

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10479:2014

ISO 16931:2009

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –
XÁC ĐỊNH CÁC TRIACYLGLYCERON ĐÃ POLYME HÓA
BẰNG SẮC KÝ RÂY PHÂN TỬ HIỆU NĂNG CAO (HPSEC)**

*Animal and vegetable fats and oils –
Determination of polymerized triacylglycerons by high-performance
size-exclusion chromatography (HPSEC)*

HÀ NỘI – 2014

Lời nói đầu

TCVN 10479:2014 hoàn toàn tương đương với ISO 16931:2009;

TCVN 10479:2014 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 các triacylglycerol đã polyme hóa bằng sắc kí rây phân tử hiệu năng cao (HPSEC)

Animal and vegetable fats and oils - Determination of polymerized triacylglycerols by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí rây phân tử hiệu năng cao (HPSEC) để xác định hàm lượng các triacylglycerol đã polyme hóa (PTAG) trong các loại dầu mỡ có chứa ít nhất 3 % (tính theo diện tích pic) các polyme này, tính bằng phần khối lượng. Các PTAG (gọi đúng là dimeric triacylglycerol và oligomeric triacylglycerol) có dạng rắn được hình thành trong suốt quá trình đun nóng dầu mỡ và vì vậy phương pháp này dùng để đánh giá quá trình suy giảm chất lượng do nhiệt của chất béo chiên rán sau khi sử dụng.

Phương pháp này áp dụng cho mỡ rắn, dầu mỡ đã qua xử lý nhiệt có hàm lượng các PTAG ít nhất 3 %. Phương pháp này cũng có thể áp dụng để xác định các polyme có trong chất béo dùng làm thức ăn chăn nuôi, mặc dù trong trường hợp này sử dụng phương pháp chiết có thể ảnh hưởng đến kết quả.

CHÚ THÍCH: Để biết thêm chi tiết, xem TCVN 4331(ISO 6492)⁽⁴⁾.

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 thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Các triacylglycerol đã polyme hóa (polymerized triacylglycerols)

PTAGs

Thành phần dầu mỡ gia nhiệt được xác định bằng phương pháp HPSEC theo các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng các PTAG của tất cả các pic từ các triacylglycerol đã polyme hóa đã được rửa giải, các mono-triacylglycerol, các di-triacylglycerol và các triacylglycerol (PTAG, MAG, DAG và TAG) đã rửa giải được biểu thị bằng phần trăm khối lượng, tính bằng gam trên 100 gam .

4 Nguyên tắc

Trộn kỹ mẫu với tetrahydrofuran (THF) và tách các PTAG bằng phương pháp sắc kí thẩm thấu gel theo kích thước phân tử. Các hợp chất được phát hiện bằng detector chỉ số khúc xạ.

CHÚ THÍCH: Để khả năng tách tốt hơn thì sử dụng hai cột nối tiếp (2 x 300 mm).

5 Thuốc thử

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

CẢNH BÁO – Cần chú ý các quy định về việc xử lý các chất gây nguy hiểm. Cần tuân thủ các biện pháp an toàn kỹ thuật, an toàn đối với tổ chức và cá nhân.

5.1 Tetrahydrofuran (THF), dùng cho HPLC, có thể được ổn định bằng butylhydroxytoluen (BHT), đã khử khí, không chứa nước.

Đảm bảo rằng THF sử dụng làm dịch pha loãng mẫu có cùng hàm lượng nước với chất rửa giải; nếu không có thể quan sát thấy pic âm.

5.2 Toluene, dùng cho HPLC.

5.3 Dầu oliu nguyên chất hạng đặc biệt, dùng làm chất chuẩn: thêm từ 100 mg đến 300 mg dầu vào 10 ml THF và đồng hóa hỗn hợp.

CHÚ THÍCH: Dầu oliu nguyên chất hạng đặc biệt không chứa các PTAG và có thể được sử dụng để xác định thời gian lưu của các monome TAG.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Bình chứa dung môi, dung tích từ 500 ml đến 1 000 ml, có bộ lọc dòng pha động polytetrafluetylen.

6.2 **Bơm HPLC**, không xung, có tốc độ dòng thể tích từ 0,5 ml/min đến 1,5 ml/min.

6.3 **Van bơm**, có vòng bơm 20 μ l và xyranh thích hợp có thể tích từ 50 μ l đến 100 μ l hoặc có **bộ bơm mẫu tự động** thích hợp.

6.4 **Cột bằng thép không gỉ**, dài 2 x 300 mm, đường kính trong từ 7,5 mm đến 7,8 mm, được nhồi gel co-polymer styren-divinylbenzen hiệu năng cao; hình cầu, đường kính 5 μ m, cỡ lỗ 10 nm hoặc 50 nm¹⁾.

CHÚ THÍCH: Sắc kí đồ trong Phụ lục A cho độ phân giải cần thiết đối với hai cột.

Nên sử dụng cột bảo vệ. Hiệu suất cột được xác định bằng số đĩa lý thuyết, n , đối với các monone TAG phải ít nhất là 6 000.

Duy trì nhiệt độ cột từ 30 °C đến 35 °C bằng thiết bị kiểm soát.

Cột có thể được bảo quản trong toluen (5.2), nếu cần, mặc dù kinh nghiệm cho thấy giữ hệ thống chạy bằng THF là tốt hơn.

6.5 **Detector**, detector chỉ số khúc xạ kiểm soát được nhiệt độ.

Nhiệt độ lý tưởng đối với detector là trên nhiệt độ cột (từ 30 °C đến 35 °C).

6.6 **Hệ thống dữ liệu sắc kí (CDS)**, cho phép hiển thị và định lượng chính xác diện tích pic.

6.7 **Xyranh dùng 1 lần**, dung tích 1 ml

6.8 **Bộ lọc nylon**, cỡ lỗ 0,45 μ m²⁾.

6.9 **Xyranh HPLC**, dung tích từ 50 μ l đến 100 μ l.

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555)¹⁾.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6128 (ISO 661).

¹⁾ 1 nm = 10 Å

²⁾ Bộ lọc xyranh Nalgene 4mm là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

9 Cách tiến hành

9.1 Khởi động thiết bị HPLC

Cần thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bật hệ thống và bơm THF ở tốc độ dòng từ 0,5 ml/min đến 1 ml/min để làm sạch toàn bộ hệ thống đến van bơm. Nối cột vào van bơm và rửa cột bằng khoảng 30 ml THF. Nối cột với cuvet đựng mẫu của detector. Rót THF đầy cuvet chuẩn. Chỉnh tốc độ dòng pha động từ 0,5 ml/min đến 1,0 ml/min. Đợi đến khi hệ thống đạt đến độ ổn định thích hợp (độ sai lệch của đường nền không đáng kể).

Nếu sử dụng cột đưa ra dưới đây thì hệ thống có thể ổn định trong khoảng 15 min. Đối với các cột nhỏ khác, hệ thống khó ổn định hơn. Ví dụ nên thực hiện từng bước việc thay đổi pha động từ toluen sang THF, bằng các hỗn hợp có tỉ lệ THF khác nhau, mỗi hỗn hợp chứa ít nhất là 25 % THF. Thông thường hệ thống ổn định trong khoảng 12 h.

Các điều kiện sau được cho là thích hợp:

Cột: PLgel³⁾ kích thước 10 nm, 2× 300 mm× 7,6 mm, cỡ hạt 5 µm;

Chất rửa giải: THF;

Tốc độ dòng: 0,8 ml/min;

Lò cột: 35 °C;

Detector: RI cài đặt ở 35 °C;

Thể tích bơm: 20 µl.

9.2 Chuẩn bị phân mẫu thử và mẫu phân tích

Thêm khoảng 100 mg đến 300 mg mẫu thử (Điều 8) vào 10 ml THF và đồng hóa. Lọc qua bộ lọc nylon (6.8), nếu cần. Dùng xyranh HPLC bơm từ 20 µl đến 40 µl dung dịch.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Phân tích định tính

Sắc kí đồ của phép xác định cho thấy pic chính thể hiện các monome TAG (khối lượng phân tử tương đối khoảng 900) và một hoặc một vài các pic nhỏ hơn cùng với thời gian lưu ngắn hơn thể hiện các PTAG (dime và cao hơn oligome).

³⁾ Plgel là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Trong điều kiện thích hợp, các TAG và các PTAG có thể được tách riêng ở độ phân giải tốt (Xem Hình A.1 và Hình A.2) ngay cả ở mức các PTAG thấp.

Tuy nhiên trong một số trường hợp (có thể liên quan đến hiện tượng hư hỏng phức hợp), hình dạng pic có trước các pic triacylglycerol có thể không rõ ràng gây khó khăn cho việc tính toán (Hình 2).

10.2 Phân tích định lượng

Thực hiện phép tính theo phương pháp nội chuẩn, giả sử tất cả các thành phần có trong mẫu được rửa giải có cùng hệ số đáp ứng. Điều quan trọng là phải có đường nền thẳng.

Phần khối lượng của các PTAG, w_{PTAG} , tính bằng gam trên 100 g, được tính bằng công thức sau:

$$w_{PTAG} = \frac{\sum A_{PTAG} \times 100}{\sum A_{tot}}$$

Trong đó

$\sum A_{PTAG}$ là tổng diện tích pic của tất cả các PTAG;

$\sum A_{tot}$ là tổng diện tích pic của tất cả các acylglycerol (PTAG, TAG, DAG và MAG).

Biểu thị kết quả đến một chữ số thập phân.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

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

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên cùng một loại vật liệu thử, trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, nằm trong dải các giá trị trung bình nêu trong Bảng B.1 không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại, r , thường được suy ra bằng phương pháp nội suy tuyến tính từ các giá trị nêu trong Bảng B.1.

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên cùng một vật liệu thử, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập, R , thường được suy ra bằng phương pháp nội suy tuyến tính từ các giá trị nêu trong Bảng B.1.

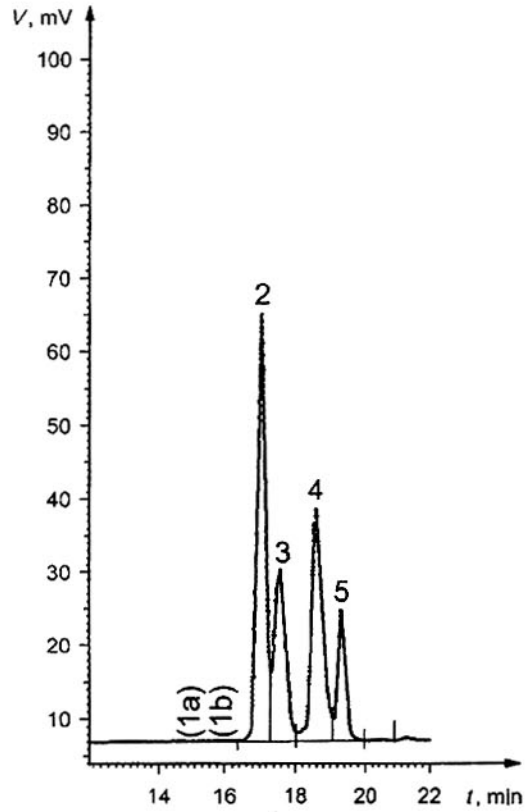
12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- 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) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này cùng với mọi tình huống bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) các kết quả thử nghiệm thu được, hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Sắc kí đồ

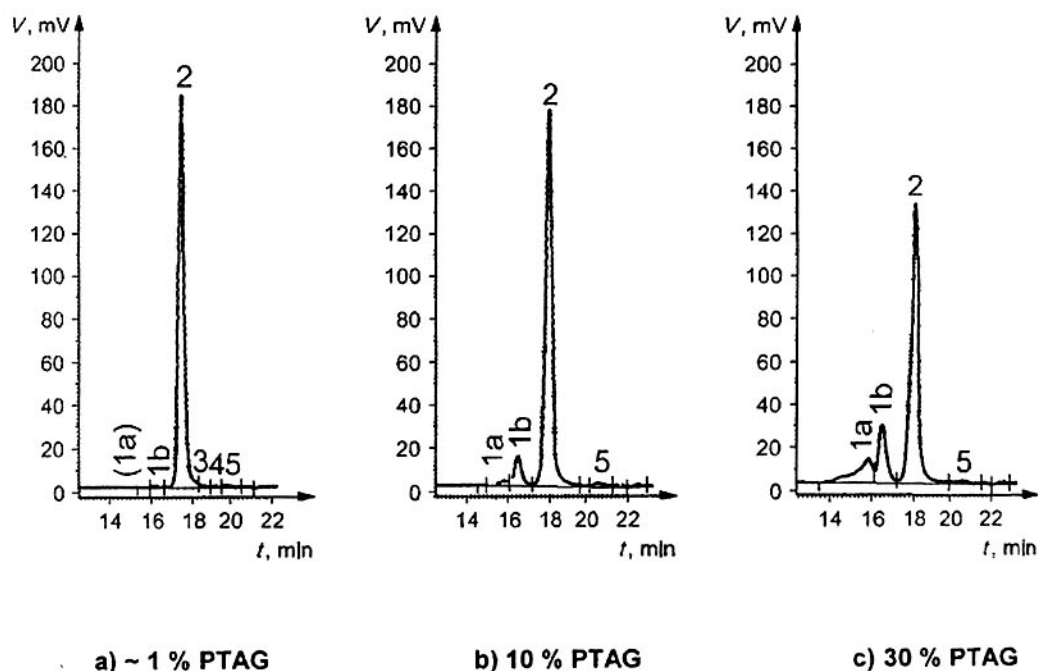


CHÚ DẪN:

1a/1b	poly-/oligomeric TAG
1b	dime TAG
2	TAG
3	DAG
4	MAG
5	axit béo
t	thời gian
V	tín hiệu đáp ứng

CHÚ THÍCH: Các điều kiện nêu trong 9.1.

Hình A.1 – HPSEC hỗn hợp thử nghiệm của các TAG, DAG, MAG và các axit béo tự do

**CHÚ DẪN:**

- 1a/1b poly-/oligomeric TAG
 1b dime TAG
 2 TAG
 3 DAG
 4 MAG
 5 axit béo

- t thời gian
 V tín hiệu đáp ứng

CHÚ THÍCH 1: Các điều kiện được nêu trong 9.1

CHÚ THÍCH 2: Thứ tự rửa giải được quy định theo cỡ phân tử và khối lượng phân tử tương đối. Trong quá trình chiên rán, không tạo thành các DAG. Tuy nhiên, pic từ các DAG tăng do quá trình oxy hóa bởi sự giảm nhiệt của các TAG thành các TAG có hai đoạn C_7 hoặc C_8 và một axit béo C_{18} . Khối lượng phân tử tương đối bằng khối lượng phân tử tương đối của các DAG.

Hình A.2 – HPLC của các TAG và PTAG: sắc kí đồ của dầu rán có phần khối lượng các PTAG khác nhau

Phụ lục B
(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử liên phòng thử nghiệm tiến hành ở cấp quốc tế do DIN và DGF tổ chức năm 2007, gồm 15 phòng thử nghiệm tham gia, mỗi phòng thu được hai kết quả thử đối với từng mẫu thử, cho các kết quả thống kê [được đánh giá theo TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994)^[2] và TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994)^[3]] được nêu trong Bảng B.1.

Bảng B.1 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Các mẫu dầu chiên rán được sử dụng	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm	15	15	15	15	15
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	14	15	13	15	14
Số lượng các kết quả trong tất cả các phòng thử nghiệm	28	30	26	30	28
Giá trị trung bình, \bar{w}_{PTAG} , %	5,23	11,95	12,81	15,78	20,42
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,10	0,12	0,11	0,13	0,14
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $CV(r)$ %	1,9	1,0	0,8	0,8	0,7
Giới hạn lặp lại, r ($2,8 s_r$)	0,28	0,32	0,30	0,37	0,39
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,22	0,20	0,19	0,26	0,15
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $CV(R)$ %	4,1	1,7	1,4	1,6	0,7
Giới hạn tái lập, R ($2,8 s_R$)	0,61	0,57	0,52	0,72	0,42
CHÚ THÍCH: Các kết quả và các thống kê được tính bằng gam trên 100 gam (phần trăm khối lượng).					

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 2625 (ISO 5555), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu.*
 - [2] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
 - [3] 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.*
 - [4] TCVN 4331:2001 (ISO 6492:1999), *Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng chất béo.*
 - [5] IUPAC Method 2.508, Determination of polymerized triglycerides in oils and fats by high performance liquid chromatography. Pure Appl. Chem. 1991, **63**, pp. 1168-1171. Available (2008-10-16) at: <http://www.iupac.org/publications/pac/1991/pdf/6308x1163.pdf>
-