

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 10712:2015**

**ISO 29841:2009**

Xuất bản lần 1

**DẦU, MỠ THỰC VẬT – XÁC ĐỊNH  
SẢN PHẨM PHÂN HỦY CỦA CHLOROPHYLL *a* VÀ *a'*  
(CÁC PHEOPHYTIN *a*, *a'* VÀ CÁC PYROPHEOPHYTIN)**

*Vegetable fats and oils – Determination of the degradation products  
of chlorophylls *a* and *a'* (pheophytins *a*, *a'* and pyropheophytins)*

HÀ NỘI – 2015



## Lời nói đầu

TCVN 10712:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 29841:2009;

TCVN 10712:2015 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 thực vật – Xác định sản phẩm phân hủy của chlorophyll a và a' (các pheophytin a, a' và các pyropheophytin)**

*Vegetable fats and oils – Determination of the degradation products of chlorophylls a and a' (pheophytins a, a' and pyropheophytins)*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định sản phẩm phân hủy pheophytin a, a' và pyropheophytin của các chlorophyll. Phương pháp này chỉ áp dụng cho dầu và chất béo thực vật.

### **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**

**Pyropheophytin a (hàm lượng sản phẩm phân hủy của chlorophyll)** [pyropheophytin a (content in chlorophyll degradation products)]

Khối lượng của pheophytins a chia cho tổng khối lượng của pyropheophytin a, a' và pyropheophytin a.

### **4 Nguyên tắc**

Tách các chất màu (chlorophyll, pheophytin a và a', pyropheophytin a) ra khỏi các phần chất béo chính (triglycerid), dùng sắc ký cột thu nhỏ trên cột silicagel. Dịch rửa giải được phân tích bằng cột pha đảo RP18-HPLC, sau đó các hợp chất đã tách được đo ở bước sóng 410 nm bằng detector quang phổ.

Việc phân tích dầu của một số loại hạt (ví dụ: dầu hạt nho) cần đến độ nhạy cao hơn, có thể thực hiện được bằng cách dùng detector huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 430 nm và bước sóng phát xạ ở 670 nm.

Cũng có thể sử dụng HPLC để xác định trực tiếp bằng detector huỳnh quang như trong Phụ lục C.

## **5 Thuốc thử**

**CẢNH BÁO – Cần chú ý mọi qui định về xử lý các chất gây nguy hại. Các tổ chức và các nhân phải tuân thủ các biện pháp về an toàn kỹ thuật.**

Trong suốt quá trình phân tích, chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích, trừ khi có các qui định khác.

### **5.1 Chlorophyll a.**

**CHÚ THÍCH** Vì không có chất liệu chuẩn pheophytin và pyropheophytin, nên chlorophyll a được sử dụng để tạo ra sản phẩm phân hủy này. Pheophytin thu được từ dung dịch chlorophyll a bằng cách axit hóa; pyropheophytin thu được bằng cách đun nóng thêm (> 100 °C) (Tài liệu tham khảo [4]).

### **5.2 Axeton.**

### **5.3 Metanol.**

### **5.4 Dietyl ete.**

### **5.5 Ete dầu mỏ, điểm sôi trong dải từ 40 °C đến 60 °C.**

### **5.6 *n*-heptan, hoặc nếu không sẵn có thì dùng *n*-hexan**

**CHÚ Ý – *n*-hexan độc, vì vậy không dùng *n*-hexan nếu có sẵn *n*-heptan.**

### **5.7 Hỗn hợp dung môi ete dầu mỏ và dietyl ete: các phần thể tích $\varphi_{\text{PetE}} = 90 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ ; $\varphi_{\text{Et}_2\text{O}} = 10 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ .**

## **6 Thiết bị, dụng cụ**

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

### **6.1 Máy HPLC.**

**6.1.1 Hệ thống HPLC**, gồm có bơm, dụng cụ bơm mẫu (vòng bơm 20  $\mu\text{l}$ ) hoặc bộ bơm mẫu tự động, detector quang phổ để đo ở bước sóng 410 nm hoặc detector huỳnh quang (bước sóng kích thích,  $\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$  và bước sóng phát xạ,  $\lambda_{\text{ex}} = 670 \text{ nm}$ ) và hệ thống tích phân.

**6.1.2 Cột HPLC**, dài 250 mm, đường kính trong 4,0 mm hoặc 4,6 mm, được nhồi đầy hạt pha đảo RP18, cỡ 5  $\mu\text{m}$ .

Các điều kiện sau đây cho thấy thích hợp:

Pha tĩnh: Partisil ODS 3, 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4,6 mm<sup>1)</sup> ;

Pha động: Nước, metanol và axeton (6.1.3);

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

**6.1.3 Pha động**, hỗn hợp nước, metanol và axeton, các phần thể tích:  $\varphi_{\text{H}_2\text{O}} = 4 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ ;  $\varphi_{\text{MeOH}} = 36 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ ,  $\varphi_{\text{Me}_2\text{C}=\text{O}} = 60 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ . Tất cả các dung môi phải là loại dùng cho HPLC.

**6.2 Bình hình côn**, dung tích 10 ml hoặc 25 ml.

**6.3 Cốc có mô**, có các dung tích khác nhau.

**6.4 Bộ cô quay**, có nồi cách thủy.

**6.5 Lọ lấy mẫu tự động**, dung tích thích hợp.

**6.6 Cột silica**, 1 000 mg/6ml, 55  $\mu\text{m}$ , 700 nm hoặc **cột diol**, dung tích 3 ml<sup>2)</sup>.

CHÚ THÍCH Các cột mini silica tự chế cũng có thể được sử dụng để tách chiết.

## 7 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

### 7.1 Lấy mẫu

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

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

### 7.2 Chuẩn bị mẫu thử

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

<sup>1)</sup> Cột pha đảo C18 với 10,5 % phần khối lượng cacbon, một đầu để khử hoạt tính của silanol nhằm giảm thiểu sự cần thiết phải khử ion hoặc các chất ghép cặp ion là ví dụ về sản phẩm bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

<sup>2)</sup> Strata Si-1 (cột silica) và các cột Supelclean LC-Diol SPE – Supleco 57016 (cột diol) là các ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

**CHÚ Ý – Các mẫu thử phải đựng trong bình thủy tinh, tránh ánh sáng và được bảo quản lạnh. Sau khi làm sạch, các dung dịch thử phải được phân tích ngay để tránh bị giảm chất lượng và oxy hóa. Tránh để mẫu thử tiếp xúc với chất dẻo.**

## 8 Cách tiến hành

**8.1** Cân khoảng 300 mg mẫu thử (7.2) cho vào cốc có mỏ nhỏ (6.3), hòa tan trong 1 ml *n*-heptan hoặc *n*-hexan (5.6) và rót dung dịch này vào cột silica (cột silica gel) (6.6). Tráng cốc có mỏ hai lần, mỗi lần 1 ml ete dầu mỏ (5.5), rót luôn nước rửa này vào cột.

**8.2** Ngay sau khi dung môi chảy lên đỉnh cột, rửa giải các chất không phân cực hai lần, mỗi lần dùng 5 ml hỗn hợp dung môi ete dầu mỏ/dietyl ete (5.7).

**8.3** Rửa giải pheophytin hai lần, mỗi lần dùng 5 ml axeton (5.2) và thu lấy dịch rửa giải này vào bình hình côn (6.2), tránh ánh sáng.

**8.4** Làm bay hơi dung môi đến khô trên bộ cô quay (6.4) ở nhiệt độ tối đa 20 °C. Hòa tan phần còn lại trong 200 µl axeton. Bơm ngay dung dịch này vào máy HPLC (6.1).

**LƯU Ý – Pheophytin không ổn định dưới ánh sáng và dễ bị oxy hóa.**

**8.5** Sắc ký đồ điển hình thu được trong các điều kiện cột qui định trong 6.1.2 được nêu trong Hình A.1 và Hình A.2.

## 9 Kết quả của phép xác định

### 9.1 Nhận biết pic

Sắc ký đồ của phép xác định có thể cho thấy các pic của các chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, tương ứng với các pheophytin và các pyropheophytin. Cần tham khảo các sắc ký đồ điển hình nêu trong Hình A.1 và Hình A.2 vì không có các chất màu chuẩn do tính không ổn định của chúng. Để nhận biết pheophytin *a*, pheophytin *a'* và pyropheophytin *a*, xem Hình A.1 và Hình A.2.

### 9.2 Tính hàm lượng pyropheophytin *a*

Sử dụng diện tích pic để tính các tỷ lệ tương đối của các chất được phân tích có trong dung dịch mẫu. Trong trường hợp này, giả định rằng hệ số đáp ứng của tất cả các chất màu là như nhau. Hàm lượng pyropheophenol *a*,  $w_{PPPa}$ , biểu thị bằng phần trăm khối lượng, tính được dựa vào tỷ lệ diện tích pic như sau:

$$w_{PPPa} = \frac{A_{PPPa} \times 100}{(A_{PPPa} + \sum A_{PP})}$$

Trong đó



$A_{PPPa}$  là diện tích pic của pyropheophytin  $a$ ;

$\sum A_{PP}$  là tổng các diện tích của pic pheophytin  $a$  và  $a'$ .

Báo cáo kết quả đến một chữ số thập phân.

## 10 Độ chụm của phương pháp

### 10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các 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 thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và các nền mẫu khác với các dải nồng độ và các nền mẫu đã nêu.

### 10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử, tiến hành trên cùng một vật liệu thử, thực hiện trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người phân tích, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị  $r$  nêu trong Bảng B.1.

### 10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử, tiến hành trên cùng một vật liệu thử, thực hiện 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 giá trị  $R$  nêu trong Bảng B.1.

## 11 Báo cáo thử nghiệm

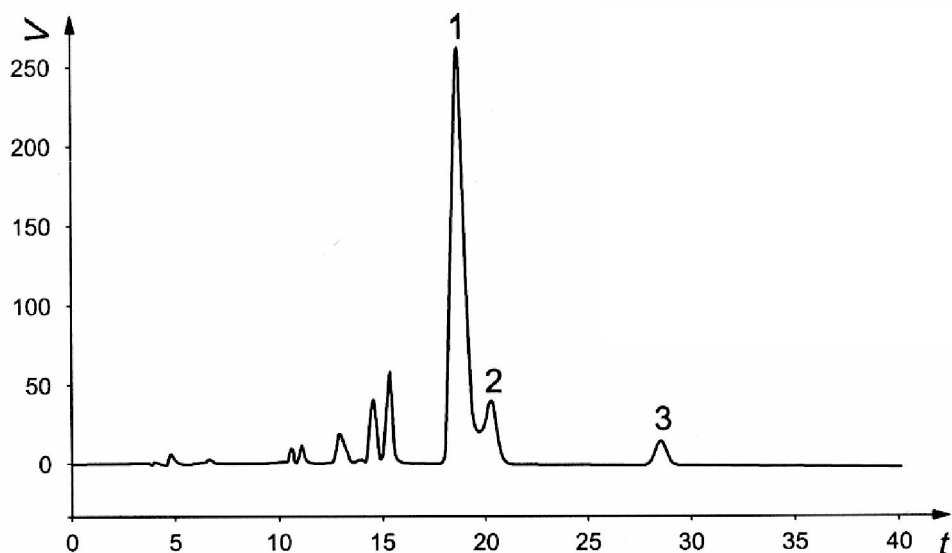
Báo cáo thử nghiệm phải ít nhất bao gồm các thông tin sau đây:

- mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- 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 có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

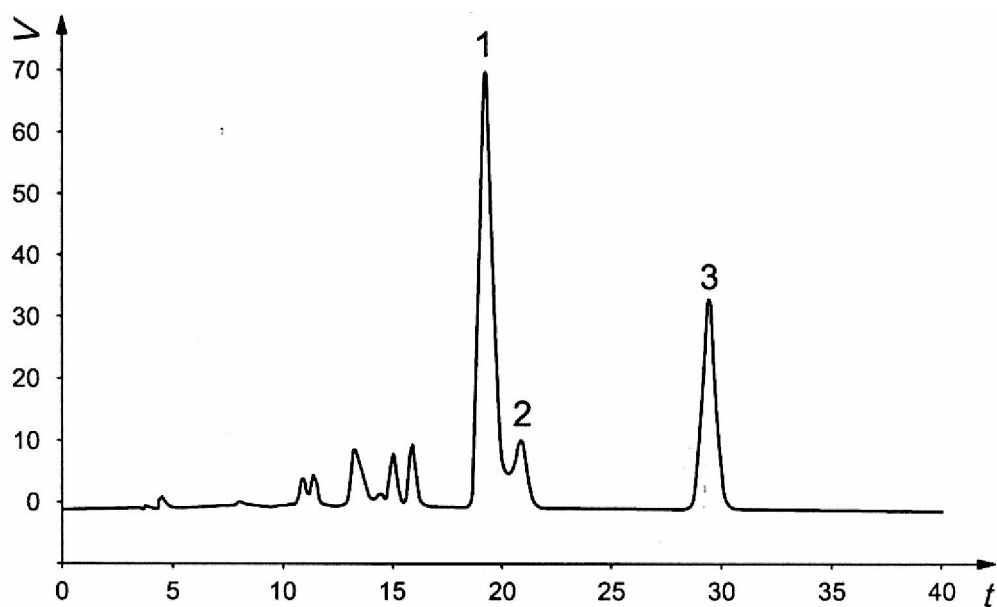
### Ví dụ về sắc ký đồ điện hình



#### CHÚ DẪN

- 1 pheophytin a
- 2 pheophytin a'
- 3 pyropheophytin
- t* thời gian rửa giải, tính bằng phút
- V* chênh lệch điện thế, tính bằng vôn

**Hình A.1 – Sắc ký đồ HPLC của dầu ô liu nguyên chất đặc biệt với 5 % hàm lượng pyropheophytin trong sản phẩm phân hủy của chlorophyll**

**CHÚ DẪN**

- 1 pheophytin *a*
- 2 pheophytin *á*
- 3 pyropheophytin
- t* thời gian rửa giải, tính bằng phút
- V* chênh lệch điện thế, tính bằng vôn

**Hình A.2 – Sắc ký đồ HPLC của dầu ô liu nguyên chất đặc biệt với 30 % khối lượng pyropheophytin trong sản phẩm phân hủy của chlorophyll**

**Phụ lục B**

(Tham khảo)

**Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm**

Độ chụm của phương pháp là kết quả của nghiên cứu liên phòng thử do Ban kỹ thuật chung về Phân tích mỡ, dầu, sản phẩm chất béo, sản phẩm có liên quan và các nguyên liệu thô (DIN/DGF) tổ chức gồm 16 phòng thử nghiệm từ Pháp, Đức và Ý đã tham gia. Nghiên cứu đã được tiến hành năm 2005 trên năm mẫu và dữ liệu về độ chụm được tính phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)<sup>[2]</sup> và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)<sup>[3]</sup>.

**Bảng B.1 – Tổng hợp các kết quả thống kê của dầu ô liu**

<b>Mẫu</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
Số lượng các phòng thử nghiệm tham gia, $N$	16	16	16	16	16
Số lượng các phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ, $n$	12	12	14	15	15
Số lượng các kết quả thử nghiệm đơn lẻ của tất cả các phòng thử nghiệm trên mỗi mẫu $\sum_{i=1}^n n_{w,i}$	24	24	28	30	30
Giá trị trung bình, $\bar{w}_{PPPa, \%}$	<b>28,86</b>	<b>34,01</b>	<b>5,63</b>	<b>6,26</b>	<b>84,75</b>
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r, \%$	0,53	0,61	0,59	0,36	1,09
Hệ số biến thiên lặp lại, $CV(r), \%$	1,8	1,8	10,4	5,8	1,3
Giới hạn lặp lại, $r(s_r \times 2,8), \%$	<b>1,48</b>	<b>1,71</b>	<b>1,65</b>	<b>1,01</b>	<b>3,05</b>
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R, \%$	1,78	2,08	0,79	1,29	3,06
Hệ số biến thiên tái lập, $CV(R), \%$	6,2	6,1	14,1	20,7	3,6
Giới hạn tái lập, $R(s_R \times 2,8), \%$	<b>4,98</b>	<b>5,82</b>	<b>2,21</b>	<b>3,61</b>	<b>8,56</b>

## Phụ lục C

(Tham khảo)

### Phương pháp HPLC trực tiếp có detector huỳnh quang

#### C.1 Nguyên tắc

Phụ lục này mô tả phương pháp thay thế. Dầu đưa vào HPLC mà không xử lý trước.

#### C.2 Các dung môi dùng cho HPLC

**C.2.1 Nước**, dùng cho HPLC.

**C.2.2 Metanol**, dùng cho HPLC.

**C.2.3 Axeton**, dùng cho HPLC.

#### C.3 Thiết bị, dụng cụ

**C.3.1 Hệ thống HPLC hai kênh** gồm có bơm, dụng cụ bơm mẫu (vòng 20  $\mu$ l) hoặc bộ lấy mẫu tự động, detector huỳnh quang ( $\lambda_{ex} = 430$  nm và  $\lambda_{em} = 670$  nm) và hệ thống tích phân.

**C.3.2 Cột HPLC**, dài 250 nm, đường kính trong 4,0 mm hoặc 4,6 mm, nhồi đầy các hạt RP18 pha đảo, cỡ hạt 5  $\mu$ m.

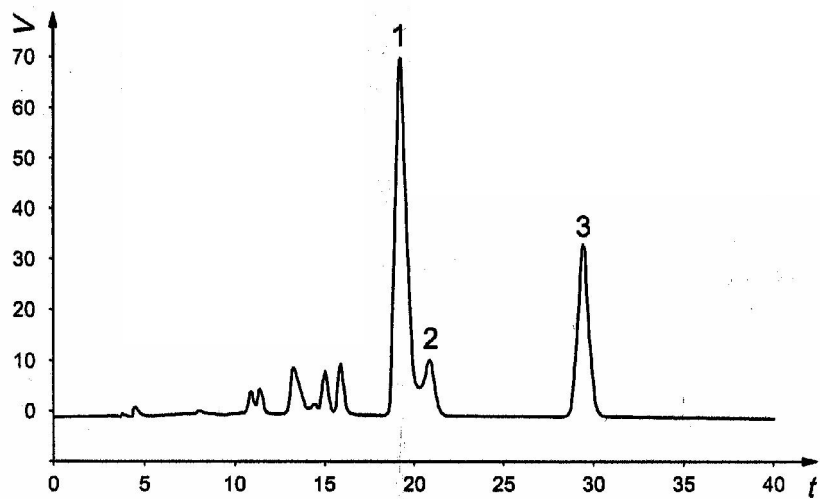
#### C.4 Cách tiến hành

**C.4.1** Chuyển các loại dầu vào lọ HPLC màu hổ phách.

**C.4.2** Chuyển phần mẫu thử vào máy HPLC (C.3). Các điều kiện được nêu trong Bảng C.1 cho thấy thích hợp và cho sắc ký đồ điển hình, ví dụ nêu trong hình C.1.

**Bảng C.1 – Chương trình rửa giải với tốc độ 1,0 ml/min**

Thời gian (phút)	Dung môi A Phần thể tích: $\varphi_{H_2O} = 4\%$ ; $\varphi_{MeOH} = 76\%$ ; $\varphi_{Me_2C=O} = 20\%$	Dung môi B Phần thể tích: $\varphi_{H_2O} = 4\%$ ; $\varphi_{MeOH} = 36\%$ ; $\varphi_{Me_2C=O} = 60\%$
0	100 %	0 %
7	0 %	100 %
50	0 %	100 %
50,1	100 %	0 %
60	100 %	0 %



**CHÚ DẪN**

1 pheophorbide

2 metylpheophorbide

3 pheophytin *b*

4 pheophytin *a*

5 pheophytin *a'*

6 pyropheophytin

*M* detector huỳnh quang, tính bằng lux

*t* thời gian rửa giải, tính bằng phút

**Hình C.1 – Sắc ký đồ HPLC của dầu hạt nho có pyropheophytin**

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 2625:2007 (ISO 5555:2001), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
- [2] 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*
- [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] AITZETMULLER, K. Chlorophyll-Abbauprodukte in pflanzlichen Olen [chlorophyll degradation products in vegetable oils]. Fat Sci. Technol. 1989, 91, pp 99-105; AITZETMULLRE, K. Analysis of chlorophyll degradation products in fat and oilseeds. In: *Actes du congres international "Chevreul" pour l'étude des cosps gras* [proceedings of the Chevreul international congress], Angers, 1989-06-06/10, p. 177-84. Association francaise pour l'Étude des corps gras, Neuilly sur Seine.
-