

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10582 : 2014

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CÔNG THỨC TỪ SỮA
DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
AXIT LINOLEIC – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ**

*Milk-based infant formula – Determination of linoleic acid content –
Gas chromatographic method*

HÀ NỘI - 2014

Lời nói đầu

TCVN 10582:2014 được xây dựng dựa trên cơ sở AOAC 992.25 *Linoleic acid in ready-to-feed milk-based infant formula. Gas chromatographic method*;

TCVN 10582:2014 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh - Xác định hàm lượng axit linoleic - Phương pháp sắc kí khí

*Milk-based infant formula - Determination of linoleic acid content -
Gas chromatographic method*

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí khí để xác định hàm lượng axit linoleic có trong thức ăn công thức từ sữa dành cho trẻ sơ sinh.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để xác định hàm lượng axit linoleic từ 4 g/l đến 14 g/l.

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 6508:2011 (ISO 1211:2010), *Sữa – Xác định hàm lượng chất béo – Phương pháp khối lượng (Phương pháp chuẩn)*.

TCVN 9966:2013 (ISO 3889:2006), *Sữa và sản phẩm sữa – Yêu cầu đối với bình chiết chất béo kiểu Mojonnier*

AOAC 969.33, *Fatty acids in oils and fats. Preparation of methyl esters. Boron trifluoride method (Axit béo trong dầu và mỡ. Chuẩn bị methyl este. Phương pháp bo trifluorua)*.

3 Nguyên tắc

Phân mẫu thử được bổ sung triheptadecanoin và được chiết bằng etanol, dietyl ete và ete dầu mỏ. Sử dụng bo trifluorua để chuẩn bị các metyl este từ các axit béo chiết được. Tách metyl linoleat và nhận biết bằng sắc kí khí trên cột xyanosilicon với detector ion hóa ngọn lửa.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng, trừ khi có quy định khác.

4.1 Khí mang, khí nitơ nên đã được tinh sạch, có chứa hàm lượng oxi nhỏ hơn 10 mg/kg.

4.2 Các loại khí nén khác

4.2.1 Khí hydro, có độ tinh khiết 99,9 %, không chứa tạp chất hữu cơ.

4.2.2 Không khí hoặc oxi, không chứa các tạp chất hữu cơ (nồng độ hydrocacbon tính theo đương lượng metan < 2 mg/l).

4.3 Dung môi

Tất cả dung môi được chưng cất bằng dụng cụ thủy tinh.

4.3.1 Hexan.

4.3.2 Metylen clorua (diclometan).

4.3.3 Clorofom.

4.3.4 Metanol.

4.3.5 Etanol, độ tinh khiết 95 %.

4.3.6 Dietyl ete, loại phân tích, không chứa peroxit, khi bay hơi không còn dư lượng.

4.3.7 Ete dầu mỏ, loại phân tích, dải sôi từ 30 °C đến 60 °C.

4.4 Chất chuẩn đối chứng

4.4.1 Triheptadecanoin, có độ tinh khiết > 99 %.

4.4.2 Trilinolein, có độ tinh khiết > 99 %.

4.4.3 Hỗn hợp chất chuẩn sắc kí khí (GC), ví dụ: Nu Check Prep 15A (chứa 6 % methyl palmitat, 3 % methyl stearat, 35 % methyl oleat, 50 % methyl linoleat, 3 % methyl linolenat và 3 % methyl arachidat) hoặc Rm 1 và Rm 5 (Supelco) là thích hợp.

4.5 Dung dịch thêm chất chuẩn nội

Cân khoảng 1 g triheptadecanoin (4.4.1), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 25 ml (5.6). Hòa tan và pha loãng đến vạch bằng cloroform (4.3.3) hoặc metylen clorua (4.3.2).

4.6 Bo triflorua (BF₃), nồng độ 125 g/l metanol, có thể sử dụng dung dịch bán sẵn trên thị trường hoặc được chuẩn bị như sau:

Cân bình định mức 2 lít (5.6) có chứa 1 lít metanol (4.3.4). Làm nguội trên bề nước đá và để yên trong bể nước đá, thổi đẩy BF₃ từ xyranh (5.5) qua ống thủy tinh vào metanol (4.3.4) cho đến khi hấp thụ hết 125 g. Thực hiện trong tủ hút. BF₃ phải được đi qua ống thủy tinh trước khi vào metanol đến khi bị đầy khỏi metanol để chất lỏng không bị hút vào xyranh. Thuộc thử bền trong 2 năm.

CẢNH BÁO – Loại bỏ hơi của BF₃ trong tủ hút, không để tiếp xúc với da, mắt và tránh hít phải hơi BF₃.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

5.2 Bình chiết chất béo kiểu Mojonnier, theo quy định trong TCVN 9966:2013 (ISO 3889:2006).

Các bình chiết chất béo phải được đậy bằng nút bần chất lượng tốt hoặc nắp bằng vật liệu khác [ví dụ: cao su silicon hoặc polytetrafluetylen (PTFE)] không bị ảnh hưởng bởi thuốc thử được sử dụng. Nút bần phải được chiết bằng dietyl ete (4.3.6), ngâm trong nước ít nhất 15 min ở nhiệt độ 60 °C hoặc lớn hơn và sau đó được làm nguội trong nước sao cho chúng bão hòa nước khi được sử dụng.

5.3 Hệ thống sắc kí khí (GC), có thể cài đặt chương trình nhiệt độ cột, detector ion hóa ngọn lửa, máy tích phân diện tích pic và máy ghi biểu đồ.

Điều kiện vận hành:

- tốc độ dòng khí mang [khí nitơ (4.1)]: 15 ml/min đến 20 ml/min;
- tốc độ dòng ion hóa ngọn lửa [khí hydro (4.2.1)]: 30 ml/min;
- thể tích bơm: 1 µl;

TCVN 10582:2014

- tốc độ máy ghi: 1 cm/min;
- nhiệt độ bơm: 200 °C;
- nhiệt độ detector: 230 °C;
- nhiệt độ ban đầu của cột: 100 °C.

– chương trình nhiệt độ: giữ nhiệt độ ban đầu của cột trong 4 min, sau đó tăng với tốc độ 8 °C/min đến 148 °C và giữ ở nhiệt độ này 1 min; tăng với tốc độ 4 °C/min đến 200 °C (nhiệt độ cuối cùng) và giữ ở nhiệt độ này 16 min. Tổng thời gian chạy là 40 min.

5.4 Cột sắc kí khí, bằng thủy tinh, kích thước 2 mm × 1828,8 mm (2 mm × 6 ft¹⁾ , được nhồi 75 % xyanosilicon (10 % SP-2340 là thích hợp) trên cột Chromosorb WAW²⁾ cỡ hạt từ 100 mesh đến 200 mesh hoặc loại tương đương.

5.5 Bộ bơm mẫu, có thể phân phối thể tích 1 µl.

5.6 Bình định mức, dung tích 25 ml và 2 lít.

5.7 Pipet, có thể phân phối các thể tích thích hợp.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400:2010 (ISO 707:2008)¹⁾.

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

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị phân mẫu thử

Dùng cân (5.1) cân khoảng 10 g phân mẫu thử, chính xác đến 1 mg, cho vào bình chiết chất béo (5.2) và thêm 1 ml dung dịch thêm chất chuẩn nội (4.5). Xoay bình để trộn đều.

Chiết chất béo theo 9.5 trong TCVN 6508:2011 (ISO 1211:2010), sử dụng etanol (4.3.5), dietyl ete (4.3.6) và ete dầu mỡ (4.3.7). Chuẩn bị các methyl este của các axit béo chiết được theo AOAC 969.33,

¹⁾ 1 ft = 0,3048 m = 304,8 mm.

²⁾ Cột Chromosorb WAW là sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

sử dụng bo trifluorua (4.6), thay heptan bằng hexan (4.3.1) và chuẩn bị 25 ml cuối cùng của dung dịch methyl este.

7.2 Kiểm tra hiệu quả của cột

Bơm 1 µl hỗn hợp chất chuẩn sắc kí (4.4.3) vào hệ thống sắc kí khí (5.3) để đánh giá hiệu quả và độ phân giải của cột.

Tính số đĩa lý thuyết hiệu quả, n , như sau:

$$n = 16 \times (ART/W)^2$$

Trong đó:

ART là thời gian lưu đã chỉnh của methyl stearat đo được từ tín hiệu đầu tiên của pic dung môi, tính bằng phút (min);

W là thời gian giữa đường tiếp tuyến của pic cắt với đường nền của methyl stearat, tính bằng phút (min).

Giá trị n cần phải lớn hơn 20 000.

Tính độ phân giải của cột, R , như sau:

$$R = \frac{2(rt_2 - rt_1)}{W_1 + W_2}$$

Trong đó:

rt_1 và rt_2 là thời gian lưu tương ứng của oleat và stearat, tính bằng phút (min);

W_1 và W_2 là thời gian giữa đường tiếp tuyến của pic cắt với đường nền tương ứng của oleat và stearat, tính bằng phút (min).

Giá trị R cần phải lớn hơn 1,25.

Nếu hiệu quả hoặc độ phân giải của cột thấp hơn các giá trị khuyến cáo nói trên thì chuẩn bị và ổn định lại cột mới.

7.3 Độ tinh khiết của chất chuẩn

Chuẩn bị các methyl este của triheptadecanoin (4.4.1) theo AOAC 969.33. Nồng độ methyl este phải nằm trong khoảng từ 1 mg/ml đến 2 mg/ml. Triheptadecanoin cần sinh ra > 99 % methyl heptadecanoat và không có các methyl este gây nhiễu khác.

7.4 Hệ số đáp ứng tương đối

Chuẩn bị các methyl este từ hỗn hợp của các lượng triheptadecanoin (4.4.1) và trilinolein (4.4.2) đã biết, theo AOAC 969.33, với nồng độ methyl este từ 1 mg/ml đến 2 mg/ml. Phân tích các methyl este bằng sắc kí khí theo AOAC 969.33, sử dụng các điều kiện vận hành tại 5.3.

Tính hệ số đáp ứng tương đối (RF) theo diện tích đáp ứng pic trên miligam của từng thành phần.

7.5 Phép xác định

Lấy 1 μ l dung dịch methyl este được chuẩn bị từ dung dịch thử (7.1) cho vào hệ thống sắc kí (5.3). Ghi lại diện tích pic và phần trăm diện tích pic của heptadecanoat và linoleat.

8 Tính kết quả

Hàm lượng trilinolein có trong phần mẫu thử, X_1 , biểu thị bằng gam trên 100 g (g/100 g), tính được theo công thức sau:

$$X_1 = \frac{A_{18,2}}{A_{17,0}} \times \frac{RF_{17,0}}{RF_{18,2}} \times \frac{w_1}{w} \times 100$$

Trong đó:

$A_{18,2}$ là diện tích đáp ứng của linoleat (C18:2) trong dung dịch thử;

$A_{17,0}$ là diện tích đáp ứng của heptadecanoat (C17:0) trong dung dịch thử;

$RF_{17,0}$ là hệ số đáp ứng tương đối trên miligam heptadecanoat, xác định được trong 7.4;

$RF_{18,2}$ là hệ số đáp ứng tương đối trên miligam linoleat, xác định được trong 7.4;

w_1 là khối lượng chất chuẩn nội được bổ sung vào dung dịch mẫu thử, tính bằng gam (g);

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

Hàm lượng axit linoleic, X_2 , có trong phần mẫu thử, tính bằng gam trên 100 g (g/100 g), được tính theo công thức sau:

$$X_2 = X_1 \times 0,9524$$

Trong đó: 0,9524 là tỷ lệ giữa khối lượng phân tử của axit linoleic và methyl linoleat.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về 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) kết quả thử nghiệm thu được;
- e) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm trên mẫu thức ăn công thức từ sữa dạng lỏng dành cho trẻ sơ sinh như sau:

	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Hàm lượng axit linoleic trung bình, g/l	4,1	10,7	14,4
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,1	0,1	0,2
Hệ số biến thiên lặp lại, RSD_r , %	1,6	10	1,5
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	0,2	0,4	0,5
Hệ số biến thiên tái lập, RSD_R , %	5,1	3,5	3,7

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400:2010 (ISO 707:2008) *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.*
- [2] TCVN 9675-2:2013 (ISO 12966-2:2011) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Sắc kí khí các metyl este của axit béo – Phần 2: Chuẩn bị metyl este của axit béo*
-