

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.068 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 1/6
--	----------------------------	---

**ĐỊNH LƯỢNG SODIUM BENZOATE & POTASSIUM SORBATE TRONG THỰC
PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG GHEP ĐẦU DÒ TỬ NGOẠI – KHẢ
KIẾN (HPLC / UV-Vis hoặc DAD)**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Thị Xuân Mai	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	04/01/2018

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này được áp dụng định lượng sodium benzoate & potassium sorbate trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng ghép đầu dò UV (HPLC-UV). Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của phương pháp lần lượt: 3ppm; 10ppm

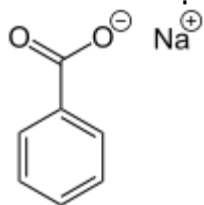
II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo:

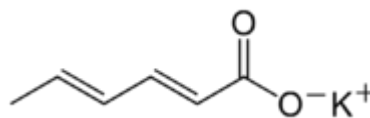
Ref. AOAC 2007.01: xử lý mẫu

Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences: chạy máy

Công thức cấu tạo



Sodium benzoate: $C_7H_5NaO_2$
Mw : 144.10 g/mol



Potassium Sorbate: $C_6H_7KO_2$
Mw: 150.22 g/mol

III. Nguyên tắc

Mẫu sau khi được đồng nhất sẽ được chiết trong Acetonitril ở môi trường acid, dùng hỗn hợp $MgSO_4$ khan và NaCl để tách lớp. Pha loãng dịch chiết trong dung môi pha động, votex, lọc qua màng lọc 0.45 μ m vào vial và được phân tích trên hệ thống HPLC-UV.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.

Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ cơ bản

1. Thiết bị cơ bản

- ✓ Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg và 1 mg
- ✓ Máy ly tâm
- ✓ Máy lắc Vortex.
- ✓ Bộ lọc dung môi tương thích với giấy lọc 0.45 μ m
- ✓ Màng lọc Nilon, 13 mm, 0,45 μ m
- ✓ Ống ly tâm nhựa 15 mL có nắp đậy
- ✓ Bình định mức (CCX A): 10mL
- ✓ Pipet vạch (CCX A): 5 mL, 10 mL
- ✓ Pipet bầu (CCX A): 5 mL, 10 mL
- ✓ Dụng cụ thủy tinh các loại
- ✓ m. Micropipet 1 mL và 200 μ L.
- ✓ n. Vial 1.5 mL.

2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống HPLC/PDA của Thermo: gồm pump, đầu dò PDA, autosampler hoặc tương đương.
- Cột sắc ký lỏng pha đảo pha đảo C18 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5 μ m (hoặc tương đương).

II. Hóa chất và chất chuẩn

1. Hóa chất

- ✓ Nước cất 2 lần khử ion.
- ✓ MeOH, HPLC.
- ✓ K₂HPO₄, Merck.
- ✓ Amoni acetate, Merck

2. Pha động chạy máy:

- Dung dịch A: Dung dịch CH₃COONH₄ 50mM pH4.4 được lọc qua giấy lọc 0.45 μ m, đánh siêu âm 15 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.
- Dung dịch B: dd MeOH: Đánh siêu âm 15 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.

3. Chất chuẩn

a. Chuẩn gốc và dung dịch chuẩn gốc

Sodium benzoate (Supelco) & Potassium Sorbate (Sigma-Aldrich) hoặc tương đương (1)

Cân chuẩn trên cân phân tích HV.023.H

b. Dung dịch chuẩn gốc 10000 mg/L

Cân chính xác khoảng 100mg (ghi lại khối lượng cân chuẩn thực tính theo mg) của 2 chất chuẩn (1) cho vào bình định mức 10 mL (V thể tích định mức tính theo mL), định mức đến vạch bằng MeOH. Ta được hỗn hợp dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.068 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 4/6
--	----------------------------	---

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{m * \% \text{ pure} * 1000}{V * 100}$$

Lưu ý: Chuẩn gốc được bảo quản lạnh ở 4°C, sử dụng trong 1 năm

c. Dung dịch chuẩn trung gian 100 mg/L

Rút 0.1 mL hỗn hợp dung dịch chuẩn gốc 10000 mg/L cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng nước khử ion. Ta thu được dung dịch chuẩn 100 mg/L.

Lưu ý: Chuẩn trung gian được bảo quản ở 18°C, sử dụng trong 6 tháng.

d. Dung dịch chuẩn làm việc

Tiến hành pha loãng trung gian trong nước để được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ từ 0.5 đến 50 mg/L theo bảng sau:

C, ppm dãy chuẩn	50	20	10	5	2	1	0.5
C std trung gian, ppm	100				20	10	5
V, ml std trung gian	0.5	0.2	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1
Vdm, mL	1						
Dung môi	H2O DI						

Lưu ý: Chuẩn làm việc được sử dụng trong ngày

III. Kiểm soát QA/QC

- Mẫu lặp
- Mẫu spike trên nền mẫu

IV. Xử lý mẫu

1. Chuẩn bị mẫu

Mẫu nước chấm và thực phẩm khô được bảo quản nơi thoáng mát tránh ánh sáng và nhiệt độ cao. Còn đối với mẫu thủy hải sản được bảo quản đông lạnh.

2. Phương pháp tiến hành

Cân khoảng 2-5g mẫu (tùy vào nền mẫu đã được đồng nhất) cho vào ống ly tâm 50 mL, thêm vào 8 mL nước cất, lắc 1 phút cho mẫu tơi đều. Thêm 10mL ACN 5% acid formic, lắc mạnh 3 phút, cho hỗn hợp muối vào (4g MgSO₄ + 1g NaCl + 1g sodium citrate + 0.5 g Sodium Citrate sesquihydrate), lắc mạnh trong 3 phút, ly tâm 5phút

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.068 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/6
--	----------------------------	---

(3000vòng/phút). Lọc dung dịch qua màng 0.42µm vào vial, phân tích trên HPLC-UV. Pha loãng nếu cần để nồng độ mẫu nằm trong dãy chuẩn.

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị

- Cột sắc ký: cột C₁₈ 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm. (hoặc tương đương)
- Thể tích tiêm: 20 µl
- Pha động: CH₃COONH₄ 50mM pH4.4 : MeOH Tỉ lệ 70:30.
- Tốc độ : 1 mL/phút
- Điều kiện cho UV:

λ =230 nm (benzoate)

λ =254 nm (Sorbate) hoặc 235 nm (nếu chạy cùng lúc với benzoate)

Lưu ý: Với các cột sắc ký lỏng C₁₈ phân cực khác nhau (chiều dài, đường kính cột, kích cỡ hạt...), tỉ lệ thành phần pha động hay tốc độ dòng có thể thay đổi.

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

Sau khi hệ thống cân bằng (khoảng 30 phút), các mẫu sẽ được phân tích theo trình tự sau:

- ✓ Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao
- ✓ Mobile phase
- ✓ Mẫu cần kiểm nghiệm.
- ✓ Mẫu thêm chuẩn
- ✓ Chuẩn check

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm xen kẽ một điểm chuẩn sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc là một điểm chuẩn. Nếu mẫu không phát hiện có thể không cần dựng đường chuẩn mà chỉ cần chạy 1 điểm chuẩn, mẫu và mẫu spike tại ngay mức LOQ.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích thu được với nồng độ tương ứng. Kết quả chất cần phân tích trong mẫu được tính toán thông qua diện tích tương ứng so với đường chuẩn, theo công thức sau:

$$C(\text{ppm}) = \frac{C_0 * f * V}{m}$$

Trong đó:

- ✓ C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, ppm
- ✓ C₀: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính theo đường chuẩn, mg/L
- ✓ V: Thể tích chiết mẫu, mL
- ✓ m: khối lượng cân, g

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.068 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 6/6
--	----------------------------	---

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

1. Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (ít nhất là 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính (R^2) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995.
2. Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá $\pm 10\%$ giá trị thật.
3. Mẫu thêm chuẩn được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu. Hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn dao động từ 85-105% , lấy từ XNGTSD của phương pháp.
4. Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≥ 5 mẫu). Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại phải $< 6\%$, lấy từ XNGTSD của phương pháp.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích BM 15.04a và BM 15.06