

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.152 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 30/10/2017 Trang: 1/6
---	----------------------------------	---

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ETHANOL TRONG RƯỢU VÀ THỨC UỐNG CÓ CỒN SỬ DỤNG THIẾT BỊ HEADSPACE – GC/FID

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
LA THỊ TRẦM	DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI	TRẦN THÁI VŨ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

ST T	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	30/10/2017
2	Phần A.I	Thay đổi tài liệu tham khảo	30/10/2017
3	Phần B.I.2	Thay đổi thiết bị phân tích: Máy GC/MS -> GC/FID, cột phân tích	30/10/2017
4	Phần B.V.1	Thay đổi điều kiện Headspace	30/10/2017
5	Phần B.V.2	Thay đổi điều kiện GC	30/10/2017

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.152 Ngày ban hành: 30/10/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 2/6
--	--	---

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này áp dụng để xác định hàm lượng ethanol trong rượu và thức uống có cồn.

STT	Hợp chất	LOD (%)	LOQ (%)
1	Ethanol	0.003	0.010

II. Tài liệu tham khảo

AOAC 984.14: Ethanol in beer.

III. Nguyên tắc

Mẫu được xác định trực tiếp sử dụng kỹ thuật Headspace GC/FID.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

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

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 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

- Micropipet loại 20 μ L, 200 μ L và 1000 μ L
- Vial headspace 20 mL và nắp nhôm
- Bình định mức 10 mL
- Pipet 1 mL

2. Thiết bị phân tích

- Headspace sampler Agilent 7694E hoặc tương đương.
- Agilent 7890A hoặc tương đương.
- DB-5: 30 m x 0.53 mm x 1.5 μ m hoặc tương đương.

II. Hóa chất và chất chuẩn

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.152 Ngày ban hành: 30/10/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 3/6
---	----------------------------------	---

1. Hóa chất

- Ethanol 100 % của Merk hoặc tương đương.
- 1-propanol 99 % của Fisher hoặc tương đương.
- Nước cất, DI.

2. Pha chuẩn

Đường chuẩn ethanol được pha như trong bảng sau:

Nồng độ (%)	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0
Thêm H ₂ O	Thêm khoảng 4-5 mL nước cất vào bình mức 10 mL				
Ethanol 100 % (μL)	25	50	100	150	200
1-propanol 99 % (μL)	50				
Định mức	Định mức đến vạch 10mL bằng nước cất, vortex và lắc đều dung dịch				

Rút 30 μL từ mỗi bình định mức vào các ống Headspace khác nhau, đậy nắp và phân tích bằng thiết bị Headspace GC/FID.

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 QC: Mẫu spike trên nền mẫu blank với nồng độ kiểm soát: 1%.

a. Mẫu blank hóa chất

- Phân tích ít nhất một mẫu blank hóa chất trong mỗi lần thực hiện phân tích.
- Nếu mẫu blank hóa chất ngoài giới hạn kiểm soát, kiểm tra xem dụng cụ, hoá chất, chất chuẩn có bị nhiễm bẩn không. Dụng cụ được tráng với acetone và nước cất hoặc nước DI. Nếu sử dụng dụng cụ, hóa chất và chất chuẩn mới hoàn toàn vẫn thấy xuất hiện chất phân tích thì thực hiện lặp lại 3 lần blank và trừ blank nền mẫu.

c. Mẫu thêm chuẩn (QC)

- Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn 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

1. Chuẩn bị mẫu:

Lắc đều mẫu trước khi tiến hành phân tích.

2. Phương pháp tiến hành

a. Mẫu rượu

Tùy vào độ rượu mà pha loãng thích hợp sao cho nồng độ thuộc khoảng 0.5% – 1% .

Trước tiên cần ước lượng hàm lượng ethanol trong mẫu bằng cách rút 1 ml mẫu vào bình mức 10 ml có sẵn 4 – 5 mL H₂O cất (pha loãng 10 lần). Phân tích mẫu và tính hàm lượng ethanol ước lượng. Sau đó tiến hành phân tích chính xác:

Hàm lượng ethanol ước lượng trong rượu (%)	30 – 35	20 – 30	10 – 15	1 – 5	0.1 – 0.5
Thể tích rượu cần rút (μL)	250 μL	300 μL	500 μL	2 mL	9 mL
Nội chuẩn 1-propanol (99 %)	50 μL				
Bình mức	Định mức lên 10 mL bằng nước cất, lắc đều				

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.152 Ngày ban hành: 30/10/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 5/6
---	----------------------------------	---

Rút 30 μ L vào ống Headspace, đậy nắp và phân tích bằng thiết bị Headspace GC/GID.

b. Mẫu bia

Dùng bình định mức 10 mL lấy chính xác 10 mL mẫu bia: Dùng pasteuripet thủy tinh rút mẫu bia vào bình mức, bỏ hết phần bọt và định mức lên 10 mL bằng chính mẫu bia.

Chuyển 10 mL mẫu bia trong bình mức 10 mL vào bình định mức 50 mL, tráng 3-4 lần bình 10 mL bằng H₂O cất. Thêm 250 μ L 1-propanol 99%. Định mức tới vạch bằng nước cất. Lắc đều. Rút 30 μ L vào ống Headspace và phân tích bằng thiết bị Headspace GC/FID.

V. Phân tích

1. Điều kiện Headspace

Oven temp: 105 °C	Loop Eq. time: 0.1 min
Loop temp.: 120 °C	Injection time: 0.5 min
Transferline temp: 200 °C	GC cycle time: 12 min
Sample Equilibration time: 3 min	Vial pressure: 10 psi
Pressuriz. Time: 0.15 min	Shaking: 2 High
Loop fill time: 0.5 min	

2. Điều kiện GC/FID

Cột DB-5: 30 m x 530 μ m x 1.5 μ m
 Nhiệt độ Injector: 250 °C
 Tốc độ dòng: 2 mL/phút
 Nhiệt độ đầu dò: 260 °C
 Tốc độ khí Hydrogen: 45 mL/phút
 Tốc độ không khí: 350 mL/phút

<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.152 Ngày ban hành: 30/10/2017 Lần ban hành: 02 Trang: 6/6</p>
--	--	---

Tốc độ dòng khí mang Nitrogen: 20 mL/phút

Chương trình nhiệt: 60 °C giữ trong 1 phút → 80 °C (12 °C/phút) → 250 °C (30 °C/phút)

1. 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

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa tỷ lệ diện tích peak của ethanol và nội chuẩn 1-propanol theo nồng độ ethanol.

Hàm lượng Ethanol trong mẫu được tính toán theo công thức:

$$C = C_o \times f$$

- C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, %
- C_o: nồng độ chất phân tích xác định trên máy, %
- f: hệ số pha loãng

D. 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.
- Độ lệch thời gian lưu không quá 0.5 % cho GC
- 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)

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

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