

TCVN 10715-2:2015

ISO 23275-2:2006

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –
ĐƯƠng LƯỢNG BƠ CACAO TRONG BƠ CACAO
VÀ SÔCÔLA THÔNG DỤNG –
PHẦN 2: ĐỊNH LƯỢNG ĐƯƠng LƯỢNG BƠ CACAO**

*Animal and vegetable fats and oils –
Cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate –
Part 2: Quantification of cocoa butter equivalents*

HÀ NỘI – 2015

Lời nói đầu

TCVN 10715-2:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 23275-2:2006;

TCVN 10715-2:2015 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;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 10715 (ISO 23275), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Đương lượng bơ cacao trong bơ cacao và sôcôla thông dụng* gồm có các phần sau:

- TCVN 10715-1:2015 (ISO 23275-1:2006), *Phần 1: Xác định sự có mặt đương lượng bơ cacao*
- TCVN 10715-2:2015 (ISO 23275-2:2006), *Phần 2: Định lượng đương lượng bơ cacao*

Lời giới thiệu

“Đường lượng bơ cacao” là thuật ngữ chung dùng cho các chất béo được sử dụng để thay thế cho bơ cacao trong sôcôla. Chúng có thành phần hóa học và các đặc tính vật lý rất giống bơ cacao, vì vậy rất khó để định lượng và thậm chí trong một số trường hợp rất khó để phát hiện. Về nguyên tắc, đường lượng bơ cacao phải có hàm lượng chất béo axit lauric thấp, giàu triacylglycerol chưa bão hòa đơn đối xứng của loại 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol, 1-palmitoyl-oleoyl-3-stearoylglycerol và 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol, có thể trộn lẫn với bơ cacao và chỉ thu được bằng cách tinh luyện và phân đoạn.

Trong khối liên minh Châu Âu, thì các chất béo thực vật thu được từ các thực vật liệt kê dưới đây, có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc hỗn hợp, phù hợp với Hướng dẫn 2000/36/EC ^[1]:

- illipé, mỡ động vật Borneo hoặc tengkawang (*Shorea* spp.),
- dầu cọ (*Elaeis guineensis*, *Elaeis olifera*),
- cây chai (*Shorea robusta*),
- cây hạt mỡ (*Butyrospermum parkii*),
- kokum gurgi (*Garcinia indica*) và
- hạt xoài (*Mangifera indica*).

Tiêu chuẩn này qui định qui trình phát hiện các loại chất béo này (chỉ hạn chế đối với các mẫu chất béo illipé tinh khiết) trong bơ cacao và sôcôla thông dụng. TCVN 10715-2 (ISO 23275-2) qui định qui trình đáng tin cậy định lượng các chất béo này ở mức 5 %, phù hợp với giới hạn qui định trong Hướng dẫn 2000/36/EC ^[1] của Nghị Viện và Hội đồng Châu Âu.

Để thuận tiện cho việc sử dụng cả hai tiêu chuẩn TCVN 10715-1 (ISO 23275-1) và TCVN 10715-2 (ISO 23275-2), sổ tay phân tích có tên là “CoCal-1” đã được thiết lập. “CoCal-1” bao gồm các phương pháp đã được đánh giá xác nhận để phát hiện (phần 1) và định lượng (phần 2) CBE trong sôcôla thông dụng và chất chuẩn bơ cacao đã được chứng nhận (IRMM-801) để hiệu chuẩn thiết bị phân tích và bảng đánh giá điện tử Microsoft Excel[®] để tính kết quả cuối cùng. Một nhóm phân tích tiến hành phát hiện và định lượng CBE để hiệu chuẩn hệ thống tách bằng sắc ký khí, sử dụng IRMM-801, tách các phân đoạn triglycerid của mẫu theo yêu cầu và dùng bảng đánh giá điện tử xử lý dữ liệu tiếp theo để phát hiện và định lượng CBE.

Dầu mỡ động vật và thực vật – Đường lượng bơ cacao trong bơ cacao và sôcôla thông dụng – Phần 2: Định lượng đường lượng bơ cacao

*Animal and vegetable fats and oils – Cocoa butter equivalents
in cocoa butter and plain chocolate –
Part 2: Quantification of cocoa butter equivalents*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định qui trình định lượng đường lượng bơ cacao (CBE) trong bơ cacao (CB) và sôcôla thông dụng bằng phân tích sắc ký khí mao quản độ phân giải cao (HR-GC) của các triacylglycerol và đánh giá dữ liệu sau đó bằng phân tích hồi qui bình phương nhỏ nhất từng phần.

CHÚ THÍCH Có thể xác định các CBE trong CB và sôcôla thông dụng ở mức 0,6 % (hàm lượng chất béo của sôcôla được giả định là 30 %) theo qui trình qui định trong TCVN 10715- 1 (ISO 23275-1). Sự khác nhau về qui trình của hai phương pháp hiện hành là số lượng các triacylglycerol riêng lẻ được sử dụng để xử lý dữ liệu và nguyên tắc đánh giá dữ liệu bằng toán học. Sự có mặt của các CBE được phát hiện bằng phân tích hồi qui tuyến tính áp dụng cho tỉ lệ tương đối của ba phân đoạn triacylglycerol chính của chất béo cần phân tích. Lượng hỗn hợp CBE được ước tính bằng phân tích hồi qui bình phương nhỏ nhất từng phần áp dụng cho các tỉ lệ tương đối của năm triacylglycerol chính.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Đường lượng bơ cacao (cocoa butter equivalents)

CBEs

Các chất béo phát hiện được trong bơ cacao và sôcôla thông dụng.

2.2

Hàm lượng CBE bơ cacao (CBE content of cocoa butter)

Phần khối lượng của các chất trong bơ cacao xác định được bằng qui trình qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng CBE của bơ cacao được biểu thị bằng gam trên 100 g bơ cacao.

2.3

Hàm lượng CBE của sôcôla (CBE content of chocolate)

Phần khối lượng của các chất trong sôcôla xác định được bằng qui trình qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng CBE của sôcôla được biểu thị bằng gam trên 100 g sôcôla.

3 Nguyên tắc

Bơ cacao hoặc chất béo thu được từ sôcôla thông dụng, được tách bằng HR-GC thành các phân đoạn triacylglycerol theo khối lượng phân tử và mức độ chưa bão hòa. Lượng CBE bổ sung được ước tính bằng phân tích hồi qui bình phương nhỏ nhất từng phần, áp dụng cho các phân đoạn triacylglycerol riêng lẻ của chất béo cần phân tích.

4 Thuốc thử và vật liệu

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích, trừ khi có các qui định khác.

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

4.1 Chất chuẩn bơ cacao đã được chứng nhận (CRM), IRMM-801 ^[2] dùng để hiệu chuẩn và kiểm tra sự phù hợp của hệ thống.

4.2 Dung môi chiết chất béo, các dung môi không bị clo hóa (ví dụ, dietyl ete, *n*-heptan, iso-octan).

4.3 Axit clohydric, $c = 8 \text{ mol/l}$.

4.4 Giấy lọc gấp nếp¹⁾, 15 cm.

5 Thiết bị, dụng cụ

5.1 Cân phân tích, có thể đọc được đến 0,1 mg.

5.2 Tủ sấy, duy trì được nhiệt độ ở 55 °C.

Có thể sử dụng buồng sấy khác.

5.3 Máy nghiền trộn thực phẩm, máy trộn gia dụng có thiết kế mô tơ ở phía trên buồng trộn để tránh làm tan chảy mẫu ²⁾.

¹⁾ Giấy lọc trung bình S&S 589 là một ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn.

²⁾ Philips HR2833 là ví dụ về thiết bị 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.

5.4 Bình định mức, dung tích 20 ml.

5.5 Pipet, dung tích 1 ml.

5.6 Microxyranh, có thể tích tối đa 10 µl, được chia vạch đến 0,1 µl, hoặc **bộ lấy mẫu tự động**.

5.7 Máy sắc ký khí (GC), được gắn với hệ thống bơm lên cột lạnh và detector in hóa ngọn lửa (FID).

Có thể sử dụng hệ thống bơm khác [ví dụ, bơm chia dòng, bộ hóa hơi có cài đặt chương trình nhiệt độ (PTV) hoặc bơm có kim tiêm rời với điều kiện thu được các kết quả tương tự như trong 10.2.

Việc tách và định lượng cho thấy sẽ đáp ứng các yêu cầu khi tuân thủ các điều kiện thực nghiệm sau đây:

- cột GC: dài 25 m đến 30 m, đường kính trong 0,25 mm, silica nung chảy được phủ 50 % phenylmethylpolysiloxan chịu nhiệt có độ dày màng 0,1 µm đến 0,15 µm.
- chương trình nhiệt độ: 100 °C (nhiệt độ ban đầu), tốc độ tăng nhiệt 30 °C/min đến 340 °C (nhiệt độ cuối cùng).
- khí mang: heli hoặc hydro (độ tinh khiết $\geq 99,999$ %).

CHÚ THÍCH Các cột và các điều kiện thực nghiệm khác thích hợp được sử dụng trong nghiên cứu cộng tác quốc tế, được nêu trong Phụ lục A. Có thể thay đổi các điều kiện vận hành để tách tối ưu các triacylglycerol của bơ cacao.

5.8 Hệ thống dữ liệu sắc ký

5.9 Máy chiết Soxhlet, có các khớp nối hình côn chuẩn, dung tích siphon khoảng 100 ml (ống chiết 33 mm × 88 mm), bình nón 250 ml và ống điều chỉnh nhiệt độ.

6 Lấy mẫu

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.

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

7 Chuẩn bị mẫu thử

7.1 Chuẩn bị CRM bơ cacao dùng để hiệu chuẩn và kiểm tra sự phù hợp của hệ thống

Trước khi mở và sử dụng CRM bơ cacao (4.1), làm ấm ampun trong tủ sấy (5.2) cho đến khi lượng chứa bên trong tan chảy. Khi thu được dung dịch trong, trộn lượng chứa bằng cách đảo chiều ampun nhiều lần, ít nhất 20 s. Sau đó mở ampun rồi chuyển lượng chứa bên trong vào lọ sạch, làm kín rồi bảo quản nơi mát để sử dụng tiếp.

7.2 Chuẩn bị mẫu sôcôla

Làm lạnh khoảng 200 g sôcôla cho đến khi cứng và dùng máy nghiền trộn thực phẩm (5.3) nghiền thành hạt mịn, Trộn đều và bảo quản trong lọ có nắp đậy kín khí ở nơi mát.

8 Cách tiến hành

8.1 Chiết chất béo

8.1.1 Tách chất béo và xác định hàm lượng chất béo có trong mẫu sôcôla (được chuẩn bị trong 7.2) bằng chiết Soxhlet ^[3] như sau: cân 4 g đến 5 g sôcôla cho vào cốc có mỏ dung tích 300 ml đến 500 ml. Thêm từ từ, trong khi vẫn khuấy, 45 ml nước sôi để thu được huyền phù đồng nhất. Thêm 55 ml HCl (4.3) và vài hạt trợ sôi đã khử chất béo hoặc chất chống trào khác và khuấy. Đậy mặt kính đồng hồ, đun dung dịch từ từ đến sôi và cho sôi nhẹ trong 15 min. Tráng mặt kính đồng hồ bằng 100 ml nước. Lọc dịch phân hủy qua giấy lọc gấp nếp loại trung bình (4.4) hoặc loại tương đương, tráng cốc có mỏ ba lần bằng nước. Tiếp tục rửa giấy lọc cho đến khi phần dịch lọc cuối cùng không còn clo. Chuyển giấy lọc chứa mẫu vào ống chiết đã khử chất béo rồi đặt vào cốc có mỏ nhỏ và sấy 2 h ở 100 °C. Đậy ống chiết bằng bông thủy tinh.

Cho vài hạt chống trào đã khử chất béo vào bình nón 250 ml rồi sấy 1 h ở 100 °C. Làm nguội bình nón trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng rồi cân. Cho ống chứa mẫu đã khô vào thiết bị Soxhlet (5.9) và thêm vài hạt chống trào. Tráng cốc phân hủy, cốc làm khô và mặt kính đồng hồ ba lần, mỗi lần dùng 50 ml ete dầu mỏ rồi cho nước rửa vào ống chiết. Cho đối lưu mẫu đã phân hủy trong 4 h, chỉnh thiết bị gia nhiệt sao cho các siphon chiết được trên 30 lần. Lấy ống ra và làm bay hơi dung môi. Sấy ống chiết ở 102 °C đến khối lượng không đổi (1,5 h). Để nguội trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng rồi cân. Khối lượng không đổi thu được khi quá trình sấy liên tiếp trong 1 h cho thấy hao hụt chất béo < 0,05 %. Các phép xác định kép phải nằm trong phạm vi 0,1 % chất béo.

Hàm lượng chất béo tổng số, c_{fat} của sôcôla, tính bằng gam trên 100 g, tính như sau:

$$c_{fat} = \frac{m_{fat} \times 100}{m}$$

trong đó

m_{fat} là chất béo tổng số thu được bằng cách chiết, tính bằng gam (g);

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

Có thể sử dụng quy trình chiết khác (ví dụ: bằng cách tăng tốc độ chiết trong dung môi, bằng cacbon dioxit siêu tới hạn hoặc bằng cách sử dụng lò vi sóng) với điều kiện là thu được các kết quả tương đương.

Báo cáo hàm lượng chất béo đến hai chữ số thập phân.

8.2 Tách các triacylglycerol riêng lẻ bằng HR-GC

Các mẫu thử [bơ cacao, chất béo được chiết từ sôcôla, CRM bơ cacao (4.1)] phải được làm ấm trong tủ sấy (5.2) cho đến khi tan chảy hoàn toàn. Nếu mẫu lỏng có chứa cặn, thì lọc mẫu bên trong tủ sấy để thu được dịch lọc trong. Dùng pipet (hoặc dụng cụ tương tự) để chuyển mẫu, trong quá trình cân, đưa nhiệt độ trong tủ sấy (5.2) về khoảng 55 °C để tránh phân đoạn từng phần chất béo.

Cân khoảng 0,2 g mẫu thử cho vào bình định mức 20 ml (5.4) rồi thêm dung môi chiết chất béo thích hợp đến vạch. Dùng pipet (5.5) lấy 1 ml dung dịch cho vào bình định mức 20 ml khác rồi thêm cùng một loại dung môi đến vạch.

Dùng hệ thống bơm lên cột lạnh bơm 0,5 µl đến 1,0 µl dung dịch thử nghiệm cuối cùng ($\rho_{\text{chất béo}} = 0,5 \text{ mg/ml}$) vào hệ thống HR-GC.

Có thể sử dụng bộ bơm và lượng mẫu khác với điều kiện hệ thống phát hiện được sử dụng cho độ nhạy tuyến tính và đáp ứng các tiêu chí phù hợp của hệ thống (10.2).

8.3 Nhận biết

Tiến hành nhận biết năm phân đoạn triacylglycerol chính [1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol (POP), 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-tearoyl-glycerol (POS), 1-palmitoyl-2,3-dioleoyl-glycerol (POO), 1,3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol (SOS) và 1-stearoyl-2,3-dioleoylglycerol (SOO)] bằng cách so sánh thời gian lưu của mẫu thử với thời gian lưu của CRM bơ cacao (4.1). Thông thường, các triacylglycerol xuất hiện theo trật tự số lượng nguyên tử cacbon tăng dần và tăng dần theo số nguyên tử chưa bão hòa nếu cùng số nguyên tử cacbon. Thứ tự rửa giải của các triacylglycerol của CRM bơ cacao được nêu trong ví dụ về sắc ký đồ (Hình A.1).

9 Tính kết quả

9.1 Xác định các hệ số đáp ứng

Xác định hệ số đáp ứng của các triacylglycerol POP, POS, POO, SOS và SOO bằng cách bơm dung dịch CRM bơ cacao, sử dụng các điều kiện thực nghiệm tương tự như đã sử dụng đối với mẫu. Tính phần trăm của từng phân đoạn trong số năm phân đoạn triacylglycerol bằng các công thức sau đây:

$$P_{\text{ref},i} = \frac{A_{\text{ref},i}}{\sum A_{\text{ref},i}} \times 100 \% \quad (1)$$

$$F_i = \frac{w_{\text{ref},i}}{P_{\text{ref},i}} \quad (2)$$

Trong đó

$P_{\text{ref},i}$ là phần trăm triacylglycerol thứ i trong CRM bơ cacao (từ các diện tích pic);

$A_{\text{ref},i}$ là diện tích pic của triacylglycerol thứ i trong CRM bơ cacao;

$\sum A_{\text{ref},i}$ là tổng các diện tích pic của POP, POS, POO, SOS, SOO trong CRM bơ cacao;

F_i là hệ số đáp ứng detector của triacylglycerol thứ i trong CRM bơ cacao;

$w_{\text{ref},i}$ là phần khối lượng của triacylglycerol thứ i trong CRM bơ cacao như đã nêu trong giấy chứng nhận, tính bằng phần trăm (%).

Báo cáo kết quả đến hai chữ số thập phân.

9.2 Tính phần trăm của các triacylglycerol

Tính phần trăm của các triacylglycerol POP, POS, POO, SOS và SOO trong mẫu thử bằng công thức sau:

$$w_{\text{test},i} = \frac{F_i \times A_{\text{test},i}}{\sum (F_i \times A_{\text{test},i})} \times 100\% \quad (3)$$

Trong đó

$w_{\text{test},i}$ là phần khối lượng của triacylglycerol thứ i trong mẫu thử, tính bằng phần trăm (%);

$A_{\text{test},i}$ là diện tích pic tương ứng với triacylglycerol thứ i trong mẫu thử;

F_i là hệ số đáp ứng xác định được trong 9.1.

9.3 Tính hàm lượng CBE trong bơ cacao

Hàm lượng CBE của bơ cacao, $c_{\text{CBE,CB}}$ biểu thị bằng gam CBE trên 100 g bơ cacao, được tính bằng phân tích hồi qui bình phương nhỏ nhất từng phần [Công thức (4)] của các tỷ lệ tương đối của năm triacylglycerol chính; nghĩa là % POP + % POS + % POO + % SOS + % SOO = 100 %, như được xác định trong Công thức (3):

$$c_{\text{CBE,CB}} = 37,439 + 1,175 \times \text{POP} - 1,939 \times \text{POS} - 0,121 \times \text{POO} + 0,982 \times \text{SOS} - 0,097 \times \text{SOO} \quad (4)$$

Báo cáo các kết quả đến hai chữ thập phân, tính bằng gam trên 100 g.

Công thức (4) được thiết lập bằng cách sử dụng bộ hiệu chuẩn 798 của hỗn hợp CB/CBE chứa 10 %, 15 % và 20 % CBE. Việc sử dụng CRM bơ cacao trong phương pháp này là bắt buộc để hiệu chuẩn và kiểm tra sự phù hợp của hệ thống đảm bảo độ ổn định của các kết quả thu được từ các phòng thử nghiệm riêng rẽ và tính giao hoán của quy trình đã được soạn thảo ^[4].

Trong 99 % các trường hợp đã sử dụng chất béo bán sẵn trên thị trường, sai số dự đoán không quá $\pm 2,60$ % liên quan đến bơ cacao.

9.4 Tính hàm lượng CBE trong sôcôla

Hàm lượng CBE cuối cùng trong sản phẩm sôcôla, $c_{\text{CBE, choc}}$, biểu thị bằng gam CBE trên 100 g sôcôla, được tính bằng Công thức (5):

$$c_{\text{CBE, choc}} = \frac{c_{\text{fat}} \cdot c_{\text{CBE, CB}}}{100} \quad (5)$$

Trong đó

c_{fat} là tổng hàm lượng chất béo của sôcôla, tính bằng gam trên 100 g, xác định được trong 8.1;

$c_{\text{CBE, CB}}$ là hàm lượng CBE của bơ cacao, tính bằng gam trên 100 g, xác định được trong 9.3.

Báo cáo các kết quả đến hai chữ thập phân.

Trong 99 % các trường hợp đã sử dụng chất béo bán sẵn, trên thị trường để tạo hỗn hợp, sai số dự đoán không quá $\pm 0,78$ % liên quan đến sôcôla (hàm lượng chất béo của sôcôla được giả định là 30 %).

10 Yêu cầu đối với qui trình

10.1 Yêu cầu chung

Các chi tiết của qui trình sắc ký phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác: thiết bị, loại cột, tuổi cột và nhà cung cấp cột, cách lấy dung dịch thử, cỡ mẫu và detector. Có thể sử dụng chiều dài, nhãn hiệu cột khác nhau và các thể tích bơm có thể được thay đổi, nếu đáp ứng được các yêu cầu của phép thử phù hợp của hệ thống (10.2).

10.2 Sự phù hợp hệ thống

Sử dụng CRM bơ cacao (4.1) để kiểm tra sự phù hợp của hệ thống tách.

a) Độ phân giải

Hệ thống tách HR-GC phải có khả năng tách các cặp POS/POO và SOS/SOO có độ phân giải sắc ký ít nhất 1,0. Nếu không, cần tối ưu hóa các điều kiện sắc ký (ví dụ: cỡ mẫu, nhiệt độ cột, dòng khí mang).

b) Xác định hệ số đáp ứng detector

Để kiểm tra việc giả định hệ số đáp ứng detector ion hóa ngọn lửa của các triacylglycerol không chênh lệch đáng kể, CRM bơ cacao phải được phân tích ở các điều kiện GC chuẩn. Kinh nghiệm cho thấy rằng đối với hệ thống sắc ký hoạt động tốt thì hệ số đáp ứng đối với năm triacylglycerol chính (POP, POS, POO, SOS, SOO) dao động trong dải từ 0,80 đến 1,20.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm được nêu trong Phụ lục A. 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.

11.2 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 lớn hơn 0,721 g/100 g liên quan đến bơ cacao và 0,216 g/100 g liên quan đến sôcôla trong sản phẩm cuối cùng (với giả định rằng hàm lượng chất béo của sôcôla là 30 %).

Các giá trị về giới hạn lặp lại, r , như tìm thấy trong nghiên cứu kiểm tra đánh giá được nêu trong Bảng A.2 đến A.4.

11.3 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 lớn hơn 1,719 g/100 g liên quan đến bơ cacao và 0,516 g/100 g liên quan đến sản phẩm sôcôla cuối cùng (với giả định rằng hàm lượng chất béo của sôcôla là 30 %).

Các giá trị về giới hạn tái lập, R , như tìm thấy trong nghiên cứu kiểm tra đánh giá được nêu trong Bảng A.2 đến A.4.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;

- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) 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;
- e) kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Phương pháp đã được đánh giá xác nhận năm 2002 trong phép thử liên phòng thử nghiệm Châu Âu với 13 nước tham gia ^{[5] [6]}. Phương pháp đã được đánh giá xác nhận về các mức CBE, khoảng 5 % CBE trong sôcôla; nghĩa là hỗn hợp của 5 g, 25 g và 30 g CBE/100 g bơ cacao tương ứng 4,5 g, 7,5 g và 9,0 g CBE trong sôcôla (hàm lượng chất béo của sôcôla được giảm định là 30 %).

Bảng A.1 cho thấy các điều kiện GC thích hợp³⁾. Một ví dụ về triacylglycerol của CRM bơ cao cao nêu trong Hình A.1. Các kết quả về độ chụm nêu trong Bảng A.2 đến A.4.

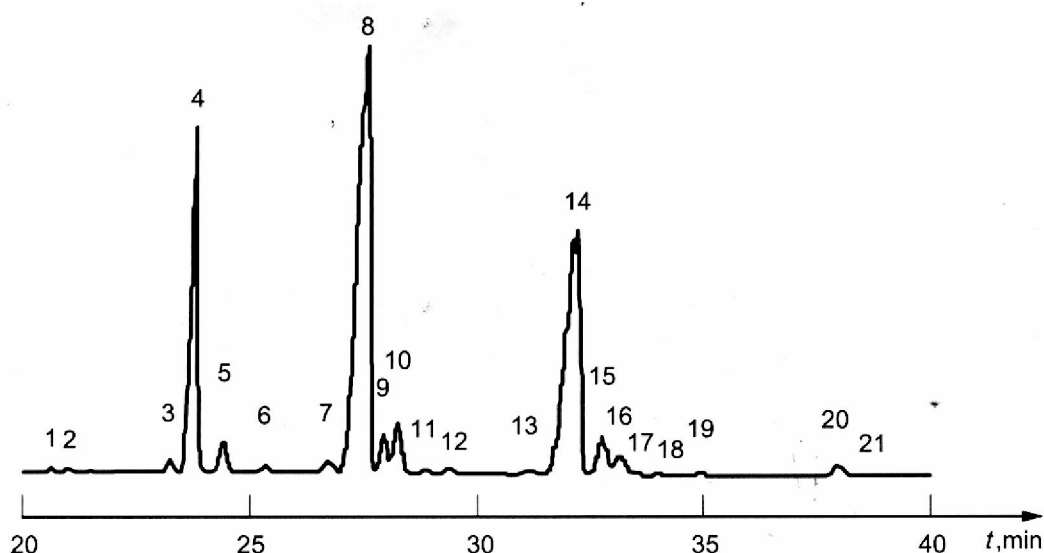
Bảng A.1 – Các điều kiện GC thích hợp đã được dùng để phân tích triacylglycerol trong bơ cacao, CBE, hỗn hợp CB/CBE và sôcôla

Phương pháp có thể thực hiện	1	2	3	4	5
Đặc tính của cột:					
- Pha tĩnh	DB-17HT	RTx-65TG	CB-TAP	RTx-65TG	CB
- chiều dài (m)	30	30	25	30	25
- đường kính (mm)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
- độ dày màng (μm)	0,15	0,1	0,1	0,1	0,1
Chế độ nhiệt độ (lò cột)					
- nhiệt độ bơm (°C)/thời gian giữ nhiệt (min)	80/2	340/1	280/0	100/0,5	340/0
- tốc độ chương trình 1 (°C/min)	50	1	10	50	1
- nhiệt độ 1 (°C)/thời gian giữ nhiệt (min)	300/0	-	320/0	330/2	-
- tốc độ chương trình 2 (°C/min)	30	-	2	1	-
- nhiệt độ 2 (°C)/thời gian giữ nhiệt (min)	-	-	-	-	-
- tốc độ chương trình 3 (°C/min)	-	-	-	-	-
- nhiệt độ cuối cùng (°C)/thời gian giữ nhiệt (min)	350/30	360/3	360/6	350/5	360/10
- nhiệt độ bơm (°C)	Chương trình nhiệt độ của lò (oven track)	390	370	Chương trình nhiệt độ của lò (oven track)	360
- nhiệt độ detector (°C)	360	370	370	355	360
Chế độ bơm	OCI	chia dòng	chia dòng	OCI	chia dòng
Khí mang:					
- loại	H ₂	H ₂	H ₂	He	He
- áp suất (kPa)	-	120	100	-	150
- tốc độ dòng (ml/min)	0,8	-	-	0,8	-
Mẫu:					
- nồng độ (mg/ml)	0,3	50	12,5	0,3	
- thể tích được bơm (μl)	0,5	0,1	0,6	0,5	1

³⁾ Các loại cột này là các ví dụ về các 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.

Bảng A.1 (kết thúc)

Phương pháp có thể thực hiện	6	7	8	9	10	11
Đặc tính của cột:						
- Pha tĩnh	RTX-65 TG	CB-TAP	DB-17HT	CB-TAP	CB-TAP	CB-TAP
- chiều dài (m)	30	25	30	25	25	25
- đường kính (mm)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
- độ dày màng (μm)	0,1	0,1	0,15	0,1	0,1	0,1
Chế độ nhiệt độ (lò cột)						
- nhiệt độ bơm ($^{\circ}\text{C}$)/thời gian giữ (min)	200/0	100/0,1	50/2	200/2	100/1	200/2
- tốc độ chương trình 1 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	15	70	50	20	30	12
- nhiệt độ 1 ($^{\circ}\text{C}$)/thời gian giữ (min)	360/0	-	300/1	320/0	300/2	-
- tốc độ chương trình 2 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	1	-	10	1	30	-
- nhiệt độ 2 ($^{\circ}\text{C}$)/thời gian giữ (min)	-	-	340/2	-	-	-
- tốc độ chương trình 3 ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	-	-	0/5	-	-	-
- nhiệt độ cuối cùng ($^{\circ}\text{C}$)/thời gian giữ (min)	370	350/21	345/26	360/10	340/35	350/10
- nhiệt độ bơm ($^{\circ}\text{C}$)	390	Chương trình nhiệt độ của lò (oven track)	50	65-220-370	100	
- nhiệt độ detector ($^{\circ}\text{C}$)	390	360	360	370	360	360
Chế độ bơm	chia dòng	OCI	OCI	OCI	OCI	OCI nóng
Khí mang:						
- loại	H_2	H_2	H_2	He	H_2	H_2
- áp suất (kPa)	150	-	120	90	150	-
- tốc độ dòng (ml/min)	-	1	-	-	-	2,4
Mẫu:						
- nồng độ (mg/ml)	10	15	0,5	1-2	0,5	0,65
- thể tích bơm (μl)	0,5	0,5	0,5	0,1	0,4	0,3



Nhận biết pic: 1, PPP; 2, MOP; 3, PPS; 4, POP; 5, PLP; 6, chưa nhận biết; 7, PSS; 8, POS; 9, POO; 10, PLS; 11, PLO; 12, không xác định; 13, SSS; 14, SOS; 15, SOO; 16, SLS + OO; 17, SLO; 18, không xác định; 19, không xác định; 20, SOA; 21, AOO.

Các điều kiện thực nghiệm

Cột GC: 25 m × 0,25 mm cột mao quản silica nung chảy được phủ 0,1 μm Chrompack TAP

Nhiệt độ sấy: 100 °C giữ được trong 1 min; 30 °C/min đến 340 °C giữ được trong 35 min

Bơm: Bơm lên cột lạnh

Detector (FID): 360 °C

Khí mang: H₂ ở áp lực đầu 1,6 bar

Lượng được bơm: 0,5 μl của dung dịch 0,5 mg/ml

Các chữ viết tắt:

PPP: Tripalmitin

SSS: Tristearin

MOP: 1-Margaroyl-2-oleoyl-3-palmitoylglycerol

SOS: 1,3-Distearoyl-2-oleoylglycerol

PPS: 1,2-Dipalmitoyl-3-stearoylglycerol

SOO: 1-Stearoyl-2,3-dioleoylglycerol

POP: 1,3-Dipalmitoyl-2-oleoylglycerol

SLS: 1,3-Distearoyl-2- linoleoyl glycerol

PLP: 1,3-Dipalmitoyl-2-linoleoylglycerol

OOO: Triolein

PSS: 1-Palmitoyl-2,3-distearoylglycerol

SLO: 1- Stearoyl -2-linoleoyl-3-oleoylglycerol

POS: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoylglycerol

SOA: 1-Stearoyl-2-oleoyl-arachidoylglycerol

POO: 1-Palmitoyl-2,3-dioleoylglycerol

AOO: 1-Arachidoyl-2,3- dioleoylglycerol

PLS: 1-Palmitoyl-2-linoleoyl-3-stearoylglycerol

Hình A.1 – Triacylglycerol của CRM bơ cacao

Bảng A.2 – Dữ liệu về độ chụm đối với mẫu sôcôla và hỗn hợp CB/CBE đã được chuẩn bị có CB từ Grenada và CBE loại PFM/(cây hạt mỡ + Illipe') (35 % và 65 % phần khối lượng)

Mẫu	Mẫu sôcôla	Mức thấp	Mức trung bình	Mức cao
Số lượng các phòng thử nghiệm	13	13	13	13
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	1	0	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	12	12	13	13
Giá trị trung bình, g CBE /100 g CB	13,992	15,142	24,798	29,563
Giá trị thực, g CBE/100 g CB	-	14,790	24,920	30,010
Độ chênh lệch, g CBE/100 g CB	-	-0,352	0,122	0,447
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , g/100 g	0,258	0,167	0,181	0,222
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	1,84	1,11	0,73	0,75
Giới hạn lặp lại, $r [=2,83 \times s_r]$, g/100 g	0,721	0,469	0,506	0,623
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , g/100 g	0,614	0,357	0,410	0,541
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	4,39	2,36	1,65	1,83
Giới hạn tái lập, $R [=2,83 \times s_R]$, g/100 g	1,719	1,000	1,148	1,514

Bảng A.3 – Dữ liệu về độ chụm đối với hỗn hợp CB/CBE được chuẩn bị có CB từ Ghana và CBE loại PFM/Cây hạt mỡ (50 % và 50 % phần khối lượng)

Mẫu	Mức thấp	Mức trung bình	Mức cao
Số lượng các phòng thử nghiệm	13	13	13
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	2	1	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	11	12	13
Giá trị trung bình, g CBE /100 g CB	16,627	25,871	30,686
Giá trị thực, g CBE/100 g CB	15,070	24,900	30,010
Độ chênh lệch, g CBE/100 g CB	-1,557	-0,971	-0,676
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , g/100 g	0,214	0,258	0,158
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	1,29	1,00	0,51
Giới hạn lặp lại, $r [=2,83 \times s_r]$, g/100 g	0,599	0,722	0,442
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , g/100 g	0,229	0,427	0,452
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	1,37	1,65	1,47
Giới hạn tái lập, $R [=2,83 \times s_R]$, g/100 g	0,640	1,196	1,265

Bảng A.4 – Dữ liệu về độ chụm đối với hỗn hợp CB/CBE được chuẩn bị có CB từ Bờ Biển Ngà và CBE của PFM/cây chai/cây xoài (50 %, 25 % và 25 % phần khối lượng)

Mẫu	Mức thấp	Mức trung bình	Mức cao
Số lượng các phòng thử nghiệm	13	13	13
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	1	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	13	12	13
Giá trị trung bình, g CBE /100 g CB	15,655	24,170	28,535
Giá trị thực, g CBE/100 g CB	14,970	24,970	29,960
Độ chệch, g CBE/100 g CB	-0,685	0,800	1,425
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , g/100 g	0,223	0,189	0,222
Độ chênh lệch tương đối lặp lại, %	1,43	0,78	0,78
Giới hạn lặp lại, r [$=2,83 \times s_r$], g/100 g	0,625	0,530	0,621
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , g/100 g	0,309	0,356	0,406
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	1,98	1,47	1,42
Giới hạn tái lập, R [$=2,83 \times s_R$], g/100 g	0,866	0,997	1,138

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Directive 2000/36/EC of the European Parliament and of the council of 23 June 2000 relating to cocoa and chocolate products intended for human consumption. Official Journal, L 197, 03/80/2003,19-25
 - [2] KOEBER, R., BUCHGRABER, M., ULBERTH, F., BACAROLO, R., BERNREUTHER, A., SCHIMMEL, H., ANKLAM, E. and PAUWELS, J. *The certification of the content of five triglycerides in cocoa butter*, 2003, EUR 20781 EN, ISBN 92-894-6036-9
 - [3] Official methods of analysis of AOAC international, AOAC Official method 963.15: *Fat in Cacao products*, 1995
 - [4] BUCHGRABER, M., SENALDI, Ch., ULBERTH, F. and ANKLAM, E. Detection and quantification of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate by gas liquid chromatography of triacylglycerols. *J.AOAC Internat.*, 87, 2004, pp. 1153-1163
 - [5] BUCHGRABER, M. ULBERTH, G. and ANKALAM, E. Method validation fo detection and quantification of cocoa butter equivalents in cocoa butter ans plain chocolate. *J. AOAC Internat.*, 87, 2004, pp. 1164-1172
 - [6] BUCHGRABER, M. and ANKALAM, E. *Validation for the detection of cocoa butter equivalents in cocoa butter and plain chocolate*, 2003, EUR 20685 EN, ISBN 92-894-5510-1
 - [7] TCVN 2625 (ISO 5555), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
-