

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9672:2013

ISO 18395:2005

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –
XÁC ĐỊNH CÁC MONOACYLGLYCEROL,
DIACYLGLYCEROL, TRIACYLGLYCEROL VÀ GLYCEROL
BẰNG SẮC KÍ RÂY PHÂN TỬ HIỆU NĂNG CAO**

*Animal and vegetable fats and oils – Determination of monoacylglycerols,
diacylglycerols, triacylglycerols and glycerol by high-performance
size-exclusion chromatography (HPSEC)*

Lời nói đầu

TCVN 9672:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 18395:2005;

TCVN 9672:2013 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 động vật và thực vật – Xác định các monoacylglycerol, diacylglycerol, triacylglycerol và glycerol bằng sắc kí rây phân tử hiệu năng cao

Animal and vegetable fats and oils – Determination of monoacylglycerols, diacylglycerols, triacylglycerols and glycerol by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định các monoacylglycerol, diacylglycerol và triacylglycerol và glycerol tự do bằng sắc kí rây phân tử hiệu năng cao. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm (ví dụ các chất nhũ hóa) có thành phần chính là các monoacylglycerol và diacylglycerol với hàm lượng lớn hơn 10 % và có thể áp dụng cho triacylglycerol với hàm lượng nhỏ hơn 20 %.

Phương pháp này không áp dụng cho chất béo sữa hoặc dầu và mỡ có chứa nhiều axit béo mạch dài, vì các diacylglycerol của axit béo mạch ngắn có khối lượng phân tử thấp hơn các monoacylglycerol của axit béo mạch dài.

Phương pháp này bị hạn chế khi áp dụng cho các hỗn hợp acylglycerol trên nền axit caprylic và axit capric. Do đó, chỉ có hàm lượng glycerol tự do và hàm lượng monoacylglycerol có thể xác định được.

CHÚ THÍCH Các thông tin cơ bản được nêu trong các tài liệu tham khảo từ [1] đến [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:

3.1

Hàm lượng monoacylglycerol, diacylglycerol, triacylglycerol và glycerol (contents of monoacylglycerol, diacylglycerols, triacylglycerol and glycerol)

Phần khối lượng của các monoacylglycerol, diacylglycerol, triacylglycerol và glycerol xác định được theo các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Các hàm lượng này được biểu thị theo phần khối lượng (gam trên 100 g) hoặc bằng phần trăm của tất cả các pic.

4 Nguyên tắc

Mẫu thử được hoà tan trong tetrahydrofuran (THF). Phân tích dung dịch thu được bằng sắc kí thẩm thấu gel (GPC), sử dụng THF làm pha động. Glycerol và các acylglycerol được tách theo kích thước phân tử của chúng. Phát hiện bằng detector chỉ số khúc xạ.

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.

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

5.1 Tetrahydrofuran (THF), được ổn định bằng BHT 250 µl/l.

5.2 Chất chuẩn

5.2.1 Glycerol ($w \geq 99,5 \%$).

5.2.2 Monoacylglycerol, diacylglycerol, triacylglycerol¹⁾.

Các chất chuẩn được sử dụng là monoacylglycerol, diacylglycerol và triacylglycerol có sự phân bố của axit béo càng giống như trong mẫu càng tốt. Tuy nhiên, thành phần acylglycerol không được lặp lại hoàn toàn. Đối với hầu hết các mẫu thì monopalmitat và/hoặc monostearat và/hoặc monooleat, dipalmitat và/hoặc distearat và/hoặc dioleat, tripalmitat và/hoặc tristearat và/hoặc trioleat là đủ.

Các hệ số đáp ứng đối với glycerol, monoacylglycerol, diacylglycerol và triacylglycerol thường giống nhau trong các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này, nên trong hầu hết các trường hợp, không cần sử dụng các dung dịch chuẩn định lượng và có thể sử dụng tỷ lệ phần trăm diện tích pic. Tuy nhiên,

¹⁾ Ví dụ về sản phẩm bán sẵn từ Sigma-Aldric (<http://www.sigmaaldrich.com/>). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó.

cần xác định hệ số đáp ứng đối với glycerol khi nồng độ trong mẫu lớn hơn 3 %. Không phải tất cả các hệ số đáp ứng đối với acylglycerol đều được áp dụng trong Dược điển châu Âu. Điều này phải được nêu trong báo cáo thử nghiệm.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

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

6.2 Bình định mức, dung tích 10 ml.

6.3 Pipet, dung tích 5 ml.

6.4 Bể siêu âm.

6.5 Bơm HPLC/GPC.

6.6 Bơm mẫu, có trang bị một vòng lấy mẫu dung tích 20 μ l.

6.7 Detector, đo chỉ số khúc xạ (detector RI).

6.8 Bộ kết hợp cột GPC, với khối lượng phân tử hiệu quả lên đến 4 000 Da (ví dụ: ba cột kích thước 300 mm x 7,5 mm Plgel²⁾, 5 μ m, 100 Å).

Cũng có thể sử dụng các cột khác (hoặc kết hợp cột) miễn là đảm bảo tách được các monoacylglycerol và các diacylglycerol cũng như tách được các diacylglycerol và các triacylglycerol. Sử dụng hai cột cũng có thể tách được theo yêu cầu.

6.9 Lò cột (điều chỉnh nhiệt cho cột).

6.10 Hệ thống đánh giá và phân tích dữ liệu.

7 Lấy mẫu

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.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555)^[5].

²⁾ Ví dụ về sản phẩm có bán sẵn từ Phòng thử nghiệm Polymer (<http://www.polymerlabs.com/>). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó.

8 Chuẩn bị mẫu thử

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

Trước khi lấy phần mẫu thử, trộn kỹ mẫu để đảm bảo sự đồng nhất. Do đó, đối với mẫu dạng rắn thì làm tan chảy hoàn toàn mẫu.

9 Cách tiến hành

9.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Cân khoảng 100 mg mẫu, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 10 ml. Nồng độ được tính bằng miligam mẫu trên 10 ml. Sau khi pha loãng bằng THF đến vạch, đặt bình trong bể siêu âm từ 5 min đến 10 min.

Bơm dung dịch trong thu được vào hệ thống GPC.

9.2 Chuẩn bị các dung dịch đối chứng

Cân các lượng glycerol, monoacylglycerol, diacylglycerol và triacylglycerol cao hơn và thấp hơn so với mức nồng độ dự kiến có trong mẫu, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 10 ml. Sau khi pha loãng bằng THF đến vạch, đặt bình vào bể siêu âm từ 5 min đến 10 min.

Bơm dung dịch trong thu được vào hệ thống GPC.

Ghi lại nồng độ mỗi thành phần bằng miligam trên 10 ml đối với từng dung dịch chuẩn. Nếu không dự kiến được nồng độ trong mẫu thì có thể chuẩn bị một số dung dịch chuẩn có dải nồng độ rộng hơn.

CHÚ THÍCH: Xem 5.2.2.

9.3 Sắc kí thẩm thấu gel (GPC)

Thiết lập hệ thống GPC như sau:

Thể tích bơm:	20 μ l
Cột tách:	dải khối lượng phân tử: tối thiểu từ 0 Da đến 4 000 Da (6.8)
Nhiệt độ lò:	35 °C hoặc 40 °C \pm 0,1 °C
Tốc độ dòng:	từ 0,8 ml/min đến 1,0 ml/min
Detector RI:	nhiệt độ: 35 °C hoặc 40 °C.

Sắc đồ điển hình thu được trong các điều kiện này được nêu trong Phụ lục A.

Phép thử xác định sự có mặt của các monoacylglycerol, diacylglycerol, triacylglycerol và của glycerol được thực hiện bằng cách so sánh thời gian lưu với các chất chuẩn (ví dụ: C18-monoacylglycerol/C18-diacylglycerol/C18-triacylglycerol) hoặc các nhóm acylglycerol.

Để xác định hàm lượng, chuẩn bị ít nhất hai dung dịch hiệu chuẩn. Chọn nồng độ của các dung dịch bao trùm nồng độ của các thành phần trong mẫu. Bơm lần lượt mỗi dung dịch hai lần. Các đường chuẩn thu được có thể dùng để tính các nồng độ của glycerol và acylglycerol trong mẫu.

CHÚ THÍCH Xem 5.2.2.

10 Tính kết quả

Hàm lượng glycerol trong mẫu, w_G , được biểu thị bằng phần trăm khối lượng, được tính như sau:

$$w_G = \frac{m_G \times F_G}{m_S} \times 100 \%$$

Trong đó:

w_G là hàm lượng glycerol của mẫu;

m_G là khối lượng của glycerol có trong mẫu tính được từ đường chuẩn, bằng miligam (mg);

m_S là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng miligam (mg);

F_G là hệ số đáp ứng đối với glycerol.

Các hàm lượng mono-, di- và tri-acylglycerol cũng được tính theo cách tương tự.

Khi đánh giá các diện tích pic thì sử dụng đường nền nằm ngang làm giới hạn tích phân.

Các hệ số đáp ứng đối với glycerol, monoacylglycerol, diacylglycerol và triacylglycerol thường giống nhau trong các điều kiện quy định, vì vậy trong hầu hết các trường hợp không cần phải sử dụng các dung dịch đối chứng định lượng và các hệ số đáp ứng được giả định là $F = 1$. Tuy nhiên, cần xác định hệ số đáp ứng đối với glycerol khi nồng độ trong mẫu lớn hơn 3 %.

Trong hầu hết các trường hợp, các axit béo tự do không tách được ra khỏi nhóm pic monoacylglycerol. Do đó, trong các mẫu có trị số axit > 1 thì hàm lượng axit béo có thể tính được từ hàm lượng monoacylglycerol trừ đi trị số axit. Điều này phải được ghi trong báo cáo thử nghiệm.

Ghi lại kết quả của phép xác định đến một chữ số thập phân, được biểu thị bằng phần trăm khối lượng trên 100 %.

11 Độ chụm

11.1 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.

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử 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 đến B.5.

11.3 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 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 đến B.5.

12 Báo cáo thử nghiệm

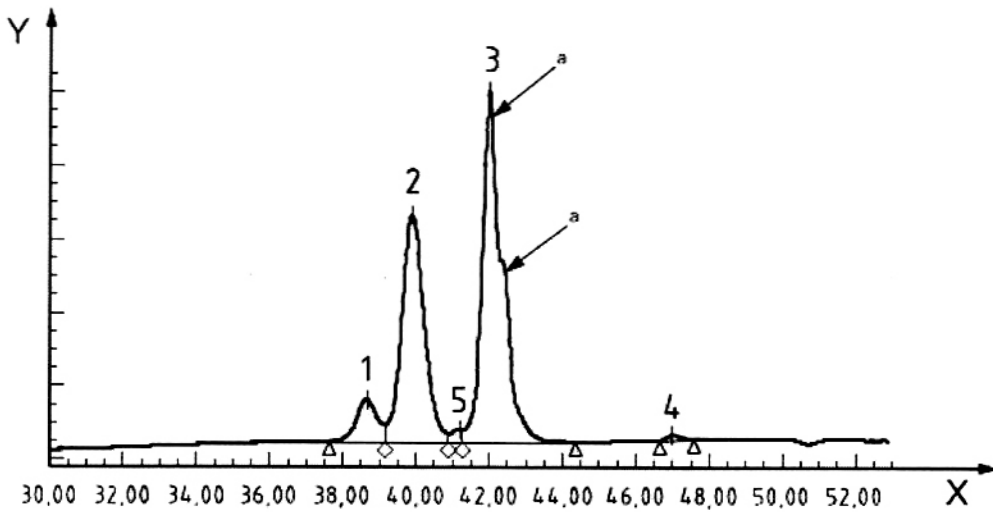
Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết để 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 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;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Ví dụ về sắc đồ



CHÚ DẪN

X thời gian lưu, tính bằng phút

Y cường độ pic, mV

1 triacylglycerol (39,132)

2 diacylglycerol (40,407)

3 monoacylglycerol (42,552)

4 glycerol tự do (47,560)

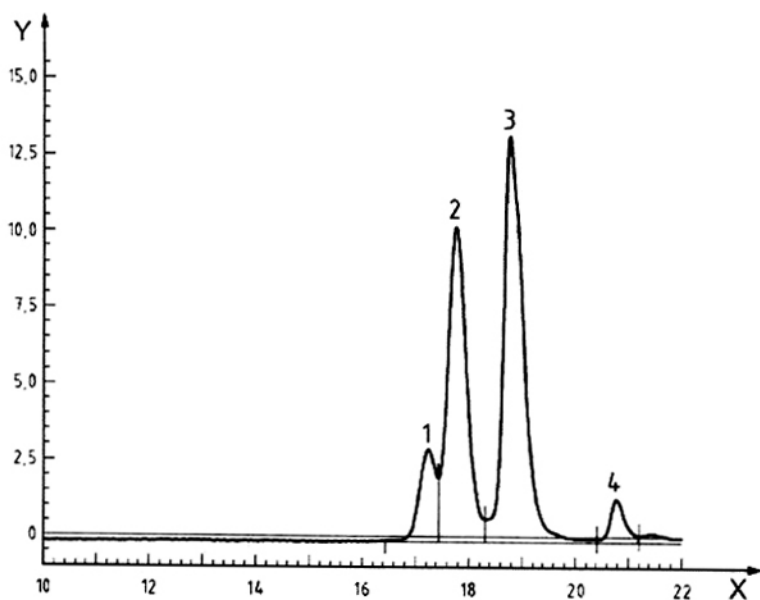
5 diglycerol monostearat (41,719)

^a tách từng phần C16-/C18-monoacylglycerol.CHÚ THÍCH: Sử dụng năm cột kích thước 300 mm x 7,5 mm Plgel, 5 μ m, 100 Å.

Hình A.1 – Sắc đồ của mẫu chứa mono-, di- và tri-acylglycerol thu được từ mỡ lợn

Bảng A.1 – Mẫu chứa mono-, di- và tri-acylglycerol thu được từ mỡ lợn

Chất	Thời gian lưu min	Diện tích	% diện tích
Triacylglycerol	39,132	1 694 320	6,2
Diacylglycerol	40,407	10 574 930	38,5
Diglycerol-monoeste	41,719	311 730	1,2
Monoacylglycerol	42,552	14 719 338	53,5
Glycerol tự do	47,560	155 732	0,57

**CHÚ DẪN**

- | | |
|--------------------------------------|--------------------|
| X thời gian lưu, tính bằng phút | 2 diacylglycerol |
| Y cường độ pic, mAU (đơn vị hấp thụ) | 3 monoacylglycerol |
| 1 triacylglycerol | 4 glycerol tự do |

CHÚ THÍCH: Sử dụng hai cột kích thước 300 mm x 7,5 mm Plgel, 5 μ m, 100 Å.

Hình A.2 – Tách hỗn hợp thử

Phụ lục B

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Một nghiên cứu cộng tác quốc tế do Ủy ban hỗn hợp về phân tích chất béo, dầu, sản phẩm chất béo, các sản phẩm liên quan và nguyên liệu tổ chức năm 2002. Nghiên cứu thực hiện trên năm mẫu. Các kết quả được đánh giá theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[6] được nêu trong Bảng B.1 đến B.5.

Bảng B.1 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm (axit béo)

Nhận biết mẫu: Mono-/di-acylglycerol của axit béo C8/C10	Monoacyl- glycerol	Di-/triacyl- glycerol	Glycerol
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	10	10	10
Số lượng phòng thử nghiệm giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	10	10	8
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng	20	20	16
Trung bình	45,78	41,76	10,96
Độ lệch chuẩn lặp lại, (s_r)	0,24	0,27	0,14
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại	0,5	0,7	1,20
Giới hạn lặp lại (r)	0,67	0,77	0,38
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R)	1,38	1,08	0,61
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập	3,0	2,6	5,5
Giới hạn tái lập (R)	3,85	3,03	1,70

Bảng B.2 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm (mỡ lợn)

Nhận biết mẫu Mono-/di-acylglycerol của mỡ lợn	Monoacyl- glycerol	Diacyl- glycerol	Triacyl- glycerol	Glycerol
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	10	10	10	9
Số lượng phòng thử nghiệm giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	10	9	9	8
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng	20	18	18	16
Trung bình	48,92	43,52	6,09	1,72
Độ lệch chuẩn lặp lại, (s_r)	0,15	0,12	0,08	0,04
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại	0,3	0,3	1,3	2,1
Giới hạn lặp lại (r)	0,41	0,33	0,22	0,10
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R)	0,64	0,49	0,23	0,48
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập	1,3	1,1	3,8	27,9
Giới hạn tái lập (R)	1,78	1,37	0,65	1,35

Bảng B.3 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm (dầu thực vật)

Nhận biết mẫu Mono-/di-acylglycerol của dầu thực vật	Monoacyl- glycerol	Diacyl- glycerol	Triacyl- glycerol	Glycerol
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	10	10	10	9
Số lượng phòng thử nghiệm giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	9	8	10	8
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng	18	16	20	16
Trung bình	57,29	34,68	6,95	0,81
Độ lệch chuẩn lặp lại, (s_r)	0,08	0,05	0,08	0,06
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại	0,1	0,1	1,2	7,2
Giới hạn lặp lại (r)	0,23	0,14	0,23	0,16
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R)	0,44	0,29	0,46	0,16
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập	0,8	0,8	6,6	19,6
Giới hạn tái lập (R)	1,23	0,80	1,28	0,44

Bảng B.4 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm (mỡ lợn)

Nhận biết mẫu Monoacylglycerol của mỡ lợn	Monoacyl- glycerol	Diacyl- glycerol	Triacyl- glycerol	Glycerol
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	10	10	9	8
Số lượng phòng thử nghiệm giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	8	10	9	7
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng	16	20	18	14
Trung bình	97,18	2,52	0,02	0,32
Độ lệch chuẩn lặp lại, (s_r)	0,09	0,09	0,00	0,03
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại	0,1	3,7	0,0	8,9
Giới hạn lặp lại (r)	0,26	0,26	0,00	0,08
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R)	0,38	0,26	0,04	0,23
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập	0,4	10,2	198,4	72,5
Giới hạn tái lập (R)	1,07	0,72	0,12	0,65

Bảng B.5 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm (axit oleic)

Nhận biết mẫu Mono-/di-acylglycerol của axit oleic	Monoacyl- glycerol	Diacyl- glycerol	Triacyl- glycerol	Glycerol
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	10	10	10	9
Số lượng phòng thử nghiệm giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	10	10	10	8
Số lượng kết quả thử trong tất cả các phòng	20	20	20	16
Trung bình	52,38	39,91	6,87	0,74
Độ lệch chuẩn lặp lại, (s_r)	0,10	0,08	0,06	0,09
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại	0,2	0,2	0,8	12,4
Giới hạn lặp lại (r)	0,29	0,22	0,15	0,26
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R)	0,54	0,42	0,54	0,14
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập	1,0	1,0	7,9	18,4
Giới hạn tái lập (R)	1,51	1,17	1,52	0,38

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] AOCS Official Method Cd 11-57
 - [2] European Pharmacopoeia, 2.2.30, *Size-Exclusion Chromatography*
 - [3] European Pharmacopoeia – Supplement 2000, *Glycerol Monostearate*, pp.40-55
 - [4] *European Journal of Lipid Science Technology*, **105** (2003) pp.45-48
 - [5] TCVN 2625:2007 (ISO 5555:2001), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
 - [6] 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.*
-