

| | | |
|--|----------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.057 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 2/6 |
|--|----------------------------|---|

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

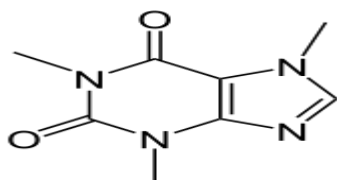
Phương pháp này dùng để xác định cafein trong nền mẫu nước giải khát, trà và cà phê. Giới hạn phát hiện và định lượng của phương pháp:

| Nền mẫu | LOD (ppm) | LOQ (ppm) |
|----------------|-----------|-----------|
| Nước giải khát | 3 | 10 |
| Trà, cà phê | 50 | 150 |

II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: Ref. Agric Food Chem. 45(1997) 3973-3975

Công thức cấu tạo



CTPT: $C_8H_{10}N_4O_2$
 M_w : 194.19

III. Nguyên tắc

Cafein được chiết trong nước nóng, sau đó được pha loãng trong pha động và tiến hành định lượng bằng thiết bị HPLC-UV/Vis.

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
- Bộ lọc dung môi tương thích với màng lọc 0.45 μ m
- Bồn siêu âm có điều chỉnh nhiệt độ
- Màng lọc Nilon, 13 mm, 0,45 μ m
- Bình định mức: 25mL

- f. Pipet vạch : 1mL, 2mL
- g. Dụng cụ thủy tinh các loại
- h. Vial 1.5 mL
- i. Kim pha chuẩn thể tích 0.5mL, 1mL

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 5µm (hoặc tương đương).

II. Hóa chất và chất chuẩn

1. Hóa chất

- a. Nước cất 2 lần khử ion.
- b. MeOH, HPLC.

2. Pha động chạy máy

- Dung dịch A: H₂O cất khử ion, đánh siêu âm 10 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.
- Dung dịch B: MeOH, đánh siêu âm 10 phút loại bọt khí trước khi sử dụng.

3. Chất chuẩn

Cafein dạng rắn của (Dr. Ehrenstorfer) hay tương đương

3.1 Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác khoảng 10mg (a) chất chuẩn cafein cho vào bình định mức 10 mL (ghi lại khối lượng cân), định mức đến vạch bằng methanol. Ta được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ:

$$C_{\text{stock}}(\text{ppm}) = \frac{m \times \% \text{ pure} \times 1000}{V \times 100}$$

Trong đó:

- m: khối lượng chất chuẩn, mg
- V: thể tích định mức, mL
- %pure: độ tinh khiết của chất chuẩn

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

3.2 Dung dịch chuẩn trung gian 100 mg/L

Rút 1.0 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.

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

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 0.5 đến 50 mg/L theo bảng sau:

| | | |
|--|----------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.057 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 4/6 |
|--|----------------------------|---|

| | | | | | | | |
|------------------------------|---------------------|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| 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 | H ₂ O DI | | | | | | |

Lưu ý: Chuẩn làm việc được sử dụng trong ngày

III. Kiểm soát QA/QC:

- Mẫu lặp
- Mẫu spike hoặc mẫu QC do trưởng nhóm chỉ định

IV. Xử lý mẫu:

1. Chuẩn bị mẫu

Mẫu được bảo quản nơi thoáng mát. Mẫu phải được xay mịn trước khi tiến hành phân tích.

2. Phương pháp tiến hành

- Đối với nước giải khát:

Rút 1-2mL mẫu vào bình định mức 25mL, định mức đến vạch bằng nước cất, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm vào vial

- Đối với trà, cà phê:

Cân chính xác khoảng 0.5g mẫu vào ống ly tâm 50mL, thêm khoảng 40mL nước cất, đánh siêu 30 phút ở nhiệt độ 60°C, lấy ra để nguội, lắc đều, lọc qua màng lọc 0.45µm vào vial. Pha loãng mẫu trong nước DI để nồng độ mẫu nằm trong dãy chuẩn.

| | |
|---------------------------|---------------------|
| Nền mẫu | Hệ số pha loãng (f) |
| Nước giải khát | 1 |
| Cà phê tách cafeine | 1 |
| Trà, cà phê (thường 1-2%) | 20 |

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: MeOH: H₂O=30:70

| | | |
|--|----------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.057 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/6 |
|--|----------------------------|---|

- Tốc độ : 0.7 mL/phút
- Bước sóng: 272nm

Lưu ý: Với các cột sắc ký lỏng C_{18} 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.
- 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.

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:

Đối với mẫu trà, cà phê:

$$C(\%) = \left(\frac{C_0 \times V \times f}{m \times 10000} \right)$$

Trong đó:

- C: nồng độ cafein trong mẫu, %
- C_0 : nồng độ cafein trong dịch chiết tính theo đường chuẩn, mg/L
- V: Thể tích chiết, mL
- m: khối lượng cân, g
- f: hệ số pha loãng (nếu có)
- 10000: hệ số chuyển đổi từ mg/kg sang %

Đối với mẫu nước giải khát:

$$C(\text{mg/L}) = \frac{C_0 \times V \times f}{V_{\text{mẫu}}}$$

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 ± 10 % giá trị thật.

3. Mẫu lặp lại, mẫu spike hay mẫu QC (nếu có) được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu. Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại, hiệu suất thu hồi mẫu spike hay mẫu QC phải phù hợp theo:

| | | |
|--|----------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.057 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 6/6 |
|--|----------------------------|---|

| ST T | Hàm lượng | Đơn vị | Độ thu hồi, % | RSD, % |
|-----------------|----------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|
| 1 | 0.2-5 | % | 95-102 | ≤ 2.5 |
| 2 | 10-500 | ppm | 90-99 | ≤ 5.3 |

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