

Tính sai số tương đối (theo tỷ lệ phần trăm) về thành phần trong mẫu thử

Áp dụng công thức sau để tính sai số tương đối về thành phần đối với một loại acid amin i:

$$\frac{100m_i}{m_{is}}$$

Trong đó:

$m_i$  là hàm lượng, tính theo nanomol, xác định bằng thực nghiệm, của loại acid amin i có trong mẫu thử;

$m_{is}$  là hàm lượng (tính theo nanomol) đã biết của loại acid amin i có trong mẫu thử.

Giá trị sai số tương đối trung bình về thành phần của mẫu thử là giá trị trung bình của tất cả các sai số tương đối về thành phần tính theo từng loại acid amin riêng rẽ, trừ tryptophan và cystein.

Giá trị sai số tương đối trung bình về thành phần của một mẫu thử cung cấp thông tin quan trọng về độ ổn định của phép phân tích theo thời gian. Sự phù hợp giữa giá trị thành phần acid amin trong mẫu thử, tìm thấy bằng thực nghiệm với giá trị thành phần acid amin đã biết trước của protein đem thử có thể giúp cho việc củng cố kết quả định tính và xác định độ tinh khiết của protein trong mẫu thử.

### 10.12 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ETHANOL

Sử dụng phương pháp 1 hoặc phương pháp 2 trừ khi có chỉ dẫn khác trong chuyên luận riêng.

#### PHƯƠNG PHÁP 1

Tiến hành phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2), sử dụng các dung dịch sau:

*Dung dịch (1):* Dung dịch chứa 5,0 % (tt/tt) ethanol (TT) và 5,0 % (tt/tt) propanol (TT) (chuẩn nội) trong nước.

*Dung dịch (2):* Pha loãng một thể tích chế phẩm thử bằng nước để thu được dung dịch chứa từ 4,0 % đến 6,0 % (tt/tt) ethanol.

*Dung dịch (3):* Chuẩn bị như dung dịch (2) nhưng thêm vừa đủ chất chuẩn nội để thu được nồng độ cuối cùng của chuẩn nội trong dung dịch là 5,0 % (tt/tt).

*Điều kiện sắc ký:*

Có thể áp dụng điều kiện sắc ký như sau:

Cột (1,5 m x 4 mm) được nhồi hạt xốp polymer (100 mesh đến 120 mesh) (Porapak Q hoặc Chromosorb 101 là phù hợp).

Nhiệt độ cột: 150 °C.

Nhiệt độ buồng tiêm và detector: 170 °C.

Tính hàm lượng phần trăm ethanol dựa vào tỷ lệ diện tích pic ethanol so với pic chuẩn nội thu được trên sắc ký đồ của dung dịch (1) và dung dịch (3).

#### PHƯƠNG PHÁP 2

Với những chế phẩm được phép sử dụng cồn công nghiệp có chứa methanol, xác định hàm lượng ethanol giống như phương pháp 1 nhưng chuẩn bị dung dịch (2) bằng cách

pha loãng một thể tích chế phẩm thử với nước để thu được dung dịch có nồng độ tổng cộng của methanol và ethanol từ 4,0 % đến 6,0 % (tt/tt).

Xác định hàm lượng methanol bằng phương pháp sắc ký khí như đã mô tả ở phương pháp 1 nhưng chuẩn bị các dung dịch như sau:

*Dung dịch (1):* Dung dịch chứa 0,25 % (tt/tt) methanol (TT) và 0,25 % (tt/tt) propanol (TT) (chuẩn nội) trong nước.

*Dung dịch (2):* Pha loãng một thể tích chế phẩm thử bằng nước để thu được dung dịch chứa từ 0,2 % đến 0,3 % (tt/tt) methanol.

*Dung dịch (3):* Chuẩn bị như dung dịch (2) nhưng thêm vừa đủ chất chuẩn nội để thu được nồng độ cuối cùng của chuẩn nội trong dung dịch này là 0,25 %.

Tổng lượng ethanol và methanol phải ở trong giới hạn quy định cho phép và tỷ số giữa lượng methanol và lượng ethanol tìm được phải tương ứng với tỷ lệ này của cồn công nghiệp có chứa methanol đã sử dụng.

#### PHƯƠNG PHÁP 3

Phương pháp này dùng cho những chế phẩm và các nguyên liệu dạng lỏng chứa ethanol.

Hàm lượng ethanol có trong một chất lỏng được biểu thị bằng số thể tích ethanol trong 100 thể tích chất lỏng đó ở 20 °C ± 0,1 °C và được hiểu là phần trăm ethanol tính theo thể tích/thể tích (tt/tt).

Hàm lượng cũng có thể được biểu thị bằng gam ethanol trong 100 g chất lỏng và được hiểu là phần trăm ethanol tính theo khối lượng/khối lượng (kl/kl).

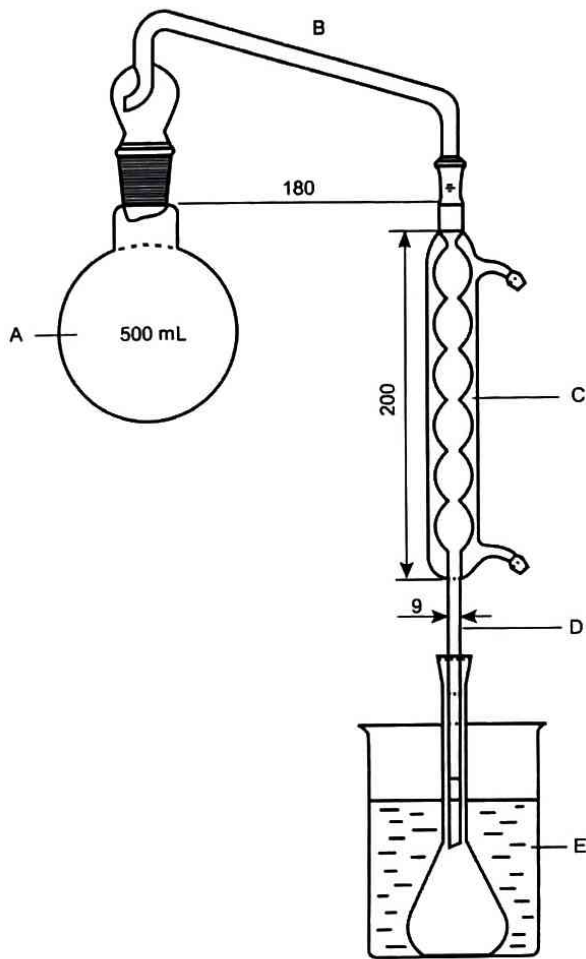
#### Phương pháp A

Phương pháp này dùng cho những chế phẩm có chứa các chất tan có khả năng phân tách khỏi ethanol khi chưng cất. Khi cất, nếu trong mẫu thử ngoài ethanol và nước còn có lẫn các chất bay hơi khác thì hướng dẫn thích hợp sẽ được quy định trong chuyên luận riêng.

Liên quan giữa tỷ trọng ở 20 °C ± 0,1 °C, tỷ trọng tương đối (đã hiệu chỉnh ở chân không) và hàm lượng ethanol của hỗn hợp nước và ethanol được ghi trong Bảng 10.12 - Liên quan giữa tỷ trọng, tỷ trọng tương đối và hàm lượng ethanol (Tham khảo theo Khuyến cáo Quốc tế số 22, Tổ chức Quốc tế về Đo lường hợp pháp (1972)).

#### Thiết bị

Thiết bị (Hình 10.12) bao gồm một bình cầu thủy tinh đáy tròn (A) gắn với một đầu cất có bộ phận bẫy hơi (B), bộ phận này được nối với một ống sinh hàn (C) đặt thẳng đứng. Tiếp theo là một ống dẫn (D) gắn vào phần dưới của ống sinh hàn để dẫn dịch cất vào bình hứng (là bình định mức dung tích 100 ml hoặc 250 ml). Trong suốt quá trình cất, bình hứng này được nhúng trong cốc (E) chứa hỗn hợp đá và nước đá. Một miếng lót đường kính 6 cm đặt dưới bình cất (A) để bảo vệ mẫu không bị cháy.



Hình 10.12 - Dụng cụ để xác định hàm lượng ethanol  
(Kích thước tính bằng mm)

**Xác định bằng picnomet (Phụ lục 6.5)**

Đong chính xác 25,0 ml chế phẩm ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  chuyển vào bình cất. Thêm 100 ml đến 150 ml nước cất và vài hạt đá bọt. Lắp hệ thống chung cất. Chung cất và hứng ít nhất 90 ml dịch cất vào bình định mức 100 ml. Điều chỉnh nhiệt độ dịch cất tới  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pha loãng thành 100 ml bằng nước cất ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Xác định tỷ trọng tương đối ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  bằng picnomet.

Hàm lượng ethanol tính theo phần trăm tt/tt gấp 4 lần trị số chỉ ra trong cột 3 ở Bảng 10.12 - Liên quan giữa tỷ trọng, tỷ trọng tương đối và hàm lượng ethanol. Biểu thị kết quả với một chữ số ở phần thập phân.

**Xác định bằng tỷ trọng kế (Phụ lục 6.5)**

Đong chính xác 50,0 ml chế phẩm ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  chuyển vào bình cất. Thêm 200 ml đến 250 ml nước cất và vài hạt đá bọt. Lắp hệ thống chung cất. Chung cất và hứng ít nhất 180 ml dịch cất vào bình định mức 250 ml. Điều chỉnh nhiệt độ dịch cất tới  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; pha loãng thành 250 ml bằng nước cất ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Chuyển dịch cất vào một ống đong hình trụ có đường kính lớn hơn đường kính bầu của tỷ trọng kế ít nhất 6 mm. Nếu thể tích dịch cất không đủ, tăng gấp đôi lượng chế phẩm thử và pha loãng dịch cất thành 500,0 ml bằng nước cất ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Hàm lượng ethanol tính theo phần trăm tt/tt gấp 5 lần trị số chỉ ra trong cột 3 ở Bảng 10.12 - Liên quan giữa tỷ trọng, tỷ trọng tương đối và hàm lượng ethanol. Biểu thị kết quả với một chữ số ở phần thập phân.

Bảng 10.12 - Liên quan giữa tỷ trọng, tỷ trọng tương đối và hàm lượng ethanol

$\rho_{20}$ ( $\text{kg.m}^{-3}$ )	Tỷ trọng tương đối của dịch cất đo trong không khí ở $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ( $d_{20}^{20}$ )	Hàm lượng ethanol tính theo % (tt/tt) ở $20\text{ }^{\circ}\text{C}$	$\rho_{20}$ ( $\text{kg.m}^{-3}$ )	Tỷ trọng tương đối của dịch cất đo trong không khí ở $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ( $d_{20}^{20}$ )	Hàm lượng ethanol tính theo % (tt/tt) ở $20\text{ }^{\circ}\text{C}$
1	2	3	1	2	3
968,0	0,9697	25,09	983,5	0,9853	11,02
968,5	0,9702	24,64	984,0	0,9858	10,60
969,0	0,9707	24,19	984,5	0,9863	10,18
969,5	0,9712	23,74	985,0	0,9868	9,76
970,0	0,9717	23,29	985,5	0,9873	9,35
970,5	0,9722	22,83	986,0	0,9878	8,94
971,0	0,9727	22,37	986,5	0,9883	8,53
971,5	0,9733	21,91	987,0	0,9888	8,13
972,0	0,9738	21,45	987,5	0,9893	7,73
972,5	0,9743	20,98	988,0	0,9898	7,34
973,0	0,9748	20,52	988,5	0,9903	6,95
973,5	0,9753	20,05	989,0	0,9908	6,56
974,0	0,9758	19,59	989,5	0,9913	6,17
974,5	0,9763	19,12	990,0	0,9918	5,79
975,0	0,9768	18,66	990,5	0,9923	5,42

$\rho_{20}$ (kg.m <sup>-3</sup> )	Tỷ trọng tương đối của dịch cất đo trong không khí ở 20 °C ( $d_{20}^{20}$ )	Hàm lượng ethanol tính theo % (tt/tt) ở 20 °C	$\rho_{20}$ (kg.m <sup>-3</sup> )	Tỷ trọng tương đối của dịch cất đo trong không khí ở 20 °C ( $d_{20}^{20}$ )	Hàm lượng ethanol tính theo % (tt/tt) ở 20 °C
975,5	0,9773	18,19	991,0	0,9928	5,04
976,0	0,9778	17,73	991,5	0,9933	4,67
976,5	0,9783	17,25	992,0	0,9938	4,30
977,0	0,9788	16,80	992,5	0,9943	3,94
977,5	0,9793	16,34	993,0	0,9948	3,58
978,0	0,9798	15,88	993,5	0,9953	3,22
978,5	0,9803	15,43	994,0	0,9958	2,86
979,0	0,9808	14,97	994,5	0,9963	2,51
979,5	0,9813	14,52	995,0	0,9968	2,16
980,0	0,9818	14,07	995,5	0,9973	1,82
980,5	0,9823	13,63	996,0	0,9978	1,47
981,0	0,9828	13,18	996,5	0,9983	1,13
981,5	0,9833	12,74	997,0	0,9988	0,80
982,0	0,9838	12,31	997,5	0,9993	0,46
982,5	0,9843	11,87	998,0	0,9998	0,13
983,0	0,9848	11,44			

**Phương pháp B**

Phương pháp sắc ký khí tiêm pha hơi (head-space) (Phụ lục 5.2).

*Dung dịch chuẩn nội:* Pha loãng 1,0 ml *propanol* (TT) thành 100,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch thử:* Pha loãng một thể tích thích hợp mẫu thử có chứa 0,4 g ethanol thành 50,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 20,0 ml bằng *nước*. Lấy 2,0 ml dung dịch thu được, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*. Chuyển 2,0 ml dung dịch thu được vào lọ tiêm mẫu.

*Dung dịch đối chiếu (1):* Pha loãng 5,0 ml *ethanol* (TT) thành 100,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 25,0 ml dung dịch thu được thành 100,0 ml bằng *nước*. Tiếp tục pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch đối chiếu (2):* Trộn đều 0,5 ml dung dịch đối chiếu (1) và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*. Chuyển 2,0 ml dung dịch thu được vào lọ tiêm mẫu.

*Dung dịch đối chiếu (3):* Trộn đều 1,0 ml dung dịch đối chiếu (1) và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*. Chuyển 2,0 ml dung dịch thu được vào lọ tiêm mẫu.

*Dung dịch đối chiếu (4):* Trộn đều 1,5 ml dung dịch đối chiếu (1) và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*. Chuyển 2,0 ml dung dịch thu được vào lọ tiêm mẫu.

*Dung dịch đối chiếu (5):* Pha loãng 1,0 ml *methanol* (TT) thành 100,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch đối chiếu (6):* Trộn đều 1,0 ml dung dịch chuẩn nội, 2,0 ml dung dịch đối chiếu (1) và 2,0 ml dung dịch đối chiếu (5) và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*. Chuyển 2,0 ml dung dịch thu được vào lọ tiêm mẫu.

(*Chú ý:* Đậy ngay các lọ tiêm mẫu bằng nút cao su phủ *polytetrafluoroetylen* và cố định bằng nắp nhôm)

*Điều kiện sắc ký:*

Cột silica nung chảy (30 m × 0,53 mm) được phủ pha tinh *cyanopropyl(3)phenyl(3)methyl(94)polysiloxan* (độ dày phim 3 μm).

Khí mang: *Heli* dùng cho sắc ký.

Tỷ lệ chia dòng: 1 : 50.

Tốc độ dòng: 3 ml/min.

Điều kiện tiêm pha hơi tinh như sau: nhiệt độ cân bằng 85 °C, thời gian cân bằng 20 min.

Nhiệt độ:

	Thời gian (min)	Nhiệt độ (°C)
Cột	0 - 1,6	40
	1,6 - 9,9	40 → 65
	9,9 - 13,6	65 → 175
	13,6 - 20	175
Buồng tiêm		200
Detector		200

Detector ion hóa ngọn lửa.

Thể tích tiêm: 1,0 ml pha hơi của các dung dịch thử, dung dịch đối chiếu (2), (3), (4) và (6), mỗi dung dịch ít nhất 3 lần.

Thứ tự rửa giải: *Methanol*, *ethanol*, *propanol*.

Thời gian lưu tương đối so với ethanol (thời gian lưu khoảng 5,3 min): methanol khoảng 0,8, propanol khoảng 1,6.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (6), độ phân giải giữa pic methanol và pic ethanol ít nhất là 5.

Lập đường chuẩn với trục hoành là nồng độ ethanol trong các dung dịch đối chiếu (2), (3), (4) và (6) và trục tung là tỷ lệ trung bình giữa diện tích pic ethanol với diện tích pic chuẩn nội trong sắc ký đồ của các dung dịch đối chiếu tương ứng.

Tính hàm lượng phần trăm của ethanol trong chế phẩm cần kiểm tra dựa vào đường chuẩn lập được.

**Phương pháp C**

Phương pháp sắc ký khí (Phụ lục 5.2).

*Dung dịch chuẩn nội:* Pha loãng 1,0 ml *propanol* (TT<sub>1</sub>) thành 100,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch thử:* Pha loãng một thể tích thích hợp mẫu thử có chứa 1 g ethanol thành 50,0 ml bằng *nước*. Lấy 1,0 ml dung dịch thu được, thêm 1,0 ml dung dịch chuẩn nội và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch đối chiếu (1):* Pha loãng 1,0 ml *ethanol* (TT) thành 50,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch đối chiếu (2):* Pha loãng 1,0 ml *methanol* (TT<sub>2</sub>) thành 100,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch đối chiếu (3):* Trộn đều 1,0 ml dung dịch chuẩn nội, 1,0 ml dung dịch đối chiếu (1) và 2,0 ml dung dịch đối chiếu (2) và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Điều kiện sắc ký:*

Cột silica nung chảy (30 m × 0,53 mm) được phủ pha tĩnh *cyanopropyl(3)phenyl(3)methyl(94)polysiloxan* (độ dày phim 3 μm).

Khí mang: *Heli* dùng cho sắc ký.

Tỷ lệ chia dòng: 1 : 50.

Tốc độ dòng: 3 ml/min.

Nhiệt độ:

	Thời gian (min)	Nhiệt độ (°C)
Cột	0 - 1,6	40
	1,6 - 9,9	40 → 65
	9,9 - 13,6	65 → 175
	13,6 - 20	175
Buồng tiêm		200
Detector		200

Detector ion hóa ngọn lửa.

Thể tích tiêm: 1,0 μl dung dịch thử, dung dịch đối chiếu (3), mỗi dung dịch ít nhất 3 lần.

Thứ tự rửa giải: methanol, ethanol, propanol.

Thời gian lưu tương đối so với ethanol (thời gian lưu khoảng 5,3 min): methanol khoảng 0,8, propanol khoảng 1,6.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (3), độ phân giải giữa pic methanol và pic ethanol ít nhất là 5.

Tính hàm lượng phần trăm ethanol (tt/tt) có trong chế phẩm thử theo công thức sau:

$$\frac{A_1 \times I_2 \times 100}{A_2 \times I_1 \times V_1}$$

Trong đó:

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> lần lượt là diện tích pic ethanol thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (3);

I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> lần lượt là diện tích pic chuẩn nội thu được trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (3);

V<sub>1</sub> là thể tích của mẫu thử trong dung dịch thử (ml).

**10.13 XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG METHANOL VÀ PROPAN-2-OL**

**Phương pháp A**

Phương pháp sắc ký khí tiêm pha hơi (head-space) (Phụ lục 5.2).

*Dung dịch chuẩn nội:* Pha loãng 1,0 ml *propanol* (TT<sub>1</sub>) thành 100,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch thử:* Trộn đều 1,0 ml dung dịch chuẩn nội và 4,0 ml mẫu thử và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*. Chuyển 2,0 ml dung dịch thu được vào lọ tiêm mẫu.

*Dung dịch đối chiếu (1):* Trộn đều 1,0 ml *methanol* (TT<sub>2</sub>) và 1,0 ml *propan-2-ol* (TT<sub>2</sub>) và pha loãng thành 100,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch đối chiếu (2):* Pha loãng 5,0 ml *ethanol* (TT) thành 100,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 25,0 ml dung dịch thu được thành 100,0 ml bằng *nước*. Pha loãng 1,0 ml dung dịch thu được thành 20,0 ml bằng *nước*.

*Dung dịch đối chiếu (3):* Trộn đều 1,0 ml dung dịch chuẩn nội, 2,0 ml dung dịch đối chiếu (1) và 2,0 ml dung dịch đối chiếu (2) và pha loãng thành 20,0 ml bằng *nước*. Chuyển 2,0 ml dung dịch thu được vào lọ tiêm mẫu.

(*chú ý:* Đậy ngay các lọ tiêm mẫu bằng nút cao su phủ *polytetrafluoroetylen* và cố định bằng nắp nhôm)

*Điều kiện sắc ký:*

Cột silica nung chảy (30 m × 0,53 mm) được phủ pha tĩnh *cyanopropyl(3)phenyl(3)methyl(94) polysiloxan* (độ dày phim 3 μm).

Khí mang: *Heli* dùng cho sắc ký.

Tỷ lệ chia dòng: 1 : 50.

Tốc độ dòng: 3 ml/min.

Điều kiện tiêm pha hơi tĩnh như sau: nhiệt độ cân bằng 85 °C, thời gian cân bằng 20 min.

Nhiệt độ: