

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.042 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:25/02/2018 Trang: 1/6
---------------------------------------------------	----------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

XÁC ĐỊNH TỔNG HÀM LƯỢNG XƠ DINH DƯỠNG TRONG THỰC PHẨM (DETERMIATION OF TOTAL DIETARY FIBER IN FOOD) (AOAC 991.43)

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Trần Thị Hằng	Phạm Thị Kim Cúc	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	25/02/2018

A. TỔNG QUAN

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.042 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:25/02/2018 Trang: 2/6
---------------------------------------------------	----------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

I. Phạm vi áp dụng.

- Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng dietary fiber (Xơ dinh dưỡng) trong thực phẩm.
- Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0.1% và giới hạn định lượng là 0.3%

II. Tài liệu tham khảo.

- Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: *AOAC Official Method 991.43*

III. Nguyên tắc.

- Tổng hàm lượng dietary fiber (TDF) được xác định bằng phần cặn còn lại sau khi được phân hủy lần lượt trong enzym α -amylase, protease và amyloglucosidase trừ đi hàm lượng protein và tro có trong phần cặn đó. Phần cặn sau khi lọc sẽ được rửa bằng cồn 78%, 95% và aceton, sau khi làm khô và cân khối lượng cặn. Tiến hành làm hai mẫu thực và hai mẫu trắng song song, một mẫu sẽ đem đi xác định protein, mẫu còn lại xác định tro tại 525°C.

VI. 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 hóa 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 phân tích.

- Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg
- Hệ thống lọc với áp suất kém
- Bếp đun cách thủy.
- Tủ sấy
- Lò nung
- Bình hút ẩm
- Hệ thống phá mẫu và chưng cất đậm.

<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.042 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:25/02/2018 Trang: 3/6</p>
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------

g. Máy đo pH, bercher 300mL, pipet...

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hóa chất

a. HCl, P.A

b. TRIS, MES

c. NaOH, P.A

d. Eter dầu, aceton, ethanol 78%, ethanol 98%.

e. H₂SO₄, P.A

f. α -amylase: được bảo quản ở nhiệt độ lạnh dưới 5°C.

g. Protease: được bảo quản lạnh dưới 5°C.

h. Amyloglucosidase: được bảo quản lạnh dưới 5°C.

2. Dung dịch hóa chất:

a. Ethanol 95%: 95ml ethanol tinh khiết + 5ml nước cất

b. Ethanol 78%: 78ml ethanol tinh khiết + 22 ml nước cất

c. Đệm MES/TRIS (c=0.05mol/L, pH=8.3): Cân 2.13g MES (2-morpholinoethansulfonic acid monohydrate) và 1.22 TRIS (tris(hydroxymethyl)-aminomethane) hòa tan trong nước cất và chỉnh pH về 8.3 tại 20°C (hoặc pH=8.2 ở nhiệt độ 24°C) với NaOH 6M, sau đó định mức 200ml dung dịch.

d. NaOH 6M: cân 24g NaOH hòa tan trong nước cất và định mức thành 100ml dd

e. NaOH 5%: Cân 6.8g NaOH và hòa tan trong 100ml nước cất

f. HCl 0.56M: hút 28ml HCl 2M và định mức bằng nước cất tới vạch 100ml

g. HCl 5%: hút 80ml HCl 2M và định mức lên tới vạch 100ml.

h. Celite: rửa bằng acid, sau đó rửa lại nhiều lần bằng nước thường cho hết acid, rửa lại bằng nước cất. Sấy khô và đem nung ở 550°C khoảng 4h

<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.042 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:25/02/2018 Trang: 4/6</p>
------------------------------------------------------------	------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------

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 hóa chất
- Mẫu Lặp
- Mẫu QC

Thực hiện mẫu Blank, blank matrix và mẫu QC theo mục IV.

IV. Phân tích mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu:

- Mẫu được nghiền mịn có kích thước nhỏ hơn 0.5mm. Nếu mẫu chứa nhiều nước thì làm khô mẫu ở 105°C, sau đó làm nguội, nghiền mịn và trộn đều mẫu.
- Nếu mẫu có hàm lượng béo lớn hơn 5% thì loại béo bằng 3*25ml ether dầu, làm khô mẫu.

2. Tiến hành phân tích:

- Tiến hành làm hai mẫu trắng và hai mẫu thực song song.
- Cân khoảng 1g mẫu (với độ chính xác 0.1g và hai mẫu cân không được chênh lệch quá 20mg, nếu mẫu có hàm lượng TDF lớn có thể giảm lượng cân) đã được chuẩn bị ở trên vào bercher 300ml, thêm 40ml dung dịch đệm MES/TRIS, chỉnh pH=8.3 nếu cần, đậy cốc bằng mặt kính thủy tinh
- Thêm 50µl dung dịch α -amylase, lắc đều và đun cách thủy ở nhiệt độ 95-100°C trong 30 phút. Làm nguội về 60°C,
- Thêm vào dung dịch 50µl protease, tiếp tục đun cách thủy ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút. Thêm vào dd 5ml HCl 0.56M và chỉnh về pH=4.0-4.7 tại 60°C với NaOH 5% và HCl 5%. Thêm tiếp vào dung dịch 150µl amyloglucosidase và đun cách thủy ở 60°C trong 30 phút.
- Tiếp theo cho vào mỗi cốc 220ml ethanol 95% đã được để yên ở nhiệt độ 60°C. Sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 1h.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.042 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:25/02/2018 Trang: 5/6
---------------------------------------------------	----------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

- Lọc dung dịch bằng phễu lọc bucher có rút áp suất kém (có thể bổ sung thêm 1g cellit (hoặc ít hơn) đã được xử lý như trên), sau đó rửa 3 lần với 15ml ethanol 78%, 2 lần với 10ml ethanol 95% và 3 lần với 10ml acetone. Sau đó lấy phần cặn thu được đem sấy ở 105⁰C đến khi khối lượng không đổi, làm nguội trong bình hút ẩm và cân.

3.. Xác định protein trong phần cặn:

- Lấy phần cặn sau sấy của một mẫu thực và một blank đem đi xác định protein theo AOAC 928.08, N*6.25

4. Xác định hàm lượng tro tổng số trong phần cặn:

- Lấy phần cặn của một mẫu thực và một mẫu trắng còn lại đem xác định hàm lượng tro tổng số ở 525⁰C trong 5h.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

Hàm lượng xơ khó tiêu (TDF) trong mẫu được tính như sau:

$$\text{TDF(\%)} = \frac{(R_1 + R_2)/2 - P - A - B}{(m_1 + m_2)/2} * 100$$

Trong đó:

- R₁, R₂: là phần cặn của mẫu thực sau sấy (g)
- P: hàm lượng protein có trong phần cặn của mẫu thực sau sấy (g)
- A: hàm lượng tro tổng có trong phần cặn của mẫu thực sau sấy (g)
- m₁, m₂: khối lượng mẫu (g)
- 100: hệ số quy đổi về đơn vị %
- B: blank được xác định như sau: $B(g) = (r_1 + r_2)/2 - P_B - A_B$
 - r₁, r₂: phần cặn của blank sau sấy (g)
 - P_B: hàm lượng protein có trong phần cặn của blank (g)
 - A_B: hàm lượng tro tổng có trong phần cặn của blank (g)

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.042 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:25/02/2018 Trang: 6/6
---------------------------------------------------	------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

- Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≤ 10 mẫu). Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại không quá giới hạn cho phép theo phụ lục f AOAC.

Nồng độ	RSD, %
100%	1.3
10%	1.9
1%	2.7
0.10%	3.7
100ppm	5.3
10ppm	7.3
1ppm	11
100ppb	15
10ppb	21
1ppb	30

E. **BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

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