

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 9971:2013
ISO 18252:2006**

Xuất bản lần 1

**CHẤT BÉO SỮA DẠNG KHAN –
XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN STEROL BẰNG
SẮC KÝ KHÍ LỎNG (PHƯƠNG PHÁP THÔNG DỤNG)**

*Anhydrous milk fat – Determination of sterol composition by
gas liquid chromatography (Routine method)*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 9971:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 18252:2006;

TCVN 9971:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12
Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Chất béo sữa dạng khan - Xác định thành phần sterol bằng sắc ký khí lỏng (Phương pháp thông dụng)

Anhydrous milk fat - Determination of sterol composition by gas liquid chromatography (Routine method)

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp thông dụng dùng sắc ký khí lỏng để xác định thành phần sterol của chất béo sữa dạng khan được tách ra từ các sản phẩm sữa, trực tiếp trong chất không xà phòng hóa không qua bước tinh sạch và tạo dẫn xuất.

Mục tiêu đầu tiên là định lượng cholesterol, thường chiếm khoảng 98 % trong các sterol của chất béo sữa tinh khiết. Tuy nhiên, khi phân tích chất béo sữa ở dạng hỗn hợp với chất béo thực vật, thì quy trình này có thể đánh giá được hầu hết các phytosterol chính. Quy trình này đã được đánh giá xác nhận trên các mẫu chất béo sữa chứa khoảng 28 % đến 32 % chất béo thực vật.

Do không có bước làm sạch nên cần loại hết các hợp chất gây nhiễu từ chất không xà phòng hóa, đặc biệt cần tiến hành cẩn thận khi áp dụng phương pháp này để kiểm tra độ tinh khiết của chất béo sữa khi chưa biết nguồn gốc. Trong trường hợp các kết quả bị nghi ngờ thì có thể sử dụng phương pháp chuẩn quy định trong TCVN 9970 (ISO 12078).

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 9971:2013

TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

TCVN 8103 (ISO 14156), *Sữa và sản phẩm sữa – Phương pháp chiết lipid và các hợp chất hoà tan trong lipid.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Thành phần sterol (sterol composition)

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

CHÚ THÍCH: Thành phần sterol có thể được biểu thị bằng số miligam trên 100 g chất béo hoặc bằng phần trăm hàm lượng sterol tổng số.

4 Nguyên tắc

5 α -cholestan được bổ sung vào mẫu thử làm chất chuẩn nội. Chất béo được xà phòng hóa bằng dung dịch kali hydroxit trong metanol. Chiết chất không xà phòng hóa bằng dietyl ete. Sau đó được cô đặc và xác định bằng sắc ký khí lỏng mao quản. Các sterol đơn lẻ được nhận biết bằng cách so sánh với thời gian lưu của mẫu chuẩn đối chứng. Các sterol được định lượng bằng phương pháp nội chuẩn.

5 Thuốc thử

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

5.1 Nước, phù hợp với loại 2 quy định trong TCVN 4851 (ISO 3696).

5.2 Etanol (C₂H₅OH), tuyệt đối.

5.3 Metanol (CH₃OH), có ít hơn hoặc bằng 0,5 % khối lượng nước.

5.4 Thuốc thử xà phòng hóa, dung dịch kali hydroxit trong metanol, c(KOH) = 2 mol/l.

Hòa tan 11,2 g KOH trong 100 ml metanol (5.3) và trộn đều.

5.5 Natri sulfat (Na₂SO₄), khan.

5.6 Dietyl ete (C₂H₅OC₂H₅), không chứa peroxit.

5.7 n-Hexan [CH₃(CH₂)₄CH₃].

5.8 5 α -cholestan, độ tinh khiết 99 %.

5.9 Dung dịch chuẩn 5 α -cholestan

Cân chính xác khoảng 60 mg 5 α -cholestan (5.8) cho vào bình định mức một vạch 100 ml (6.4). Pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp *n*-hexan (5.7)/etanol (5.2) với tỷ lệ 1:10 hoặc bằng *n*-hexan (5.7) và trộn.

Dung dịch chuẩn 5 α -cholestan này có thể bền được một tháng khi được bảo quản trong tủ lạnh.

5.10 Cholesterol, độ tinh khiết 99 %.

5.11 Dung dịch chuẩn cholesterol

Cân chính xác khoảng 60 mg cholesterol (5.10) cho vào bình định mức một vạch 100 ml (6.4). Pha loãng đến vạch bằng *n*-hexan (5.7) hoặc bằng etanol (5.2) và trộn.

Dung dịch chuẩn cholesterol có thể bền được một tháng khi bảo quản trong tủ lạnh.

5.12 Campesterol, độ tinh khiết 65 %.

5.13 Dung dịch chuẩn campesterol

Cân chính xác khoảng 10 mg campesterol (5.12) cho vào bình định mức một vạch 100 ml (6.4). Pha loãng đến vạch bằng *n*-hexan (5.7) và trộn.

Dung dịch chuẩn campesterol có thể bền được một tháng khi bảo quản trong tủ lạnh.

5.14 Stigmasterol, độ tinh khiết 95 %.

5.15 Dung dịch chuẩn stigmasterol

Cân chính xác khoảng 10 mg stigmasterol (5.14) cho vào bình định mức một vạch 100 ml (6.4). Pha loãng đến vạch bằng *n*-hexan (5.7) và trộn.

Dung dịch chuẩn stigmasterol có thể bền được một tháng khi bảo quản trong tủ lạnh.

5.16 β -Sitosterol, độ tinh khiết 95 %.

5.17 Dung dịch chuẩn β -Sitosterol

Cân chính xác khoảng 10 mg β -sitosterol (5.16) cho vào bình định mức một vạch 100 ml (6.4). Pha loãng đến vạch bằng *n*-hexan (5.7) và trộn.

Dung dịch chuẩn β -sitosterol có thể bền được một tháng khi bảo quản trong tủ lạnh.

TCVN 9971:2013

CHÚ THÍCH: Vì dung dịch chuẩn phytosterol (5.13, 5.15 và 5.17) chỉ được dùng để đánh giá định tính, nên chúng có thể được thay bằng các sterol được chuẩn bị từ dầu đậu nành có chứa campesterol, stigmasterol và β -sitosterol làm các thành phần chính.

6 Thiết bị, dụng cụ

CẢNH BÁO – Vì phép xác định này có sử dụng các dung môi bay hơi dễ cháy, nên tất cả các thiết bị điện được dùng phải tuân theo quy định an toàn khi sử dụng các dung môi này.

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

- 6.1 Tủ sấy, có thể duy trì nhiệt độ trong khoảng từ 50 °C đến 70 °C.
- 6.2 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 1 mg, với số đọc 0,1 mg.
- 6.3 Bình cầu đáy tròn, cổ mài, dung tích 100 ml.
- 6.4 Bình định mức một vạch, dung tích 100 ml.
- 6.5 Pipet chia vạch, dung tích 10 ml.
- 6.6 Pipet một vạch, dung tích 1 ml.
- 6.7 Nồi cách thủy, có thể duy trì ở 50 °C \pm 2 °C và ở điểm sôi.
- 6.8 Bộ sinh hàn, khít với bình cầu đáy tròn (6.3).
- 6.9 Phễu chiết, dung tích 100 ml.
- 6.10 Bộ phân phối dung môi hoặc ống đong chia độ, dung tích 10 ml và 20 ml.
- 6.11 Thiết bị chưng cất hoặc thiết bị bay hơi (ví dụ: bộ cô quay chân không) để chưng cất hoặc làm bay hơi dung môi, duy trì được nhiệt độ đến điểm sôi.
- 6.12 Phễu thủy tinh, đường kính 100 mm.
- 6.13 Giấy lọc khô, gấp nếp, loại lọc nhanh, đường kính 200 mm.
- 6.14 Lọ nhỏ, phía trong dạng hình nón, dung tích 5 ml và 10 ml.
- 6.15 Nguồn khí nitơ, khí có độ tinh khiết ít nhất là 99 %.
- 6.16 Ống nghiệm, với nắp vặn có lót PTFE, dung tích 50 ml.
- 6.17 Máy sắc ký khí lỏng

6.17.1 Bộ bơm mẫu

Duy trì bộ bơm mẫu kiểu bay hơi (chia dòng/không chia dòng), được lắp septum bền nhiệt ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ tối đa của lò là 30 °C. Khi sử dụng bộ bơm trên cột lạnh, thì bộ bơm phải duy trì được ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ sôi của dung môi vài độ.

6.17.2 Lò, có khả năng làm việc trong dải chương trình nhiệt độ từ 50 °C đến 320 °C.

6.17.3 Cột, mao quản silica nung chảy

Có thể sử dụng các kiểu cột có pha tĩnh, chiều dày màng phim, chiều dài cột và đường kính cột khác nhau để tách được hoàn toàn sterol. Trong mọi trường hợp, cột được chọn phải tách được hoàn toàn pic dung môi và 5 α -cholestan (5 α -cholestan không được rửa giải trong khoảng đoãng của pic dung môi) có độ phân giải đường nền giữa các pic cholesterol, campesterol, stigmasterol và β -sitosterol. Tuy nhiên, không được có sự loang đường nền xuất hiện trong suốt quá trình chạy sắc ký khí.

Một ví dụ về sắc ký đồ mẫu sử dụng các điều kiện trong 6.18.2 được nêu trong các Hình A.1.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng các pha tĩnh bán sẵn thích hợp, có chứa dimethylpolysiloxan hoặc dimethylpolysiloxan, với các phần trăm phenyl/cyanopropyl-polysiloxan khác nhau.

6.17.4 Detector ion hóa ngọn lửa, có thể được gia nhiệt cao hơn nhiệt độ cuối cùng của lò cột 30 °C.

6.17.5 Khí mang, khí nitơ, heli hoặc hydro, có độ tinh khiết ít nhất 99,999 %.

6.17.6 Các loại khí khác, không chứa các tạp chất hữu cơ (C_nH_m nhỏ hơn 1 phần triệu) như nitơ và hydro, có độ tinh khiết ít nhất 99,995 % và không khí nhân tạo.

6.17.7 Xyranh bơm, dung tích 1 μ l đến 10 μ l

6.17.8 Hệ thống tích phân, tốt nhất là được trang bị máy tính.

6.18 Điều kiện sắc ký khí

Cài đặt thiết bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhiệt độ lò và dòng khí mang phụ thuộc vào cột được chọn và hệ thống bơm tương ứng. Các ví dụ dưới đây cho thấy các điều kiện có thể áp dụng đối với các hệ thống bơm chia dòng và trên cột.

6.18.1 Bơm chia dòng

Ví dụ về các điều kiện có thể áp dụng với bộ bơm chia dòng là:

- a) Khí mang Khí heli

- b) Áp suất đầu cột 90 kPa
- c) Cột Cột mao quản silica nung chảy, dài 25 m, đường kính trong 0,32 mm, chiều dày màng phim 0,25 μm
- d) Pha tĩnh 5 % phenyl và 95 % dimethylpolysiloxan
- e) Nhiệt độ cột Đẳng nhiệt ở 280 °C
- f) Nhiệt độ detector Cài đặt ở 310 °C
- g) Nhiệt độ bơm Cài đặt ở 310 °C
- h) Tỷ lệ chia dòng Tỷ lệ 1:40
- i) Thể tích mẫu bơm 0,5 μl

6.18.2 Bơm trên cột

Ví dụ về các điều kiện có thể áp dụng với bộ bơm trên cột là:

- a) Khí mang Khí hydro
- b) Áp suất đầu cột 30 kPa
- c) Cột Cột mao quản silica nung chảy, dài 30 m, đường kính trong 0,32 mm, chiều dày màng phim 0,25 μm
- d) Pha tĩnh 5 % phenyl và 95 % dimethylpolysiloxan
- e) Nhiệt độ cột Nhiệt độ ban đầu 60 °C trong 2 min; cài đặt gradient thứ nhất ở 40 °C/min, khi tăng đến 220 °C thì ngừng trong 2 min; cài đặt gradient thứ hai ở 5 °C/min, khi tăng đến 310 °C thì dừng.
- f) Nhiệt độ detector 330 °C
- g) Thể tích mẫu bơm 1 μl

7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng 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 quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707) ^[2].

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 8103 (ISO 14156). Làm tan chảy mẫu trong tủ sấy (6.1) ở 50 °C.

9 Cách tiến hành

9.1 Dung dịch chuẩn sterol

9.1.1 Dung dịch hiệu chuẩn để xác định hệ số đáp ứng cholesterol

Dùng pipet một vạch (6.6) chuyển 1 ml dung dịch chuẩn cholesterol (5.11) sang lọ nhỏ 5 ml (6.14). Dùng pipet một vạch (6.6) khác thêm vào lọ này 1 ml dung dịch chuẩn (nội) 5 α -cholestan (5.9) và trộn. Loại bỏ dung môi dưới dòng khí nitơ nhẹ trong khi vẫn làm ấm trong nồi cách thủy (6.7) ở 50 °C.

9.1.2 Dung dịch định tính để xác định thời gian lưu của sterol

Dùng các pipet một vạch (6.6) riêng rẽ chuyển các dung dịch chuẩn sterol đã chuẩn bị trong 5.11, 5.13, 5.15 và 5.17 tương ứng, mỗi dung dịch 1 ml vào lọ nhỏ 10 ml (6.14). Dùng pipet một vạch (6.6) khác thêm vào lọ này 1 ml dung dịch chất chuẩn (nội) 5 α -cholestan (5.9) và trộn. Loại bỏ dung môi dưới dòng khí nitơ nhẹ.

Khi sử dụng dầu đậu nành thay các chất chuẩn tinh khiết, sử dụng cùng quy trình như đã dùng đối với phần mẫu thử trong 9.2.

9.2 Phần mẫu thử

Lắc mẫu thử đã tan chảy (Điều 8) 1 min để đồng hóa mẫu thử. Cân khoảng 200 mg mẫu thử, chính xác đến 1 mg, cho vào bình cầu đáy tròn (6.3).

9.3 Xà phòng hóa

Dùng pipet một vạch (6.6) chuyển 1 ml dung dịch chất chuẩn (nội) 5 α -cholestan (5.9) và 10 ml thuốc thử xà phòng hóa (5.4) vào phần mẫu thử (9.2). Lắp bình cầu đáy tròn vào bộ sinh hàn (6.8). Đun sôi nhẹ trên nồi cách thủy (6.7) ở 80 °C trong 1 h.

CHÚ THÍCH: Khi dự kiến có sôi mạnh thì thêm vài hạt chống trào.

9.4 Chiết chất không xà phòng hóa

Làm nguội bình cầu đáy tròn đến 35 °C. Chuyển định lượng dung dịch thử sang phễu chiết (6.9). Thêm 10 ml dietyl ete (5.6) và 20 ml nước cất. Sử dụng một phần của từng dung môi nói trên, tráng bình cầu để không làm thất thoát mẫu. Lắc mạnh trong khi vẫn thường xuyên loại khí. Để cho tách lớp và để cho trong hoàn toàn.

TCVN 9971:2013

Tháo lớp nước phía dưới vào phễu chiết thứ hai (6.9). Chiết dung dịch và phòng thu được bằng 10 ml dietyl ete (5.6) theo cùng trình tự như trên. Thực hiện lần chiết thứ ba bằng 5 ml dietyl ete.

Gộp các dịch chiết thu được vào một phễu chiết (6.9) khác. Thêm 10 ml nước và lắc nhẹ (trong giai đoạn này nếu lắc mạnh sẽ tạo nhũ tương). Sau khi tách lớp, tháo lớp nước. Rửa dung dịch ete thu được hai lần, mỗi lần dùng 5 ml nước. Nếu tạo nhũ tương trong quá trình rửa thì thêm vài giọt etanol (5.2).

Cho 10 g natri sulfat (5.5) vào giấy lọc gấp nếp (6.13) rồi đặt vào phễu chiết (6.12). Lọc dung dịch ete qua natri sulfat vào bình cầu đáy tròn (6.3). Tráng phễu chiết bằng 5 ml dietyl ete (5.6). Cho bay hơi dung môi bằng thiết bị thích hợp (6.11) trong khi làm nóng nhẹ bình cầu trong nồi cách thủy ở 50 °C. Dùng pipet chia vạch (6.5) thêm 2 ml dietyl ete (5.6) và trộn. Chuyển định lượng chất không xà phòng hóa sang lọ nhỏ (6.14). Tráng lại bình cầu bằng 1 ml dietyl ete (5.6). Loại bỏ dung môi trong lọ nhỏ dưới dòng khí nitơ nhẹ. Hòa tan phần cặn còn lại trong 0,25 ml *n*-Hexan (5.7) nếu sử dụng bộ bơm chia dòng, còn khi sử dụng bộ bơm lên cột thì hòa tan trong 3 ml *n*-Hexan. Dung dịch thu được này được dùng để bơm vào máy sắc ký khí.

9.5 Phân tích định tính

Hòa tan dung dịch chuẩn sterol đã làm khô (9.1.2) với cùng một lượng *n*-Hexan (5.7) như đã dùng trong 9.4 và trộn. Bơm dung dịch thu được vào máy sắc ký khí. Ghi lại thời gian lưu của các sterol đối chứng. Phân tích phần mẫu thử (9.2) trong cùng điều kiện như đã dùng để phân tích dung dịch chuẩn sterol.

CHÚ THÍCH 1: Thứ tự rửa giải các sterol chính như sau: cholesterol, campesterol, stigmasterol và β -sitosterol. Chất chuẩn nội 5 α -cholestan rửa giải trước cholesterol. Sắc đồ nêu trong Hình A.1 giúp cho việc nhận biết các sterol này.

CHÚ THÍCH 2: Nếu đầu đầu nành được dùng để nhận biết các phytosterol thì việc phân tích dung dịch hiệu chuẩn (9.1.1) có thể cho phép xác định thời gian lưu của cholesterol.

Nhận biết các pic của mẫu thử bằng cách so sánh thời gian lưu thu được với thời gian lưu của dung dịch chuẩn sterol.

9.6 Phân tích định lượng

9.6.1 Tính hệ số đáp ứng

Hòa tan dung dịch hiệu chuẩn (9.1.1) trong cùng một lượng *n*-Hexan như đã dùng trong 9.4 và trộn. Bơm dung dịch thu được vào máy sắc ký khí. Xác định diện tích pic của 5 α -cholestan và cholesterol. Tính hệ số đáp ứng, F , đến hai chữ số thập phân theo công thức sau:

$$F_r = \frac{(w_c \times P_c) \times A_{5\alpha}}{(w_{5\alpha} \times P_{5\alpha}) \times A_c}$$

Trong đó:

w_c là phần khối lượng cholesterol có trong dung dịch hiệu chuẩn (9.1.1);

$w_{5\alpha}$ là phần khối lượng 5 α -cholestan có trong dung dịch hiệu chuẩn (9.1.1);

$A_{5\alpha}$ là diện tích pic 5 α -cholestan;

A_c là diện tích pic cholesterol;

P_c là độ tinh khiết của cholesterol chuẩn (5.10), (ví dụ : $P_c = 0,99$);

$P_{5\alpha}$ là độ tinh khiết của 5 α -cholestan chuẩn (5.8), (ví dụ : $P_{5\alpha} = 0,99$).

CHÚ THÍCH : Hệ số đáp ứng tính được đối với cholesterol cũng có thể áp dụng cho các sterol khác (campesterol, stigmasterol và β -sitosterol).

9.6.2 Xác định phần mẫu thử

Phân tích mẫu thử trong các điều kiện như đã dùng đối với dung dịch hiệu chuẩn. Xác định diện tích pic của 5 α -cholestan, cholesterol và các sterol khác, nếu phát hiện thấy.

Lặp lại việc bơm dung dịch hiệu chuẩn và tính F_r theo 9.6.1.

9.6.3 Tính và biểu thị kết quả

9.6.3.1 Tính các sterol theo phần khối lượng

Tính hệ số đáp ứng trung bình đối với cholesterol, $F_{r,s}$ độ lệch chuẩn và hệ số biến thiên giữa các giá trị. Phép xác định thành công khi cho độ đáp ứng gần với 1 và hệ số biến thiên nhỏ hơn 2. Tính phần khối lượng của từng sterol, w_i , theo công thức sau:

$$w_i = \frac{(w_{5\alpha} \times P_{5\alpha}) \times A_i \times F_{r,s}}{A_{5\alpha} \times m_s} \times 100$$

Trong đó:

w_i là phần khối lượng của từng sterol (cholesterol, campesterol, stigmasterol và β -sitosterol) có trong mẫu, tính bằng miligam trên 100 g chất béo;

TCVN 9971:2013

$w_{5\alpha}$ là phần khối lượng dung dịch chuẩn 5 α -cholestan bổ sung vào phần mẫu thử (9.3), tính bằng miligam (mg);

$P_{5\alpha}$ là độ tinh khiết của 5 α -cholestan chuẩn (5.8), (ví dụ : $P_{5\alpha} = 0,99$);

A_i là diện tích pic của từng sterol có trong phần mẫu thử (9.6.2);

$F_{r,a}$ là giá trị trung bình của hệ số đáp ứng cholesterol;

$A_{5\alpha}$ là diện tích pic 5 α -cholestan (9.6.2);

m_s là khối lượng phần mẫu thử (9.2), tính bằng gam (g).

9.6.3.2 Tính các sterol theo phần trăm sterol tổng số

Tính phần khối lượng của từng sterol, w_i , theo phần trăm khối lượng của các sterol theo công thức sau:

$$w_i = \frac{A_i \times F_{r,a}}{\sum (A_i \times F_{r,a})} \times 100 \%$$

9.6.3.3 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến một chữ số thập phân.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục B.

Các giá trị về giới hạn độ tái lập và độ lặp lại được biểu thị ở mức xác suất 95 % và có thể không thể áp dụng cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong 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:

- đối với cholesterol: $r = 14,5$ mg/100 g chất béo; $s_r = 5,20$ mg/100 g chất béo;
- đối với campesterol: $r = 1,9$ mg/100 g chất béo; $s_r = 0,68$ mg/100 g chất béo;

- đối với stigmasterol: $r = 1,4 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo; $s_r = 0,50 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo;
- đối với β -sitosterol: $r = 3,8 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo; $s_r = 1,37 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo.

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống thử hết nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn:

- đối với cholesterol: $R = 32,6 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo; $s_R = 11,66 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo;
- đối với campesterol: $R = 6,5 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo; $s_R = 2,34 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo;
- đối với stigmasterol: $R = 3,9 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo; $s_R = 1,39 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo;
- đối với β -sitosterol: $R = 9,5 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo; $s_R = 3,39 \text{ mg}/100 \text{ g}$ chất béo.

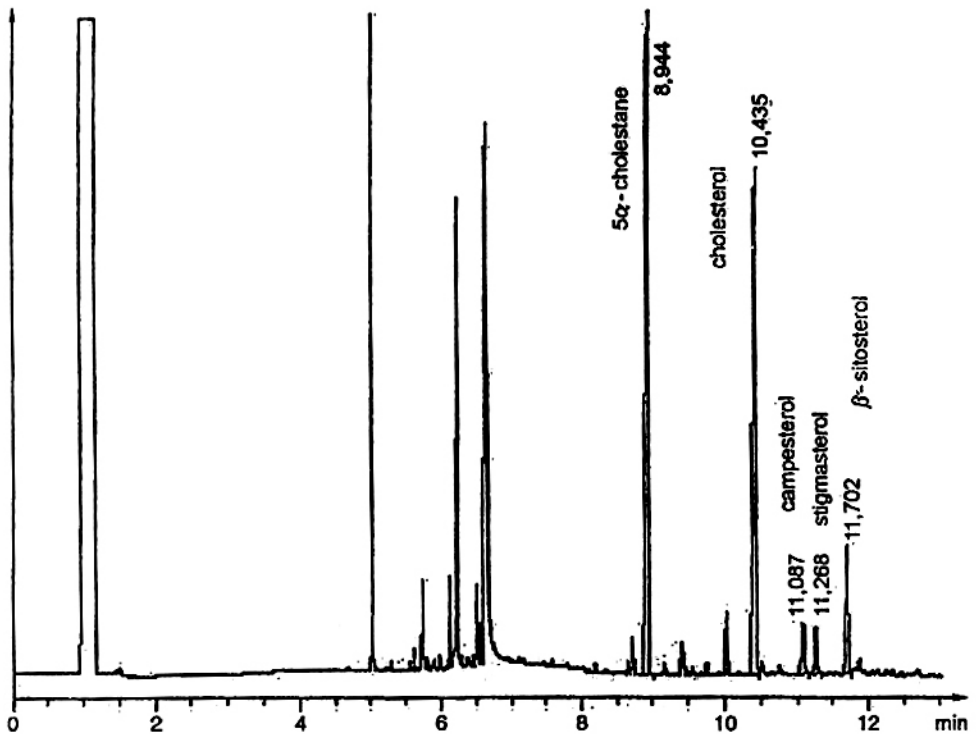
11 Báo cáo thử nghiệm

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 dùng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã dùng, cũng như viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thu được, hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Các ví dụ về phân tích sắc ký khí lỏng



Hình A.1 – Ví dụ về mẫu sắc ký đồ GC của các sterol
thu được trong các điều kiện GC trong 6.18.2

Phụ lục B
(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Phép thử liên phòng này gồm có 13 phòng thử nghiệm tham gia thực hiện phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) trên ba mẫu chất béo sữa dạng khan khác nhau chứa từ 28 % đến 32 % chất béo thực vật. Ba mẫu hỗn hợp chất béo này được chia thành sáu cặp mẫu mù giống nhau.

Phép thử liên phòng này do Instituto del Frio (CSIC) (ES) and Instituto Sperimentale Lattiero Caseario (IT) tổ chức thực hiện. Các kết quả phần khối lượng cholesterol, campesterol, stigmaterol and β -sitosterol được biểu thị bằng miligam trên 100 g chất béo.

Các kết quả thu được đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) để cho dữ liệu về độ chụm như trong Bảng B.1.

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

Cholesterol			
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	9	10	10
Giá trị trung bình, (mg/100 g chất béo)	187,0	179,9	181,5
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , (mg/100 g chất béo)	1,69	5,87	8,02
Hệ số biến thiên lặp lại, %	0,9	3,3	4,4
Giới hạn lặp lại, r ($= 2,8 s_r$), (mg/100 g chất béo)	4,7	16,4	22,5
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , (mg/100 g chất béo)	13,67	10,69	10,62
Hệ số biến thiên tái lập, %	7,3	5,9	5,8
Giới hạn tái lập, R ($= 2,8 s_R$), (mg/100 g chất béo)	38,3	29,9	29,7

Campesterol			
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	11	10	12
Giá trị trung bình, (mg/100 g chất béo)	13,1	14,7	15,5
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , (mg/100 g chất béo)	0,57	0,79	0,69
Hệ số biến thiên lặp lại, %	4,4	5,3	4,5
Giới hạn lặp lại, r ($= 2,8 s_r$), (mg/100 g chất béo)	1,6	2,2	1,9
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , (mg/100 g chất béo)	1,95	2,29	2,76
Hệ số biến thiên tái lập, %	14,9	15,6	17,8
Giới hạn tái lập, R ($= 2,8 s_R$), (mg/100 g chất béo)	5,5	6,4	7,7

Stigmasterol			
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	10	8	11
Giá trị trung bình, (mg/100 g chất béo)	10,1	10,7	12,8
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , (mg/100 g chất béo)	0,49	0,52	0,48
Hệ số biến thiên lặp lại, %	4,9	4,8	3,7
Giới hạn lặp lại, r ($= 2,8 s_r$), (mg/100 g chất béo)	1,4	1,4	1,3
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , (mg/100 g chất béo)	1,41	1,37	1,39
Hệ số biến thiên tái lập, %	14,0	12,7	10,9
Giới hạn tái lập, R ($= 2,8 s_R$), (mg/100 g chất béo)	3,9	3,8	3,9

β-sitosterol			
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	10	8
Giá trị trung bình, (mg/100 g chất béo)	32,9	35,2	40,8
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , (mg/100 g chất béo)	1,70	1,19	1,21
Hệ số biến thiên lặp lại, %	5,2	3,4	3,0
Giới hạn lặp lại, r ($= 2,8 s_r$), (mg/100 g chất béo)	4,8	3,3	3,4
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , (mg/100 g chất béo)	4,71	4,00	1,45
Hệ số biến thiên tái lập, %	14,3	11,4	3,6
Giới hạn tái lập, R ($= 2,8 s_R$), (mg/100 g chất béo)	13,2	11,2	4,1

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn 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] ISO 6799, *Animal and vegetable fats and oils – Determination of composition of the sterol fraction - Method using gas chromatography.*
 - [5] TCVN 9970 (ISO 12078), *Chất béo sữa dạng khan – Xác định thành phần sterol bằng sắc ký khí lỏng (Phương pháp chuẩn).*
-