

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10112:2013

ISO 11701:2009

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ THỰC VẬT – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
PHOSPHOLIPID TRONG LECITHIN BẰNG
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)
SỬ DỤNG DETECTOR TÁN XẠ ÁNH SÁNG**

*Vegetable fats and oils – Determination of phospholipids content
in lecithins by HPLC using a light-scattering detector*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 10112:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 11701:2009;

TCVN 10112:2013 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 thực vật – Xác định hàm lượng phospholipid trong lecithin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng detector tán xạ ánh sáng

Vegetable fats and oils – Determination of phospholipids content in lecithins by HPLC using a light-scattering detector

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng phospholipid bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột diol và detector tán xạ ánh sáng.

Phương pháp này có thể áp dụng cho dầu thô, dầu chứa lecithin và dầu không chứa lecithin, các phần lecithin từ dầu mỡ thực vật.

Phương pháp này không thể áp dụng cho lecithin của động vật, động vật nhai lại và lecithin thủy phân trong enzym vì không tách được hết pic của lysophosphatidylethanolamin (LPE), lysophosphatidylinositol (LPI) và axit lysophosphatidic (LPA).

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:

3.1

Hàm lượng của từng phospholipid (content of an individual phospholipid)

phần khối lượng của *N*-acyl-phosphatidylethanolamin (*N*-acyl-PE) hoặc phosphatidylcholin (PC), hoặc phosphatidylethanolamin (PE), hoặc phosphatidylinositol (PI) hoặc axit phosphatidic (PA) hoặc lysophosphatidylcholin (LPC) xác định được bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng phospholipid được biểu thị bằng gam trên 100 g.

4 Nguyên tắc

Từng phospholipid được tách bằng HPLC sử dụng cột diol và detector tán xạ ánh sáng. Để định lượng, sử dụng hỗn hợp chất chuẩn đối chứng đã được chứng nhận.

5 Thuốc thử

CẢNH BÁO – Cần tuân thủ các quy định khi xử lý các chất nguy hại và các biện pháp kỹ thuật an toàn cho tổ chức và cá nhân.

Trong quá trình phân tích chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác.

5.1 Nước, loại dùng cho HPLC.

5.2 *n*-hexan, loại dùng cho HPLC.

5.3 2-propanol, loại dùng cho HPLC.

5.4 Axit acetic, w_{\min} , 99,8 % khối lượng.

5.5 Triethylamin.

5.6 **Hỗn hợp dung môi:** Hỗn hợp A gồm 80 ml *n*-hexan (5.2) và 20 ml 2-propanol (5.3) (phần thể tích $\varphi = 80 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ đối với *n*-hexan và $\varphi = 20 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ đối với 2-propanol) được dùng để hòa tan chất chuẩn và mẫu thử.

5.7 **Chất chuẩn đối chứng (chất chuẩn ngoại) ILPS-LE01¹⁾**, chất chuẩn đối chứng phospholipid đậu nành là hỗn hợp của chất chuẩn đối chứng đã được chứng nhận với hàm lượng *N*-acyl-PE, PA, PE, PC, PI và LPC xác định.

5.8 Pha động dùng cho HPLC

5.8.1 **Dung môi A.** Trộn 814,2 ml *n*-hexan (5.2), 170,0 ml 2-propanol (5.3), 15 ml axit acetic (5.4) và 0,8 ml triethylamin (5.5) ($\varphi = 81,42 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ đối với *n*-hexan, $\varphi = 17,00 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ đối với 2-propanol, $\varphi = 1,50 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ đối với axit acetic và $\varphi = 0,08 \text{ ml}/100 \text{ ml}$ đối với triethylamin, tính theo phần thể tích).

Để thu được thành phần nửa giải tương tự thì nên cân dung môi có tính đến tỷ trọng của dung môi. Đối với mẻ 2,5 lít: lấy 1 341,4 g *n*-hexan, 331,5 g 2-propanol, 39,4 g axit acetic và 1,45 g (2,0 ml) triethylamin.

¹⁾ ILPS-LE01 là tên thương mại của sản phẩm do Tổ chức quốc tế lecithin và phospholipid cung cấp. Thông tin đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

5.8.2 Dung môi B. Trộn 844,2 ml 2-propanol (5.3), 140 ml nước (5.1), 15,0 ml axit axetic (5.4) và 0,8 ml triethylamin (5.5) ($\varphi = 84,42$ ml/100 ml đối với 2-propanol, $\varphi = 14,00$ ml/100 ml đối với nước, $\varphi = 1,50$ ml/100 ml đối với axit axetic và $\varphi = 0,08$ ml/100 ml đối với triethylamin, tính theo phần thể tích).

Để thu được thành phần rửa giải tương tự nên cân dung môi có tính đến tỷ trọng của dung môi. Đối với mẻ 2,5 lít: lấy 1 646,2 g 2-propanol, 350,0 g nước, 39,4 g axit axetic và 1,45 g (2,0 ml) triethylamin.

6 Thiết bị, dụng cụ

6.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,000 1 g.

6.2 Thiết bị HPCL cơ bản, có hệ thống gradient và detector tán xạ ánh sáng.

6.3 Lò cột HPLC, có thể điều chỉnh nhiệt độ đến 55 °C.

6.4 Bộ loại khí, hoặc thiết bị tương tự để loại khí dung môi.

6.5 Cột HPLC, (250 mm x 4,0 mm) có tiền cột (20 mm x 4,0 mm) được nhồi bằng hạt nhỏ hình cầu (5 μ m) silica liên kết diol, ví dụ. LiChrospher 100 diol (5 μ m)²⁾. Tuổi thọ và lịch sử sử dụng của cột, vật liệu nhồi và nhiệt độ có thể ảnh hưởng đến quá trình tách.

6.6 Bình định mức một vạch, dung tích 50 ml, 100 ml và 2 500 ml, đáp ứng yêu cầu loại A trong TCVN 7153 (ISO1042) ⁽¹⁾.

6.7 Xyranh nhỏ, dung tích 25 μ l, chia đến vạch microlit.

6.8 Bộ lọc, để lọc chất chuẩn ngoại và dung dịch mẫu thử, ví dụ. Millex HV³⁾.

6.9 Hệ thống tích phân.

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 hoặc vận chuyển.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555)⁽²⁾.

²⁾ LiChrospher là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp bởi Merck. Thông tin đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

³⁾ Ví dụ về sản phẩm được cung cấp từ Hiệp hội lecithin và phospholipid quốc tế. Thông tin đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Xem TCVN 6128 (ISO 661).

Mẫu được làm nóng đến tối đa 60 °C để làm nóng chảy (tránh để quá nhiệt) và sau đó đồng hóa bằng cách khuấy mạnh.

9 Cách tiến hành

9.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn đối chứng và dung dịch mẫu thử

9.1.1 Dung dịch chuẩn đối chứng R₁, R₂, và R₃

Chuẩn bị ba dung dịch chuẩn đối chứng khác nhau. Để chuẩn bị, cân chính xác khoảng 550 mg, 850 mg và 1 150 mg hỗn hợp chuẩn đã chứng nhận (5.7), cho vào ba bình định mức 100 ml khác nhau, pha loãng trong hỗn hợp dung môi (5.6) và thêm hỗn hợp dung môi này đến vạch.

Dùng bộ lọc (6.8) để lọc dung dịch chuẩn đối chứng trước khi bơm lên HPLC.

9.1.2 Dung dịch mẫu thử và phần mẫu thử

Cân 425 mg mẫu trong trường hợp lecithin thô, hoặc 255 mg mẫu trong trường hợp lecithin đã tách dầu hoặc lecithin đã phân đoạn, chính xác đến 0,001 g, cho vào bình định mức một vạch dung tích 50 ml, hòa tan trong hỗn hợp dung môi (5.6) và thêm hỗn hợp dung môi này đến vạch.

Dùng bộ lọc (6.8) lọc dung dịch mẫu thử trước khi lấy ra các phần mẫu thử S_{1a} và S_{1b}.

9.2 Phân tích bằng HPLC

Điều chỉnh các điều kiện làm việc trong thiết bị, sử dụng mẫu thử và mẫu chuẩn đối chứng sao cho đạt được quá trình tách theo sắc ký đồ như trong Hình A.1. Tối ưu hóa việc tách, tùy thuộc vào kiểu cột và gradient. Nên tiến hành theo các điều kiện sau (xem Bảng 1):

- nhiệt độ của lò: 55 °C
- độ nhạy của detector: 5 đến 6
- nhiệt độ của detector: 50 °C
- áp suất của detector: 0,20 MPa (2,0 bar)
- tốc độ dòng: 1,0 ml/min
- tốc độ rửa cột: 2,0 ml/min

Bảng 1 – Chương trình gradient đối với HPLC

Thời gian min	Dung môi A %	Dung môi B %	Tốc độ dòng ml/min
0,0	95	5	1,0
5,0	80	20	1,0
8,5	60	40	1,0
15,0	0	100	1,0
17,5	0	100	1,0
17,6	95	5	1,0
21,0	95	5	1,0
22,0	95	5	2,0
27,0	95	5	2,0
29,0	95	5	1,0

9.3 Hiệu chuẩn

Sử dụng các thể tích bơm 20 μ l để tính toán theo đường hồi qui tuyến tính và để xác định mẫu thử. Dung đường chuẩn đối với diện tích pic theo nồng độ.

CHÚ THÍCH: Detector tán xạ ánh sáng không tuyến tính trên toàn dải đo (đường hiệu chuẩn hình chữ S). Nồng độ của các dung dịch chuẩn đối chứng được chọn cần nằm trong dải tuyến tính.

Để định lượng các phospholipid nên sử dụng trình tự phân tích sau: R₁, R₂, R₃ (mỗi dung dịch bơm một lần), S_{1a}, S_{1b} (mỗi dung dịch bơm hai lần), R₁, R₂, R₃ (mỗi dung dịch bơm một lần).

9.4 Xác định

Bơm 20 μ l dung dịch mẫu thử vào HPLC và ghi lại các diện tích pic. Nhận biết các pic bằng cách so sánh thời gian lưu của chất trong sắc ký đồ của các dung dịch chuẩn đối chứng và các phân mẫu thử (xem Hình A.1).

10 Tính và biểu thị kết quả

Sử dụng đường chuẩn để tính hàm lượng từng phospholipit (xem 9.3). Ba điểm hiệu chuẩn cho nồng độ thấp hơn và ba điểm hiệu chuẩn cho nồng độ cao hơn được so sánh với mẫu. Dung dịch R₁, R₂, R₃ (9.1.1) được pha loãng phụ thuộc vào mẫu để thu được sáu điểm hiệu chuẩn.

Phần khối lượng, w_i , tính bằng gam trên 100 g mẫu thử, của từng phospholipid đưa ra theo Công thức:

$$w_i = \frac{m_{pi}}{m} \times 100$$

Trong đó:

m_{pi} là khối lượng của từng phospholipid xác định được từ đường chuẩn, tính bằng miligam (mg);

m là khối lượng mẫu thử (9.1.2), tính bằng miligam (mg).

Biểu thị kết quả đến một chữ số thập phân.

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 B. 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

Giới hạn lặp lại, r , là giá trị nhỏ hơn hoặc bằng chênh lệch tuyệt đối giữa hai giá trị cuối cùng, mỗi giá trị thể hiện một dãy các kết quả thử, thu được trong điều kiện lặp lại được biểu thị với xác suất 95 %.

Các điều kiện lặp lại cho các kết quả thử thu được trên cùng một 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 và thuốc thử, trong một khoảng thời gian ngắn.

11.3 Độ tái lập

Giới hạn tái lập, R , là giá trị nhỏ hơn hoặc bằng chênh lệch tuyệt đối giữa hai giá trị cuối cùng, mỗi giá trị thể hiện dãy các kết quả thử, thu được trong điều kiện tái lập được biểu thị với xác suất là 95 %.

Các điều kiện tái lập xác định theo các điều kiện thử cho các kết quả thử thu được trên cùng một phương pháp, tiến hành 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 và thuốc thử khác nhau, trong một khoảng thời gian ngắn.

12 Báo cáo thử nghiệm

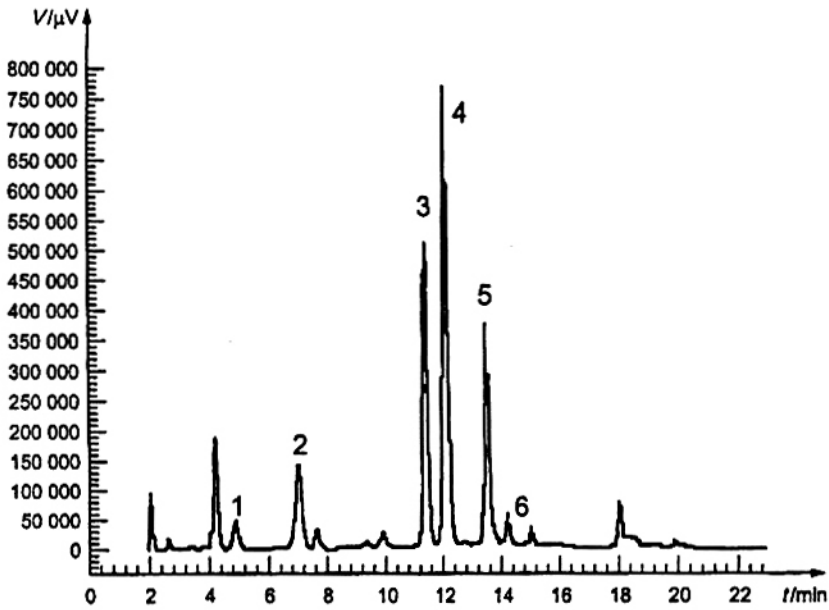
Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

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) kết quả thử nghiệm thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Sắc ký đồ HPLC



CHÚ DẪN

- 1 *N*-acyl-phosphatidylethanolamin
- 2 axit phosphatidic
- 3 phosphatidylethanolamin
- 4 phosphatidylcholin
- 5 phosphatidylinositol
- 6 lysophosphatidylcholin
- t* thời gian
- V* độ nhạy

Hình A.1 – Sắc ký đồ HPLC đối với phospholipid của lecithin đậu nành tự nhiên dạng thô

Phụ lục B
(Tham khảo)

Kết quả phép thử liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp là kết quả của nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được tổ chức bởi Hiệp hội Lecithin và phospholipid Quốc tế (ILPS) theo chuẩn Quốc tế. Nghiên cứu được tiến hành năm 1996 trên ba mẫu. Các kết quả thu được dựa trên phép phân tích theo TCVN 6910-1(ISO 5725-1)^[3] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[4] cho dữ liệu về độ chụm theo Bảng B.1 đến B.6.

Bảng B.1 – Kết quả thống kê của *N*-acyl-phosphatidylethanolamin (*N*-acyl-PE)

Thông số	Mẫu	
	A: lecithin đậu nành thô	B: lecithin đậu nành thô
Số phòng thử nghiệm tham gia, <i>N</i>	10	11
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ, <i>n</i>	8	8
Số lượng các kết quả thử riêng rẽ của tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu, <i>z</i>	4	4
Giá trị trung bình, \bar{w}, % khối lượng	1,52	1,59
Độ lệch chuẩn lặp lại, <i>s_r</i>	0,04	0,05
Hệ số biến thiên lặp lại, <i>C_{V,r}</i> , %	2,3	3,2
Giới hạn lặp lại, <i>r</i> (= <i>s_r</i> × 2,8)	0,10	0,14
Độ lệch chuẩn tái lập, <i>s_R</i>	0,11	0,20
Hệ số biến thiên tái lập, <i>C_{V,R}</i> , %	7,2	12,6
Giới hạn tái lập, <i>R</i> (= <i>s_R</i> × 2,8)	0,30	0,55

Bảng B.2 – Kết quả phân tích thống kê của axit phosphatidic (PA)

Thông số	Mẫu	
	A: lecithin đậu nành thô	B: lecithin đậu nành thô
Số phòng thử nghiệm tham gia, <i>N</i>	12	12
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ, <i>n</i>	11	10
Số lượng từng kết quả thử riêng rẽ của tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu, <i>z</i>	4	4
Giá trị trung bình, \bar{w}, % phần khối lượng	4,67	6,23
Độ lệch chuẩn lặp lại, <i>s_r</i>	0,17	0,20
Hệ số biến thiên lặp lại, <i>C_{V,r}</i> , %	3,6	3,4
Giới hạn lặp lại, <i>r</i> (= <i>s_r</i> × 2,8)	0,46	0,57
Độ lệch chuẩn tái lập, <i>s_R</i>	0,24	1,17
Hệ số biến thiên tái lập, <i>C_{V,R}</i> , %	4,6	18,8
Giới hạn tái lập, <i>R</i> (= <i>s_R</i> × 2,8)	0,67	3,28

Bảng B.3 – Kết quả phân tích thống kê của phosphatidylethanolamin (PE)

Thông số	Mẫu	
	A: lecithin đậu nành thô	B: lecithin đậu nành thô
Số phòng thử nghiệm tham gia, N	12	12
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ, n	9	10
Số lượng các kết quả thử riêng rẽ của tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu, z	4	4
Giá trị trung bình, \bar{w}, % khối lượng	11,74	12,14
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,17	0,21
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{V,r}$, %	1,5	1,7
Giới hạn lặp lại, r ($= s_r \times 2,8$)	0,47	0,59
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,34	0,37
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$, %	2,9	3,0
Giới hạn tái lập, R ($= s_R \times 2,8$)	0,94	1,03

Bảng B.4 – Kết quả thống kê của phosphatidylcholin (PC)

Thông số	Mẫu		
	A: lecithin đậu nành thô	B: lecithin đậu nành thô	C: phần PC của lecithin đậu nành
Số phòng thử nghiệm tham gia, N	12	12	13
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ, n	11	11	11
Số lượng các kết quả thử riêng rẽ của tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu, z	4	4	4
Giá trị trung bình, \bar{w}, % khối lượng	14,70	13,45	94,70
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,25	0,27	1,01
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{V,r}$, %	1,7	2,0	1,1
Giới hạn lặp lại, r ($= s_r \times 2,8$)	0,69	0,76	2,28
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,46	0,46	2,14
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$, %	3,1	3,4	2,3
Giới hạn tái lập, R ($= s_R \times 2,8$)	1,28	1,28	6,00

Bảng B.5 – Kết quả thống kê của phosphatidylinositol (PI)

Thông số	Mẫu	
	A: lecithin đậu nành thô	B: lecithin đậu nành thô
Số phòng thử nghiệm tham gia, N	12	12
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ, n	11	11
Số lượng từng kết quả thử riêng rẽ của tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu, z	4	4
Giá trị trung bình, \bar{w}, % khối lượng	9,36	9,87
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,17	0,20
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{V,r}$, %	1,8	2,0
Giới hạn lặp lại, $r (= s_r \times 2,8)$	0,48	0,56
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,30	0,33
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$, %	3,2	3,4
Giới hạn tái lập, $R (= s_R \times 2,8)$	0,83	0,93

Bảng B.6 – Kết quả thống kê của lysophosphatidylcholin (LPC)

Thông số	Mẫu	
	A: lecithin đậu nành thô	B: lecithin đậu nành thô
Số phòng thử nghiệm tham gia, N	11	12
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ, n	10	7
Số lượng từng kết quả thử riêng rẽ của tất cả các phòng thử nghiệm trên từng mẫu, z	4	4
Giá trị trung bình, \bar{w}, % khối lượng	0,71	0,46
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,06	0,03
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{V,r}$, %	8,5	7,0
Giới hạn lặp lại, $r (= s_r \times 2,8)$	0,17	0,09
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,15	0,11
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$, %	20,9	23,9
Giới hạn tái lập, $R (= s_R \times 2,8)$	0,41	0,32

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 7153 (ISO 1042) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*
 - [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*
-