

TCVN 6349 : 1998
ISO 5558 - 1982 (E)

**DẦU, MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT - PHÁT HIỆN VÀ
NHẬN BIẾT CÁC CHẤT CHỐNG ÔXY HOÁ -
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỚP MỎNG**

*Animal and vegetable fats and oils - Detection and indentification of antioxidants -
Thin-layer chromatographic method*

HÀ NỘI - 1998

Lời nói đầu

TCVN 6349 : 1998 hoàn toàn tương đương với ISO 5558 : 1982 (E)

TCVN 6349 : 1998 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F2 Dầu, mỡ động vật và thực vật biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

DẦU, MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT - Phát hiện và nhận biết các chất chống oxy hoá - Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Animal and vegetable fats and oils – Detection and identification of antioxidants – Thin-layer chromatographic method

1 Phạm vi và lĩnh vực áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lớp mỏng để phát hiện và nhận biết các chất chống oxy hoá sau đây có trong dầu mỡ động vật và thực vật :

- axit nordihydroguaiaretic (NDGA)
- propylgalat (PG)
- octylgalat (OG)
- dodexylgalat (DG)
- tetiobutylhydroquinon (TBHQ)
- butylhydroxianisol (ter-butyl-4-metoxyphenon) (BHA)
- α -tocopherol
- butylhydroxytoluen (2,6 di-ter-butyl-4-metylphenon) (BHT)

Các chất chống oxy hoá này được liệt kê theo thứ tự các giá trị chỉ số R_f của chúng.

Việc phát hiện α -tocopherol đôi khi gặp khó khăn vì các phổ của nó thường khuyếch tán.

Giới hạn phát hiện của phương pháp này đối với BHT là 20 mg / kg (ppm), và đối với các chất chống oxy hoá khác là 10 mg / kg (ppm). Nên lưu ý phương pháp này khó tách hoàn toàn BHT.

2 Nguyên tắc

TCVN 6349 : 1998

Hoà tàn phần mẫu thử trong n-hecxan và chiết chất chống oxy hoá này bằng axetonitryl.

Nhận biết các chất chống oxy hoá này bằng sắc ký lớp mỏng.

3 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử phải thuộc loại thuốc thử phân tích. Sử dụng nước cất hoặc nước có ít nhất là có chất lượng tương đương.

3.1 bột silicagel có kèm chất kết dính, cỡ hạt nhỏ hơn 30 µm đạt chất lượng dùng cho sắc ký lớp mỏng.

3.2 Metanol, chứa lượng nước không quá 0,5 % (m/m).

3.3 Etanol 96 % (V/V).

3.4 n-hecxan, hoặc nếu không có thì dùng ete dầu hoả có nhiệt độ sôi từ 30 °C đến 60 °C.

3.5 Axetonitryl bão hoà với n-hecxan

Rót 900 ml axetonitryl vào bình cầu thể tích 1 000 ml và thêm 100 ml n-hecxan (3.4) và một ít natri sunfat khan hoặc canxi clorua khan. Lắc, đậy nắp bình và để yên qua đêm.

3.6 n-hecxan bão hoà với axetonitryl

Rót 900 ml n-hecxan (3.4) vào bình cầu thể tích 1 000 ml và thêm 100 ml axetonitryl và một ít natri sunfat khan hoặc canxi clorua khan. Lắc, đậy nắp bình và để yên qua đêm.

3.7 Dung dịch chỉ thị : 2,6-dicloro-p-benzoquinol-4-cloroimid, dung dịch 10 g/l trong etanol 96 % (V/V)

Chuẩn bị dung dịch trước khi sử dụng bằng cách hoà tan 500 mg 2,5-dicloro-p-benzoquinol-4-cloroimid vào trong 50 ml etanol (3.3).

3.8 Hỗn hợp dung môi khai triển

Chỉ chuẩn bị hỗn hợp trước khi sử dụng, bằng cách trộn đều hai thể tích n-hecxan (3.4), hai thể tích benzen và một thể tích axit axetic băng.

Cảnh báo – Benzen độc, dễ cháy và cần phải thận trọng khi sử dụng.

3.9 các dung dịch chuẩn của các chất chống oxy hoá, chứa 1 g chất chống oxy hoá trong một lít metanol.

Trong một dây tám cốc có mỏ, hoà tan riêng biệt từng 100 mg mỗi chất chống oxy hoá (xem điều 1) trong metanol (3.2) rồi chuyển chúng sang dây tám bình định mức thể tích 100 ml, thêm metanol đến vạch mức và lắc đều.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm và đặc biệt như sau :

4.1 Bình sắc ký dùng cho sắc ký lớp mỏng, làm bằng thủy tinh, thích hợp cho các bản mỏng thủy tinh có kích thước 200 mm x 200 mm, có nắp thủy tinh tròn đậy kín.

4.2 Máy phun và mặt phẳng để chuẩn bị các bản mỏng.

4.3 Các bản mỏng thủy tinh, có kích thước 200 mm x 200 mm, được phủ một lớp silicagel (3.1) dày 0,40 mm.

Sử dụng các bản mỏng đã chuẩn bị sẵn ở dạng thương phẩm, hoặc chuẩn bị như sau :

Rửa thật sạch các bản mỏng bằng etanol, n-hexan và axeton cho đến khi sạch hết tất cả các vết mỡ.

Cân 30 g silicagel (3.1) cho vào bình nón dung tích 250 ml (4.8) và cho thêm 60 ml nước. Đậy nắp bình và lắc mạnh lượng chứa trong bình thật kỹ trong 1 phút.

Dùng máy phun (4.2) phủ ngay 0,4 mm lớp keo silic oxit lên bề mặt của các bản mỏng.

Để khô các bản mỏng ở nhiệt độ môi trường trong 15 phút, và sau đó cho vào tủ sấy (4.6), điều chỉnh ở nhiệt độ $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1 giờ. Để nguội trong bình hút ẩm (4.3) và bảo quản trong bình hút ẩm cho tới khi sử dụng.

4.4 Máy cô quay chân không.

4.5 Phễu chiết, dung tích 250 ml.

4.6 Tủ sấy khô bằng điện, có quạt thông gió, điều chỉnh ở $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7 Tủ sấy nóng bằng điện, có quạt thông gió, điều chỉnh ở $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.8 bình nón dung tích 250 ml, có nút mài bằng thủy tinh.

4.9 Bình định mức cổ tròn, dung tích 100 ml, có nút mài bằng thủy tinh.

4.10 Cốc có mỏ, dạng cao, dung tích 150 ml.

4.11 Bình cầu đáy tròn, dung tích 250 ml, thích hợp khi sử dụng với máy cô quay chân không (4.4).

4.12 Xilanh, dung tích 20 μl được chia vạch theo microlit.

4.13 Bình hút ẩm.

4.14 Máy phun dung dịch chất chỉ thị lên mặt các bản mỏng.

5 Cách tiến hành

5.1 Phần mẫu thử

Lấy một phần mẫu thử khoảng từ 7,5 g đến 10 g từ các mẫu thí nghiệm.

5.2 Chiết các chất chống oxy hoá

TCVN 6349 : 1998

Hoà tan phần mẫu thử trong 100 ml n-hec-xan (3.4) trong cốc mở dung tích 150 ml (4.10), đun nóng nhẹ, nếu cần, và chuyển dung dịch sang một trong các phễu chiết dung tích 250 ml (4.5), phải chú ý không để các phần không tan lọt qua phễu.

Tráng cốc bằng 25 ml n-hec-xan (3.4) và cho phần dịch tráng này sang phễu chiết, cũng phải chú ý không để các phần không tan lọt qua phễu chiết.

Thêm 25 ml axetonitril bão hoà với n-hec-xan (3.5) và lắc trong 1 phút. Gạn lấy lớp axetonitril (lớp phía dưới) vào một phễu chiết dung tích 250 ml thứ hai (4.5).

Chú thích - Nếu thấy có hình thành thể nhũ thì cần thận để phễu chiết dưới luồng hơi nước ở khoảng 50°C cho đến khi nhận được các lớp trong.

Tiến hành ba lần chiết tiếp theo lớp n-hec-xan mỗi lần sử dụng 25 ml axetonitril bão hoà với n-hec-xan (3.5).

Gộp các dịch chiết axetonitril và rửa hai lần, mỗi lần với 25 ml dung dịch n-hec-xan bão hoà với axetonitril (3.6).

Chuyển lớp axetonitril sang bình cầu đáy tròn dung tích 250 ml (4.11) và cho bay hơi dung môi ở áp suất thấp trong máy cô quay chân không (4.4) ở nhiệt độ càng thấp càng tốt. Cơ bản là nhiệt độ của nước không được vượt quá 40 °C.

Hoà tan phần còn lại trong 2 ml metanol (3.2) và rót dung dịch này sang bình cầu nhỏ hơn. Nếu phần còn lại này không hoàn toàn hoà tan thì lọc dung dịch.

Chú thích - Nếu hàm lượng chất chống oxy hoá nhỏ hơn 100 mg/kg (ppm), chỉ cần hoà tan phần còn lại trong 1 ml metanol.

5.3 Sắc ký và nhận biết

Phủ giấy lọc lên thành của bình sắc ký (4.1).

Rót hỗn hợp dung môi khai triển (3.8) sang bình sắc ký, độ cao của dung môi khai triển trong bình sắc ký khoảng 1 cm và đậy nắp. Để yên ở nơi tối từ 1 giờ đến 2 giờ, để cho môi trường bên trong của bình sắc ký được bão hoà với hơi của dung môi.

Dùng xilanh (4.12) lấy 10 µl và 20 µl dung dịch metanol của các chất chống oxy đã chiết, chuẩn bị theo 5.2, cho vào hai điểm đặc trưng cách nhau 20 mm và cách mép của bản mỏng (4.3) 20 mm mà trước đó đã được hoạt hoá 1 giờ ở 60 °C trong tủ sấy (4.7). Lấy 4 µl mỗi dung dịch chuẩn của chất chống oxy hoá (3.9) cho vào các điểm đặc trưng cách nhau 20 mm và cách mép bản mỏng 20 mm.

Kẻ một đường thẳng song song với cạnh của bản mỏng và cách các điểm trên 150 mm. Đặt bản mỏng vào bình sắc ký và để yên chỗ tối cho tới khi mặt trên của dung môi chạm tới đường kẻ đã đánh dấu.

Lấy bản mỏng ra khỏi bình sắc ký và để khô trong tủ hút.

Phun dung dịch chất chỉ thị (3.7) lên mặt bản mỏng bằng máy phun (4.14), và đặt bản mỏng vào tủ sấy (4.6) khoảng từ 10 phút đến 15 phút, chỉnh ở nhiệt độ 103 °C ± 2 °C.

Lấy bản mỏng ra khỏi tủ sấy, và so sánh các giá trị R_f của các điểm của các dung dịch chuẩn với các giá trị R_f của các chất chống oxy hoá đã chiết.

Thông tin khác về việc nhận biết các chất chống oxy hoá có thể thu được bằng cách để bản mỏng 30 giây ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, trong bình sắc ký bão hoà với amoniac và so sánh màu sắc thu được đối với các chất chống oxy hoá khác nhau.

6 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và các kết quả thu được. Cũng phải đề cập đến tất cả các điều kiện thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hay tùy ý lựa chọn, cũng như mọi tình huống có thể làm ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo kết quả cũng phải bao gồm tất cả các thông tin cần thiết về việc nhận biết mẫu thử.