

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Ngọc Hưng

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ AXÍT BÉO TRONG DẦU GẮC
BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ KHÍ

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội – 2010

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Ngọc Hưng

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ AXÍT BÉO TRONG DẦU GẮC
BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ KHÍ

Chuyên ngành: Hóa phân tích

Mã số: 60 44 29

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

PGS. TS. Phạm Luận

Hà Nội - 2010

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	2
1.1. Cây Gấc và dầu Gấc	2
1.1.1. Cây Gấc.....	2
1.1.2. Dầu Gấc	3
1.2. Tổng quan về axit béo không no	5
1.2.1. Axit linoleic	5
1.2.2. Axit oleic	7
1.3. Các phương pháp phân tích axit béo.....	8
1.3.1. Các phương pháp chung	8
1.3.2. Các phương pháp sắc ký	12
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24
2.1. Đối tượng, mục tiêu và nhiệm vụ nghiên cứu	24
2.1.1. Đối tượng và mục tiêu nghiên cứu.....	24
2.1.2. Nhiệm vụ nghiên cứu.....	25
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	26
2.2.1. Phương pháp sắc ký khí.....	26
2.2.2. Định lượng các axit béo bằng GC – FID	32
2.2.3. Phương pháp xử lý và đánh giá kết quả.....	33
2.3. Hóa chất và dụng cụ.....	34
2.3.1. Hóa chất	34
2.3.2. Dụng cụ	35
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	36
3.1. Khảo sát các điều kiện sắc ký tối ưu đối với việc phân tích các axit béo	36
3.1.1. Lựa chọn cột tách.....	36
3.1.2. Khảo sát chương trình nhiệt độ cột tách	36
3.1.3. Khảo sát tốc độ khí mang	39
3.1.4. Khảo sát thể tích bơm mẫu	41
3.1.5. Tổng kết điều kiện chạy sắc ký.....	43
3.2. Tối ưu hóa quá trình methyl este hóa	43
3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích NaOH/MeOH 0,5M.....	43
3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích BF ₃ /MeOH 20%	46
3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng thời gian este hóa	48
3.2.4. Quy trình chuẩn bị mẫu chuẩn hỗn hợp.....	51
3.3. Xây dựng phương pháp định lượng hỗn hợp hai axit béo	51
3.3.1. Khảo sát giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng	51
3.3.2. Khảo sát khoảng tuyến tính	53
3.3.3. Khảo sát độ lặp lại của phép đo	56
3.4. Ứng dụng qui trình phân tích các mẫu dầu Gấc	57
3.4.1. Xử lý sơ bộ mẫu phân tích	57
3.4.2. Phân tích mẫu thật	58
KẾT LUẬN.....	64
TÀI LIỆU THAM KHẢO	67

MỞ ĐẦU

Từ xa xưa, ông cha ta đã biết sử dụng các cây cỏ trong thiên nhiên để làm thuốc cũng như các chế phẩm sinh học nhằm tăng cường và bảo vệ sức khỏe của mình. Nước Việt Nam nằm trong khu vực nhiệt đới, gió mùa, thuận tiện cho nhiều loại thảo dược phát triển, trong đó có cây Gấc. Các bộ phận của Gấc có nhiều công năng khác nhau, trong đó dầu Gấc đã được chiết xuất để dùng như một loại thực phẩm chức năng nhằm tăng cường sức đề kháng, chống lão hóa tế bào, cung cấp vitamin, ... cho cơ thể.

Dầu Gấc có chứa nhiều nhiều chất bổ dưỡng, trong đó có các axit béo no và không no mà vai trò của các axit béo không no là quan trọng hơn cả. Hiện nay đã có nhiều phương pháp phân tích các axit béo không no với nhiều kỹ thuật khác nhau, tuy nhiên khi áp dụng trong dầu Gấc thì có rất ít công trình công bố một cách tỉ mỉ và chi tiết.

Để đóng góp thêm phương pháp phân tích cho đối tượng này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu các điều kiện tách cũng như xác định đồng thời hai axit béo không no có hàm lượng cao trong dầu Gấc là axit oleic và axit linoleic bằng phương pháp sắc ký khí (GC) sử dụng detector FID.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Cây Gấc và dầu Gấc

1.1.1. Cây Gấc

Gấc có tên khoa học là *Momordica cochinchinesis* (Lour.) Spreng, họ Bí (Cucurbitaceae) bộ Violales. Gấc còn có tên khác là *Muricia cochinchinensis* Lour., *Momordica macrophylla* Gage, *Momordica mixta* Roxburgh.

Ở một số nước, Gấc được gọi là: Mộc Miết (Trung Quốc), Spiny bitter-cucumber, Chinese bitter-cucumber, Chinese cucumber (Anh), Margones à piquants (Pháp), Makkao (Khơ me) [1,5].

1.1.1.1. Đặc điểm thực vật

Gấc là loài cây thân thảo dây leo thuộc chi Mướp đắng. Cây gấc leo khòe, chiều dài có thể đến 15m. Thân dây có tiết diện góc. Lá gấc nhẵn, thù hình chân vịt phân ra từ 3 đến 5 dẻ, dài 8-18 cm. Gấc là loài đơn tính khác gốc (*dioecious*). Hoa sắc vàng. Quả hình tròn, sắc xanh, khi chín chuyển sang màu đỏ cam, đường kính 15-20 cm. Vỏ gấc có gai rậm. Bỏ ra mỗi quả thường có sáu múi. Thịt gấc màu đỏ cam. Hạt gấc màu nâu thẫm, hình dẹp, có khía. Gấc trổ hoa mùa hè sang mùa thu, đến mùa đông mới chín. Mỗi năm gấc chỉ thu hoạch được một mùa. Do vụ thu hoạch tương đối ngắn (vào khoảng tháng 12 hay tháng 1), nên gấc ít phổ biến hơn các loại quả khác.

1.1.1.2. Thu hái

Quả Gấc chín hái về, đem bỏ ngang, vét hạt với cả màng đỏ. Nếu để nấu xôi thì dùng hạt với cả màng đỏ trộn với gạo (có thể thêm ít rượu). Nếu để chế dầu thì phải phơi hay sấy khô hạt tới khi không còn dính tay. Bóc lấy lớp màng hạt rồi lại phơi hay sấy khô ở nhiệt độ thấp (60 – 70°C).

1.1.1.3. Công dụng của các bộ phận

Hạt Gấc (Semen Momordicae) thường được gọi là Mộc miết tử là hạt lấy ở quả Gấc chín đã bóc vỏ màng và chế biến khô, đã được ghi vào Dược điển Việt Nam (1983) và Dược điển Trung Quốc (1963, 2000).

Dầu Gấc (Oleum Momordicae) ép từ màng đỏ bao xung quanh hạt đã phơi hay sấy khô và đã được ghi vào Dược điển Việt Nam I (1971).

Rễ Gấc (Radix Momordicae) còn gọi là Phòng kỳ nam là rễ cây Gấc thu hái vào mùa đông đã phơi khô.

1.1.2. Dầu Gấc

1.1.2.1. Các phương pháp sản xuất

Muốn chế dầu Gấc, trước hết sấy khô màng hạt Gấc, sau đó tán nhỏ rồi áp dụng một trong các phương pháp sau [3]:

- Chiết bằng dung môi ete dầu hỏa: Lấy kiệt bằng dung môi ete dầu hỏa, sau đó thu hồi ete dầu hỏa bằng cách đun cách thủy trong môi trường khí trơ, cặn còn lại là dầu Gấc.

- Ép: Màng đỏ đã sấy khô, tán nhỏ đem đồ lên rồi ép.

- Phương pháp thủ công nghiệp: Màng hạt Gấc đã sấy khô tán nhỏ cho vào chảo dầu lạc hay mỡ lợn đã đun nóng ở nhiệt độ 60 – 70⁰C. Dầu lạc hay mỡ lợn sẽ hòa tan chất dầu chứa trong màng dầu Gấc.

Dầu Gấc sau đó được bảo quản trong chai màu nâu, đóng đầy, nút kín.

1.1.2.2. Tính chất lý hóa

- Dầu Gấc là chất lỏng, sánh, trong, màu đỏ máu, mùi thơm ngọt đặc biệt, vị béo, không khé cổ. Nếu để lâu hoặc ở nhiệt độ 0 – 5⁰C xuất hiện cặn, cặn đó là các tinh thể carotenoid.
- Độ hòa tan: Dễ tan trong ete dầu hỏa, cloroform và ete.
- Tỷ trọng: D = 0,9151 – 0,9156 g/cm³ ở 15⁰C.

- Chỉ số khúc xạ: 1,4681 – 1,4685 [2].
- Thành phần hóa học: 100g dầu này có 150 - 175mg β - caroten, khoảng 4g lycopene và 12mg alpha tocopherol (vitamin E thiên nhiên). Axít panmitic (33,4%), axít stearic (7,9%), đặc biệt là các axít không no như axít oleic (44%) và axít linoleic (14,7%) là hai axít béo rất cần thiết cho cơ thể. Dầu Gấc cũng còn chứa các vi lượng cần thiết như: sắt, đồng, coban, kali và kẽm ...[1,5].

1.1.2.3. Tác dụng sinh học và công dụng

Khi vào cơ thể, β - caroten (chất tiền vitamin A) sẽ được chuyển hoá thành vitamin A tùy theo nhu cầu, vì vậy khi dùng dầu gấc, không có hiện tượng thừa vitamin A. Hàm lượng vitamin A trong dầu gấc cao gấp 1,8 lần so với dầu gan cá thu, gấp 15 lần so với củ cà rốt và gấp 68 lần so với quả cà chua. Đây là nguồn vitamin A thiên nhiên rất quý giá, có tác dụng phòng ngừa và chữa bệnh thiếu vitamin A, là nguyên nhân gây khô giác mạc mắt, bệnh quáng gà, suy dinh dưỡng và chậm lớn ở trẻ em. Các thuốc vitamin A trên thị trường là chất tổng hợp, nếu uống quá nhiều sẽ có hại, đặc biệt gây nguy cơ gãy xương háng ở phụ nữ. Nếu không có chỉ định của thầy thuốc thì không nên uống trực tiếp vitamin A mà cần thay thế bằng các loại thức ăn có chất β - caroten thiên nhiên là nguồn cung cấp vitamin A giúp cơ thể dễ hấp thụ an toàn và không độc hại cho gan.

Dầu gấc còn có hàm lượng lycopene rất cao nên có tác dụng làm giảm nguy cơ ung thư (nhất là ung thư tuyến tiền liệt và ung thư dạ dày). β - caroten và lycopene là các chất carotenoid, loại chất chống oxy hoá của thực vật có tác dụng dọn sạch các gốc tự do (các nguyên tử và phân tử ở trạng thái không ổn định, có hoạt tính hoá học rất cao) và các sản phẩm oxy hoá độc hại do các gốc tự do sinh ra, giúp cơ thể khoẻ mạnh và kéo dài tuổi thanh xuân. Có thể ví chất carotenoid như cái chổi quét rác trong cơ thể có nhiệm vụ "quét

dộn" thường xuyên các sản phẩm oxy hoá không những làm cho cơ thể bị già nhanh, mà nó còn tham gia gây nhiều bệnh hiểm nghèo như xơ vữa động mạch, thoái hoá thần kinh, đục thủy tinh thể mắt, bệnh Alzheimer, viêm nhiễm, ung thư...

Dầu gấc còn có tác dụng phòng ngừa và điều trị bệnh viêm gan, xơ gan hoặc nguy cơ phát triển ung thư gan, loại trừ độc hại cho người làm việc trong môi trường có chất độc. Gần đây, nhiều công trình nghiên cứu chỉ ra rằng β - caroten, lycopene và alpha - tocopherol trong dầu gấc có khả năng làm mất tác dụng của 75% những chất gây bệnh ung thư nói chung, đặc biệt ung thư vú. Nó được dùng cho bệnh nhân bị ung thư sau khi cắt bỏ khối u, sau hoá trị và xạ trị. Axít linoleic trong dầu gấc là một vitamin F, có ảnh hưởng đến chuyển hoá các lipid, phospholipid, giúp cơ thể thải bớt cholesterol chống nhiễm mỡ và làm vững bền thành mạch máu. Nó cũng có tác dụng bảo vệ da và tăng sức chống đỡ của cơ thể.

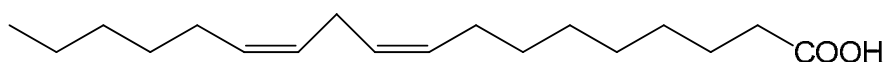
Dầu gấc còn kích thích sinh ra lớp mô mới, làm cho vết thương mau lành, để chữa các vết bỏng, loét và nứt kẽ vú ... [4].

1.2. Tổng quan về axít béo không no

Dầu Gấc chứa nhiều các axít béo no và không no, trong đó có các axít không no oleic (ω_9) và linoleic (ω_6) là nhiều hơn cả. Đây là các axít quan trọng nhất vì nó cần thiết cho sự phát triển của cơ thể con người. Các axít này cũng được gọi là các vitamin F [7],[12],[30].

1.2.1. Axít linoleic

- Công thức cấu tạo



- Tên IUPAC: axit (9Z, 12Z) – octadeca – 9,12 – dienoic.
- Công thức phân tử : $C_{18}H_{32}O_2$.
- Khối lượng phân tử: $280,45 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Tỷ khối: $0,9 \text{ g.cm}^{-3}$.
- Điểm nóng chảy: $- 5^{\circ}\text{C}$.
- Điểm sôi: 229°C .
- Độ tan trong metanol : $903,05 \text{ g.l}^{-1}$.
- Tên khác: Omega 6.
- Tác dụng:

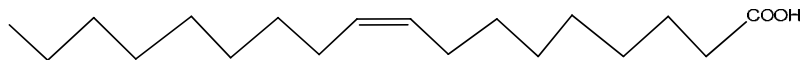
Axit linoleic là một axit béo không no nhiều lần được sử dụng để sinh tổng hợp axit arachidonic và sau đó là prostaglandin. Axit linoleic nằm trong nhóm các axit béo cần thiết gọi là các vitamin F mà cơ thể chúng ta không tổng hợp được [18].

Nó được tìm thấy trong lipid của màng tế bào. Nó cũng có nhiều trong dầu thực vật của các loại hạt cây anh túc, hoa hướng dương và tinh dầu ngô với trên 50% khối lượng.

Sự thiếu hụt axit linoleic sẽ dẫn đến hiện tượng khô và rụng tóc [14] khả năng lành vết thương kém [27].

1.2.2. Axít oleic

- Công thức cấu tạo



- Tên IUPAC: axít (9Z) – octadec – 9 – enoic.
- Công thức phân tử : $C_{18}H_{34}O_2$.
- Khối lượng phân tử: $282,4614 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Tỷ khối: $0,895 \text{ g.cm}^{-3}$.
- Điểm nóng chảy: 14°C .
- Điểm sôi: 360°C .
- Tên khác: Omega 9.
- Tác dụng:

Axít béo cần cho sự phát triển bình thường và giúp cho màng tế bào khỏe mạnh, cân bằng lượng hormon và hệ thống miễn dịch.

Axít béo cần thiết cho việc tổng hợp các mô mỡ, giữ vai trò quan trọng trong việc cân bằng mức cholesterol, điều chỉnh mức protagladin, hormon.

Với da, axít béo cung cấp chất dinh dưỡng, làm cho tóc và da óng mượt, khỏe mạnh. Nó cũng có vai trò trong quá trình tổng hợp hormon adrenalin và hormon sinh dục. Axít béo no cũng có tác dụng kích thích hệ vi khuẩn có ích trong ruột. Phù cũng một phần do thiếu các axít béo. Axít béo có lợi cho bệnh viêm khớp, chúng giúp việc vận chuyển dẫn truyền thần kinh. Nếu thiếu axít béo có thể dẫn đến kém thông minh và ảnh hưởng đến trí nhớ [14].

1.3. Các phương pháp phân tích axit béo

1.3.1. Các phương pháp chung

Các phương pháp chung thông thường dùng để xác định tổng các axit béo chứ không thể xác định được các axit riêng rẽ. Có thể chia chúng thành các phương pháp sau đây:

1.3.1.1. Phương pháp chuẩn độ hóa học

Phương pháp chuẩn độ hóa học dùng để xác định các axit béo với nồng độ bằng hoặc lớn hơn 1mM. Phương pháp này thường dùng để xác định chỉ số axit trong dầu thực vật và chất béo.

Phương pháp chuẩn độ hóa học được thực hiện theo qui trình sau:

Cân 0,1 đến 10 gam dầu hay chất béo, sau đó hòa tan và định mức bằng hỗn hợp dung môi, etanol 95% và dietylete với tỉ lệ thể tích là 1:1, đến 50ml. Dung dịch sau phản ứng được chuẩn độ bằng dung dịch KOH 0,1M trong metanol với chỉ thị là phenolphatalein.

Chỉ số axit được qui ra bằng số mg KOH dùng để trung hòa axit béo tự do có trong 1 gam chất béo.

Vào năm 2005, Bahruddin Saad và các cộng sự đã kết hợp phương pháp tiêm dòng chảy và phương pháp chuẩn độ khi xác định các axit béo tự do có trong dầu cọ. Hệ thống 1 kênh và 2 kênh thuốc thử đã được khảo sát với các thuốc thử lần lượt là phenolphatalein và bromthymol xanh. Phương pháp trên cho thời gian phân tích khá nhanh với số lượng là 35 – 74 và 21 – 46 mẫu / giờ đối với hệ thống 1 và 2 kênh. 50 mẫu dầu cọ đã được khảo sát và được so sánh với phương pháp PORIM, kết quả cho thấy 2 phương pháp có độ tương quan cao ($R^2 = 0,92$). Mặt khác, phương pháp trên không bị ảnh

hường của màu nền của mẫu khi phổ hấp thụ UV-VIS chỉ ra rằng độ hấp thụ của mẫu là cực tiểu tại bước sóng phát hiện của phenolphthalein (562 nm) và bromthymol xanh (627 nm) [11].

1.3.1.2. Phương pháp chuẩn độ đo nhiệt (trong môi trường không nước)

Phương pháp chuẩn độ đo nhiệt dựa trên kỹ thuật CETT, Catalyzed Endpoint Thermometric Titrimetry [29]. Kỹ thuật này tương tự như chuẩn độ hóa học thông thường nhưng lượng dư ion OH^- sau khi trung hòa các axit béo trong mẫu được dùng làm xúc tác cho một phản ứng tỏa nhiệt mạnh giữa các cấu tử trong hỗn hợp dung môi (axeton và clorofom, 25/2, v/v) dùng để hòa tan mẫu các chất béo hay mẫu dầu.

Phương pháp sử dụng một đầu đo nhiệt độ đơn giản và cho kết quả phân tích nhanh khi được tự động hóa. Thời gian phân tích thường chỉ mất từ 1 – 3 phút với độ chính xác cao. Ngoài ra đầu dò nhiệt không cần phải chuẩn hóa trước khi đo, thí nghiệm tiến hành ở điều kiện thường cũng là một thuận lợi của phương pháp.

1.3.1.3. Phương pháp đo dựa vào sự tạo phức của axit béo và kim loại

Dựa vào sự tạo phức của các axit béo và một số ion kim loại (Cu^{2+} , Co^{2+}) người ta đã phát triển phương pháp đo quang để xác định chúng. Tuy nhiên, các phương pháp trên có độ nhạy kém và thời gian phân tích lâu.

Để cải tiến độ nhạy của phương pháp này, Ho R.J. [19] và các cộng sự đã sử dụng phương pháp phóng xạ để phân tích phức của axit béo và ^{60}Co . Mẫu axit béo sau khi được hòa tan trong dung môi n-hexan được thêm vào thuốc thử $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ và $^{60}\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ trong dung môi n-hexan và clorofom. Sau khi ly tâm, hỗn hợp sau phản ứng tách lớp; phần phức của axit béo và kim

loại được chiết ra ở pha hữu cơ đem đi đo hoạt độ phóng xạ. Kết quả được so sánh với dung dịch chuẩn gốc của các axit béo.

Vào năm 2005, Marta Bernárdez [26] và các cộng sự đã biến đổi phương pháp Lowry khi phân tích các axit béo tự do trong thịt cá. Ông đã thay thế dung môi benzen bằng dung môi ít độc hơn là xiclohexan. Mẫu chất béo làm khô được hòa tan trong 3 ml xiclohexan và trộn lẫn với 1 ml thuốc thử đồng axetat – pyridin. Sau khi lắc đều và li tâm, lớp trên của hỗn hợp được chiết ra và đem đo quang ở bước sóng 715 nm. Kết quả cho sự tương quan cao khi so sánh với phương pháp chuẩn độ truyền thống.

1.3.1.4. Phương pháp enzym

Phương pháp enzym cũng được dùng để xác định lượng nhỏ các axit béo tự do có trong huyết thanh và huyết tương. Phương pháp dựa trên sự axyl hóa các axit béo mạch không phân nhánh bởi enzym acyl-CoA synthetase (ACS) tạo ra một lượng tương đương acyl-CoA và AMP (adenosine monophosphate). Sau đó sử dụng các phản ứng ghép cặp của AMP với myokinase (MK), pyruvate kinase (PK) và lactate dehydrogenase (LHD) để tạo ra NADH (nicotinamide adenine dinucleotide). NADH được xác định bằng phương pháp huỳnh quang.

Vào năm 1992, Jebens E. [23] và các cộng sự đã dùng phương pháp trên để xác định một lượng nhỏ các axit béo bằng cách chiết chúng với thuốc thử Triton X-100. Các phép đo được tiến hành lặp lại trong 5 mẫu của mẫu huyết thanh và huyết tương với khoảng nồng độ từ 0 đến 2 mmol.l⁻¹. Kết quả thu được khá tốt với hệ số biến thiên giữa các mẫu và trong mỗi mẫu lần lượt là 1,7 và 4%.

1.3.1.5. Phương pháp quang học

Ngày nay, với sự phát triển của máy tính hiện đại cùng với các thuật toán mới mà các phương pháp quang học cũng được ứng dụng rộng rãi để xác định các axit béo.

Satoshi Yoshida [32] và các cộng sự đã ứng dụng phương pháp phổ hồng ngoại chuyển hóa Fourier (FTIR) để phân tích các axit béo no và không no có trong các mô niêm mạc và được ứng dụng phân tích mẫu mô của 3 nước là Iran, Việt Nam và Indonesia. Phổ hồng ngoại bậc hai và thuật toán bình phương tối thiểu riêng phần đã được áp dụng và cho kết quả tốt. Hầu như tất cả các thành phần axit béo có trong niêm mạc miệng khá gần nhau khi so sánh giữa giá trị chuẩn (đo bằng phương pháp GC-MS) và giá trị tiên đoán dựa trên phương trình hồi qui. Phương pháp này cũng có thể áp dụng phân tích axit béo trong các lĩnh vực như thực phẩm, y tế dự phòng hay dịch tễ học.

Vào năm 2008, Di Wu [15] và các cộng sự đã sử dụng phương pháp quang phổ cận hồng ngoại để xác định axit α -linolenic và axit linolenic trong 8 loại dầu ăn và hỗn hợp của chúng. Các tác giả đã sử dụng phép biến đổi wavelet để giảm kích thước tập số liệu đầu vào trước khi cho vào mô hình hồi qui bình phương tối thiểu riêng phần. Phương pháp trên được đối chiếu với phương pháp bình phương tối thiểu riêng phần sử dụng đầy đủ dữ liệu phổ. Kết quả thu được cho thấy 2 phương pháp có độ tương quan cao và độ sai khác nhỏ. Đối với axit α -linolenic lần lượt là 0,9345 và 0,0123; còn đối với axit linoleic là 0,9054 và 0,0437. Phương pháp cho kết quả nhanh, chính xác và có thể áp dụng trong nhiều mẫu khác nhau.

1.3.2. Các phương pháp sắc ký

Từ khi ra đời đến nay, sắc ký vẫn luôn là phương pháp hữu hiệu nhất khi cần xác định riêng rẽ các chất trong cùng một hỗn hợp. Trong khi đó các axit béo hay đi cùng với nhau và việc xác định riêng biệt chúng là một việc làm cần thiết. Việc áp dụng các phương pháp sắc ký xác định các axit béo hiện nay là phương pháp phổ biến và có rất nhiều công trình nghiên cứu về vấn đề này. Trong khuôn khổ của luận văn chỉ đề cập đến các qui trình nghiên cứu chính khi sử dụng phương pháp sắc ký trong phân tích axit béo.

1.3.2.1 *Phương pháp sắc ký khí (GC)*

Sắc ký khí được xem là phương pháp hữu hiệu nhất hiện nay dùng để phân tích các axit béo trong các loại nền mẫu khác nhau. Tuy nhiên do sắc ký khí chỉ áp dụng đối với những chất dễ bay hơi trong khi các axit béo có trong tự nhiên đa số có nhiệt độ sôi cao nên chúng phải được dẫn xuất hóa. Do đó một qui trình xác định axit béo bằng sắc ký khí thường bao gồm 2 giai đoạn chính là dẫn xuất hóa và xác định.

a) Các phương pháp dẫn xuất hóa axit béo:

Trước khi phân tích sắc ký khí, việc làm đầu tiên là chuyển hóa các axit béo thành các dẫn xuất dễ bay hơi như là methyl este hay các dẫn xuất khác. Các lipid trong chất béo, dầu thực vật thường được este hóa để chuyển glycerol thành các ancol nhẹ hơn (metanol hay butanol . . .) trong môi trường axit (HCl , H_2SO_4 hay BF_3).

Quá trình methyl este hóa không những có thể thực hiện trong môi trường axit, môi trường kiềm đối với các axit béo tự do, hay lipid đã được tách ra khỏi nền mẫu mà nó còn có thể thực hiện trực tiếp trong qui trình một

bước bằng cách kết hợp việc chiết và chéo hóa este trong một lượng nhỏ mẫu khô.

Ở qui mô lớn, các metyl este của axit béo (FAMES), được sử dụng như là nhiên liệu diesel sinh học, được điều chế bằng phản ứng chéo hóa este của dầu thực vật với natri metylat, NaOH hay KOH trong môi trường khô.

Ngoài ra, đối với một số mục đích nhất định, chúng ta có thể tạo các dẫn xuất khác nhau đối với axit béo.

- Este hóa với xúc tác axit:

Dẫn xuất thông dụng nhất của axit béo là metyl este được điều chế bằng cách đun nóng axit béo tự do với một lượng dư metanol khan với sự có mặt của xúc tác axit, BF_3 .

+ Hóa chất:

- o Dung dịch BF_3 14% trong metanol (Altech hoặc Sigma),
- o Pentan, chloroform.

+ Qui trình:

Một lượng nhỏ dịch chiết lipid (10 mg) cho vào ống nghiệm có nút xoắn. Thêm vào đó 1 ml BF_3 /metanol. Nếu chỉ phân tích trianxylglyxerol hay sterol este, hoặc chúng có hàm lượng cao trong dịch chiết thì dịch chiết được hòa tan trong 0,75 ml chloroform/metanol (1/1,v/v) và 0,25 ml BF_3 /metanol được cho vào. Sau đó, đóng chặt nút xoắn, đun nóng trong nước sôi (hoặc bếp cách cát ở 100°C). Thời gian đun tùy thuộc dạng mẫu, thông thường từ 5 – 45 phút.

Ống nghiệm sau đó được làm lạnh, thêm vào đó 1 ml nước và 2 ml pentan. Lắc ống nghiệm trong vòng 1 phút, ly tâm tại tốc độ thấp và chiết lấy pha hữu cơ ở trên. Pentan được cho bay hơi và phần dư được hòa tan trong 50 – 100 μ L hexan ngay lập tức. Dung dịch trên được đem tiêm trực tiếp vào cột sắc ký khí.

+ Các phương pháp khác:

* Vào năm 2008, Ernesto Mendez Antolin và các cộng sự [16] đã nghiên cứu 5 phương pháp tạo dẫn xuất khác nhau khi xác định các axit béo no từ C_{24} – C_{36} . Các phương pháp tạo dẫn xuất bao gồm:

- Metyl hóa bằng diazometan
- Metyl hóa với hỗn hợp axit sulfuric – metanol
- Metyl hóa với hỗn hợp axit clohidric – metanol
- Metyl hóa với hỗn hợp BF_3 – metanol
- Metyl hóa bằng N-metyl-N-trimetylsilyltrifloaxetamit.

Sau khi đánh giá các thông số như giá thành, tốc độ phân tích, tính an toàn, độ nhạy, các tác giả kết luận phương pháp sử dụng hỗn hợp axit sulfuric – metanol cho kết quả tốt nhất.

* Phương pháp metyl hóa bằng axit clohidric thương mại từ các nguồn khác nhau cũng được Ichihara K. và cộng sự [20] nghiên cứu khi xác định axit béo trong các mẫu sterol este, trianxylglyxerol, photpholipit. Hiệu suất quá trình este hóa được so sánh với BF_3 – metanol. Phương pháp cho hiệu suất este hóa cao, đến 96% trong khi vẫn sử dụng hóa chất rẻ tiền, an toàn và thuận lợi, dễ kiểm. Qui trình phân tích tóm tắt như sau:

Hỗn hợp tạo dẫn xuất được tạo thành từ 9,7 ml dung dịch HCl đặc (35%, v/v) pha loãng với 41,5 ml metanol và được giữ trong tủ lạnh. Mẫu chất béo được hòa tan trong 0,2 ml toluen, sau đó thêm tiếp 1,50 ml metanol và 0,3 ml hỗn hợp tạo dẫn xuất. Ống nghiệm được lắc mạnh và đun nóng ở 100°C trong 1 giờ. Sau khi làm lạnh, thêm vào hỗn hợp 1 ml n-hexan và 1 ml nước, chiết lấy lớp metyl este ở pha n-hexan.

- Chéo hóa este bằng xúc tác bazơ:

Các este của axit béo khi có sự hiện diện của các ancolat trong môi trường dư ancol sẽ xảy ra sự chéo hóa este tạo thành một este mới. Nhờ tính chất này mà ta có thể chéo hóa các este của axit béo thành các metyl este để thuận tiện cho việc phân tích sắc ký.

Hỗn hợp tạo dẫn xuất thường gặp nhất là dung dịch Na hay K metoxi 1M hay 2 M trong metanol khan. Dung dịch trên bền vững trong nhiều tháng khi lưu trữ tại 4°C. Các glycerollipit có thể chéo hóa este trong vòng 2 – 5 phút khi sử dụng phương pháp này tại nhiệt độ phòng.

Vào năm 1996, Ichihara K. và cộng sự [21] đã có cải tiến qui trình trên để phân tích nhanh các axit béo trong trianxylglyxerol và photpholipit như sau:

+ Hóa chất: n-hexan, dung dịch KOH/metanol 2M.

+ Qui trình:

Ống nghiệm chứa 20 - 40 mg chất béo được hòa tan trong 2 ml n-hexan, sau đó thêm vào hỗn hợp 0,2 ml KOH/metanol 2 M. Ống nghiệm được lắc mạnh trong 2 phút tại nhiệt độ phòng. Sau đó ly tâm nhẹ, chiết lấy lớp n-

hexan ở trên để bơm vào cột GC. Phương pháp trên không dùng được cho sterol este và sáp.

Ichihara K và các cộng sự cũng đã biến đổi phương pháp trên để điều chế trực tiếp các este metyl của axit béo từ các lipid phân cực (photpholipit) trong hỗn hợp chất béo mà không cần phải phân lập trước [22]. Quá trình metyl hóa các glyxerolipit phân cực trong hỗn hợp chất béo xảy ra hoàn toàn trong 2,5 phút khi sử dụng máy khuấy và 20 phút khi lắc với dung dịch KOH 0,7M trong metanol với sự có mặt của n-hexan ở 30⁰C. Hiệu suất của quá trình este hóa lớn hơn 95% và phương pháp trên được ứng dụng khi phân tích thành phần các glyxerolipit phân cực trong dầu thực vật và mẫu máu. So với các phương pháp truyền thống thông qua sự chiết lipid bởi cloroform/metanol, phương pháp trên không có sự sai khác đáng kể và cho thời gian cũng như hiệu quả phân tích nhanh, chính xác.

- Quá trình metyl hóa trực tiếp:

Đối với một lượng mẫu nhỏ như mẫu mô từ 1 – 10 mg, mẫu chất lỏng sinh học có thể tích nhỏ (50 µL) ta có thể thực hiện phản ứng chéo hóa trực tiếp ngay trong mẫu mà không cần qua khâu tách chiết.

+ Qui trình:

Mẫu (chứa hàm lượng lipid không quá 10 µg) được cho vào đáy của ống nghiệm có nút xoắn làm bằng Teflon. Sau đó thêm vào 1 ml HCl trong metanol, 1 ml metanol và 0,5 ml n-hexan. Đóng chặt nút ống nghiệm và đun nóng tại 100⁰C trong 1 giờ (lắc nhiều lần).

Sau khi làm lạnh, thêm vào 2 ml n-hexan và 2 ml nước. Hỗn hợp được lắc nhẹ, lấy lớp n-hexan sau khi ly tâm. Trước khi phân tích GC, dịch chiết có thể được làm giàu bằng cách thổi khí nitơ qua bề mặt.

Vào năm 2000, Carrapiso AI và các cộng sự [13] đã nghiên cứu một số phương pháp chiết và chéo hóa este trực tiếp khi phân tích các lipit. Các phương pháp chiết bao gồm chiết bằng vi sóng và chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn được so sánh với phương pháp chéo hóa este trực tiếp. Kết quả thu được cho thấy phương pháp chéo hóa este trực tiếp có độ chính xác cao và đáng tin cậy, đồng thời tiết kiệm được hóa chất và thời gian phân tích.

Khi phân tích các axit béo trong mẫu dầu trong hạt cây, mẫu thịt bằng phương pháp chéo hóa este trực tiếp, Jordi Eras và các cộng sự [25] đã thay đổi qui trình trên bằng việc tạo este pentyl. Phản ứng sử dụng clotrimetylsilan và 1-pentanol là các chất tạo dẫn xuất. Phản ứng được thực hiện tại 90⁰C trong 40 phút. Thời gian và nhiệt độ trên đủ để chuyển hóa hoàn toàn các lipit thành các pentyl este của axit béo. Tương tự như qui trình trên, khi phân tích các mẫu thịt, Albert Tomas và các cộng sự [10] đã sử dụng lò vi sóng để tăng nhanh thời gian phân tích. Quá trình chéo hóa este trực tiếp được thực hiện trong lò vi sóng ở 90⁰C trong khoảng thời gian 30 giây, trong khi các quá trình khác cần từ 1 – 2 giờ. Hơn nữa phương pháp này cho hiệu suất thu hồi cao đối với mỗi axit béo no và không no. Thành phần của các axit béo cũng không bị ảnh hưởng bởi các bức xạ vi sóng.

b) Xác định axit béo bằng GC:

Các axit béo sau khi este hóa được bơm vào cột GC. Tùy thuộc vào thành phần và tính chất của axit béo mà ta có thể sử dụng các cột tách và các qui trình khác nhau. Bảng 1.1 cho biết một số cột tách sử dụng để phân tích axit béo trong thực phẩm [28].

Bảng 1.1: Thành phần hóa học của một vài pha tĩnh thông dụng dùng để phân tích axit béo trong thực phẩm bằng GC

Thành phần hóa học	Tên thương mại	Độ phân cực	Ứng dụng
100% Cyanopropylsilicon	CP – Sil – 88 (Silar -10c)	VP	Dầu đậu nành
100% Cyanoethylsilicon	SP – 2340, OV – 275	VP	Sữa, dầu thực vật đã hydro hóa
Methylsilicon polyme, 25% cyanopropyl – 25% phenyl – 50% methyl	OV – 225, DB – 225, SP – 2300	P	Thịt
Methylsilicon polyme, 1% vinyl – 5% phenyl	SE – 54	NP	Dầu các hạt ngũ cốc
Methyl silicon	SPB – 1 SPB - 5	NP	Dầu cá Dầu hạt cây
68% Biscyanopropyl – 32% dimethylsiloxan	SP – 2330	VP	Bơ, dầu thực vật
	SP – 2560	P	Dầu thực vật đã hydro hóa.
Polyetylenglycol	DB-WAX, Supelcowa-10, Omegawax, Carbowax 20M	P	Men, bơ, dầu đậu nành, dầu các hạt cây, dầu hạt cây bông
95% Dimethyl – 5 % diphenylpoysiloxan	DB-5, SPB-5, CP-SIL 8CB	NP	Dầu hạt cây bông, dầu thực vật
100% Dimethylpolysiloxan	DB-1, Rt-1, SPB-1, SP-2100, OV-1, OV-101, CP-SIL 5CB	NP	Men
86% Dimethyl – 14% cyanopropylphenylpolyxiloxan	DB - 1701	P	Men

(Chú thích: VP: rất phân cực, P: phân cực, NP: không phân cực).

Tùy thuộc vào cột tách và thành phần mẫu mà ta có các điều kiện phân tích khác nhau. Sau đây xin giới thiệu một vài điều kiện phân tích axit béo bằng GC.

+ Pha tĩnh ít phân cực:

- Cột SPB – 5 (30m x 0,32mm x 0,25 μ m).
- Chương trình nhiệt độ cột: Nhiệt độ đầu 40 $^{\circ}$ C; tăng 5 $^{\circ}$ C/phút lên 120 $^{\circ}$ C giữ 0,5 phút; tăng 1 $^{\circ}$ C/phút lên 180 $^{\circ}$ C giữ trong 1 phút, sau đó tăng 5 $^{\circ}$ C/phút lên 250 $^{\circ}$ C, giữ ở nhiệt độ này trong 5 phút. Tổng thời gian phân tích 100 phút.
- Buồng bơm: Nhiệt độ injector là 250 $^{\circ}$ C; bơm không chia dòng splitless; thời gian không chia dòng là 1 phút.
- Khí mang: Heli, tốc độ 0,8 ml/phút.

+ Pha tĩnh phân cực:

- Cột DB – WAX (20m x 0,12 mm x 0,18 μ m).
- Chương trình nhiệt độ cột: Nhiệt độ đầu 100 $^{\circ}$ C, tăng 5 $^{\circ}$ C/phút đến 250 $^{\circ}$ C, giữ ở 250 $^{\circ}$ C 1 phút.
- Buồng bơm: Nhiệt độ injector là 250 $^{\circ}$ C, bơm chia dòng.
- Khí mang: Heli, tốc độ 1 ml/phút.

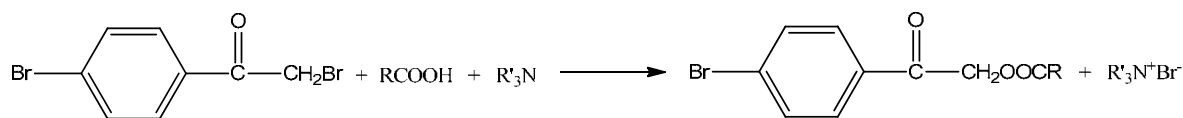
1.3.2.2 Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Thông thường, khi phân tích các axit béo, người ta hay sử dụng phương pháp GC. Tuy nhiên trong một số trường hợp đặc biệt, phương pháp HPLC lại tỏ ra hữu dụng. Giá trị lớn nhất của HPLC là phân tích các axit dễ bay hơi

(các axit có mạch ngắn), hoặc dùng để nghiên cứu phương pháp đồng vị đánh dấu các axit béo. Các đồng phân vị trí hay đồng phân cấu dạng khi tách bằng HPLC cũng cho kết quả khả quan hơn GC. Khi tách bằng HPLC có thể sử dụng nhiều loại detector khác nhau, nhưng đối với các phương pháp có tạo dẫn xuất thì detector UV và detector huỳnh quang được dùng phổ biến hơn cả. Ngày nay người ta cũng kết hợp detector khối phổ với HPLC để cho kết quả phân tích chính xác hơn [17]. Sau đây là các phương pháp tạo dẫn xuất chính khi xác định axit béo bằng HPLC với detector UV và huỳnh quang.

a) Tạo dẫn xuất đo UV

Dẫn xuất hay dùng nhất để đo UV là este của phenacyl. Quy trình sử dụng 4-bromphenacyl bromua như là thuốc thử tạo dẫn xuất.



Dung dịch 0,2 mM trimetyl amin trong axeton khan được sử dụng để tạo môi trường kiềm; ngoài ra có thể dùng natri cacbonat hay kali hidroxit.

- Thuốc thử: 4-bromphenacyl bromua, ete 18-crown-6, KOH/metanol 50 mM. Axetonitrin.
- Quy trình:

Hòa tan mẫu axit béo tự do trong metanol và trung hòa bằng dung dịch KOH hay trimetyl amin với chỉ thị là phenolphthalein. Hỗn hợp được làm bay hơi bởi khí N_2 .

Thêm 0,1 ml ete 18-crown-6 trong axetonitrin có nồng độ 2 mM và 0,1 ml 4-bromphenacyl bromua vào phần còn lại. Đun nóng ở 80°C trong 15

phút; vừa đun nóng vừa lắc đều hỗn hợp. Làm lạnh hỗn hợp, sau đó pha loãng bằng axetonitrin để được nồng độ axit béo phù hợp.

Sử dụng cột C18, gradient pha động (axetonitrin trong nước) axetonitrin/nước (1/1, v/v) với tốc độ dòng là 1ml/phút. Detector UV được thiết lập tại 242 nm.

Tùy thuộc các axit béo cần tách và loại cột mà ta có các cách gradient khác nhau nhưng thông thường người ta hay sử dụng gradient sau: chạy tuyến tính trong 60 phút đầu, và sau đó đẳng dòng (80% axetonitrin) trong 30 – 40 phút.

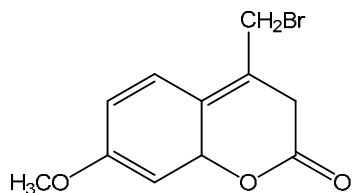
Phương pháp trên đã áp dụng thành công trong nhiều đối tượng và có những đối tượng khó như huyết thanh người [9].

b) Tạo dẫn xuất đo huỳnh quang

Để tăng độ nhạy và độ chọn lọc khi xác định axit béo bằng HPLC, người ta đã tạo ra các dẫn xuất để đo huỳnh quang.

Jinmao You và các cộng sự đã đề nghị một phương pháp tạo dẫn xuất nhanh, đơn giản và có độ nhạy cao khi xác định các axit béo có mạch ngắn lẫn mạch dài [24]. Các tác giả sử dụng 9-(2-hydroxietyl)-cacbazol như là thuốc thử tạo huỳnh quang. Phương pháp cho giới hạn phát hiện thấp 45 – 68 fmol đối với các axit béo từ C₁₄ – C₂₀ và còn thấp hơn đối với các axit ngắn hơn. Tuy nhiên phương pháp này có hạn chế là thuốc thử không có trên thị trường mà phải tổng hợp trước khi phân tích.

Do đó trên thực tế, người ta hay sử dụng brommetylmethoxycoumarin (Br-MMC) làm thuốc thử tạo huỳnh quang. Br-MMC có thể tạo ra hợp chất phát huỳnh quang mạnh và nó cũng sẵn có trên thị trường.



4- Brommetyl-7-metoxicoumarin

J.H.Wolf và các cộng sự đã sử dụng qui trình sau đây để xác định các axit béo tự do cũng như là các axit béo đã được axyl hóa cho kết quả rất tốt, với giới hạn phát hiện ở mức ng [31].

- Hóa chất:

Dung dịch 1: 5 mg Br-MMC hòa tan trong 5 ml axetonitrin khan.

Dung dịch 2: 13 mg ete 18-crown-6 trong 5 ml axetonitrin khan.

Lưu trữ các dung dịch này ở - 20 °C.

Dung dịch làm việc: 40 µL dung dịch 1 và 2 µL dung dịch 2 được cho vào 2 ml axetonitrin khan trước khi tạo dẫn xuất.

Kali cacbonat (khan).

- Qui trình:

Dẫn xuất hóa: 1- 2 µg axit béo và vài ng của chất nội chuẩn (C17:0) được hòa tan trong một thể tích nhỏ của diclometan. Hỗn hợp sau đó được hút bằng pipet vào ống nghiệm nhỏ. Sau khi làm bay hơi bằng khí nitơ, thêm 100 µL dung dịch làm việc và 2 – 4 mg kali cacbonat. Siêu âm nhanh, sau đó làm nóng dung dịch ở 60 °C trong 15 phút. Làm lạnh dung dịch rồi lọc bởi phễu lọc nylon 0,22 µm.

HPLC: Sử dụng cột C18 (250 x 4 mm), bơm gradient 2 kênh và detector huỳnh quang với bước sóng kích thích và phát xạ lần lượt là 325 nm và 398 nm. Dung dịch rửa giải A: axetonitrin/nước (70/30, w/w); dung dịch B: axetonitrin. Thể tích bơm mẫu: 20 μ L.

Cột ban đầu được rửa giải với dung dịch A và thay đổi thành dung dịch axetonitrin/nước (95,5/4,5, w/w) tại phút thứ 24 trong vòng 10 phút. Tốc độ dòng là 1 ml/phút.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, mục tiêu và nhiệm vụ nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng và mục tiêu nghiên cứu

Axít béo không no có nhiều trong chất béo có nguồn gốc từ thực vật nói chung và trong dầu Gấc nói riêng. So với các axit béo no, các axit béo không no có hoạt tính sinh học cao hơn. Các nghiên cứu cho thấy chúng có khả năng ngăn ngừa xơ vữa động mạch bằng cách kết hợp với cholesterol tạo ra các este cơ động, không bền vững và dễ bài xuất ra khỏi cơ thể. Chúng còn có khả năng điều hòa tính bền vững của thành mạch: nâng cao tính đàn hồi và hạ thấp tính thấm của thành mạch. Các axit béo không no còn cần thiết cho các chuyển hóa vitamin nhóm B. Một số tổ chức như gan, não, tim, các tuyến sinh dục có nhu cầu cao về các axit béo không no, khi không được cung cấp đủ từ thức ăn thì các rối loạn sẽ xuất hiện ở các cơ quan này trước tiên. Vì vậy, việc xác định hàm lượng các axit béo không no trong các mẫu sinh học, thực phẩm, dầu thực vật, . . . là một việc làm cần thiết.

Hiện nay có nhiều phương pháp xác định các axit béo trong mẫu dầu thực vật, tuy nhiên có ít công trình công bố việc xác định các axit béo không no trong dầu Gấc. Do đó đối tượng phân tích của luận văn là phân tích một số mẫu dầu Gấc trên thị trường.

Mục tiêu của luận văn là nghiên cứu xây dựng qui trình phân tích đồng thời axit oleic (ω -9) và axit linoleic (ω -6), hai axit không no trong mẫu dầu Gấc bằng phương pháp GC – FID dựa trên trang thiết bị hiện có và điều kiện của phòng thí nghiệm. Đây là hai axit béo không no quan trọng trong dầu Gấc Việt Nam.

2.1.2. Nhiệm vụ nghiên cứu

Với mục tiêu trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tách và xác định đồng thời axit oleic và axit linoleic trong một số mẫu dầu Gấc bằng phương pháp sắc ký khí sử dụng detector FID.

Để xây dựng qui trình tách và phân tích, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu các vấn đề sau:

1/ Tối ưu hóa điều kiện tách các axit béo dưới dạng dẫn xuất metyl este:

- Lựa chọn cột tách
- Khảo sát chương trình nhiệt độ cột tách
- Khảo sát tốc độ khí mang
- Khảo sát thể tích bơm mẫu

2/ Tối ưu hóa quá trình este hóa:

- Khảo sát ảnh hưởng thể tích NaOH/MeOH
- Khảo sát ảnh hưởng của thể tích BF_3/MeOH
- Khảo sát ảnh hưởng thời gian este hóa

3/ Xây dựng phương pháp định lượng hỗn hợp axit béo

- Khảo sát giới hạn định lượng, giới hạn phát hiện
- Khảo sát khoảng tuyến tính
- Khảo sát độ lặp lại của phép đo

4/ Ứng dụng qui trình nghiên cứu để phân tích một số mẫu dầu Gấc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp sắc ký khí

2.2.1.1. Khái niệm

Sắc ký khí là một phương pháp tách chất trong đó pha động là 1 chất khí (được gọi là khí mang) và pha tĩnh chứa trong cột là một chất rắn hoặc chất lỏng phủ trên bề mặt chất mang tro dạng rắn, hay phủ đều lên thành phía trong cột. Tùy thuộc bản chất pha tĩnh, người ta chia thành 2 loại sắc ký khí:

+ Nếu pha tĩnh là một chất hấp phụ rắn thì kỹ thuật phân tích được gọi là sắc ký khí – rắn.

+ Nếu pha tĩnh là chất lỏng được gắn lên bề mặt của chất mang tro hoặc được phủ dưới dạng một lớp phim mỏng lên thành trong của cột mao quản thì kỹ thuật này gọi là sắc ký khí – lỏng [8].

2.2.1.2. Nguyên tắc hoạt động

Nhờ có khí mang từ bom khí (hoặc máy sinh khí), mẫu từ buồng bay hơi được dẫn vào cột tách nằm trong buồng điều nhiệt. Quá trình sắc ký xảy ra tại đây. Sau khi rời khỏi cột tách tại các thời điểm khác nhau, các cấu tử lần lượt đi vào detector, tại đây nồng độ chất được chuyển thành tín hiệu điện. Tín hiệu này được khuếch đại rồi chuyển sang bộ ghi, tích phân kế hay máy vi tính. Các tín hiệu được xử lý tại đó rồi chuyển sang bộ phận in và lưu kết quả. Kết quả của quá trình phân tích sắc ký khí được biểu diễn bằng sắc đồ. Trên sắc đồ nhận được, sẽ có các tín hiệu ứng với các cấu tử được tách gọi là pic. Mỗi pic của sắc đồ ứng với một hay một nhóm cấu tử của mẫu phân tích [8].

2.2.1.3. Cấu tạo và mô hình sắc ký khí

a) Cấu tạo:

Hai bộ phận quan trọng nhất của thiết bị sắc ký khí là hệ thống cột tách và detector.

- Cột tách: Có 2 loại cột tách là cột nhồi và cột mao quản.

Ở cột nhồi, cột được nhồi đầy pha tĩnh xốp hay bằng các viên chất mang có phủ trên bề mặt một lớp mỏng pha lỏng tương ứng có khối lượng từ 0,1% - 0,25% khối lượng so với chất mang. Khi dòng khí mang len lỏi qua các khe hở trong cột tách, các cấu tử cần phân tích trong dòng khí mang sẽ được lưu giữ ở pha tĩnh với mức độ khác nhau. Nhưng với cột nhồi, chiều dài cột không thể kéo dài một cách tùy ý vì độ chênh lệch áp suất giữa đầu và cuối cột tăng tỉ lệ với chiều dài cột. Do đó để khắc phục điều này, người ta đã chế tạo ra cột mao quản.

Cột mao quản là loại cột tách với đường kính nhỏ hơn 1mm, thành trong của cột được tẩm pha tĩnh. Nhờ cấu trúc đặc biệt này của cột mao quản, khí mang sẽ đưa mẫu đi qua cột tách rất dài (làm cho năng suất tách cao) mà không gặp trở kháng lớn (về độ chênh lệch áp suất). Các cấu tử sẽ tương tác với pha tĩnh bám trên thành cột và được lưu giữ lại với mức độ khác nhau. Hiện nay người ta hay sử dụng 2 loại cột mao quản là cột mao quản phim mỏng và cột mao quản lớp mỏng [8].

- Detector:

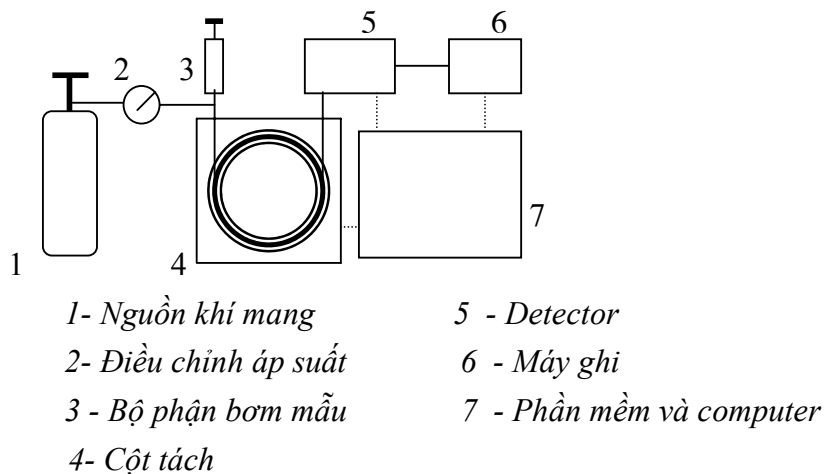
Detector là bộ phận có nhiệm vụ chuyển hóa một đại lượng không điện (nồng độ, khối lượng các chất được tách ra khỏi cột sắc ký) thành đại lượng điện. Hiện nay tùy thuộc vào mục đích sử dụng mà ta có nhiều

loại detector khác nhau. Một số detector thông dụng của GC được liệt kê trong bảng 2.1 [8].

Bảng 2.1: Một số detector thông dụng dùng cho sắc ký khí

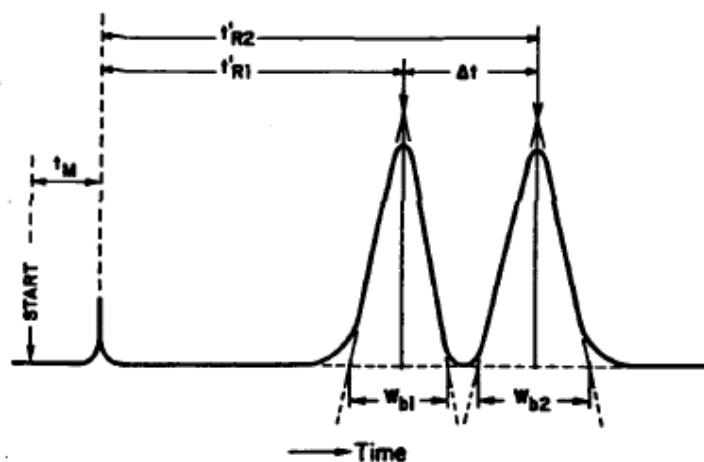
Detector	Giới hạn phát hiện (g.s ⁻¹)	Khả năng áp dụng
Dẫn nhiệt (TCD)	$2,5.10^{-6}$	Tất cả các chất không làm hỏng dây nung
Ion hóa ngọn lửa (FID)	5.10^{-12}	Detector vạn năng cho hầu như tất cả các chất hữu cơ.
Cộng kết điện tử (ECD)	2.10^{-14}	Áp dụng cho các chất có ái lực điện tử cao như các thuốc trừ sâu, diệt cỏ (loại clo hữu cơ), chất diệt cỏ.
Quang kế ngọn lửa (FPD)	10^{-8} đối với parathion	Phát xạ tối ưu cho lưu huỳnh ở 394 nm và photpho ở 526 nm.

b) Sơ đồ thiết bị sắc ký khí:



Hình 2.1: Mô hình thiết bị sắc ký khí thông thường

2.2.1.4. Một số đại lượng dùng trong sắc ký khí



Hình 2.2: Sắc ký đồ của 2 cấu tử 1 và 2

Một số thông số được mô tả trên hình 2.2:

- t_M (thời gian chết): là thời gian cần thiết để khí mang đi qua cột tách của hệ sắc ký khí.

- t_R (thời gian lưu) = $t_{R'} + t_M$: là thời gian được tính từ lúc bắt đầu bơm mẫu vào đầu cột đến khi pic đạt giá trị cực đại. Trên cùng một điều kiện sắc ký đã chọn t_R của mỗi chất là không đổi. Đây là thông tin về mặt định tính của một chất.
- $t_{R'}$ (thời gian lưu hiệu chỉnh): là thời gian lưu không tính đến thời gian chết (thời gian lưu thực của chất).
- W_b (độ rộng của đáy pic).
- k' (hệ số dung lượng): cho biết khả năng phân bố của cấu tử cần phân tích trong hai pha với sức chứa của cột. Nó cũng là tỷ số giữa lượng chất trong pha tĩnh và lượng chất bị kéo đi bởi khí mang tại thời điểm cân bằng.

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R}{t_M} - 1 \quad (2.1)$$

- α (hệ số tách hay độ chọn lọc): là tốc độ di chuyển tỷ đối của 2 chất, cho biết hiệu quả tách của hệ thống sắc ký khí, hai chất chỉ được tách ra khi giá trị k' khác nhau, hay $\alpha > 1$.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (k'_2 > k'_1) \quad (2.2)$$

Để tách riêng 2 chất, ta thường chọn α trong khoảng từ 1,05 đến 2. α càng lớn thì 2 chất càng tách nhau tốt, nhưng khi α quá lớn thì thời gian phân tích sẽ kéo dài, gây loãng pic và tốn kém không cần thiết.

- N (số đĩa lý thuyết): là đại lượng đặc trưng cho hiệu lực của cột tách. Số đĩa lý thuyết càng cao, khả năng tách càng tốt. N được tính theo công thức sau:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (2.3)$$

- R (độ phân giải): là đại lượng đặc trưng cho mức độ tách của 2 chất cạnh nhau trên cùng một điều kiện sắc ký. R được tính theo công thức sau:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_{b2} + W_{b1}} \quad (2.4)$$

Khi $R = 0,75$ thì 2 pic không tách tốt, còn xen phủ nhau nhiều.

Khi $R = 1,0$ hai pic có độ lớn tương tự nhau được phân tách khỏi nhau khoảng 95%.

Khi $R = 1,5$ thì sự phân giải được coi như là hoàn toàn, khoảng 99,7%.

Giữa độ phân giải, hệ số dung lượng của cấu tử ra sau, độ chọn lọc α và số đĩa lý thuyết N của cột có mối liên hệ thông qua phương trình (2.5).

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right) \sqrt{N} \quad (2.5)$$

Như vậy muốn tăng R ta có thể dùng các biện pháp sau:

- + Tăng số đĩa lý thuyết bằng cách dùng cột dài hơn, hay giảm tốc độ pha động.
- + Tăng k'_2 bằng cách thay đổi thành phần pha động.

+ Tăng α bằng cách thay đổi thành phần pha động hoặc chọn cột khác phù hợp hơn với quá trình tách.

2.2.2. Định lượng các axit béo bằng GC – FID

2.2.2.1. Quy trình xử lý mẫu chuẩn hỗn hợp

Cân chính xác lần lượt 100 mg chuẩn axit oleic và 150 mg chuẩn axit linoleic cho vào bình định mức 10 ml. Định mức bằng dung môi n-hexan. Ta thu được dung dịch chuẩn của axit oleic và linoleic có nồng độ tương ứng là 10 mg/ml và 15 mg/ml. Lấy 0,1 ml dung dịch này cho vào ống nghiệm 20 ml có nút xoáy. Thêm vào ống nghiệm 2,0 ml dung dịch NaOH 0,5M pha trong metanol, đậy kín nắp, lắc ống nghiệm trong thời gian 15 phút. Cho tiếp 2,0 ml BF_3 20% trong metanol, sục khí N_2 , đun cách thủy 80°C trong 30 phút. Mẫu sau đó được chiết bằng 4 ml dung dịch n-hexan (chiết 2 lần). Dịch chiết n-hexan được định mức đến 10 ml. Ta được các dung dịch chuẩn axit oleic và linoleic đã este hóa có nồng độ tương ứng là 0,1 mg/ml và 0,15 mg/ml.

2.2.2.2. Quy trình xử lý mẫu dầu Gấc

Cân chính xác 100 mg dầu Gấc cho vào bình định mức 10 ml. Định mức bằng dung môi n-hexan. Lấy 0,1 ml dung dịch này cho vào ống nghiệm 20 ml có nút xoáy. Thêm vào ống nghiệm 2,0 ml dung dịch NaOH 0,5M pha trong metanol, đậy kín nắp, lắc ống nghiệm trong thời gian 15 phút. Cho tiếp 2,0 ml BF_3 20% trong metanol, sục khí N_2 , đun cách thủy 80°C trong 30 phút. Mẫu sau đó được chiết bằng 4 ml dung dịch n-hexan (chiết 2 lần). Dịch chiết n-hexan được định mức đến 10 ml. Sau đó cho dịch chiết này vào các lọ nhỏ (vial) dùng để bơm trực tiếp vào cột GC.

2.2.2.3. Chương trình GC – FID

Khí mang	Khí N ₂
Tốc độ khí mang	0,8 ml/phút
Chương trình nhiệt độ	150 ⁰ C giữ 1 phút, tăng 10 ⁰ C/phút đến 200 ⁰ C, giữ 1 phút, tăng 2 ⁰ C/phút đến 250 ⁰ C, giữ 1 phút, tăng 10 ⁰ C/phút đến 270 ⁰ C, giữ 10 phút.
Nhiệt độ buồng tiêm mẫu	250 ⁰ C
Nhiệt độ FID	280 ⁰ C
Thể tích bơm mẫu	1μl
Kiểu bơm	Bơm chia dòng với tỉ lệ 10:1

2.2.3. Phương pháp xử lý và đánh giá kết quả

Theo lý thuyết sắc ký khí, trong một điều kiện sắc ký xác định đã chọn, thì thời gian lưu của chất là đại lượng đặc trưng để định tính (phát hiện) các chất. Còn chiều cao và diện tích pic sắc ký có liên quan chặt chẽ đến nồng độ của chất. Trong một vùng nồng độ nhất định và không lớn, thì chúng ta có mối quan hệ tuyến tính như sau:

$$H_i = k_1.C_i = f(C) \quad (2.6)$$

$$S_i = k_2.C_i = f(C) \quad (2.7)$$

trong đó:

H_i và S_i là chiều cao và diện tích của pic sắc ký của cấu tử i .

C_i là nồng độ của cấu tử i với thời gian lưu t_{Ri} .

k_1, k_2 là các hằng số thực nghiệm phụ thuộc vào các điều kiện sắc ký, của pha tĩnh cũng như khí mang.

Dựa trên (2.6) hay (2.7) ta có thể xác định nồng độ các chất phân tích theo phương pháp đường chuẩn hay thêm chuẩn.

Các số liệu thực nghiệm được xử lý bằng phương pháp toán thống kê với các đặc trưng sau [6]:

+ Giá trị trung bình:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.8)$$

+ Độ lệch chuẩn:
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.9)$$

+ Độ lệch chuẩn tương đối:
$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (2.10)$$

2.3. Hóa chất và dụng cụ

2.3.1. Hóa chất

a) Các hóa chất và thuốc thử:

Nguyên vật liệu	Nguồn gốc	Tiêu chuẩn
Metanol (MeOH)	Merck – Đức	HPLC
n – hexan	Merck – Đức	HPLC
BF ₃ /MeOH 20%	Merck – Đức	PA
NaOH	Sigma-Aldrich	PA

b) Các chất chuẩn:

- Chuẩn axit oleic (Dr. Ehrenstorfer, C15727000), hàm lượng 98,5%.
- Chuẩn axit linoleic (Dr. Ehrenstorfer, C14635400), hàm lượng 99%.

2.3.2. Dụng cụ

- Máy sắc ký khí GC – 2010 của hãng Shimazu.
- Bể siêu âm, tủ sấy, máy sinh khí nitơ, bể cách thủy có điều nhiệt, cân phân tích, các dụng cụ thủy tinh khác như: bình định mức các loại, pipet, micropipet, . . .

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát các điều kiện sắc ký tối ưu đối với việc phân tích các axit béo

3.1.1. Lựa chọn cột tách

Cột tách (pha tĩnh) là yếu tố quan trọng trong phân tích sắc ký nói chung và trong sắc ký nói riêng. Tùy thuộc vào bản chất của hỗn hợp phân tích mà lựa chọn cột tách với pha tĩnh thích hợp. Theo [28], để phân tích hỗn hợp các axit béo sau khi đã methyl este hóa có thể chọn cột phân cực như Carbowax hoặc cột không phân cực như HP-1. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, chúng tôi chọn cột tách mao quản HP-5 với các thông số như sau:

- Bản chất pha tĩnh: Methylpolisiloxan với 5% phenyl
- Chiều dài cột: 30 m
- Đường kính trong: 0,25 mm
- Bề dày lớp phim: 0,25 μm .

3.1.2. Khảo sát chương trình nhiệt độ cột tách

Chuẩn các axit béo linoleic (0,1mg/ml) và axit oleic (0,1mg/ml) sau khi đã được methyl este hóa theo qui trình chuẩn bị mẫu chuẩn được bơm vào hệ thống GC với các chương trình nhiệt độ sau:

- Chương trình 1 (CT1): 150⁰C giữ 1 phút, tăng 10⁰C/phút đến 270⁰C, giữ 20 phút.
- Chương trình 2 (CT2): 150⁰C giữ 1 phút, tăng 10⁰C/phút đến 230⁰C, giữ 1 phút, tăng 2⁰C/phút đến 250⁰C, giữ 1 phút, tăng 10⁰C/phút đến 270⁰C, giữ 10 phút.
- Chương trình 3 (CT3): 150⁰C giữ 1 phút, tăng 10⁰C/phút đến 200⁰C, giữ 1 phút, tăng 2⁰C/phút đến 250⁰C, giữ 1 phút, tăng 10⁰C/phút đến 270⁰C, giữ 10 phút.

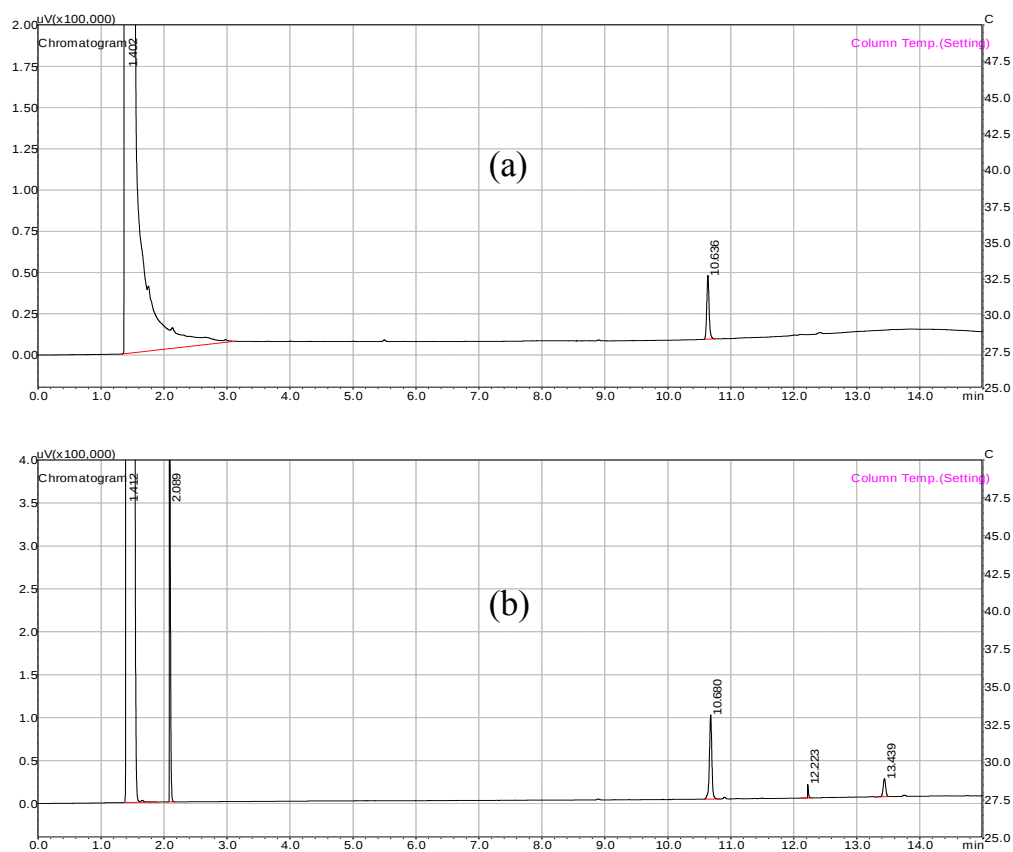
Các thông số còn lại:

- Cột tách : HP-5
- Khí mang : N₂ với vận tốc 1,5 ml/phút
- Nhiệt độ FID: 280⁰C
- Thể tích bơm : 1 µl.

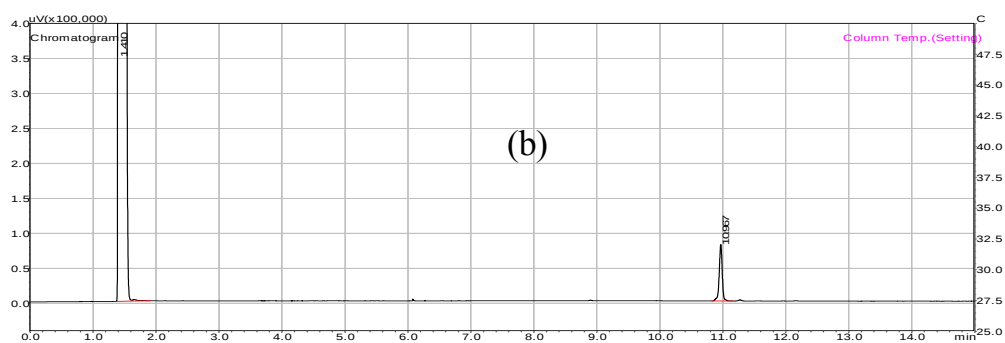
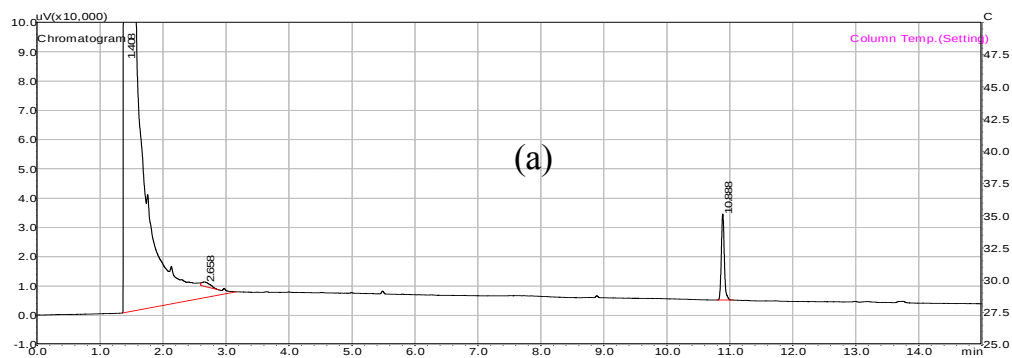
Kết quả thu được trình bày ở bảng 3.1 và các hình 3.1, 3.2 và 3.3.

Bảng 3.1: Thời gian lưu của các este theo chương trình nhiệt độ

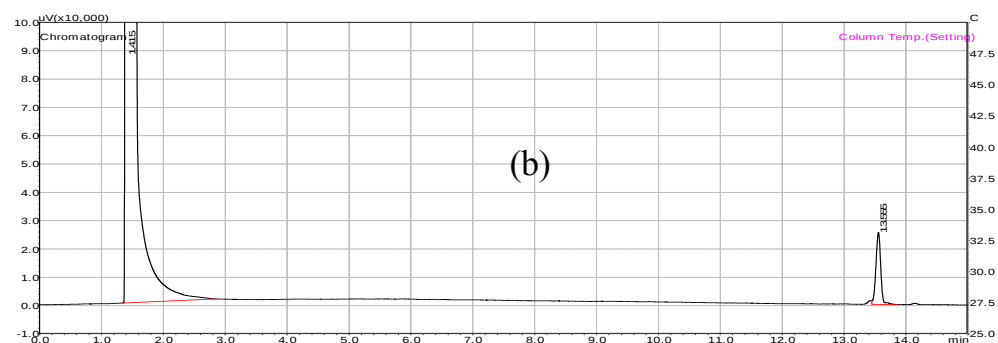
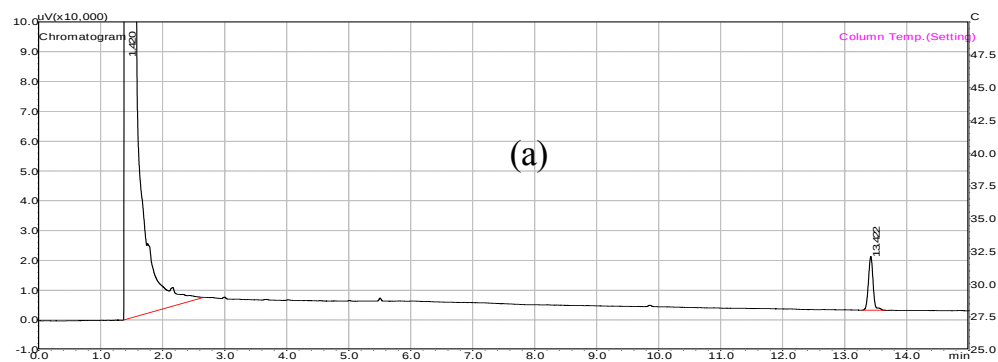
Chương trình	t _R MeLino (phút)	t _R MeOle (phút)	Δt _R (phút)
CT1	10,636	10,680	0,044
CT2	10,888	10,967	0,079
CT3	13,422	13,555	0,133



Hình 3.1: Sắc đồ của methyl linoleat (a) và methyl oleat (b) theo CT1



Hình 3.2: Sắc đồ của methyl linoleat (a) và methyl oleat (b) theo CT2



Hình 3.3: Sắc đồ của methyl linoleat (a) và methyl oleat (b) theo CT3

Nhận xét: Trong 3 chương trình nhiệt độ nêu trên, chương trình nhiệt độ 3 cho ta Δt_R lớn nhất, do đó khả năng tách được 2 axit béo trên là cao nhất. Điều này có thể được giải thích là do ta chọn chương trình nhiệt độ tăng chậm trong một khoảng nhiệt độ rộng hơn 200 – 250⁰C nhằm mục đích để các cấu tử có thời gian lưu gần nhau bị giữ ở cột lâu hơn nên chúng tách ra tốt hơn.

3.1.3. Khảo sát tốc độ khí mang

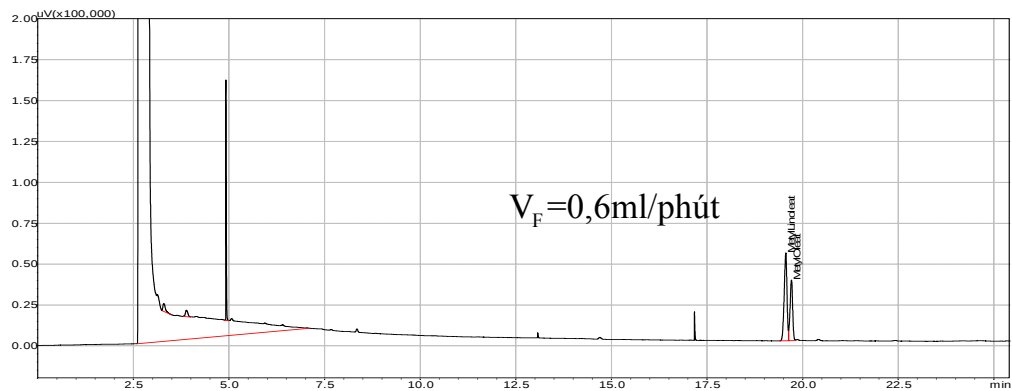
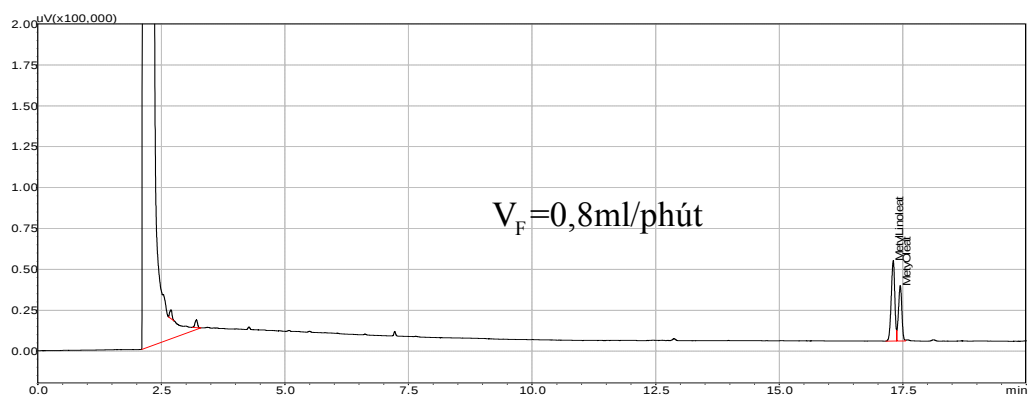
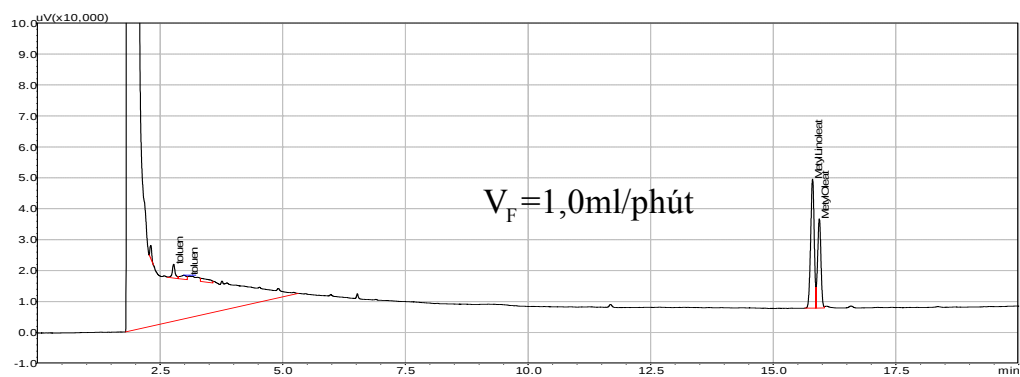
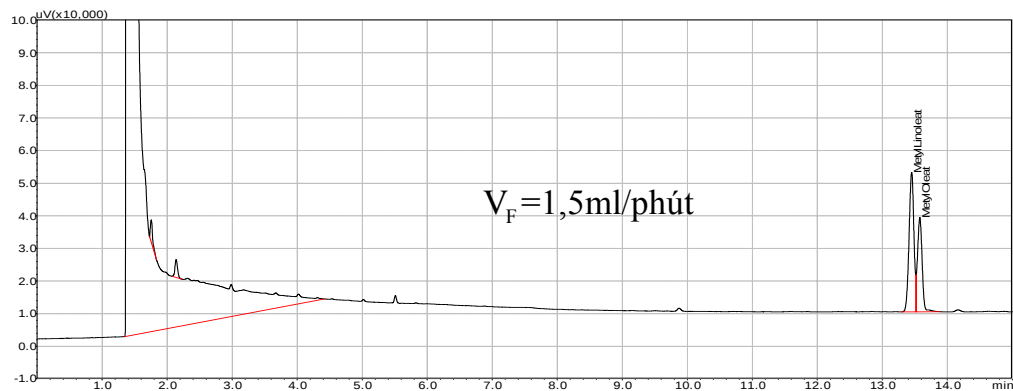
Tốc độ khí mang có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả tách và số đĩa lý thuyết cho quá trình tách. Để khảo sát ảnh hưởng của tốc độ khí mang đến việc phân tích mẫu, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu hỗn hợp chuẩn của axit oleic (0,1 mg/ml) và axit linoleic (0,15 mg/ml) sau khi đã este hóa với các điều kiện sắc ký như sau:

- Cột tách : HP-5
- Chương trình nhiệt độ 3: 150⁰C giữ 1 phút, tăng 10⁰C/phút đến 200⁰C, giữ 1 phút, tăng 2⁰C/phút đến 250⁰C, giữ 1 phút, tăng 10⁰C/phút đến 270⁰C, giữ 10 phút.
- Nhiệt độ FID: 280⁰C
- Thể tích bơm : 1 μ l
- Khí mang: N₂ với các vận tốc 1,5ml/phút; 1,0ml/phút; 0,8ml/phút; 0,6ml/phút.

Kết quả thu được chỉ ra ở bảng 3.2 và hình 3.4.

Bảng 3.2 : Ảnh hưởng của tốc độ khí mang đến quá trình tách chất

V _{khí mang} (ml/phút)	t _R MeLino (phút)	t _R MeOle (phút)	Δt_R (phút)	Hệ số phân giải R
1,5	13,451	13,576	0,125	0,908
1,0	15,800	15,938	0,138	1,055
0,8	17,308	17,448	0,140	1,085
0,6	19,560	19,707	0,147	1,107



Hình 3.4: Sắc đồ của các este khi tốc độ khí mang giảm dần

Nhận xét: Khi giảm vận tốc khí mang, sự chênh lệch về thời gian lưu Δt_R và hệ số phân giải R tăng lên nhưng không nhiều. Điều này có thể được giải thích là do trong sắc ký khí, pha động (khí mang) chỉ đóng vai trò cơ học nên không làm thay đổi đáng kể khả năng tách chất, sự tách chất được quyết định chủ yếu do pha tĩnh. Do yêu cầu phân tích và vận hành máy, nên chúng tôi chọn vận tốc khí mang là 0,8 ml/phút ứng với hệ số phân giải $R \approx 1,1$ để đảm bảo sự tách chất tốt mà không làm doãn pic sắc ký cũng như tắt cột tách.

3.1.4. Khảo sát thể tích bơm mẫu

Trong sắc ký khí, thể tích bơm mẫu ảnh hưởng đến nhiều yếu tố như sự cân đối của pic sắc ký, sai số, độ nhạy của phép phân tích, tuổi thọ cột,.

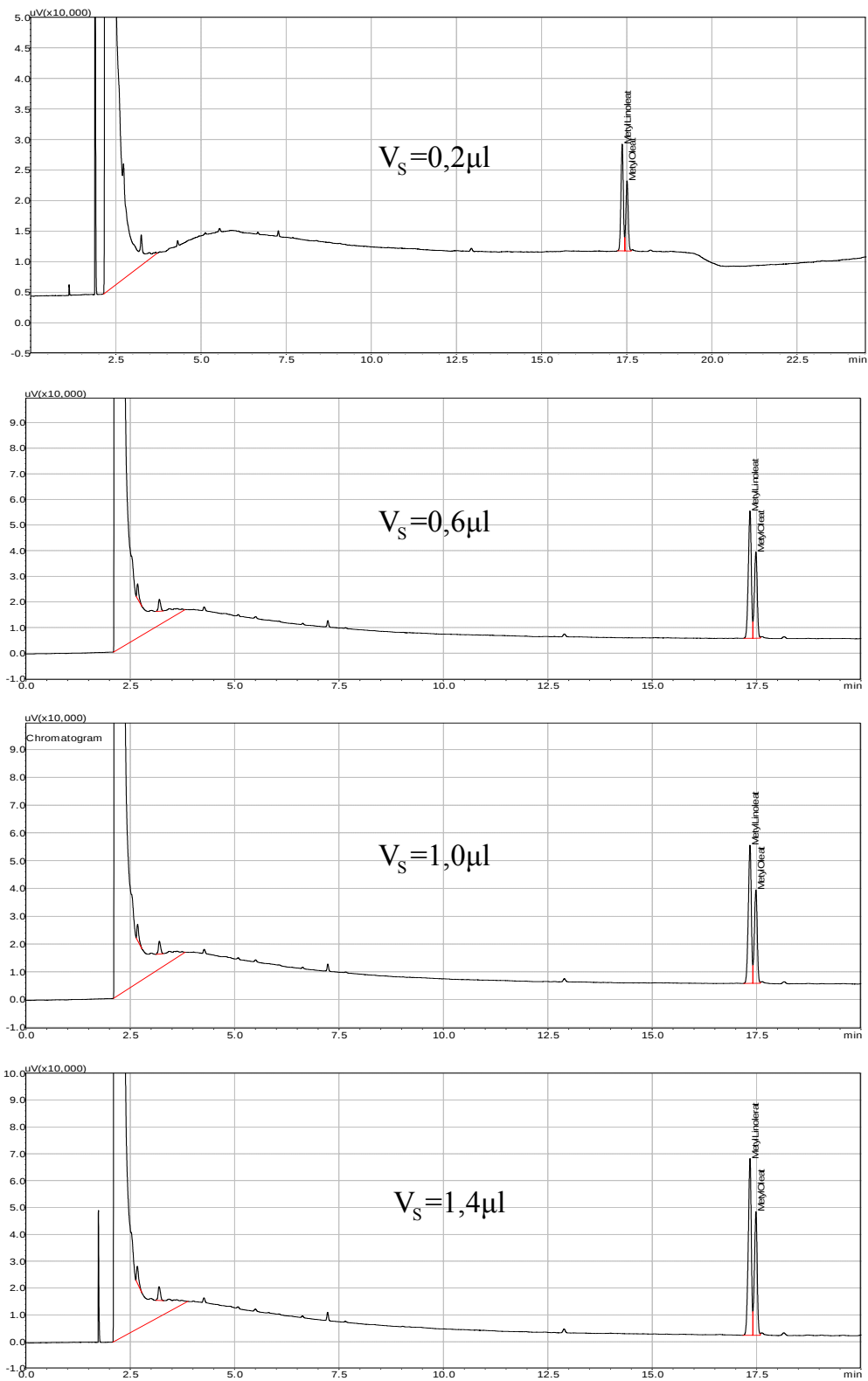
Nếu thể tích bơm mẫu quá nhỏ, có thể gây sai số lớn khi bơm bằng tay và giảm độ nhạy. Còn nếu thể tích bơm mẫu quá lớn sẽ gây doãn pic, giảm tuổi thọ của cột, tắt cột.

Để khảo sát thể tích bơm mẫu, chúng tôi sử dụng chuẩn hỗn hợp axit oleic (0,1 mg/ml) và linoleic (0,15 mg/ml) sau khi este hóa, với các điều kiện tối ưu như trên và chỉ thay đổi thể tích bơm mẫu lần lượt là 0,2 μ l; 0,6 μ l; 1,0 μ l; 1,4 μ l.

Kết quả thu được ở bảng 3.3 và hình 3.5

Bảng 3.3: Ảnh hưởng của thể tích bơm mẫu đến quá trình phân tích

V (μ l)	t_R MeLino (phút)	t_R MeOle (phút)	Δt_R (phút)	Hệ số phân giải R	S_{MeLino}	S_{MeOLe}
0,2	17,368	17,510	0,0142	1,116	84820,2	54003,1
0,6	17,354	17,497	0,0143	1,113	183872,3	119620,8
1,0	17,341	17,483	0,0142	1,097	248491,9	159887,0
1,4	17,342	17,483	0,0141	1,098	334066,8	214565,0



Hình 3.5: Ảnh hưởng của thể tích bơm mẫu đến quá trình phân tích

Nhận xét: Khi ta thay đổi thể tích bơm mẫu thì hiệu số thời gian lưu Δt_R (0,141 – 0,143) và độ phân giải R (xấp xỉ 1,1) của các pic sắc ký gần như không đổi, các pic sắc ký đều đối xứng. Ở đây chúng tôi chọn thể tích bơm mẫu là 1,0 μ l để có độ nhạy cao và sai số phân tích thấp khi bơm bằng tay.

3.1.5. Tổng kết điều kiện chạy sắc ký

Sau khi khảo sát các điều kiện có thể ảnh hưởng đến quá trình phân tích, chúng tôi đã lựa chọn các điều kiện tối ưu được thể hiện trong bảng 3.4.

Bảng 3.4 : Điều kiện chạy tối ưu cho phân tích đồng thời axit oleic và linoleic sau khi metyl este hóa

Cột tách	HP-5 (Polimetylsiloxan có 5% phenyl) 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m.
Khí mang	Khí N ₂
Tốc độ khí mang	0,8 ml/phút
Chương trình nhiệt độ	150 ⁰ C giữ 1 phút, tăng 10 ⁰ C/phút đến 200 ⁰ C, giữ 1 phút, tăng 2 ⁰ C/phút đến 250 ⁰ C, giữ 1 phút, tăng 10 ⁰ C/phút đến 270 ⁰ C, giữ 10 phút.
Nhiệt độ buồng tiêm mẫu	250 ⁰ C
Nhiệt độ FID	280 ⁰ C
Thể tích bơm mẫu	1 μ l
Kiểu bơm	Bơm chia dòng với tỉ lệ 10:1

3.2. Tối ưu hóa quá trình metyl este hóa

3.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích NaOH/MeOH 0,5M

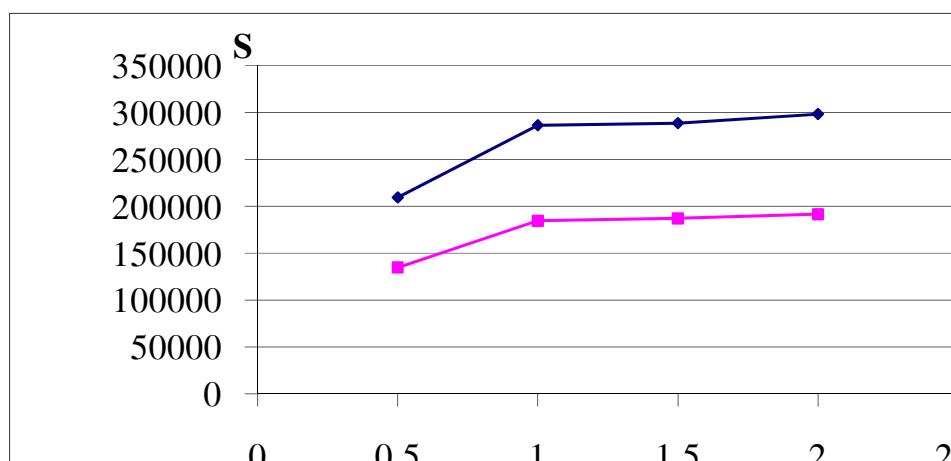
Quá trình metyl hóa este phụ thuộc khá nhiều vào khả năng chuyển từ dạng kém phản ứng (axít hay este) sang dạng các muối cacboxylat dễ phản

ứng hơn. Do đó việc khảo sát hàm lượng NaOH/MeOH 0,5M cho vào mẫu phân tích là cần thiết, nhằm đạt hiệu suất chuyển hóa este tối đa.

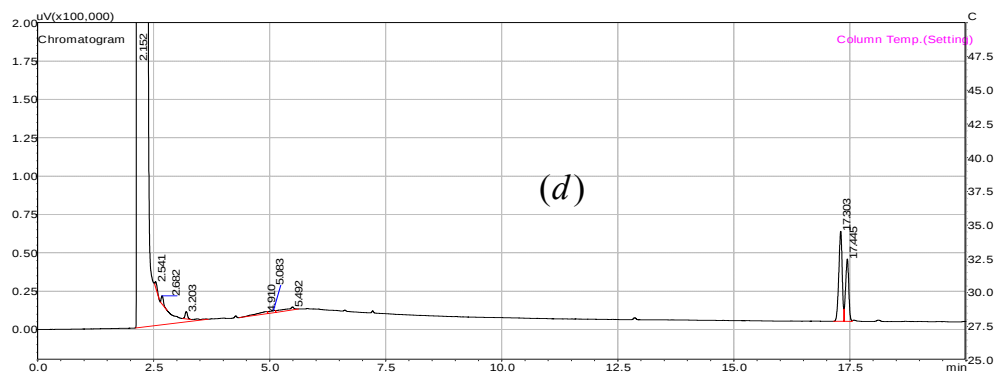
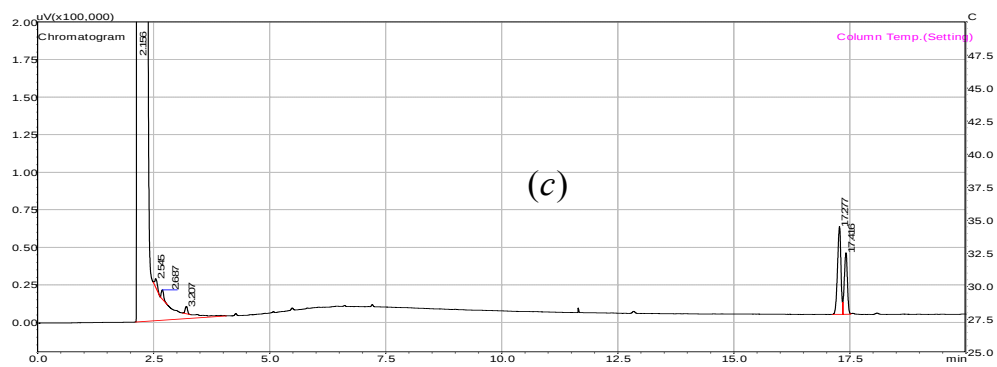
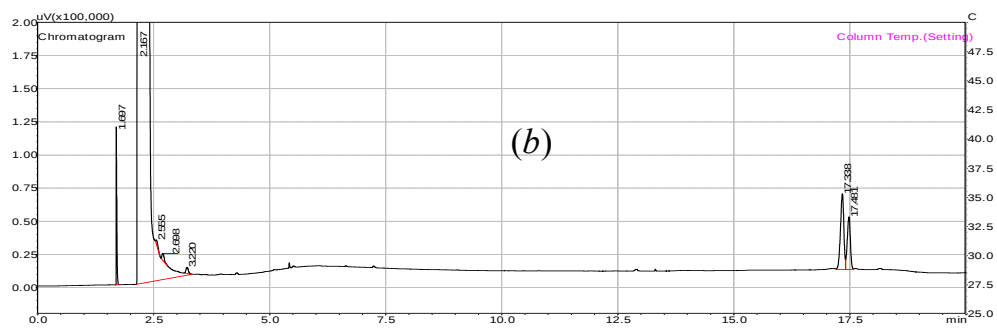
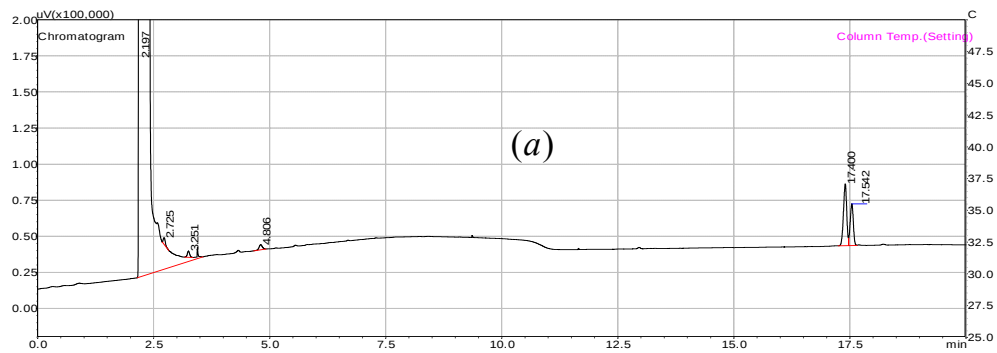
Dựa vào qui trình chuẩn bị mẫu chuẩn ở mục 2.2.2.1, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu chuẩn hỗn hợp axit oleic (0,1mg/ml) và axit linoleic (0,15 mg/ml) với các thông số khác giữ nguyên, chỉ thay đổi thể tích NaOH/MeOH 0,5M lần lượt là 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml. Kết quả thu được ở bảng 3.5 và các hình 3.6, 3.7.

Bảng 3.5: Ảnh hưởng của thể tích NaOH/MeOH 0,5M đến quá trình este hóa

$V_{\text{NaOH/MeOH}} \text{ (ml)}$	S_{MeLino}	S_{MeOle}
0,5	209280,9	134770,9
1,0	286271,5	184540,2
1,5	288558,5	187000,6
2,0	298293,6	191626,4



Hình 3.6: Ảnh hưởng của thể tích NaOH/MeOH 0,5 M đến quá trình este hóa



Hình 3.7: Các sắc đồ este khi thay đổi thể tích NaOH/MeOH 0,5M
 (a)-V = 0,5 ml (b)-V = 1,0 ml (c)-V = 1,5 ml (d)-V = 2,0 ml.

Nhận xét: Khi thể tích NaOH/MeOH 0,5M tăng từ 0,5 đến 1 ml thì diện tích pic sắc ký có tăng, điều này phù hợp với lý thuyết nghiên cứu. Nhưng khi tăng từ 1 đến 2 ml thì diện tích các pic sắc ký tăng không đáng kể. Điều này có thể được giải thích là do ứng với thể tích từ 1 ml trở lên, các axit trong mẫu được chuyển hóa hoàn toàn thành dạng cacboxylat. Như vậy, trong trường hợp này, chúng tôi chọn thể tích NaOH/MeOH 0,5M tối ưu cho quá trình este hóa là 2,0 ml.

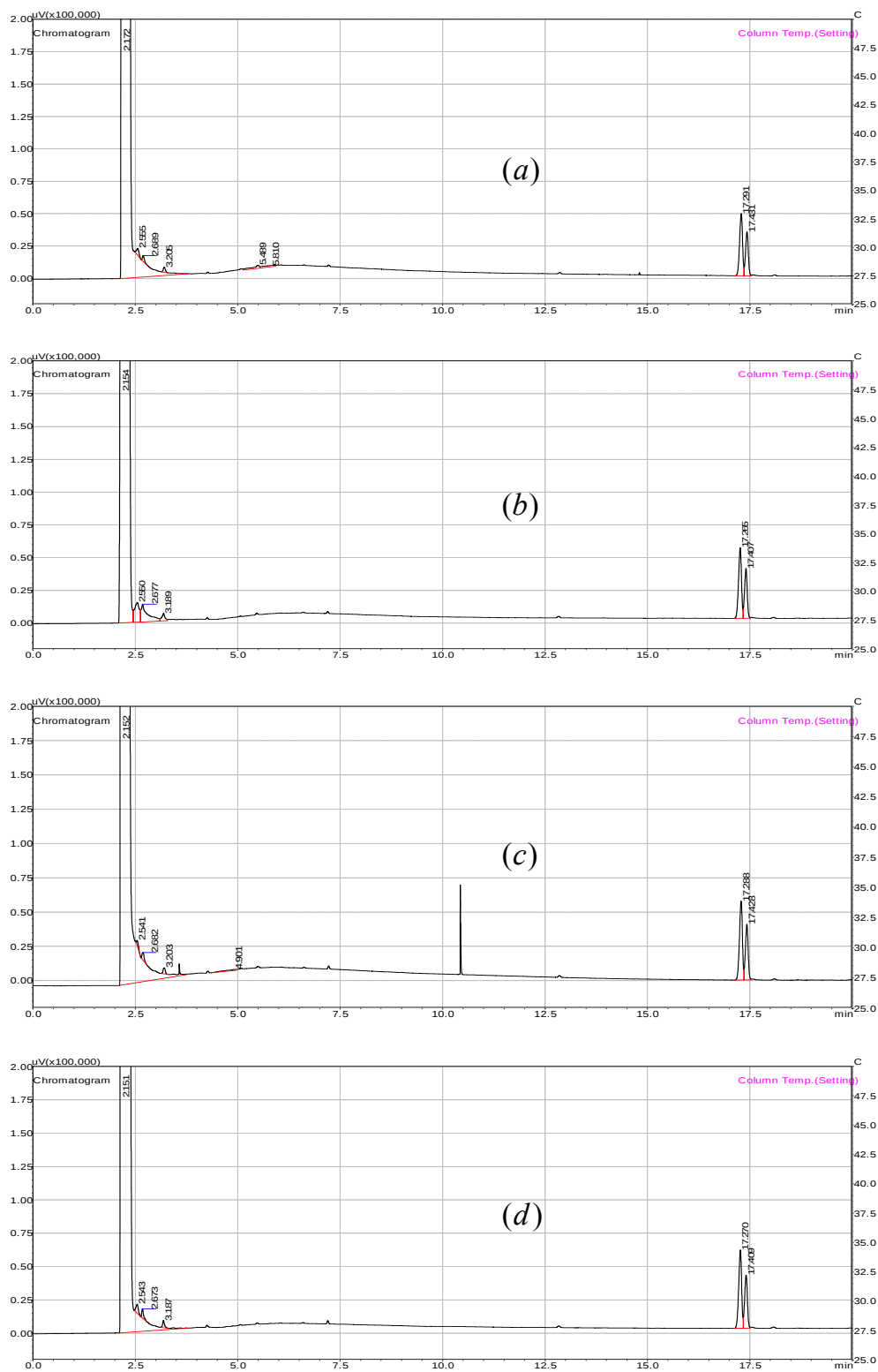
3.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích BF_3/MeOH 20%

Phản ứng este hóa thuộc dạng phản ứng thuận nghịch nên muốn thu được sản phẩm este thường phải tốn thời gian rất lâu và không hoàn toàn. Để giảm thời gian este hóa, người ta thường dùng các xúc tác khác nhau trong đó hệ xúc tác axit yếu BF_3/MeOH 20% hay được lựa chọn.

Dựa vào qui trình chuẩn bị mẫu chuẩn, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu chuẩn hỗn hợp axit oleic (0,1 mg/ml) và axit linoleic (0,15 mg/ml) với các thông số khác giữ nguyên, chỉ thay đổi thể tích BF_3/MeOH 20% lần lượt là 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml. Kết quả thu được ở bảng 3.6 và các hình 3.8, 3.9.

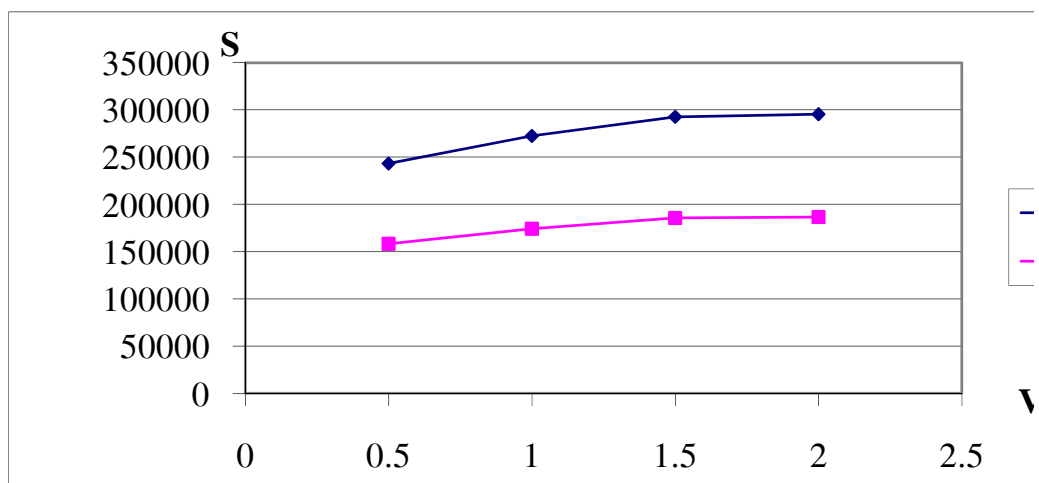
Bảng 3.6 : Ảnh hưởng của thể tích BF_3/MeOH 20% đến quá trình este hóa

$V_{\text{BF}_3/\text{MeOH}}$ (ml)	S_{MeLino}	S_{MeOle}
0,5	243194,5	158239,3
1,0	272495,5	174175,9
1,5	292768,1	185606,8
2,0	295612,5	186618,4



Hình 3.8: Các sắc đồ este khi thay đổi thể tích BF_3/MeOH 20%

(a)-V = 0,5 ml (b)-V = 1,0 ml (c)-V = 1,5 ml (d)-V = 2,0 ml.



Hình 3.9: Ảnh hưởng của thể tích BF_3/MeOH 20% đến quá trình este hóa

Nhận xét: Dựa vào hình 3.9 ta thấy khi tăng thể tích BF_3/MeOH 20% thì diện tích các pic sắc ký tăng, nghĩa là hiệu suất este hóa tăng, và không đổi trong khoảng từ 1,5 đến 2,0 ml. Điều này hoàn toàn phù hợp với lý thuyết và đối với 100 mg mẫu thì ta có thể dùng từ 1,5 ml BF_3/MeOH 20% trở lên làm chất xúc tác cho phản ứng este hóa. Do đó chúng tôi chọn thể tích BF_3/MeOH 20% tối ưu là 2,0 ml.

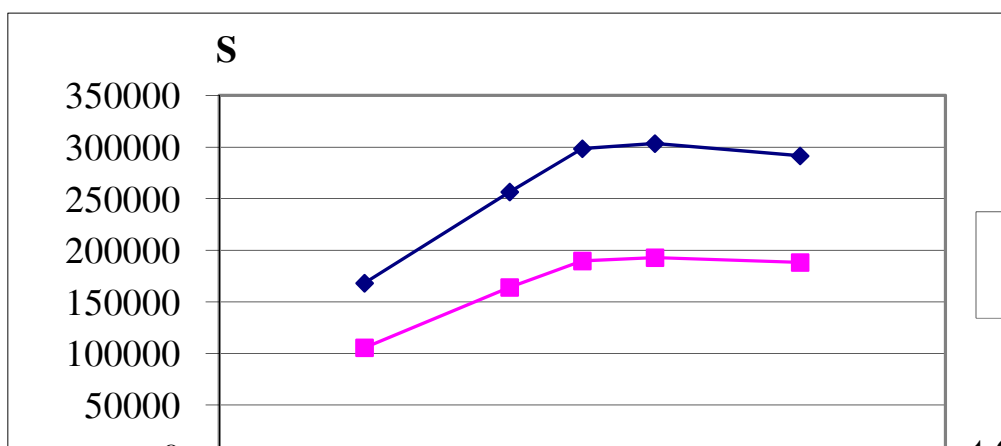
3.2.3. Khảo sát ảnh hưởng thời gian este hóa

Phản ứng este hóa là một phản ứng thuận nghịch và thường xảy ra chậm nên cần thời gian khá lâu để thực hiện phản ứng nhất là khi không có chất xúc tác. Tuy nhiên nếu đun quá lâu, khi phản ứng đã đạt trạng thái cân bằng, có thể tốn nhiều thời gian phân tích không cần thiết và còn làm cho mất chất phân tích vì các este là các chất dễ bay hơi. Do đó việc khảo sát thời gian este hóa là cần thiết.

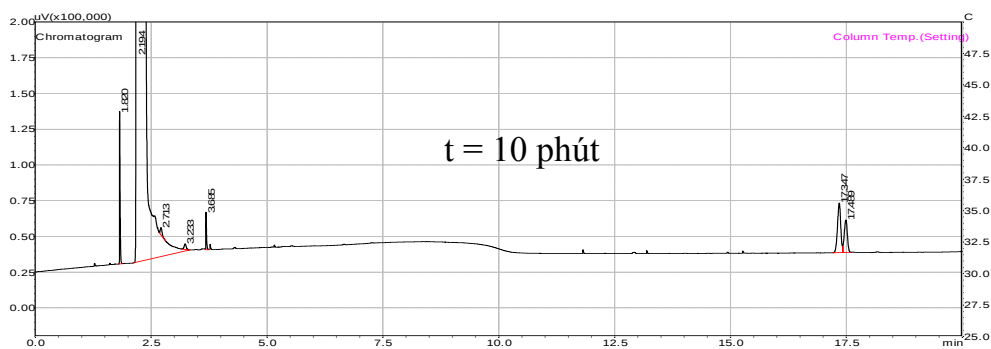
Dựa vào qui trình chuẩn bị mẫu chuẩn, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu hỗn hợp axit oleic (1,0mg/ml) và axit linoleic (0,15mg/ml) với các thông số khác giữ nguyên, lần lượt thay đổi thời gian este hóa là 10 phút, 20 phút, 25 phút, 30 phút, 40 phút. Kết quả thu được ở bảng 3.7 và các hình 3.10, 3.11.

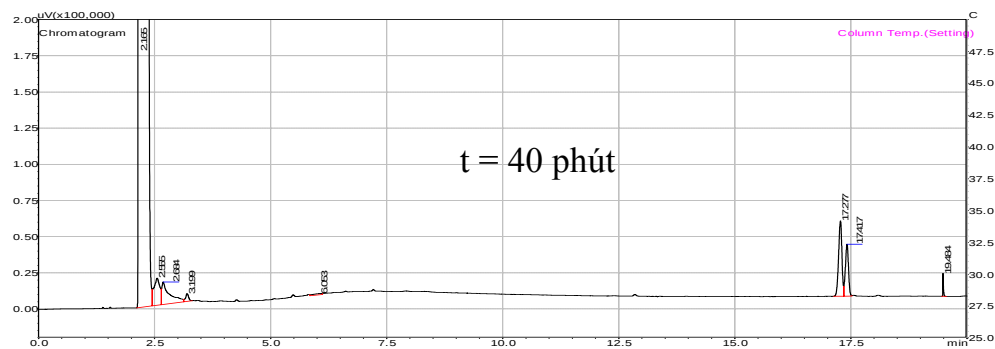
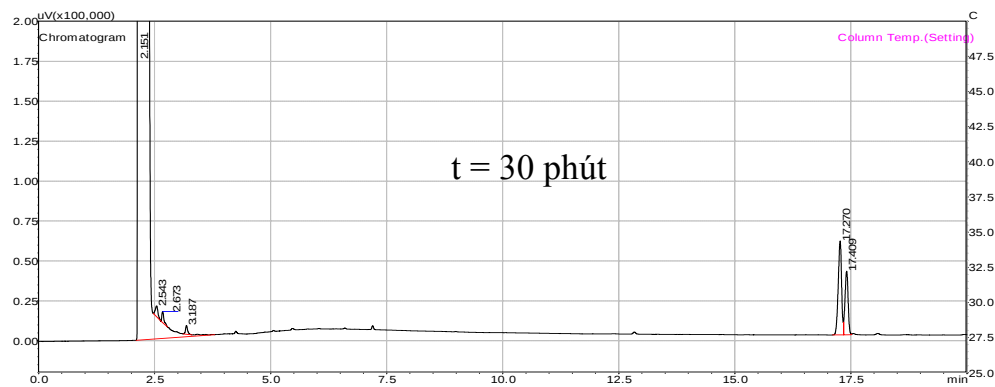
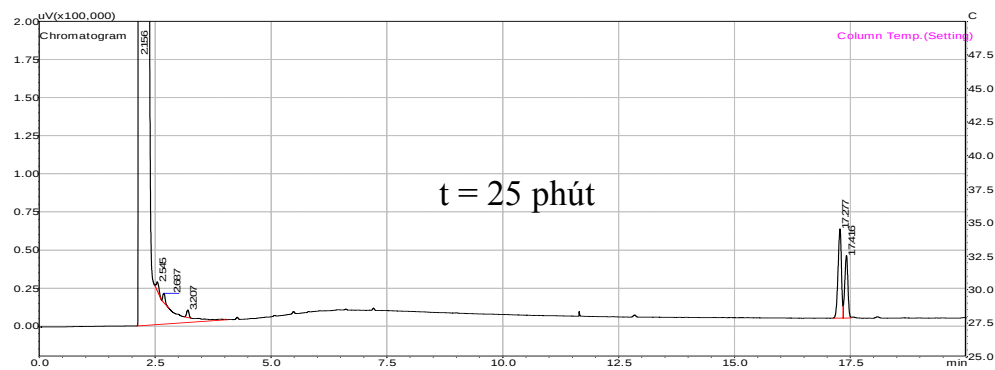
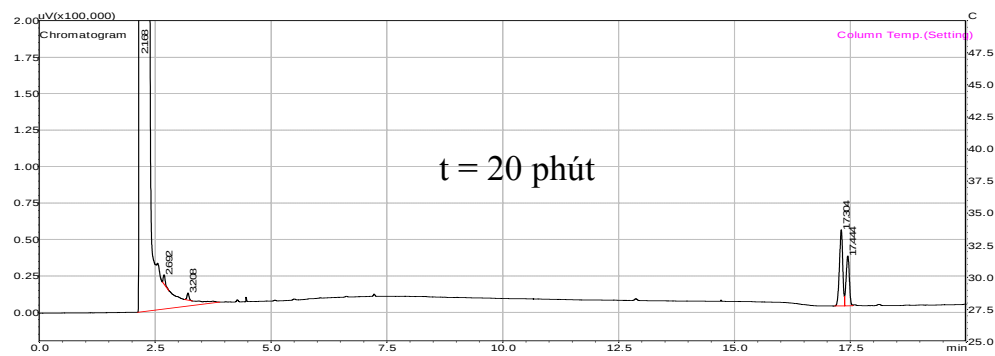
Bảng 3.7: Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình este hóa

t (phút)	S_{MeLino}	S_{MeOle}
10	168005,2	105548,2
20	256461,4	164077,7
25	298363,3	189602,9
30	303441,3	192771,7
40	291383,2	188118,8



Hình 3.10: Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình este hóa





Hình 3.11: Sắc đồ các este theo thời gian este hóa

Nhận xét: Dựa vào hình 3.10 ta thấy theo thời gian thì diện tích các pic sắc ký tăng dần, nghĩa là hiệu suất este hóa tăng dần, và đạt cân bằng trong khoảng từ 25 – 40 phút. Do đó chúng tôi chọn thời gian este hóa tối ưu cho quá trình chuẩn bị mẫu chuẩn hỗn hợp là 30 phút nhằm đạt hiệu suất chuyển hóa tối đa mà không mất nhiều thời gian, gây lãng phí và mất chất phân tích.

3.2.4. Quy trình chuẩn bị mẫu chuẩn hỗn hợp

Dựa vào các điều kiện tối ưu cho quá trình metyl este hóa đã khảo sát ở trên, chúng tôi đề ra quy trình chuẩn bị mẫu chuẩn như sau:

Cân chính xác lần lượt 100 mg chuẩn axit oleic và 150 mg chuẩn axit linoleic cho vào bình định mức 10 ml. Định mức bằng dung môi n-hexan. Ta thu được dung dịch chuẩn của axit oleic và linoleic có nồng độ tương ứng là 10 mg/ml và 15 mg/ml. Lấy 0,1 ml dung dịch này cho vào ống nghiệm 20 ml có nút xoáy. Thêm vào ống nghiệm 2,0 ml dung dịch NaOH 0,5M pha trong metanol, đậy kín nắp, lắc ống nghiệm trong thời gian 15 phút. Cho tiếp 2,0 ml BF_3 20% trong metanol, sục khí N_2 , đun cách thủy 80°C trong 30 phút. Mẫu sau đó được chiết bằng 4 ml dung dịch n-hexan (chiết 2 lần). Dịch chiết n-hexan được định mức đến 10 ml. Ta được các dung dịch chuẩn axit oleic và linoleic đã este hóa có nồng độ tương ứng là 0,1 mg/ml và 0,15 mg/ml.

3.3. Xây dựng phương pháp định lượng hỗn hợp hai axit béo

3.3.1. Khảo sát giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Trong một qui trình phân tích bất kì, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) là 2 thông số quan trọng.

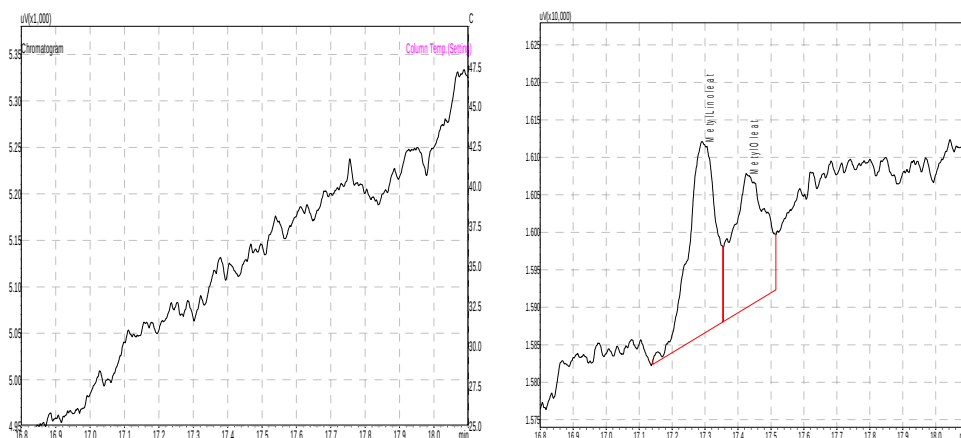
Giới hạn phát hiện là giá trị nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà hệ thống phân tích còn cho tín hiệu phân tích khác có nghĩa với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu của đường nền.

Giới hạn định lượng được xem là nồng độ thấp nhất của chất phân tích mà hệ thống phân tích định lượng được với tín hiệu phân tích khác có nghĩa

với tín hiệu của mẫu trắng hay tín hiệu nền. Thông thường LOQ được tính như sau:

$$LOQ = \frac{10}{3} LOD$$

Để tiến hành xác định các giá trị LOD và LOQ, chúng tôi pha loãng chuẩn hỗn hợp các axit béo đã được metyl este hóa liên tiếp 2 hoặc 5 lần, sau đó bơm lên cột GC đến khi nào chiều cao pic sắc ký bằng 3 lần nhiễu đường nền thì dừng lại và lấy đó là giới hạn phát hiện của thiết bị. Kết quả thể hiện trong hình 3.12 cho thấy giới hạn phát hiện của axit linoleic là 0,6 µg/ml và của axit oleic là 0,4 µg/ml.



Hình 3.12: Mẫu trắng (n-hexan) và mẫu chuẩn hỗn hợp axit linoleic (0,6 µg/ml) và axit oleic (0,4 µg/ml)

Từ đó suy ra giới hạn định lượng của thiết bị là :

- Axit linoleic: $\frac{10}{3} \times 0,6 \approx 2,0 \mu\text{g/ml}$.
- Axit oleic : $\frac{10}{3} \times 0,4 \approx 1,3 \mu\text{g/ml}$.

Các giá trị LOD và LOQ của 2 axit béo được tóm tắt trong bảng 3.8.

Bảng 3.8: Giá trị LOD và LOQ của axit linoleic và oleic

Tên axit	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Axit linoleic	0,6	2,0
Axit oleic	0,4	1,3

Nhận xét: Thiết bị sử dụng có khả năng phát hiện tốt, cho giá trị LOD và LOQ thấp (LOD dưới 1 $\mu\text{g/ml}$, và LOQ dưới 2 $\mu\text{g/ml}$), hoàn toàn phù hợp để phân tích 2 axit béo trên trong mẫu thật theo qui trình đã đề xuất.

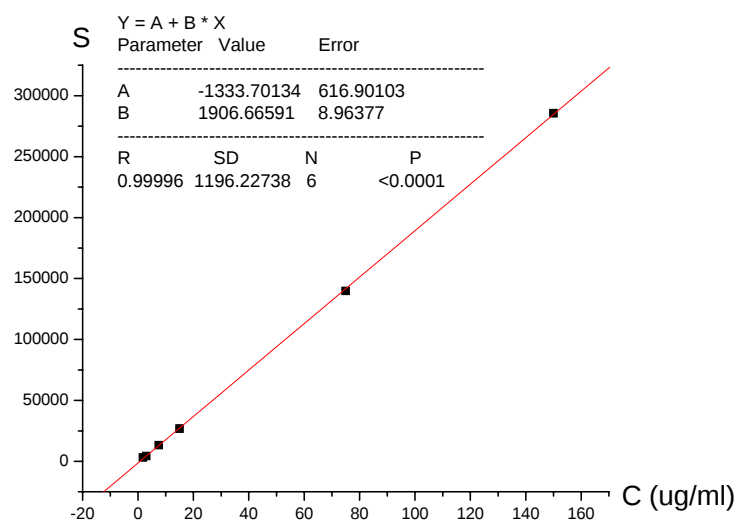
3.3.2. Khảo sát khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính là một thông số quan trọng của qui trình phân tích. Một chất chỉ có thể định lượng tốt theo phương pháp đường chuẩn hay thêm chuẩn khi nồng độ của chất phân tích nằm trong khoảng tuyến tính.

Để khảo sát khoảng tuyến tính giữa nồng độ của các axit béo và diện tích pic sắc ký, chúng tôi lần lượt pha các dung dịch chuẩn hỗn hợp axit béo, sau khi đã metyl este hóa được bơm vào cột GC. Kết quả cho ở các bảng 3.9, 3.10 và các hình 3.13, 3.14.

Bảng 3.9: Mối quan hệ giữa nồng độ axit linoleic diện tích pic sắc ký

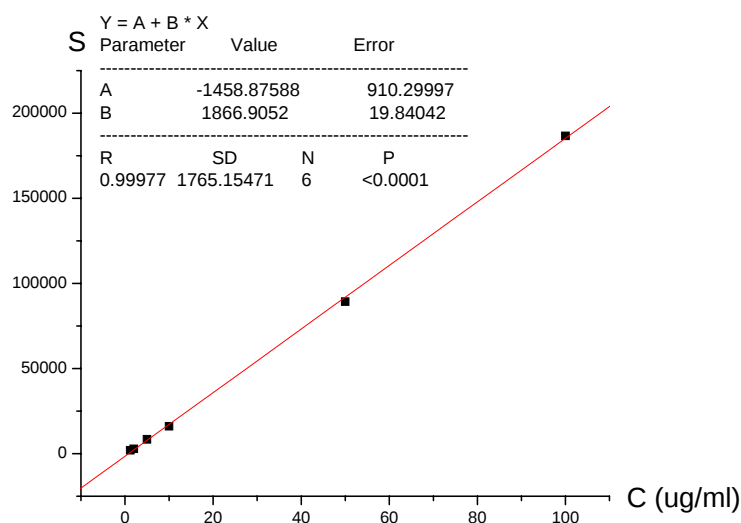
Axit linoleic	
C ($\mu\text{g/ml}$)	S _{pic}
1,8	3121,1
3,0	4317,3
7,5	13317,1
15	26889,5
75	139792,1
150	285612,5



Hình 3.13: Quan hệ giữa diện tích pic sắc ký và nồng độ axit linoleic

Bảng 3.10: Mối quan hệ giữa nồng độ axit oleic diện tích pic sắc ký

Axit oleic	
C (µg/ml)	S
1,2	2021,7
2,0	2830,6
5,0	8473,4
10	16091,2
50	89224,9
100	186618,4



Hình 3.14: Quan hệ giữa diện tích pic sắc ký và nồng độ axit oleic

Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính cho ta các phương trình hồi qui sau.

Bảng 3.11: Phương trình hồi qui các axit béo

Tên axit	Phương trình hồi qui	Hệ số tương quan	Khoảng tuyến tính (µg/ml)
Linoleic	Y = (1906,67±8,96) X - (1333,70±616,90) (3.1)	0,99996	1,8 – 150
Oleic	Y = (1866,90±19,84)X - (1458,9±910,30) (3.2)	0,99977	1,2 – 100

Nhận xét: Qua các kết quả phân tích và thống kê ta thấy, tỉ lệ diện tích pic sắc ký và nồng độ các axit béo phụ thuộc tuyến tính với nhau một cách chặt chẽ với hệ số tương quan cao, $R > 0,9997$. Khoảng tuyến tính rộng: đối với axit linoleic từ 1,8 – 150 µg/ml và axit oleic từ 1,2 – 100 µg/ml. Do đó ta có thể sử dụng các phương pháp đường chuẩn hay thêm chuẩn để định lượng các axit linoleic và oleic trong mẫu thật ở khoảng tuyến tính đã khảo sát.

3.3.3. Khảo sát độ lặp lại của phép đo

Một phương pháp phân tích tốt ngoài yêu cầu về độ đúng của phương pháp người ta còn chú ý độ lặp lại của phương pháp. Độ lặp lại của hệ thống sắc ký được khảo sát bằng cách bơm 5 lần cùng một mẫu chuẩn hỗn hợp axit oleic (0,1mg/ml) linoleic (0,15mg/ml) đã được metyl este hóa vào máy sắc ký khí. Các mẫu được phân tích theo đúng điều kiện chạy máy đã nêu ở mục 3.1.4. Kết quả được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn (S) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic sắc ký S_{pic} và thời gian lưu t_R theo công thức (2.9) và (2.10). Các số liệu được ghi chi tiết ở bảng 3.12 và 3.13

Bảng 3.12: Độ lặp lại của hệ thống sắc ký khí đối với metyl linoleat

Tên chất	t_R (phút)	Số liệu thống kê t_R	S_{pic}	Số liệu thống kê S_{pic}
Metyl linoleat (n = 5)	17,227	$x_{tb} = 17,234$ $S = 0,022$ $RSD = 0,13\%$	25423,5	$x_{tb} = 25042,4$ $S = 245,0$ $RSD = 0,98\%$
	17,236		24846,2	
	17,255		24919,4	
	17,276		25151,8	
	17,223		24871,3	

Bảng 3.13: Độ lặp lại của hệ thống sắc ký khí đối với metyl oleat

Tên chất	t_R (phút)	Số liệu thống kê t_R	S_{pic}	Số liệu thống kê S_{pic}
Metyl oleat (n = 5)	17,372	$x_{tb} = 17,388$ $S = 0,022$ $RSD = 0,13\%$	16794,6	$x_{tb} = 16633,1$ $S = 178,1$ $RSD = 1,07\%$
	17,379		16610,0	
	17,400		16337,9	
	17,420		16691,3	
	17,369		16731,6	

Nhận xét: Theo kết quả khảo sát ta thấy hệ thống sắc ký khí có độ lặp lại tốt. Đối với phân tích định tính, thông số thời gian lưu t_R có độ lệch chuẩn tương đối rất nhỏ là 0,13%, và đối với phân tích định lượng, thông số diện tích pic S_{pic} có RSD là 0,98% và 1,07% ứng với các metyl este của axit linoleic và oleic. Quy trình phân tích ổn định và có thể áp dụng để phân tích mẫu thật.

3.4. Ứng dụng quy trình phân tích các mẫu dầu Gấc

3.4.1. Xử lý sơ bộ mẫu phân tích

Mẫu dầu Gấc được thu thập từ các hiệu thuốc về, ghi lại các thông tin về mẫu, bao bì sản xuất, ngày sản xuất, số đăng kí kiểm soát, ngày hết hạn và thành phần như trong bảng 3.14. Trong khuôn khổ luận văn, chúng tôi khảo sát 4 lọ viên nang : 3 lọ VINAGA và 1 lọ VINADICA.

Bảng 3.14: Một số mẫu dầu Gấc dùng để phân tích

Tên mẫu	M1	M2	M3	M4
Nhà sản xuất	Công ty chế biến dầu thực vật và thực phẩm Việt Nam			Công ty TNHH được phẩm Lạc Việt
Tên sản phẩm	VINAGA			VINADICA
Ngày sản xuất	07/2008	12/2008	28/10/2009	15/12/2009
Ngày hết hạn	07/2011	12/2011	28/10/2012	12/2012
Số đăng kí	6341/2007/YT-CNTC			1279/2007/YT-CNTC
Thành phần	Dầu Gấc tinh khiết chứa beta caroten, lycopene, vitamin E, chất béo thực vật . . . và các vi chất cho cơ thể con người.			

3.4.2. Phân tích mẫu thật

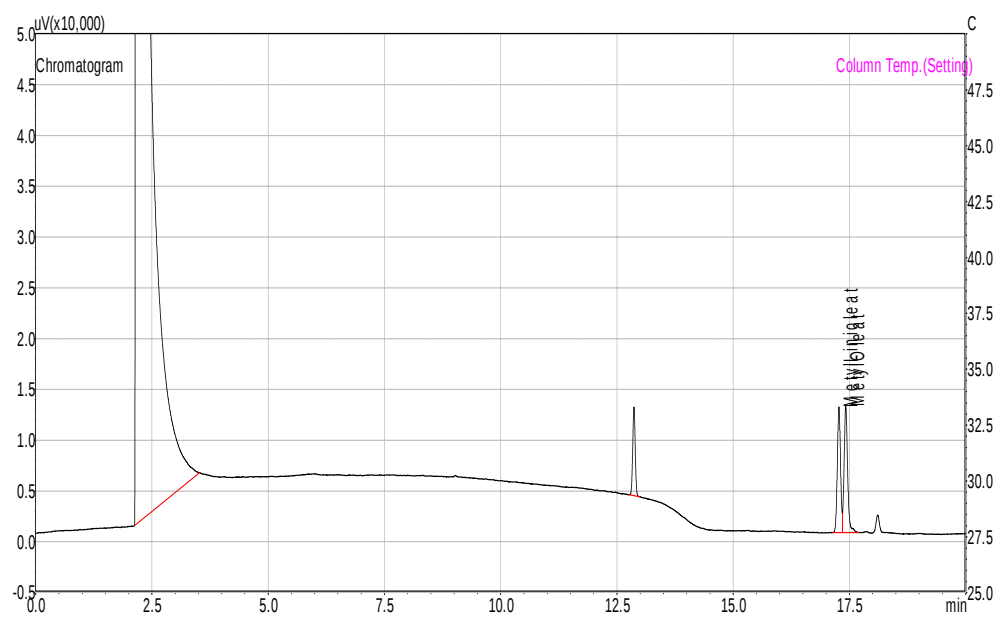
3.4.2.1. Xử lý mẫu phân tích

Do các mẫu nằm ở dạng lỏng trong viên nang nên chúng tôi đã tiến hành cân chính xác 100 mg dầu Gấc cho vào bình định mức 10 ml. Định mức bằng dung môi n-hexan. Lấy 0,1 ml dung dịch này cho vào ống nghiệm 20 ml có nút xoáy. Thêm vào ống nghiệm 2,0 ml dung dịch NaOH 0,5M pha trong metanol, đậy kín nắp, lắc ống nghiệm trong thời gian 15 phút. Cho tiếp 2,0 ml BF₃ 20% trong metanol, sục khí N₂, đun cách thủy 80⁰C trong 30 phút. Mẫu sau đó được chiết bằng 4 ml dung dịch n-hexan (chiết 2 lần). Dịch chiết n-hexan được định mức đến 10 ml. Sau đó cho dịch chiết này vào các lọ nhỏ (vial) dùng để bơm trực tiếp vào cột GC.

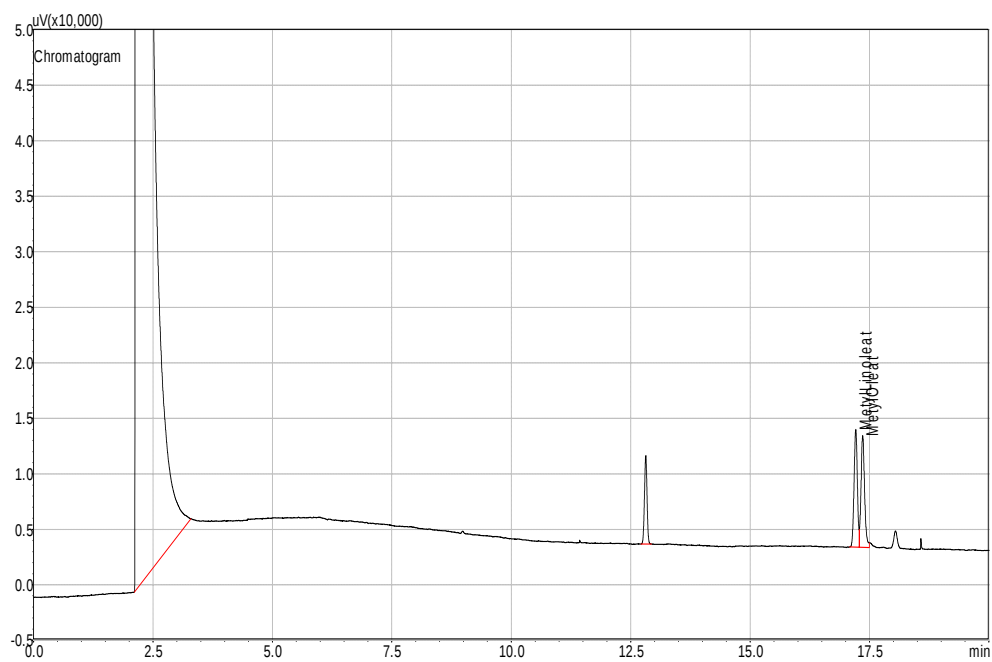
3.4.2.2. Kết quả phân tích mẫu thật

Mỗi mẫu phân tích M1, M2, M3, M4 được tiến hành phân tích 3 lần trong cùng điều kiện xử lý mẫu và điều kiện chạy sắc ký. Dựa vào các phương trình hồi qui (3.1) và (3.2) để xác định hàm lượng của các axit béo

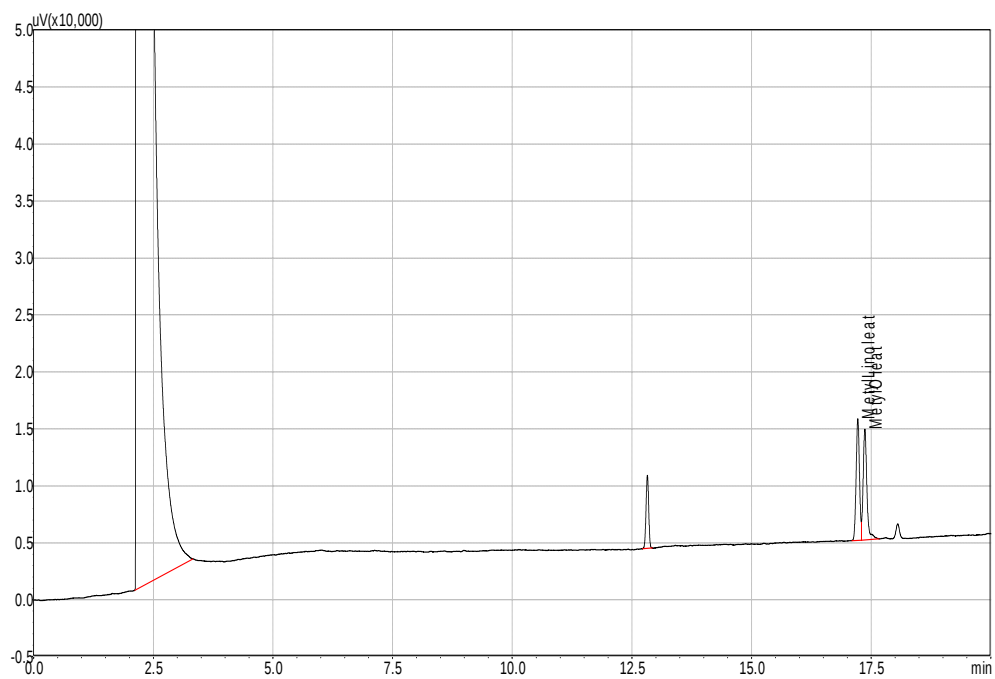
trong mẫu. Kết quả phân tích được cho ở bảng 3.15 và các hình 3.15, 3.16, 3.17 và 3.18.



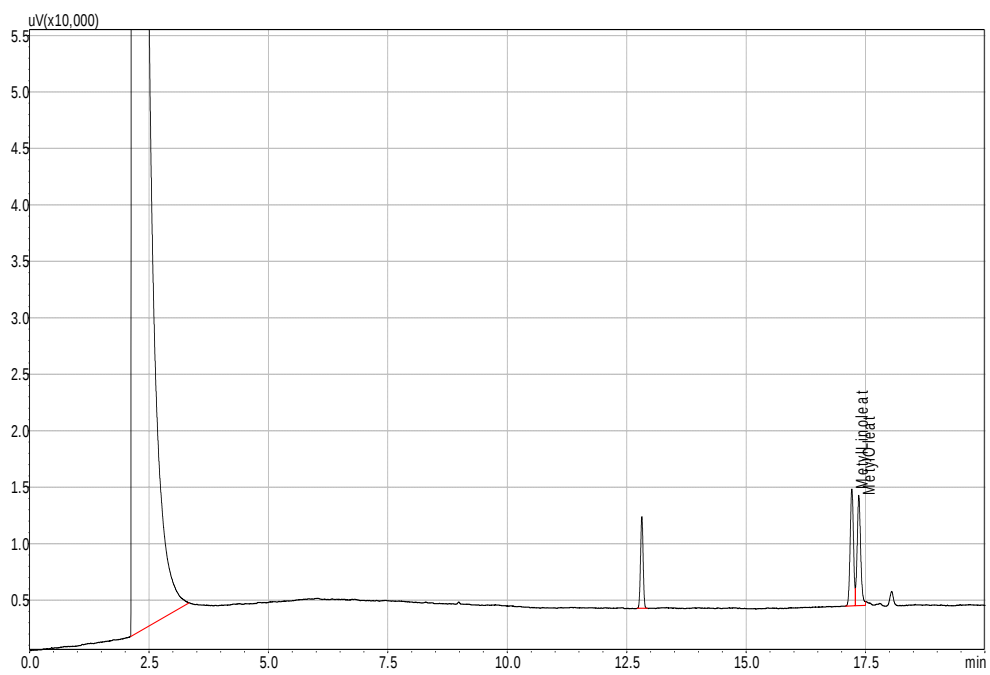
Hình 3.15: Sắc đồ của mẫu dầu Gấc M1



Hình 3.16: Sắc đồ của mẫu dầu Gấc M2



Hình 3.17: Sắc đồ của mẫu dầu Gác M3



Hình 3.18: Sắc đồ của mẫu dầu Gác M4

Bảng 3.15: Kết quả phân tích các mẫu dầu Gấc

Mẫu	S _{MeLino}	S _{MeOle}	C _{Linoleic} (µg/ml)	C _{Oleic} (µg/ml)
M1	51834,8	52671,1	27,88	28,99
	52617,3	52435,6	28,30	28,87
	51456,2	53589,0	27,69	29,49
M2	51505,9	52288,0	27,71	28,79
	51327,0	51176,5	27,62	28,199
	50658,9	51628,9	27,27	28,44
M3	52527,1	53015,5	28,25	29,18
	51917,0	52852,8	27,93	29,098
	52016,9	52616,4	27,98	28,96
M4	52436,7	53233,0	28,20	29,30
	51550,4	53098,5	27,74	29,22
	51236,9	53189,7	27,57	29,27

Từ nồng độ các axit béo tìm được trong mẫu, ta qui đổi sang hàm lượng của chúng có trong 100 mg mẫu như sau:

$$m_{\text{cpt}} = C_x \cdot V \cdot F$$

trong đó: m_{cpt} là khối lượng chất phân tích có trong 100 mg mẫu (mg)

C_x là nồng độ chất phân tích tính theo phương trình hồi qui (µg/ml)

V: thể tích dung dịch được pha từ 100 mg mẫu

F: hệ số pha loãng

10^{-3} : là hệ số chuyển đổi từ µg sang mg.

Vậy ta có: $m_{\text{cpt}} \text{ (mg)} = C_x \text{ (µg/ml)} \cdot 10 \text{ (ml)} \cdot 100 \cdot 10^{-3} \text{ (mg/µg)} = C_x \text{ (mg)}$.

Như vậy theo qui trình phân tích ở trên ta có hàm lượng các axit béo không no trong các mẫu dầu Gấc được tóm tắt trong bảng 3.16.

Bảng 3.16: Hàm lượng của các axit béo trong mẫu dầu Gấc

Mẫu	Axit Linoleic (%)	Axit Oleic (%)
M1	27,88	28,99
	28,30	28,87
	27,69	29,49
M1(tb)	$27,96 \pm 0,78$	$29,12 \pm 0,82$
M2	27,71	28,79
	27,62	28,199
	27,27	28,44
M2(tb)	$27,53 \pm 0,58$	$28,48 \pm 0,74$
M3	28,25	29,18
	27,93	29,10
	27,98	28,96
M3(tb)	$28,05 \pm 0,43$	$29,08 \pm 0,28$
M4	28,20	29,30
	27,74	29,22
	27,57	29,27
M4(tb)	$27,84 \pm 0,81$	$29,26 \pm 0,10$

Dựa vào kết quả phân tích hàm lượng các axit béo không no ở trên ta có các nhận xét sau:

+ Hàm lượng các axit béo trong các mẫu dầu Gấc khá ổn định, đối với axit linoleic từ 27,53 – 28,05 % và của axit oleic từ 28,48 – 29,26 %.

+ Trong các mẫu dầu Gấc, hàm lượng 2 axit béo không chênh lệch nhiều (1 – 1,5%) dù hàm lượng axit linoleic có ít hơn axit oleic.

+ Trong các mẫu của VINAGA (M1 – M3), hàm lượng của từng axit thay đổi không đáng kể theo thời gian (27,53 – 28,05%) . Qua đó cho ta thấy thành phần của dầu Gấc khá ổn định trong thời gian còn hạn sử dụng, và sản phẩm có độ tin cậy cao khi dùng.

+ Hàm lượng của các axit béo trong mẫu dầu Gấc của 2 nhà sản xuất là tương đối giống nhau cho thấy qui trình sản xuất viên nang dầu Gấc của các nhà sản xuất ổn định.

KẾT LUẬN

Kết quả đề tài “Xác Định Một Số Axít Béo Trong Dầu Gấc Bằng Kỹ Thuật Sắc Ký Khí” cho những kết luận sau:

1. Chọn được điều kiện phù hợp để tách và xác định đồng thời hai axít béo không no có hàm lượng cao trong dầu Gấc là axít oleic và axít linoleic bằng máy sắc ký khí với detector FID.

Cột tách	HP-5 (Polimetylsiloxan có 5% phenyl) 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m.
Khí mang	Khí N ₂
Tốc độ khí mang	0,8 ml/phút
Chương trình nhiệt độ	150 ⁰ C giữ 1 phút, tăng 10 ⁰ C/phút đến 200 ⁰ C, giữ 1 phút, tăng 2 ⁰ C/phút đến 250 ⁰ C, giữ 1 phút, tăng 10 ⁰ C/phút đến 270 ⁰ C, giữ 10 phút.
Nhiệt độ buồng tiêm mẫu	250 ⁰ C
Nhiệt độ FID	280 ⁰ C
Thể tích bơm mẫu	1 μ l
Kiểu bơm	Bơm chia dòng với tỉ lệ 10:1

2. Tối ưu hóa quá trình methyl este hóa các axít béo và đưa ra qui trình chuẩn bị mẫu chuẩn như sau:

Cân chính xác lần lượt 100 mg chuẩn axít oleic và 150 mg chuẩn axít linoleic cho vào bình định mức 10 ml. Định mức bằng dung môi n-hexan.

Lấy 0,1 ml dung dịch này cho vào ống nghiệm 20 ml có nút xoáy. Thêm vào ống nghiệm 2,0 ml dung dịch NaOH 0,5M pha trong metanol, đập

kín nắp, lắc ống nghiệm trong thời gian 15 phút. Cho tiếp 2,0 ml BF_3 20% trong metanol, sục khí N_2 , đun cách thủy 80°C trong 30 phút.

Mẫu sau đó được chiết bằng 4 ml dung dịch n-hexan (chiết 2 lần). Dịch chiết n-hexan được định mức đến 10 ml.

Ta được các dung dịch chuẩn axit oleic và linoleic đã metyl este hóa có nồng độ tương ứng là 0,1 mg/ml và 0,15 mg/ml.

3. Xác định được LOD, LOQ và khoảng tuyến tính cho hai axit oleic và linoleic như sau:

Tên axit	Axit linoleic	Axit oleic
LOD ($\mu\text{g/ml}$)	0,6	0,4
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	2,0	1,3
Phương trình hồi qui	$Y = (1906,67 \pm 8,96) X$ - $(1333,70 \pm 616,90)$	$Y = (1866,90 \pm 19,84) X$ - $(1458,9 \pm 910,30)$
Hệ số tương quan	0,99996	0,99977
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	1,8 – 150	1,2 – 100

4. Khảo sát và phân tích 4 mẫu thật, 3 mẫu VINAGA với thời gian xuất xưởng khác nhau và 1 mẫu VINADICA. Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng của 2 axit béo trên trong các hãng không khác nhau nhiều, và trong cùng một hãng cũng ít thay đổi theo thời gian khi sản phẩm còn trong hạn sử dụng. Điều này cho thấy các axit béo không no trong dầu Gấc có độ ổn định cao và có thể lưu trữ được lâu. Quy trình chiết xuất dầu Gấc của các nhà sản xuất ổn định.

Như vậy, từ các kết quả thu được, chúng tôi thấy phương pháp GC-FID có độ nhạy cao, thích hợp cho việc phân tích đồng thời các axit béo không no trong các mẫu dầu Gấc.

Chúng tôi hi vọng những nghiên cứu trên góp phần vào việc ứng dụng kỹ thuật GC-FID nói riêng hay kỹ thuật GC nói chung để xác định các axit béo trong các mẫu dầu thực vật hay nhiên liệu sinh học khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Đỗ Huy Bích (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb Khoa học kỹ thuật, Hà nội, tr. 861 – 863.
2. Bộ Y tế (1971), *Dược điển Việt Nam*, Nxb Y học, Hà nội, tr. 186 – 187.
3. Nguyễn Văn Đàn, Ngô Ngọc Khuyển (1999), *Hợp chất thiên nhiên dùng làm thuốc*, Nxb Y học, Hà nội, tr. 20 – 27.
4. Trần Công Khánh (2004), “Dầu gấc – Thuốc trường xuân”, *Tạp chí thuốc và sức khỏe*, Hà nội, số 258.
5. Đỗ Tất Lợi (1999), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, Hà Nội, tr. 920 – 921.
6. Tạ Thị Thảo (2006), *Bài Giảng Chuyên Đề Thống Kê Trong Hóa Phân Tích*, ĐH KHTN – ĐHQG Hà Nội.
7. Vũ Đình Trác (1986), *100 cây thuốc có tác dụng chữa bệnh*, Nxb Y học, Hà nội, tr. 175.
8. Phạm Hùng Việt (2003), *Cơ Sở Lý Thuyết Phương Pháp Sắc Ký Khí*, Nxb Khoa học kỹ thuật, Hà nội.

Tiếng Anh

9. Adosh Mehta, Annette M. Oeser and Michael G. Carlson (1998), “Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 719, pp. 9 – 23.
10. Albert Tomàs, Marc Tor, Gemma Villorbina, Ramon Canela, Mercè Balcells and Jordi Eras (2009), “A rapid and reliable direct method for quantifying meat acylglycerides with monomode microwave irradiation”, *J. Chromatography A*, 1216, pp. 3290 – 3295.
11. Bahrudin Saad, et al, (2007), “Determination of free fatty acids in palm oil samples using non-aqueous flow injection titrimetric method”, *Food Chemistry*, 102, pp. 1407.

12. Bialostosky K. et al (2002), "Dietary intake of macronutrients, micronutrients and other dietary constituents", United States 1988 – 1994, National Center for Health Statistics, *Vital Health Stat 11*, pp. 245.
13. Carrapiso A. I., García C (2000), "Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification", *Lipids*, 35, pp. 1167 – 1177.
14. Cunnane S, Anderson M (1997), "Pure linoleate deficiency in the rat: influence on growth, accumulation of n-6 polyunsaturates, and (1-¹⁴C) linoleate oxidation", *J Lipid Res*, 38, pp. 805 – 812.
15. Di Wu et al (2009), "Determination of α -linolenic acid and linoleic acid in edible oils using near-infrared spectroscopy improved by wavelet transform and uninformative variable elimination", *Analytical Chimica Acta*, 634, pp. 166 – 171.
16. Ernesto Mendez Antolin et al (2008), "Evaluation of five methods for derivatization and GC determination of a mixture of very long chain fatty acids (C_{24:0} – C_{36:0})", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, pp. 194 – 199.
17. Hans M.H. van Eijk, Johanne G. Bloemen and Cornelis H.C. Dejong (2009), "Application of liquid chromatography–mass spectrometry to measure short chain fatty acids in blood", *Journal of Chromatography B*, 877, pp. 719 – 724.
18. Hilditch, T.P and William, P.N. (1964), *The chemical Constituent of natural fats*, 4th edition, John Wiley & Son Inc, New York, pp. 319 – 331.
19. Ho J. R., et al. (1969), "A simple and ultrasensitive method for determination of free fatty acid by radiochemical assay", *Ana Biochem*, 31, pp. 426 – 436.
20. Ichihara K, Fukubayashi Y (2010), "Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography", *J Lipid Res*, 51, pp. 635 – 640.

21. Ichihara K, Shibahara A, Yamamoto K, Nakayama T (1996), “An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids”, *Lipids*, 31, pp. 535.
22. Ichihara K et al (2010), “Preparation of fatty acid methyl esters by selective methanolysis of polar glycerolipids”, *Lipids*, 45, pp. 367 – 374.
23. Jebens E., et al (1992), “Enzymatic microdetermination of plasma and serum free fatty acids”, *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 52, pp. 717 – 724.
24. Jinmao You, Weibing Zhang and Yukui Zhang (2001), “Simple derivatization method for sensitive determination of fatty acids with fluorescence detection by high-performance liquid chromatography using 9-(2-hydroxyethyl)-carbazole as derivatization reagent”, *Analytica Chimica Acta*, 436, pp. 163 – 172.
25. Jordi Eras, Javier Ferran, Belén Perpiña and Ramon Canela (2004), “Chlorotrimethylsilane, Chlorotrimethylsilane, a reagent for the direct quantitative analysis of fats and oils present in vegetable and meat samples”, *J Chromatography A*, 1047, pp. 157 – 161.
26. Marta Bernárdez, Laura Pastoriza, Gabriel Sampedro, Juan J. R. Herrera, and Marta L. Cabo (2005), “Modified method for the analysis of free Fatty Acids in Fish”, *J. Agric. Food Chem*, 53 (6), pp. 1903 – 1906.
27. Ruthig D. J. and Meckling-Gill KA (1999), “Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6”, *Journal of Nutrition*, 129, pp. 1791–1798.
28. Shantha N. C., Guillermo E. Napolitano (1992), “Gas chromatography of fatty acids”, *Journal of Chromatography A*, 624, pp. 37 – 51.
29. Thomas K. Smith (2003), “Analysis of FFA in edible oils by catalyzed end-point thermometric titrimetry (CETT)”, *J Am Oil Chem Soc*, 80, pp. 21 – 24.
30. Wade L. G. (2006), *Organic chemistry*, 6th edition, Pearson Prentice Hall Inc, New York, pp. 1200 – 1204.

31. Wolf J. H. and Korf J. (1988), “Automated solid-phase catalyzed pre-column derivatization of fatty acids for reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis with fluorescence detection”, *Journal of Chromatography A*, 436, pp. 437 – 445.
32. Yoshida S (2008), “Analysis of fatty acid compositions of human tissues using Fourier-transform infrared spectroscopy”, *Lipid Technology*, 20, pp. 184 – 186.