

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9671:2013

ISO 29822:2009

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ THỰC VẬT – CÁC DIACYLGLYCEROL
DẠNG ĐỒNG PHÂN – XÁC ĐỊNH TỈ LỆ TƯƠNG ĐỐI
CỦA 1,2- VÀ 1,3-DIACYLGLYCEROL**

*Vegetable fats and oils – Isomeric diacylglycerols –
Determination of relative amount of 1,2- and 1,3-diacylglycerols*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 9671:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 29822:2009;

TCVN 9671:2013 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 – Các diacylglycerol dạng đồng phân – Xác định tỉ lệ tương đối của 1,2- và 1,3-diacylglycerol

Vegetable fats and oils – Isomeric diacylglycerols –

Determination of relative amounts of 1,2- and 1,3-diacylglycerols

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phép xác định mức độ đồng phân hóa của các diacylglycerol trong dầu mỡ thực vật. Trong quá trình bảo quản hoặc do phản ứng xúc tác axit, các 1,2-diacylglycerol được chuyển về dạng đồng phân 1,3 bền hơn.

Phân khối lượng 1,2-diacylglycerol có thể sử dụng làm tiêu chí về chất lượng đối với dầu mỡ 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

Mức độ đồng phân hóa (degree of isomerization)

Phân khối lượng của các diện tích pic của tất cả các 1,2-diacylglycerol (C_{32} , C_{34} , C_{36}) so với tổng của các pic diacylglycerol (C_{32} , C_{34} , C_{36}).

CHÚ THÍCH: Phân khối lượng được biểu thị bằng phần trăm, đến một chữ số thập phân.

4 Nguyên tắc

Sử dụng sắc kí cột thu nhỏ trên cột silica gel để tách các đồng phân diacylglycerol là phần phân cực hơn từ phần chính của các lipid khác. Các diện tích pic của các đồng phân 1,2- và 1,3- được xác định bằng sắc kí khí sau khi silyl hóa. Chỉ có các C₃₂-, C₃₄- và C₃₆-diacylglycerol được dùng để tính kết quả.

5 Thuốc thử

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

Trong quá trình phân tích, chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

5.1 Silica gel 60¹⁾, dùng cho sắc kí cột, (cỡ hạt từ 0,063 mm đến 0,100 mm).

5.1.1 Silica gel 60, có hàm lượng ẩm $w_{H_2O} = 5\%$ khối lượng.

Hoạt hoá silica gel bằng cách sấy qua đêm ở $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$. Sau khi sấy, đặt silica gel vào trong bình hút ẩm để làm nguội và sau đó chuyển silica gel vào bình kín. Thêm 5% khối lượng nước và lắc cho đến khi hết mảng vón và bột có thể chảy tự do (lắc 1 h trong máy lắc tự động). Bảo quản silica gel đã hoạt hóa qua đêm trước khi sử dụng.

5.2 Bông vải, đã khử chất béo.

5.3 Chất chuẩn²⁾.

5.3.1 Dilaurin (1,3-dilauroyl-*sn*-glycerol).

5.3.2 Dipalmitin (hỗn hợp đồng phân 1,2- và 1,3- dipalmitoyl-*sn*-glycerol, $w \approx 99\%$ khối lượng).

5.3.3 Distearin (hỗn hợp đồng phân 1,2- và 1,3- distearoyl-*sn*-glycerol, $w \approx 99\%$ khối lượng).

5.3.4 Diolein (hỗn hợp đồng phân 1,2- và 1,3- dioleoyl-*sn*-glycerol, $w \approx 99\%$ khối lượng).

5.4 Dung dịch chuẩn

Đối với các chất chuẩn dipalmitin và distearin, chuẩn bị dung dịch trong toluen (nồng độ khối lượng $\rho = 1\text{ mg/ml}$).

¹⁾ Merck Art-No. 612-1484 hoặc 613-2623 (www.merck.de) là các ví dụ về sản phẩm thích hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm đó. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

²⁾ Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com) là nhà cung cấp thích hợp. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm của nhà cung cấp này.

5.5 Isooctan (2,2,4-trimethylpentan).

5.6 Diethyl ete, dung môi rửa giải.

5.7 Diisopropyl ete.

5.8 Hỗn hợp dung môi: isooctan/diisopropyl ete [phần thể tích $\varphi(\text{isooctan}) = 85 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ và $\varphi(\text{diisopropyl ete}) = 15 \text{ ml}/100 \text{ ml}$].

5.9 1-metylimidazol.

5.10 N-metyl-N-(trimetyl-silyl)heptafluorobutyramid (MSHFBA).

5.11 Thuốc thử silyl hóa: 50 μl 1-metylimidazol trong 1 ml MSHFBA.

5.12 Toluen.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,001 g và hiển thị đến 0,000 1 g.

6.2 Bình hút ẩm, để bảo quản chất hấp phụ sau khi sấy.

6.3 Đầu tip pipet³⁾, dung tích 5 ml, dài khoảng 150 mm.

6.4 Bình nhọn đầu, dung tích 10 ml, có đáy tròn và cổ thủy tinh mài.

6.5 Cốc có mỏ, dung tích 10 ml.

6.6 Máy cô quay.

6.7 Máy sắc kí khí cột mao quản, bơm chia dòng, detector ion hoá ngọn lửa (FID) và hệ thống tích phân thích hợp.

Không sử dụng bơm trên cột hoặc bơm không chia dòng vì sử dụng các bơm này sẽ đồng phân hóa các 1,2-diacylglycerol.

³⁾ Merck Art-No. 612-1484 hoặc 613-2623 (www.merck.de) là các ví dụ về sản phẩm thích 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 đó. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 9671:2013

6.8 Cột mao quản silica nung chảy, dùng cho sắc kí khí (đường kính trong 0,25 mm hoặc 0,32 mm, dài 12 m, 15 m, 30 m hoặc 60 m) được phủ bằng lớp màng từ hỗn hợp 5 % diphenyl- và 95 % dimethylpolysiloxan dày 0,1 μm .

Cũng có thể sử dụng các cột khác có độ chọn lọc và phân cực tương tự.

7 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử

7.1 Lấy mẫu

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

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

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

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị cột sắc kí silica gel

Chèn vào phần dưới của đầu tip pipet (6.3) một nút nhỏ bằng bông vải (5.2) có chiều cao khoảng 5 mm, tiếp theo là 1 g silica gel 60 (5.1). Phủ lớp silica lên trên nút nhỏ bằng bông vải cao 5 mm. Nén chất nhồi bằng cách ấn nhẹ đũa có đầu phẳng.

8.2 Chuẩn bị phần chứa lipit không phân cực

8.2.1 Cân khoảng 100,0 mg mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg, cho vào cốc có mỏ (6.5) và thêm 1 ml toluen (5.12).

8.2.2 Chuyển phần mẫu thử vào cột, làm sạch bình cân thận bằng 1 ml hỗn hợp dung môi (5.8). Rửa cột hai lần, mỗi lần dùng 3,5 ml hỗn hợp dung môi (5.8). Rửa đầu tip pipet bằng hỗn hợp dung môi (5.8) và loại bỏ dung môi.

8.2.3 Rửa giải diacylglycerol hai lần, mỗi lần dùng 3,5 ml dietyl ete (5.6) và thu dịch rửa giải vào trong bình nhọn đầu (6.4).

8.2.4 Loại bỏ dung môi ra khỏi dịch rửa giải đến khi còn khoảng 1 ml bằng máy cô quay (6.6) ở 20 °C. Chuyển dung dịch còn lại vào trong lọ phản ứng. Thổi hết dung môi trong lọ phản ứng bằng dòng khí nitơ.

8.3 Chuẩn bị trimethylsilyl ete (silyl hóa)

8.3.1 Cho 200 µl thuốc thử silyl hóa (5.11) vào lọ phản ứng có chứa diacylglycerol, đậy kín và để hỗn hợp phản ứng trong 20 min ở nhiệt độ phòng.

8.3.2 Sau khi đã silyl hóa, thêm 1 ml axeton và sử dụng từ 1 µl đến 2 µl dung dịch cho sắc kí khí.

8.4 Sắc kí khí

Các điều kiện nêu trong Bảng 1 dùng cho máy sắc kí khí cho thấy thu được các sắc đồ thích hợp.

Bảng 1 – Các điều kiện sắc kí khí

Chức năng	Điều kiện
Cột GC mao quản	Restek RTX5 ⁴⁾ , 60 m; đường kính trong 0,25 mm, màng mỏng 0,1 µm
Thẻ tích bơm	1 µl (tỉ lệ chia dòng 1:50)
Khí mang	Hydro ở 2 ml/min, tốc độ dòng không đổi
Khí cho FID	Hydro ở 33 ml/min và không khí ở 420 ml/min
Nhiệt độ bơm	340 °C
Nhiệt độ detector	340 °C
Nhiệt độ lò	240 °C duy trì trong 1 min, tăng nhiệt độ 10 °C/min đến 320 °C duy trì trong 10 min

Tối ưu hoá chương trình nhiệt độ và tốc độ dòng chảy của khí mang sao cho thu được sắc đồ như trong Bảng 1. Kiểm tra việc tách bằng các phần diacylglycerol silyl hóa.

8.5 Nhận biết các đồng phân diacylglycerol

Chuẩn bị dung dịch dipalmitin (1,2-C₃₂, 1,3-C₃₂) (5.3.2), distearin (1,2-C₃₆, 1,3-C₃₆) (5.3.3) và diolein (1,2-C₃₆, 1,3-C₃₆) (5.3.4), mỗi dung dịch có nồng độ khối lượng $\rho = 1$ mg/ml toluen. Thêm 100 µl dung dịch này vào lọ tạo dẫn xuất. Thổi hết dung môi trong lọ phản ứng bằng dòng khí nitơ rồi silyl hóa.

Không thêm axeton vào các dung dịch chuẩn.

⁴⁾ Ví dụ về sản phẩm thích 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 đó. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

9 Kết quả của phép xác định

9.1 Nhận biết diacylglycerol

Để nhận biết 1,2- và 1,3-diacylglycerol trong phần mẫu thử, cần xác định thời gian lưu của các chất chuẩn.

CHÚ THÍCH: Thời gian lưu của các diacylglycerol chứa các axit béo chưa bão hoà có thể khác đáng kể với thời gian lưu của các diacylglycerol chứa các axit béo bão hoà. Trong phương pháp này, giả định rằng các hệ số đáp ứng của tất cả các diacylglycerol là như nhau.

9.2 Xác định các diện tích pic của 1,2- và 1,3-diacylglycerol trong dầu

Tính phần khối lượng của các 1,2-diacylglycerol, $w_{1,2}$, theo phần trăm khối lượng, như sau:

$$w_{1,2} = \frac{A_{1,2}}{\sum A} \times 100$$

Trong đó:

$A_{1,2}$ là diện tích pic của tất cả 1,2-diacylglycerol (C_{32} , C_{34} , C_{36}) có trong phần mẫu thử;

$\sum A$ là tổng các diện tích pic riêng lẻ của 1,2- và 1,3-diacylglycerol (C_{32} , C_{34} , C_{36}).

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 chất nền khác với các dải nồng độ và các chất nền 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 phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn độ lặp lại r nêu trong Bảng B.1.

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống 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, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn độ tái lập R nêu trong Bảng B.1.

11 Báo cáo thử nghiệm

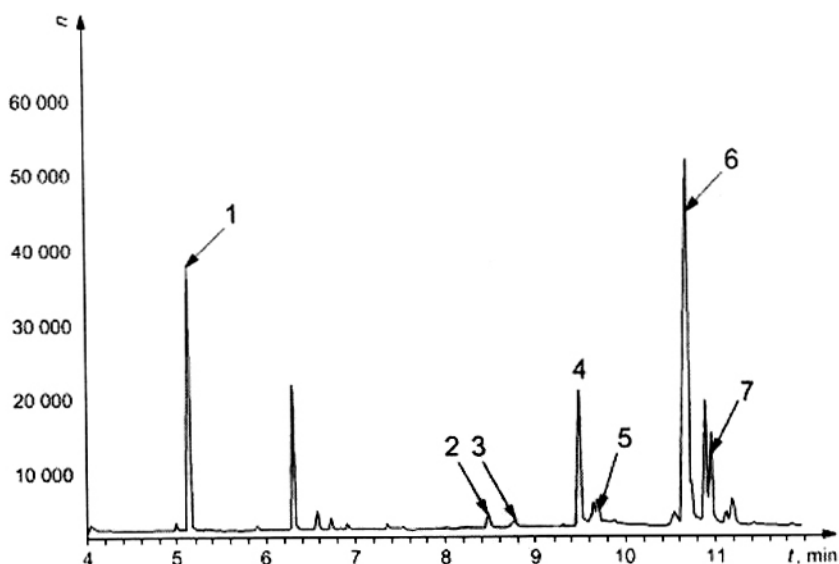
Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- 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) mọi điều kiện thao tác không quy 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;
- e) kết quả thử nghiệm thu được;
- f) kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Ví dụ về sắc đồ điện hình



CHÚ DẪN:

- 1 1,3-DG C₂₄ (dilaurin)
- 2 1,2-DG C₃₂
- 3 1,3-DG C₃₂
- 4 1,2-DG C₃₄
- 5 1,3-DG C₃₄
- 6 1,2-DG C₃₆
- 7 1,3-DG C₃₆

Các điều kiện:

Cột: SGE, HT-5, 12 m x 0,22 mm, độ dày của màng 0,25 μ m
 Chia dòng: 1 : 10
 Chương trình nhiệt độ của lò: 1 min 140 °C
 8 °C/min 320 °C
 20 °C/min 420 °C
 3 min 420 °C

Hình A.1 – Sắc đồ thu được từ dầu ôliu

Phụ lục B
(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp là kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm quốc tế do Ủy ban Phân tích dầu mỡ, các sản phẩm chất béo, các sản phẩm có liên quan và nguyên liệu thô (DIN/DGF) tổ chức. Nghiên cứu này được thực hiện năm 2005 trên năm mẫu, được đánh giá theo Phương pháp chuẩn DGF A-II^[4], TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[2] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[3]. Trong phép thử này có 19 phòng thử nghiệm từ Pháp, Đức và Ý tham gia.

Bảng B.1 – Tóm tắt kết quả thống kê đối với dầu ôliu

Mẫu	A	B	C	D	F
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia, n_p	19	19	19	19	19
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ, n_p	16	19	18	19	19
Số kết quả thử nghiệm riêng lẻ của tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu, n_z	32	38	36	38	38
Giá trị trung bình, $\bar{w}_{1,2}$, %	42,18	34,91	60,27	55,44	35,14
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , %	0,51	0,76	1,24	1,63	0,72
Hệ số biến thiên lặp lại, $CV(r)$, %	1,2	2,2	2,0	2,9	2,0
Giới hạn lặp lại, $r (= 2,8 s_r)$, %	1,42	2,14	3,46	4,55	2,00
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , %	1,56	1,60	2,15	2,19	2,95
Hệ số biến thiên tái lập, $CV(R)$, %	3,7	4,6	3,6	4,0	8,4
Giới hạn tái lập, $R (= 2,8 s_R)$, %	4,36	4,48	6,02	6,14	8,27

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 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994), *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] DGF Standard Method A-II 1, *Execution and evaluation of ring tests*
-