

**XÁC THỰC MẬT ONG PHA TRỘN BẰNG SỰ KẾT HỢP
CỦA PHÂN TÍCH NGUYÊN TỐ- ĐỒNG VỊ KHỐI PHỔ VÀ
SẮC KÍ LỎNG- ĐỒNG VỊ KHỐI PHỔ (LC/EA- IRMS)**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Ngọc Quân	Trần Minh Thứ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1			

A. TỔNG QUAN

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.232 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 24/3/2018 Trang: 2/6
---	---------------------	--

I. Phạm vi áp dụng.

- Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác thực đường thực vật C₃ trong mật ong bằng kỹ thuật xác định tỉ lệ đồng vị bền của carbon (LC/EA-IRMS).
- Giới hạn của phương pháp:
 - Difference max ¹³C sugar fractions: < ±2.1‰
 - Oligosaccharides: < 1%
 - Diference d¹³C(Fructose-Glucose): < 1‰

II. Tài liệu tham khảo.

- Apidologie (2008),INRA/DIB-AGIB/EDP Scienecs, 2008

III. Nguyên tắc.

- Sử dụng EA-IRMS để xác định giá trị δ¹³C của mật ong và protein tách chiết từ mật ong, và LC-IRMS để xác định giá trị δ¹³C của fructose, glucose, disaccharide, trisaccharride, Oligosaccharides. Sau đó so sánh sự khác nhau giữa các giá trị này để xác định sự pha trộn trong mật ong.

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 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 5 số
 - Máy ly tâm
 - Micro pipet
2. Thiết bị phân tích
 - EA-IRMS (Thermo Fisher)
 - LC-IRMS (Thermo Fisher)

II. Hoá chất và chất chuẩn.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.TN.232 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 24/3/2018 Trang: 3/6</p>
--	----------------------------	--

1. Hoá chất.

- Nước LC - MS
- Nước DI
- Acid phos-phoric tinh thể
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- Sodium tungstate dihydrate 10% : cân 40g hòa tan trong 400mL nước DI.
- Acid sulfuric 0.335M: hút 7.2ml acid đậm đặc cho vào 400ml nước DI.
- Khí Helium 5.0(carrier gas)
- CO_2 5.0 (working standard reference gas)
- O_2 5.0 (flash combustion gas)

2. Chất chuẩn:

- D-glucose (ACROS, 99%)
- D-fructose (ACROS, 99%)
- Sucrose (ACROS, 99%)
- Disaccharides
- Trisaccharides
- Oligosaccharide

3. Chuẩn làm việc: cân 0.5g beet sugar pha loãng 200 lần.

4. Pha động chạy máy:

- H_3PO_4 1.5M: acid phosphoric ở dạng rắn, cho vào ống thủy tinh sấy chân không 70°C đến khi tan hoàn toàn sẽ được dung dịch acid có nồng độ 15M. Lấy 30ml acid đậm đặc cho vào 300ml nước siêu sạch.
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 100g/l: cân 30g chất rắn trong 300ml nước siêu sạch.
- Các dung dịch oxy hóa H_3PO_4 và $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 100g/l chuẩn bị trong chai thủy tinh màu nâu và được loại bọt khí trong bể siêu âm cùng với bơm.

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.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.232 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 24/3/2018 Trang: 4/6
---	---------------------	--

- Mẫu Blank Reagent.
- Mẫu QC phòng thí nghiệm do trưởng nhóm quyết định

IV. Xử lý mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu.

Trích dẫn “ hướng dẫn công việc đồng nhất mẫu trong phòng thí nghiệm – HD.KT.022”

Điều kiện bảo quản mẫu: nhiệt độ phòng

2. Phương pháp tiến hành.

a. EA-IRMS

- Honey: Cân chính xác 3mg mật ong không pha loãng, sai lệch 0.1 mg, trong capsule và đặt trên bộ phận lấy mẫu tự động của buồng đốt.
- Protein:
 - Nếu có một lượng đáng kể chất rắn mật ong thì tiến hành lọc thông qua lưới 100_150 (nguyên liệu nylon là tốt nhất), bất kì vật liệu không hòa tan nào nặng hơn nước sẽ gây ô nhiễm protein kết tủa.
 - Cân 10-12g mật ong vào ống ly tâm 50ml, thêm 4ml H₂O, trộn đều. Thêm 2ml dung dịch Na₂WO₄ 10% và 2ml H₂SO₄ 0.335M, lắc đều. Tiến hành đun cách thủy ở 80°C trong 10 phút. Sau khi đun có kết tủa nổi lên, cho thêm nước vào đầy ống rồi tiến hành ly tâm 5 phút ở 1500 vòng/phút, gạn bỏ phần nước và giữ lại phần rắn. Lặp lại bước rửa thêm 3 lần.
 - Lấy một lượng protein thích hợp vào buồng đốt tương tự như trong phần kiểm tra mật ong. Đốt cháy protein bằng phương pháp tương tự được sử dụng cho mật ong.

b. LC-IRMS

- Cân 0.2-0.4g mật ong vào bình định mức 100ml rồi lọc qua màng lọc 0.45µm cho vào vial.

Phân tích

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.232 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 24/3/2018 Trang: 5/6
---	---------------------	--

Thông số thiết bị

Ms		
HV	(KV)	3.02
Vac	(mBar)	1.6-1.8e-006
LC Isolink interface		
Acid pump	(µl/min)	50
Ox.-pump	(µl/min)	25
Mobile phase (H ₂ O)	(µl/min)	300
Nhiệt độ cột phản ứng	(°C)	55
Nhiệt độ lò phản ứng	(°C)	99
Thông số cột LC		Rezex RCM-Monosaccharide Ca +2 LC column 300*7.8mm

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

ANALYSIS REQUESTED: 13C ISOTOPE Analysis by EA/LC (C4/C3 sugars)				
Parameter	Result	Unit	Method	MD L
Protein	Nhập từ máy	d13C (‰)	AOAC 998.12	
Honey	Nhập từ máy	d13C (‰)	AOAC 998.12	
Fructose (F)	Nhập từ máy	d13C (‰)		
Glucose (G)	Nhập từ máy	d13C (‰)		
Disaccharides	Nhập từ máy	d13C (‰)		
Trisaccharides	Nhập từ máy	d13C (‰)		
Oligosaccharides	Nhập từ máy	d13C (‰)		
Delta d13C (F-G)		d13C (‰)		
Delta d13C (max)	Xem bảng dưới	d13C (‰)		
diff (protein- honey)		d13C (‰)	AOAC 998.12	
C4 sugar content	$(\text{Diff(P-H)} / (\text{P} + 9.7)) * 100$	%	AOAC 998.12	
F/G ratio	Area(fruc/gluc)			
Portoin of Disaccharides	Area(di)/all area	%		
Portoin of Trisaccharides	Area(tri)/all area	%		
Portoin of Oligosaccharides	Area(olig)/all area	%		

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.232 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 24/3/2018 Trang: 6/6
---	---------------------	--

Tiêu chí đánh giá giới hạn của các giá trị $\Delta\delta^{13}C$ trong mật ong tinh khiết với độ tin cậy 99,7%

Thông số	Giới hạn
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) p – h	≥ -1 (AOAC 998.12)
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) fru – glu	± 1
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) fru - ds	± 2.1 (APPLICA GbmH – Applied Chemical Analysis, Olof-Palme-Str. 8, 28719 Bremen, Germany)
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) fru - ts	
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) fru - p	
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) glu - ds	
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) glu - ts	
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) glu - p	
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) ds - ts	
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) ds - p	
$\Delta\delta^{13}C$ (‰) ts - p	

*Giới hạn giữa tất cả
các giá trị $\Delta\delta^{13}C$
(‰) max*

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Độ lệch của thời gian lưu không quá 2.5%.
- ✓ Độ lệch của dung dịch chuẩn check beet sugar không quá 0.2 đơn vị.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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