

propylparaben/ethylparaben thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hàm lượng tương ứng của $C_8H_8O_3$ và $C_{10}H_{12}O_3$ trong methylparaben chuẩn và propylparaben chuẩn.

Ethylparaben và butylparaben có thể được xác định theo cách tương tự với các dung dịch nội chuẩn thích hợp. Tuy nhiên, độ thu hồi của quá trình chiết xuất phụ thuộc vào chất nền, vì vậy cần xác định tính phù hợp của quy trình với từng sản phẩm cụ thể.

Thimerosal

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Dung dịch A: Acid trifluoroacetic - nước (0,5 : 1000).

Pha động: Methanol - dung dịch A (60 : 40).

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chứa 25 µg/ml thimerosal chuẩn trong nước.

Dung dịch thử: Pha loãng mẫu thử trong nước để thu được dung dịch có nồng độ thimerosal khoảng 25 µg/ml.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (10 cm × 2,1 mm) được nhồi pha tĩnh C (2 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 222 nm.

Tốc độ dòng: 0,35 ml/min.

Thể tích tiêm: 2,5 µl.

Nhiệt độ buồng tiêm mẫu tự động: 4 °C.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn, hệ số đối xứng của pic thimerosal không lớn hơn 1,5; độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic thimerosal thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 1,0 %.

Tính hàm lượng của thimerosal, $C_9H_9HgNaO_2S$, trong chế phẩm dựa vào diện tích pic thimerosal thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn và dung dịch thử, hàm lượng của $C_9H_9HgNaO_2S$ trong thimerosal chuẩn.

Phương pháp cực phổ

Phenylmercuric nitrat

Dung dịch chuẩn gốc: Dung dịch chứa 0,1 mg/ml phenylmercuric nitrat trong dung dịch natri hydroxyd 0,1 M (TT). Làm ấm để hòa tan nếu cần.

Dung dịch chuẩn: Hút 10 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 25 ml rồi tiến hành như chỉ dẫn ở mục dung dịch thử bắt đầu từ “thêm 2 ml dung dịch kali nitrat 1 %....”.

Dung dịch thử: Hút 10 ml mẫu thử vào bình định mức 25 ml, thêm 2 ml dung dịch kali nitrat 1 % (TT) và 10 ml dung dịch đệm borat kiểm pH 9,2 (TT), nếu cần điều chỉnh đến pH 9,2 bằng dung dịch acid nitric 2 M (TT). Thêm 1,5 ml dung dịch gelatin (TT) 0,1 % mới pha, thêm dung dịch đệm borat kiểm pH 9,2 (TT) đến vạch, trộn đều.

Cách tiến hành:

Hút một phần dung dịch thử cho vào bình cực phổ, đuổi không khí trong dung dịch bằng dòng khí nitrogen thổi qua trong 15 min. Đặt điện cực giọt thủy ngân của máy cực phổ thích hợp và ghi lại cực phổ đồ trong khoảng điện thế từ -0,6 V đến -1,5 V so với điện cực calomel bão hòa. Xác

định cường độ dòng khuếch tán của dung dịch thử, $(i_d)_U$, là hiệu số giữa cường độ dòng tồn dư và cường độ dòng giới hạn.

Theo cách tương tự, xác định đồng thời cường độ dòng khuếch tán, $(i_d)_S$, của dung dịch chuẩn.

Tính hàm lượng phenylmercuric nitrat, $C_6H_5HgNO_3$, trong mẫu thử (µg/ml) theo công thức sau:

$$2,5 \times C \times \frac{(i_d)_U}{(i_d)_S}$$

Trong đó: C là nồng độ của phenylmercuric nitrat trong dung dịch chuẩn (µg/ml).

10.21 ĐỊNH LƯỢNG ACID OMEGA-3 TRONG DẦU CÁ

Dầu cá là sản phẩm có nguồn gốc từ các loài cá thuộc họ Cá trổng (*Engraulidae*), Cá khê (*Carangidae*), Cá trích (*Clupeidae*), Cá ớt me (*Osmeridae*), Cá Hồi (*Salmonidae*), Cá ngừ (*Scombridae*). Dầu cá có chứa acid omega-3. Acid omega-3 bao gồm acid alpha-linolenic (C18:3 n-3), acid moroctic (C18:4 n-3), acid eicosatetraenoic (C20:4 n-3), acid timnodonic (eicosapentaenoic) (C20:5 n-3; EPA), acid heneicosapentaenoic (C21:5 n-3), acid clupanodonic (C22:5 n-3) và acid cervonic (docosaheptaenoic) (C22:6 n-3; DHA).

EPA và DHA

Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

Quá trình xử lý mẫu cần được tiến hành nhanh, tránh tiếp xúc với ánh sáng, các tác nhân oxy hóa, chất xúc tác quá trình oxy hóa (ví dụ: đồng, sắt) và không khí.

Phương pháp được áp dụng để phân tích dạng methyl hoặc ethyl ester của acid (all-Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoic (EPA; 20:5 n-3) và acid (all-Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic (DHA; 22:6 n-3).

Chuẩn nội: Methyl tricosanoat (TT).

Dung dịch thử (a)

A. Áp dụng với chế phẩm chứa acid omega-3 ở dạng ethyl ester: Hòa tan một lượng chế phẩm tương ứng trong Bảng 1 và khoảng 70,0 mg chuẩn nội bằng dung dịch butylhydroxytoluen (TT) 0,005 % trong trimethylpentan (TT) và pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi. Có thể đun nóng nhẹ (tới 60 °C) để hòa tan chuẩn nội.

Bảng 1 - Khối lượng mẫu chế phẩm dùng thử nghiệm

Tổng hàm lượng EPA và DHA (%)	Khối lượng mẫu chế phẩm dùng thử nghiệm (g)
30 - 50	0,4 - 0,5
50 - 70	0,3
70 - 90	0,25

B. Áp dụng với chế phẩm chứa acid omega-3 ở dạng triglycerid: Lấy 2,0 ml dung dịch thu được ở phép thử A

vào ống thủy tinh thạch anh có nắp xoay dung tích thích hợp, bay hơi dung môi đến khô dưới dòng khí nitrogen (TT). Thêm 1,5 ml dung dịch natri hydroxyd (TT) 2% trong methanol (TT), thổi khí nitrogen, nắp kín bằng nắp đậy có có bao lớp polytetrafluoroethylen, lắc đều. Đun trên cách thủy trong 7 min, để nguội. Thêm 2 ml dung dịch boron trichlorid trong methanol (TT), thổi khí nitrogen (TT), nắp kín, lắc nhẹ. Đun trên cách thủy trong 30 min. Để nguội tới 40 - 50°C, thêm 1 ml trimethylpentan (TT), nắp kín, lắc mạnh ít nhất 30 s. Ngay lập tức, thêm 5 ml dung dịch natri clorid bão hòa (TT), thổi khí nitrogen (TT), nắp kín, lắc kỹ trong ít nhất 15 s, ly tâm 3000 r/min trong 5 min, hoặc để tách lớp. Chuyển lớp trimethylpentan (lớp trên) sang lọ thủy tinh khác, phần còn lại (lớp dưới) được chiết với 1 ml trimethylpentan (TT) thêm một lần nữa. Gộp các dịch chiết trimethylpentan. Rửa dịch chiết trimethylpentan với nước hai lần, mỗi lần 1 ml, sau đó làm khô dịch chiết trimethylpentan bằng natri sulfat khan (TT) được dung dịch tiêm sắc ký. Chuẩn bị 3 dung dịch thử.

Dung dịch thử (b): Hòa tan 0,300 g chế phẩm bằng dung dịch butylhydroxytoluen (TT) 0,005 % trong trimethylpentan (TT) và pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi. Tiếp tục các bước tương tự như chuẩn bị dung dịch thử (a).

Dung dịch đối chiếu (a₁): Hòa tan khoảng 70,0 mg chuẩn nội và 90,0 mg acid eicosapentaenoic ethyl ester chuẩn trong dung dịch butylhydroxytoluen (TT) 0,005 % trong trimethylpentan (TT), pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi. Có thể đun nóng nhẹ (tới 60 °C) để hòa tan chuẩn nội.

Dung dịch đối chiếu (a₂): Hòa tan khoảng 60,0 mg acid docosahexaenoic ethyl ester chuẩn và 70,0 mg chuẩn nội trong dung dịch butylhydroxytoluen (TT) 0,005 % trong trimethylpentan (TT), pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi. Có thể đun nóng nhẹ (tới 60 °C) để hòa tan chuẩn nội.

Chuẩn bị dung dịch đối chiếu (a₁) và (a₂) theo các bước như mô tả tại mục A của phần Dung dịch thử (a) nếu kiểm tra chế phẩm chứa acid omega-3 ở dạng ethyl este; tiếp tục theo các bước mô tả tại mục B của phần Dung dịch thử (a) nếu chế phẩm chứa acid omega-3 ở dạng triglycerid. Chuẩn bị 3 dung dịch đối chiếu đối với mỗi mẫu chế phẩm cần kiểm tra.

Dung dịch đối chiếu (b): Hòa tan 0,3 g methyl palmitat (TT), 0,3 g methyl stearat (TT), 0,3 g methyl arachidat (TT) and 0,3 g methyl behenat (TT) trong dung dịch butylhydroxytoluen (TT) 0,005 % trong trimethylpentan (TT), pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi.

Dung dịch đối chiếu (c): Hòa tan khoảng 55,0 mg acid docosahexaenoic methyl ester (TT) và khoảng 5,0 mg acid tetracos-15-enoic methyl ester (TT) trong dung dịch

butylhydroxytoluen (TT) 0,005 % trong trimethylpentan (TT), pha loãng thành 10,0 ml bằng cùng dung môi.

Điều kiện sắc ký

Cột mao quản bằng silica nung chảy, chiều dài ít nhất 25 m, đường kính 0,25 mm, được phủ lớp phim macrogol 20.000 dày 0,2 µm.

Khí mang: Hydrogen (TT) hoặc heli dùng cho sắc ký khí (TT).

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

Detector ion hóa ngọn lửa

Thể tích tiêm: 1 µl, tiêm 2 lần.

Tỷ lệ chia dòng 1 : 200. Nếu hệ thống sắc ký sử dụng chế độ không chia dòng, các dung dịch thử và đối chiếu phải được pha loãng 200 lần bằng dung dịch butylhydroxytoluen (TT) 0,005 % trong trimethylpentan (TT) trước khi tiêm sắc ký. Chương trình nhiệt độ:

	Thời gian (min)	Nhiệt độ (°C)
Cột	0 - 2	170
	2 - 25,7	170 → 240
	25,7 - 28	240
Buồng tiêm		250
Detector		270

Tính phù hợp hệ thống:

Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch đối chiếu (b), phần trăm diện tích của các pic tăng dần tương ứng với các chất sau: methyl palmitat, methyl stearat, methyl arachidat, methyl behenat. Phần trăm diện tích của pic methyl palmitat và pic methyl behenat khác nhau không quá 2,0 %.

Độ phân giải: Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch đối chiếu (c), độ phân giải giữa pic của acid docosahexaenoat methyl ester và acid tetracos-15-enoic methyl ester không nhỏ hơn 1,2.

Trên sắc ký đồ của dung dịch thử (a), pic của methyl tricosanoat và bất kỳ pic của acid heneicosapentaenoic methyl ester hoặc ethyl ester (C21:5) khi so sánh với sắc ký đồ của dung dịch thử (b) phải cho thấy sự tách biệt rõ (nếu không phải dùng hệ số hiệu chỉnh).

Tính hàm lượng phần trăm của EPA và DHA theo công thức sau:

$$A_x \times \frac{A_{x,3}}{m_{x,3}} \times \frac{m_l}{A_l} \times \frac{m_{x,r}}{A_{x,r}} \times \frac{1}{m_2} \times C \times 100$$

Trong đó:

m_l là khối lượng chuẩn nội trong dung dịch thử (a), tính bằng mg;

m₂ là khối lượng chế phẩm trong dung dịch thử (a), tính bằng mg;

m_{x,3} là khối lượng chuẩn nội trong dung dịch đối chiếu (a₁) (định lượng EPA) hoặc trong dung dịch đối chiếu (a₂) (định lượng DHA), tính bằng mg;

$m_{x,r}$ là khối lượng acid eicosapentaenoic ethyl ester chuẩn trong dung dịch đối chiếu (a_1) hoặc acid docosahexaenoic ethyl ester chuẩn trong dung dịch đối chiếu (a_2), tính bằng mg;

A_x là diện tích pic của acid eicosapentaenoic ester hoặc acid docosahexaenoic ester trong sắc ký đồ của dung dịch thử (a);

$A_{x,r}$ là diện tích pic của acid eicosapentaenoic ester trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a_1) hoặc acid docosahexaenoic ester trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a_2);

A_1 là diện tích pic chuẩn nội trong sắc ký đồ của dung dịch thử (a);

$A_{x,3}$ là diện tích pic chuẩn nội trong sắc ký đồ dung của dịch đối chiếu (a_1) (định lượng EPA) hoặc trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (a_2) (định lượng DHA);

C là hệ số chuyển đổi giữa dạng ethyl ester và dạng triglycerid: C = 1,00 đối với ethyl ester; C = 0,954 đối với EPA; C = 0,957 đối với DHA.

Acid omega-3 toàn phần

Xem sắc ký đồ của acid omega-3 toàn phần trong dầu cá trong Hình 10.21.

Từ kết quả định lượng EPA và DHA, tính hàm lượng phần trăm của acid omega-3 toàn phần theo công thức sau:

$$EPA+DHA + \frac{A_{n-3}(EPA+DHA)}{A_{EPA} + A_{DHA}}$$

Trong đó:

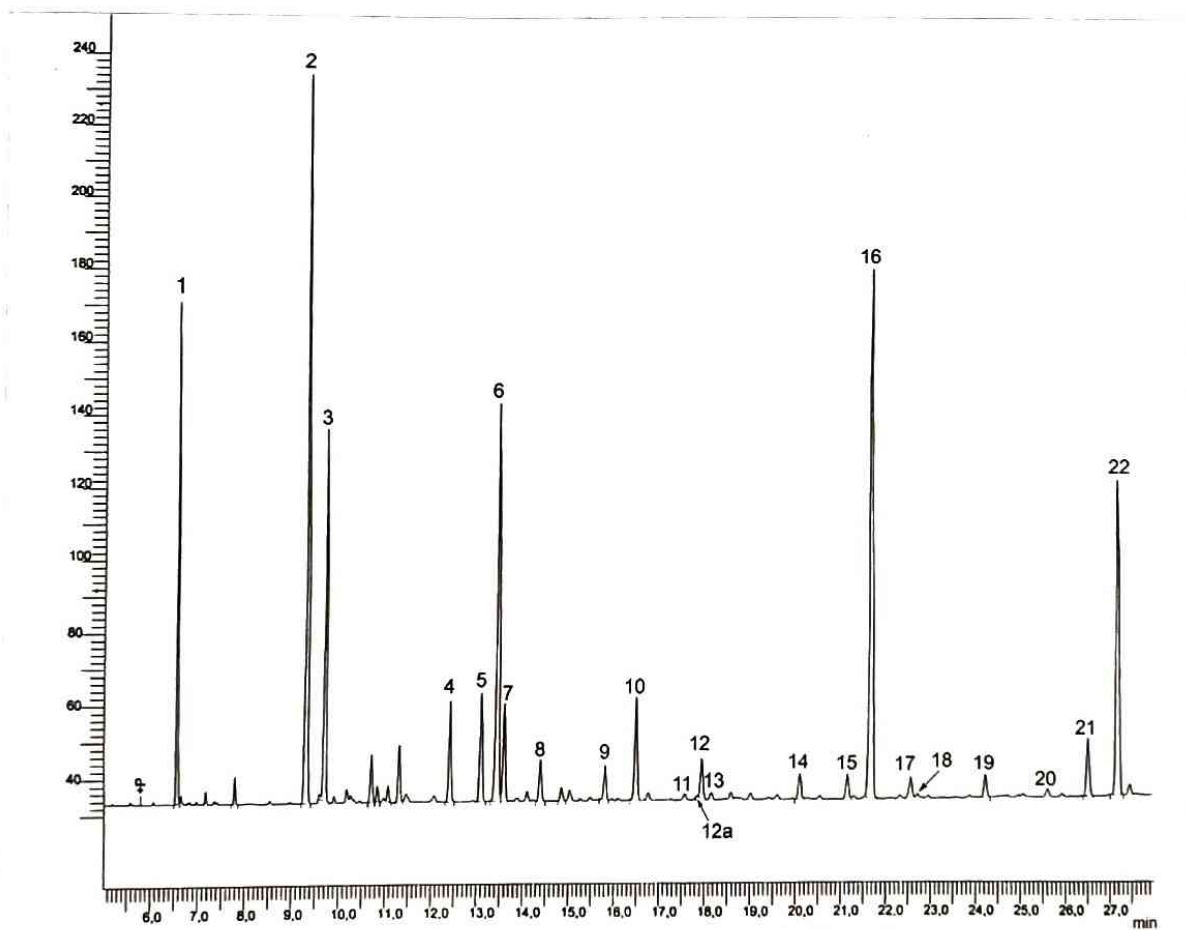
EPA là hàm lượng phần trăm của EPA;

DHA là hàm lượng phần trăm của DHA;

A_{n-3} tổng diện tích của các pic C18:3 n-3, C18:4 n-3, C20:4 n-3, C21:5 n-3 and C22:5 n-3 ester trong sắc ký đồ của dung dịch thử (b);

A_{EPA} là diện tích pic của EPA ester trong sắc ký đồ của dung dịch thử (b);

A_{DHA} là diện tích pic của DHA ester trong sắc ký đồ của dung dịch thử (b).



- | | | | | | | | |
|--------------|--------------|--------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|
| 1. C14:0 | 4. C16:4 n-1 | 7. C18:1 n-7 | 10. C18:4 n-3 | 12a. C20:1 n-11 | 15. C20:4 n-3 | 18. C22:1 n-9 | 21. C22:5 n-3 |
| 2. C16:0 | 5. C18:0 | 8. C18:2 n-6 | 11. C20:0 | 13. C20:1 n-7 | 16. C20:5 n-3 | 19. C21:5 n-3 | 22. C22:6 n-3 |
| 3. C16:1 n-7 | 6. C18:1 n-9 | 9. C18:3 n-3 | 12. C20:1 n-9 | 14. C20:4 n-6 | 17. C22:1 n-11 | 20. C22:5 n-6 | |

Hình 10.21 - Sắc ký đồ định lượng acid omega-3 toàn phần trong dầu cá