

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.257 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 1/7
---	----------------------------------	---

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG FAT THÀNH PHẦN TRONG THỰC
PHẨM TRÊN THIẾT BỊ SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI PHỔ GC/
MS**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
LINH THỊ MÌNH	DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI	TRẦN THÁI VŨ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1			
2			
3			
4			

- A. TỔNG QUAN**
- I. Phạm vi áp dụng**

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.257 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 2/7
---	--	---

- Phương pháp này áp dụng để xác định hàm lượng Fat thành phần trong nền mẫu thực phẩm như bánh kẹo, thủy hải sản, trái cây, sữa và sản phẩm sữa.
- Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) đối với phương pháp được trình bày trong bảng:

Tên hợp chất	LOD (%)	LOQ (%)
C10 : 0	0.05	0.15
C12 : 0		
C14 : 0		
C16 : 0		
C16 : 1		
C18 : 0		
Cis C18 : 1		
Cis C18 : 2		
C18 : 3		
C20 : 0		
ETA	0.001	0.003
EPA		
DHA		

II. Tài liệu tham khảo

- [1] AOAC Official Method 996.06: Fat (Total, Saturated, and Unsaturated) in Foods Hydrolytic Extraction Gas Chromatographic 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. Sau đó, béo được chiết lên dung môi hexane, methyl hóa với dung dịch methanol trong môi trường bazo và được phân tích trên thiết bị GC/MS.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

- Đeo khẩu trang, găng tay khi thực hiện phân tích.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.257 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 3/7</p>
--	--	---

- Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động phòng thí nghiệm.
- Sử dụng tủ hút, kính bảo hộ và găng 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

2. Micropipet loại 20 μ L, 200 μ L và 1000 μ L.
3. Cân phân tích, độ chính xác 0.1 mg.
4. Bếp điện.
5. Ống thủy tinh 100 ml có nắp Teflon.
6. Thiết bị thổi khí.
7. Ống ly tâm dung tích 50 ml, 15 ml.
8. Pasteur pipet thủy tinh.
9. Nhiệt kế.

2. Thiết bị phân tích

10. Agilent 6890GC / HP 5972MS hoặc tương đương.
11. Cột mao quản ZB-5MS: 30m x 0.25 mm x 0.25 μ m hoặc tương đương.

II. Hóa chất và chất chuẩn

1. Hóa chất (hãng Fisher hoặc tương đương)

- Acid chlohydric 8 M
- Acid ascorbic
- Ethanol 95%, các dung môi hữu cơ hexane, isooctane
- Boron triflouride 12% trong methanol
- NaOH 0.5 M trong methanol

2. Chất chuẩn

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.257 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 4/7
---	----------------------------------	---

a. Chuẩn gốc

- Chuẩn Fat thành phần (Dr.Ehrentofer hoặc tương đương) có độ tinh khiết trên 99%
- 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 Fat thành phần 1000 mg/L: Cân chính xác khoảng 10 mg các chất chuẩn Fat vào bình định mức 10 ml, hòa tan bằng isooctane, định mức tới vạch bằng isooctane. 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 (mg/L).
- 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: Các dung dịch chuẩn được lưu trữ trong tủ mát (4-8°C)

c. Đường chuẩn Fat như trong bảng sau:

	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
Nồng độ Fat (mg/L)	0.5	2.5	5	10	25	50
Chuẩn Fat 1000 mg/L (μL)	5	25	50	100	250	500
Isooctane		10 mL				

- Bảo quản và lưu trữ: Các dung dịch chuẩn được lưu trữ trong tủ mát (4-8°C)

III. Xử lý mẫu

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.257 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 5/7
---	----------------------------------	---

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. Quá trình chiết béo tổng

- Chuẩn bị ống thủy tinh 100 ml: Ống thủy tinh được sấy ở nhiệt độ 105 °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_0 ($\pm 1\text{mg}$).
- Cân m_1 (g) mẫu đã được đồng nhất (khối lượng cân dao động từ 2 – 5 (g) phụ thuộc vào hàm lượng béo tổng thường có trong mẫu) vào ống ly tâm 50 ml. Thêm vào 0.30 – 0.40 (g) acid ascorbic, 2 ml ethanol nồng độ 95%, 10 ml acid chlohydric 8 M, vortex đều. Đun mẫu tại 80 °C trong vòng 40 phút.
- Sau khi thủy phân mẫu được để nguội tới nhiệt độ phòng. Chiết mẫu với hexane (15 ml x 3), vortex hoặc lắc đều trong vòng 5 phút, ly tâm và chiết lớp hexane vào ống thủy tinh 100 ml đã chuẩn bị sẵn. Sau đó thổi khô ở nhiệt độ 60 °C cho tới cạn.
- Sấy ống thủy tinh 100 ml ở nhiệt độ 105 °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 chênh lệch giữa m_2 và m_0 , tính toán được m (g) chất béo tổng ($m_2 - m_0$)

b. Quá trình methyl hóa

- Sau khi xác định hàm lượng béo có trong mẫu, tiếp tục thêm V_1 mL NaOH 0.5M trong MeOH, V_2 mL BF_3 12% trong MeOH vào ống thủy tinh (theo bảng sau). Đậy nắp kín và chặt, lắc nhẹ hỗn hợp và đem đun cách thủy ở $90 \pm 5^\circ\text{C}$ đến khi lượng béo tan hết. Lấy mẫu ra để nguội ở nhiệt độ phòng.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.257 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 6/7
---	----------------------------------	---

- Thể tích NaOH và BF_3 sử dụng tùy thuộc vào hàm lượng béo trong mẫu:

Hàm lượng béo (mg)	NaOH 0.5M V_1 mL	BF_3 12% V_2 mL
100-250	4	5
250-500	6	7
500-750	8	9
750-100	10	12

- Tiếp theo cho chính xác 10mL Isooctane vào ống thủy tinh. Tiếp tục đun cách thủy ở $90 \pm 5^\circ\text{C}$ trong 30 phút. Sau đó lấy 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 khoảng 2 phút.
- Rút lớp isooctane phía trên vào vial và phân tích trên GC/MS.

3. Phân tích

a. Điều kiện GC:

-
-
- Cột mao quản ZB-5MS: 30m x 0.25 mm x 0.25 μm hoặc tương đương
- Tốc độ dòng: 1.2 mL/phút.
- Nhiệt độ Inlet: 280 $^\circ\text{C}$; detector: 280 $^\circ\text{C}$; chế độ tiêm không chia dòng.
- Chương trình nhiệt:

Nhiệt độ đầu	Tốc độ tăng nhiệt ($^\circ\text{C}$ /phút)	Nhiệt độ ($^\circ\text{C}$)	Thời gian giữ (phút)
80 $^\circ\text{C}$		80	1
	15	300	2

b. Điều kiện MS:

- Solvent delay: 4 phút.
- Nguồn ion hóa: EI, nhiệt độ 3000 $^\circ\text{C}$.
- Chế độ: Scan từ mass 35 đến 300.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.257 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 15/06/2018 Trang: 7/7
---	----------------------------------	---

c. Trình tự của quá trình tiêu 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

- Xây dựng các đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỉ lệ diện tích của chuẩn với nồng độ chất phân tích.
- Hàm lượng Fat trong mẫu được tính toán theo công thức:

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

- 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
- V: thể tích lấy

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với R² ≥ 0.99
- Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
- Độ lệch thời gian lưu không quá 0.5 % cho GC
- Tỷ số ion: Cường độ tương đối của ion định tính so với ion định lượng phải nằm trong khoảng cho phép:

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 %

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu BM.15.04a và BM.15.06