung dịch chuẩn gốc, nồng độ crom, molybden và selen trong axit nitric tương ứng là 2 mg/l, 2 mg/l và 1 mg/l.

3.5.2 Dung dịch chuẩn trung gian

Từ dung dịch chuẩn gốc (3.5.1), chuẩn bị dung dịch chuẩn trung gian có nồng độ crom, molybden và selen tương ứng là 40 ng/ml, 40 ng/ml và 20 ng/ml.

3.5.3 Dung dịch chuẩn làm việc

Từ dung dịch chuẩn trung gian (3.5.2), chuẩn bị tối thiểu ba dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ crom, molybden tương ứng là 0,8 ng/ml, 4,0 ng/ml, 20 ng/ml và nồng độ selen là 0,4 ng/ml, 2,0 ng/ml, 10 ng/ml.

3.6 Dung dịch chuẩn nội niken và telua trong axit nitric, nồng độ 5 mg/l.

## 4 Thiết bị, dụng cụ

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

### 4.1 Lò vi sóng

Lò vi sóng được thiết kế cho phòng thử nghiệm sử dụng ở nhiệt độ từ 0 °C đến 300 °C, có hệ thống bình phân hủy kín và có khả năng kiểm soát sự tăng nhiệt độ. Nên dùng bình chịu được áp suất tối đa vì các nguyên liệu hữu cơ và muối cacbonat nếu không có đủ thời gian để phân hủy thì sẽ tạo ra áp suất lớn trong quá trình phân hủy.

Bình phải được thiết kế sao cho quá trình thực hiện chỉ dùng 6 ml thể tích dung dịch hoặc thể tích phải được điều chỉnh phù hợp. Tiến hành thông khí theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

**CẢNH BÁO:** Khi vận hành lò vi sóng có dung dịch axit đặc với áp suất cao thì phải dùng mặt nạ và quần áo bảo vệ thích hợp.

Các thông số của thiết bị được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Các thông số của thiết bị ICP-MS

Các điều kiện vận hành đặc trưng	
Công suất cao tần, W	1600
Điều hợp cao tần, V	1,8
Độ sâu lấy mẫu, mm	9
Thấu kính tách 1, V	0
Khí mang, l/min	0,9
Khí phụ trợ, l/min	0,2
Đầu phun sương nhu động (thủy tinh đồng tâm)	MicroMist <sup>1)</sup>
Nhiệt độ khoang phun, °C	2
Giao diện hình nón	Ni
Tốc độ dòng khí heli, ml/min	4,5
Tốc độ dòng khí hydro, ml/min	4,2
Tốc độ bơm nhu động, r/s	0,1 (0,5 ml/min)
Chất phân tích/chất chuẩn nội/loại khí	<sup>52</sup> Cr, <sup>95</sup> Mo/ <sup>60</sup> Ni, /He <sup>78</sup> Se/ <sup>130</sup> Te/H <sub>2</sub>

#### 4.2 Máy đo phổ khối lượng plasma cảm ứng, có buồng va chạm phản ứng (CRS)

#### 4.3 Các dụng cụ bằng chất dẻo và pipet.

#### 4.4 Tủ hút.

#### 4.5 Lọ đựng mẫu, dung tích 50 ml.

### 5 Lấy mẫu

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

<sup>1)</sup> MicroMist là sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này, có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

## 6 Cách tiến hành

### 6.1 Chuẩn bị mẫu thử

#### 6.1.1 Đối với mẫu dạng bột

Hoàn nguyên khoảng 25 g mẫu trong 200 ml nước ấm (60 °C). Cân chính xác khoảng 1,8 g phần mẫu thử đã hoàn nguyên cho vào bình phân hủy. Mẫu đại diện này chứa khoảng 0,2 g mẫu bột ban đầu.

#### 6.1.2 Đối với mẫu dạng lỏng

Cân chính xác khoảng 1 g phần mẫu thử đã trộn, trực tiếp vào bình phân hủy.

Đối với việc phân hủy một bước (hai giai đoạn trong chương trình của lò vi sóng), thêm 0,5 ml dung dịch chuẩn nội niken và telua nồng độ 5 mg/l (3.6) và 5 ml axit nitric đậm đặc (3.1) sau đó thêm 2 ml hydro peroxit (3.2) vào bình phân hủy của lò vi sóng (4.1). Lắp kín bình theo hướng dẫn của nhà sản xuất và đặt vào lò vi sóng.

Nâng nhiệt độ từ nhiệt độ môi trường đến 180 °C trong 20 min, giữ nhiệt 20 min ở giai đoạn 1. Ở giai đoạn 2, lò vi sóng tự động nâng nhiệt đến 200 °C trong 20 min và giữ nhiệt ở 20 min. Các thông số vận hành của lò vi sóng được quy định trong Bảng 2.

**Bảng 2 – Các thông số vận hành của quy trình phân hủy mẫu**

<b>Giai đoạn 1</b>		
1	Công suất	100 % (1600 W)
2	Nâng nhiệt độ	20 min
3	Thời gian giữ nhiệt	20 min
4	Nhiệt độ	180 °C
5	Làm mát	20 min
<b>Giai đoạn 2</b>		
1	Công suất	100 % (1600 W)
2	Nâng nhiệt độ	20 min
3	Thời gian giữ nhiệt	20 min
4	Nhiệt độ	200 °C
5	Làm mát	20 min

Đối với lò vi sóng không có chương trình gồm hai giai đoạn thì sẽ tiện lợi hơn nếu sử dụng chương trình phân hủy hai bước. Thêm 0,5 ml dung dịch nội chuẩn niken và telua nồng độ 5 mg/l (3.6) và 5 ml axit nitric đậm đặc (3.1). Cài đặt công suất thích hợp cho lò vi sóng và số bình, nâng nhiệt độ từ nhiệt độ môi trường đến 200 °C trong 20 min. Giữ nhiệt độ ở 200 °C trong 20 min. Làm nguội bình theo hướng dẫn của nhà sản xuất, khoảng 20 min. Mở từ từ bình chứa, cho bay hơi khí nitơ dioxit có màu nâu.

**CẢNH BÁO:** Quá trình bay hơi phải được tiến hành trong tủ hút (4.4) do nitơ dioxit là chất rất độc.

Thêm 1 ml hydro peroxit (3.2) và phân hủy lại mẫu bằng cách nâng nhiệt độ từ nhiệt độ môi trường đến 180 °C trong 15 min. Giữ ở 180 °C trong 15 min và làm nguội trong 20 min.

## 6.2 Chuẩn bị dung dịch thử

Thêm khoảng 20 ml nước vào bình chứa mẫu đã phân hủy và chuyển vào lọ đựng mẫu dung tích 50 ml (4.5). Tráng bình và chuyển nước tráng vào lọ đựng mẫu. Thêm 0,5 ml metanol (3.3) vào lọ đựng mẫu và pha loãng bằng nước đến khoảng 50 ml.

## 6.3 Phép xác định

Phân tích dung dịch thử bằng thiết bị ICP-MS đã được chuẩn hóa bằng các dung dịch chuẩn. Niken dùng làm chất chuẩn nội cho cả crom và molybden (khí heli) và telua được dùng làm chất chuẩn nội cho selen (khí hydro). Phân tích dung dịch chuẩn làm việc nồng độ crom và molybden 4 ng/ml và nồng độ selen 2 ng/ml hoặc dung dịch kiểm soát chất lượng phù hợp khác sau 10 phần mẫu thử để kiểm tra độ chệch và độ tuyến tính của thiết bị (kết quả quy định là 100 % ± 5 %).

Phép thử trắng (chạy một mẫu), mẫu kép [sai số tương đối (RPD) ≤ 10 %], và mẫu chuẩn đã biết làm mẫu đối chứng (kiểm tra độ thu hồi trong giới hạn kiểm soát) là bắt buộc đối với quy trình thực hành phương pháp tốt. Nếu bất kỳ mẫu kiểm soát nào không đạt chất lượng thì kết quả tính có thể không đúng và cần được đánh giá khẳng định lại.

## 7 Tính kết quả

Nồng độ mẫu tự động được tính theo phần mềm ChemStation sử dụng phép phân tích hiệu chỉnh hồi quy tuyến tính bình phương nhỏ nhất không trọng lượng để thu được đường tuyến tính thích hợp nhất:

$$y = ax + b$$

Nồng độ chất phân tích có trong mẫu thử,  $X$ , biểu thị bằng nanogram trên gam (ng/g), được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{Y - b}{a} \times DF$$

Trong đó:

- Y là tỷ lệ đặc trưng của mẫu, tính bằng nanogam trên mililit (ng/ml), là số đếm đo được của từng điểm dữ liệu của dung dịch chuẩn phân tích trên đường chuẩn được chia theo tỷ lệ số đếm/nồng độ chất chuẩn nội ở cùng mức quy định;
- b là dung dịch chuẩn trắng, tính bằng nanogam trên mililit (ng/ml), là số đếm đo được từng điểm dữ liệu của dung dịch chuẩn trắng trên đường chuẩn chia theo tỷ lệ số đếm/nồng độ chất chuẩn nội ở cùng mức quy định như dung dịch chuẩn trắng;
- a điểm uốn của đường chuẩn;

DF là hệ số pha loãng của dung dịch mẫu so với khối lượng mẫu, tính bằng mililit trên gam (ml/g).

## 8 Đánh giá phương pháp

### 8.1 Khoảng tuyến tính

Tất cả đường chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng phép phân tích hồi quy tuyến tính bình phương nhỏ nhất không trọng lượng và các giá trị hệ số tương quan ( $r$ ) được tính cho từng đường chuẩn. Mỗi đường chuẩn được xây dựng bằng bốn dung dịch chuẩn đa nguyên tố, bao gồm cả dung dịch chuẩn trắng. Cần lưu ý rằng tất cả các nồng độ phân tích trong mẫu phải nằm trong dải tuyến tính của đường chuẩn và trên giới hạn tuyến tính thấp hơn đã được thiết lập.

### 8.2 Giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn định lượng là nồng độ thấp nhất của chất phân tích trong mẫu mà có thể được định lượng chính xác bằng thiết bị. Giá trị LOQ của phương pháp thường được xác định bằng cách nhân SD trung bình của 10 mẫu thử với hệ số của 10 và LOQ của thiết bị được xác định bằng cách nhân giới hạn phát hiện (LOD) của thiết bị với 3. Tuy nhiên trong phương pháp này, LOQ hữu dụng hoặc LOQ thực tế (PLOQ) được xác định thấp hơn giá trị giới hạn tuyến tính của đường chuẩn do độ chính xác và độ chụm của mẫu cần đo có thể không chắc chắn.

Hầu hết các sản phẩm dinh dưỡng có bổ sung khoáng chất như crom, selen và molybden, cần được pha loãng trước khi phân tích.

### 8.3 Chuẩn hóa nền bằng metanol

Sự có mặt của cacbon (hợp chất hữu cơ) trong dung dịch phân tích làm tăng tín hiệu của selen trong quá trình phân tích bằng ICP-MS. Để xác định nồng độ tối ưu của metanol (nguồn cacbon), cần bổ sung để tăng tín hiệu của selen, nồng độ metanol khác nhau được thêm vào cho cả các chất chuẩn hiệu chỉnh và mẫu phân hủy.

#### 8.4 Ảnh hưởng của các EIE

Nhiều sản phẩm dinh dưỡng chứa mức EIE đáng kể như canxi, natri, kali, magie. Do đó, cả dung dịch mẫu trắng và dung dịch chứa crom, molybden nồng độ 4 ng/ml và selen nồng độ 2 ng/ml (3.5.2) có và không có EIE được phân tích để xác định bất kỳ sự thay đổi nào về nồng độ các chất phân tích.

#### 8.5 Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của phương pháp là khả năng để đo chính xác chất phân tích khi có mặt các thành phần khác trong mẫu nền mà có thể làm nhiễu phổ. Để chứng minh sự đặc trưng của phương pháp thì dung dịch trắng không phân hủy được thêm chuẩn bằng các dung dịch đa nguyên tố ở các nồng độ đại diện cho các sản phẩm dinh dưỡng trong các mẫu để phân tích ICP-MS. Sử dụng loại khí hydro đặc trưng cho selen và khí heli đặc trưng cho crom và molybden.

### 9 Độ chụm

Các giá trị của độ lệch chuẩn tương đối tái lập trong ngày và giữa các ngày phân tích được xác định bằng cách phân tích hai mẫu kiểm soát phòng thử nghiệm nội bộ. Độ chụm trong ngày được xác định bằng cách phân tích các mẫu kiểm soát phòng thử nghiệm kép trong mỗi ngày và độ chụm giữa các ngày phân tích đo được bằng cách sử dụng các kết quả trung bình của mẫu kép phân tích được của từng ngày trong 10 ngày khác nhau.

### 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đó sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đó sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết 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) kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Lawrence H. Pacquette, Andre Szabo, Joseph J. Thompson, and Steve Baugh: *Application of Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry for the Measurement of Chromium, Selenium, and Molybdenum in Infant Formula and Adult Nutritional Products*, J. AOAC International Vol. **95**, No. 3, 2012
-