**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ĐƯỜNG BẰNG SẮC KÝ KHÍ GHÉP KHỐI PHỔ (GC/MS)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nhân viên biên soạn | Nhân viên xem xét | Nhân viên phê duyệt |
| TỪ HIẾU HẬU | DIỆP THỊ HỒNG TƯƠI | TRẦN THÁI VŨ |

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| STT | Vị trí | Nội dung sửa đổi | Ngày sửa đổi |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

1. **TỔNG QUAN**
2. **Phạm vi áp dụng.**

* Phương pháp này được áp dụng để xác định hàm lượng đường (< 10%) trong thực phẩm. Giới hạn phát hiện của phương pháp với nền mẫu mật ong là 0.5 g/100g và với các nền mẫu còn lại là 0.05 g/100g.

|  |  |
| --- | --- |
| **STT** | **Chắt phân tích (sugar)** |
| 1 | Inositol |
| 2 | Sorbitol |
| 3 | Glycerol |
| 4 | Sacharose |
| 5 | Lactose |
| 6 | Glucose |
| 7 | Fructose |
| 8 | Maltose |

1. **Tài liệu tham khảo.**

* Food Chemistry 120 (2010) 637–642: Gas chromatographic–mass spectrometric characterization of tri- and tetrasaccharides in honey

1. **Nguyên tắc.**

* Mẫu được pha loãng với DI. Sau đó được tạo dẫn xuất trimethylsilyl (TMS) và phân tích trên GC/MS.

1. **Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.**

* Tuân thủ các nguyên tắc hoạt động trong phòng thí nghiệm.
* Báo cáo tất cả các vấn đề gây tổn thương tới con người và các sự cố gây đổ vỡ hóa chất.
* Dung môi hữu cơ được thu hồi vào trong thùng chứa có dán nhãn dung môi thải.

1. **PHÂN TÍCH**
2. **Thiết bị và dụng cụ phân tích.**
3. Thiết bị cơ bản.

* Cân phân tích, độ chính xác 0.1mg
* Bình định mức 10 ml, 50 ml
* Máy ly tâm cho ống 50ml
* Micropipet các loại 20 µL, 200 µL, 1000 µL.
* Pipet thủy tinh
* Bếp đun

1. Thiết bị phân tích

* Hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ GC/MS 5973 hoặc tương đương.

1. **Hoá chất và chất chuẩn.**
2. Hoá chất.

* Nước cất khử ion (nước DI)
* Isooctan của Fisher hoặc tương đương
* Tác chất Hexamethyldisiloxane (HMDS), [Trifluoroacetic acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Trifluoroacetic_acid) (TFA) và hydroxylamin của Merck hoặc tương đương.
* Ethanol 99%

1. Chất chuẩn.

***a. Chuẩn gốc:***

* Inositol; Sorbitol; Glycerol; Sacharose; Lactose; Glucose; Fructose và maltose của Sigma hoặc tương đương.
* Bảo quản và lưu trữ: Chuẩn được lưu trữ theo đúng nhiệt độ khuyến cáo của nhà sản xuất.

***b. Dung dịch chuẩn gốc***

* Dung dịch chuẩn gốc 20000 µg/mL: Cân chính xác khoảng 200 mg chất chuẩn vào các bình định mức 10 mL, hoà tan và định mức đến vạch bằng nước cất DI.

- Lưu ý đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Khi đó nồng độ chất chuẩn trong dung dịch được tính được theo công thức sau:

Trong đó:

* C là nồng độ chất chuẩn có trong dung dịch (µg/mL).
* m là khối lượng cân của chất chuẩn (mg).
* V là thể tính định mức (mL).
* P: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%).
* Bảo quản và lưu trữ: dung dịch chuẩn gốc sau khi chuẩn bị được lưu trữ trong các ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4 - 80C), sử dụng trong thời gian 1 năm.
* Chuẩn hỗn hợp làm việc (1000 µg/mL): Từ các dung dịch chuẩn gốc trên (20000 µg/mL) tương ứng lấy 0.5 mL mỗi chất cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch với nước cất DI.
* Bảo quản và lưu trữ: chuẩn làm việc được lưu trữ trong ống thủy tinh, dán nhãn, bảo quản ở nhiệt độ mát (4-80C), sử dụng trong thời gian 6 tháng.
* Pha dãy chuẩn làm việc:

+ Định tính: Nếu mẫu thường không phát hiện chỉ cần pha điểm chuẩn định tính 1.0 µg/mL.

+ Định lượng:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nồng độ dãy chuẩn (mg/kg ) | 11 | 22 | | 55 | 110 | 220 | 550 |
| Thể tích dung dịch chuẩn trung gian 1 % (mL) |  |  | |  | 00.01 | 00.02 | 00.05 |
| Thể tích dung dịch chuẩn trung gian 0.1% (mL) | 00.01 | 00.02 | | 00.05 |  |  |  |
| Thể tích dung dịch nội chuẩn Sucralose 0.1% mL |  | | 0.02 | | | | |
| Thể tích định mức Isoctane (mL) |  | | 10 | | | | |

1. **Kiểm soát QA/QC.**

**a. Mẫu Blank matrix:** Mẫu blank không phát hiện chất phân tích hoặc phát hiện ở nồng độ nhỏ hơn LOD

**b. Mẫu thêm chuẩn (QC)**

* Phân tích 01 mẫu thêm chuẩn với nồng độ thêm là 500 µg/ml 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



Trong đó:

* R = Độ thu hồi
* Cs = Nồng độ mẫu thêm chuẩn
* C= Nồng độ của mẫu nền
* S= Nồng độ của chất phân tích thêm vào mẫu

1. **Xử lý mẫu.**

* Cân 5g mẫu cho vào ống ly tâm 50 mL, thêm vào 25 mL nước cất. Lắc đều mẫu 2 phút. Ly tâm 3000 rpm trong 3 phút.
* Mẫu QC: Spike 250 uL chuẩn Sugar hỗn hợp 1 g/100g. Thực hiện phân tích như mẫu thật.
* Rút 100 uL dung dịch mẫu chuyển vào ống thủy tinh 10ml. Thêm 475 uL hydroxylamine 2.5%. Lắc đều mẫu. Đun mẫu ở 70-75oC trong 30 phút.
* Để mẫu nguội về nhiệt độ phòng. Thêm 475 uL HMDS và 50 uL TFA. Lắc đều mẫu. Tiếp tục đun mẫu ở 45-50oC trong 30 phút.
* Để mẫu nguội về nhiệt độ phòng, pha loãng mẫu với 9ml Isooctan. Lọc mẫu vào vial và phân tích trên GC/MS

1. **Phân tích**
2. **Điều kiện GC:**
   * Cột : DB-5: 30 m x 0.25 mm. 0.25 µm.
   * Tốc độ dòng: 0.5 mL/phút.
   * Nhiệt độ Inlet: 260 oC; detector: 280 oC; chế độ tiêm không chia dòng.
   * Chương trình nhiệt:
   * Solvent delay: 3.5 phút

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tốc độ tăng nhiệt (oC/phút) | Nhiệt độ (oC) | Thời gian giữ (phút) |
|  | 160 | 4 |
| 15 | 260 | 0 |
| 20 | 300 | 2 |

1. **Điều kiện MS:**
   * Nguồn ion hóa: EI, nhiệt độ 3000 oC
   * Chế độ: Sim

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Chất phân tích** | **ion  định lượng** | **ion định tính** | | |
| 1 | Inositol | 305 | 217 | 318 | 432 |
| 2 | Sorbitol | 319 | 205 | 320 | 217 |
| 3 | Glycerol | 147 | 205 | 218 |  |
| 4 | Sacharose | 361 | 362 | 437 |  |
| 5 | Lactose | 361 | 204 | 217 | 451 |
| 6 | Glucose | 319 | 320 | 205 |  |
| 7 | Fructose | 307 | 217 | 422 |  |
| 8 | Maltose | 361 | 362 | 204 | 217 |

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.

1. **TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.**
2. **Công thức tính toán:**

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích và nồng độ chuẩn.

# C: nồng độ chất phân tích trong mẫu, µg/mL

# Co­: nồng độ chất phân tích trong dịch chiết tính trên đường chuẩn, µg/mL

# Vextract: Thể tích dịch chiết

# f: hệ số pha loãng

# m: khối lượng cân (g) hoặc thể tích mẫu (mL)

1. **KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC**

* Đồ thị tuyến tính ít nhất 5 điểm chuẩn với R2 ≥ 0.99
* Độ thu hồi: giá trị từ XNGTSD của phương pháp.
* Tỷ số ion:

|  |  |
| --- | --- |
| Cường độ tương đối  (so với ion định lượng) | Sai số cho phép của GC-EI-MS |
| > 50 % | ± 10 % |
| 20 – 50 % | ± 15 % |
| 10 – 20 % | ± 20 % |
| < 10 % | ± 50 % |

* Độ lệch của thời gian lưu không quá 0.5%
* Độ lệch của dung dich chuẩn kiểm tra không quá 15%
* Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart).
* Thực hiện kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (control chart) ở mức thêm chuẩn 0.1g/100g sau mỗi lô mẫu phân tích.

1. **BÁO CÁO KẾT QUẢ.**

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