

S	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
TT			

## A. TỔNG QUAN

### I. Phạm vi áp dụng.

- Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng đường (< 10%) trong thực phẩm. Giới hạn phát hiện của phương pháp với nền mẫu mật ong là 0.5 g/100g và với các nền mẫu còn lại là 0.05 g/100g.

### II. Tài liệu tham khảo.

- Food Chemistry 642: Gas mass spectrometric of tri- and in honey

S T T	Chất phân tích (sugar)
1	Inositol
2	Sorbitol
3	Glycerol
4	Sacharose
5	Lactose
6	Glucose
7	Fructose
8	Maltose

120 (2010) 637–  
chromatographic–  
characterization  
tetrasaccharides

### III. Nguyên tắc.

- Mẫu được pha loãng với DI. Sau đó được tạo dẫn xuất trimethylsilyl (TMS) và phân tích trên GC/MS.

### VI. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.

- Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động trong phòng thí nghiệm.
- Báo cáo tất cả các vấn đề gây tổn thương tới con người và các sự cố gây đổ vỡ hóa chất.
- Dung môi hữu cơ được thu hồi vào trong thùng chứa có dán nhãn dung môi thải.

## B. PHÂN TÍCH

### I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.

#### 1. Thiết bị cơ bản.

- Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg
- Bình định mức 10 ml, 50 ml
- Máy ly tâm cho ống 50ml

- Micropipet các loại 20 µL, 200 µL, 1000 µL.
- Pipet thủy tinh
- Bếp đun

## 2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ GC/MS 5973 hoặc tương đương.

## II. Hoá chất và chất chuẩn.

### 1. Hoá chất.

- Nước cất khử ion (nước DI)
- Isooctan của Fisher hoặc tương đương
- Tác chất Hexamethyldisiloxane (HMDS), Trifluoroacetic acid (TFA) và hydroxylamin của Merck hoặc tương đương.
- Ethanol 99%

### 2. Chất chuẩn.

#### a. Chuẩn gốc:

- Inositol; Sorbitol; Glycerol; Sacharose; Lactose; Glucose; Fructose và maltose của Sigma hoặc tương đương.
- Bảo quản và lưu trữ: Chuẩn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

#### b. Dung dịch chuẩn gốc

- Dung dịch chuẩn gốc 20000 µg/mL: Cân chính xác khoảng 200 mg chất chuẩn vào các bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng nước cất DI.
- Lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Khi đó nồng độ chất chuẩn trong dung dịch được tính được theo công thức sau:

$$C (mg/L) = \frac{m (mg) \times 1000}{V (ml)} \times P$$

Trong đó:

- C là nồng độ chất chuẩn có trong dung dịch (µg/mL).

- m là khối lượng cân của chất chuẩn (mg).
  - V là thể tích định mức (mL).
  - P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).
- Bảo quản và lưu trữ: dung dịch chuẩn gốc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 8°C), sử dụng trong thời gian 1 năm.
  - Chuẩn hỗn hợp làm việc (1000 µg/mL): Từ các dung dịch chuẩn gốc trên (20000 µg/mL) tương ứng lấy 0.5 mL mỗi chất cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với nước cất DI.
  - Bảo quản và lưu trữ: chuẩn làm việc được lưu trữ trong ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4-8°C), sử dụng trong thời gian 6 tháng.
  - Pha dãy chuẩn làm việc:
    - + Định tính: Nếu mẫu thường không phát hiện chỉ cần pha điểm chuẩn định tính 1.0 µg/mL.

+ Định lượng:

Nồng độ dãy chuẩn (mg/kg)	1	2	5	10	20	50
Thể tích dung dịch chuẩn trung gian 1 % (mL)				0.01	0.02	0.05
Thể tích dung dịch chuẩn trung gian 0.1% (mL)	0.01	0.02	0.05			
Thể tích dung dịch nội chuẩn Sucralose 0.1% mL	0.02					
Thể tích định mức Isoctane (mL)	10					

### III. Kiểm soát QA/QC.

a. **Mẫu Blank matrix:** Mẫu blank không phát hiện chất phân tích hoặc phát hiện ở nồng độ nhỏ hơn LOD

b. **Mẫu thêm chuẩn (QC)**

- Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn với nồng độ thêm là 500 µg/ml sau khi phân tích 20 mẫu hoặc một mẻ mẫu. Mẫu thêm chuẩn được thực hiện cùng lúc với lô mẫu phân tích.
- Tính toán độ thu hồi theo phương trình

$$R(\%) = \frac{C_s - C}{S} \times 100$$

Trong đó:

- R = Độ thu hồi
- $C_s$  = Nồng độ mẫu thêm chuẩn
- C = Nồng độ của mẫu nền
- S = Nồng độ của chất phân tích thêm vào mẫu

### IV. Xử lý mẫu.

- Cân 5g mẫu cho vào ống ly tâm 50 mL, thêm vào 25 mL nước cất. Lắc đều mẫu 2 phút. Ly tâm 3000 rpm trong 3 phút.
- Mẫu QC: Spike 250 uL chuẩn Sugar hỗn hợp 1 g/100g. Thực hiện phân tích như mẫu thật.
- Rút 100 uL dung dịch mẫu chuyển vào ống thủy tinh 10ml. Thêm 475 uL hydroxylamine 2.5%. Lắc đều mẫu. Đun mẫu ở 70-75°C trong 30 phút.
- Để mẫu nguội về nhiệt độ phòng. Thêm 475 uL HMDS và 50 uL TFA. Lắc đều mẫu. Tiếp tục đun mẫu ở 45-50°C trong 30 phút.
- Để mẫu nguội về nhiệt độ phòng, pha loãng mẫu với 9ml Isooctan. Lọc mẫu vào vial và phân tích trên GC/MS

### V. Phân tích

1. **Điều kiện GC:**

- Cột : DB-5: 30 m x 0.25 mm. 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:
  - Solvent delay: 3.5 phút

Tốc độ tăng nhiệt (°C/phút)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian giữ (phút)
	160	4
15	260	0
20	300	2

## 2. Điều kiện MS:

- Nguồn ion hóa: EI, nhiệt độ 3000 °C
- Chế độ: Sim

3.

S	Chất	ion	ion
T	phân	định	định
T	tích	lượng	tính
1	Inositol	305	21 31 43 7 8 2
2	Sorbitol	319	20 32 21 5 0 7
3	Glycerol	147	20 21 5 8
4	Sacharose	361	36 43 2 7
5	Lactose	361	20 21 45 4 7 1
6	Glucose	319	32 20 0 5
7	Fructose	307	21 42 7 2
8	Maltose	361	36 20 21 2 4 7

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

Dung môi trắng →

Các chuẩn

có nồng độ từ

thấp tới cao → Dung môi trắng → Mẫu cần kiểm nghiệm → Mẫu thêm chuẩn → Chuẩn kiểm tra.

## C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

### 1. Công thức tính toán:

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích và nồng độ chuẩn.

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

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/mL
- C<sub>0</sub>: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/mL
- V<sub>extract</sub>: Thể tích dịch chiết
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng cân (g) hoặc thể tích mẫu (mL)

### 2. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với  $R^2 \geq 0.99$
- Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
- Tỷ số ion:

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

- Độ lệch của thời gian lưu không quá 0.5%
- Độ lệch của dung dịch chuẩn kiểm tra không quá 15%
- Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart).
- Thực hiện kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (control chart) ở mức thêm chuẩn 0.1g/100g sau mỗi lô mẫu phân tích.

## D. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

- Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu: BM.15.04a, BM.15.06