

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9675-3:2013

ISO 12966-3:2009

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –
SẮC KÍ KHÍ CÁC METYL ESTE CỦA AXIT BÉO –
PHẦN 3: CHUẨN BỊ METYL ESTE BẰNG
TRIMETYL SULFONI HYDROXIT (TMSH)**

*Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters –
Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH)*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 9675-3:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 12966-3:2009;

TCVN 9675-3:2013 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 methyl este của axit béo* gồm các phần sau đây:

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

Dầu mỡ động vật và thực vật –**Sắc kí khí các metyl este của axit béo –****Phần 3: Chuẩn bị metyl este bằng trimethylsulfoni hydroxit (TMSH)**

*Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters –
Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH)*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuyển hóa metyl nhanh bằng xúc tác kiềm đối với dầu và mỡ để chuẩn bị metyl este axit béo, sử dụng trimethylsulfoni hydroxit (TMSH). Phương pháp này chỉ dùng cho việc chuẩn bị metyl este của dầu và mỡ để phân tích sắc kí khí lỏng (GLC). Phương pháp này có thể áp dụng cho tất cả các loại dầu mỡ kể cả chất béo sữa và các hỗn hợp chứa chất béo sữa. Quá trình đồng phân hóa các axit béo chưa bão hòa ít xuất hiện và các axit béo đã đồng phân hóa chỉ có mặt ở giới hạn của phép xác định. Vì quá trình đồng phân hóa xảy ra, do đó không nên sử dụng quy trình này cho axit linoleic liên hợp (CLA). Vì CLA không phân tích được chính xác, nên phương pháp này không áp dụng để xác định tất cả thành phần axit béo của các mẫu chất béo sữa.

Chỉ khoảng 70 % đến 80 % axit béo tự do được este hóa. Trong trường hợp của các axit béo cyclopropyl và cyclopropenyl liên hợp, có thể tạo ra các phản ứng phụ nhưng chúng không cản trở phép xác định các axit béo.

CHÚ THÍCH Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa trên Phương pháp chuẩn của Đức C-VI 11 e (98) (xem Tài liệu tham khảo [8]).

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 Nguyên tắc

Mẫu được hòa tan trong *tert*-butyl methyl ete (TBME) và trộn với dung dịch trimetylsulfonyl hydroxit trong metanol. Các glycerid được chuyển hóa este với xúc tác kiềm tạo thành các methyl este axit béo (xem Tài liệu tham khảo [4] đến [8]). Các axit béo tự do được chuyển thành muối sau đó được nhiệt phân thành methyl este và dimetylsulfua trong bộ bơm. Thuốc thử dư cũng được nhiệt phân thành metanol và dimetylsulfua. Để thu được phản ứng nhiệt phân hoàn toàn, cần sử dụng bộ bơm nóng (bơm chia dòng) ở nhiệt độ nhỏ nhất là 250 °C.

Để xác định các axit béo mạch ngắn (từ C₄ đến C₈), có thể sử dụng methyl este của axit valeric làm chất chuẩn nội. Các lipid chứa các nhóm hydroxyl được chuyển đổi từng phần thành các chất dẫn xuất O-methyl ete tương ứng có thể cản trở các methyl este axit béo trong quá trình phân tách GLC (Tài liệu tham khảo [9]). Trong phần đầu của sắc đồ (vùng C₄), có thể xuất hiện các pic của thuốc thử. Các pic này không được đưa vào phần tính kết quả.

4 Thuốc thử

CẢNH BÁO – Cần chú ý các quy định đối với việc xử lý các chất nguy hại. Phải tuân thủ các biện pháp kỹ thuật an toàn cho tổ chức và cá nhân.

Trong quá trình phân tích, chỉ sử dụng các thuốc thử và dung môi thuộc loại tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác.

4.1 *tert*-Butyl methyl ete (TBME).

4.2 Trimetylsulfonyl hydroxit (TMSH), dung dịch trong metanol, nồng độ chất c(Me₃SOH) = 0,2 mol/l

Hàm lượng của dung dịch có thể xác định được bằng thiết bị đo axit: pha loãng 5,0 ml dung dịch với 10 ml metanol, thêm hai giọt phenolphthalein và chuẩn độ bằng HCl 0,1 mol/l. Nồng độ Me₃SOH ít nhất phải là 0,15 mol/l.

CHÚ THÍCH Khi được bảo quản ở 4 °C với lượng nhỏ trong ống hàn kín thì dung dịch có thể bền được hai tháng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Ống nghiệm, dung tích 2 ml có nắp bằng thủy tinh mài (lọ lấy mẫu tự động).

5.2 Pipet chia độ, dung tích 250 µl, 500 µl và 1 000 µl, phù hợp với loại A quy định trong TCVN 7149 (ISO 835)^[1].

6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình bảo quản và vận chuyển.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555)^[3].

7 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu thử phải ở dạng lỏng, khô và trong suốt. Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6128 (ISO 661), nhưng làm nóng mẫu chỉ vừa trên điểm nóng chảy.

Các mẫu dạng rắn được làm nóng chảy cẩn thận ở nhiệt độ cao hơn điểm nóng chảy tối đa là 10 °C và trộn. Tránh làm quá nhiệt.

Các mẫu chứa nước được hòa tan trong ete dầu mỏ và làm khô trong 30 min bằng cách thêm natri sulfat khan. Lọc qua giấy lọc gấp nếp để loại chất làm khô và cặn được rửa cẩn thận bằng ete dầu mỏ. Dùng máy cô quay để loại bỏ dung môi.

8 Cách tiến hành

8.1 Cân (10 ± 2) mg mẫu thử cho vào ống nghiệm (5.1).

8.2 Dùng pipet (5.2) lấy 500 μ l TBME (4.1) cho vào ống nghiệm và hòa tan mẫu, làm ấm nhẹ, nếu cần.

CHÚ THÍCH Để xác định các axit béo mạch ngắn (C_4 đến C_8), sử dụng metyl este của axit valeric làm chất chuẩn nội. Dung dịch chuẩn nội này được sử dụng để hòa tan mẫu.

8.3 Dùng pipet (5.2) lấy 250 μ l dung dịch TMSH (4.2) cho vào ống nghiệm và lắc mạnh khoảng 30 s. Sau đó, bơm ngay dung dịch này vào máy sắc kí khí. Vì các metyl este được tạo thành trong suốt quá trình bơm, nên nhiệt độ của bơm ít nhất phải là 250 °C.

Sử dụng hỗn hợp của TBME và metanol (9 thể tích + 1 thể tích) để pha loãng dung dịch, nếu cần.

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Các axit béo tự do phản ứng với TMSH tạo thành các muối tương ứng sau đó được nhiệt phân thành metyl este và dimethylsulfua trong bộ bơm. Do đó, nhiệt độ của bộ bơm phải là 250 °C. Để tránh sự tắc nghẽn, mao quản của ống chia dòng phải có đường kính trong thích hợp (> 1 mm). Cột mao quản cần được làm sạch bằng cách làm nóng hoặc thổi bằng dung môi. Ngoài ra, van của các ống chia dòng phải được bảo vệ bằng bẫy than hoạt tính.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- a) kết quả của phép xác định;
- b) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) mọi thông tin cần thiết để xác định mẫu;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;

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 2625 (ISO 5555), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
- [4] BUTTE, W.J Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulfonium hydroxide for transesterification. *J. Chromatogr.* 1983, **261**, pp. 142-145
- [5] SCHULTE, E., WEBER, K. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from fats with trimethylsulfonium hydroxide or sodium methylate. *Fat Sci. Technol.* 1989, **91**, pp. 181-183
- [6] ARENS, M., SCHULTE, E., WEBER, K. Féttäuremethylester, Umesterung mit trimethylsulfoniumhydroxid [Fatty acid methyl esters, transesterification with trimethylsulphonium hydroxide]. *Fat Sci. Technol.* 1994, **96**, pp.67-68
- [7] EL-HAMDY, A.H., CHRISTIE, W.W. Preparation of methyl esters of fatty acids with trimethylsulphonium hydroxide – An appraisal. *J. Chromatogr.* 1983, **630**, pp. 438-441
- [8] DEUTSCHE, GESELLSCHAFT FÜR FETTWISSENSCHAFT. *Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen/German standard methods for the analysis of fats and other lipids.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2008
- [9] VOSMANN, K., SCHULTE, E., KLEIN, E., WEBER, N. Reaction of lipids containing hydroxy group with trimethylsulfonium hydroxide: Formation of O-methyl derivatives. *Lipids* 1996, **31**, pp. 349-352.
-