

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9675-2:2013**

**ISO 12966-2:2011**

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –  
SẮC KÍ KHÍ CÁC METYL ESTE CỦA AXIT BÉO –  
PHẦN 2: CHUẨN BỊ METYL ESTE CỦA AXIT BÉO**

*Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters –  
Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids*

**HÀ NỘI – 2013**

## Lời nói đầu

TCVN 9675-2:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 12966-2:2011;

TCVN 9675-2:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F2 Dầu mỡ động vật và thực vật biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ TCVN 9675 (ISO 12966), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Sắc kí khí các metyl este của axit béo* gồm các phần sau đây:

- TCVN 9675-2:2013 (ISO 12966-2:2011), *Phần 2: Chuẩn bị metyl este của axit béo*;
- TCVN 9675-3:2013 (ISO 12966-3:2009), *Phần 3: Chuẩn bị metyl este bằng trimetylsulfonyl hydroxit (TMSH)*.

## Lời giới thiệu

### Khái quát

Dầu và mỡ (lipid dạng lỏng và lipid dạng rắn) chủ yếu bao gồm các este axit béo của glycerol (triacylglycerol, TAG) với các lượng nhỏ este axit béo của sterol và alcohol béo mạch dài. Do khối lượng phân tử của TAG cao và khả năng bay hơi thấp nên khó phân tích trực tiếp bằng sắc kí khí (GC), đặc biệt nếu cần phải phân tích chi tiết các axit béo chưa bão hòa. Bản thân các axit béo không thể phân tích trên sắc kí (không kể các axit béo có mạch ngắn, ví dụ: axit butanoic và axit pentanoic). Do đó, thực tế tốt hơn là tạo thành các este axit béo, thường là các methyl este của axit béo (FAME), trước khi phân tích GC.

Phép phân tích dầu và mỡ đã được xem xét trong Tài liệu tham khảo [9].

Việc hình thành FAME là bước quan trọng trong phân tích axit béo. Sự chuyển đổi không định lượng của các axit béo thành FAME, việc thay đổi thành phần của các axit béo (ví dụ: thay đổi vị trí và đồng phân hình học) và sự hình thành các dạng không phải FAME có thể ảnh hưởng đến việc định lượng thành phần axit béo.

Cơ chế của quá trình chuyển hóa este có thể được dùng để tạo thành FAME từ các este axit béo trong chất béo (triacylglycerol). Các quy trình chuyển hóa este có xúc tác axit hoặc xúc tác kiềm có thể được sử dụng để tạo các FAME trong môi trường metanol; quá trình này có thể được gọi là *chuyển hóa methyl*. Chuyển hóa methyl là quá trình thuận nghịch và cần đến một lượng lớn metanol dư để duy trì vị trí cân bằng tạo thành FAME. Nước có thể ngăn cản phản ứng hoàn thành và do đó nên giảm thiểu lượng nước có mặt. Quá trình xúc tác kiềm không tạo FAME từ các axit béo tự do mà tạo thành xà phòng.

Cơ chế xúc tác axit của quá trình este hóa có thể được dùng để tạo FAME từ các axit béo. Các axit béo có thể có mặt tự nhiên trong mẫu chất béo cần xác định. Sự hình thành FAME bằng cơ chế này thường được gọi là *methyl hóa*. Metanol dư và việc không có mặt của nước cũng là điều kiện tiên quyết để hình thành FAME.

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn để chuẩn bị các methyl este của axit béo. Để hỗ trợ cho các hướng dẫn này, cần quy định các quy trình chuẩn bị methyl este của axit béo. Các quy trình này bao gồm:

- chuyển hóa methyl "nhanh" trong điều kiện kiềm;
- methyl hóa/chuyển hóa methyl "tổng thể" trong điều kiện kiềm và axit kế tiếp;
- methyl hóa/chuyển hóa methyl sử dụng bo triflorua ( $\text{BF}_3$ ).

### Phương pháp chuyển hóa methyl "nhanh" trong điều kiện xúc tác kiềm

Phương pháp này áp dụng để phân tích thường xuyên dầu và mỡ thực phẩm chứa các axit béo mạch ngắn hơn axit butanoic (C4:0) và/hoặc để xác định axit butanoic hoặc axit hexanoic (C6:0) bằng GC sử dụng chất chuẩn nội.

Quá trình chuyển hóa este của các lipit trung tính bằng xúc tác kiềm với sự có mặt của metanol khan (chuyển hóa methyl) xảy ra nhanh hơn so với khi dùng xúc tác axit. Nhược điểm của quy trình xúc tác bằng kiềm là các axit béo tự do không được este hóa và sự có mặt của nước có thể ngăn cản quá trình chuyển hóa methyl hoàn toàn (thủy phân các FAME tạo các axit béo tự do). Các thuốc thử thường được sử dụng nhiều nhất là kali hydroxit, natri hydroxit và natri methoxit với sự có mặt của metanol khan.

### **Methyl hóa/chuyển hóa methyl “tổng thể” trong điều kiện kiềm và axit kế tiếp**

Phương pháp methyl hóa/chuyển hóa methyl “tổng thể” trong điều kiện kiềm và axit kế tiếp áp dụng cho tất cả các loại dầu và mỡ bao gồm các sản phẩm chưng cất và dầu chiết bằng axit, nhưng không nên áp dụng cho dầu lauric. Các methyl este của axit béo mạch ngắn dễ thất thoát trong quá trình hồi lưu. Đối với dầu axit lauric thì nên sử dụng phương pháp chuyển hóa methyl “nhanh”.

Trong quá trình methyl hóa, các chất chứa các nhóm chức sau đây có thể bị phân hủy một phần hoặc hoàn toàn:

- a) các nhóm keto, epoxy, hydroxyl, hydroperoxy;
- b) các nhóm cyclopropyl và cyclopropenyl;
- c) các axit béo của axetylen.

### **Methyl hóa/chuyển hóa methyl sử dụng bo triflorua (BF<sub>3</sub>)**

Vì BF<sub>3</sub> rất độc nên phương pháp này chỉ được thao tác trong tủ hút (ngay trước khi dùng).

Phương pháp BF<sub>3</sub> áp dụng cho hầu hết các loại dầu, mỡ và các dẫn xuất (axit béo, xà phòng) ngoại trừ chất béo sữa và các chất béo chứa các axit béo với các nhóm đặc thù.

Trong quá trình methyl hóa, các chất chứa các nhóm chức sau đây có thể bị phân hủy một phần hoặc hoàn toàn:

- a) các nhóm keto, epoxy, hydroxyl, hydroperoxy;
- b) các nhóm cyclopropyl và cyclopropenyl;
- c) các axit béo của axetylen.

Nếu chất béo chứa các chất trên chỉ với lượng rất nhỏ (ví dụ: dầu hạt bông) thì có thể áp dụng phương pháp này, ngược lại thì phải sử dụng các phương pháp methyl hóa/chuyển hóa methyl “nhanh” hoặc “tổng thể”.

Đối với GC, độ thu hồi tối ưu các methyl este từ hỗn hợp phản ứng thu được bằng cách sử dụng isooctan (2,2,4 trimethylpentan). Tuy nhiên, chỉ thu hồi được khoảng 75 % methyl caproat.

## TCVN 9675-2:2013

Bo triflorua là axit Lewis mạnh và khi ở dạng phức chất với metanol, trong các điều kiện hồi lưu, nó có thể nhanh chóng metyl hóa các axit béo. Bo triflorua trong metanol chuyển hóa metyl các este axit béo (ví dụ: triglycerid), nhưng tốc độ phản ứng chậm hơn phản ứng metyl hóa các axit béo. Dung dịch bo triflorua trong metanol có bán sẵn trên thị trường giúp tăng sự hấp thụ của chất xúc tác axit này nhưng có một số nhược điểm khi sử dụng thuốc thử này.

- Thực tế cho thấy rằng bo triflorua với nồng độ cao (50 % khối lượng) sinh ra các chất giả metoxy từ các axit béo chưa bão hòa.
- Thuốc thử có thời hạn sử dụng ngắn ở nhiệt độ môi trường và cần được giữ trong tủ lạnh.
- Thuốc thử để lâu có thể tạo ra các chất giả và do đó cần kiểm tra mỗi mẻ hàng mới mua trước khi sử dụng và định kỳ kiểm tra trong suốt thời hạn bảo quản.
- Bo triflorua trong metanol là thuốc thử có tính axit và có thể tạo ra các dẫn xuất của các axit béo chứa các nhóm không bền, có thể tạo ra các pic sai trên sắc đồ FAME.

### Thông tin bổ sung

Đặc biệt chú ý khi chuẩn bị và phân tích các este của các axit béo mạch ngắn bằng GC, chủ yếu do sự xuất hiện của chúng trong chất béo sữa. Các axit béo mạch ngắn, ở trạng thái tự do hoặc este hóa thành glycerol, có thể được chuyển hóa hoàn toàn thành metyl este bằng các thuốc thử nêu trên, nhưng việc thu hồi định lượng từ môi trường phản ứng có thể không đạt được trừ khi thực hiện các biện pháp đặc biệt. Sự thất thoát có thể xảy ra ở một vài giai đoạn trong quy trình. Các este axit béo mạch ngắn (đặc biệt là metyl) dễ bay hơi và có thể thất thoát khi cất hồi lưu trong môi trường este hóa, chúng có thể dễ hòa tan trong nước hơn các este mạch dài và có thể bị thất thoát trong bước chiết pha nước hoặc chúng có thể bị chưng cất khi làm bay hơi dung môi chiết. Thất thoát chọn lọc cũng có thể xảy ra nếu các tạp chất không xà phòng hóa được loại bỏ bằng thăng hoa hoặc tinh sạch bằng sắc kí lớp mỏng (TLC). Các quá trình este hóa tốt nhất đối với các axit béo mạch ngắn là tránh làm nóng thuốc thử và bỏ qua các giai đoạn chiết pha nước và loại bỏ dung môi.

Việc bơm trực tiếp môi trường phản ứng chứa các chất xúc tác este hóa có tính axit và bazơ vào các cột GC làm tuổi thọ của cột. Phần đỉnh cột nhồi (khoảng vài xentimet) có thể được định kỳ làm mới và được bảo vệ bởi phần ống khử hoạt tính hoặc "các khoảng trống duy trì" ở phía trước các cột mao quản. Việc này có thể giúp tăng tốc độ, đơn giản hóa và tăng độ chính xác của quy trình.

Ngoài ra, tiêu chuẩn này đưa ra quy trình TLC đơn giản để kiểm tra tính hiệu quả của quá trình chuyển hóa metyl/metyl hóa. Quy trình này cũng có thể được sử dụng để kiểm tra các thành phần phổ biến của dầu hoặc mỡ trước khi quá trình metyl hóa/chuyển hóa metyl xảy ra.

## **Dầu mỡ động vật và thực vật – Sắc kí khí các metyl este của axit béo – Phần 2: Chuẩn bị metyl este của axit béo**

*Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters –  
Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuẩn bị metyl este của các axit béo.

Tiêu chuẩn này bao gồm các phương pháp chuẩn bị các metyl este của axit béo từ dầu mỡ động vật và thực vật, các axit béo và xà phòng. Tiêu chuẩn này quy định bốn quy trình metyl hóa khác nhau:

- a) quy trình chuyển hóa metyl “nhanh” trong điều kiện kiềm;
- b) quy trình metyl hóa/chuyển hóa metyl “tổng thể” trong điều kiện kiềm và tiếp theo là axit;
- c) quy trình chuyển hóa metyl sử dụng bo triflorua ( $\text{BF}_3$ );
- d) quy trình chuyển hóa metyl đối với các glycerid sử dụng xúc tác axit.

Các dẫn xuất của metyl este tạo thành được sử dụng trong các quy trình phân tích khác nhau, ví dụ: sắc kí khí-lỏng (GLC), sắc kí lớp mỏng (TLC) và phép đo phổ hồng ngoại (IR).

### **2 Tài liệu viện dẫn**

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6128 (ISO 661), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị mẫu thử*.

### **3 Các phản ứng**

Việc xác định thành phần axit béo của dầu và mỡ là một trong những phép phân tích cơ bản trong lĩnh vực dầu mỡ và được nêu chi tiết trong Tài liệu tham khảo [9]. Đối với mục đích này, các thành phần axit béo của lipid thường được chuyển thành metyl este sau đó được phân tích bằng GC.

Phương pháp “nhanh” (4.2) không tạo dẫn xuất các axit béo tự do (FFA) có trong dầu thành các metyl este của axit béo (FAME). Nếu có mặt FFA, thì thường giả định rằng các FFA có sự phân bố axit béo giống như triglycerid. Điều này thường đúng đối với dầu thô, nhưng không đúng hoàn toàn đối với dầu chưng cất phân đoạn hoặc dầu tinh luyện. Thông thường, các loại dầu có khối lượng FFA < 0,5 % có thể đã được tinh luyện, trừ các loại dầu ép nguội; các loại dầu trên có thể được coi là dầu thô. Nồng độ FFA cho phép trong dầu phụ thuộc vào dầu cần phân tích và có cùng mục đích sử dụng FAME. Sự có mặt FFA trong dầu có thể cho các pic bổ sung trên sắc đồ cuối cùng và dẫn đến khó nhận biết các FAME tổng hợp sử dụng quy trình chuyển hóa metyl “nhanh”.

Quy trình “tổng thể”(4.3) tạo dẫn xuất cả este glyceryl lẫn FFA thành FAME (xem 4.3.1).

Người phân tích tự quyết định sử dụng quy trình “nhanh” hoặc quy trình “tổng thể” dựa trên bản chất của dầu cần phân tích. Dù vậy, nhìn chung thì sử dụng phương pháp “nhanh” áp dụng cho dầu có hàm lượng FFA ≤ 0,5 % khối lượng. Phương pháp “tổng thể” nên áp dụng đối với dầu có hàm lượng FFA > 0,5 % phần khối lượng. Ngoài ra, nếu mỡ thủy phân một phần được chuyển hóa thành FAME, thì có thể sử dụng quy trình chuyển hóa metyl xúc tác axit được quy định trong 4.5.

Vì BF<sub>3</sub> rất độc nên chỉ sử dụng phương pháp BF<sub>3</sub> (4.4) trong tủ hút thông gió.

### **4 Phương pháp luận**

**CẢNH BÁO** – Trong phương pháp này có sử dụng các thuốc thử độc hại. Phải thực hiện các biện pháp phòng ngừa thông thường để bảo vệ mắt và bảo vệ khỏi sự nguy hiểm của các hóa chất ăn mòn gây cháy. Dung dịch kali hydroxit trong metanol có độc tính.

#### **4.1 Chuẩn bị mẫu thử**

Mẫu thử phải ở dạng lỏng, khô và trong. Tiến hành theo TCVN 6128 (ISO 661) nhưng chỉ làm nóng mẫu đến trên điểm nóng chảy.

#### **4.2 Phương pháp nhanh**

##### **4.2.1 Khả năng áp dụng**

Phương pháp chuyển hóa metyl nhanh này trong điều kiện kiểm xúc tác, có thể áp dụng để phân tích dầu mỡ thực phẩm có chứa các axit béo mạch ngắn hơn axit butanoic (C4:0) và/hoặc để xác định axit butanoic hoặc axit hexanoic (C6:0) bằng GC sử dụng chất chuẩn nội.

CHÚ THÍCH 1: Quy trình này không tạo dẫn xuất FFA thành FAME. Người phân tích cần lưu ý rằng sự có mặt của FFA trong dung dịch cuối có thể ảnh hưởng đến chất lượng của phép sắc kí khí tiếp theo.

CHÚ THÍCH 2: Theo COI/T.20/Doc. No. 24:2001<sup>[8]</sup> thì quy trình tương tự có thể áp dụng trực tiếp với các mẫu của các loại dầu sau:

- a) dầu ôliu nguyên chất có độ axit nhỏ hơn 3,3 %;
- b) dầu ôliu tinh luyện;
- c) dầu ôliu (hỗn hợp của dầu ôliu nguyên chất và tinh luyện)
- d) dầu ép bã ôliu tinh luyện;
- e) dầu ép bã ôliu (hỗn hợp của dầu ôliu nguyên chất và dầu ép bã ôliu tinh luyện).

#### 4.2.2 Nguyên tắc

Các methyl este được tạo thành bằng cách chuyển hóa methyl, sử dụng kali hydroxit trong metanol. Các axit béo tự do không este hóa bằng quy trình này.

#### 4.2.3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích, trừ khi có các quy định khác.

Các thuốc thử không được tạo ra các pic gây cản trở đến các methyl este của axit béo trong quá trình GC. Bất kỳ mẻ thuốc thử hoặc dung môi nào mới đều phải được kiểm tra bằng cách sử dụng chúng để chuẩn bị methyl este của axit oleic tinh khiết. Nếu xuất hiện các pic không mong muốn trong phân tích GC cuối cùng thì loại bỏ thuốc thử đó.

**4.2.3.1 Metanol**, chứa lượng nước không lớn hơn 0,5 %.

**4.2.3.2 Nước**, phù hợp với loại 3 quy định trong TCVN 4851 (ISO 3696)<sup>[3]</sup>.

**4.2.3.3 Natri hydrosulfat**, khan.

**4.2.3.4 Isooctan (2,2,4-trimethylpentan)**, loại dùng cho sắc kí.

**CẢNH BÁO** – Isooctan là chất dễ cháy và có nguy cơ cháy cao. Giới hạn phần thể tích cháy nổ là 1,1 % đến 6,0 %. Chất này rất độc khi xâm nhập qua đường hô hấp và đường tiêu hóa. Thao tác với dung môi này trong tủ hút thông khí tốt.

**4.2.3.5 Kali hydroxit**, dung dịch trong metanol, nồng độ chất  $c = 2 \text{ mol/l}$ .

Hòa tan 13,1 g kali hydroxit (khối lượng  $w = 85 \text{ g/100 g}$ ) trong 100 ml metanol nguyên chất, làm nóng nhẹ.



## TCVN 9675-2:2013

**4.2.3.6 Dung dịch chuẩn nội gốc**, chỉ dùng cho việc xác định axit butanoic và/hoặc hexanoic.

Cân 250 mg metyl este của axit valeric (metyl pentanoat) (chính xác đến 0,1 mg) vào bình định mức một vạch 50 ml (4.2.4.4). Sử dụng isooctan để hòa tan mẫu và thêm isooctan đến vạch.

**4.2.3.7 Dung dịch chuẩn nội đối chứng**, chỉ dùng cho việc xác định axit butanoic và/hoặc hexanoic.

Dùng pipet (4.2.4.2) thêm 10 ml dung dịch gốc vào bình định mức 100 ml (4.2.4.4) và thêm isooctan đến vạch. Tính nồng độ của dung dịch đối chứng này.

**4.2.3.8 Dung dịch natri clorua**

Hoà tan 40 g natri clorua trong 100 ml nước.

**4.2.4 Thiết bị, dụng cụ**

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

**4.2.4.1 Ống nghiệm có nắp vặn**, dung tích 10 ml, có nắp được gắn với khớp nối PTFE

**4.2.4.2 Pipet**, dung tích 0,1 ml, 2 ml và 10 ml, đáp ứng yêu cầu quy định trong ISO 8655-2<sup>[6]</sup>.

**4.2.4.3 Lọ đựng mẫu bằng thủy tinh**, dung tích 3 ml.

**4.2.4.4 Bình định mức một vạch**, dung tích 50 ml và 100 ml đáp ứng yêu cầu loại A quy định trong TCVN 7153 (ISO 1042)<sup>[2]</sup>.

**4.2.5 Cách tiến hành**

Cân khoảng 0,1 g mẫu thử (4.1) cho vào ống nghiệm có nắp vặn 10 ml (4.2.4.1). Nếu các axit béo cần được định lượng bằng GC sử dụng chất chuẩn nội, thì phải cân chính xác phần mẫu thử, nghĩa là đến 0,1 mg. Kết quả được biểu thị bằng phần trăm khối lượng của axit béo trong mỡ hoặc dầu. Các kết quả này không nhất thiết phải đúng như kết quả thu được bằng quy trình chuẩn hóa nội.

Dùng pipet (4.2.4.2) thêm 2 ml isooctan (4.2.3.4) và lắc. Trong trường hợp nhất định, có thể không sử dụng cỡ mẫu 0,1 g như quy định, khi đó lượng isooctan thêm vào phần mẫu thử phải được thay đổi tương ứng.

Để xác định axit hexanoic và/hoặc butanoic, dùng pipet (4.2.4.2) lấy 2 ml dung dịch đối chứng (4.2.3.7) thay cho isooctan. Trong trường hợp cụ thể, có thể cần phân tích mỡ và dầu chứa các lượng nhỏ các axit béo. Khi đó, thể tích của dung dịch đối chứng thêm vào mẫu thử có thể giảm tương ứng.

Dùng pipet (4.2.4.2) thêm 0,1 ml dung dịch kali hydroxit trong metanol 2 mol/l (4.2.3.5), đậy ngay nắp có khớp nối PTFE, vặn chặt nắp và lắc mạnh trong 1 min. Dung dịch trở nên trong và đục trở lại sau

thời gian ngắn vì glycerol tách ra. Để yên khoảng 2 min. Thêm khoảng 2 ml dung dịch natri clorua và lắc trong một thời gian ngắn. Lấy lớp isooctan ra và chuyển vào lọ mẫu (4.2.4.3). Thêm khoảng 1 g natri hydrosulfat (4.2.3.3) và lắc dung dịch.

Dung dịch isooctan này thích hợp cho phép phân tích GC theo ISO 12966-4<sup>1)</sup>.

CHÚ THÍCH: Hiệu quả của quá trình tạo dẫn xuất sử dụng quy trình "nhẹ" có thể được xác định bằng TLC được nêu trong Phụ lục A.

### 4.3 Phương pháp tổng thể

#### 4.3.1 Khả năng áp dụng

Phương pháp chuyển hóa methyl/metyl hóa tổng thể, trong điều kiện xúc tác kiềm và axit kế tiếp, có thể áp dụng cho tất cả các loại dầu và mỡ, kể cả sản phẩm chưng cất và dầu chiết bằng axit, nhưng không thích hợp với dầu lauric. Các methyl este của axit béo mạch ngắn dễ bị thất thoát trong quá trình hồi lưu. Đối với dầu lauric, nên dùng phương pháp quy định trong 4.2.

Trong quá trình methyl hóa, các chất chứa các nhóm chức sau đây có thể bị phân hủy một phần hoặc hoàn toàn:

- a) các nhóm keto, epoxy, hydroxyl, hydroperoxy;
- b) các nhóm cyclopropyl và cyclopropenyl;
- c) các axit béo của axetylen.

CHÚ THÍCH: Theo COI/T.20/Doc. No. 24:2001<sup>[8]</sup> thì phương pháp này có thể áp dụng trực tiếp cho các mẫu dầu sau:

- a) dầu ôliu nguyên chất có độ axit lớn hơn 3,3 %;
- b) dầu ép bã ôliu thô.

#### 4.3.2 Nguyên tắc

Thuốc thử kiềm làm chuyển hóa methyl đối với các este glyceryl thành các methyl este của axit béo; các axit béo tự do được chuyển thành xà phòng. Chất xúc tác axit chuyển hóa xà phòng thành methyl este của axit béo.

**CẢNH BÁO – Quy trình methyl hóa phải được thực hiện trong tủ hút thông gió.**

#### 4.3.3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích. Các thuốc thử không được tạo các pic gây cản trở đến các methyl este của axit béo trong quá trình GC. Bất kỳ mẻ thuốc thử hoặc dung môi nào

<sup>1)</sup> ISO 12966-4 hiện nay đang được biên soạn.

## TCVN 9675-2:2013

mới đều phải được kiểm tra bằng cách dùng chúng để chuẩn bị các methyl este của axit oleic tinh khiết. Nếu xuất hiện các pic không mong muốn trong phân tích GC cuối cùng thì loại bỏ thuốc thử đó.

**4.3.3.1 Isooctan (2,2,4-trimethylpentan)**, dùng cho sắc kí.

**CẢNH BÁO** – Isooctan là chất dễ cháy và có nguy cơ cháy cao. Các giới hạn phần thể tích cháy nổ là 1,1 % đến 6,0 %. Chất này rất độc khi xâm nhập qua đường hô hấp và đường tiêu hóa. Thao tác với dung môi này trong tủ hút thông gió tốt.

**4.3.3.2 Metanol**, chứa lượng nước không quá 0,05 %.

**4.3.3.3 Natri methoxit**, dung dịch trong metanol, 0,2 mol/l.

Hòa tan 8 g natri hydroxit trong 1 000 ml metanol. Có thể được chuẩn bị từ các dung dịch bán sẵn trên thị trường.

**4.3.3.4 Phenolphthalein**, dung dịch trong metanol, 0,2 % khối lượng

**4.3.3.5 Axit sulfuric**, dung dịch trong metanol, 1 mol/l.

Cho 3 ml axit sulfuric 96 % vào 100 ml metanol.

**4.3.3.6 Dung dịch natri clorua.**

Hòa tan 40 g natri clorua trong 100 ml nước.

**4.3.3.7 Nước**, phù hợp với loại 3 quy định trong TCVN 4851 (ISO 3696)<sup>[3]</sup>.

**4.3.4 Thiết bị, dụng cụ và vật liệu thử**

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

**4.3.4.1 Bình định mức một vạch**, dung tích 10 ml, dài hẹp, cổ mài với nắp đậy bằng thủy tinh mài, phù hợp với loại 3 quy định trong TCVN 7153 (ISO 1042)<sup>[2]</sup>.

**4.3.4.2 Bình sinh hàn**, TCVN 7157 (ISO 4799)<sup>[4]</sup>, có khớp nối thủy tinh mài lắp khít với cổ bình.

**4.3.4.3 Viên trợ sôi**, không chứa chất béo.

**4.3.4.4 Phễu thủy tinh.**

**4.3.4.5 Pipet**, dung tích 0,2 ml, 1 ml và 4 ml, phù hợp với quy định trong ISO 8655-2<sup>[6]</sup>.

**4.3.5 Cách tiến hành**

Chuyển khoảng 50 mg mẫu thử (4.1) vào bình định mức một vạch có cổ bằng thủy tinh mài dung tích 10 ml (4.3.4.1).

Cho thêm 2 ml natri methoxit trong metanol 0,2 mol/l (4.3.3.3) và viên trợ sôi (4.3.4.3) đi qua phễu (4.3.4.4).

Lắp bộ sinh hàn (4.3.4.2), lẮc và đun sôi. Hồi lưu hỗn hợp cho đến khi dung dịch trở nên trong suốt. Đối với hầu hết các loại dầu cần khoảng 5 min, nhưng đối với các loại dầu đã bão hòa mạch dài hoặc rắn hơn, thì có thể kéo dài đến 20 min.

CHÚ THÍCH 1 Este sterol cũng xà phòng hóa.

Lấy bình ra khỏi nguồn nhiệt, đợi cho đến khi quá trình hồi lưu dừng lại, tháo bộ sinh hàn và thêm hai giọt dung dịch phenolphthalein (4.3.3.4). Thêm dư 2 ml axit sulfuric 1 mol/l trong dung dịch metanol (4.3.3.5) cho đến khi dung dịch trở nên không màu và sau đó dùng pipet (4.3.4.5).

Lắp bộ sinh hàn và đun sôi lại 5 min. Ngắt nguồn nhiệt và làm nguội bình dưới dòng nước chảy. Tháo bộ sinh hàn ra, dùng pipet (4.3.4.5) thêm 4 ml dung dịch natri clorua (4.3.3.6) và lẮc.

CHÚ THÍCH 2 Thời gian hồi lưu dài trong các điều kiện axit có thể làm tăng sự thất thoát axit dodecanoic.

Dùng pipet (4.3.4.5) thêm 1 ml isooctan, đậy nút bình và lẮc mạnh 15 s. Để yên cho đến khi hai pha phân tách. Thêm tiếp dung dịch natri clorua cho đến khi lớp nước chạm đến phía dưới cổ bình. Lớp phía trên chứa metyl este phải chứa đầy cổ bình.

Lớp isooctan phía trên thích hợp cho phép phân tích GC theo ISO 12966-4.

CHÚ THÍCH 3 Hiệu quả của quá trình tạo dẫn xuất sử dụng quy trình "tổng thể" có thể được xác định bằng TLC được nêu trong Phụ lục A.

#### 4.4 Chuyển hóa metyl sử dụng chất xúc tác bo triflorua (BF<sub>3</sub>)

**CẢNH BÁO** – Trong phương pháp này có sử dụng các thuốc thử độc hại. Phải thực hiện các biện pháp phòng ngừa thông thường để bảo vệ mắt và bảo vệ khỏi sự nguy hiểm của các hóa chất ăn mòn gây cháy.

**ĐIỀU QUAN TRỌNG** – Bo triflorua là chất độc hại. Vì lý do này, người phân tích không nên chuẩn bị dung dịch bo triflorua trong metanol từ metanol và bo triflorua.

##### 4.4.1 Nguyên tắc

Trước tiên, trong bước xúc tác bằng kiềm, các TAG được chuyển hóa metyl với natri hydroxit trong metanol tạo thành FAME. Các FFA có mặt đều được chuyển hóa thành xà phòng. Sau đó, trong bước xúc tác bằng axit thì xà phòng được chuyển thành metyl este bằng phản ứng với phức chất bo triflorua- metanol.

Do vậy, để phân tích xà phòng và axit béo tinh khiết thì bước đầu tiên dùng chất xúc tác kiềm là không cần thiết và FAME có thể được chuẩn bị trực tiếp bằng phản ứng với bo triflorua.

## TCVN 9675-2:2013

### 4.4.2 Khả năng áp dụng

Phương pháp này có thể áp dụng đối với hầu hết các loại dầu, mỡ và các chất dẫn xuất (các axit béo, xà phòng) ngoại trừ chất béo sữa và các mỡ chứa các axit béo có các nhóm đặc thù.

Trong quá trình metyl hóa, các chất chứa các nhóm chức sau đây có thể bị phân hủy một phần hoặc hoàn toàn:

- a) các nhóm keto, epoxy, hydroxyl, hydroperoxy;
- b) các nhóm cyclopropyl và cyclopropenyl;
- c) các axit béo của axetylen.

Nếu chất béo có chứa các chất nói trên chỉ với lượng rất nhỏ (ví dụ: dầu hạt bông) thì có thể áp dụng phương pháp này, ngược lại thì phải sử dụng các phương pháp quy định trong 4.2 hoặc 4.3.

Đối với phép GC, độ thu hồi tối ưu của metyl este từ hỗn hợp phản ứng thu được bằng cách sử dụng isooctan. Tuy nhiên, chỉ thu hồi được khoảng 75 % metyl caproat.

### 4.4.3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các loại thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích.

Các thuốc thử không được tạo các pic gây cản trở đến các metyl este của axit béo trong GC. Bất kỳ mẻ thuốc thử hoặc dung môi mới nào đều phải được kiểm tra bằng cách sử dụng chúng để chuẩn bị metyl este của axit oleic tinh khiết. Nếu xuất hiện các pic không mong muốn trong phân tích GC cuối cùng thì loại bỏ thuốc thử đó.

**4.4.3.1 Nước**, phù hợp với loại A được quy định trong TCVN 4851 (ISO 3696)<sup>[3]</sup>.

**4.4.3.2 Natri hydroxit**, dung dịch trong metanol, khoảng 0,5 mol/l.

Hòa tan 2 g natri hydroxit trong 100 ml metanol chứa không quá 0,5 % khối lượng nước.

CHÚ THÍCH: Nếu dung dịch đã được bảo quản trong thời gian dài, thì có thể hình thành một lượng nhỏ chất kết tủa trắng của natri cacbonat; điều này không ảnh hưởng đến việc chuẩn bị metyl este.

**4.4.3.3 Bo triflorua (BF<sub>3</sub>)**, dung dịch trong metanol, 12 % khối lượng đến 15 % khối lượng.

**4.4.3.4 Isooctan (2,2,4-trimethylpentan)**, dùng cho sắc kí.

**CẢNH BÁO** – Isooctan là chất dễ cháy và có nguy cơ cháy cao. Các giới hạn phần thể tích cháy nổ là 1,1 % đến 6,0 %. Chất này rất độc khi xâm nhập qua đường hô hấp và đường tiêu hóa. Thao tác với dung môi này trong tủ hút thông gió tốt.

**4.4.3.5 Natri clorua**, dung dịch nước bão hòa.

**4.4.3.6 Natri sulfat**, khan.

**4.4.3.7 Nitơ**, có hàm lượng oxy < 5 mg/kg.

**4.4.3.8 Hexan**, dùng cho sắc kí, chỉ dùng để làm khô các methyl este.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng dầu nhẹ, có dải sôi từ 40 °C đến 60 °C, đã chưng cất và không có cặn, trị số brom nhỏ hơn 1.

**4.4.3.9 Đò methyl**, dung dịch 1 g/l trong 60 % thể tích etanol.

CHÚ THÍCH Các dung dịch 14 %, 20 % và 50 % có bán sẵn trên thị trường.

#### 4.4.4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

**4.4.4.1 Bình định mức một vạch**, dung tích 50 ml hoặc 100 ml, dài hẹp, cổ mài với nắp đậy bằng thủy tinh mài, phù hợp với loại A quy định trong TCVN 7153 (ISO 1042)<sup>[2]</sup>.

**4.4.4.2 Bộ sinh hàn**, phù hợp với quy định trong TCVN 7157 (ISO 4799)<sup>[4]</sup>, chiều dài hiệu quả từ 20 cm đến 30 cm, có khớp nối thủy tinh mài lắp khít với cổ của bình (4.4.4.1).

**4.4.4.3 Viên trợ sôi**, không chứa chất béo.

**4.4.4.4 Pipet chia độ**, dung tích 10 ml, phù hợp với quy định trong TCVN 7149 (ISO 835), có gắn với bầu cao su, hoặc **pipet tự động**, dung tích 10 ml, phù hợp với quy định trong ISO 8655-2<sup>[6]</sup> và có gắn với bầu cao su.

**4.4.4.5 Lọ nhỏ**, dung tích 4 ml, có nắp vặn.

**4.4.4.6 Phễu chiết**, dung tích 250 ml, phù hợp với quy định trong TCVN 7158 (ISO 4800)<sup>[5]</sup>, chỉ dùng để làm khô methyl este.

**4.4.4.7 Máy cô quay**.

**4.4.4.8 Cân phân tích**, có thể đọc chính xác đến 0,001 g.

#### 4.4.5 Cách tiến hành

**CẢNH BÁO** – Vì tính độc hại của bo triflorua, thực hiện methyl hóa trong tủ hút thông gió. Cần phải rửa tất cả dụng cụ thủy tinh với nước ngay sau khi sử dụng.

## 4.4.5.1 Phần mẫu thử

Sử dụng Bảng 1 để chọn cỡ thích hợp của bình và thể tích của thuốc thử và dung môi cần để methyl hóa khối lượng phần mẫu thử (4.1).

## 4.4.5.2 Xà phòng hóa

Đối với mỡ và dầu, cho phần mẫu thử được chọn từ Bảng 1 vào bình thích hợp (4.4.4.1). Thêm một lượng thích hợp (xem Bảng 1) của dung dịch natri hydroxit trong metanol (4.4.3.2) và viên trợ sôi. Lắp bộ sinh hàn (4.4.4.2) với bình. Loại bỏ không khí khỏi bình bằng cách thổi bằng dòng khí nitơ khô (4.4.3.7) ngay trước khi hồi lưu khoảng vài phút. Đun hồi lưu cho đến khi các giọt chất béo biến mất, xoay bình nhẹ cứ 30 s đến 1 min để tránh tạo thành natri hydroxit quanh thành bình. Thông thường mất 5 min đến 10 min, nhưng trong trường hợp đặc biệt có thể lâu hơn.

**CHÚ THÍCH** Với các dầu có thể hòa tan trong metanol, như dầu hạt thầu dầu, thì không quan sát được giọt dầu nào. Do đó, độ trong của dung dịch không phải là bằng chứng của việc kết thúc phản ứng.

Chất không xà phòng hóa không loại bỏ được và nếu có một lượng đáng kể thì có thể gây cản trở đến phép phân tích tiếp theo. Trong trường hợp này, cần bổ sung các thao tác sau đây.

Pha loãng dung dịch thu được sau khi xà phòng hóa với nước (4.4.3.1) và chiết chất không xà phòng hóa bằng diethyl ete, hexan hoặc dầu nhẹ. Axit hóa dung dịch nước và chiết các axit béo với isooctan (4.4.3.4) hoặc hexan (4.4.3.8). Chuẩn bị methyl este từ các chất chiết này theo 4.4.5.3.

Thêm lượng dung dịch bo triflorua trong metanol (4.4.3.3) thích hợp (xem Bảng 1) qua đỉnh bộ sinh hàn.

Đối với các axit béo và xà phòng, đưa phần mẫu thử được chọn từ Bảng 1 vào bình định mức thích hợp. Thêm lượng thích hợp (xem Bảng 1) của dung dịch bo triflorua trong metanol vào bình. Lắp bộ sinh hàn với bình định mức.

**Bảng 1 – Các điều kiện phản ứng  $\text{BF}_3$  và hướng dẫn lựa chọn thuốc thử**

Mục đích	Phần mẫu thử mg	Bình định mức (4.4.4.1) ml	Dung dịch NaOH (4.4.3.2) ml	Dung dịch $\text{BF}_3$ (4.4.3.3) ml	Isooctan (4.4.3.4) ml
GLC	từ 100 đến 250	50	4	5	từ 1 đến 3
	từ 250 đến 500	50	6	7	từ 2 đến 5
IR/TLC	từ 500 đến 750	100	8	9	từ 4 đến 8
	từ 750 đến 1 000	100	10	12	từ 7 đến 10

#### 4.4.5.3 Chuẩn bị methyl este trong dung dịch isooctan

Tiếp tục đun sôi khoảng 3 min. Đối với dầu chứa các axit béo mạch dài, như dầu cá, thì tiếp tục đun sôi thêm 30 min.

Thêm lượng thích hợp (xem Bảng 1) của isooctan (4.4.3.4) vào hỗn hợp đun sôi qua đỉnh của bộ sinh hàn.

Tháo bình định mức ra khỏi nguồn nhiệt và tháo bình sinh hàn ra. Không để cho bình nguội, ngay lập tức thêm 20 ml dung dịch natri clorua (4.4.3.5). Đậy chặt bình và lắc mạnh ít nhất 15 s.

Thêm dung dịch natri clorua bão hòa để đưa mức chất lỏng của hỗn hợp lên đến cổ bình. Để hai pha tự phân tách.

Chuyển từ 1 ml đến 2 ml lớp isooctan phía trên vào lọ nhỏ 4 ml (4.4.4.5) và thêm một lượng nhỏ natri sulfat khan (4.4.3.6) để loại bỏ vết nước.

Dung dịch isooctan thu được thích hợp để phân tích sử dụng GC theo ISO 12966-4 như sau:

- bơm trực tiếp lên cột nhờ đối với sắc kí khí lỏng;
- pha loãng thích hợp bằng isooctan trước khi bơm khi sử dụng hệ thống cột mao quản;
- pha loãng bằng dung môi có nhiệt độ sôi thấp như isooctan trong trường hợp đặc biệt khi bơm lên cột mao quản.

#### 4.4.5.4 Bảo quản các dung dịch methyl este

Tốt nhất là phân tích các este ngay khi có thể. Nếu cần, dung dịch isooctan chứa methyl este có thể được bảo quản trong khí trơ để trong tủ lạnh. Để thời gian bảo quản dài hơn, nên bảo vệ methyl este khỏi sự oxy hóa bằng cách thêm chất chống oxy hóa vào dung dịch ở nồng độ không cản trở phép phân tích tiếp theo, ví dụ dung dịch 2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT) 0,05 g/l. Các methyl este chứa methyl butyrat phải được bảo quản trong ống kín và có các biện pháp phòng ngừa đặc biệt để không làm thất thoát do bay hơi trong quá trình làm đầy và làm kín ống.

#### 4.4.5.5 Bảo quản các methyl este khô

Các methyl este khô không có dung môi cần được phân tích ngay. Nếu cần, có thể bảo quản trong khí trơ ở trong tủ lạnh trong 24 h hoặc với thời gian dài hơn trong điều kiện chân không đựng trong ống đậy kín để trong tủ lạnh đông.

CHÚ THÍCH 1: Trong quá trình chạy GC của methyl este, một số thuốc thử nhất định có thể tạo ra các pic không mong muốn trên đồ thị. Đặc biệt trong suốt thời gian bảo quản dài, thì bo triflorua trong metanol có thể tạo ra các thành phần làm ảnh hưởng đến vùng các axit từ C<sub>20</sub> đến C<sub>22</sub>.

CHÚ THÍCH 2: Hiệu quả của việc tạo dẫn suất có thể xác định được bằng TLC như trong Phụ lục A.



## **4.5 Chuyển hóa methyl đối với glycerid bằng xúc tác axit**

### **4.5.1 Nguyên tắc**

Thuốc thử methyl hóa trong axit tạo ra sự chuyển hóa methyl của este glyceryl thành các methyl este của axit béo. Thuốc thử methyl hóa cũng biến đổi các axit béo tự do thành các methyl este của axit béo.

### **4.5.2 Thuốc thử**

Chỉ sử dụng thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

**4.5.2.1 Axit sulfuric**,  $\rho_{20}(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/ml}$ .

**4.5.2.2 Metanol**, chứa lượng nước không quá 0,05 %.

#### **4.5.2.3 Thuốc thử methyl hóa**

Trong khi làm nguội, dùng pipet chia độ (4.5.3.2) thêm từ từ 1 ml axit sulfuric (4.5.2.1) vào pipet dung tích 15 ml (4.5.3.5) chứa metanol (4.5.2.2).

### **4.5.3 Thiết bị, dụng cụ**

Chỉ sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

**4.5.3.1 Cân phân tích**, có thể đọc chính xác đến 10 mg.

**4.5.3.2 Pipet chia độ**, dung tích 1 ml và 5 ml, phù hợp với các yêu cầu quy định trong TCVN 7149 (ISO 835)<sup>[1]</sup>.

**4.5.3.3 Ống thủy tinh**, dung tích 5 ml

Có thể dùng các lọ tạo dẫn xuất thích hợp khác có kích thước tương tự để thay cho các ống bằng thủy tinh, với điều kiện là được đậy kín để không làm thất thoát các este dễ bay hơi.

**4.5.3.4 Tủ sấy**, có thể duy trì trong khoảng 100 °C đến 110 °C, hoặc nồi cách thủy đun sôi.

**4.5.3.5 Pipet**, dung tích 15 ml.

### **4.5.4 Chuẩn bị mẫu thử**

Chuẩn bị mẫu thử theo quy định trong 4.1.

**4.5.5 Cách tiến hành**

Dùng cân phân tích (4.5.3.1) cân 100 mg mẫu đã chuẩn bị, chính xác đến 10 mg, cho vào ống thủy tinh (4.5.3.3). Thêm 0,4 ml thuốc thử metyl hóa (4.5.2.3). Hàn kín ống bằng ngọn lửa. Gia nhiệt ống thủy tinh chứa mẫu thử 3 h trong tủ sấy (4.5.3.4) duy trì trong khoảng từ 100 °C và 110 °C hoặc trong nồi cách thủy đun sôi (4.5.3.4) thỉnh thoảng trộn mẫu đựng trong ống.

Làm nguội ống thủy tinh và mẫu đến nhiệt độ phòng để tách pha hoàn toàn. Mở ống thủy tinh và giữ một phần pha lỏng phía trên để phân tích thêm. Có thể cần phải pha loãng các este tạo thành bằng dung môi thích hợp.

Dung dịch cuối cùng thích hợp để phân tích GC theo ISO 12966-4.

**CHÚ THÍCH** Hiệu quả của việc tạo dẫn suất sử dụng quy trình "tổng thể" có thể xác định được bằng TLC như trong Phụ lục A.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Phương pháp sắc kí lớp mỏng để kiểm tra việc tạo dẫn xuất hoàn toàn**

**A.1 Phạm vi áp dụng**

Phụ lục này quy định phương pháp sắc kí lớp mỏng (TLC) để kiểm tra xác nhận xem việc tạo dẫn xuất thực hiện theo 4.2, 4.3, 4.4 hoặc 4.5 đã hoàn toàn hay chưa. Ngoài ra, quy trình này có thể có ích trong việc xác định thành phần chung của dầu hoặc mỡ trước khi quá trình dẫn xuất được thực hiện.

**A.2 Nguyên tắc**

Phương pháp TLC được sử dụng để tách các sản phẩm dẫn xuất hoặc các thành phần chung của mỡ và dầu trước khi tạo dẫn xuất. Các sản phẩm được nhận biết theo sự hiển thị của dạng axit molybdophosphoric hoặc hiển thị sử dụng hơi iot bằng cách so sánh vùng sản phẩm hiển thị với vùng của các chất thử nghiệm chạy trên cùng một đĩa.

Khi quá trình tạo dẫn xuất không hoàn toàn thì các sản phẩm phản ứng không chuyển hóa hết, như mono-, di- và triglycerid cũng như các axit béo tự do, vẫn có thể nhận biết được với nồng độ rất thấp.

**A.3 Thuốc thử**

**A.3.1 Tấm TLC/HPTLC chuẩn bị sẵn hoặc tấm nhôm**, có các kích thước khác nhau (ví dụ: 10 cm x 10 cm, 20 cm x 10 cm, 20 cm x 20 cm) được phủ bằng silica gel 60, độ dày từ 0,2 mm đến 0,25 mm. Các tấm này có thể cắt đôi thành các tấm 50 mm x 100 mm.

**A.3.2 Ete dầu mỏ**, dải sôi từ 40 °C đến 60 °C.

**A.3.3 Dietyl ete**, không chứa peroxit.

**A.3.4 Axit axetic băng**, 100 % khối lượng.

**A.3.5 Axit molybdophosphoric**.

**A.3.6 Etanol**, 95 % đến 96 % thể tích.

**A.3.7 Dung dịch axit molybdophosphoric**, axit molybdophosphoric (A.3.5) trong etanol (A.3.6), 3,5 % thể tích.

**A.3.8 Iot tinh thể**.

**A.3.9 Pha động**, hỗn hợp của ete dầu mỏ (A.3.2) (85 ml/101,5 ml thể tích) và dietyl ete (A.3.3) (15 ml/101,5 ml thể tích) và axit axetic (A.3.4) (15 ml/101,5 ml thể tích).

**A.3.10 Các chất thử nghiệm**, ví dụ: các axit béo tự do, mono-, di- và triglycerid cũng như các metyl este của axit béo và este propyl.

**A.3.11 Kali permanganat.**

**A.3.12 Axit sulfuric**, 95 % đến 97 % khối lượng.

**A.3.13 Dung dịch kali permanganat**, kali permanganat (A.3.11) trong axit sulfuric (A.3.12), nồng độ khối lượng khoảng 30 g/l.

#### **A.4 Thiết bị, dụng cụ và vật liệu thử**

**A.4.1 Buồng sắc kí lớp mỏng**, có vỏ bọc, đủ cỡ để chứa các tấm TLC.

**A.4.2 Ống đong có nắp mài**, dung tích 100 ml.

**A.4.3 Pipet chia độ**, dung tích 2 ml, được chia vạch 0,1 ml đơn vị, phù hợp với TCVN 7149 (ISO 835)<sup>[1]</sup>.

**A.4.4 Ống mao quản.**

**A.4.5 Quả bóp hình quả lê.**

**A.4.6 Giấy lọc tấm.**

**A.4.7 Tủ sấy**, có thể duy trì nhiệt độ ở khoảng 150 °C.

#### **A.5 Cách tiến hành**

##### **A.5.1 TLC sử dụng axit molybdophosphoric để hiển thị**

###### **A.5.1.1 Chuẩn bị buồng sắc kí lớp mỏng**

Xếp giấy lọc (A.4.6) quanh buồng TLC (A.4.1) để bảo hòa dung môi.

Chuyển đủ pha động (A.3.9) sang buồng TLC để đạt được độ sâu khoảng 1 cm và đầy nắp. Sau khoảng 30 min buồng sẵn sàng để sử dụng.

###### **A.5.1.2 Tính năng của phép thử**

Dùng 1 µl đến 2 µl este hòa tan thu được từ 4.2, 4.3, 4.4 hoặc 4.5 cũng như các dung dịch của các chất thử nghiệm (A.3.10), chấm thành các chấm cách cạnh dưới của tấm (A.3.1) khoảng 2 cm và cách nhau khoảng 3 cm sử dụng ống mao quản (A.4.4).

## **TCVN 9675-2:2013**

Đặt tấm này vào buồng TLC đã chuẩn bị (A.5.1.1) và đậy nắp buồng sắc ký.

Để dung môi pha động chạy lên đến đỉnh tấm. Lấy tấm ra khỏi buồng và để khô trong không khí ở nhiệt độ môi trường khoảng vài phút.

Phun dung dịch axit molybdophosphoric (A.3.7) lên tấm sắc ký và làm khô trong tủ sấy (A.4.7) khoảng 10 min để có thể nhìn thấy được các chất.

Các este của các axit béo bão hòa khó nhìn thấy bằng axit molybdophosphoric. Trong trường hợp này nên dùng hỗn hợp axit sulfuric và kali permanganat (A.3.13) làm thuốc thử.

### **A.5.2 TLC sử dụng hơi iot để hiển thị**

#### **A.5.2.1 Chuẩn bị buồng sắc kí lớp mỏng**

Xếp giấy lọc (A.4.6) quanh buồng TLC (A.4.1) để bão hòa dung môi.

Chuyển đủ pha động (A.3.9) sang buồng TLC để đạt được độ sâu khoảng 1 cm và đậy nắp buồng. Sau khoảng 30 min buồng sẵn sàng để sử dụng.

#### **A.5.2.2 Chuẩn bị buồng hiển thị hơi iot**

Cho vài tinh thể iot (A.3.8) vào một buồng TLC (A.4.1) khác. Sau khoảng 30 min buồng sẵn sàng để sử dụng.

Các tinh thể iot luôn phải nhìn thấy ở đáy buồng.

#### **A.5.2.3 Tính năng của phép thử**

Dùng 1 µl đến 2 µl este đã hòa tan thu được trong 4.2, 4.3, 4.4 hoặc 4.5 để chấm thành các chấm cách cạnh của tấm khoảng 2 cm từ cạnh dưới của đĩa (A.3.1) các chấm cách nhau 2 cm, sử dụng ống mao quản (A.4.4). Để đối chứng, có thể chấm các dung dịch của các chất thử nghiệm (A.3.10) trên tấm này hoặc các tấm khác.

Đặt tấm sáng vào buồng sắc kí đã chuẩn bị (A.5.2.1) và đậy nắp buồng.

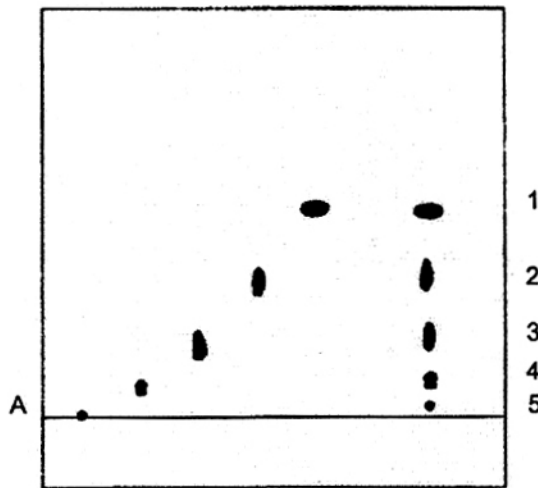
Để cho dung môi pha động chạy lên đến đỉnh của tấm sắc kí. Lấy tấm này ra khỏi buồng và để khô trong không khí ở nhiệt độ môi trường khoảng vài phút.

Đề đĩa trong buồng hiển thị hơi iot (A.5.2.2). Sau vài phút, các chấm cho thấy xuất hiện vị trí của các chất khác nhau.

### A.5.3 Kết quả của phép xác định

Quá trình dẫn xuất cho thấy hoàn tất nếu không có mono-, di- hoặc triglycerid hoặc các axit béo có thể nhận biết đồng thời với các methyl este của axit béo và este propyl (Hình A.1). Lý tưởng nhất là có một chấm đơn ở vị trí của methyl este được xác định bằng cách sử dụng các chất thử nghiệm. Các chấm nhỏ ban đầu cho biết các chất không chứa glycerid (ví dụ: phospholipid) và các lipid phân cực.

Ngưỡng phát hiện đối với triglycerid không chuyển đổi hoặc các sản phẩm dẫn xuất là < 0,1 % sử dụng axit molybdophosphoric để hiển thị và < 1,0 % sử dụng hơi iốt để hiển thị.



#### CHÚ DẪN

- A Bắt đầu
- 1 Các methyl este của axit béo
- 2 triglycerid
- 3 các axit béo tự do
- 4 diglycerid
- 5 monoglycerid

**Hình A.1 – Phép thử sắc kí lớp mỏng để kiểm tra việc tạo dẫn xuất hoàn toàn**

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*
  - [2] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*
  - [3] TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*
  - [4] TCVN 7157 (ISO 4799), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bộ ngưng tụ*
  - [5] TCVN 7158 (ISO 4800), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Phễu chiết và phễu chiết nhỏ giọt*
  - [6] ISO 8655-2, *Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes*
  - [7] TCVN 6900-2 (ISO 78-2), *Hóa học – Cách trình bày tiêu chuẩn – Phần 2: Phương pháp phân tích hóa học*
  - [8] COI/T.20/Doc. No. 24:2001, *Preparation of the fatty acid methyl esters from olive oil and olive-pomance oil*
  - [9] CHRISTIE, W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: CHRISTIE, W.W., editor. *Advances in lipid methodology – Two*, pp. 69-111. Dundee: Oil Press, 1993
-