

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10115:2013

ISO 13884:2003

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –
XÁC ĐỊNH CÁC ĐỒNG PHÂN *TRANS*
ĐÃ TÁCH BẰNG ĐO PHỔ HỒNG NGOẠI**

Animal and vegetable fats and oils -

Determination of isolated trans isomers by infrared spectrometry

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 10115:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 13884:2003;

TCVN 10115:2013 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 đồng phân *trans* đã tách bằng đo phổ hồng ngoại

Animal and vegetable fats and oils –

Determination of isolated trans isomers by infrared spectrometry

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định chính xác các liên kết *trans* đã tách có trong các axit béo mạch dài tự nhiên hoặc đã chế biến, các este của axit béo và các triglycerid có mức đồng phân *trans* $\geq 5\%$.

Phương pháp này không thể áp dụng được hoặc chỉ áp dụng được với các trường hợp cụ thể cho:

- dầu và mỡ có chứa hợp chất không no với các mức cao (quá 5%) (ví dụ: dầu tung),
- các nguyên liệu chứa các nhóm chức có sự thay đổi lượng các biến dạng liên kết C-H về nối đôi *trans* [ví dụ dầu hạt thầu dầu chứa axit ricinoleic hoặc đồng phân hình học của nó là axit ricinelaidic (axit 12-hydroxy-9-octadecenoic)],
- các triglycerid hỗn hợp có nửa mạch ngắn và nửa mạch dài (như diacetostearin) hoặc nói chung là,
- nguyên liệu bất kỳ chứa các thành phần có các nhóm chức làm tăng dải hấp thụ đặc thù ngay tại hoặc gần gây nhiễu với dải bước sóng 966 cm^{-1} của biến dạng liên kết C-H của nối đôi *trans* đã tách.

CHÚ THÍCH: Các dien như dien *cis-trans* và dien *trans-trans* có thể làm ảnh hưởng việc hiệu chuẩn.

Để xác định chính xác trên các nguyên liệu có mức *trans* nhỏ hơn 5% thì nên dùng phương pháp sắc ký khí lỏng (GLC) mao quản đã chuẩn hóa [ví dụ xem TCVN 9673 (ISO 15304)].

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 10115:2013

TCVN 6128 (ISO 661), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị mẫu thử.*

ISO 5509¹⁾, *Animal and vegetable fats and oils - Preparation of methyl esters of fatty acids*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Phần trăm axit béo dạng *trans* (percentage of *trans* fatty acids)

% *trans* (% *trans*)

Lượng chất biểu thị theo đương lượng khối lượng của metyl elaidat, có trong mẫu chia cho khối lượng mẫu, tính bằng gam trên 10 ml dung môi.

4 Nguyên tắc

Trong hầu hết các loại dầu mỡ thực vật tự nhiên các thành phần chưa bão hòa chỉ chứa các liên kết đôi tách biệt (nghĩa là không liên hợp) theo cấu hình *cis*. Các liên kết *cis* này có thể chuyển thành cấu hình *trans* trong quá trình trích ly và chế biến, do sự oxi hóa, chuyển hóa khi gia nhiệt và/hoặc hydro hóa từng phần. Dầu mỡ động vật và sinh vật biển có thể chứa một lượng có thể đo được các đồng phân *trans* xuất hiện tự nhiên. Các liên kết *trans* tách biệt trong các axit béo mạch dài, este của axit béo và các triglycerid có thể đo được bằng phổ hồng ngoại (IR). Dải phổ hấp thụ cực đại ở bước sóng 966 cm^{-1} ($10,3\text{ }\mu\text{m}$) xuất phát từ sự biến dạng liên kết C-H về liên kết đôi dạng *trans*, thể hiện trong sắc phổ của tất cả các hợp chất chứa nhóm *trans*. Dải phổ này không quan sát được trong sắc ký đồ của các hợp chất *cis* tương ứng và các hợp chất bão hòa. Phép đo cường độ của dải hấp thụ này trong các điều kiện phân tích được kiểm soát là cơ sở của phép định lượng đồng phân *trans*. Để có độ chính xác cao hơn, thì các chất gây nhiễu thông thường liên quan đến bộ khung glycerol của triglycerid và nhóm cacboxyl của các axit béo phải được loại bỏ bằng cách chuyển hóa thành các metyl este của chúng trước khi phân tích.

5 Thuốc thử

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

5.1 Cacbon disulfit (CS_2), khô.

CẢNH BÁO – Việc hít phải hơi cacbon disulfit trong thời gian dài sẽ rất nguy hiểm. Dung môi này phải được xử lý trong các điều kiện thông khí thích hợp, tốt nhất là trong tủ hút.

¹⁾ ISO 5509:2000 đã được thay thế bằng ISO 12966-2:2011, tiêu chuẩn này đã được biên soạn thành TCVN 9675-2:2013 (ISO 12966-2:2011) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Phương pháp sắc kí khí các metyl este của axit béo – Phần 2: Chuẩn bị metyl este của axit béo.*

5.2 Chất chuẩn đầu: methyl elaidat và methyl oleat, có độ tinh khiết 99 %¹⁾.

6 Thiết bị, dụng cụ

6.1 Máy đo phổ hồng ngoại (FT-IR hoặc độ phân tán), có thể thực hiện đo ở độ phân giải ở 4 cm^{-1} trong dải phổ $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ đến 900 cm^{-1} .

Khả năng xử lý dữ liệu của thiết bị cần cho phép chuyển sắc phổ sang độ hấp thụ, thang đo mở rộng của trục x và trục y và hiển thị số bước sóng chính xác đến 1 cm^{-1} , độ hấp thụ chính xác đến 0,001 AU. Máy đo phổ FT-IR sử dụng detector TGS hoặc DTGS hoặc đảm bảo độ tuyến tính.

6.2 Cuvet lấy mẫu chất lỏng hồng ngoại, có cửa NaCl hoặc KBr và chiều dài đường quang cố định 1 mm.

Để sử dụng các thiết bị loại null thì cần đến các cặp cuvet phù hợp trong khoảng 0,01 AU. Nếu sử dụng các thiết bị kiểu tách chùm tia với hai cuvet đổ đầy dung môi (5.1) thì phải cân bằng điện tử của hai chùm tia trong các giới hạn này.

6.3 Bình định mức, loại A, dung tích 10 ml, 25 ml và 50 ml.

6.4 Pipet, loại A, dung tích 1 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 7 ml và 9 ml.

6.5 Pipet Pasteur dùng một lần, để cho mẫu thử vào cuvet hồng ngoại.

6.6 Cân phân tích, có thể cân được 60 g, 0,2 g, chính xác đến $\pm 0,000\ 1\text{ g}$.

7 Lấy mẫu

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

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 hoặc vận chuyển.

8 Chuẩn bị mẫu thử

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

Khi mẫu phòng thử nghiệm là chất béo dạng rắn thì phải làm tan chảy hoàn toàn trong nồi hơi ở nhiệt độ không lớn hơn điểm tan chảy của mẫu $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mẫu phòng thử nghiệm đã tan chảy phải được trộn

¹⁾ Sản phẩm có bán sẵn từ Nu-Check-Prep, Inc., Elysian, MN, Mỹ; Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm đó. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 10115:2013

đều trước khi lấy phần mẫu thử. Nếu mẫu bị đục do có lẫn nước thì phải được xử lý bằng natri sulfat khan và lọc trước khi lấy phần mẫu thử.

9 Cách tiến hành

9.1 Chuẩn bị các chất chuẩn

9.1.1 Dung dịch gốc

Cân $0,5 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ metyl elaidat (5.2), chính xác đến $0,0001 \text{ g}$, cho vào bình định mức 25 ml (6.3). Pha loãng bằng dung môi (5.1), đầy nắp và trộn kỹ. Chuẩn bị dung dịch metyl oleat (5.2) thứ hai, chính xác theo cách trên. Các dung dịch gốc này có nồng độ $0,020 \text{ g/ml}$. Chuẩn bị dung dịch gốc metyl elaidat $0,002 \text{ g/ml}$ bằng cách dùng pipet lấy $5,00 \text{ ml}$ dung dịch gốc metyl elaidat $0,020 \text{ g/ml}$ cho vào bình định mức 50 ml (6.3). Pha loãng bằng dung môi (5.1), đầy nắp và trộn kỹ.

9.1.2 Dung dịch chuẩn *trans* 1 %, 4 % và 7 %

Cân một lượng metyl oleat (5.2) theo qui định trong Bảng 1 dao động trong khoảng $\pm 0,005 \text{ g}$, chính xác đến $0,0001 \text{ g}$, cho vào bình định mức 10 ml (6.3). Dùng pipet (6.4) lấy một lượng dung dịch gốc metyl elaidat $0,002 \text{ g/ml}$ (9.1.1) qui định, tương ứng cho vào từng bình định mức 10 ml . Pha loãng bằng dung môi (5.1), đầy nắp và trộn kỹ.

Bảng 1 – Các tỷ lệ của dung dịch chuẩn *trans* 1 %, 4 % và 7 %

Hàm lượng danh nghĩa của đồng phân- <i>trans</i> %	Dung dịch metyl elaidat ml	Metyl oleat g
1	1,00	0,198
4	4,00	0,192
7	7,00	0,186

9.1.3 Dung dịch chuẩn *trans* 10 %, 30 %, 50 % và 70 %

Dùng pipet lấy một lượng dung dịch metyl elaidat $0,020 \text{ g/ml}$ và dung dịch gốc metyl oleat (9.1.1) qui định trong Bảng 2 cho vào bình định mức 10 ml (6.3). Cần chắc chắn rằng các lượng đã lấy cho vào bình định mức chính xác đến vạch 10 ml .

Bảng 2 – Tỷ lệ của các dung dịch chuẩn *trans* 10%, 30 %, 50 % và 70 %

Hàm lượng danh nghĩa của đồng phân- <i>trans</i> %	Dung dịch methyl elaidat ml	Dung dịch methyl oleat g
10	1,00	9,00
30	3,00	7,00
50	5,00	5,00
70	7,00	3,00

9.2 Hiệu chuẩn

9.2.1 Yêu cầu chung

Đối với từng dung dịch chuẩn (9.1.2 và 9.1.3), tính khối lượng chính xác của methyl elaidat đã pha loãng trong 10 ml dung môi.

Phân tích từng dung dịch chuẩn (9.1.2 và 9.1.3) và xác định độ hấp thụ hồng ngoại đường nền-hiệu chuẩn ở bước sóng 966 cm^{-1} như trong 9.2.2 và 9.2.3.

9.2.2 Đối với hàm lượng *trans* $\leq 10\%$.

Dùng phép phân tích hồi qui bậc một, xác định độ dốc và giao điểm của đường phù hợp nhất của độ hấp thụ đã hiệu chuẩn nền ở 966 cm^{-1} đối với các dung dịch chuẩn *trans* 1 %, 4 %, 7 % và 10 % (trục y) theo hàm của số gam methyl elaidat trên 10 ml dung dịch (trục x).

9.2.3 Đối với hàm lượng *trans* $> 10\%$

Lặp lại bước hiệu chuẩn 9.2.2 đối với các dung dịch chuẩn *trans* 7 %, 10 %, 30 %, 50 % và 70 %.

9.3 Chuẩn bị methyl este

9.3.1 Chuyển hóa 0,5 g đến 1,0 g phần mẫu thử (Điều 8) thành methyl este dùng phương pháp nêu trong ISO 5509, hoặc bất kỳ phương pháp đã được chấp nhận khác, phương pháp đã chuẩn hóa thích hợp cho loại mẫu (ví dụ: Tài liệu tham khảo [4], [5] hoặc [6]).

9.3.2 Cân $0,20\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ methyl este đã chuẩn bị (9.3.1), chính xác đến 0,000 1 g cho vào bình định mức 10 ml (6.3). Hòa tan bằng dung môi (5.1) đến vạch, đậy nắp và trộn kỹ.

Đối với dầu mỡ chứa các axit béo mạch ngắn thì cần cẩn thận khi chuẩn bị và cô đặc methyl este để giảm thiểu hao hụt của các phần dễ bay hơi.

9.4 Xác định

9.4.1 Yêu cầu chung

Cài đặt thông số vận hành của máy đo phổ hồng ngoại (6.1) theo hướng dẫn của nhà sản xuất để thu được độ phân dải phổ hồng ngoại ở 4 cm^{-1} bao trùm dải phổ $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ đến 900 cm^{-1} . Các điều kiện áp dụng phải giống nhau cho cả chất chuẩn và mẫu thử.

Khi dữ liệu hiệu chuẩn đã được thiết lập thì cần được kiểm tra trước để đảm bảo tính hiệu lực. Để có độ chính xác và độ chụm của phép xác định cao nhất, chất chuẩn đầu hoặc chuẩn thứ cấp phải được metyl hóa và được phân tích với từng nhóm mẫu, sau đó kiểm tra để chắc chắn rằng mức *trans* đo được phù hợp với giá trị trung bình đã biết hoặc đã thiết lập.

Kiểm tra máy đo phổ hồng ngoại để chắc chắn rằng chúng đang được vận hành theo qui định của nhà sản xuất. Kiểm tra tín hiệu-nhiều nền cũng như độ chính xác của phép đo phổ hồng ngoại và độ chính xác của bước sóng.

9.4.2 Thiết bị một chùm tia

Đổ đầy dung môi (5.1) vào cuvet lỏng hồng ngoại sạch (6.2). Loại hết bọt khí, đậy nắp và đặt vào bộ giữ cuvet của máy đo quang phổ. Ghi lại phổ một chùm tia được dùng làm chuẩn (nền). Đổ đầy lại cuvet đã sạch bằng dung dịch thu được trong 9.3.2 và ghi lại phổ mẫu. Tính tỷ lệ phổ của mẫu so với nền và chuyển đổi thành đơn vị hấp thụ.

9.4.3 Thiết bị hai chùm tia hoặc tách chùm tia

Đổ đầy dung môi (5.1) vào cuvet lỏng hồng ngoại sạch (6.2). Loại hết bọt khí, đậy nắp và đặt vào bộ giữ cuvet chùm tia chuẩn. Đổ dung dịch thu được trong 9.3.2 vào cuvet lỏng hồng ngoại (6.2) thứ hai phù hợp. Loại hết bọt khí, đậy nắp và đặt vào bộ giữ cuvet chùm tia của mẫu. Ghi lại phổ và chuyển đổi thành đơn vị hấp thụ.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Với phổ của mẫu thang đo mở rộng trong vùng từ $1\ 050\text{ cm}^{-1}$ đến 900 cm^{-1} , dựng đường nền (XY) tiếp tuyến với "chân" dải hấp thụ hồng ngoại ở bước sóng 966 cm^{-1} như minh họa trong Hình 1. Các điểm trên phổ giữa các đường XY đã dựng sẽ thay đổi theo pic hấp thụ. Để có kết quả chính xác, đường nền phải được dựng cho cả dung dịch chuẩn và mẫu. Đối với mẫu có hàm lượng *trans* cao thì đường nền phải được dựng vào vị trí tối thiểu ở 985 cm^{-1} . Thông thường, mức tối thiểu này có thể bị mất và điểm trên đường nền được dựng chỉ là ước tính.

10.2 Xác định độ hấp thụ hiệu chỉnh nền (A_c) bằng cách lấy độ hấp thụ của pic ở 966 cm^{-1} (A_p) trừ độ hấp thụ của đường nền ở pic tối đa (A_B). Vị trí đo được của pic cực đại sẽ thay đổi theo thiết bị và hàm

lượng *trans* của mẫu phân tích. Vị trí của pic cực đại cần phải được thiết lập, cụ thể cho từng thiết bị với chất chuẩn *trans* 70 %. Vị trí này sau đó được dùng cho tất cả các nồng độ.

10.3 Từ Hình 1

$$A_c = (A_P - A_B)$$

Dùng dữ liệu hiệu chuẩn cho dải *trans* thích hợp ($\leq 10\%$ hoặc $> 10\%$), tính đương lượng khối của methyl elaidat, m_{equiv} , trong mẫu (9.3.2), tính bằng gam, theo Công thức sau:

$$M_{equiv} = \frac{A_c - a}{b}$$

$$\omega_{trans} = \frac{m_{equiv}}{m_t} \times 100\%$$

Trong đó:

A_c là độ hấp thụ đường nền-hiệu chuẩn của dải phổ;

a là giao điểm;

b là độ dốc;

ω_{trans} là % *trans* tính theo methyl elaidat;

m_t là khối lượng mẫu trên 100 g dung môi.

10.4 Báo cáo kết quả chính xác đến 0,1 %.

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 nêu trong Phụ lục A. 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 nghiệm độc lập, đơn lẻ 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 giới hạn lặp lại r nêu trong Phụ lục A.

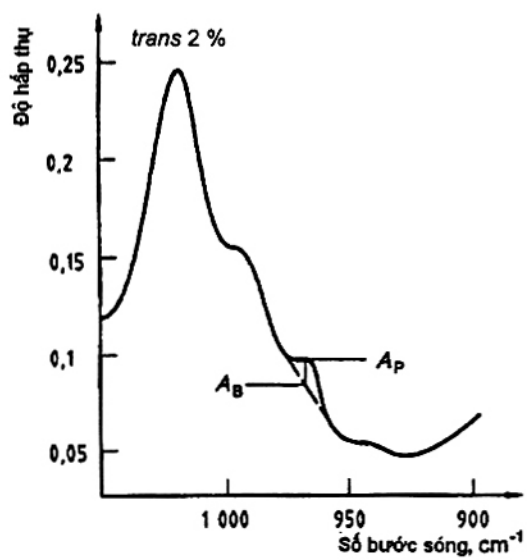
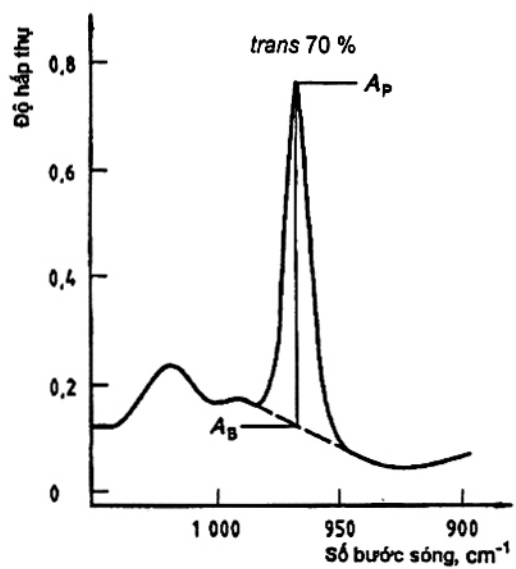
11.3 Độ tái lập

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 giống thử giống hết 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 giới hạn tái lập R nêu trong Phụ lục A.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

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



Hình 1 – Phổ hồng ngoại của metyl este chứa đồng phân *trans* 70 % và *trans* 2 %

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Phép thử liên phòng thử nghiệm do Ủy ban phân tích sắc ký AOCS tổ chức năm 1995, có 16 phòng thử nghiệm tham gia, mỗi phòng thu được hai kết quả thử cho từng mẫu được phân tích bằng IR, cho kết quả phân tích thống kê phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) nêu trong Bảng 1.

Bảng A.1 – Kết quả phân tích thống kê

	Mẫu ^a						
	Me-1	Tg-1	Tg-2	Tg-3	Tg-4	Tg-5	Tg-6
Số phòng thử nghiệm tham gia	16	16	16	16	16	16	16
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	15	16	16	15	16	16	14
Số kết quả thử đơn lẻ của tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu	30	32	32	30	32	32	27
Giá trị trung bình, % <i>trans</i>	20,23	6,09	1,33	16,14	16,02	30,91	47,25
Giá trị đã biết, % <i>trans</i>	21,15	6,14					
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r)	0,49	0,22	0,18	0,20	0,38	0,46	0,81
Hệ số biến thiên lặp lại, %	2,40	3,65	13,86	1,21	2,38	1,49	1,71
Giới hạn lặp lại (r)	1,37	0,62	0,50	0,56	1,09	1,29	2,27
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R)	1,30	0,60	0,44	1,19	1,07	1,86	1,22
Hệ số biến thiên tái lập, %	6,42	9,82	32,78	7,38	6,69	6,03	2,59
Giới hạn tái lập (R)	3,64	1,68	1,23	3,33	3,00	5,21	3,42
^a Me-1 = methyl elaidat/methyl stearat có 21,15 % <i>trans</i> ; Tg-1 = trielaidin có 6,14 % <i>trans</i> trong dầu lạc zero- <i>trans</i> ; Tg-2 = dầu canola (dầu hạt cải dầu); Tg-3 = shortening; Tg-4 = shortening; Tg-5 = margarin; Tg-6 = dầu rán.							
CHÚ THÍCH: Tg-3 và Tg-4 là cặp mẫu mù.							

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 2625:2007 (ISO 5555:2001) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
 - [2] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*
 - [3] TCVN 9673:2013 (ISO 15304:2002) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Xác định hàm lượng các đồng phân axit béo dạng trans của dầu mỡ thực vật – Phương pháp sắc kí khí*
 - [4] AOCS Official Method Ce 2-66, *Preparation of Methyl Esters of Long-chain Fatty Acids*
 - [5] AOAC Official Method 969.33, *Fatty Acids in Oils and Fats - Preparation of Methyl Esters - Boron Trifluoride Method*
 - [6] IUPAC 2.302, *Preparation of the fatty acid methyl esters.*
-