

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.048 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 1/5
---	----------------------------	---

ĐỊNH LƯỢNG ACID CITRIC TRONG THỦY SẢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ ION – ĐẦU DÒ ĐỘ DẪN ĐIỆN (IC-CD)

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

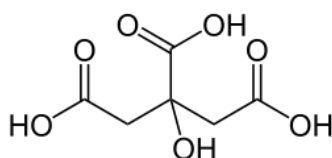
I. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này được áp dụng định lượng citric trong thủy sản bằng sắc ký ion đầu dò độ dẫn điện. Giới hạn phát hiện của phương pháp: 10ppm.

II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: *Ref. J. Pharm, Biomed, Anal 36(2004), 517-524(IC-CD)*

III. Nguyên tắc



Acid citric: $C_6H_8O_7$

Mw : 192.12 g/mol

Mẫu sau khi được đồng nhất sẽ được chiết trong nước cất, sau đó tua protein bằng Acetonitril, ly tâm, lọc dung dịch qua màng lọc 0.45 μ m và được phân tích trên hệ thống IC-CD.

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 phân tích

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
- Dụng cụ thủy tinh các loại
- Vial 1.5 mL.

2. Thiết bị phân tích

Hệ thống sắc ký Ion bao gồm degaser, pump và đầu dò CD.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.048 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 3/5
---	----------------------------	---

Cột sắc ký sắc ký ion ionPac AS19 250mm x 2mm (hoặc tương đương).

II. Hóa chất và chất chuẩn

1. Hóa chất

- Nước cất 2 lần khử ion.
- NaOH, Merck.
- Chuẩn acid citric monohydrate, Sigma-Aldrich hoặc tương đương

2. Dung dịch pha động:

Dung dịch NaOH 25mM, được đánh siêu âm kỹ trước khi phân tích.

3. Cách pha dung dịch chuẩn

Acid citric monohydrate (Sigma hoặc tương đương)

Cân chuẩn trên cân phân tích HV.023.H

3.1. Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác 11mg (m) chất chuẩn cho vào bình định mức 10 mL (ghi lại khối lượng cân), định mức đến vạch bằng nước cất khử ion. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000ppm. Công thức tổng quát để tính nồng độ của chuẩn:

$$C(ppm) = \frac{m \times 192 \times \% \text{ pure} \times 1000}{V \times 210 \times 100}$$

$$C(ppm) = \frac{10.9 \times 192 \times 99 \times 1000}{10 \times 210 \times 100}$$

Nồng độ chuẩn gốc 995.6ppm

Trong đó: 192, 210 là khối lượng phân tử của acid citric và acid citric ngậm nước.

3.2 Dung dịch chuẩn trung gian 100 mg/L

Rút 1 mL dung dịch chuẩn gốc 1000 mg/L cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng nước cất khử ion. Ta thu được dung dịch chuẩn 100 mg/L.

3.3 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 2 đến 50 mg/L.

Rút lần lượt 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02mL dung dịch chuẩn trung gian 100 mg/L cho vào 5 vial 1.5 mL, thêm nước cất khử ion đến 1mL. Ta thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ: 50, 20, 10, 5, 2mg/L.

III. Kiểm soát QA/QC

Trong mỗi đợt phân tích, phân tích viên thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích:

- Mẫu lặp

- Mẫu spike trên nền mẫu

IV. Xử lý mẫu

1. Chuẩn bị mẫu

Mẫu thủy hải sản được bảo quản đông lạnh -18°C .

2. Phương pháp tiến hành

Cân khoảng 5g mẫu cho vào ống ly tâm 50 mL, thêm vào 15 mL nước cất, lắc 5 phút, sau đó thêm 10mL ACN, lắc mạnh 3 phút, ly tâm và lọc dung dịch vào vial, phân tích trên IC-CD.

3. Phân tích trên IC-CD

- Cột sắc ký: cột ionPac AS19 250mm x 2mm. (hoặc tương đương)
- Thể tích tiêm: 25 μl
- Pha động: NaOH 25mM
- Tốc độ : 0.4 mL/phút
- **Điều kiện cho CD:**
 - Nhiệt độ: 30°C
 - Base: 100 $\mu\text{S/cm/FS}$
 - Current:2

4. Trình tự tiêm mẫu

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

- a. Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao
- b. Mẫu cần kiểm nghiệm.
- c. Mẫu thêm chuẩn
- d. 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.

G. YÊU CẦU VỀ ĐỘ TIN CẬY CỦA PHÉP PHÂN TÍCH

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 $\pm 15\%$ 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 phải nằm trong khoảng 80-120 %.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.048 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/5
---	---------------------	---

4. Mẫu lặp lại được thực hiện cho một lô mẫu (≥ 5 mẫu). Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại không quá $\pm 10\%$.

C. TÍNH 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:

$$C = \frac{C_0 \times V_{chiet}}{m} \times f$$

Trong đó:

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, ppm
- C_0 : nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính theo đường chuẩn, mg/L
- V_{chiet} : Thể tích chiết, mL
- m: khối lượng cân, g
- f: hệ số pha loãng (nếu có)

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- 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.
- Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá $\pm 10\%$ giá trị thật.
- Mẫu thêm chuẩn được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu. Hiệu suất thu hồi của mẫu thêm chuẩn phải phù hợp theo bảng 1:
- Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu. Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại phải phù hợp theo bảng 1:

ST T	Hàm lượng	Đơn vị	Độ thu hồi, %	RSD, %
1	0.1	%	95-105	3.7
2	0.01	%	90-107	5.3
3	10	ppm	80-110	7.3

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