

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11513-2:2016

ISO 12228-2:2014

**XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG STEROL TỔNG SỐ
VÀ CÁC STEROL RIÊNG RẺ - PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ
- PHẦN 2: DẦU ÔLIU VÀ DẦU BÃ ÔLIU**

*Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method -
Part 2: Olive oils and olive pomace oils*

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11513-2:2016 hoàn toàn tương đương với ISO 12228-2:2014;

TCVN 11513-2:2016 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.

Bộ TCVN 11513 (ISO 12228) *Xác định hàm lượng sterol tổng số và các sterol riêng rẽ – Phương pháp sắc ký khí* gồm có các phần sau:

TCVN 11513-1:2016 (ISO 12228-1:2014), Phần 1: *Dầu mỡ động vật và thực vật*;

TCVN 11513-2:2016 (ISO 12228-2:2014), Phần 2: *Dầu ôliu và dầu bã ôliu*.

Xác định hàm lượng sterol tổng số và các sterol riêng rẽ -

Phương pháp sắc ký khí -

Phần 2: Dầu ôliu và dầu bã ôliu

*Determination of individual and total sterols contents – Gas chromatographic method –
Part 2: Olive oils and olive pomace oils*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng và thành phần các sterol và triterpen dialcohol trong dầu ôliu và dầu bã ôliu bằng sắc ký khí. Để xác định hàm lượng và thành phần của các sterol trong tất cả dầu mỡ động vật và thực vật khác, sử dụng TCVN 11513-1 (ISO 12228-1).

CHÚ THÍCH: Tiêu chuẩn này là tài liệu kỹ thuật giống với tiêu chuẩn IOC COI/T.20/Tài liệu số 30 (tháng 11 năm 2011).

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 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Thành phần của các sterol (composition of sterols)

Thành phần của các sterol riêng rẽ trong mẫu, bắt đầu với cholesterol và kết thúc với $\Delta 7$ -avenasterol (xem Bảng 1) trong các điều kiện qui định tại tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH 1: Thành phần được biểu thị bằng phần trăm tất cả các diện tích pic, chuẩn hóa đến 100 %.

3.2

Hàm lượng sterol tổng số (total sterol content)

Phần khối lượng của tổng tất cả các sterol riêng rẽ, được xác định theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này, bắt đầu với cholesterol và kết thúc với Δ^7 -avenasterol (xem Bảng 1) chia cho khối lượng phần mẫu thử.

CHÚ THÍCH 1: Hàm lượng được biểu thị bằng miligam trên kilogam.

3.3

Thành phần của các triterpen dialcohol (composition of triterpene dialcohols)

Thành phần của erythrodiol và uvaol có trong mẫu dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH 1: Thành phần này được biểu thị bằng phần trăm tất cả các diện tích pic, bắt đầu với cholesterol và kết thúc bằng uvaol (xem Bảng 1) dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này đã được chuẩn hóa đến 100 %.

4 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được xử phòng hóa bằng cách đun sôi hồi lưu với dung dịch kali hydroxit trong etanol. Chất không xử phòng hóa được chiết bằng dietyl ete. Các phần sterol và triterpen dialcohol được tách ra khỏi chất không xử phòng hóa bằng sắc ký lớp mỏng trên tấm silica gel kiềm hóa. Định tính và định lượng các thành phần sterol và triterpen dialcohol bằng sắc ký khí của các ete trimethylsilyl, sử dụng cholestanol làm chất chuẩn nội.

5 Thuốc thử

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

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước đạt loại 3 trong TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có qui định khác.

5.1 Kali hydroxit, phần khối lượng tối thiểu $w = 85$ g/100 g.

5.2 Kali hydroxit, dung dịch trong etanol, nồng độ khối lượng, c , xấp xỉ 2 mol/l.

Hòa tan 130 g kali hydroxit (5.1) trong 200 ml nước cất và pha loãng bằng etanol (5.9) đến vạch 1 lít, trong khi làm nguội. Giữ dung dịch này trong chai thủy tinh tối màu, đậy kín và bảo quản tối đa 2 ngày.

5.3 Kali hydroxit, dung dịch trong etanol, nồng độ khối lượng, c , xấp xỉ 0,2 mol/l.

Hòa tan 13 g kali hydroxit (5.1) trong 20 ml nước cất và pha loãng bằng etanol (5.9) đến vạch 1 lít.

5.4 Dietyl ete, dùng cho sắc ký.

CẢNH BÁO – Dietyl ete là chất dễ cháy và có thể tạo thành peroxit gây nổ. Giới hạn gây nổ trong không khí là 1,7 % đến 48 % (phần thể tích). Hết sức cẩn thận khi sử dụng dietyl ete.

5.5 Natri sulfat khan.

5.6 Tấm sắc ký lớp mỏng silica gel (TLC), có bán sẵn, kích thước 20 cm x 20 cm, dày 0,25 mm, không có chất chỉ thị huỳnh quang.

5.7 Axeton, dùng cho sắc ký.

5.8 *n*-Hexan, dùng cho sắc ký.

5.9 Etanol 96 %, phần thể tích tối thiểu $\rho = 95 \%$.

5.10 Etyl axetat.

5.11 Dung dịch chuẩn dùng cho sắc ký lớp mỏng, cholesterol hoặc hỗn hợp các phytosterol và dung dịch erythrodol trong etyl axetat (5.10), nồng độ khối lượng, $\rho = 5 \%$.

5.12 2,7-dichlorofluorescein, dung dịch trong etanol, nồng độ khối lượng, $\rho = 0,2 \%$.

Tạo kiềm nhẹ bằng cách thêm vài giọt dung dịch kali hydroxit trong alcohol 2 mol/l (5.2). Bảo quản dung dịch này tối đa trong 1 năm.

5.13 Dung dịch chuẩn nội α -cholestanol, nồng độ khối lượng, $\rho = 0,2 \text{ g}/100 \text{ ml}$, trong etyl axetat (5.10).

5.14 Dung dịch phenolphthalein, nồng độ khối lượng, $\rho = 10 \text{ g}/\text{l}$, trong etanol (5.9).

5.15 Khí mang dùng cho sắc ký khí, heli hoặc tốt nhất là hydro.

5.16 Khí phụ trợ dùng cho sắc ký khí, hydro, heli, nitơ và không khí.

5.17 Dung môi triển khai, hỗn hợp của *n*-hexan và dietyl ete, nồng độ thể tích là: $\sigma(\text{n-hexan}) = 65 \text{ ml}/100 \text{ ml}$, $\sigma(\text{dietyl ete}) = 35 \text{ ml}/100 \text{ ml}$.

5.18 Hexamethyldisilazan.

5.19 Trimethylchlorosilan.

5.20 Thuốc thử silyl hóa, hỗn hợp của pyridin, hexamethyldisilazan và trimethylchlorosilan.

TCVN 11513-2:2016

Nồng độ thể tích σ (pyridin) = 9 ml/13 ml, σ (hexamethyl disilazan) = 3 ml/13 ml, σ (trimethylchlorosilan) = 1 ml/13 ml. Chuẩn bị hỗn hợp mới trong ngày sử dụng.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng thuốc thử đã silyl hóa khác, ví dụ: hỗn hợp của N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (BSTFA) và trimethylchlorosilan (TMCS), σ (BSTFA) = 99 ml/100 ml và σ (TMCS) = 1 ml/100 ml.

6 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:

6.1 **Bình cầu đáy tròn**, dung tích 250 ml, cổ mài.

6.2 **Bộ sinh hàn**, có khớp nối thủy tinh mài lắp kín với bình (6.1).

6.3 **Phễu chiết**, dung tích 500 ml.

6.4 **Bể triển khai**, bằng thủy tinh, có nắp đậy thủy tinh mài, phù hợp để sử dụng với tấm có kích thước 20 cm x 20 cm

6.5 **Đèn tia cực tím**, bước sóng 366 nm hoặc 254 nm.

6.6 **Microxyranh**, để phân phối 100 μ l, 500 μ l và 1000 μ l.

6.7 **Phễu lọc hình trụ**, có bộ lọc thủy tinh thiêu kết (G3, độ xốp 15 μ m đến 40 μ m), đường kính xấp xỉ 2 cm, sâu 5 cm, phù hợp để lọc trong chân không, có khớp nối thủy tinh mài nhô ra.

6.8 **Bình nón**, vận hành trong chân không, dung tích 50 ml có khớp nối thủy tinh mài lõm vào để nối với phễu lọc (6.7).

6.9 **Ống thử nghiệm**, dung tích 10 ml có đáy hình côn và nắp thủy tinh đậy kín.

6.10 **Thiết bị sắc ký khí**, cột mao quản, có bộ bơm chia dòng gồm có:

- lò cột, có thể duy trì nhiệt độ chính xác ± 1 °C;
- bộ bơm mẫu có kiểm soát nhiệt độ, có bộ phận làm bay hơi bằng thủy tinh persilan hóa và hệ thống chia dòng;
- detector ion hóa ngọn lửa (FID);
- hệ thống phân tích dữ liệu.

6.11 **Cột mao quản**, bằng silica nóng chảy, dài 20 m đến 30 m, đường kính trong 0,25 mm đến 0,32 mm, được phủ bằng diphenyl 5 %, dimetyl polysiloxan 95 % (SE-52 hoặc SE-54 hoặc pha tinh tương đương), với giới hạn nhiệt độ trong khoảng từ 280 °C đến 300 °C, độ dày màng trong khoảng từ 0,1 μ m đến 0,30 μ m.

6.12 Microxyranh dùng cho sắc ký khí, dung tích 1 µl và 10 µl, dùng cho sắc ký khí, có gắn kim ghi phù hợp với bộ bơm chia dòng.

6.13 Bình hút ẩm, chứa các chất hút ẩm hiệu quả, ví dụ: canxi điclorua, để bảo quản mẫu.

6.14 Tủ sấy, duy trì nhiệt độ ở $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.15 Bộ cô quay, nối với bơm chân không và nồi cách thủy, duy trì ở nhiệt độ $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.16 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,001 g và có thể đọc được 0,000 1 g.

7 Mẫu thử

7.1 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555) ^[2].

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.

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6128 (ISO 661). Làm khô mẫu bằng cách lọc, nếu cần.

8 Cách tiến hành

8.1 Phần mẫu thử

Dùng microxyranh (6.6) lấy một lượng dung dịch chuẩn nội (5.13) 500 µl (đối với dầu ôliu) hoặc 1 500 µl (đối với dầu bã ôliu), cho vào bình 250 ml (6.1). Cho bay hơi đến khô bằng dòng khí nitơ nhẹ, trong nồi cách thủy ẩm và làm nguội bình.

Cân khoảng 5 g dầu ôliu hoặc dầu bã ôliu, chính xác đến 10 mg, cho vào bình trên và tiến hành theo 8.2.

CHÚ THÍCH: Dầu ôliu (dầu bã ôliu), chứa một lượng đáng kể cholesterol, có thể cho pic có thời gian lưu giống với thời gian lưu của cholestanol. Trong trường hợp này, phần sterol sẽ được phân tích lặp lại hai lần có và không bổ sung chất nội chuẩn.

8.2 Chuẩn bị chất không xà phòng hóa

8.2.1 Bổ sung 50 ml dung dịch kali hydroxit trong etanol 2 mol/l (5.2) và vài viên đá bọt, lắp bộ sinh hàn và gia nhiệt cho sôi nhẹ đến khi dung dịch trong (kết thúc quá trình xà phòng hóa).

Tiếp tục gia.nhiệt thêm 20 min, bổ sung 50 ml nước cất qua đỉnh bộ sinh hàn, tháo bộ sinh hàn và làm

TCVN 11513-2:2016

nguội bình đến khoảng 30 °C.

8.2.2 Chuyển lượng chứa trong bình vào phễu chiết 500 ml (6.3) sử dụng vài phần nước cất (50 ml). Thêm khoảng 80 ml dietyl ete (5.4), lắc mạnh trong khoảng 60 s, định kỳ giải phóng áp lực bằng cách lật ngược phễu chiết và mở van khóa. Để yên dung dịch cho đến khi hai pha tách hoàn toàn.

Tháo dung dịch xà phòng càng triệt để càng tốt vào phễu tách thứ hai. Tiến hành hai quá trình chiết tiếp theo với cùng một cách, sử dụng 60 ml đến 70 ml dietyl ete (5.4).

Phá dung dịch nhũ tương bằng cách thêm một lượng nhỏ etanol (5.9) và khuấy nhẹ.

8.2.3 Gộp ba dịch chiết dietyl ete vào một phễu chiết chứa 50 ml nước. Tiếp tục rửa bằng nước (50 ml) cho đến khi nước rửa không chuyển thành màu hồng đậm khi thêm một giọt dung dịch phenolphthalein (5.14).

Sau khi loại bỏ nước rửa, lọc qua natri sulfat khan (5.5) vào bình 250 ml đã được cân trước, rửa phễu và bộ lọc bằng một lượng nhỏ dietyl ete (5.4).

8.2.4 Cho bay hơi dung môi bằng bộ cô quay ở 30 °C trong chân không. Thêm 5 ml axeton (5.7) và loại bỏ hết dung môi bay hơi, trong dòng không khí nhẹ. Sấy phần còn lại trong tủ sấy (6.14) ở 103 °C ± 2 °C trong 15 min. Làm nguội trong bình hút ẩm và cân chính xác đến 0,1 mg.

8.3 Tách các phần sterol và triterpen dialcohol (erythrodiol, uvaol) bằng TLC

8.3.1 Nhúng tấm silica gel (5.6) ngập khoảng 4 cm trong dung dịch kali hydroxit trong etanol 0,2 mol/l (5.3) 10 s, để khô trong tủ hút 2 h và đặt vào tủ sấy ở 100 °C trong 1 h.

Lấy tấm sắc khí ra khỏi tủ sấy và bảo quản trong bình hút ẩm (6.13) cho đến khi sử dụng (tấm sắc ký được bảo quản tối đa 15 ngày).

CHÚ THÍCH: Khi sử dụng tấm silica chuẩn để tách sterol thì tất cả các thành phần tự nhiên có tính axit (axit béo và các axit khác) được giữ lại trên đường vạch chấm và dải sterol được tách rõ khỏi dải aliphatic và dải triterpen alcohol.

8.3.2 Đổ đầy dung môi triển khai (5.17) đến độ sâu khoảng 1 cm trong bể triển khai (6.4). Đậy nắp thủy tinh và để ít nhất nửa giờ ở nơi mát để cân bằng pha hơi-lỏng. Các dải giấy lọc nhúng trong dung môi rửa giải cần được đặt trên bề mặt trong của khoang chứa để làm giảm thời gian triển khai đến khoảng một phần ba. Ngoài ra, việc đó cũng giúp cho rửa giải các thành phần tốt hơn.

Cần thay dung môi triển khai đối với mỗi phép thử, để đạt các điều kiện rửa giải tái lập tốt hơn. Cũng có thể sử dụng hỗn hợp *n*-hexan và dietyl ete (nồng độ thể tích $\sigma = 50$ ml/100 ml) làm dung môi triển khai thay thế.

8.3.3 Chuẩn bị dung dịch không xà phòng hóa 5 % (8.2.4) trong etyl axetat (5.10). Dùng microxyranh

100 µl, lấy 0,3 ml dung dịch để kẻ thành một đường thẳng, ở khoảng cách 2 cm, tính từ cạnh dưới của tấm TLC (5.6). Để cách mỗi cạnh tấm sắc ký ít nhất 3 cm. Chấm một điểm 5 µl của dung dịch chuẩn TLC (5.11) ở điểm cách cạnh 1,5 cm.

8.3.4 Đặt tấm sắc ký vào bể đã được chuẩn bị theo 8.3.2 và triển khai cho đến khi dung môi đạt khoảng 1 cm đến 2 cm tính từ cạnh trên của tấm TLC. Giữ ở nhiệt độ môi trường không đổi. Lấy tấm sắc ký ra khỏi bể triển khai và để dung môi bay hơi trong tủ hút.

8.3.5 Phun nhẹ và đều dung dịch 2,7-dichlorofluorescein (5.12) lên tấm sắc ký, sau đó để khô. Quan sát tấm sắc ký trong ánh sáng cực tím (6.5) và nhận biết các dải sterol và triterpen diacohol với sự hỗ trợ của các chấm dung dịch chuẩn (5.11). Đánh dấu các vùng quang trên các chấm dung dịch chuẩn bằng bút chì đen (xem Hình A.1).

8.3.6 Dùng thìa cạo hết vùng được đánh dấu và thu lấy lượng silica vào phễu lọc (6.7). Thêm 10 ml etyl axetat (5.10) nóng, trộn cẩn thận bằng thìa kim loại và lọc trong điều kiện chân không, thu lấy dịch lọc vào bình nón (6.8) được nối với phễu lọc. Rửa phần còn lại trong bình ba lần bằng 10 ml dietyl ete (5.4) và lọc vào cùng một bình, nối với phễu. Cho bay hơi dịch chiết ete đã gộp, đến thể tích khoảng 4 ml đến 5 ml, chuyển dung dịch còn lại vào ống nghiệm 10 ml (6.9) đã biết khối lượng và thổi hết dung môi bằng dòng khí nitơ. Thêm vài giọt axeton (5.7) và thổi axeton đến khô. Phần còn lại trong ống thử nghiệm chứa các phần sterol và triterpen dialcohol.

8.4 Chuẩn bị các ete trimethylsilyl

8.4.1 Cho thuốc thử silyl hóa (5.20) vào ống nghiệm. Sử dụng 50 µl thuốc thử cho 1 mg sterol và triterpen dialcohol.

CHÚ THÍCH: Dung dịch sử dụng một lần có bán sẵn trên thị trường. Có thể dùng pyridin thay cho axetonitril.

8.4.2 Đậy nắp ống thử nghiệm, lắc kỹ để hòa tan hết. Để yên ít nhất 15 min ở nhiệt độ môi trường và sau đó ly tâm vài phút. Dung dịch trong suốt này đã sẵn sàng để phân tích sắc ký khí.

Khi sử dụng hexamethyldisilazan trimethylchlorosilan thì có thể xuất hiện màu trắng đục nhẹ. Khi tạo thành đám trắng hoặc xuất hiện màu hồng cho thấy thuốc thử bị ẩm hoặc hư hỏng. Trong trường hợp này, phải lập lại phép thử.

8.5 Phân tích bằng sắc ký khí

8.5.1 Các điều kiện của GC

Tối ưu hóa chương trình nhiệt độ và dòng khí mang sao cho thu được sắc ký đồ giống với Hình A.2 và Hình A.3. Kiểm tra việc tách với các phần sterol đã silyl hóa thu được từ dầu đã biết (xem Bảng 1).

TCVN 11513-2:2016

Các thông số sau đã được thử nghiệm và cho thấy hiệu quả:

- nhiệt độ cột: (260 ± 5) °C;
- nhiệt độ buồng bơm mẫu: (280 đến 300) °C;
- nhiệt độ detector: (280 đến 300) °C;
- tốc độ tuyến tính của khí mang: heli 20 cm/s đến 35 cm/s, hydro 30 cm/s đến 50 cm/s;
- tỷ lệ chia dòng: 1:50 đến 1:100;
- thể tích bơm: 0,5 µl đến 1,0 µl dung dịch TMSE;
- thời gian lưu đối với β -sitosterol phải là (20 ± 5) min;
- pic campesterol của dầu ôliu có hàm lượng trung bình 3 % phải là (20 ± 5) % trên toàn thang đo;
- pic campesterol của dầu đậu tương có hàm lượng trung bình 20 % phải là (80 ± 10) % trên toàn thang đo;
- tất cả các sterol có mặt cần được tách và phân giải hoàn toàn.

CHÚ THÍCH: Cho chạy phép thử trắng để kiểm tra khả năng nhiễm (ví dụ: cholesterol từ dung môi, thành bộ lọc bằng thủy tinh, dầu vân tay, v.v.).

Bơm 0,5 µl đến 1 µl mẫu lên sắc ký khí. Có thể sử dụng bộ bơm tự động.

Ghi lại sắc ký đồ cho đến khi triterpen dialcohol rửa giải hết. Cần thu được đường nền nằm ngang không có độ trôi âm hoặc dương.

8.5.2 Nhận biết pic

Nhận biết các pic riêng rẽ, sử dụng thời gian lưu tương đối (RRT) và so sánh với hỗn hợp của sterol và triterpen dialcohol, đã chuẩn bị và phân tích trong cùng điều kiện.

Các sterol và triterpen dialcohol được rửa giải theo Bảng 1 cũng cho RRT. Các RRT tương ứng với β -sitosterol có pha tinh SE-52 và SE-54 được cho trong Bảng 1.

Bảng 1 – Nhận biết pic GLC của các sterol riêng rẽ, erythrodiol và uvaol theo RRT có pha tinh SE-52 và SE-54, dựa trên β -sitosterol

Thứ tự Pic	Tên thông thường của sterol	Tên của các sterol theo hệ thống	RRT SE-54	RRT SE-52
1	Cholesterol	Cholest-5-en-3 β -ol	0,67	0,63
2	Cholestanol	5 α -cholestan-3 β -ol	0,68	0,64
3	Brassicasterol	[24S]-24-methyl cholesta-5,22-dien-3 β -ol	0,73	0,71
*	(Ergosterol)	[24S]-24-methyl cholesta-5,7,22-trien-3 β -ol	0,78	0,76
4	24-Methylen cholesterol	24-methylen cholesta-5,24-dien-3 β -ol	0,82	0,80
5	Campesterol	[24R]-24-methyl choles-5-en-3 β -ol	0,83	0,81
6	Campestanol	[24R]-24-methyl cholestan-3 β -ol	0,85	0,82
7	Stigmasterol	[24S]-24-ethyl cholesta-5,22-dien-3 β -ol	0,88	0,87
8	Δ 7-Campesterol	[24R]-24-methyl choles-7-en-3 β -ol	0,93	0,92
9	Δ 5,23-Stigmastadienol	[24R,S]-24-ethyl cholesta-5,23-dien-3 β -ol	0,95	0,95
10	Clerosterol	[24S]-24-ethyl cholesta-5,25-dien-3 β -ol	0,96	0,96
11	β -Sitosterol	[24R]-24-ethyl choles-5-en-3 β -ol	1,00	1,00
12	Sitostanol	[24R]-24-ethyl cholestan-3 β -ol	1,02	1,02
13	Δ 5-Avenasterol	[24Z]-24(28)-ethyliden cholest-5-en-3 β -ol	1,03	1,03
14	Δ 5,24-Stigmastadienol	[24R,S]-24-ethyl cholesta-5,24-dien-3 β -ol	1,08	1,08
15	Δ 7-Stigmastenol	[24R,S]-24-ethyl choles-7-en-3 β -ol	1,12	1,12
16	Δ 7-Avenasterol	[24Z]-24(28)-ethyliden cholest-7-en-3 β -ol	1,16	1,16
17	Erythrodiol	5 α -olean-12-en-3 β ,28-diol	1,41	1,41
18	Uvaol	Δ 12-ursen-3 β ,28-diol	1,52	1,52

CHÚ THÍCH 1: Ergosterol không được đưa vào phép tính.

CHÚ THÍCH 2: Sitosterol có thể được rửa giải đồng thời với α -spinasterol và Δ 7,22,25-stigmastatrienol. [24R]-24-ethyl cholesta-7,25(27)-dien-3 β -ol có mặt trong sterol của dầu hương dương và dầu hạt bí và có thể rửa giải đồng thời với pic 14 (Δ 5,24-stigmastadienol).

9 Biểu thị kết quả

9.1 Đánh giá định lượng

Tính diện tích các pic α -cholestanol, sterol và triterpen dialcohol. Không tính đến các pic không được liệt kê trong Bảng 1 và ergosterol. Mục đích của tiêu chuẩn này giả định rằng hệ số phản ứng của tất cả các sterol bằng nhau và bằng 1.

9.2 Xác định hàm lượng sterol tổng số

Tính hàm lượng sterol tổng số của dầu, w , bằng miligam trên kilogam dầu, theo Công thức (1):

$$w = \frac{\sum(A) \times m_{IS} \times 1000}{A_{IS} \times m} \quad (1)$$

Trong đó:

m_{IS} là khối lượng của chất chuẩn nội (cholestanol), tính bằng miligam (mg);

$\Sigma(A)$ là tổng diện tích pic của các sterol riêng rẽ có mặt;

A_{IS} là diện tích pic của chất chuẩn nội được thêm vào;

m là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g).

Để tính hàm lượng sterol tổng số, thì cần khẳng định tất cả các pic sterol bắt đầu với cholesterol và kết thúc với $\Delta 7$ -avenasterol (pic 16), nhưng không có erythrodiol và uvaol (pic 17 và pic 18).

Báo cáo hàm lượng sterol tổng số đến số nguyên.

9.3 Thành phần của các sterol

Tính phần khối lượng, w_i , của sterol riêng rẽ, i , bằng gam trên 100 g (phần trăm), theo Công thức (2):

$$w_i = \frac{A_i}{\sum A} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

A_i là diện tích pic của sterol i ;

ΣA là tổng diện tích pic của tất cả các sterol (pic 1 đến pic 16).

CHÚ THÍCH: β -sitosterol biểu kiến được xác định như tổng của $\Delta 5$ -23-stigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, $\Delta 5$ -avenasterol và $\Delta 5$ -24-sigmastadienol.

9.4 Thành phần của các triterpen dialcohol

Tính phần khối lượng, w_{EU} , của tổng erythrodiol và uvaol, bằng phần trăm, theo Công thức (3):

$$w_{EU} = \frac{A_E + A_U}{A_E + A_U + \sum A} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó:

A_E là diện tích pic của erythrodiol;

A_U là diện tích pic của uvaol;

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

Báo cáo hàm lượng tổng của erythrodiol và uvaol đến một chữ số thập phân.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

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

10.2 Giới hạn lặp lại, r

Giới hạn lặp lại (r) là giá trị mà độ lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử thu được trong các điều kiện lặp lại sẽ nhỏ hơn hoặc bằng giá trị đó được dự kiến với xác suất 95 %.

Điều kiện lặp lại là các điều kiện trong đó các kết quả thử độc lập thu được khi sử dụng cùng phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn.

10.3 Giới hạn tái lập, R

Giới hạn tái lập (R) là giá trị mà độ lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử thu được trong các điều kiện tái lập sẽ nhỏ hơn hoặc bằng giá trị đó được dự kiến với xác suất 95 %.

Điều kiện tái lập là các điều kiện trong đó các kết quả thử độc lập, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn.

11 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) 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;
- e) kết quả thu được hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

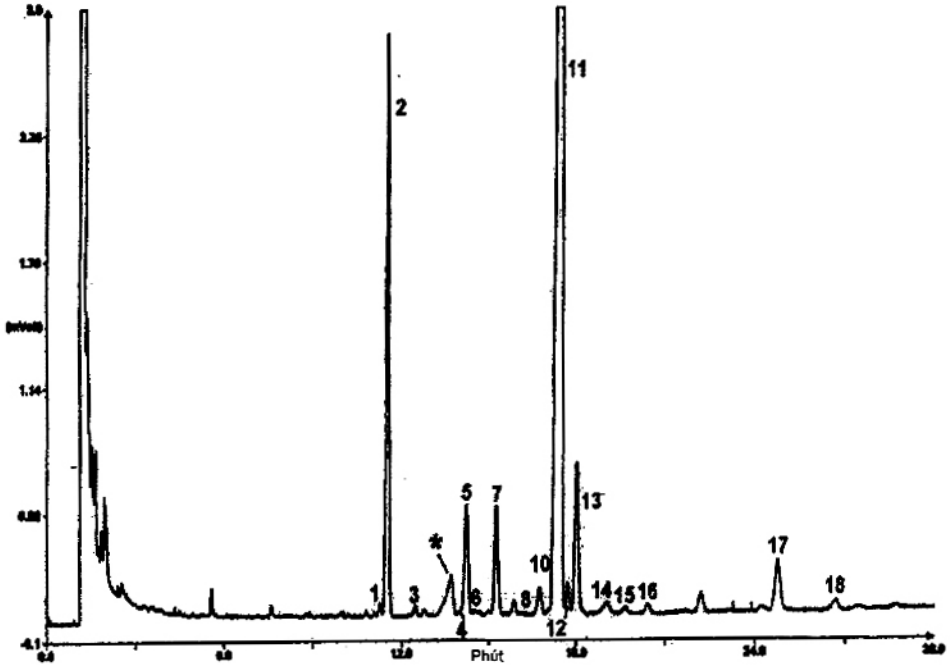
Hình vẽ



CHÚ DẪN

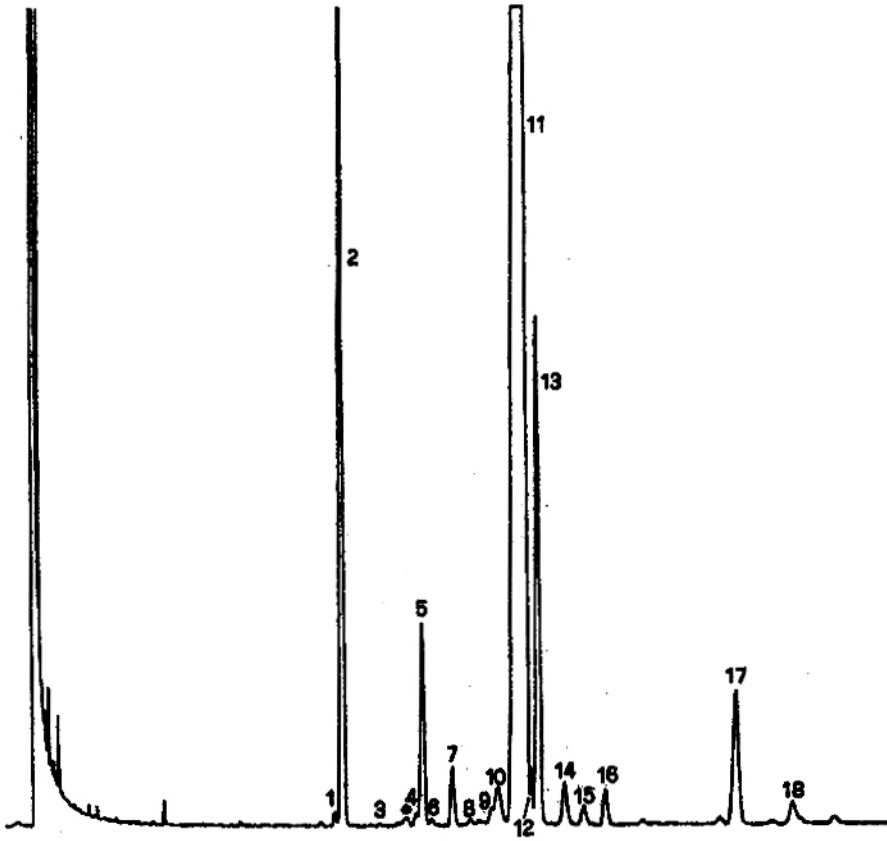
- 1 squalen
- 2 triterpen và aliphatic alcohol
- 3 sterol và triterpen dialcohol
- 4 điểm bắt đầu và các axit béo tự do

Hình A.1 – Tách các sterol bằng TLC ra khỏi chất không xà phòng hóa
(các bước 8.3 và 8.4)



CHÚ THÍCH: Nhận biết số pic theo Bảng 1. Các điều kiện đã cho trong 8.5.

Hình A.2 – Phân tích sắc ký khí-lỏng (GLC) các sterol và triterpen dialcohol từ dầu ôliu lampan



CHÚ THÍCH: Nhận biết số pic theo Bảng 1. Các điều kiện đã cho trong 8.5.

Hình A.3 – GLC các sterol và triterpen diacohol từ dầu ôliu tinh luyện

Phụ lục B
(Tham khảo)

Phép thử liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp đã được thiết lập theo phép thử liên phòng thử nghiệm quốc tế do Ban thư ký điều hành của Hiệp hội Dầu ôliu quốc tế tổ chức thực hiện năm 2009 trên các mẫu sau đây:

- A: dầu bã ôliu thô
- B: dầu bã ôliu tinh luyện
- C: dầu ôliu nguyên chất thượng hạng
- D: hỗn hợp của 20 % dầu hướng dương có oleic cao với 70 % dầu ôliu nguyên chất thượng hạng và 10 % dầu hạt cải dầu.
- E: hỗn hợp của 15 % dầu đậu tương và 85 % dầu ôliu.

Phép thử được tiến hành phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[3] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[4]

Bảng B.1 – Kết quả thống kê đối với hàm lượng sterol tổng số

Mẫu	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	18	18	18	18	18
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	17	18	18	17	17
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng thử nghiệm	34	36	36	34	34
Giá trị trung bình (m), mg/kg	4 487,0	3 169,8	1 359,8	2 066,5	1 552,1
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	71,8	49,2	45,2	30,1	31,8
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r , %	1,6	1,6	3,3	1,5	2,1
Giới hạn lặp lại (r)	200,9	137,6	126,5	84,4	88,9
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	378,9	234,7	82,9	131,5	89,5
Hệ số biến thiên tái lập, CVR , %	8,4	7,4	6,1	6,4	5,8
Giới hạn tái lập (R)	1 060,9	657,0	232,2	368,1	250,7

Bảng B.2 – Kết quả thống kê đối với hàm lượng sterol riêng rẽ: Cholesterol

Mẫu	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	19	19	19	19	19
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	19	14	16	18	18
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng thử nghiệm	38	28	32	36	36
Giá trị trung bình (m), %	0,13	0,13	0,13	0,16	0,21
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r , %	18,8	14,0	12,3	15,1	7,2
Giới hạn lặp lại (r)	0,07	0,05	0,04	0,07	0,04
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	0,04	0,02	0,04	0,05	0,06
Hệ số biến thiên tái lập, CVR , %	31,9	17,8	29,5	29,1	27,7
Giới hạn tái lập (R)	0,12	0,07	0,11	0,13	0,16

Bảng B.3 – Kết quả thống kê đối với hàm lượng sterol riêng rẽ: Brassicasterol

Mẫu	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	19	19	19	19	19
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	19	15	17	19	18
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng thử nghiệm	38	30	34	38	36
Giá trị trung bình (m), %	0,05	0,02	0,00	1,46	0,02
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,013	0,004		0,039	0,007
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r , %	25,9	21,1		2,7	32,7
Giới hạn lặp lại (r)	0,04	0,01		0,11	0,02
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	0,039	0,020		0,052	0,024
Hệ số biến thiên tái lập, CVR , %	75,1	115,2		3,6	107,2
Giới hạn tái lập (R)	0,11	0,06		0,15	0,07

Bảng B.4 – Kết quả thống kê đối với hàm lượng sterol riêng rẽ: Campesterol

Mẫu	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	19	19	19	19	19
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	18	18	17	18	18
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng thử nghiệm	36	36	34	36	36
Giá trị trung bình (m), %	3,22	3,13	2,98	10,74	6,99
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,044	0,045	0,029	0,100	0,061
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r , %	1,3	1,4	1,0	1,0	0,9
Giới hạn lặp lại (r)	0,12	0,13	0,08	0,28	0,17
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	0,085	0,087	0,086	0,259	0,167
Hệ số biến thiên tái lập, CV_R , %	2,6	2,8	2,9	2,4	2,4
Giới hạn tái lập (R)	0,24	0,24	0,24	0,73	0,47

Bảng B.5 – Kết quả thống kê đối với hàm lượng sterol riêng rẽ: Stigmasterol

Mẫu	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	19	19	19	19	19
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	17	16	18	18	19
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng thử nghiệm	34	32	36	36	38
Giá trị trung bình (m), %	1,23	1,05	0,41	2,83	5,40
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,027	0,040	0,046	0,043	0,087
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r , %	2,2	3,8	11,1	1,5	1,6
Giới hạn lặp lại (r)	0,08	0,11	0,13	0,12	0,24
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	0,039	0,059	0,064	0,111	0,158
Hệ số biến thiên tái lập, CV_R , %	3,2	5,7	15,6	3,9	2,9
Giới hạn tái lập (R)	0,11	0,17	0,18	0,31	0,44

Bảng B.6 – Kết quả thống kê đối với hàm lượng sterol riêng rẽ: Sitosterol

Mẫu	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	19	19	19	19	19
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	16	17	17	18	17
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng thử nghiệm	32	34	34	36	34
Giá trị trung bình (m), %	93,9	93,8	95,2	78,6	84,8
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,141	0,223	0,091	0,195	0,220
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r , %	0,15	0,24	0,10	0,25	0,26
Giới hạn lặp lại (r)	0,4	0,6	0,3	0,6	0,6
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	0,355	0,471	0,340	1,372	0,819
Hệ số biến thiên tái lập, CVR , %	0,38	0,50	0,36	1,75	1,00
Giới hạn tái lập (R)	1,0	1,3	1,0	4,0	2,2

Bảng B.7 – Kết quả thống kê đối với hàm lượng sterol riêng rẽ: $\Delta 7$ -stigmastenol

Mẫu	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	19	19	19	19	19
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	18	19	19	17	18
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng thử nghiệm	36	38	38	34	36
Giá trị trung bình (m), %	0,70	0,94	0,27	3,52	1,10
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,028	0,056	0,025	0,090	0,040
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r , %	4,1	6,0	9,5	2,6	3,6
Giới hạn lặp lại (r)	0,08	0,16	0,07	0,25	0,11
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	0,086	0,084	0,067	0,171	0,087
Hệ số biến thiên tái lập, CVR , %	12,3	8,9	25,3	4,9	7,9
Giới hạn tái lập (R)	0,24	0,24	0,19	0,48	0,24

Bảng B.8 – Kết quả thống kê đối với hàm lượng sterol riêng rẽ: Erythrodiol – uvaol

Mẫu	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	19	19	19	19	19
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	17	15	19	18	15
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng thử nghiệm	34	30	38	36	30
Giá trị trung bình (m), %	22,38	27,17	1,80	1,06	2,9
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,214	0,333	0,215	0,162	0,108
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r , %	1,0	1,2	11,9	15,3	3,8
Giới hạn lặp lại (r)	0,60	0,93	0,60	0,46	0,30
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	1,028	1,257	0,450	0,342	0,210
Hệ số biến thiên tái lập, CV_R , %	4,6	4,6	25,0	32,2	7,3
Giới hạn tái lập (R)	2,88	3,52	1,26	0,96	0,59

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4851 (ISO 3696) *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*
- [2] TCVN 2625 (ISO 5555) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
- [3] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
- [4] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
-