

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6761:2008

ISO 9936:2006

Xuất bản lần 2

**DẦU MỠ ĐỘNG THỰC VẬT – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
TOCOPHEROL VÀ TOCOTRIENOL BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Animal and vegetable fats and oils –
Determination of tocopherol and tocotrienol contents by
high-performance liquid chromatography*

Lời nói đầu

TCVN 6761:2008 thay thế TCVN 6761:2000;

TCVN 6761:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 9936:2006;

TCVN 6761:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F2
Đầu mữ động thực vật biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn
Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ
công bố.

Dầu mỡ động thực vật – Xác định hàm lượng tocopherol và tocotrienol – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng α -, β -, γ -, và δ - tocopherol và tocotrienol tự do (liên quan đến liên kết tocol) trong dầu mỡ động thực vật (gọi là chất béo) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Đối với các sản phẩm chứa các este của tocopherol và este của tocotrienol thì cần tiến hành xà phòng hoá sơ bộ.

CHÚ THÍCH Phương pháp thích hợp về qui trình xà phòng hoá nguội mô tả trong Phụ lục B chỉ dùng để tham khảo.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là 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.

TCVN 6128:2007 (ISO 661:2003), Dầu mỡ động thực vật – Chuẩn bị mẫu thử.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hàm lượng tocol (tocol content)

Phần khối lượng của từng tocol xác định được bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng tocol được làm tròn số đến microgam trên kilogam.

4 Nguyên tắc

Hoà tan phần mẫu thử trong *n*-heptan và dùng sắc ký lỏng hiệu năng cao để tách từng loại tocol. Dùng hệ số hiệu chuẩn xác định được từ các dung dịch hiệu chuẩn để tính hàm lượng của từng loại tocol.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các loại thuốc thử đạt chất lượng phân tích HPLC hoặc có chất lượng tương đương.

5.1 Các chất chuẩn α -, β -, γ -, δ -tocopherol và tocotrienol

Nếu không có sẵn các chất chuẩn tocopherol thì có thể sử dụng hỗn hợp của phơi hạt lúa mì với dầu đậu tương sử dụng để nhận biết α -, β -, γ -, và δ -tocopherols.

Nếu không có sẵn các chất chuẩn tocotrienol thì có thể sử dụng dầu cọ để nhận biết α - và γ -tocotrienol. Sắc đồ thu được có thể sử dụng để giúp cho việc nhận biết pic trong sắc đồ của mẫu thử, trong trường hợp này có thể sử dụng hệ số hiệu chuẩn đối với các tocopherol tương ứng.

CHÚ THÍCH Các chất chuẩn α -, β -, γ -, và δ -tocopherol và tocotrienol có thể mua được từ hãng Merck¹⁾; còn α -tocopherol thì từ nhiều hãng cung cấp khác. Một điều đã được ghi nhận là độ tinh khiết của một số chất chuẩn tocopherol thương mại có thể dao động từ 85 % đến 100 %. Do đó, điều quan trọng là phải xác định nồng độ các dung dịch hiệu chuẩn đã được chuẩn bị bằng quang phổ tử ngoại (xem 9.1.1).

5.2 Tetrahydrofuran, được lọc qua màng lọc (0,45 μ m) của HPLC.

5.3 *n*-Heptan, được lọc qua màng lọc (0,45 μ m) của HPLC

5.4 Pha động của HPLC, bất kỳ hỗn hợp của dung môi nào đã đạt độ phân giải pic của sắc đồ thể hiện trong Bảng 2 (liên quan đến thời gian lưu của tocopherols và tocotrienols) và trong Phụ lục A (sắc đồ của hỗn hợp dầu thực vật) sẽ được sử dụng (xem Bảng C.3).

Dung dịch tetrahydrofuran 3,85 % (theo thể tích) trong *n*-heptan được chuẩn bị pha động thích hợp như sau: Dùng ống đong chia vạch 1 000 ml (6.5) đong 1 000 ml *n*-heptan (5.3) cho vào lọ 2 lít. Dùng pipet 20 ml (6.6) bổ sung hai lần 20 ml tetrahydrofuran (5.2). Đồng hoá pha động bằng bể siêu âm (6.8) trong 15 min.

5.5 Metanol.

¹⁾ Tocopherol 613424 của hãng Merck thuộc Công ty Calbiochem (www.calbiochem.com) thường có bán sẵn. Mỗi lọ nhỏ chứa 50 mg DL- α -tocopherol, D- β -tocopherol, D- γ -tocopherol và D- δ -tocopherol có độ tinh khiết 95 % bằng phép phân tích sắc ký (đối với mỗi phần). Bộ tocotrienol 613424 của hãng Merck thuộc Công ty Calbiochem cũng có bán sẵn. Mỗi bộ chứa một lọ nhỏ 50 mg α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol và δ -tocotrienol có độ tinh khiết 95 % cho phép phân tích sắc ký (đối với γ -tocotrienol độ tinh khiết là 75 %).

Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này và ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Hệ thống HPLC, gồm bơm cao áp, dụng cụ bơm mẫu, bộ ổn nhiệt dạng cột điều chỉnh đến 25 °C (tùy ý), detector huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 295 nm và bước sóng phát xạ ở 330 nm, và máy đọc tích phân.

Nếu không có sẵn detector phát huỳnh quang thì có thể sử dụng detector tử ngoại (UV). Tuy nhiên, nếu sử dụng detector tử ngoại thì cài đặt ở bước sóng 292 nm.

6.2 Cột phân tích HPLC, có hai loại thích hợp sau đây:

- 250 mm × 4 mm, được nhồi vi hạt **diol** có cỡ hạt trung bình khoảng 5 µm hoặc
- 250 mm × 4,6 mm, được nhồi vi hạt **silica** có cỡ hạt trung bình khoảng 5 µm.

CHÚ THÍCH 1 Cột silic diol thích hợp được nhồi các vật liệu có sẵn trên thị trường là: 5 µm LiChrospher 100 Diol; Cột silica thích hợp được nhồi các vật liệu có bán sẵn là 5 µm LiChrospher SI 60 và Kromasil 100²⁾. Khi dùng cột diol silica để tách rửa β-tocotrienol trong mẫu sẽ tốt hơn vì cột silica tách rửa γ-tocopherol và β-tocotrienol cùng một lúc.

CHÚ THÍCH 2 Chiều dài và đường kính của cột có thể được thay đổi theo kỹ thuật sử dụng HPLC.

6.3 Máy quang phổ UV, có thể đo độ hấp thụ ở các bước sóng đã xác định chính xác, với chiều dài cột là 10 mm.

6.4 Bộ cất quay.

6.5 Ống đong chia vạch, dung tích 1 000 ml.

6.6 Pipet, dung tích 5 ml, 10 ml và 20 ml.

6.7 Bình định mức, dung tích 50 ml và 25 ml.

6.8 Thiết bị siêu âm.

7 Lấy mẫu

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

²⁾ Các loại cột này là các ví dụ về các sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường.

Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này và ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó.

TCVN 6761:2008

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo phương pháp qui định trong TCVN 2625:2007 (ISO 5555:2001).

8 Chuẩn bị mẫu thử

Trong trường hợp các mẫu thử nghiệm ở dạng lỏng, chuẩn bị mẫu thử bằng cách đồng hoá mẫu theo mô tả trong TCVN 6128:2007 (ISO 661:2003), không lọc mẫu.

Trong trường hợp mẫu thử nghiệm ở dạng rắn, chuyển phần mẫu đại diện (tức là không nhỏ hơn 10 % khối lượng mẫu thử nghiệm) vào cốc thuỷ tinh có mỏ và đồng hoá cẩn thận bằng cách cho nóng chảy trong nồi cách thuỷ ở nhiệt độ không quá 40 °C và trộn nhẹ.

Nên tiến hành chuẩn bị mẫu thử dưới ánh sáng nhẹ và trong trường hợp nào cũng không được thực hiện dưới ánh nắng mặt trời.

9 Cách tiến hành

CHÚ Ý Nhìn chung, sự ôxy hoá tocol trong quá trình phân tích có thể dẫn đến kết quả thấp. Tốc độ ôxy hoá tăng nhanh khi có chất kiềm, hoặc do ảnh hưởng của nhiệt hoặc ánh sáng và do đó nên tiến hành đo sao cho tránh được các ảnh hưởng này.

9.1 Chuẩn bị các dung dịch hiệu chuẩn

9.1.1 Các dung dịch chuẩn gốc

Chuẩn bị dung dịch gốc của từng loại tocol bằng cách cân 10 mg \pm 1 mg chất chuẩn (5.1) cho vào bình định mức 50 ml và pha loãng bằng *n*-heptan (5.3) cho đến vạch.

Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch này cho vào bình thuỷ tinh màu nâu có đáy tròn và loại bỏ hết *n*-hexan trên bộ cất quay (6.4) trong chân không ở nhiệt độ không lớn hơn 40 °C. Khôi phục lại áp suất không khí bằng nitơ và lấy bình thuỷ tinh ra khỏi bộ cất quay càng nhanh càng tốt ngay sau khi đã loại bỏ hết dung môi. Dùng pipet lấy 10 ml metanol (5.5) cho vào bình và khuấy cho tan hết cặn. Dùng quang phổ kế tử ngoại (6.3) với chiều dài cột 10-mm để đo độ hấp thụ lớn nhất của dung dịch này ở bước sóng trong khoảng 270 nm và 310 nm (xem bước sóng thích hợp trong Bảng 1). Độ hấp thụ đo được nằm trong khoảng 0,2 và 0,8. Tính nồng độ (microgam trên millilit) bằng cách chia độ hấp thụ cho hệ số tương ứng được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Hệ số chia

Bước sóng nm	Tocopherol	Hệ số chia
292	α -tocopherol	0,0076
296	β -tocopherol	0,0089
298	γ -tocopherol	0,0091
298	δ -tocopherol	0,0087

CHÚ THÍCH Các hệ số nêu trên thu được từ giá trị E (1%/1 cm) của tocopherol. Ví dụ, giá trị E (1%/1 cm) α -tocopherol là 76 ở 292 nm (trong metanol); do đó 1 μ g/ml dung dịch α -tocopherol sẽ có độ hấp thụ là 0,0076 ở 292 nm).

9.1.2 Dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn thích hợp được chuẩn bị theo độ nhạy của detector huỳnh quang được sử dụng.

Ví dụ chuẩn bị dung dịch làm việc: Trộn các thể tích thích hợp, ví dụ 1 ml, của các dung dịch chuẩn hiệu chuẩn gốc (9.1.1) để thu được dung dịch tocol chuẩn hỗn hợp và pha loãng bằng *n*-heptan để có dung dịch chứa khoảng 1 μ g đến 5 μ g từng loại chuẩn trên mililit.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn mới cho mỗi ngày làm việc.

Bảo vệ tất cả các dung dịch tránh ánh sáng và nhiệt độ. Bảo quản ở nhiệt độ từ 0 °C đến 4 °C.

Các dung dịch chuẩn gốc có thể bảo quản trong bình thủy tinh màu nâu đến một tuần nếu được bảo quản lạnh. Các bình định mức có thể được bọc trong lá nhôm.

CHÚ THÍCH Nếu sử dụng detector UV có thể cần đến dung dịch đậm đặc hơn.

9.2 Tối ưu hoá các thông số làm việc

9.2.1 Nếu cột (6.2) còn mới chưa sử dụng hoặc chưa biết tiền sử của nó, hoặc vì một lý do bất kỳ nào khác thì cần phải luyện lại cột. Rửa bằng metanol và luyện lại cột trong khoảng 10 min, sau đó rửa bằng diclometan, tiếp đó bằng *n*-heptan ở tốc độ dòng khoảng 1 ml/min.

Cho pha động HPLC (5.4) chạy qua cột ở tốc độ dòng 1 ml/min ít nhất 30 min.

CẢNH BÁO Metanol và diclometan nguy hiểm đối với con người và môi trường. Thận trọng khi sử dụng.

9.2.2 Bơm khoảng 10 μ l hoặc 20 μ l (theo độ nhạy của detector) dung dịch chuẩn (9.1.2) vào cột và nếu

TCVN 6761:2008

cần, điều chỉnh hàm lượng tetrahydrofuran của pha động và tốc độ dòng để đạt được các điều kiện sau:

- thời gian lưu α -tocopherol trong khoảng 8 min đến 12 min;
- hệ số phân giải RF để tách β - và γ -tocopherol không nhỏ hơn 1,0; nghĩa là hầu như tới đường nền, trong đó RF được tính theo công thức sau đây:

$$RF = \frac{d_r(I) - d_r(II)}{0,5 \times [b(I) + b(II)]}$$

trong đó

$d_r(I)$ là thời gian lưu γ -tocopherol;

$d_r(II)$ là thời gian lưu β -tocopherol;

$b(I)$ là độ rộng đáy của pic γ -tocopherol;

$b(II)$ là độ rộng đáy của pic β -tocopherol.

9.2.3 Chọn chế độ tối ưu cho detector và độ nhạy của bộ tích hợp. Bơm khoảng 10 μ l hoặc 20 μ l dung dịch chuẩn (9.1.2). Bơm lặp lại và kiểm tra các sắc đồ thu được.

9.3 Chuẩn bị dung dịch thử

Tuỳ theo nồng độ của tocol (9.1.2) cân khoảng 0,25 g \pm 0,1 g mẫu thử (điều 8), chính xác đến 1 mg, cho vào bình định mức một vạch dung tích 25 ml. Thêm một lượng *n*-heptan (5.3), lắc để hoà tan phần mẫu thử và pha loãng đến vạch bằng cùng loại dung môi. Lọc dung dịch bằng màng lọc 0,45 μ m của HPLC nếu dung dịch chứa trong.

Điều quan trọng là các dung dịch thử được bảo vệ khỏi ánh sáng trước khi phân tích và được phân tích trong ngày chuẩn bị.

CHÚ THÍCH Có thể chuẩn bị một dung dịch đậm đặc hơn hoặc pha loãng tiếp dung dịch này trước khi cho chạy sắc ký.

9.4 Phương pháp xác định

9.4.1 Bơm 10 μ l hoặc 20 μ l (tuỳ theo độ nhạy của detector) dung dịch chuẩn (9.1.2) cho vào cột và ghi lại diện tích pic.

9.4.2 Bơm 10 μ l hoặc 20 μ l (tuỳ theo độ nhạy của detector) dung dịch thử (9.3) cho vào cột và nhận biết sự có mặt của các tocol bằng cách so sánh với các sắc đồ hiệu chuẩn. Ghi lại diện tích của pic.

Lặp lại việc bơm dung dịch thử và đo. Kết quả là giá trị trung bình cộng của hai phép xác định.

Bơm tiếp 10 μl hoặc 20 μl (tùy theo độ nhạy của detector) dung dịch chuẩn (9.1.2) và ghi lại các diện tích các pic.

Thời gian lưu tương đối đưa ra trong Bảng 2 đã được tìm thấy, điển hình như sau:

Bảng 2 – Ví dụ về thời gian lưu tương đối của các tocopherol và tocotrienol

Cột silica (α -tocopherol chuẩn)		Cột diol (α -tocopherol chuẩn)	
α -tocopherol = 1,00	α -tocotrienol = 1,19	α -tocopherol = 1,00	α -tocotrienol = 1,24
β -tocopherol = 1,34	β -tocotrienol = 1,63	β -tocopherol = 1,59	β -tocotrienol = 2,03
γ -tocopherol = 1,63	γ -tocotrienol = 2,00	γ -tocopherol = 1,74	γ -tocotrienol = 2,22
δ -tocopherol = 2,24	δ -tocotrienol = 2,79	δ -tocopherol = 2,46	δ -tocotrienol = 3,19

10 Biểu thị kết quả

Hàm lượng α -tocopherol của mẫu, w , được biểu thị bằng miligam trên kilogam (mg/kg), theo công thức sau đây:

$$w = \frac{\rho \times \overline{At} \times V}{\overline{As} \times m}$$

trong đó:

ρ là nồng độ của α -tocopherol trong dung dịch chuẩn (9.1.2), tính bằng microgam trên mililit;

\overline{As} là giá trị trung bình của các diện tích pic thu được đối với chuẩn α -tocopherol;

\overline{At} là giá trị trung bình của các diện tích pic thu được đối với α -tocopherol có trong mẫu thử;

m là khối lượng của phần mẫu thử (9.3), tính bằng gam;

V là thể tích dung dịch thử được chuẩn bị (= 25 ml).

Tính hàm lượng tocol còn lại trong mẫu thử theo cùng cách, sử dụng số liệu thu được từ chuẩn tương ứng.

Nếu chỉ có sẵn chuẩn của α -tocopherol, thì tất cả các tocopherol được so sánh theo tiêu chuẩn này, nhưng phải nêu rõ trong phần báo cáo kết quả. Nếu sử dụng detector UV, thì lại so sánh tất cả các tocopherol theo α -tocopherol chuẩn, nhưng việc chuẩn hoá các diện tích pic theo α -tocopherol sử dụng các hệ số chia trong 9.1.1.

TCVN 6761:2008

CHÚ THÍCH Cường độ huỳnh quang của tocotrienol cũng giống như của tocopherol tương ứng và các độ hấp thụ UV cũng tương tự.

Hàm lượng được biểu thị bằng miligam trên kilôgam là một số nguyên.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Chi tiết phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được thống kê trong Phụ lục C. Các giá trị thu được từ phép thử này có thể không áp dụng được đối với các dải nồng độ và các chất nền khác với dải nồng độ và các chất nền đã đưa ra.

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một thời gian ngắn, không vượt quá 5 % các trường hợp lớn hơn giá trị r đưa ra trong Bảng 3.

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, 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 vượt quá 5 % các trường hợp và lớn hơn giá trị R nêu trong Bảng 3.

Bảng 3 – Giới hạn lặp lại (r) và giới hạn tái lập (R)

Hàm lượng tocol mg/kg	Dải nồng độ mg/kg	r mg/kg	R mg/kg
T_1 = giá trị trung bình của hàm lượng tocopherol độc lập	0 đến 2220	0,0825 T_1	0,2094 T_1
T_2 = giá trị trung bình của hàm lượng tocotrienol độc lập	10 đến 210	0,0900 T_2	0,2552 T_2
T_3 = giá trị trung bình của hàm lượng tổng (tocopherol + tocotrienol)	200 đến 3250	0,0718 T_3	0,2557 T_3

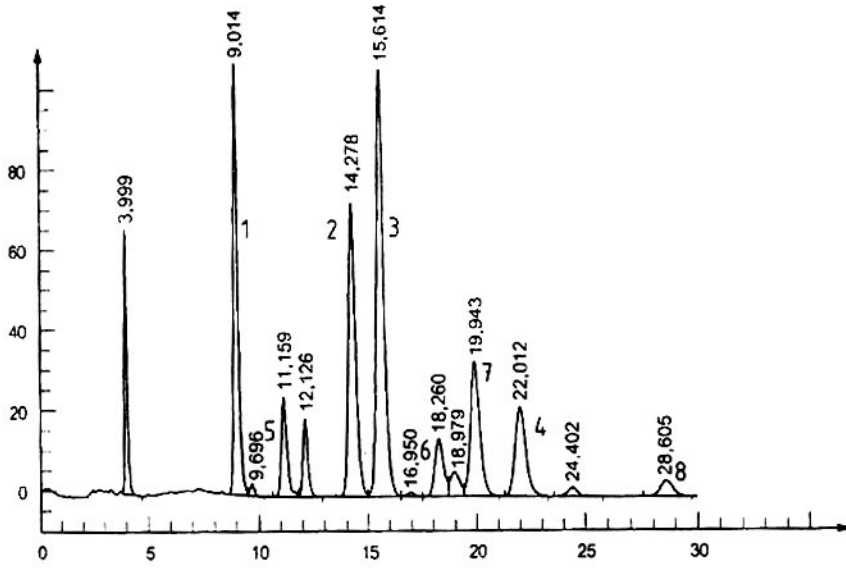
12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

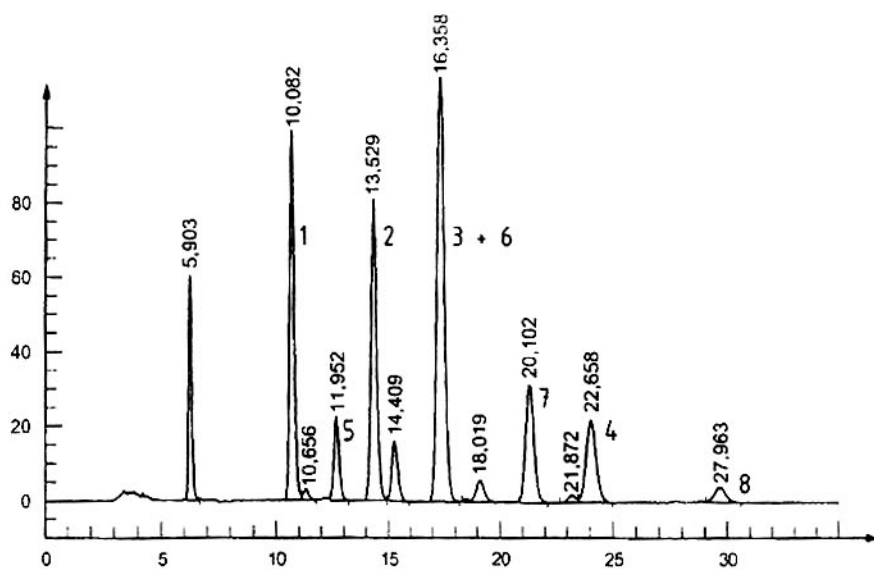
- a) tất cả các thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu được sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, cùng với viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy ý cũng như bất kỳ yếu tố nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử thu được;
- f) 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



a) Tỷ lệ diol



b) Cột silica

Nhận dạng pic

1 α -tocopherol	5 α -tocotrienol
2 β -tocopherol	6 β -tocotrienol
3 γ -tocopherol	7 γ -tocotrienol
4 δ -tocopherol	8 δ -tocotrienol

Các điều kiện

Pha động: 3,8 % (theo thể tích) THF trong *n*-heptan

Tốc độ dòng: 1 ml/min

Detector: huỳnh quang

Hình A.1 – Hỗn hợp dầu thực vật (đậu tương, hạt nho, phôi lúa mì, dầu cọ) được bổ sung α -tocopherol axetat

Phụ lục B
(tham khảo)

Xà phòng hóa

B.1 Giới thiệu

Khi phân tích các sản phẩm được chế biến có bổ sung các este của tocopherol hoặc este của tocotrienol, thì trước khi chạy sắc ký nên tiến hành qui trình xà phòng hoá nguội. Cần phân tích đồng thời các mẫu chứa lượng este đã biết trước ở cùng một thời điểm.

B.2 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích.

B.2.1 Etanol, $w = 94 \text{ g}/100 \text{ g}$ đến $96 \text{ g}/100 \text{ g}$.

B.2.2 Etanol, nguyên chất, $w \geq 99,7 \text{ g}/100 \text{ g}$.

B.2.3 Pyrogallol.

B.2.4 Kali hydroxit, dung dịch lỏng $w = 60 \text{ g}/100 \text{ g}$.

B.2.5 Dietyl ete, không chứa peroxit, chứa pyrogallol 0,1 %.

B.2.6 Axit clohydric, $c(\text{HCl}) = 0,01 \text{ mol/l}$.

B.2.7 Natri sunfat, khan.

B.2.8 Nước, phù hợp với các yêu cầu của loại 3 của TCVN 4851 (ISO 3696).

B.3 Cách tiến hành

CẢNH BÁO Phải đặc biệt chú ý đến nhiệt độ và thời gian xà phòng hoá, nếu không sự thu hồi este có thể cho kết quả thấp.

Cân chính xác 2 g mẫu đã trộn kỹ cho vào bình định mức đáy phẳng dung tích 100 ml và phân tán phần mẫu thử đã nóng chảy trong khoảng 8 ml etanol (B.2.1) bằng cách xoay nhẹ bình. Thêm 100 mg pyrogallol (B.2.3) và lắc cho tan.

Làm sạch bình định mức bằng nitơ, thêm 4 ml dung dịch kali hydroxit (B.2.4), làm sạch lại bằng nitơ và đậy bình bằng nắp thủy tinh. Đặt bình vào nồi cách thủy ở $26 \text{ }^\circ\text{C}$ và lắc mạnh trong 10 min hoặc cho

đến khi xà phòng hoá hoàn toàn. Thực hiện tất cả các thao tác tránh ánh sáng mặt trời, sử dụng bình thủy tinh màu nâu hoặc được bọc trong giấy nhôm.

Thêm 50 ml nước (B.2.8) vào bình định mức và chuyển lượng chứa trong bình sang phễu chiết dung tích 250 ml. Rửa bình bằng 50 ml dietyl ete (B.2.5) và chuyển sang phễu. Lắc mạnh phễu chiết trong 1 min, thỉnh thoảng nới lỏng nút để giảm áp suất. Để yên cho tách lớp và tháo bỏ lớp nước bên dưới. Chiết tiếp lớp chất lỏng bốn lần, mỗi lần với 30 ml dietyl ete và kết hợp với chiết xuất ete.

Rửa các dịch chiết dietyl ete đã kết hợp bằng 50 ml nước (lắc cẩn thận để tránh tạo thể nhũ) và sau đó rửa tiếp bằng 30 ml axit clohydric loãng (B.2.6). Thêm khoảng 3 g natri sunfat khan (B.2.7) và trộn nhẹ để hấp thụ nước. Lọc chất chiết ete qua giấy lọc và thu lấy chất lọc vào bình bay hơi dạng quay, màu nâu, đáy tròn. Loại bỏ ete dưới áp suất thấp ở nhiệt độ không vượt quá 40 °C. Nếu chất lỏng còn sót lại trong bình, thêm etanol (B.2.2) và cho bay hơi đến khô.

Rửa bình định mức bằng *n*-heptan (5.3) và chuyển sang bình định mức một vạch dung tích 50 ml và pha loãng đến vạch bằng *n*-heptan. Tạo độ pha loãng thích hợp của dung dịch thử (theo mô tả trong 9.3) và tiếp tục tiến hành theo 9.4.

Phụ lục C

(tham khảo)

Kết quả thử nghiệm liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp đã được thiết lập bởi thử nghiệm của liên phòng thử nghiệm quốc tế IUPAC được tổ chức vào năm 2003 bởi Trung tâm nghiên cứu Dinh dưỡng và Thực phẩm thuộc Viện nghiên cứu Lipit (Munster - Đức) và tiến hành phù hợp với TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2). Trong thử nghiệm này có 12 phòng thử nghiệm của bốn nước (1 Hungari, 1 Canada, 4 Pháp, 6 Đức) tham gia và nghiên cứu trên tám loại mẫu chất béo khác nhau đã được kiểm tra (xem Bảng C.1). Thống kê của các kết quả đưa ra trong Bảng C.2.

Các loại HPLC pha động khác nhau sử dụng trong phép thử này liệt kê trong Bảng C.3

Bảng C.1 – Mô tả mẫu

Mẫu A	Dầu phôi hạt lúa mì
Mẫu B	50 % dầu phôi lúa mì + 50 % dầu ngô
Mẫu C	25 % dầu phôi lúa mì + 75 % dầu ngô
Mẫu D	25 % dầu phôi lúa mì + 75 % dầu đậu tương
Mẫu E	10 % dầu phôi lúa mì + 90 % dầu cọ
Mẫu F	25 % dầu phôi lúa mì + 75 % dầu cọ
Mẫu G	Dầu cọ
Mẫu H	Dầu ôliu nguyên chất

Bảng C.2 – Kết quả thống kê

α -Tocopherol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia	12	12	12	12	12	12	12	12
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	12	12	12	12	11	11
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	22,0	22,0
Giá trị trung bình, mg/kg	2214,5	1284,8	813,7	662,8	311,5	625,0	106,5	193,1
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg	68,3	34,9	24,3	18,4	10,4	25,4	5,0	7,8
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	3,1	2,7	3,0	2,8	3,3	4,1	4,7	4,0
Giới hạn lặp lại, (r) mg/kg	191,3	97,7	68,1	51,5	29,1	71,1	13,9	21,7
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg	173,1	87,9	56,4	48,5	20,9	38,1	7,1	11,4
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	7,8	6,8	6,9	7,3	6,7	6,1	6,6	5,9
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg	484,7	246,1	157,8	135,9	58,4	106,6	19,7	31,8

β -Tocopherol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia	12	12	12	12	12	12	7	9
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	12	12	12	12	7	9
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	14,0	18,0
Giá trị trung bình, mg/kg	841,4	417,8	212,5	214,5	79,1	202,6	0,7	2,2
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg	22,6	6,8	5,1	6,1	2,8	7,6	0,0	0,3
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	2,7	1,6	2,4	2,8	3,5	3,7	0,0	15,0
Giới hạn lặp lại, (r) mg/kg	63,4	19,0	14,3	17,1	7,8	21,2	0,0	0,9
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg	108,3	55,7	24,7	26,3	10,2	25,9	1,1	0,7
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	12,9	13,3	11,6	12,3	12,9	12,8	155,8	29,8
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg	303,1	156,0	69,1	73,8	28,7	72,4	3,1	1,9

TCVN 6761:2008

γ -Tocopherol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia	10	12	12	12		8		12
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	6	11	7	9		8		12
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm	12,0	22,0	14,0	18,0		16,0		24,0
Giá trị trung bình, mg/kg	19,5	403,8	546,6	325,4		3,6		13,8
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg	1,4	7,5	11,7	10,5		0,4		1,1
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	7,3	1,9	2,1	3,2		9,8		8,1
Giới hạn lặp lại, (r) mg/kg	4,0	21,0	32,7	29,4		1,0		3,1
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg	2,4	62,9	12,3	19,2		2,2		4,2
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	12,5	15,6	2,3	5,9		59,7		30
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg	6,8	176,0	34,5	53,8		6,1		11,6

δ -Tocopherol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia		12	12	12				
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ		10	12	12				
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm		20,0	24,0	24,0				
Giá trị trung bình, mg/kg		13,0	20,0	71,0				
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg		0,6	1,7	2,5				
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %		4,9	8,5	3,5				
Giới hạn lặp lại, (r) mg/kg		1,8	4,7	6,9				
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg		2,7	3,9	8,3				
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %		20,8	19,3	11,6				
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg		7,6	10,8	23,1				

α -Tocotrienol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia	9	9	8	7	9	9	9	
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	7	7	7	7	8	8	8	
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm	14,0	14,0	14,0	14,0	16,0	16,0	16,0	
Giá trị trung bình, mg/kg	42,0	25,1	18,1	10,1	149,7	138,1	162,5	
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg	1,1	1,2	0,8	0,9	5,3	7,4	5,0	
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	2,5	4,9	4,7	8,8	3,6	5,4	3,1	
Giới hạn lặp lại, (r) mg/kg	3,0	3,4	2,4	2,5	14,9	20,8	14,0	
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg	24,7	12,0	6,3	6,7	12,6	26,3	11,0	
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	58,7	47,8	34,6	66,2	8,4	19,1	6,7	
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg	69,0	33,6	17,6	18,7	35,3	73,7	30,7	

β -Tocotrienol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia	7	7	7	7	9	9	8	
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	6	7	6	6	8	9	7	
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm	12,0	14,0	12,0	12,0	16,0	18,0	14,0	
Giá trị trung bình, mg/kg	113,5	63,7	34,3	28,6	23,9	37,7	15,8	
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg	3,0	2,5	0,9	1,0	2,0	2,9	2,1	
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	2,6	4,0	2,5	3,3	8,2	7,6	13,4	
Giới hạn lặp lại, (r) mg/kg	8,3	7,1	2,4	2,7	5,5	8,1	5,9	
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg	54,8	34,3	26,0	20,4	8,3	14,1	3,7	
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	48,3	53,8	75,9	71,4	34,6	37,3	23,7	
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg	153,6	96,1	72,8	57,1	23,2	39,4	10,5	

γ -Tocotrienol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia			8		9	9	9	
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ					6	6	6	
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm			14,0		12,0	12,0	12,0	
Giá trị trung bình, mg/kg			3,6		185,3	152,1	205,2	
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg			0,7		3,4	4,9	6,3	
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %			19,4		1,9	3,2	3,1	
Giới hạn lặp lại, (r) mg/kg			2,0		9,6	13,6	17,6	
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg			1,9		8,1	6,9	8,5	
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %			53,0		4,4	4,5	4,2	
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg			5,4		22,8	19,3	23,9	

δ -Tocotrienol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia					10	9	8	
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ					9	8	9	
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm					18,0	16,0	18,0	
Giá trị trung bình, mg/kg					40,8	35,3	47,7	
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg					2,1	1,6	1,4	
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %					5,0	4,6	2,9	
Giới hạn lặp lại, (r) mg/kg					5,8	4,6	3,9	
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg					4,4	4,1	6,6	
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %					10,8	11,7	13,8	
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg					12,4	11,6	18,4	

Tổng hàm lượng	A	B	C	D	E	F	G	H
Số phòng thử nghiệm tham gia	12	12	12	12	12	12	12	12
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	9	9	9	8	8	8	6	11
Số kết quả thử của tất cả các phòng thử nghiệm	18,0	18,0	18,0	16,0	16,0	16,0	12,0	22,0
Giá trị trung bình, mg/kg	3248,8	2209,4	1708,7	1290,4	813,7	1192,1	522,5	210,6
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), mg/kg	91,1	47,4	33,6	39,8	22,4	32,5	14,8	8,8
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	2,8	2,1	2,0	3,1	2,7	2,7	2,8	4,2
Giới hạn lặp lại. (r) mg/kg	255,1	132,6	94,0	111,3	62,7	90,9	41,5	24,6
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R), mg/kg	292,3	217,5	161,2	62,3	98,2	85,2	17,1	14,9
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	9,0	9,8	9,4	4,8	12,0	7,1	3,3	7,1
Giới hạn tái lập, (R) mg/kg	818,4	609,1	451,3	174,4	274,8	238,5	47,8	41,6
CHÚ THÍCH Nồng độ trung bình, giới hạn lặp lại và tái lập được biểu thị bằng mg/kg.								

Bảng C.3 – Ví dụ về pha động của HPLC đã sử dụng trong phép thử liên phòng thử nghiệm năm 2003

Hỗn hợp rửa giải	Số lượng phòng thử nghiệm sử dụng chất rửa giải này
3,85 % (theo thể tích) tetrahydrofuran trong <i>n</i> -heptan	2
Tetrahydrofuran/ <i>n</i> -heptan (1:99)	1
Tetrahydrofuran/ <i>n</i> -hexan (2:98)	1
<i>t</i> -butyl methyl ete/ <i>n</i> -hexan (4:96)	1
5 % <i>t</i> -butyl methyl ete trong <i>n</i> -hexan	1
6 % <i>t</i> -butyl methyl ete trong isohexan	1
<i>t</i> -butyl methyl ete/ <i>n</i> -heptan (5:95)	1
<i>t</i> -butyl methyl ete/isooctan (4:96)	1
2,8 % dioxan trong <i>n</i> -hexan	1
Dioxin/isooctan (3:97)	1
isopropanol/ <i>n</i> -heptan (0,5:99,5)	1

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 3696, *Water for analytical laboratory use – Specification and test methods* [Nước sử dụng trong phòng thử nghiệm phân tích – Yêu cầu kỹ thuật và các phương pháp thử].
- [2] TCVN 2625 : 2007 (ISO 5555:2001), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*.
- [3] 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*.
- [4] 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*.
-