TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9887:2013

Xuất bản lần 1

THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG ETYL CARBAMAT – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ-PHỔ KHỐI LƯỢNG

Foodstuffs – Determination ethyl carbamate –
Gas chromatography-mass spectrometry method

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 9887:2013 được xây dựng dựa trên cơ sở AOAC 994.07 *Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages and Soy Sauce. Gas Chromatography/Mass Selective Detection Method;*

TCVN 9887:2013 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Xác định dư lượng etyl carbamat – Phương pháp sắc ký khí-phổ khối lượng

Foodstuffs – Determination ethyl carbamate – Gas chromatography-mass spectrometry method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định dư lượng etyl carbamat (EC) trong đồ uống có cồn và nước tương bằng sắc ký khí-phổ khối lượng.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để xác định mức etyl carbamat từ 50 µg/kg đến 350 µg/kg trong rượu chưng cất, từ 40 µg/kg đến 160 µg/kg trong rượu vang nâng độ (fortified wine), từ 10 µg/kg đến 50 µg/kg trong rượu vang và từ 15 µg/kg đến 70 µg/kg trong nước tương.

2 Nguyên tắc

n-Propyl carbamat được thêm vào phần mẫu thử làm chất chuẩn nội, dung dịch được pha loãng với nước, sau đó cho vào cột chiết pha rắn dung tích 50 ml. Etyl carbamat và n-propyl carbamat được rửa giải bằng diclometan. Dịch rửa giải được cô đặc trên bộ cô quay. Dịch cô đặc được phân tích bằng sắc ký khí-phổ khối lượng trong chế độ kiểm soát ion chọn lọc.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước đã loại khoáng, trừ khi có quy định khác.

3.1 Axeton, loại dùng cho sắc ký lỏng.

CHÚ THÍCH: Kiểm tra từng lô trước khi sử dụng bằng phương pháp GC-MS để đảm bảo không chứa m/z 62, m/z 74 và m/z 89.

3.2 Diclometan

CHÚ THÍCH: Kiểm tra từng lô trước khi sử dụng bằng phương pháp GC-MS để đảm bảo không chứa m/z 62, m/z 74 và m/z 89.

3.3 Etanol, dạng khan.

3.4 Dung dịch chuẩn etyl carbamat (EC)

3.4.1 Dung dịch gốc, 1,00 mg/ml

Cân 100 mg EC (độ tinh khiết ít nhất 99 %) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng axeton.

3.4.2 Dung dịch chuẩn làm việc, 10,0 µg/ml

Chuyển 1 ml dung dịch gốc EC (3.4.1) vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng axeton.

3.5 Dung dịch chuẩn *n*-propyl carbamat

3.5.1 Dung dịch chuẩn gốc *n*-propyl carbamat, 1,00 mg/ml

Cân 100 mg chất chuẩn *n*-propyl carbamat (nPC) [1)] cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng axeton.

3.5.2 Dung dịch chuẩn làm việc *n*-propyl carbamat, 10,0 µg/ml

Chuyển 1 ml dung dịch gốc nPC (3.5.1) vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng axeton.

3.5.3 Dung dịch chuẩn nội nPC, 400 ng/ml

Chuyển 4 ml dung dịch chuẩn làm việc nPC (3.5.2) vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng nước.

3.6 Dung dịch hiệu chuẩn EC-nPC

Pha loãng các dung dịch chuẩn làm việc EC (3.4.2) và nPC (3.5.2) với diclometan để có được:

- dung dịch (100 ng EC và 400 ng nPC)/ml,
- dung dịch (200 ng EC và 400 ng nPC)/ml,
- dung dịch (400 ng EC và 400 ng nPC)/ml,
- dung dịch (800 ng EC và 400 ng nPC)/ml,
- dung dịch (1600 ng EC + 400 ng nPC)/ml.

[1)] Có thể sử dụng sản phẩm của Biomedicals ICN, Irvine, CA 92.713, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

3.7 Mẫu kiểm soát, nồng độ EC 100 ng/g trong etanol 40 %

Chuyển 1 ml dung dịch chuẩn làm việc EC (3.4.2) vào bình định mức 200 ml và pha loãng bằng etanol 40 % cho đến khi tổng khối lượng là 100 g.

CHÚ THÍCH: Độ thu hồi etyl carbamat từ mẫu kiểm soát (3.7) phải từ 90 % đến 110 %.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Máy sắc ký khí/phổ khối lượng (GC-MS)

GC-MS có kiểm soát ion chọn lọc (SIM), được trang bị bộ lấy mẫu tự động, hệ thống xử lý dữ liệu Chemstation hoặc loại tương đương;

Cột mao quản silica nung chảy, chiều dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm, chiều dày màng film 0,25 µm DB-WAX [2] hoặc silica nung chảy chiều dày màng film 0,25 µm Supelcowax 10 [3].

Các điều kiện vận hành sau đây cho thấy thích hợp:

- Nhiệt độ của bộ bơm: 180 °C;
- Tốc độ khí mang heli: 1 ml/min ở 25 °C;
- Chế độ bơm: bơm không chia dòng;
- Chương trình nhiệt độ: 40 °C trong 0,75 min, tốc độ tăng 10 °C/min đến 60 °C, sau đó 3 °C/min đến 150 °C rồi tăng đến 220 °C và sau đó giữ trong 4,25 min ở 220 °C;
- Thời gian lưu điển hình: đối với etyl carbamat là từ 23 min đến 27 min

  đối với *n*-propyl carbamat là 27 min đến 31 min;
- Giao diện (interface) GC-MS: 220 °C;
- Các thông số MS: sử dụng perfluorotributylamin để tối ưu hóa độ nhạy ở khối lượng thấp hơn, chế độ SIM, độ trễ dung môi và thời gian bắt đầu 22 min, thời gian dừng/ion 100 ms.

---

[2] Sản phẩm của hãng J & W Scientific, Folsom, CA 95630, USA.

[3] Sản phẩm của hãng Supelco, Inc., Bellefonte, PA 16823, USA.

Các thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

4.2 Bộ cô quay, ví dụ: Buchi Rotovapor Model RE-120 [4].

4.3 Bình, hình quả lê, dung tích 300 ml, có cổ mài chuẩn 24/40.

4.4 Ống nghiệm cô đặc, dung tích 4 ml, được chia vạch, có khớp nối mài chuẩn 19/22 và có nắp đậy với cổ mài chuẩn 19/22.

4.5 Cốc có mỏ, dung tích 100 ml.

4.6 Cân, có thể cân chính xác đến 0,01 g.

4.7 Nồi cách thủy, có thể duy trì ở 30 °C.

4.8 Pipet Pasteur, có thể phân phối thể tích thích hợp.

4.9 Pipet, có thể phân phối các thể tích thích hợp.

4.10 Cột chiết pha rắn

Sử dụng cột chiết pha rắn loại dùng một lần, dung tích 50 ml, được nhồi bằng diatomit, ví dụ: cột Chem Elut [5] hoặc Extrelut QE Celite [6].

CHÚ THÍCH: Trước khi phân tích, kiểm tra từng lô cột chiết về độ thu hồi tương đối EC-nPC và để chắc chắn không chứa m/z 62, m/z 74 và m/z 89.

Chuẩn bị EC trong mẫu kiểm soát (3.7) với nồng độ 100 ng/g. Phân tích 5,00 g mẫu kiểm soát như đối với mẫu rượu chưng cất, tiến hành theo 6.1.1, 6.2 và 6.3. Độ thu hồi EC từ 90 ng/g đến 110 ng/g là thỏa mãn. Sự thay đổi độ mịn của chất hấp thụ có thể làm cho tốc độ dòng rất chậm, ảnh hưởng đến độ thu hồi tương đối EC-nPC. Nếu sau một vài thử nghiệm, mẫu kiểm soát không đạt được độ thu hồi từ 90 % đến 110 % thì thay cột hoặc sử dụng đường chuẩn đã hiệu chỉnh độ thu hồi về định lượng EC.

Để dựng đường chuẩn, chuẩn bị các dung dịch chuẩn như trong (3.6), sử dụng etanol 40 % thay cho diclometan. Phân tích 1 ml dung dịch hiệu chuẩn như đối với mẫu rượu chưng cất, tiến hành theo 6.1.1, 6.2 và 6.3, nhưng không bổ sung dung dịch nPC thay thế. Dựng đường chuẩn mới, sử dụng các tỷ lệ EC/nPC từ các chất chuẩn chiết được.

---

[4] Sản phẩm của Kuderna Danish.

[5] Sản phẩm của hãng Varian Sample Preparation Products, Sunnyvale, CA 94089, USA.

[6] Sản phẩm của hãng EM Science, Gibbstown, NJ 08027, USA.

Các thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này.

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

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu thử

6.1.1 Rượu chưng cất và rượu vang nâng độ (độ cồn trên 14 %)

Cân 5,00 g mẫu thử, chính xác đến 0,01 g, cho vào cốc có mỏ 100 ml (4.5) rồi thêm 1 ml dung dịch chuẩn nội nPC (3.5.3), thêm nước để có được tổng khối lượng 40,00 g.

6.1.2 Rượu vang (độ cồn ít hơn 14 %)

Cân 20,00 g mẫu thử, chính xác đến 0,01 g, cho vào cốc có mỏ 100 ml (4.5) rồi thêm 1 ml dung dịch chuẩn nội nPC (3.5.3), thêm nước để có được tổng khối lượng 40,00 g.

6.1.3 Nước tương

Cân 10,00 g mẫu thử, chính xác đến 0,01 g, cho vào cốc có mỏ 100 ml (4.5) rồi thêm 1 ml dung dịch chuẩn nội nPC (3.5.3), thêm nước để có được tổng khối lượng 40,00 g.

6.2 Chiết

CHÚ THÍCH: Tiến hành chiết mẫu trong tủ hút có thông gió.

Chuyển phần mẫu thử đã pha loãng tương ứng trong 6.1 sang cột chiết. Rửa cốc có mỏ bằng 10 ml nước và chuyển nước rửa sang cột. Để cho chất lỏng hấp thụ vào cột trong 4 min. Rửa giải hai lần, mỗi lần dùng 80 ml diclometan. Thu lấy dịch rửa giải vào bình hình quả lê 300 ml (4.3). Làm bay hơi dịch rửa giải đến khoảng từ 2 ml đến 3 ml, sử dụng bộ cô quay (4.2) để trong nồi cách thủy ở 30 °C. Không để dịch chiết bay hơi đến khô.

Chuyển phần dịch chiết đã cô đặc vào ống cô đặc chia vạch 4 ml, sử dụng pipet Pasteur (4.8). Tráng bình bằng 1 ml diclometan và chuyển nước tráng rửa vào ống nghiệm. Cô đặc dịch chiết đến 1 ml dưới dòng khí nitơ. Chuyển dịch cô đặc sang lọ lấy mẫu tự động để phân tích GC-MS.

6.3 Phân tích GC-MS

6.3.1 Dựng đường chuẩn

Bơm các thể tích 1 µl của các dung dịch hiệu chuẩn EC-nPC trong 3.6 vào máy GC-MS. Dựng đồ thị của các tỷ lệ diện tích đối với m/z 62 trên trục y với nồng độ EC (ng/ml) trên trục x (100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml và 1600 ng/ml).

6.3.2 Định lượng EC

Bơm 1 µl dịch chiết cô đặc thu được trong 6.2 vào máy GC-MS và tính tỷ lệ diện tích EC-NPC đối với m/z 62.

Xác định nồng độ EC bằng nanogam trên mililit trong dịch chiết, sử dụng đường chuẩn nội.

6.3.3 Phép thử khẳng định EC

Xác định các độ đáp ứng đối với các ion m/z 62, m/z 74 và m/z 89 có mặt ở thời gian lưu của EC. Các đáp ứng này là chẩn đoán các mảnh vỡ chính $(M - C_2H_3 \bullet)^+$ và $(M - CH_3 \bullet)^+$ và ion phân tử (M) tương ứng. Sự có mặt EC được khẳng định nếu tỷ lệ tương đối của các ion này nằm trong dải 20 % các tỷ lệ của dung dịch chuẩn EC. Dịch chiết có thể cần được cô đặc tiếp để thu được độ đáp ứng đủ đối với m/z 89.

7 Tính kết quả

Hàm lượng EC có trong phần mẫu thử, X, biểu thị bằng nanogam trên gam (ng/g), tính theo công thức sau:

$$X = C \times \frac{V}{w}$$

Trong đó:

C là nồng độ EC trong dịch chiết cuối cùng, xác định từ đường chuẩn (xem 6.3.2), tính bằng nanogam trên mililit (ng/ml);

V là thể tích dịch chiết sau khi cô cạn (xem 6.2), tính bằng mililit (V = 1 ml);

w là khối lượng phần mẫu thử đã lấy, tính bằng gam (g).

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

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 chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tuỳ chọn, cùng với mọi tình huống bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;

e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Kết quả của phép thử liên phòng về xác định etyl carbamat (EC) trong đồ uống có cồn và nước tương bằng phương pháp GC-MS được nêu trong Bảng A.1.

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

Mẫu	EC bổ sung ng/g	EC trung bình ng/g	Độ thu hồi của EC bổ sung %	Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r ng/g	Độ lệch chuẩn tái lập, s_R ng/g	Hệ số biến thiên lặp lại, RSD_r %	Hệ số biến thiên tái lập, RSD_R %
Rượu chưng cất	0	50		2,25	4,78	4,47	9,49
	70	112	89	7,43	10,38	6,63	9,26
	320	329	87	13,24	28,03	4,03	8,53
Rượu vang nâng độ	0	40		1,59	4,77	4,01	12,02
	45	80	89	3,32	7,00	4,14	8,74
	135	162	90	8,20	11,11	5,05	6,84
Rượu vang	0	11		0,43	2,03	3,94	18,47
	15	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	40	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86
Nước tương	0	18		1,49	4,82	8,43	27,37
	20	36	90	3,08	8,22	8,49	22,63
	60	70	87	3,29	9,70	4,70	13,87