

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6761:2017

ISO 9936:2016

Xuất bản lần 3

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

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

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 6761:2017 thay thế TCVN 6761:2008;

TCVN 6761:2017 hoàn toàn tương đương với iso 9936:2016,

TCVN 6761:2017 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 hàm lượng tocopherol và tocotrienol bằng 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 tự do và các tocotrienol (gọi chung là các tocol) trong dầu mỡ động vật và thực vật (sau đây được gọi là các chất béo) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Đối với các sản phẩm chứa các este tocopherol hoặc tocotrienol thì cần tiến hành xà phòng hóa trước.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho sữa và sản phẩm sữa (hoặc chất béo từ sữa và sản phẩm sữa).

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

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

Hàm lượng tocol (tocol content)

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

CHÚ THÍCH: Hàm lượng tocol biểu thị bằng miligam trên kilogam theo số nguyên.

4 Nguyên tắc

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

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các loại thuốc thử tinh khiết phân tích dùng cho HPLC hoặc tương đương.

5.1 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 phối hạt lúa mì với dầu đậu tương để nhận biết các α -, β -, γ -, và δ -tocopherol.

Nếu không có sẵn các chất chuẩn tocotrienol thì có thể sử dụng dầu cọ để nhận biết α - và γ -tocotrienol. Sắc ký đồ thu được có thể sử dụng để giúp cho việc nhận biết pic trong sắc ký 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 -, δ -tocopherol và tocotrienol có thể có được từ hãng Merck¹⁾; còn α -tocopherol có thể có được từ nhiều nhà cung cấp khác. Các chất chuẩn tocotrienol có bán sẵn từ hãng Sigma Aldrich²⁾. Theo báo cáo, độ tinh khiết của một số chất chuẩn tocopherol bán sẵn có thể dao động từ 85 % đến 100 %. Do đó, điều quan trọng là phải xác định nồng độ các dung dịch hiệu chuẩn đó bằng cách đo quang phổ UV (xem 9.1.1).

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

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

5.4 Pha động của HPLC

Có thể sử dụng bất kỳ hỗn hợp dung môi thích hợp nào đã được chứng minh có độ phân giải pic của sắc ký đồ tốt như trong Bảng 2 (thời gian lưu tương đối của các tocopherol và tocotrienol) và trong Phụ lục A (sắc ký đồ của hỗn hợp dầu thực vật) (xem Bảng C.3).

Có thể tách γ -tocopherol và β -tocotrienol hiệu quả bằng cách sử dụng hỗn hợp 5 % thể tích *t*-butyl methyl ete + 95 % thể tích *n*-heptan và cột diol.

¹⁾ Bộ Merck Tocopherol 613424 là sản phẩm của Công ty Calbiochem (www.calbiochem.com). Mỗi lọ nhỏ chứa 50 mg DL- α -tocopherol, D- β -tocopherol, D- γ -tocopherol và D- δ -tocopherol có độ tinh khiết 95 % phân tích bằng sắc ký hiệu năng cao (HPLC) (đối với mỗi phần). Bộ Merck tocotrienol 613432 của Calbiochem cũng bán sẵn. Mỗi bộ chứa một lọ nhỏ 50 mg α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol và δ -tocotrienol có độ tinh khiết 95 % phân tích bằng sắc ký hiệu năng cao HPLC (đối với γ -tocotrienol độ tinh khiết là 75 %). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

²⁾ Tocotrienol là sản phẩm của hãng Sigma Aldrich (www.sigmaaldrich.com) và từ Chromadex (www.chromadex.com) với độ tinh khiết từ 65 % đến 98 %. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Chuẩn bị pha động thích hợp, dung dịch tetrahydrofuran 3,85 % (thể tích) trong *n*-heptan như sau: Dùng ống đong chia vạch 1 000 ml (6.5) lấy 1 000 ml *n*-heptan (5.3) cho vào chai 2 l. Dùng pipet định mức 20 ml (6.6) bổ sung hai lần mỗi lần 20 ml tetrahydrofuran (5.2). Đồng hoá pha động sử dụng bể siêu âm (6.8) trong 15 min.

5.5 Metanol.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

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

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

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

- kích thước 250 mm × 4 mm, được nhồi vi hạt diol có cỡ hạt trung bình khoảng 5 µm, hoặc
- kích thước 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 có bán sẵn là: LiChrospher 100 Diol cỡ hạt 5 µm; Cột silica có bán sẵn: LiChrosob SI 60 và Kromasil 100³⁾ cỡ hạt 5 µm. Khi dự kiến có β-tocotrienol trong mẫu thì sử dụng cột silica diol thích hợp hơn vì γ-tocopherol và β-tocotrienol sẽ đồng nửa giải khi dùng cột silica.

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

CHÚ THÍCH 3: Cả hai loại cột đã được sử dụng đánh giá dữ liệu về độ chụm (Phụ lục C).

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

6.4 Bộ cô quay.

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

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

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

³⁾ Các loại cột này là các ví dụ về các sản phẩm thích hợp có 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.

6.8 Bể siêu âm.

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).

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 (ISO 661), không lọc mẫu.

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

Nên tiến hành chuẩn bị mẫu thử dưới ánh sáng mờ và trong mọi trường hợp cũng không được thực hiện trực tiếp dưới ánh nắng mặt trời.

9 Cách tiến hành

CẢNH BÁO – Nhìn chung, sự oxy hóa các tocol trong quá trình phân tích có thể dẫn đến kết quả thu được thấp. Tốc độ oxy hoá tăng nhanh khi có mặt kiềm, hoặc do ảnh hưởng của nhiệt hoặc ánh sáng và 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 (6.7) và pha loãng bằng *n*-heptan (5.3) đến vạch.

Dùng pipet (6.6) lấy 5 ml dung dịch này cho vào bình thủy tinh màu hổ phách đáy tròn và loại bỏ hết *n*-heptan trên bộ cô quay (6.4) trong chân không ở nhiệt độ không lớn hơn 40 °C. Khô phục lại áp suất không khí bằng nitơ và lấy ngay bình thủy tinh ra khỏi bộ cô quay sau khi đã loại bỏ hết dung môi. Dùng pipet (6.6) lấy 10 ml metanol (5.5) cho vào bình định mức và khuấy để hòa tan hết cặn. Dùng máy đo quang phổ UV (6.3) với cuvet có chiều dài đường quang 10 mm để đo độ hấp thụ tối đa của dung dịch này ở bước sóng trong khoảng 270 nm đến 310 nm (xem bước sóng thích hợp trong Bảng 1). Độ hấp thụ đo được cần nằm trong khoảng 0,2 đến 0,8. Tính nồng độ (microgam trên mililit) 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	0,007 6
296	β -tocopherol	0,008 9
298	γ -tocopherol	0,009 1
298	δ -tocopherol	0,008 7

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

9.1.2 Dung dịch chuẩn

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

Ví dụ về việc chuẩn bị dung dịch làm việc như sau: Trộn các thể tích thích hợp, ví dụ 1 ml của các dung dịch hiệu chuẩn gốc (xem 9.1.1) để thu được dung dịch chuẩn tocol hỗn hợp và pha loãng bằng *n*-heptan để có dung dịch chứa khoảng 1 $\mu\text{g/ml}$ đến 5 $\mu\text{g/ml}$ của từng loại chất chuẩn.

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

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

Các dung dịch chuẩn gốc được bảo quản lạnh trong bình thủy tinh màu hổ phách thích hợp, có thể bền đến một tuần. Các bình định mức có thể được bọc trong lá nhôm.

CHÚ THÍCH: Nếu sử dụng detector UV thì 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) mới sử dụng hoặc chưa biết lịch sử hoặc vì lý do bất kỳ khác cần phải ổn định thì rửa và bảo ôn cột bằng metanol trong khoảng 10 min, sau đó rửa bằng diclorometan, tiếp theo bằng *n*-heptan ở tốc độ dòng khoảng 1 ml/min.

Bơm pha động HPLC (5.4) qua cột ở tốc độ dòng 1 ml/min trong thời gian ít nhất 30 min.

CẢNH BÁO – Metanol và diclorometan gây độc cho người và môi trường. Cần cẩn thận khi sử dụng chúng.

9.2.2 Bơm 10 µl hoặc 20 µl (theo độ nhạy của detector) dung dịch chuẩn (xem 9.1.2) vào cột và nếu cần, điều chỉnh tetrahydrofuran của pha động và tốc độ dòng để đạt được các điều kiện sau:

- a) thời gian lưu của α-tocopherol từ 8 min đến 12 min;
- b) hệ số phân giải RF đối với việc tách β- và γ-tocopherol không được nhỏ hơn 1,0; nghĩa là hầu hết các pic tách đến đường nền, trong đó RF được tính theo Công thức (1):

$$RF = \frac{d_r(I) - d_r(II)}{0,5 \times [b(I) + b(II)]} \quad (1)$$

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 cài đặt tối ưu cho detector và bộ tích phân. Bơm 10 µl hoặc 20 µl dung dịch chuẩn (xem 9.1.2). Bơm lặp lại và kiểm tra độ tái lập các sắc ký đồ thu được.

9.3 Chuẩn bị dung dịch thử

Tùy thuộc vào nồng độ của tocol (xem 9.1.2), cân khoảng 0,25 g ± 0,1 g mẫu thử (xem 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 qua màng lọc nylon 0,45 µm của HPLC nếu dung dịch chưa trong.

Điều quan trọng là các dung dịch thử được bảo vệ tránh 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 Xác định

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

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

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

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

Thời gian lưu tương đối thu được như trong Bảng 2 là thời gian điển hình.

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

Cột silica (α -tocopherol làm chất chuẩn)		Cột diol (α -tocopherol làm chất 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 (2):

$$w = \frac{\rho \times \bar{A}_t \times V}{A_s \times m} \quad (2)$$

Trong đó:

ρ là nồng độ của α -tocopherol trong dung dịch chuẩn (9.1.2), tính bằng microgam trên millilit ($\mu\text{g/ml}$);

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

\bar{A}_t 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 (g);

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

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

Nếu chỉ có sẵn chất chuẩn α -tocopherol thì liên kết tất cả các tocopherol với chất chuẩn này, nhưng phải nêu rõ trong báo cáo kết quả. Nếu sử dụng detector UV thì liên kết tất cả các tocopherol với

TCVN 6761:2017

α -tocopherol chuẩn, nhưng cần chuẩn hoá các diện tích pic theo α -tocopherol, sử dụng các hệ số chia nêu trong 9.1.1.

CHÚ THÍCH: Cường độ huỳnh quang của các tocotrienol cũng giống với cường độ huỳnh quang của các 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 của 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 liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và 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 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 một thiết bị, trong một thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giá trị r nêu 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 được 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 riêng rẽ	0 đến 2 220	0,082 5 T_1	0,209 4 T_1
T_2 = giá trị trung bình của hàm lượng tocotrienol riêng rẽ	10 đến 210	0,090 0 T_2	0,255 2 T_2
T_3 = giá trị trung bình của hàm lượng tổng (tocopherol + tocotrienol)	200 đến 3 250	0,071 8 T_3	0,255 7 T_3

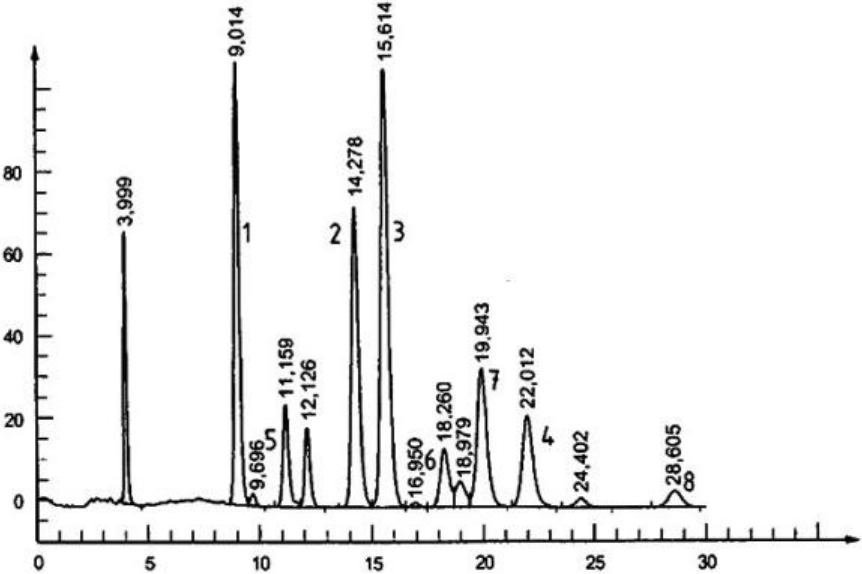
12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

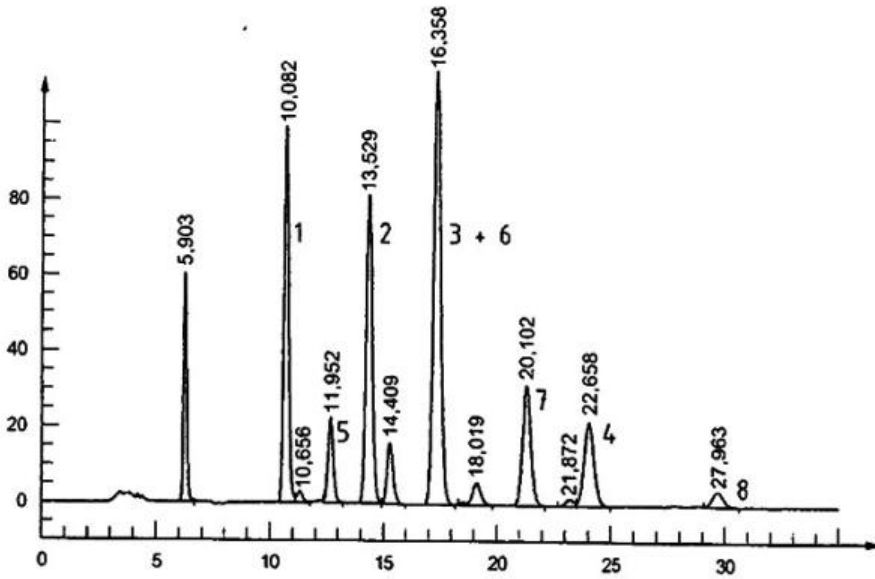
- a) tất cả các thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu được sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử thu được;
- f) nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Ví dụ về sắc ký đồ



a) Cột diol



b) Cột silica

Nhận biết 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 phân tích

Pha động: 3,85 % (phần thể tích) THF trong *n*-heptan

Tốc độ dòng: 1 ml/min

Detector: huỳnh quang

CHÚ THÍCH: Sắc ký đồ trên thể hiện với trục x biểu thị thời gian, tính bằng phút và trục y biểu thị cường độ tín hiệu.

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 đã chế biến có bổ sung các este tocopherol hoặc este tocotrienol, thì trước khi chạy sắc ký nên tiến hành qui trình xà phòng hóa nguội. Nên 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, tuyệt đối, $w \geq 99,7 \text{ g}/100 \text{ g}$.

B.2.3 Pyrogallol.

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

B.2.5 Dietyl ete, không chứa peroxit, có 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 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 hóa, nếu không độ 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 kỹ 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 xoay bình để hòa tan.

Thổi sạch bình định mức bằng nitơ, thêm 4 ml dung dịch kali hydroxit (B.2.4), thổi sạch lại bằng nitơ và đậy bình bằng nắp thủy tinh. Đặt bình vào nồi cách thủy ở 26 °C và lắc mạnh trong 10min hoặc cho đến khi xà phòng hóa hoàn toàn. Thực hiện tất cả các thao tác này tránh ánh sáng mặt trời chiếu trực tiếp, sử dụng bình thủy tinh màu hổ phách hoặc được bọc trong lá nhôm.

Thêm 50 ml nước (B.2.8) vào bình 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 nước rửa vào phễu. Lắc mạnh phễu chiết trong 1 min, thỉnh thoảng nói lỏng nút để giảm áp suất. Để yên cho tách lớp và tháo bỏ lớp nước phía dưới. Chiết tiếp lớp chất lỏng thêm bốn lần, mỗi lần bằng 30 ml dietyl ete và gộp các dịch chiết ete.

Rửa dịch chiết dietyl ete đã gộp bằng 50 ml nước (lắc kỹ để tránh tạo 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 tách pha và thu lấy dịch lọc vào bình bay hơi dạng quay, màu hổ phách, đáy tròn. Loại bỏ ete dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không vượt quá 40 °C. Nếu chất lỏng còn sót lại trong bình thì thêm etanol (B.2.2) và cho bay hơi đến khô.

Rửa phía trong thành bình 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 đã chuẩn bị (theo mô tả trong 9.3) và tiếp tục tiến hành theo 9.4.

Phụ lục C
(Tham khảo)

Kết quả thử liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp này đã được thiết lập bởi phép thử 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(ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Trong thử nghiệm này có 12 phòng thử nghiệm của bốn nước (1 của Hungari, 1 của Canada, 4 của Pháp, 6 của Đức) tham gia và nghiên cứu trên tám loại mẫu chất béo khác nhau đã được kiểm tra (xem Bảng C.1). Các kết quả thống kê được nêu trong Bảng C.2.

Các loại HPLC pha động khác nhau được các thành viên sử dụng trong phép thử này liệt kê trong Bảng C.3. Trong khi sáu phòng tham gia sử dụng cột silica gel, sáu phòng sử dụng cột diol. Do vậy, các kết quả thống kê nêu trong Bảng C.2 là có giá trị đối với cả hai loại cột.

Bảng C.1 – Mô tả mẫu

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

Bảng C.2 – Kết quả thống kê

α -Tocopherol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	12	12	12	12	12	12	12	12
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	12	12	12	12	11	11
Số lượng 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 lượng phòng thử nghiệm tham gia	12	12	12	12	12	12	7	9
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	12	12	12	12	7	9
Số lượng 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

Bảng C.2 (tiếp theo)

γ -Tocopherol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	10	12	12	12		8		12
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	6	11	7	9		8		12
Số lượng 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		30,2
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 lượng phòng thử nghiệm tham gia		12	12	12				
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ		10	12	12				
Số lượng 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				

Bảng C.2 (tiếp theo)

α -Tocotrienol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	9	9	8	7	9	9	9	
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	7	7	7	7	8	8	8	
Số lượng 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 lượng phòng thử nghiệm tham gia	7	7	7	7	9	9	8	
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	6	7	6	6	8	9	7	
Số lượng 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	

Bảng C.2 (tiếp theo)

γ -Tocotrienol	A	B	C	D	E	F	G	H
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia			8		9	9	9	
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ			7		6	6	6	
Số lượng 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 lượng phòng thử nghiệm tham gia					10	9	8	
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ					9	8	9	
Số lượng 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	

Bảng C.2 (kết thúc)

Tổng hàm lượng	A	B	C	D	E	F	G	H
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	12	12	12	12	12	12	12	12
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	9	9	9	8	8	8	6	11
Số lượng 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 giới hạn tái lập được biểu thị bằng mg/kg.								

Bảng C.3 – Ví dụ về pha động của HPLC được 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 % (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/ <i>iso</i> -octan (3:97)	1
isopropanol/ <i>n</i> -heptan (0,5:99,5)	1

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4851 (ISO 3696) *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*
 - [2] TCVN 2625 (ISO 5555), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu.*
 - [3] 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.*
 - [4] 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.*
-