HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH

Mã số: HD.TN.135 Lần ban hành: 2

Ngày ban hành: 30/03/2018 Trang: **1/8**

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TRANS FAT TRONG THỰC PHẨM

TRÊN THIẾT BỊ SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI PHỔ GC/MS

Biên soạn	Xem xét	Phê duyệt
LA THỊ TRẦM	DIỆP THỊ HỒNG TƯỚI	TRẦN THÁI VŨ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi biểu mẫu	30/03/2018
2	B.II.2.a,b	Thay đổi các điểm chuẩn, chuẩn gốc	30/03/2018
3	B.V.2.2	Thay đổi điều kiện GC: Chương trình nhiệt, cột sắc kí	30/03/2018
4			

HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH

Mã số: HD.TN.135 Lần ban hành: 2

Ngày ban hành: 30/03/2018

Trang: **2/8**

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này áp dụng để xác định hàm lượng Trans Fat trong các nền mẫu thực phẩm. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) đối với phương pháp trên các nền mẫu béo $<50\%\,$ là 100 ppm và 300 ppm. Đối với nền béo $>50\%\,$ là 300 ppm và 900 ppm.

II. Tài liệu tham khảo

- [1] AOAC Official Method 996.06: Fat (Total, Saturated, and Unsaturated) in Foods Hydrolytic Extraction Gas Chromatoghraphic Method First Action 1996 Revised 2001.
- [2] ISO 5508 : Animal and vegetable fats and oils –Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids.

III. Nguyên tắc

Mẫu được thủy phân trong môi trường acid chlohydric. Lượng béo tổng được chiết với dung môi hexane. Béo tổng sau đó được methyl hóa với methanol trong môi trường bazo (NaOH), xúc tác BF₃. Methyl esters sau phản ứng methyl hóa sẽ được chiết với dung môi isooctane và phân tích với thiết bị GC/MS.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

Đeo khẩu trang, gặng tay khi thực hiện phân tích.

Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động phòng thí nghiệm.

Sử dụng tủ hút, kính bảo hộ và gặng tay khi cần thiết.

Các dung môi hữu cơ và các chất thải như hexane, isooctane 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

- Micropipet loại 20 μL, 200 μL và 1000 μL.

HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH

Mã số: HD.TN.135 Lần ban hành: 2

Ngày ban hành: 30/03/2018

Trang: **3/8**

- Bình định mức 10 ml, 100ml
- Cân phân tích, độ chính xác 0.1 mg.
- Bếp điện.
- Őng thủy tinh 100 ml có nắp Teflon.
- Thiết bị thổi khí.
- Őng ly tâm dung tích 50 ml, 15 ml.
- Pasteur pipet thủy tinh.
- Nhiệt kế.

1. Thiết bị phân tích

- Agilent 6890GC / HP 5972MS hoặc tương đương.
- Cột mao quản BPX-70: 60m x 0.32 mm x 0.25 μm hoặc tương đương.

II. Hóa chất và chất chuẩn

1. Hóa chất (hãng Fisher hoặc tương đương)

- Acid chlohydric 8 M
- Acid ascobic
- Dung môi Ethanol, hexane, isooctane
- Boron triflouride 12% trong methanol
- NaOH 0.5 M trong methanol: Cân 2g NaOH vào bình định mức
 100 ml hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH

2. Chất chuẩn

a. Chuẩn gốc

Chuẩn Trans C18:1 (methyl elaidate), Trans C18:2 (methyl linolelaidate), nội chuẩn C11:0 của Dr.Ehrentofer hoặc tương đương

Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn được lưu trữ đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

b. Dung dịch chuẩn gốc

Chuẩn Trans C18:1 50000 mg/L: Cân chính xác khoảng 500 mg chuẩn Trans C18:1 vào bình định mức 10 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng

HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH

Mã số: HD.TN.135 Lần ban hành: 2

Ngày ban hành: 30/03/2018

Trang: **4/8**

isooctane. Khi đó nồng độ chất chuẩn trong dung dịch được tính được theo công thức sau:

$$C(mg/L) = \frac{m(mg)x1000}{V(ml)}xP$$

Trong đó: C là nồng độ chất chuẩn có trong dung dịch (mg/L).

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

V là thể tính định mức (mL).

P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).

Chuẩn Trans C18:2 7000 mg/L: Cân chính xác khoảng 70 mg chuẩn Trans C18:2 vào bình định mức 10 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng isooctane. Khi đó nồng độ chất chuẩn trong dung dịch được tính được theo công thức như trên.

Nội chuẩn C11:0 500 mg/L: Cân chính xác khoảng 5 mg chuẩn C11:0 vào bình định mức 10 ml, hòa tan và định mức tới vạch bằng isooctane. Nồng độ nội chuẩn được tính toán theo công thức như trên.

Chuẩn hỗn hợp Trans C18:1 và Trans C18:2 100 mg/L: Rút 20 μ L Trans C18:1 và 140 μ L Trans C18:2 vào bình mức 10 ml. Dùng isooctane định mức tới vạch.

Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn được lưu trữ trong tủ mát ($4-8^{\circ}$ C), sử dụng trong 1 năm.

Đường chuẩn Trans Fat như trong bảng sau:

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
Nồng độ Trans Fat	0.5	1	2	5	10	20
(mg/L)						
IS C11:0 500 mg/L	100 μL					
Chuẩn hỗn hợp Trans Fat	50	100	200	500	1000	2000
100 mg/L (μL)	30	100		300	1000	2000
Isooctane	10 mL					

Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch đường chuẩn được lưu trữ trong tủ mát (4-8°C), sử dụng trong 3 tháng.

HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH

Mã số: HD.TN.135 Lần ban hành: 2

Ngày ban hành: 30/03/2018

Trang: **5/8**

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 matrix: Mẫu blank phù hợp với nền mẫu phân tích.
- Mẫu Duplicate: Mẫu lặp cùng nền mẫu

IV. Xử lý mẫu

1. Chuẩn bị mẫu:

Theo "Hướng dẫn công việc đồng nhất mẫu trong phòng thí nghiệm – HD.KT.022"

2. Phương pháp tiến hành

a. Qúa trình chiết béo tổng

Chuẩn bị ống thủy tinh 100 ml: Ống thủy tinh được sấy ở nhiệt độ 105 $^{\circ}$ C trong khoảng 2 giờ, sau đó để trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng, đem cân. Lặp lại quá trình đến khi ống thủy tinh đạt khối lượng không đổi m $_{\circ}$ (\pm 1mg).

Cân m_1 (g) mẫu đã được đồng nhất (khoảng 5 g đối với mẫu béo < 5%, và khoảng 2 g đối với mẫu nhiều béo > 5%) vào ống ly tâm 50 ml. Thêm vào 0.30 – 0.40 (g) acid ascobic, 2 ml ethanol nồng độ 95%, 10 ml acid chlohydric 8 M, votex đều. Đun mẫu tai 80 °C trong vòng 40 phút.

Sau khi thủy phân, mẫu được để nguội tới nhiệt độ phòng. Chiết mẫu với hexane, votex hoặc lắc đều trong vòng 5 phút, ly tâm và chiết lớp hexane vào ống thủy tinh 100 ml đã chuẩn bị sẵn (15 ml \times 3). Sau đó đuổi khô dung môi ở 60 °C.

Sấy ống thủy tinh 100 ml ở nhiệt độ 105 $^{\circ}$ C ít nhất 2 giờ, để nguội trong bình hút ẩm, đem cân. Lặp lại đến khi khối lượng không đổi m_2 .

Từ khối lượng m_0 , m_2 tính toán được m (g) chất béo tổng ($(m_2-m_0)/m_1$).

b. Qúa trình methyl hóa

Sau khi xác định hàm lượng béo có trong mẫu, tiếp thục thêm V_1 mL NaOH 0.5M trong MeOH, V_2 mL BF $_3$ 12% trong MeOH vào ống thủy tinh

HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH

Mã số: HD.TN.135 Lần ban hành: 2

Ngày ban hành: 30/03/2018

Trang: **6/8**

(theo bảng dưới). Đậy nắp chặt, lắc nhẹ hỗn hợp và đem đun cách thủy ở $90 \pm 5^{\circ}$ C đến khi lượng béo tan hết. Lấy mẫu ra để nguội ở nhiệt độ phòng.

Tiếp theo cho chính xác 10mL Isooctane vào ống thủy tinh. Tiếp tục đun cách thủy ở $90 \pm 5^{\circ}C$ trong 30 phút. Sau đó lẫy mẫu ra để nguội đến nhiệt độ phòng.

Cho khoảng 3mL NaCl bão hòa vào ống thủy tinh. Tiếp tục lắc mạnh 5 phút, chờ dung dịch tách thành 2 lớp khoảng 2 phút.

Rút lớp isoctan vào vial và phân tích trên GC/MS.

Thể tích NaOH và BF₃ sử dụng tùy thuộc vào hàm lượng béo trong mẫu:

Hàm lượng béo (mg)	NaOH 0.5M	BF ₃ 12%
	$ m V_1~mL$	V ₂ mL
100-250	4	5
250-500	6	7
500-750	8	9
750-100	10	12

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị

Điều kiện GC:

- Cột : BPX-70: 60 m x 0.32 mm x 0.25 μm.
- Tốc độ dòng: 0.5 mL/phút.
- Nhiệt độ Inlet: 260 °C; detector: 280 °C; chế độ tiêm không chia dòng.
- Chương trình nhiệt:

Nhiệt độ đầu	Tốc độ tăng nhiêt (°C/phút)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian giữ (phút)
100 °C	innet (C/pilat)		0
	5	120	3

HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH

Mã số: HD.TN.135 Lần ban hành: 2

Ngày ban hành: 30/03/2018

Trang: **7/8**

5	150	3
10	245	5

- Solvent delay: 6.5 phút

Diều kiện MS:

- Nguồn ion hóa: EI, nhiệt đô 3000 °C
- Chế độ: Scan quét từ mass 35 đến 300.

2. Trình tự của quá trình tiêm mẫu trên thiết bị phân tích.

Dung môi trắng \rightarrow Các chuẩn có nồng độ từ thấp tới cao \rightarrow Dung môi trắng \rightarrow Mẫu cần kiểm nghiệm \rightarrow Mẫu thêm chuẩn \rightarrow Chuẩn kiểm tra.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

Xây dựng các đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỉ lệ diện tích của từng chuẩn trong hỗn hợp với nội chuẩn và nồng độ chất phân tích.

Hàm lượng Trans Fat trong mẫu được tính toán theo công thức:

$$C = \left(\frac{C_0 \times V_{extract}}{m} \times f\right)$$

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, mg/kg
- C₀: nồng độ chất phân tích xác định trên máy, mg/L
- V_{extract} : Thể tích định mức, mL
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng mẫu

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với $R^2 \ge 0.99$

Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.

Độ lệch thời gian lưu không quá 0.5 % cho GC

Độ lệch của dung dịch chuẩn kiểm tra không quá 15 %

• Tỷ số ion

Cường độ tương đối của ion định tính so với ion định lượng phải nằm trong khoảng cho phép:

HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH

Mã số: HD.TN.135 Lần ban hành: 2

Ngày ban hành: 30/03/2018

Trang: **8/8**

Cường độ tương đối	Sai số cho phép của
(so với ion định lượng)	GC-EI-MS
> 50 %	± 10 %
20 – 50 %	± 15 %
10 – 20 %	± 20 %
< 10 %	± 50 %

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu BM.15.04-01