

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9969:2013

ISO 15885:2002

Xuất bản lần 1

**CHẤT BÉO SỮA – XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN  
CỦA AXIT BÉO BẰNG SẮC KÝ KHÍ LỎNG**

*Milk fat – Determination of the fatty acid composition  
by gas-liquid chromatography*

HÀ NỘI – 2013

## Lời nói đầu

TCVN 9969:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 15885:2002;

TCVN 9969:2013 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 – Xác định thành phần của axit béo bằng sắc ký khí lỏng

*Milk fat – Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định thành phần của axit béo trong chất béo sữa (milk fat) và chất béo thu được từ các sản phẩm sữa.

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

TCVN 9968 (ISO 15884), *Chất béo sữa – Chuẩn bị methyl este của axit béo.*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

**Thành phần của axit béo trong chất béo sữa (fatty acid composition of milk fat)**

Phần khối lượng của các axit béo riêng rẽ xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Thành phần của axit béo trong chất béo sữa (số gam của các axit tự do đơn lẻ) trên 100 g axit béo tổng số (axit tự do) được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

#### 4 Nguyên tắc

Các methyl este của axit béo (FAME) trong chất béo sữa được chuẩn bị bằng sự chuyển hóa các este. Các methyl este này được tách ra và xác định bằng sắc ký khí lỏng mao quản. Từng FAME được định lượng bằng cách đối chiếu với thành phần của chất béo sữa đã biết.

#### 5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

**5.1 Methyl este của axit béo (FAME) đối chứng dùng cho mục đích nhận biết**, có độ tinh khiết cao (> 90 %), ngoài các methyl este của các axit oleic, linoleic và linolenic bao gồm ít nhất các FAME với các nguyên tử cacbon từ C4 đến C22 mạch thẳng số chẵn, đã bão hòa.

CHÚ THÍCH: Một tập hợp của các FAME đối chứng có thể thu được từ hỗn hợp có bán sẵn hoặc hỗn hợp được phòng thử nghiệm chuẩn bị từ các chất riêng rẽ.

**5.2 Chất béo sữa đối chứng**, dùng cho mục đích định lượng.

Sử dụng chất béo sữa đã biết thành phần axit béo (ví dụ: Mẫu chuẩn CRM 164<sup>1)</sup>).

**5.3 Dung môi của chất béo**: *n*-alkan (ví dụ: *n*-pentan, *n*-hexan hoặc *n*-heptan), không chứa các chất xuất hiện trong vùng quan tâm của sắc đồ.

**5.4 Khí mang**, hydro, heli hoặc nitơ, có độ tinh khiết tối thiểu 99,999 % với hàm lượng oxi dưới  $2 \times 10^{-6}$ .

**5.5 Các loại khí khác**, không chứa các tạp chất hữu cơ (hàm lượng C<sub>n</sub>H<sub>m</sub> dưới  $1 \times 10^{-6}$ )

Sử dụng khí nitơ và khí hydro có độ tinh khiết nhỏ nhất là 99,995 % và không khí nhân tạo.

#### 6 Thiết bị, dụng cụ

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

**6.1 Máy sắc ký khí lỏng**, gồm có các bộ phận sau:

##### 6.1.1 Bộ bơm mẫu

Duy trì các bộ bơm mẫu kiểu bơm phun (bơm chia dòng hoặc bơm được cài đặt chương trình nhiệt độ, PTV) ở nhiệt độ ít nhất 220 °C (trường hợp sử dụng PTV thì nhiệt độ cuối cùng của bộ bơm phải ít

<sup>1)</sup> Mẫu chuẩn có bán sẵn từ Bureau chuẩn, Hiệp hội Châu Âu, Brussel, Bỉ. Thông tin đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

nhất là 220 °C). Trường hợp sử dụng bộ bơm trên cột lạnh, thì duy trì bộ bơm ở nhiệt độ thấp hơn điểm sôi của dung môi vài độ.

**6.1.2 Lò cột, có khả năng chạy chương trình từ nhiệt độ gần với nhiệt độ môi trường đến 260 °C.**

**6.1.3 Cột, mao quản silica hoặc thủy tinh miệng rộng hoặc hẹp, có chiều dài và bề dày pha tĩnh thích hợp để có được các đặc tính thực hiện như trong Điều 7.**

CHÚ THÍCH 1: Các pha tĩnh bán sẵn trên thị trường có chứa các pha bị biến tính bởi axit nitroterephthalic hoặc không bị biến tính bởi poly(etylen glycol) hoặc các pha phân cực khác cho thấy phù hợp.

CHÚ THÍCH 2: Các pha tĩnh có thể được thay thế bằng các pha phân cực khác với điều kiện là cho độ phân giải các FAME tương tự.

**6.1.4 Detector ion hóa ngọn lửa, có thể làm việc ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ cuối cùng của lò cột (6.1.2) đến 20 °C.**

**6.1.5 Bộ phận nén khí mang, loại ngăn được khuếch tán oxy, có thể duy trì được áp lực đầu cột để cho tốc độ khí mang tuyến tính, với các bộ kiểm soát tốc độ dòng thích hợp để đạt được tốc độ dòng yêu cầu.**

Nếu sử dụng bộ bơm chia dòng kiểu bơm phun, thì kiểm soát tốc độ dòng của rãnh tách để có được tỷ lệ chia từ 1:50 đến 1:100.

CHÚ THÍCH: Các ví dụ về tốc độ dòng là: 15 cm/s đến 25 cm/s đối với nitơ, 25 cm/s đến 35 cm/s đối với khí heli và từ 35 cm/s đến 55 cm/s đối với khí hydro ở nhiệt độ ban đầu của lò.

**6.2 Xyranh bơm, loại thủ công dung tích tối đa 10 µl hoặc bơm tự động, theo khuyến cáo đối với thiết bị.**

Thông thường xyranh 10 µl được chia vạch 0,2 µl. Nếu cần chia vạch 0,1 µl thì sử dụng các xyranh 5 µl.

**6.3 Hệ thống dữ liệu, có thể xử lý thông tin yêu cầu trong các Điều 7, 10 và 11.**

## 7 Yêu cầu về hiệu năng

Chuẩn bị hỗn hợp mẫu thử của methyl butyrat, methyl stearat và methyl oleat ở nồng độ 0,1 mg/ml trong dung môi chất béo (5.3). Tách hỗn hợp này bằng sắc ký khí sử dụng các điều kiện vận hành giống như các điều kiện vận hành đối với các mẫu chất béo sữa. Pic của các chất thử nghiệm bất kỳ cần lớn hơn ba phần tư toàn thang đo của hệ thống dữ liệu (6.3). Cần thu được khả năng tách lớn nhất của methyl butyrat ra khỏi pic của dung môi và đạt được độ phân giải (độ phân giải đường nền) giữa methyl stearat và methyl oleat là 1,5.

Tính độ phân giải,  $R$ , bằng công thức sau:

$$R = 2 \times d / (W_1 + W_2)$$

Trong đó:

$d$  là khoảng cách giữa hai đỉnh pic tương ứng của methyl stearat và oleat, tính bằng milimet (mm);

$W_1$  là chiều rộng pic methyl stearat, đo được giữa các tiếp điểm của các tiếp tuyến tại các điểm uốn của đồ thị với đường nền, tính bằng milimet (mm);

$W_2$  là chiều rộng pic methyl oleat, đo được giữa các tiếp điểm của các tiếp tuyến tại các điểm uốn của đồ thị với đường nền, tính bằng milimet (mm).

## 8 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

## 9 Chuẩn bị mẫu thử và phân mẫu thử

Đối với các mẫu chất béo sữa, xem TCVN 9968 (ISO 15884). Đối với các sản phẩm khác, xem TCVN 8103 (ISO 14156).

## 10 Cách tiến hành

### 10.1 Điều kiện vận hành

Chọn các điều kiện vận hành [nghĩa là: chiều dài cột, đường kính trong, chiều dày màng pha tĩnh, nhiệt độ lò ban đầu, tốc độ gia nhiệt, nhiệt độ cuối cùng của lò, tốc độ dòng khí mang] để đáp ứng được các yêu cầu nêu trong Điều 7.

### 10.2 Bơm mẫu

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ bơm mẫu.

Khi sử dụng bộ bơm chia dòng phun, dùng microxyranh (6.2) lấy từ 0,5  $\mu$ l đến 1,5  $\mu$ l phần mẫu thử (Điều 9). Hút mẫu vào xyranh. Lắp kim bơm vào bộ bơm đã nóng, sau 3 s đến 5 s, rút nhanh kim ra khỏi bơm.

Nếu tiến hành bơm theo kỹ thuật trên cột lạnh, thì pha loãng phần mẫu thử (Điều 9) với dung môi chất béo (5.3) (ví dụ: tỷ lệ pha loãng là 1:10). Bơm phần mẫu thử đã chuẩn bị ở nhiệt độ của lò bằng hoặc thấp hơn nhiệt độ sôi của dung môi đã sử dụng vài độ.

### 10.3 Phân tích định tính

Phân tích các FAME đối chứng (5.1) trong cùng điều kiện làm việc như đối với phần mẫu thử. Ghi lại thời gian lưu của các chất đối chứng.

CHÚ THÍCH 1: Các este rửa giải theo thứ tự số nguyên tử cacbon tăng dần và theo thứ tự số các liên kết đôi tăng dần đối với cùng một số ( $n$ ) nguyên tử C (ví dụ: methyl palmitat rửa giải trước methyl stearat). Các FAME có 18 nguyên tử cacbon rửa giải theo thứ tự: methyl stearat, methyl oleat, methyl linoleat, methyl linolenat. Các FAME mạch nhánh rửa giải trước các este mạch thẳng có chứa cùng số nguyên tử cacbon theo thứ tự: các methyl este  $[(n - 2)]$  iso mạch nhánh rửa giải trước các methyl este  $[(n - 3)]$  anteiso mạch nhánh.

CHÚ THÍCH 2: Sắc ký đồ trong Hình 1 là một ví dụ về việc nhận biết thử FAME chất béo sữa.

Nhận biết các pic của mẫu thử bằng cách so sánh với dữ liệu thời gian lưu thu được của hỗn hợp chuẩn sử dụng sắc ký đồ nêu trong Hình 1.

### 10.4 Phân tích định lượng

#### 10.4.1 Yêu cầu chung

Chuyển hóa methyl chất béo sữa đối chứng (5.2) như trong Điều 9. Phân tích hỗn hợp FAME thu được trong cùng điều kiện làm việc như đối với phần mẫu thử. Kết thúc ghi sắc ký đồ sau khi rửa giải xong axit docosanoic (C22:0).

Ước tính phần trăm thành phần đại diện theo pic có trong sắc phổ, sử dụng phương pháp chuẩn hóa, giả sử rằng tất cả các thành phần của mẫu đại diện có mặt trong sắc ký đồ. Khi đó, tổng diện tích của các pic có liên quan đại diện cho 100 % các thành phần của mẫu (rửa giải 100 %).

Xác định các diện tích pic của các methyl este axit béo (nghĩa là tất cả các pic trong sắc phổ, trừ pic của dung môi, pic của các chất ổn định và các pic có mặt trong phép thử trắng).

#### 10.4.2 Tính diện tích của các pic

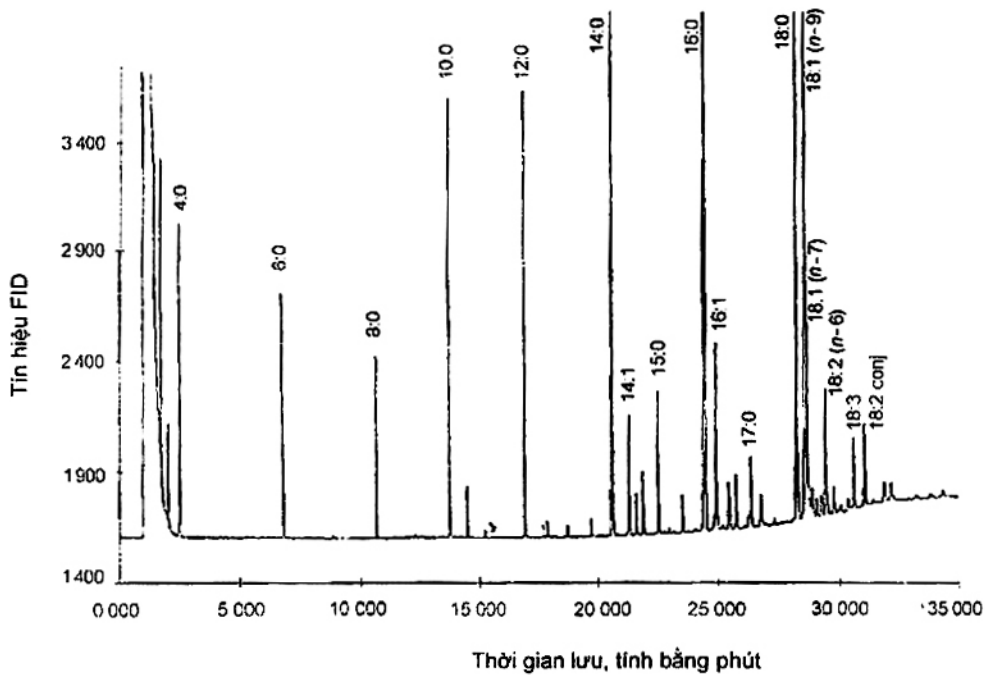
Tính phần trăm,  $P_{Ai}$ , pic thành phần  $i$  của tổng diện tích pic, theo công thức sau:

$$P_{Ai} = \frac{A_i}{\sum A_i} \times 100 \%$$

Trong đó:

$A_i$  là diện tích pic tương ứng với thành phần  $i$ ;

$\sum A_i$  là tổng diện tích của tất cả các pic tương ứng với thành phần methyl este của axit béo.



### Các điều kiện vận hành

Kích thước cột	Đường kính trong 0,32 mm, dài 30 m, chiều dày màng film 0,25 $\mu\text{m}$	Loại bơm	Thủ công
Pha tĩnh	J&W DB wax	Kiểu bơm	Chia dòng
Khí mang	Hydro	Thể tích bơm	1 $\mu\text{l}$
Áp lực đầu cột	0,4 bar	Tỷ lệ chia dòng	khoảng 1:25 xác định được ở 40 $^{\circ}\text{C}$
Nồng độ mẫu	2 mg/ml được hòa tan trong <i>n</i> -hexan	Nhiệt độ bộ bơm	280 $^{\circ}\text{C}$
		Nhiệt độ detector	250 $^{\circ}\text{C}$

Hình 1 – Tách FAME từ chất béo sữa bằng GLC

### 10.4.3 Xác định và tính hệ số hiệu chỉnh

#### 10.4.3.1 Xác định

Để xác định các hệ số hiệu chỉnh,  $f_i$ , được dùng để chuyển các phần trăm diện tích pic sang phần trăm khối lượng của các thành phần, khối lượng đã biết,  $\omega_i$ , của thành phần  $i$  của chất béo sữa đối chứng (5.2) chia cho phần trăm diện tích của pic tương ứng trong sắc ký đồ của chất béo sữa đối chứng.



### 10.4.3.2 Tính kết quả

Tính hệ số hiệu chỉnh,  $f_i$ , theo công thức sau:

$$f_i = \frac{\omega_i - \omega_i \times \sum A_i}{A_i \times \sum \omega_i \times A_i}$$

Trong đó:

$\omega_i$  là phần khối lượng của thành phần  $i$  trong chất béo sữa đối chứng (5.2), tính theo axit béo tự do;

$\sum \omega_i$  là tổng các phần khối lượng của các thành phần khác nhau có trong chất béo sữa đối chứng (5.2), tính theo axit béo tự do.

### 10.4.3.3 Chuẩn hóa hệ số hiệu chỉnh

Chuẩn hóa các hệ số hiệu chỉnh riêng rẽ theo hệ số hiệu chỉnh methyl palmitat để thu được hệ số hiệu chỉnh tương đối của thành phần  $i$ ,  $f'_i$ , theo công thức sau:

$$f'_i = \frac{f_i}{f_p}$$

Trong đó:

$f_p$  là hệ số hiệu chỉnh methyl palmitat ( $f'_i$  methyl palmitat = 1).

### 10.4.4 Xác định trên phần mẫu thử

Phân tích phần mẫu thử đã chuyển hóa methyl (Điều 9) và xác định diện tích pic theo 10.4.2.

## 11 Tính và biểu thị kết quả

### 11.1 Tính

Tính phần khối lượng của từng thành phần  $i$  riêng rẽ có trong phần mẫu thử,  $\omega_{i,s}$ , theo công thức sau :

$$\omega_{i,s} = \frac{f'_i \times P_{A_i,s}}{\sum (f'_i \times P_{A_i,s})} \times 100\%$$

Trong đó :

$\omega_{i,s}$  là phần khối lượng của từng thành phần  $i$  có trong mẫu thử, xác định được bằng gam axit béo tự do trên 100 g axit béo tổng số, tính bằng %;

$P_{A_i,s}$  là phần trăm diện tích pic tương ứng thành phần  $i$  có trong mẫu thử.

## TCVN 9969:2013

Nêu các thành phần mẫu chưa xác định được ("chưa biết") vào báo cáo cuối cùng, sử dụng hệ số hiệu chỉnh  $f' = 1$  để tính kết quả.

### 11.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến hai chữ số thập phân.

## 12 Độ chụm

### 12.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được đã sử dụng phương pháp chuẩn bị methyl este theo TCVN 9968 (ISO 15884) và tiến hành thử nghiệm theo tiêu chuẩn này. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này đã thực hiện theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2).

### 12.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tương đối giữa hai kết quả thử độc lập, đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng phòng thử nghiệm, do một người phân tích, sử dụng cùng một thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn:

- 5 % giá trị tuyệt đối của 1 g/100 g, đối với các thành phần axit béo có mặt vượt quá 5 g trên 100 g axit béo tổng số;
- 12 % giá trị tuyệt đối của 0,5 g/100 g, đối với các thành phần axit béo có mặt với các lượng từ 1 g đến 5 g trên 100 g axit béo tổng số.

### 12.3 Độ tái lập

Chênh lệch tương đối giữa hai kết quả thử đơn lẻ, 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 phân tích khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn:

- 15 % giá trị tuyệt đối của 4 g/100 g, đối với các thành phần axit béo có mặt vượt quá 5 g trên 100 g axit béo tổng số;
- 20 % giá trị tuyệt đối của 1 g/100 g, đối với các thành phần axit béo có mặt với các lượng từ 1 g đến 5 g trên 100 g axit béo tổng số.

### 13 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) tất cả các 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 dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn cũng như các sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- e) nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả thu được.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn 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 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.*
-