

TCVN 12081-1:2017**ISO 18363-1:2015**

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT - XÁC ĐỊNH CÁC
CHLOROPROPANEDIOL (MCPD) LIÊN KẾT VỚI AXIT BÉO
VÀ GLYCIDOL BẰNG SẮC KÝ KHỐI PHỔ (GC/MS) - PHẦN
1: PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG SỰ CHUYỂN HOÁ ESTE
KIỀM NHANH, ĐO 3-MCPD VÀ PHÉP ĐO VI SAI GLYCIDOL**

Animal and vegetable fats and oils - Determination of fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS - Part 1: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 3-MCPD and differential measurement for glycidol

Lời nói đầu

TCVN 12081-1:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 18363-1:2015

TCVN 12081-1:2017 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.

Lời giới thiệu

Bộ tiêu chuẩn này có thể được sử dụng để xác định MCPD liên kết este và glycidol. Hiện nay có ba tiêu chuẩn đã được đề xuất và phần giới thiệu này mô tả các phương pháp mà người phân tích có thể sử dụng để quyết định phương pháp phù hợp với ứng dụng của họ. Việc áp dụng chi tiết của mỗi phương pháp được nêu trong phạm vi áp dụng của từng tiêu chuẩn.

Tiêu chuẩn này là phương pháp vi sai tương đương với tiêu chuẩn DGF C-VI 18 (10) và tương đương phương pháp chính thức AOCS Cd 29c-13. Tóm lại, phương pháp này dựa trên việc giải phóng xúc tác kiềm nhanh của 3-MCPD và glycidol ra khỏi các dẫn xuất este. Glycidol sau đó được chuyển thành 3-MCPD khử. Phép phân tích gồm hai phần. Phần thứ nhất (A) cho phép xác định tổng của 3-MCPD liên kết este và glycidol liên kết este, còn phần thứ hai (B) chỉ xác định 3-MCPD liên kết este. Cả hai phép phân tích đều dựa trên sự giải phóng các chất phân tích 3-MCPD và glycidol đích dạng liên kết este bằng rượu phân có xúc tác kiềm ở nhiệt độ phòng. Trong phần A, sử dụng dung dịch natri clorua đã axit hóa để kết thúc phản ứng và sau đó chuyển glycidol thành 3-MCPD khử. Như vậy, trong phần A khó có thể phân biệt được 3-MCPD và glycidol. Trong phần B, việc kết thúc phản ứng đạt được bằng cách thêm dung dịch muối không có clorua đã axit hóa ngăn ngừa sự chuyển hóa glycidol thành MCPD. Do đó, phần B cho phép xác định hàm lượng 3-MCPD thực. Cuối cùng, hàm lượng glycidol của mẫu tỷ lệ với chênh lệch của hai phép phân tích (A - B) và có thể tính được khi xác định được tỷ lệ chuyển hóa từ glycidol thành 3-MCPD. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để xác định nhanh 3-MCPD liên kết este và glycidol trong dầu mỡ thực vật tinh luyện và chưa tinh luyện. Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng cho mỡ động vật và dầu mỡ dùng để chiên rán, nhưng cần thực hiện nghiên cứu đánh giá trước khi thực hiện phân tích các nền mẫu này. Mọi chất phân tích dạng tự do trong mẫu cần được nêu trong các kết quả nhưng tiêu chuẩn không cho phép phân biệt giữa các chất phân tích dạng tự do và dạng liên kết. Tuy nhiên, theo công bố, nghiên cứu này chưa chứng minh được hàm lượng chất phân tích dạng tự do cao bằng hàm lượng chất phân tích đã este hóa trong dầu mỡ thực vật tinh luyện. Về nguyên tắc, tiêu chuẩn này cũng được cải tiến sao cho dễ dàng xác định được 2-MCPD, nhưng cần được nghiên cứu đánh giá trước khi phân tích chất này.

ISO 18363-2 dùng để xác định MCPD liên kết este và glycidol theo phương pháp chính thức AOCS Cd 29b-13. Tóm lại, phương pháp này dựa trên việc giải phóng kiềm chậm của MCPD và glycidol ra khỏi các dẫn xuất este. Glycidol sau đó được chuyển thành 3-MCPD. ISO 18363-2 bao gồm hai qui trình chuẩn bị mẫu khác nhau trong việc sử dụng các chất nội chuẩn. Có thể sử dụng cả hai phần để xác định 2-MCPD và 3-MCPD liên kết este. Trong phần A, xác định được glycidol liên kết este. Do 3-MCPD có trong mẫu sẽ được chuyển hóa thành glycidol ở mức độ nhỏ vì việc chuẩn bị mẫu, phần B để định lượng glycidol tạo thành bằng cách trừ đi glycidol thu được trong phần A. Bằng cách sử dụng MCPD tự do được đánh dấu đồng vị trong phép thử A và 2-MCPD và 3-MCPD liên kết este được đánh dấu đồng vị trong phần B mà có thể kiểm soát hiệu quả phân tách este. Cả hai phép phân tích A và B

đều dựa trên sự giải phóng các chất phân tích 2-MCPD, 3-MCPD và glycidol đích ra khỏi liên kết este bằng rượu phân có xúc tác kiềm chậm trong điều kiện lạnh. Trong cả hai qui trình chuẩn bị mẫu, phản ứng kết thúc được bằng cách thêm dung dịch natri bromua đặc đã axit hóa sao cho việc chuyển đổi glycidol không bền và glycidol bay hơi thành 3-MBPĐ, cho thấy các đặc tính về độ ổn định và hiệu năng của sắc ký đồ của 3-MCPD. Ngoài ra, lượng dư các ion bromua sẽ ngăn ngừa sự tạo thành không mong muốn của 3-MCPD từ glycidol khi mẫu có chứa các lượng clorua tự nhiên. ISO 18363-2 này có thể áp dụng để xác định 3-MCPD, 2-MCPD liên kết este và glycidol liên kết este trong dầu mỡ thực vật tinh luyện và chưa tinh luyện. Phần hai này cũng có thể áp dụng cho mỡ động vật và dầu mỡ dùng để chiên rán nhưng cần được nghiên cứu đánh giá trước khi phân tích các nền mẫu này. Mọi chất phân tích dạng tự do trong mẫu bao gồm trong các kết quả, nhưng tiêu chuẩn này không cho phép phân biệt giữa chất phân tích dạng tự do và chất phân tích dạng liên kết. Tuy nhiên, theo công bố, nghiên cứu đã không chỉ ra bất kỳ bằng chứng nào về hàm lượng chất phân tích dạng tự do cao bằng hàm lượng chất phân tích đã este hóa trong dầu mỡ thực vật.

ISO 18363-3 dùng để xác định MCPD liên kết este và glycidol liên kết este theo phương pháp AOCS Cd 29a-13. Tóm lại, phương pháp này dựa trên việc chuyển hóa các este glycidyl thành các este 3-MBPĐ và giải phóng MCPD và MBPD có xúc tác kiềm chậm ra khỏi các dẫn xuất este. Phần ba này dựa trên việc chuẩn bị mẫu đơn lẻ trong đó este glycidyl được chuyển thành các monoeste MBPD và sau đó các chất phân tích dạng tự do của 2-MCPD, 3-MCPD và 3-MBPĐ được giải phóng bằng rượu phân có xúc tác kiềm chậm. 3-MBPĐ là hàm lượng chính của glycidol liên kết. Phần ba này có thể áp dụng để xác định 2-MCPD, 3-MCPD este liên kết và glycidol liên kết este trong dầu, mỡ thực vật tinh luyện và chưa tinh luyện. Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng cho mỡ động vật và dầu, mỡ dùng để chiên rán, nhưng cần được nghiên cứu đánh giá trước khi phân tích các nền mẫu này. Phương pháp này thích hợp để phân tích các chất phân tích liên kết (este hóa), nếu cần, mà phương pháp này cũng có thể được tiến hành mà không có sự chuyển hóa ban đầu các este glycidyl. Trong phương pháp này cả hai dạng tự do và liên kết của 2-MCPD và 3-MCPD phải bao gồm trong các kết quả và lượng chất phân tích dạng tự do có thể được tính theo sự chênh lệch giữa hai phép xác định thực hiện trong cả hai phương pháp. Tuy nhiên, theo công bố, nghiên cứu đã không chỉ ra bất kỳ bằng chứng nào về hàm lượng chất phân tích dạng tự do cao bằng hàm lượng phân tích đã este hóa trong dầu mỡ thực vật.

**Dầu mỡ động vật và thực vật – Xác định
các chloropropanediol (MCPD) liên kết với axit béo
và các glycidol bằng sắc ký khối phổ (GC/MS) –
Phần 1: Phương pháp sử dụng sự chuyển hóa este
kiềm nhanh và đo 3-MCPD và phép đo vi sai glycidol**

*Animal and vegetables fats and oils – Determination of
fatty-acid-bound chloropropanediols (MCPDs) and glycidol by GC/MS –
Part 1: Method using fast alkaline transesterification and measurement for 3-MCPD
and differential measurement for glycidol*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định qui trình xác định gián tiếp các este 3-MCPD (3-MCPD liên kết) và có thể xác định 3-MCPD tự do sau khi phân tách este xúc tác kiềm và tạo dẫn xuất bằng axit phenylboronic (PBA). Ngoài ra, phương pháp này có thể xác định gián tiếp các este glycidyl (glycidol liên kết) với giả định rằng ở nhiệt độ phòng không có mặt các chất khác phản ứng với clorua vô cơ tạo thành 3-MCPD.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho dầu mỡ dạng rắn và dạng lỏng.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho sữa và sản phẩm sữa (hoặc chất béo từ sữa và sản phẩm sữa).

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 4851 (ISO 3696) *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau.

3.1

3-MCPD liên kết (bound 3-MCPD)

Tổng của tất cả các dẫn xuất 3-MCPD được phân tách bằng rượu phân xúc tác kiềm (đặc biệt là các este của axit béo) theo phương pháp chuẩn.

CHÚ THÍCH 1: Hàm lượng 3-MCPD được tính và biểu thị theo phần khối lượng, tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg).

CHÚ THÍCH 2: Trong dầu và mỡ, lượng 3-MCPD tự do có thể xuất hiện với lượng không đáng kể nhưng được nêu trong kết quả.

3.2

Glycidol liên kết (bound glycidol)

Tổng của tất cả các dẫn xuất glycidyl được phân tách bằng rượu phân xúc tác kiềm (đặc biệt là các este của axit béo), theo phương pháp qui định.

CHÚ THÍCH 1: Hàm lượng glycidol tính được và biểu thị theo phần khối lượng, tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg).

CHÚ THÍCH 2: Sự có mặt của glycidol tự do trong dầu mỡ là không đáng kể do hợp chất này không ổn định.

4 Nguyên tắc

Để xác định tổng của 3-MCPD liên kết và glycidol liên kết theo 3-MCPD tự do (Phép thử A), một lượng mẫu lỏng được thêm chuẩn bằng chất chuẩn đồng hình d_5 -3-MCPD-1,2-bis-palmitoyl este và được hòa tan trong *tertiary*-butyl methyl ete (tBME). Khi bổ sung dung dịch natri hydroxit loãng hoặc natri methoxid trong metanol sẽ giải phóng 3-MCPD tự do và glycidol tự do. Phản ứng này được kết thúc bằng cách thêm một lượng dư natri clorua trong dung dịch axit. Trong các điều kiện axit, glycidol tự do phản ứng với clorua vô cơ thành 3-MCPD và một lượng nhỏ 2-MCPD. Các hợp chất không phân cực không mong muốn trong mẫu được loại bỏ bằng cách chiết hai lần pha lỏng bằng isohexan. Chất phân tích cùng với chất chuẩn đồng hình, được chuyển sang pha hữu cơ bằng cách chiết nhiều lần pha lỏng với diethyl ete, etyl axetat hoặc hỗn hợp của cả hai dung môi này. Việc tạo dẫn xuất thực hiện trong pha hữu cơ bằng phản ứng với PBA. Để loại bỏ lượng dư PBA, cô đặc mẫu và chuyển dung môi hữu cơ trở vào chất chiết mẫu với một lượng nhỏ natri sulfat khan và cho bay hơi đến khô dưới dòng nitơ, trước khi hòa tan lại lần cuối trong iso-octan để đo bằng GC-MS.

Để xác định 3-MCPD liên kết, một lượng mẫu thứ hai (Phép thử B) được thêm chuẩn bằng chất chuẩn đồng hình d_5 -3-MCPD-1,2-bis-palmitoyl este và hòa tan trong tBME. Khi bổ sung dung dịch natri hydroxit loãng hoặc natri methoxid trong metanol sẽ giải phóng 3-MCPD tự do và glycidol tự do. Phản ứng này được kết thúc bằng cách thêm một lượng dư dung dịch muối không chứa clorua trong dung

dịch axit (ví dụ: natri sulfat, amoni sulfat, natri bromua). Trong các điều kiện axit không có clorua, glycidol tự do phản ứng với các sản phẩm khác nhau, phụ thuộc vào lượng muối được sử dụng, nhưng không sinh 3-MCPD bổ sung. Việc chuẩn bị tiếp mẫu và tiến hành đo theo phép thử A.

Để tính glycidol liên kết, lấy chênh lệch kết quả của hai phép xác định (phép thử A và B) nhân với hệ số không tỷ lệ, phản ánh việc chuyển hóa glycidol thành 3-MCPD. Quy trình này dựa trên giả định rằng chênh lệch giữa các phép xác định khác nhau chỉ do sự có mặt của este glycidyl quá nhiều.

Tiến hành định lượng các chất phân tích, sử dụng d_5 -3-MCPD-1,2-bis-palmitoyl este làm chất chuẩn đồng hình. Do vậy, không cần kiểm soát việc tách hoàn toàn este. Định kỳ tiến hành hiệu chuẩn nền mẫu cho toàn bộ phương pháp và để xác định độ tuyến tính của phương pháp, độ thu hồi tương đối và trong trường hợp glycidol liên kết được dùng để xác định hệ số chuyển hóa. Nếu dùng phương pháp liên tục không thay đổi thì không cần tiến hành hiệu chuẩn trong mỗi ngày làm việc.

Các mẫu chỉ chứa 3-MCPD và không chứa glycidol làm cho các giá trị thấp hơn (khoảng 2 % đến 10 %) khi sử dụng quy trình B thay vì sử dụng quy trình A. Chênh lệch là do chất đồng vị ảnh hưởng trong quy trình B. Ảnh hưởng này có thể xác định được bằng cách đo liều lượng mẫu dầu không nhiễm các lượng 3-MCPD-1,2-bis-dipalmitoyleste và d_5 -3-MCPD-1,2-bis-palmitoyl este bằng nhau trước khi chia thành hai phần dịch lỏng. Các phần này sau đó được phân tích ba lần theo quy trình A và quy trình B. Từ các phép xác định, có thể xác định hệ số hiệu chỉnh, là tỷ số của các kết quả từ quy trình A và quy trình B. Chất đồng vị ảnh hưởng cũng xuất hiện khi có mặt glycidol liên kết.

3-MCPD có thể xuất hiện trong các polyme nhất định được sử dụng cho các resin tăng cường ươm và cho các mục đích khác, nên phân tích mẫu trắng hàng ngày để kiểm soát sự nhiễm không mong muốn. Mẫu trắng là dầu không chứa 3-MCPD hoặc glycidol, ví dụ: dầu thực vật nguyên chất. Việc nhiễm có thể cũng xuất hiện từ các bộ phận khác, ví dụ: nắp lọ hoặc bộ lọc. Nung dụng cụ thủy tinh ở nhiệt độ 400 °C đến 500 °C có thể giảm nguy cơ nhiễm này. Dung dịch sẽ tốt hơn khi sử dụng các vật liệu không thôi nhiễm.

5 Thuốc thử

5.1 Yêu cầu chung

CẢNH BÁO – Thực hiện các qui định về xử lý các chất nguy hại. Cần tuân thủ các biện pháp an toàn kỹ thuật cho tổ chức và cá nhân.

Sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, nước phải đạt loại 3 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có qui định khác.

5.2 Chất chuẩn và các hợp chất đối chứng

5.2.1 Dung dịch chuẩn làm việc thay thế, d_5 -3-MCPD-1,2-bis-palmitoyl este (ví dụ: 26,87 $\mu\text{g/ml}$ trong toluen; tương đương 5,0 $\mu\text{g/ml}$ 3-MCPD tự do); có thể sử dụng chất thay thế khác d_5 -3-MCPD-1,2-bis-este.

5.2.2 3-MCPD-1,2-bis-palmitoyl este (26,6 $\mu\text{g/ml}$ trong toluen; tương đương 5,0 $\mu\text{g/ml}$ 3-MCPD tự do), có thể sử dụng chất thay thế khác 3-MCPD-1,2-bis-este.

5.2.3 3-MCPD, $w \geq 99,0 \%$.

5.2.4 Glycidyl stearat, $w \geq 95,0 \%$.

5.3 Dung môi

5.3.1 Toluene.

5.3.2 *tertiary*-butyl methyl este (tBME), (2-methoxy-2-methylpropan).

5.3.3 Metanol.

5.3.4 Isohexan (2-methylpentan).

5.3.5 Ethyl axetat.

5.3.6 Diethyl ete.

5.3.7 Isooctan.

5.4 Thuốc thử khác

5.4.1 Dung dịch natri hydroxit, $\rho = 20 \text{ g/l}$ trong metanol hoặc dung dịch natri methoxid, $\rho = 25 \text{ g/l}$ trong metanol.

5.4.2 Dung dịch natri clorua đã axit hóa, ($\rho = 200 \text{ g/l}$). Cho 35 ml axit sulfuric (25 %) vào 1 lit dung dịch natri clorua (200 g/l). 600 μl dung dịch này phải trung hòa hết 200 μl dung dịch natri hydroxit hoặc dung dịch natri methoxid (5.4.1) và chỉnh pH đến dải axit. Có thể sử dụng các axit khác (như axit axetic) nhưng phải kiểm tra tính phù hợp của chúng bằng các thực nghiệm thêm chuẩn hoặc bằng phép phân tích mẫu liên phòng.

5.4.3 Dung dịch natri bromua đã axit hóa, ($\rho = 600 \text{ g/l}$). Cho 35 ml axit sulfuric (25 %) vào 1 lit dung dịch natri bromua (600 g/l). 600 μl dung dịch này phải trung hòa hết 200 μl natri hydroxit hoặc dung dịch natri methoxid (5.4.1) và chỉnh pH đến dải axit. Có thể sử dụng các axit khác (ví dụ: axit axetic)

nhưng phải kiểm tra tính phù hợp của chúng bằng các thử nghiệm thêm chuẩn hoặc bằng phép phân tích vòng mẫu liên phòng.

5.4.4 Natri sulfat khan, dạng hạt.

5.4.5 Axit phenylboronic, bão hòa trong diethyl ete có kết tủa.

5.4.6 Khí nitơ (ví dụ: 5,0 phần thể tích, độ tinh khiết = 99,999 %).

6 Thiết bị, dụng cụ

6.1 Pipet, ví dụ: Eppendorf (ví dụ: 10 µl đến 100 µl, 10 µl đến 200 µl, 100 µl, đến 1 000 µl).

6.2 Pipet pittông và pipet định mức, có các loại kích cỡ khác nhau.

6.3 Bình định mức, có các loại kích cỡ khác nhau.

6.4 Cân phân tích, có thể đọc đến 0,000 1 g, độ chính xác 0,001 g.

6.5 Lọ nhỏ có nắp vận, (dung tích khoảng 2 ml) và nắp vận với màng lọc polytetrafluoroetylen (PTFE).

6.6 Pipet Pasteur và pipet có quả bóp.

6.7 Lọ mẫu micro (dung tích khoảng 200 µl) dùng cho các lọ nhỏ có nắp vận (dung tích khoảng 2 ml).

6.8 Dụng cụ thổi nitơ.

6.9 Hệ thống GC-MS có buồng bơm cài đặt được chương trình nhiệt độ

6.10 Cột sắc ký khí silica nung chảy, pha tinh 50 % diphenyl - 50 % dimethylpolysiloxan, dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm, độ dày màng 0,25 µm, loại dùng cho phương pháp MS, có tiền cột.

Cần định kỳ thay tiền cột, do còn lưu giữ các thành phần không bay hơi và để kéo dài thời gian sử dụng của cột chính.

7 Mẫu thử

7.1 Lấy mẫu

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

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu dạng lỏng được sử dụng luôn mà không cần xử lý thêm. Mẫu là chất béo dạng rắn hoặc dạng đặc cần phải làm tan chảy cẩn thận ở khoảng 80 °C trong tủ sấy hoặc nồi cách thủy. Đối với chất béo có

hiệt độ tan chảy cao thì cần cẩn thận tăng nhiệt độ từng bước, mỗi bước 10 °C cho đến khi bắt đầu tan chảy.

Mẫu dạng rắn có chứa hàm lượng nước cao, dẫn đến tách pha sau khi tan chảy, thì không được làm tan chảy mà sử dụng luôn hoặc chất béo được tách bằng chiết lỏng/lỏng. Nên tách pha lỏng/lỏng nếu mẫu có chứa các lượng clorua, ví dụ: trong một số loại margarin hoặc trong bơ.

8 Cách tiến hành

8.1 Thêm chuẩn bằng chất chuẩn đồng hình và đồng hóa

Cân hai phần mẫu, mỗi phần 100 mg, chính xác đến 0,5 mg, cho vào hai lọ nhỏ 2 ml có nắp vặn. Thêm vào mỗi lọ 100 µl dung dịch chuẩn đồng hình (5.2.1) và 100 µl fBME (phép thử A và B). Lắc hai lọ cho đến khi mẫu hòa tan hoàn toàn. Trong trường hợp mẫu có nhiệt độ tan chảy cao thì cần làm ấm bình phản ứng.

8.2 Tách lớp este và chuyển hóa glycidol

8.2.1 Thêm vào mỗi phép thử 200 µl dung dịch natri hydroxid hoặc natri methoxid (5.4.1), làm kín lọ và lắc mạnh.

8.2.2 Thời gian phản ứng để tách lớp este là 3,5 min đến 5,5 min. Trong hầu hết các trường hợp, các dung dịch đục hoặc dung dịch có kết tủa cần được lắc mạnh để làm trong dung dịch. Kết thúc quá trình tách lớp este bằng cách bổ sung như sau:

- 600 µl dung dịch natri clorua đã axit hóa (5.4.2) vào một lọ (phép thử A);
- 600 µl dung dịch muối không chứa clorua đã axit hóa (5.4.3) vào lọ thứ hai (phép thử B).

CẢNH BÁO – Cần tuân thủ thời gian phản ứng nêu trên vì trong dung dịch kiềm và ở nhiệt độ cao hơn có thể giải phóng 3-MCPD tự do và d₅-3-MCPD sẽ phản ứng với glycidol và d₅-glycidol.

8.2.3 Thêm vào hai phép phân tích 600 µl isohexan, đậy kín lọ và lắc mạnh. Để cả hai lọ ở nhiệt độ phòng trong khoảng 5 min. Ở bước này, trong phép thử A, glycidol phản ứng trong xúc tác kiềm thành 3-MCPD và một phần thành 2-MCPD. Việc kết thúc phản ứng này phụ thuộc vào độ axit của dung dịch phản ứng và tỷ lệ của các đồng vị MCPD tạo thành. Nếu độ axit không đủ mạnh do việc sử dụng kiềm yếu hoặc sử dụng quá nhiều các thành phần phản ứng kiềm thì cần tăng thời gian phản ứng và nhiệt độ phản ứng. Ngược lại, phản ứng sẽ không hoàn toàn và không tái lập được.

8.3 Làm sạch nền mẫu

Lắc mạnh cả hai lọ phản ứng và sau đó tách và loại bỏ pha hữu cơ bằng pipet Pasteur. Lặp lại bước này với 600 µl isohexan khác cho cả hai phép thử.

8.4 Tạo dẫn xuất

8.4.1 Chiết các pha lỏng (8.3) ba lần, mỗi lần bằng 600 μ l hỗn hợp diethyl ete/ethyl axetat (ví dụ: 600 μ l/ml ete diethyl; 400 μ l/ml ethyl axetat) dùng các pipet Pasteur mới. Thành phần, lượng dung môi chiết và số lần chiết có thể thay đổi. Gộp các dịch chiết hữu cơ của mỗi phép phân tích không phải pha lỏng vào lọ mới có chứa một lượng nhỏ natri sulfat khan (5.4.4), thêm 10 μ l đến 100 μ l thuốc thử tạo dẫn xuất (5.4.5). Lượng thuốc thử tạo dẫn xuất phải phù hợp với dung tích của hệ thống sắc ký. Nếu thuốc thử khô bị dính thì dung dịch phải được chuyển vào lọ mới, với phần natri sulfat khan (5.4.4) khác. Cả hai phép phân tích phải được tiến hành ngay theo 8.4.2.

8.4.2 Để kết thúc phản ứng tạo dẫn xuất và để loại bỏ thuốc thử dư, làm bay hơi cả hai bình đến khô sử dụng dòng khí nitơ nhẹ. Hòa tan lại phần có thể hòa tan trong khoảng 500 μ l isooctan. Đối với phép đo GC-MS, một phần của mỗi dung dịch đã hòa tan lại được chuyển vào lọ mẫu micro 200 μ l.

8.5 Sắc ký khí/đo phổ khối lượng

8.5.1 Thể tích bơm: 1 μ l đến 2 μ l.

8.5.2 Khí mang: heli 4,6 (độ tinh khiết = 99,996 %) hoặc loại tốt hơn, tốc độ dòng không đổi từ 1 ml/min đến 1,4 ml/min.

8.5.3 Chương trình nhiệt độ PTV: ví dụ từ 85 °C tăng đến 165 °C với tốc độ 300 °C/min, đẳng nhiệt 10 min, tăng đến 320 °C với tốc độ 300 °C/min, đẳng nhiệt 8 min.

8.5.4 Bơm: ví dụ: không chia dòng, tốc độ làm sạch 50 ml/min từ 0,5 min đến 1 min, làm sạch septum 3 ml/min.

8.5.5 Chương trình nhiệt độ lò GC: Các điều kiện sau đây được cho là phù hợp nhưng cần điều chỉnh tùy thuộc vào dụng cụ được sử dụng và cột: 85 °C, đẳng nhiệt 0,5 min, tăng đến 150 °C với tốc độ 6 °C/min, tăng đến 180 °C với tốc độ 12 °C/min, tăng đến 280 °C với tốc độ 25 °C/min, đẳng nhiệt 7 min.

8.5.6 Detector phổ khối lượng: va chạm electron (EI), kiểm soát ion chọn lọc (SIM), các vết ion phát hiện được 149/150/201/203 đối với chất chuẩn đồng hình, 146/147/196/198 đối với chất phân tích. Nhìn chung, các vết ion tương ứng là 150 và 147 hoặc 201 và 196 là đích để định lượng, trong đó các vết ion khác dùng cho định tính.

CHÚ THÍCH: Không cần sử dụng kỹ thuật sắc ký thời ngược.

8.5.7 Để định lượng, nên sử dụng phần mềm thích hợp với phân tích tự động.

9 Biểu thị kết quả

9.1 Tiến hành định lượng tổng 3-MCPD đã được giải phóng khỏi 3-MCPD liên kết, đã được tạo thành từ các este glycidyl, bằng cách nhân tỷ số diện tích tín hiệu của chất phân tích và chất chuẩn đồng hình

được dán nhãn là đồng vị, dựa trên các vết ion tương ứng với mức thêm chuẩn của chất chuẩn đồng hình đánh dấu đồng vị trong phép thử A, tính theo Công thức (1):

$$W_{3\text{-MCPD(A)}} = \frac{SF_A \times W_{d_5\text{-3-MCPD(A)}}}{SF_{IA}} \quad (1)$$

Trong đó:

$W_{3\text{-MCPD(A)}}$ là phần khối lượng của 3-MCPD trong phép thử A, tính bằng miligam trên kilogram (mg/kg);

$W_{d_5\text{-3-MCPD(A)}}$ là phần khối lượng của $d_5\text{-3-MCPD}$ trong phép thử A, tính bằng miligam trên kilogram (mg/kg);

SF_A là diện tích của 3-MCPD trong phép thử A;

SF_{IA} là diện tích của $d_5\text{-3-MCPD}$ trong phép thử A.

9.2 Tiến hành định lượng 3-MCPD liên kết bằng cách nhân tỷ số diện tích tín hiệu của chất phân tích và chất chuẩn đồng hình được đánh dấu đồng vị, dựa trên các vết ion tương ứng với mức thêm chất chuẩn đồng hình được đánh dấu đồng vị trong phép thử B, tính theo Công thức (2):

$$W_{3\text{-MCPD(B)}} = \frac{SF_A \times W_{d_5\text{-3-MCPD(B)}}}{SF_{IB}} \quad (2)$$

Trong đó:

$W_{3\text{-MCPD(B)}}$ là phần khối lượng của 3-MCPD trong phép thử, tính bằng miligam trên kilogram (mg/kg);

$W_{d_5\text{-3-MCPD(B)}}$ là phần khối lượng của $d_5\text{-3-MCPD}$ trong phép thử B, tính bằng miligam trên kilogram (mg/kg);

SF_B là diện tích của 3-MCPD trong phép thử B;

SF_{IB} là diện tích của $d_5\text{-3-MCPD}$ trong phép thử B.

Báo cáo kết quả đến một chữ số thập phân.

9.3 Có thể xác định hệ số chuyển hóa mà lượng 3-MCPD được tạo thành từ glycidol trong các điều kiện phản ứng qui định bằng cách hiệu chuẩn nền mẫu với sự có mặt clorua (phép thử A). Do vậy, mẫu dầu hoặc mẫu chất béo không bị nhiễm được tiến hành theo Điều 7 (phép thử A) sau khi thêm chuẩn các lượng glycidol khác nhau (ví dụ: glycidyl stearat) sao cho có thể tạo ra các mức nồng độ cách đều

nhau. Giá trị nghịch đảo của đường chuẩn hiệu chuẩn $y = mx + n$ bằng với hệ số chuyển đổi t , tính được theo Công thức (3):

$$t = \frac{1}{m} \quad (3)$$

Trong đó:

y là phần khối lượng của W_{3-MCPD} ;

x là phần khối lượng của $W_{glycidol}$;

m là độ dốc của đường cong;

n là giao điểm y .

9.4 Hàm lượng glycidol, $W_{glycidol}$, là chênh lệch của kết quả thu được trong Công thức (1) và Công thức (2) nhân với hệ số chuyển đổi t [theo Công thức (3)], nêu trong Công thức (4):

$$W_{glycidol} = t \times [W_{3-MCPD(A)} - W_{3-MCPD(B)}] \quad (4)$$

Trong đó:

$W_{glycidol}$ là phần khối lượng của glycidol trong mẫu, tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg).

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và nền mẫu khác với các dải nồng độ và các nền mẫu đã nêu.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn độ lặp lại r nêu trong Bảng A.1.

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác

nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn độ tái lập R nêu trong Bảng A.1.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này. Phương pháp này bắt buộc trong phép thử A hoặc B được sử dụng. Không công bố, nếu phương pháp được cho là không đầy đủ;
- d) kết quả thu được;
- e) kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được
- f) 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.

CHÚ Ý – Để xác định lượng chính xác 3-MCPD, chỉ sử dụng phép thử B, còn phép thử A để xác định tổng lượng 3-MCPD và glycidol. Phương pháp này cần nêu rõ 3-MCPD tạo thành dựa trên phép thử A hoặc phép thử B.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử cộng tác

Độ chụm của phương pháp là kết quả của nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được Ủy ban liên hợp của DIN và DGF tổ chức để phân tích dầu, mỡ, sản phẩm chất béo, các sản phẩm liên quan và các nguyên liệu thô. Nghiên cứu đã được tiến hành năm 2010 trên sáu mẫu sau.

Nghiên cứu trên các mẫu sau:

- A dầu hạt cải siêu nguyên chất;
- B dầu mầm ngô, tinh luyện;
- C mỡ dùng để chiên rán (chất béo đã hydro hóa);
- D dầu óc chó/dầu hạt nho nguyên chất tinh luyện;
- E dầu đậu tương/dầu hạt hướng dương;
- F mẫu A có bổ sung 3 mg/kg 3-MCPD tự do.

Việc đánh giá kết quả đã được tiến hành theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Các kết quả đối với mẫu A đến mẫu F được nêu trong Bảng A.1 và Bảng A.2.

Bảng A.1 – Tóm tắt kết quả thống kê đối với phép thử A

Đơn vị tính là mg/kg

Tổng 3-MCPD và glycidol	A	B	C	D	E	F
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	13	13	13	13	13	13
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	13	13	13	9
Số lượng phép thử riêng rẽ trong tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu	24	24	26	26	26	18
Giá trị trung bình, $\bar{m}$	0,08	1,21	5,35	10,33	1,07	2,66
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,02	0,06	0,23	0,23	0,09	0,10
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{v,r}$ (%)	25,6	4,6	4,4	2,3	8,1	3,9
Giới hạn lặp lại, r (2,8 s_r)	0,06	0,15	0,66	0,65	0,24	0,29
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,10	0,27	0,97	1,51	0,21	0,45
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{v,R}$ (%)	131,7	22,6	18,2	14,6	20,0	16,9
Giới hạn tái lập, R (2,8 s_R)	0,29	0,77	2,72	4,23	0,60	1,26

Bảng A.2 – Tóm tắt kết quả thống kê đối với phép thử

Đơn vị tính là mg/kg

Mẫu 3-MCPD	A	B	C	D	E	F
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	13	13	13	13	13	13
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	13	13	13	12	12
Số lượng phép thử riêng rẽ trong tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu	24	26	26	26	24	24
Giá trị trung bình, m	0,09	0,46	2,31	8,12	0,62	2,37
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,04	0,07	0,11	0,22	0,04	0,17
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{v,r}$ (%)	44,5	14,7	4,7	2,7	5,7	7,3
Giới hạn lặp lại, r (2,8 s_r)	0,11	0,19	0,30	0,62	0,10	0,48
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,12	0,17	0,54	1,41	0,18	0,57
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{v,R}$ (%)	130,9	37,7	23,6	17,4	28,5	24,1
Giới hạn tái lập, R (2,8 s_R)	0,34	0,48	1,52	3,95	0,50	1,60

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6128 (ISO 661), Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị mẫu thử.
 - [2] TCVN 2625 (ISO 5555), Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu.
 - [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
 - [4] Kuhlmann J. Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2011, **113** pp. 335–344
 - [5] Ermacora A. & Hrnčirik K. A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats. J. Am. Oil Chem. Soc. 2013, **90** pp. 1–8
 - [6] Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft (DGF). DGF Standard Method C-VI 18 (10) Fatty-acid bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxypropane-1-ol (glycidol). Determination in oils and fats by GC-MS (Differential, measurement). Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen, 2011b.
 - [7] Official Method Cd AOCS 29c-13, Approved 2013, Fatty-acid-bound 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2,3-epoxy-propane-1-ol (glycidol), Determination in Oils and Fats by GC-MS (Differential Measurement)
-