

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 11519:2016**

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT -  
XÁC ĐỊNH CÁC TRIGLYCERID ĐÃ POLYME HÓA -  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG THẨM THẤU GEL**

*Animal and vegetable fats and oils - Determination of polymerized triglycerides -  
Gel-permeation liquid chromatographic method*

**HÀ NỘI - 2016**

## Lời nói đầu

TCVN 11519:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 993.25, *Polymerized triglycerides in oils and fats, Gel-permeation liquid chromatographic method*.

TCVN 11519:2016 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F2 Dầu mỡ động vật và thực vật biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## **Dầu mỡ động vật và thực vật - Xác định triglycerid đã polyme hóa - Phương pháp sắc ký lỏng thẩm thấu gel**

*Animal and vegetable fats and oils - Determination of polymerized triglycerides -  
Gel-permeation liquid chromatographic method*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định các triglycerid đã polyme hóa trong dầu mỡ động vật và thực vật được gia nhiệt, không gia nhiệt và dầu mỡ dùng để chiên rán bằng phương pháp sắc ký lỏng thẩm thấu gel.

Hàm lượng các triglycerid đã polyme hóa trong dầu mỡ động vật và thực vật phải lớn hơn hoặc bằng 3 % khối lượng.

### **2 Tài liệu viện dẫn**

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6128 (ISO 661) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị mẫu thử.*

### **3 Nguyên tắc**

Dầu mỡ được hòa tan trong tetrahydrofuran, các triglycerid đã polyme hóa trong mẫu được tách bằng sắc ký lỏng thẩm thấu gel (GLPC), dựa trên kích cỡ phân tử và được định lượng bằng đo chỉ số khúc xạ.

#### 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác.

4.1 Pha động, tetrahydrofuran (không có peroxit, không có chất ổn định).

4.2 Dung dịch bảo quản, toluen.

**CẢNH BÁO – Tetrahydrofuran và toluen là các chất dễ cháy và độc khi hít phải. Cần sử dụng tủ hút khí phân tích.**

#### 4.3 Chất chuẩn dầu

Gia nhiệt khoảng 185 ml dầu đậu tương tinh khiết trong bình (5.7) đến nhiệt độ  $180\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  cho đến khi mức triglycerid đã polyme hóa đạt 10 % đến 15 % như phân tích trong Điều 8.

4.4 Natri sulfat, khan.

#### 5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị và dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm và các thiết bị, dụng cụ sau:

5.1 Hệ thống sắc ký lỏng thẩm thấu gel (GPC), bao gồm:

5.1.1 Bể chứa dung môi, có gắn bộ lọc thẳng pha động (cỡ lỗ 1  $\mu\text{m}$ )

5.1.2 Bơm LC, không xung, có tốc độ dòng từ 0,7 ml/min đến 1,5 ml/min

5.1.3 Đầu bơm, có thể tích chết thấp, có gắn vòng bơm mẫu 10  $\mu\text{l}$ .

5.2 Xyranh, dung tích 50  $\mu\text{l}$  đến 100  $\mu\text{l}$ , tương thích với bộ bơm.

5.3 Cột GPC, bằng thép không gỉ, đường kính trong 7,8 mm, dài 300 mm, được nhồi hạt siêu xốp polystyren-divinylbenzen hình cầu, đường kính hạt khoảng 5  $\mu\text{m}$ , cỡ lỗ 100  $\text{\AA}$ <sup>1)</sup>.

CHÚ THÍCH: Bảo quản cột trong toluen.

5.4 Detector chỉ số khúc xạ, có độ đáp ứng tối thiểu trên toàn thang đo  $\geq 1,10 \times 10^{-4}$  đơn vị chỉ số khúc xạ, có khả năng duy trì ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ môi trường vài độ.

CHÚ THÍCH: Nếu detector không gắn bộ gia nhiệt thì sử dụng nổi cách thủy có nhiệt độ không đổi để tuần hoàn.

---

<sup>1)</sup> Có thể sử dụng sản phẩm của PL Gel, Phenomenex, Torrance, CA, or Polymer Laboratories, Ltd, Stretton, Shropshire, Mỹ. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

**5.5 Bộ ghi,** phù hợp để hiển thị và định lượng diện tích pic, thời gian đáp ứng là 1,5 s (độ đáp ứng 90 % với 100 % tín hiệu). Tốc độ vẽ đồ thị từ 0,1 mm/min đến 10 mm/min. Độ đáp ứng từ 1 mV đến 100 mV. Chấp nhận tín hiệu từ detector (5.4).

**5.6 Máy tính và/hoặc bộ tích phân.**

**5.7 Bình cầu đáy tròn,** dung tích 250 ml, có vỏ bọc chịu nhiệt ở  $180\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**5.8 Bộ lọc,** cỡ lỗ 1  $\mu\text{m}$ , độ xốp trung bình, được làm bằng polytetrafluoroethylen (Teflon TFE) hoặc este cellulose.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng bộ phận lọc xyranh LC dùng một lần có bán sẵn.

**5.9 Bình nón.**

**5.10 Cân phân tích,** có thể cân chính xác đến 0,01 mg.

## **6 Lấy mẫu**

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555)<sup>[1]</sup>.

## **7 Chuẩn bị mẫu thử**

Chuẩn bị mẫu thử theo phương pháp nêu trong TCVN 6128 (ISO 661).

Nếu chất béo không tan chảy hết ở nhiệt độ môi trường thì gia nhiệt cao hơn nhiệt độ nóng chảy không quá  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  và trộn kỹ.

## **8 Cách tiến hành**

### **8.1 Chuẩn bị hệ thống GPLC**

Để ổn định cột GPLC, từng bước thay đổi dung môi từ toluen (4.2) (dung môi B) đến tetrahydrofuran (4.1) (dung môi A). Bơm 10 ml các phần dung môi ở tốc độ dòng 1 ml/min như sau:

Bước 1: 25 % dung môi A trong dung môi B;

Bước 2: 50 % dung môi A trong dung môi B;

Bước 3: 75 % dung môi A trong dung môi B;

## TCVN 11519:2016

Bước 4: 100 % dung môi A.

Tiếp tục bơm tetrahydrofuran  $\geq 12$  h để ổn định cột.

Nối cột với van bơm và rửa bằng khoảng 30 ml tetrahydrofuran. Nối cột với cuvet mẫu của detector. Đổ tetrahydrofuran vào cuvet chuẩn. Điều chỉnh dòng chảy từ 0,8 ml/min đến 1 ml/min và đợi để ổn định đường nền (khoảng 15 min).

CHÚ THÍCH: Bảo quản cột trong toluen.

### 8.2 Kiểm tra sự thích hợp của hệ thống

Phân tích chất chuẩn dầu như trong 8.3, điều chỉnh độ đáp ứng detector để thu được sắc ký đồ có pic triglycerid không polyme hóa (pic 3) nhiều hơn một nửa độ rộng của đồ thị (xem Hình A.1).

Sử dụng sắc ký đồ để kiểm tra hiệu quả và độ phân giải của cột.

Tính số đĩa lý thuyết,  $n$ , và độ phân giải,  $R$  như sau:

$$n = 16 \left[ \frac{dR}{w} \right]^2$$

$$R = \frac{\Delta}{w}$$

Trong đó:

$dR$  là khoảng thời gian lưu từ điểm đầu của sắc đồ đến pic triglycerid lớn nhất, tính bằng milimet (mm);

$w$  là độ rộng của pic triglycerid trên đường nền, đo được giữa đường tiếp tuyến và đường nền, tính bằng milimet (mm).

$\Delta$  là khoảng cách giữa pic triglycerid lớn nhất và pic triglycerid đã polyme hóa liền kề (pic 3 và pic 2, tương ứng, trong Hình A.1), tính bằng milimet (mm).

Chọn các điều kiện phân tích như:  $n \geq 6000$  và  $R \geq 1$ .

### 8.3 Xác định

Nếu chất béo chưa tan chảy hoàn toàn ở nhiệt độ phòng thì gia nhiệt cho đến khi đạt được nhiệt độ cao hơn nhiệt độ tan chảy  $10^\circ\text{C}$  và trộn kỹ.

Dùng cân (5.10) cân chính xác  $0,2 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$  phần mẫu thử đã chuẩn bị cho vào bình nón (5.9). Thêm 15 ml tetrahydrofuran tinh khiết, thu được sau khi pic cuối được rửa giải khỏi cột trong quá trình chạy sắc ký. Khuấy bình và để yên cho đến khi chất béo hòa tan hết. Thêm khoảng 50 mg natri sulfat

(4.4), lắc và đợi khoảng 2 min. Lọc qua bộ lọc cỡ lỗ 1  $\mu\text{m}$  (5.8).

Khi chất béo chứa các hạt huyền phù, để tránh bị tắc bộ lọc thủy tinh xếp trên miệng cột thì lọc chất béo qua bộ lọc cỡ lỗ 1  $\mu\text{m}$  (5.8).

Dùng xyranh (5.2) lấy từ 50  $\mu\text{l}$  đến 100  $\mu\text{l}$  dung dịch thử đã chuẩn bị, đổ vào vòng bơm và bơm dung dịch thử lên cột GPLC (5.3). Rửa giải bằng tetrahydrofuran ở tốc độ 0,5 ml/min đến 1 ml/min.

CHÚ THÍCH: Ở tốc độ 1 ml/min thì phân tích trong khoảng 10 min.

## 9 Tính và biểu thị kết quả

Sử dụng diện tích chuẩn hóa để tính phần trăm triglycerid đã polyme hóa, giả định rằng tất cả các thành phần mẫu đã được rửa giải.

Trong trường hợp có độ uốn giữa các pic triglycerid và pic triglycerid đã polyme hóa cao nhất và điểm uốn thấp nhất thấp hơn 75 % chiều cao của pic triglycerid đã polyme hóa cao nhất, thì tính hàm lượng triglycerid đã polyme hóa, PT, bằng phần trăm diện tích pic, theo Công thức:

$$PT = \left[ \frac{A_{PT}}{\sum A} \right] \times 100$$

Trong đó:

$A_{PT}$  là tổng diện tích pic của các pic triglycerid đã polyme hóa;

$\sum A$  là tổng diện tích của tất cả các pic.

Báo cáo kết quả đến một chữ số thập phân.

Có thể tính  $A_{TP}$  bằng 2 cách sau:

### 1) Độ phân giải tốt giữa các pic ( $R > 1$ )

Tính diện tích riêng rẽ và diện tích tổng số bằng phương pháp tích phân chung (thông thường và điện tử).

### 2) Độ phân giải kém giữa các pic ( $R < 1$ )

Giả sử tất cả các thành phần rửa giải trước ( $dR - w/2$ ) là các triglycerid đã polyme hóa, nếu dùng kỹ thuật thông thường, thì xác định diện tích pic triglycerid theo diện tích tam giác cân. Nếu dùng phương pháp tích phân điện tử thì điều chỉnh máy tích phân cẩn thận để tích phân tất cả bề mặt giữa đường cong và đường nền.

Trong trường hợp không có độ uốn giữa các pic triglycerid và pic triglycerid đã polyme hóa cao nhất

## TCVN 11519:2016

hoặc điểm uốn thấp nhất cao hơn 75 % chiều cao của pic triglycerid đã polyme hóa cao nhất, thì tính các triglycerid đã polyme hóa như sau:

$$PT = \left[ \frac{A_{PT}}{\sum A} \right] \times 100$$

Trong đó:

$A_{PT}$  là diện tích được tính trên đường nền đo được từ điểm bắt đầu đến điểm kết thúc có khoảng cách tương ứng ( $dR - w/2$ ), nêu trong 8.2.

$\sum A$  là tổng diện tích của tất cả các pic.

Báo cáo kết quả đến một chữ số thập phân.

CHÚ THÍCH: Khi sử dụng đầu chiếu sẽ làm tăng khả năng thủy phân, do đó khó có thể xác định biểu đồ pic triglycerid và thậm chí không xuất hiện. Trong trường hợp này, xác định lượng triglycerid đã polyme hóa bằng cách giả định tất cả các thành phần rửa giải trong khoảng ( $dR - w/2$ ) là các triglycerid đã polyme hóa.

## 10 Báo cáo thử nghiệm

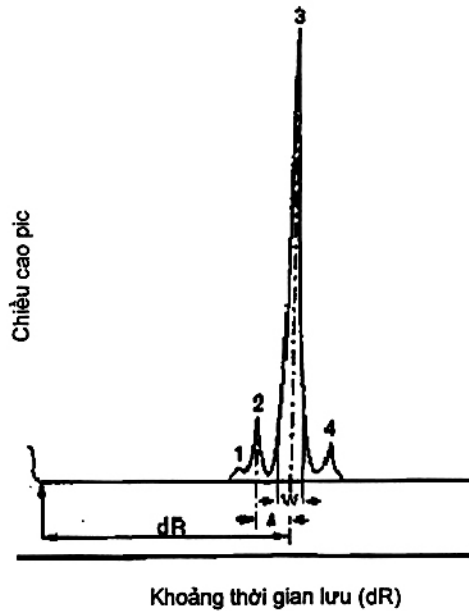
Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- kết quả thử thu được;
- nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.



**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Sắc ký đồ**



**CHÚ DẪN**

1 và 2: triglycerid đã polyme hóa;

3: triglycerid;

4: các axit béo tự do.

**Hình A.1 – Sắc ký đồ điển hình của chuẩn dầu (dầu đậu tương đã gia nhiệt) phân tích bằng sắc ký lỏng thẩm thấu gel để tính độ phân giải và số đĩa lý thuyết**

Sắc ký đồ (Hình A.1) cho thấy pic chính (triglycerid không polyme hóa, MW xấp xỉ 900) và một hoặc nhiều pic nhỏ hơn có thời gian lưu ngắn hơn (triglycerid đã polyme hóa, dimer và oligomer). Có thể xuất hiện mẫu có phức chất phenomēna phân rã (có khả năng thủy phân) do đó có thể không xác định rõ biểu đồ pic triglycerid.

**Phụ lục B**  
(Tham khảo)

**Phép thử liên phòng thử nghiệm**

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm được cung cấp từ các phòng thử nghiệm chấp nhận phương pháp, tiến hành trên 5 mẫu bao gồm:

- mẫu 1: nguyên liệu chuẩn (dầu đã biết trước hàm lượng polyme hóa);
- mẫu 2: dầu chiên có hàm lượng polyme hóa thấp;
- mẫu 3: dầu chiên có hàm lượng polyme hóa trung bình;
- mẫu 4: dầu chiên có hàm lượng polyme hóa trung bình và có độ phân giải khác nhau giữa các triglycerid đã polyme hóa và các triglycerid không polyme hóa;
- mẫu 5: dầu chiên nhiều lần.

**Bảng B.1 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm**

Số thử tự mẫu	Giá trị trung bình, %	Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$	Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại $RSD_r, \%$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập $RSD_R, \%$
1	3,6	0,1	0,5	3,3	12,5
2	5,2	0,1	0,3	2,3	6,7
3	9,7	0,3	0,4	3,2	4,6
4	10,0	0,2	1,2	2,2	12,2
5	22,0	0,2	1,5	0,8	6,8

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 2625 (ISO 5555) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu.*
-