

Lời nói đầu

TCVN 8170-4 : 2009 hoàn toàn tương đương với EN 1528-4 : 1996;

TCVN 8170-4 : 2009 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.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8170 (EN 1528), *Thực phẩm chứa chất béo – Xác định thuốc bảo vệ thực vật và polycyclobiphenyl (PCB) gồm các phần sau đây:*

- TCVN 8170-1 : 2009 (EN 1528-1 : 1996), *Phần 1: Yêu cầu chung;*
- TCVN 8170-2 : 2009 (EN 1528-2 : 1996), *Phần 2: Chiết chất béo, thuốc bảo vệ thực vật, PCB và xác định hàm lượng chất béo;*
- TCVN 8170-3 : 2009 (EN 1528-3 : 1996), *Phần 3: Phương pháp làm sạch;*
- TCVN 8170-4 : 2009 (EN 1528-4 : 1996), *Phần 4: Phương pháp xác định, phép thử khẳng định và các qui trình khác.*

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này bao gồm các phương pháp thử đa dư lượng như nhau: không có phương pháp riêng lẻ nào có thể được nhận biết là phương pháp tốt nhất vì trong lĩnh vực này các phương pháp này sẽ tiếp tục hoàn thiện. Các phương pháp được chọn trong tiêu chuẩn này đã được kiểm tra xác nhận và được sử dụng rộng rãi trong Châu Âu. Bất kỳ thay đổi nào trong các phương pháp được sử dụng cũng cần cho các kết quả tương đương.

Thực phẩm chứa chất béo –

Xác định thuốc bảo vệ thực vật và polyclobiphenyl (PCB) –

Phần 4: Phương pháp xác định, phép thử khẳng định

và các qui trình khác

Fatty food – Determination of pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) –

Part 4: Determination, confirmatory tests, miscellaneous

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn về một số kỹ thuật được khuyến cáo để xác định dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và các hợp chất polyclobiphenyl (PCB) trong thực phẩm chứa chất béo, các phép thử khẳng định và đưa ra qui trình làm sạch để loại lipid khi phân tích các lượng lớn chất béo.

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 8170-1 : 2009 (EN 1528-1 : 1996), *Thực phẩm chứa chất béo – Xác định thuốc bảo vệ thực vật và polyclobiphenyl (PCB) – Phần 1: Yêu cầu chung.*

TCVN 8170-2 : 2009 (EN 1528-2 : 1996), *Thực phẩm chứa chất béo – Xác định thuốc bảo vệ thực vật và polyclobiphenyl (PCB) – Phần 2: Chiết chất béo, thuốc bảo vệ thực vật, PCB và xác định hàm lượng chất béo.*

TCVN 8170-3 : 2009 (EN 1528-3 : 1996), *Thực phẩm chứa chất béo – Xác định thuốc bảo vệ thực vật và polyclobiphenyl (PCB) – Phần 3: Phương pháp làm sạch.*

3 Yêu cầu chung

Các phương pháp mô tả trong tiêu chuẩn này cho phép tạm thời nhận biết và định lượng bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng detector chọn lọc.

Tất cả các kết quả dương tính cần được khẳng định việc nhận biết và định lượng.

Các thủ tục được liệt kê để khẳng định như cột sắc ký khí thay thế, các detector sắc ký khí thay thế, sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), cột phân đoạn, dẫn xuất, đo phổ... đều phải chuẩn. Các kết quả thu được dùng khối phổ là kết luận cuối cùng để nhận biết/khẳng định.

4 Xác định

4.1 Sắc ký khí

4.1.1 Yêu cầu chung

Sử dụng hệ thống GC thích hợp, tốt nhất là được trang bị các bộ gia nhiệt riêng rẽ cho bộ bơm mẫu, detector và lò cột. Cho dù việc chọn các bộ phận khác nhau của hệ thống GC là theo kinh nghiệm của người phân tích, thì cũng cần theo các khuyến cáo sau đây.

Các detector cần được điều chỉnh đúng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các dao động về độ nhạy của detector cần được kiểm tra định kỳ bằng cách kiểm tra độ tuyến tính của đường chuẩn sử dụng các dung dịch chuẩn thuốc bảo vệ thực vật.

Bộ phận định lượng của hệ thống sắc ký khí cần bao gồm hệ thống tích phân cho phép tính toán không chỉ chiều cao pic mà cả diện tích pic.

Trong thực tế có thể thu được các kết quả tương đương cho dù có áp dụng các điều kiện GC khác nhau và do các hãng khác nhau sản xuất. Mặt khác, các thông số GC chuẩn qui định không phải lúc nào cũng đảm bảo cho các kết quả giống nhau.

Xem Phụ lục B về các điều kiện sắc ký khí điển hình.

4.1.2 Cột

Có thể sử dụng cột nhồi hoặc cột mao quản.

Khi sử dụng các cột nhồi thì khuyến cáo sử dụng cột thủy tinh dài từ 1,5 m đến 3 m và đường kính trong từ 2 mm đến 6 mm, tuy nhiên, các cột này không thích hợp cho việc tách các chất tương tự PCB.

Các vật liệu nhồi phải trơ và bền. Các vật liệu cho thấy thích hợp như Gaschrom Q, Chromosorb W/HP, Anachrom Q có cỡ hạt từ 125 μm đến 150 μm (100 mesh đến 120 mesh), 150 μm đến 190 μm (80 mesh đến 100 mesh) hoặc từ 190 μm đến 250 μm (60 mesh đến 80 mesh)¹.

¹ Gaschrom Q, Chromosorb W/HP, Anachrom Q là ví dụ về một sản phẩm tổng hợp được bán sẵn. Thông tin này được đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng còn CEN không ấn định sử dụng sản phẩm này.

Đối với các các phép phân tích dư lượng khác nhau cho thấy thành công khi sử dụng các loại pha tĩnh và hỗn hợp pha tĩnh. Ví dụ: các loại dưới đây thường được sử dụng nhiều nhất:

- Hydrocacbon: Apiezon L;
- Methylsilicone: DC-11, DC-200, OV-1, OV-101, SP-2100, SE-30;
- Methylphenylsilicone: OV-17, OV-25, OV-61, SP-2250, SE-52, SE-54;
- Trifluoropropylmethylsilicone: QF-1, OV-210, SF-2401;
- Phenylcyanopropylmethylsilicone: DB-1301, DB-1701, OV-225, XE-60;
- Polyethylene glycol: Carbowax 20 M¹.

Các pha tĩnh cần được phủ cẩn thận lên cột, tỷ lệ phụ thuộc vào cột/hỗn hợp pha được chọn. Các cột mới được nhồi cần được ổn định ít nhất 24 h ở nhiệt độ gần với nhiệt độ tối đa được khuyến cáo cho loại pha tĩnh được sử dụng và cần được kiểm tra về hiệu quả và độ nhạy ở nhiệt độ qui định sử dụng các hỗn hợp chuẩn của thuốc bảo vệ thực vật. Phải tháo cột ra khỏi detector trong quá trình ổn định.

Cần sử dụng khí nitơ khô, tinh khiết [không chứa oxy, đặc biệt là khi sử dụng detector cộng kết điện tử (ECD)], hoặc hỗn hợp khí metan/argon làm khí mang đối với các cột nhồi (trong trường hợp sử dụng ECD xung). Tốc độ phụ thuộc vào kích thước và kiểu loại cột được sử dụng. Nhìn chung, tốc độ dòng khí cần được kiểm soát chính xác. Định kỳ cần làm mới bộ lọc rây phân tử được lắp đặt cho tất cả các nguồn khí.

Cuối cùng, các điều kiện GC (chiều dài cột, kiểu pha tĩnh, bộ bơm, detector và nhiệt độ cột, tốc độ dòng khí ...) phải đảm bảo sao cho tách được hết các dư lượng thuốc bảo vệ thực vật và hợp chất tương tự PCB có mặt trong mẫu.

Sắc ký mao quản có thể tách tốt hơn các cột nhồi. Khuyến cáo sử dụng kỹ thuật này đặc biệt đối với các dịch chiết phức hợp.

Cột silica nung chảy có đường kính trong từ 0,20 mm đến 0,35 mm và dài từ 20 m đến 60 m được chứng minh phù hợp về hiệu quả tách, hạn sử dụng và các đặc tính cơ học của chúng. Trong một số trường hợp cũng có thể sử dụng các cột lỗ to có đường kính trong 0,5 mm đến 0,8 mm. Các pha tĩnh sau đây thường được sử dụng để phủ cột:

¹ Gaschrom Q, Chromosorb WHP, Anachrom Q, Apiezon L, DC-11... .. Carbowax 20 M là các ví dụ sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này được đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng; còn CEN không ấn định sử dụng sản phẩm này.

- SE-30 (tương đương với OV-1, DB -1, CP Sil 5, BP-1, SPB-1...);
- SE-54 (tương đương với DB-5, CP Sil 8, BP-5, SPB-5...);
- OV-17 (tương đương với OV-11, OV-22, SP-2250, DC-710, DB 608...);
- DB 1301 (tương đương với DB-624);
- DB-1701 (tương đương với OV-1701, CP Sil 19-CB, BP-10, SPB-7...);
- OV-225 (tương đương với DB-225, SIL 43-CB, SPB-2330,...);
- WAX (tương đương với DB-WAX, CP-WAX-52-CB, Carbowax 20 M,...)².

Phép thử kiểm tra các hiệu quả tách của cột mao quản được nêu trong 7.2 của TCVN 8170-1 : 2009 (EN 1528-1 : 1996).

4.1.3 Kỹ thuật bơm

Các kỹ thuật bơm khác nhau như sau:

- a) Bơm không chia dòng Grob.
- b) Bơm lên cột.
- c) Bơm hóa hơi theo chương trình nhiệt độ (PTV).

Khả năng áp dụng các kỹ thuật này phụ thuộc vào thiết bị sử dụng và các yêu cầu đặc biệt.

4.2 Phép thử ban đầu

Xác định dải tuyến tính động học của độ nhạy detector dưới các điều kiện GC thực tế sử dụng bằng cách bơm các dung dịch chuẩn pha loãng.

Bơm lên sắc ký khí một lượng thích hợp (từ 1,0 µl đến 10 µl phụ thuộc vào hệ thống) dịch chiết đã tinh sạch thu được theo phương pháp phân tích được sử dụng. Sắc đồ thu được có thể định tính và định lượng nồng độ các hợp chất có mặt trong dịch chiết.

4.3 Xác định

Đảm bảo rằng tất cả các phép đo được thực hiện trong dải tuyến tính động học của hệ thống.

² SE-30 ... Carbowax 20 M là ví dụ về một sản phẩm tổng hợp được bán sẵn. Thông tin này được đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng; còn CEN không ấn định sử dụng sản phẩm này.

Chuẩn bị ít nhất hai dung dịch chuẩn của thuốc bảo vệ thực vật hoặc các chất tương tự PCB nhận biết được trong dung môi mà sẽ được dùng trong dịch chiết cuối cùng (thường là dầu nhẹ hoặc *n*-hexan). Các nồng độ cuối cùng của chúng cần bao trùm nồng độ dự kiến trong dịch chiết cuối cùng. Sau đó bơm các thể tích bằng nhau của dịch chiết cuối cùng thu được và của hai hoặc nhiều hơn các dung dịch chuẩn vào sắc ký khí. Thực hiện bơm các phần đã tinh sạch của mẫu chiết và sau đó bơm các dung dịch chuẩn.

Đo diện tích hoặc chiều cao pic. Các kết quả thu được từ bất kỳ hai lần bơm cùng dung dịch chuẩn bất kỳ không được khác quá 5 %. Việc sử dụng chất chuẩn nội cũng tốt cho mục đích này [xem Điều 4 của TCVN 8170-3 : 2009 (EN 1528-3 : 1996)].

Cần đảm bảo rằng các chất chuẩn và các mẫu được hòa tan trong cùng loại dung môi, nếu không sẽ có sự bay hơi khác nhau dẫn đến khác về thời gian lưu và diện tích hoặc chiều cao pic. Ví dụ: tăng chiều cao pic 35 % đối với các chất tương tự PCB khi thay iso-octan bằng toluen.

Các hàm lượng của các chất tương tự PCB riêng lẻ không được cộng gộp thành hàm lượng PCB tổng số vì giá trị này không có ý nghĩa. Đồng thời cũng không dùng phương pháp ngoại suy khác để suy đoán hàm lượng PCB tổng số (ví dụ: được tính theo Clophen® A 60)³ vì chúng thường dựa vào giả định không chính xác rằng kiểu phân bố PCB trong mẫu là hoàn toàn chính xác như trong sản phẩm PCB công nghiệp thương mại.

Phép xác định chỉ khả thi nếu độ thu hồi trung bình của nhiều phép xác định nằm trong khoảng 70 % đến 100 % so với độ thu hồi của mỗi phép xác định. Để làm được điều này, nên kiểm tra định kỳ bằng các phép đo lặp lại về độ thu hồi của các mẫu đã thêm chuẩn biết trước.

5 Phép thử khẳng định [1]

5.1 Yêu cầu chung

Khi các phép phân tích được thực hiện cho các mục đích qui định thì điều quan trọng là các phép thử khẳng định được thực hiện trước khi báo cáo điều bất lợi về các mẫu chứa dư lượng thuốc bảo vệ thực vật thường không liên quan đến hàng hóa đó hoặc khi các giới hạn dư lượng tối đa (MRL) cho thấy bị vượt quá. Sự nhiễm bẩn các mẫu với các hóa chất không phải là thuốc bảo vệ thực vật luôn luôn xuất hiện và trong một số phương pháp sắc ký các hợp chất này có các đặc tính tương tự với thuốc bảo vệ thực vật và do đó có thể gây nhầm lẫn. Các ví dụ trong sắc ký khí gồm các đáp ứng của ECD với các este phtalat và của các detector đặc thù phospho với các hợp chất có chứa lưu huỳnh.

³ Clophen® A 60 là ví dụ về một sản phẩm tổng hợp được bán sẵn. Thông tin này được đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng; còn CEN không ấn định sử dụng sản phẩm này.

và thiếc), ion hóa ngọn lửa kiềm (phospho, nitơ) và đo culong/đo độ dẫn điện (nitơ, lưu huỳnh và halogen) có thể cho thông tin bổ sung về dư lượng. Tỷ lệ đáp ứng của lưu huỳnh/phospho thu được khi sử dụng detector quang phổ ngọn lửa có thể cung cấp thông tin hữu ích trong trường hợp phosphothioat.

5.4 Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Trong một số trường hợp, việc khẳng định sắc ký khí phù hợp nhất là bằng sắc ký lớp mỏng. Việc nhận dạng dựa vào giá trị R_f và phản ứng quan sát được. Tài liệu khoa học có chứa nhiều tài liệu tham khảo đối với kỹ thuật này. Báo cáo của IUPAC về thuốc bảo vệ thực vật [2] đánh giá kỹ thuật này và cung cấp giới thiệu thích hợp. Tuy nhiên, các khía cạnh định lượng của phép sắc ký lớp mỏng bị hạn chế. Việc mở rộng thêm của phương pháp này kéo theo việc tách vùng trên tấm sắc ký tương ứng với R_f của hợp chất cần tìm bằng cách rửa giải khỏi vật liệu của lớp mỏng và tiếp theo được phân tích khẳng định bằng vật lý hoặc hóa học.

Dung dịch thuốc bảo vệ thực vật chuẩn luôn được chấm trên tấm sắc ký dọc theo dịch chiết mẫu để tránh mọi vấn đề về không lặp lại của R_f . Chấm chùm dịch chiết với thuốc bảo vệ thực vật có thể cung cấp thông tin bổ ích. Ưu điểm của sắc ký lớp mỏng là nhanh, giá thành rẻ và có thể áp dụng cho vật liệu nhạy với nhiệt, nhược điểm là có độ nhạy thấp hơn sắc ký khí và cần phải làm đủ sạch. Một số vấn đề có thể gặp phải là khi độ ẩm cao hoặc nhiệt độ cao thì sẽ làm giảm độ lặp lại.

5.5 Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

HPLC có thể được sử dụng thuận lợi để khẳng định các dư lượng ban đầu được tìm thấy bằng sắc ký khí hoặc bằng các kỹ thuật khác và trong một số trường hợp nhất định có thể ưu tiên kỹ thuật định lượng. Dẫn xuất trước cột hoặc sau cột, và/hoặc sử dụng các detector khác nhau đều do người phân tích tự chọn, đặc biệt là khi phân tích các hợp chất nhạy với nhiệt hoặc ít bay hơi mà khó phân tích được bằng sắc ký khí.

5.6 Cột phân đoạn

Việc rửa giải khỏi cột sắc ký để làm sạch dịch chiết mẫu có thể giúp cho việc kiểm tra nhận dạng hợp chất. Theo đó, cơ sở khẳng định có thể được thiết lập trong qui trình tách chiết và làm sạch.

5.7 Tạo dẫn xuất

5.7.1 Phản ứng hóa học

Các phản ứng hóa học ở phạm vi nhỏ thường được sử dụng, là kết quả của sự phân hủy, bổ sung hoặc đông đặc thuốc bảo vệ thực vật, sau đó các sản phẩm được kiểm tra lại bằng kỹ thuật sắc ký. Các phản ứng sinh ra trong sản phẩm các chất có các thời gian lưu và/hoặc độ nhạy phát hiện khác với hợp chất gốc. Mẫu của thuốc bảo vệ thực vật chuẩn cần được xử lý cùng với dư lượng bị nghi ngờ

sao cho kết quả có thể so sánh trực tiếp. Dịch chiết đã được tăng cường cũng cần được kèm theo để chứng minh rằng phản ứng đã xảy ra sau đó khi có mặt vật liệu mẫu được chiết cùng. Về các phản ứng hóa học được dùng để khẳng định được công bố trong [3]. Các phản ứng hóa học có ưu điểm nhanh và dễ khi tiến hành nhưng cần có thuốc thử đặc biệt cần phải đặt hàng và/hoặc làm sạch.

5.7.2 Phản ứng vật lý

Một kỹ thuật hữu dụng là làm thay đổi quang hóa của dư lượng thuốc bảo vệ thực vật để tạo ra một hoặc nhiều sản phẩm có thể xác định được bằng sắc ký [4]. Mẫu chuẩn của thuốc bảo vệ thực vật và các dịch chiết đã được tăng cường cũng phải được xử lý theo cùng một cách. Các mẫu chứa nhiều dư lượng thuốc bảo vệ thực vật thì sẽ gặp khó khăn khi diễn giải kết quả. Khi đó, cần tiến hành tách chiết sơ bộ các dư lượng cụ thể bằng sắc ký lớp mỏng, HPLC hoặc cột phân đoạn trước phản ứng.

5.7.3 Các phương pháp khác

Có nhiều loại thuốc bảo vệ thực vật có thể được phân hủy/chuyển hóa bằng enzym. Khác với các phản ứng hóa học thông thường, các quá trình này rất đặc trưng và nói chung gồm các phản ứng oxy hóa, thủy phân hoặc loại nhóm alkyl. Các sản phẩm này có các đặc tính sắc ký khác với thuốc bảo vệ thực vật gốc và có thể được sử dụng để khẳng định nếu so sánh với các sản phẩm phản ứng dùng thuốc bảo vệ thực vật chuẩn.

5.8 Đo khối phổ (MS)

Các kết quả thu được bằng khối phổ cung cấp bằng chứng cuối cùng cho mục đích khẳng định/nhận dạng [5], [6]. Khi có các sẵn thiết bị này, thì nên chọn kỹ thuật khẳng định. Có hai phương pháp cơ bản để đưa mẫu vào thiết bị. Phương pháp được ưu tiên là sử dụng chiết tách sắc ký khí trước khi áp dụng đo khối phổ. Điều này cho phép phân tích đầy đủ khối phổ của các pic quan sát được trong khi phân tích sơ bộ. Cách khác, mẫu có thể được bơm trực tiếp. Phương pháp này có thể được sử dụng cùng với TLP hoặc HPLC khi các kỹ thuật này được sử dụng như phương pháp khẳng định ban đầu. Dư lượng được tách ra bằng kỹ thuật này được phân lập và xác định bằng đo khối phổ.

Để tăng độ nhạy, đặc biệt là với các thiết bị quét nhanh, các kỹ thuật được biết như phát hiện đơn ion và đa ion đã được sử dụng. Cần chọn đủ lượng mảnh ion để đảm bảo việc nhận dạng rõ ràng. Độ nhạy được tăng liên quan đến ion phân tử có thể thu được bằng cách sử dụng ion hóa hóa học thay cho bắn phá electron. Vì các thiết bị khối phổ thường nhạy với mức nanogram của một số dịch chiết từ phép phân tích sắc ký khí ban đầu có thể cần phải cô đặc trước khi phân tích sắc ký khối phổ, đặc biệt khi sử dụng các detecto cộng kết điện tử để định lượng. Trong một số trường hợp cần phải làm sạch thêm, đặc biệt nếu cần thu được toàn bộ sắc phổ.

Các vấn đề có thể gặp phải với các hợp chất nhạy với nhiệt trong quá trình đo sắc ký khối phổ và cần chú ý đặc biệt khi kết hợp sắc ký khí và sắc ký khối phổ. Hầu hết trong sắc ký khối phổ không có sự

phản ứng khác nhau đối với các hợp chất, nên có thể gặp phải vấn đề khi có mặt các chất nhiễm bẩn được rửa giải cùng.

5.9 Đo phổ

Hiện tại ít sử dụng phổ cộng hưởng từ hạt nhân, Raman hoặc hồng ngoại trong phân tích dư lượng thuốc bảo vệ thực vật. Các kỹ thuật sử dụng các cuvet phản xạ, microcuvet, đầu dò micro, ánh sáng laze, cộng hưởng từ hạt nhân biến đổi Fourier, v.v... đang được xây dựng. Điều này tăng chất lượng của phổ, tăng độ nhạy và có thể là việc áp dụng các kỹ thuật này sẽ được mở rộng như các phương pháp phát hiện sau cột để nhận dạng các hợp chất đã phân lập bằng các kỹ thuật sắc ký.

6 Quy trình làm sạch bổ sung đối với các lượng lớn chất béo sử dụng Calflo E[®] [7]

6.1 Yêu cầu chung

Các phương pháp thường được sử dụng nhiều nhất để xác định các hợp chất nhóm clo hữu cơ và phospho hữu cơ không phân cực trong chất béo và các sản phẩm chứa chất béo cho phép sử dụng chỉ một lượng nhỏ mẫu có kết quả là độ nhạy bị hạn chế. Các thuốc bảo vệ thực vật trong chất béo phân cực nhiều hơn thường không xác định được bằng phương pháp này, hoặc ít nhất là gặp các chất gây nhiễu, vì chúng không thể tách hoàn toàn ra khỏi chất béo và các lipit khác.

Nguyên tắc của phương pháp ở đây là loại bỏ phần lớn các lipit ra khỏi dung dịch béo bằng các chất hấp phụ thích hợp. Các dịch chiết thu được sẽ được xử lý bằng phương pháp B hoặc D [(xem Điều 6 và Điều 8 của TCVN 8170- 3 : 2009 (EN 1528-3 : 1996)]. Theo cách này mẫu chất béo sẽ tăng đến 30 g và độ nhạy được cải thiện đáng kể. Ngoài ra, nhiều hợp chất phân cực và các chất chuyển hóa có thể xác định được tốt hơn trước nếu được xử lý tiếp theo bằng phương pháp B.

6.2 Nguyên tắc

Dung dịch axeton của chất béo cần phân tích được trộn kỹ với huyền phù của canxi silicat tổng hợp (tên thương mại Calflo E[®]). Hỗn hợp này được lọc hai lần, thể tích dịch lọc được đo và dung dịch được cô quay đến khô.

6.3 Thuốc thử và vật liệu thử

Tất cả các thuốc thử và vật liệu được sử dụng phải thích hợp cho phép phân tích dư lượng và PCB và phải phù hợp với Điều 4 của TCVN 8170-1 : 2009 (EN 1528-1 : 1996). Tinh sạch theo các qui trình nêu trong Phụ lục A của TCVN 8170-3 : 2009 (EN 1528-3 : 1996), nếu cần.

⁴ Calflo E[®] và Celit[®] 545 là ví dụ về một sản phẩm tổng hợp được bán sẵn. Thông tin này được đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng; còn CEN không ấn định sử dụng sản phẩm này.

6.3.1 Axeton.

6.3.2 Axetonitril.

6.3.3 Iso-octan.

6.3.4 Calflo E[®], được sấy khô qua đêm ở 130 °C

6.3.5 Celite[®] 545, được sấy khô qua đêm ở 130 °C

6.4 Thiết bị, dụng cụ

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

6.4.1 Bộ trộn tốc độ cao, được gắn với bình thủy tinh kín và động cơ chống nổ hoặc bộ đồng hóa

6.4.2 Cốc có mỏ, dung tích 100 ml.

6.4.3 Phễu sứ Buchner, đường kính 12 cm có bình lọc chân không.

6.4.4 Ống đong chia độ, dung tích 200 ml, dạng cao.

6.4.5 Bình cầu đáy tròn, dung tích 500 ml và 250 ml, có khớp nối mài.

6.4.6 Bộ cô quay, có bình cầu đáy tròn, dung tích 500 ml, có nồi cách thủy có thể kiểm soát nhiệt độ từ 20 °C đến 50 °C.

6.4.7 Giấy lọc gấp nếp, đường kính 20 cm, được chiết bằng axeton.

6.4.8 Giấy lọc tròn, đường kính 12 cm, tốc độ lọc nhanh hoặc chậm.

6.5 Cách tiến hành

Hòa tan 5 g đến 30 g chất béo trong 25 ml axeton (6.3.1) đựng trong cốc có mỏ. Khuấy trộn dung dịch chất béo trong bình trộn có chứa 200 ml axetonitril (6.3.2), 20 g Calflo E[®] (6.3.4) và 10 g Celite[®] 545 (6.3.5). Dùng các lượng nhỏ của axetonitril để tráng cốc có mỏ (tổng số là 25 ml). Trộn mạnh dung dịch tạo thành 250 ml (V₂) trong 2 min, lọc huyền phù bằng cách hút cho qua giấy lọc trong phễu sứ Buchner. Chỉ dùng phương pháp hút nhẹ để đảm bảo cho phần dịch lọc chỉ bị bay hơi ở mức nhỏ nhất. Lọc dịch lọc qua giấy lọc gấp nếp khô được phủ 3 g Calflo E[®] cho vào ống đong chia độ. Đo thể tích của dịch lọc (V₁) và chuyển sang bình đáy tròn rồi dùng axeton để tráng bình. Thêm 2 ml iso-octan (6.3.3) và cho cất quay ở nhiệt độ 40 °C đến khi còn khoảng từ 0,5 ml đến 1 ml. Loại hết dung môi dư bằng dòng nitơ nhẹ ở nhiệt độ phòng.

CHÚ THÍCH 1 Với phân mẫu thử từ 10 g đến 30 g của các loại dầu và mỡ khác nhau, các dư lượng còn lại sau khi bay hơi ở khoảng 0,1 g đến 0,7 g. Một lượng lipit lớn hơn thu được từ chất béo sữa và dầu ôliu tự nhiên so với mỡ thực phẩm đã tinh

luyện mà đối với các loại này thì tốt nhất là sử dụng các phân mẫu thử từ 10 g đến 15 g. Sử dụng các phân mẫu thử của sáp bông từ 4 g đến 10 g, phần còn lại sau khi bay hơi từ 1 g đến 2 g.

CHÚ THÍCH 2 Để tránh thất thoát dịch lọc do bay hơi, cần hạn chế lọc bằng cách hút trong thời điểm trước khi lượng dịch lọc bị khô, thậm chí nếu cho dù thể tích dịch lọc thu được chỉ nằm trong khoảng từ 100 ml đến 150 ml.

CHÚ THÍCH 3 Thực nghiệm cho thấy rằng thực phẩm có chứa chất béo dạng khô (lòng đỏ trứng dạng khô, bột cacao) và các thức ăn cũng như hạt có dầu (hạt cải, hạt anh túc, hạt lạc) có thể được làm sạch trực tiếp bằng quy trình đã được mô tả. Các mẫu được đồng hóa trong bình trộn với 25 ml axeton, 225 ml axetonitril, 20 g Calflo E[®] và 10 g Celite[®] 545. Huyền phù được làm sạch theo 6.5. Khối lượng mẫu được điều chỉnh theo hàm lượng chất béo và lượng lipit giữ lại trong dịch chiết.

6.6 Đánh giá khối lượng mẫu chất béo

Phần còn lại sau khi bay hơi thu được trong 6.5 tương ứng với phần chất béo (G_{corr}), G_{corr} trong chất béo được tính theo công thức (1):

$$G_{\text{corr}} = \frac{G \times V_1}{V_2} \quad (1)$$

trong đó"

G là khối lượng mẫu, tính bằng gam (g);

V_1 là thể tích dịch chiết sau khi làm sạch, tính bằng mililit (ml);

V_2 là thể tích ban đầu (250 ml), tính bằng mililit (ml);

6.7 Xử lý tiếp theo

Để xử lý tiếp theo phần còn lại sau khi bay hơi thu được trong 6.5, các phương pháp B và D [xem Điều 6 và Điều 8 của TCVN 8170-3 : 2009 (EN 1528-3 : 1996)] cho thấy phù hợp, xem Bảng 1. Khi các mẫu chỉ cần phân tích các hợp chất nhóm clo hữu cơ và phospho hữu cơ không phân cực, tốt nhất là sử dụng phương pháp D vì công việc đơn giản hơn và tốn ít thời gian hơn. Sử dụng phương pháp B thì nhiều hợp chất clo hữu cơ phân cực và một số chất chuyển hóa cần được xác định thêm. Ngoài ra, các dịch chiết được làm sạch nhiều hơn sao cho phương pháp B thích hợp để phân tích các vật liệu mà Calflo E[®] chỉ loại được một phần của lipit.

Các độ thu hồi của các hợp chất cần phân tích có thể xác định được chỉ khi có làm sạch thêm dịch chiết. Trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm do chín phòng thử nghiệm tham gia, các phép thử độ thu hồi được thực hiện trong đó các mẫu kiểm chứng của dầu hướng dương tinh luyện đã được bổ sung các thuốc bảo vệ thực vật và các chất chuyển hóa khác nhau ở các nồng độ từ 0,02 mg/kg đến 16 mg/kg. Bảng 1 liệt kê các hợp chất này có độ thu hồi tổng số từ 70 % đến 100 % (trong nhiều trường hợp dao động từ 80 % đến 95 %) đã thu được bằng quy trình liên quan đến phương pháp B hoặc phương pháp D.

Bảng 1 – Các hợp chất clo hữu cơ và phospho hữu cơ gồm cả một vài chất chuyển hóa thu hồi được ở các mức trên 70 % (được đánh dấu +) hoặc không thu hồi được (được đánh dấu -) trong các phép thử về độ thu hồi có làm sạch dịch chiết bằng phương pháp B hoặc phương pháp D

Hợp chất	B	D	Hợp chất	B	D
aldrin(HHDN)	+	+	azinphos-ethyl	+	-
γ-chlordane	+	+	carbophenothion	+	+
chlorfenson	+		chlorfenvinphos	+	-
o, p'-TDE (DDD)	+	+	diazinon	+	-
o, p'-TDE (DDD)	+	+	dioxathion	+	
o, p'-DDE	+	+	ethion	+	-
p, p'-DDE	+	+	fenclorphos	+	+
o, p'-DDT	+	+	malation	+	-
p, p'-DDT	+	+	parathion-etyl	+	-
dieldrin (HEOD)	+	+	parathion- metyl	+	
α-endosulfan	+	+	phosalone	+	-
β-endosulfan	+	-			
endosulfan sulfate	+	-			
endrin	+	+			
fenson	+				
α-HCH	+	+			
β-HCH	+	+			
γ-HCH (lindane)	+	+			
δ-HCH	+	+			
heplachlor	+	+			
heplachlor epoxide	+	+			
hexachlorobenzene	+	+			
methoxychlor	+				
PCB	+				
quinlozene	+	+			
tetrasul	+				
camphechlor (toxaphene)	+				

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các điều kiện vận hành sắc ký khí điển hình

A.1 Thuốc bảo vệ thực vật nhóm clo hữu cơ

A.1.1 Điều kiện vận hành 1

Cột: mao quản silica nung chảy DB-5 (dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm, độ dày màng 0,23 μm);

Nhiệt độ cột: đẳng nhiệt ở 110 $^{\circ}\text{C}$ trong 2 min, được cài chương trình nâng nhiệt 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 110 $^{\circ}\text{C}$ đến 245 $^{\circ}\text{C}$, đẳng nhiệt ở 245 $^{\circ}\text{C}$ trong 2 min

Detector: detector cộng kết điện tử, nhiệt độ 350 $^{\circ}\text{C}$;

Bơm: bộ bay hơi có cài đặt chương trình nhiệt độ (PTV);

Chương trình PTV: thời gian (min)

trừ 0,15	chia-mở
trừ 0,10	nhiệt độ PTV 40 $^{\circ}\text{C}$
0,20	chia-đóng
0,25	nhiệt độ PTV 250 $^{\circ}\text{C}$
2,00	chia-mở
4,00	nhiệt độ PTV 40 $^{\circ}\text{C}$

Tốc độ chia nhánh 50 ml/min

A.1.2 Điều kiện vận hành 2

Cột: mao quản silica nung chảy DB 1701 (dài 30 m, đường kính trong 0,53 mm, độ dày màng 1,0 μm);

Nhiệt độ cột: đẳng nhiệt ở 80 $^{\circ}\text{C}$ trong 1 min, được cài chương trình nâng nhiệt 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 80 $^{\circ}\text{C}$ đến 150 $^{\circ}\text{C}$ và 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 150 $^{\circ}\text{C}$ đến 280 $^{\circ}\text{C}$

Detector: detector cộng kết điện tử, nhiệt độ 280 $^{\circ}\text{C}$;

Bơm: bộ bay hơi có cài đặt chương trình nhiệt độ (PTV);

Chương trình PTV: thời gian (min)

trừ 0,15 nhiệt độ PTV 40 °C

trừ 0,10 chia-mở

0,20 chia-đóng

0,25 nhiệt độ PTV 250 °C

2,00 chia-mở

4,00 nhiệt độ PTV 40 °C

A.2 Các chất tương tự PCB

A.2.1 Điều kiện vận hành 1

Cột: mao quản silica nung chảy CP Sil 8 (dài 50 m, đường kính trong 0,34 mm, độ dày màng 0,24 μm);

Nhiệt độ cột: đẳng nhiệt ở 90 °C trong 4 min, được cài nâng nhiệt 35 °C/min từ 90 °C đến 160 °C và đẳng nhiệt ở 160 °C trong 1 min, chương trình nâng nhiệt 3 °C/min từ 160 °C đến 244 °C, đẳng nhiệt ở trong 10 min

Bơm: bơm không chia dòng (1 min), nhiệt độ 250 °C;

Detector: detector cộng kết điện tử, nhiệt độ 350 °C;

Tốc độ dòng khí: khí mang heli, áp suất trong $1,5 \times 10^5$ Pa, khí làm sạch nitơ 35 ml/min;

A.2.2 Điều kiện vận hành 2

Cột: mao quản silica nung chảy DB-1 (dài 25 m, đường kính trong 0,32 mm, độ dày màng 1 μm);

Nhiệt độ cột: đẳng nhiệt ở 90 °C trong 3 min, được cài nâng nhiệt 35 °C/min từ 90 °C đến 160 °C và đẳng nhiệt ở 160 °C trong 1 min, chương trình nâng nhiệt 2 °C/min từ 160 °C đến 220 °C và 5 °C/min từ 220 °C đến 240 °C và đẳng nhiệt ở 240 °C trong 10 min.

Bơm: bơm không chia dòng (1 min), nhiệt độ 250 °C;

Detector: detector cộng kết điện tử, nhiệt độ 300 °C;

Tốc độ dòng khí: khí mang heli, áp suất trong $0,8 \times 10^5$ Pa, khí làm sạch nitơ 35 ml/min;

A.3 Thuốc bảo vệ thực vật nhóm phospho hữu cơ

A.3.1 Điều kiện vận hành 1

Cột: mao quản silica nung chảy DB-1 (dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm, độ dày màng 0,25 μm);

Nhiệt độ cột: chương trình nâng nhiệt 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 50 $^{\circ}\text{C}$ đến 150 $^{\circ}\text{C}$ và 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 150 $^{\circ}\text{C}$ đến 250 $^{\circ}\text{C}$;

Detector: detector thermionic trong phương thức P hoặc N/P, nhiệt độ 275 $^{\circ}\text{C}$;

Bơm: nhiệt độ 250 $^{\circ}\text{C}$;

A.3.2 Điều kiện vận hành 2

Cột: mao quản silica nung chảy DB-1301 (dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm, độ dày màng 0,25 μm);

Nhiệt độ cột: chương trình nâng nhiệt 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 60 $^{\circ}\text{C}$ đến 150 $^{\circ}\text{C}$, 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 150 $^{\circ}\text{C}$ đến 200 $^{\circ}\text{C}$ và 12 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 200 $^{\circ}\text{C}$ đến 275 $^{\circ}\text{C}$ đẳng nhiệt ở 275 $^{\circ}\text{C}$ trong 2 min;

Detector: detector nhiệt ion trong phương thức P hoặc N/P, nhiệt độ 280 $^{\circ}\text{C}$;

Bơm: trên cột, nhiệt độ môi trường.

A.3.3 Điều kiện vận hành 3

Cột: mao quản silica nung chảy DB-5 (dài 30 m, đường kính trong 0,53 mm, độ dày màng 1,5 μm);

Nhiệt độ cột: chương trình nâng nhiệt 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ từ 150 $^{\circ}\text{C}$ đến 250 $^{\circ}\text{C}$;

Detector: detector quang phổ ngọn lửa, bộ lọc P, nhiệt độ 250 $^{\circ}\text{C}$;

Bơm: nhiệt độ 250 $^{\circ}\text{C}$.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis; Codex Alimentarius Commission. In: Codex Alimentarius Volume Two Pesticide residues in food - Rome; Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); World Health Organization (WHO) 1993 Part 4.3, pp. 417- 455.
- [2] Bátorá, V. Vitorovic, S. Lj., Thier, H-P, and Klisenko, MA: Pure Appl) Chem., 53, 1039-1049(1981).
- [3] Cochrane, W.P.: Chemical derivatisation techniques in pesticide analysis, advances and applications; ACS Symposium Series 136, American Chemical Society, Washington, D.C., S. 231 -249,1980.
- [4] Pesticide Analytical Manual, Food and Drug Admiustration, Washington D.C. USA, Vol 1, Chapter 6, Section 652.
- [5] Hulzinger, O., and Safe. E: Mass Spectrometry of Pesticides and Pollutants, CRC Press, 1973.
- [6] Sphon,JA, and Brumley, W.C.: Biochemical Application of Mass Spectrometry. Editors: Waller, CR, Dormer, O.C.; John Wiley & Sons, New York, 1980.
- [7] Specht, W: Clean-up of large quantities of fats for analysis of residues of organochlorine and organophosphorus compounds. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Manual of Pesticide Residue Analysis, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim 1987, Vol 1, pp. 71-74, Clean-up Method 5.