

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9675-1:2017

ISO 12966-1:2014

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT -
SẮC KÝ KHÍ CÁC METYL ESTE CỦA AXIT BÉO -
PHẦN 1: HƯỚNG DẪN ĐO SẮC KÝ KHÍ CÁC METYL ESTE
CỦA AXIT BÉO**

*Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters -
Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters*

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 9675-1:2017 cùng với TCVN 9675-4:2017 thay thế TCVN 10475:2014 và TCVN 9673:2013;

TCVN 9675-1:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 12966-1:2014;

TCVN 9675-1:2017 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;

Bộ TCVN 9675 (ISO 12966), Dầu mỡ động vật và thực vật – Sắc kí khí các methyl este của axit béo gồm các phần sau đây:

- TCVN 9675-1:2017 (ISO 12966-1:2014), Phần 1: Hướng dẫn đo sắc kí khí các methyl este của axit béo;
- TCVN 9675-2:2013 (ISO 12966-2:2011), Phần 2: Chuẩn bị methyl este của axit béo;
- TCVN 9675-3:2013 (ISO 12966-3:2009), Phần 3: Chuẩn bị methyl este bằng trimethylsulfoni hydroxit (TMSH);
- TCVN 9675-4:2017 (ISO 12966-4:2009), Phần 4: Xác định bằng sắc kí mao quản.

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này là một trong bốn tiêu chuẩn thích hợp để chuẩn bị và xác định các methyl este của axit béo trong dầu mỡ động vật và thực vật bằng phương pháp sắc ký khí. Bộ TCVN 9675 (ISO 12966) có thể áp dụng cho chất béo thô, đã tinh luyện, đã hydro hóa từng phần hoặc hydro hóa hoàn toàn và các axit béo thu được từ các nguồn dầu mỡ động vật và thực vật.

TCVN 9675 (ISO 12966) (tất cả các phần) không thích hợp để phân tích dầu mỡ của động vật nhai lại và chất béo sữa (bao gồm cả sữa và sản phẩm sữa hoặc chất béo từ sữa và sản phẩm sữa) hoặc các sản phẩm được bổ sung axit linoleic (CLA). Ngoài ra, tiêu chuẩn này không áp dụng cho dầu mỡ đã polyme hóa và ôxi hóa.

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn để đo sắc ký khí các methyl este của axit béo, còn TCVN 9675-2 (ISO 12966-2) và TCVN 9675-3 (ISO 12966-3) được dùng để chuẩn bị các methyl este của axit béo bằng các phương pháp khác nhau. Trong TCVN 9675-4 (ISO 12966-4) đưa ra các điều kiện để phân tích các methyl este của axit béo bằng sắc ký khí mao quản.

**Dầu mỡ động vật và thực vật –
Sắc ký khí các metyl este của axit béo –
Phần 1: Hướng dẫn đo sắc ký khí các metyl este của axit béo**

*Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters –
Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả tổng quan việc phân tích các axit béo dạng tự do và dạng liên kết trong dầu mỡ động vật và thực vật khi được chuyển đổi thành các metyl este của axit béo (FAME) bằng sắc ký khí.

Việc định tính và định lượng thành phần của các axit béo bằng sắc ký khí lỏng (GLC) được sử dụng rộng rãi trong phân tích chất béo. Phép phân tích được sử dụng để xác định tính đặc trưng của dầu mỡ hoặc thực phẩm có chứa chất béo, sau khi chiết dầu ra khỏi nền mẫu. Các axit béo liên kết của các triacylglycerol (TAG), axit béo tự do (FFA) và chất béo khác được chuyển thành các metyl este của axit béo (FAME), phụ thuộc vào phương pháp este hóa, được xác định bằng sắc ký khí mao quản. Tùy thuộc vào số lượng axit béo khác nhau (theo lý thuyết có thể có hơn 50 axit béo khác nhau) mà sử dụng các cột mao quản có chiều dài từ 10 m đến 100 m để tách.

Phương pháp GLC phân tích các FAME có thể áp dụng cho tất cả các hỗn hợp tự nhiên và tổng hợp của các tri-, di- và monoacylglycerol, este của axit béo, axit béo tự do, hợp chất xà phòng và các hợp chất béo khác. Sử dụng các chất chuẩn thích hợp, có thể xác định được FAME từ C4 đến C26, bao gồm các metyl este của axit béo bão hòa, các metyl este của axit béo chưa bão hòa đơn dạng *cis*- và *trans* và các metyl este của axit béo chưa bão hòa dạng đa *cis*- và *trans*.

Để xác định các axit béo mạch ngắn, thường sử dụng isopropyl và butyl este để tránh gây nhiễu với pic dung môi và để giảm sai số trong đáp ứng detector.

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 9675-2 (ISO 12966-2) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Sắc ký khí các metyl este của axit béo – Phần 2: Chuẩn bị metyl este của axit béo.*

TCVN 9675-3 (ISO 12966-3) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Sắc ký khí các metyl este của axit béo – Phần 3: Chuẩn bị metyl este bằng trimethylsulfonyl hydroxit (TMSH)*

TCVN 9675-4 (ISO 12966-4) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Sắc ký khí các metyl este của axit béo – Phần 4: Xác định bằng sắc ký khí mao quản.*

3 Nguyên tắc

Sử dụng phương pháp sắc ký khí lỏng (GLC) để định tính và định lượng các FAME. Các FAME được chuẩn bị theo TCVN 9675-2 (ISO 12966-2) hoặc TCVN 9675-3 (ISO 12966-3) và được hòa tan sau đó bơm lên cột, hóa hơi trong bộ bơm. Có thể tách các FAME trên cột phân tích có độ phân cực và chiều dài khác nhau. Để phát hiện các FAME, sử dụng detector ion hóa ngọn lửa (FID).

Trong phân tích sắc ký khí các FAME dùng FID nên sử dụng khí hydro làm khí mang (pha động). Đối với MSD (detector khối phổ chọn lọc) thì phải sử dụng khí heli. Quá trình tách có thể thực hiện trong thời gian ngắn hơn với các pic nhọn hơn khi sử dụng khí hydro. Pha tĩnh là lớp màng mỏng chất lỏng trên bề mặt rắn trơ, thép, thủy tinh hoặc silica nung chảy.

Các hợp chất đã hóa hơi đi qua ống mao quản tương tác với pha tĩnh trên bề mặt trơ của cột. Do sự tương tác của các hợp chất khác nhau nên chúng đi ra khỏi cột hoặc rửa giải ở các thời điểm khác nhau, còn được gọi là thời gian lưu của hợp chất ở dây các thông số phân tích đã cài đặt. So sánh thời gian lưu để nhận biết các hợp chất khác nhau.

CẢNH BÁO – Khi sử dụng detector khối phổ chọn lọc, phải thận trọng để đạt được các kết quả định lượng do có sự khác nhau về dạng phân mảnh của từng FAME. Đối với máy đo phổ khối lượng sử dụng các dẫn xuất khác với các FAME trong tiêu chuẩn này, ví dụ: sử dụng picolinyl este hoặc dimetyl oxazolidin và các dẫn xuất khác.

4 Chuẩn bị FAME

Chuẩn bị các metyl este của axit béo phải theo TCVN 9675-2 (ISO 12966-2) và TCVN 9675-3 (ISO 12966-3). Tổng quan được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Tổng quan về các phương pháp este hóa khác nhau

Phương pháp	Nguyên tắc	Bộ bơm GC	Chú thích	-
4.2 của TCVN 9675-2 (ISO 12966-2),	Phương pháp chuyển hóa methyl nhanh trong điều kiện xúc tác kiềm bằng KOH FFA không được chuyển thành FAME Cảnh báo về quá trình xả phòng hóa	Trên cột chia dòng/không chia dòng	Có thể áp dụng cho dầu và mỡ chứa axit béo đến butanoic (C4:0) Chuyển hóa este ở nhiệt độ phòng, không cần bay hơi dung môi	Đối với triglycerit mạch trung bình (MCT) và axit béo mạch ngắn, tạo thành tín hiệu không đáng kể. Xác định axit butanoic/hexanoic sử dụng chất nội chuẩn Các FAME mạch ngắn dễ hao hụt trong phân đoạn muối/dung môi
4.3 của TCVN 9675-2 (ISO 12966-2)	Phương pháp chuyển hóa methyl/methyl hóa hoàn toàn trong điều kiện xúc tác kiềm và axit (NaOCH ₃) FFA được chuyển thành FAME	Trên cột chia dòng/không chia dòng	Có thể áp dụng cho dầu và mỡ Không áp dụng cho dầu lauric	Các FAME mạch ngắn dễ hao hụt trong quá trình hồi lưu và phân đoạn muối/dung môi
4.4 của TCVN 9675-2 (ISO 12966-2)	Chuyển hóa methyl/methyl bởi bo triflorua (BF ₃)/methyl hóa Thuốc thử rất độc. Chỉ sử dụng dung dịch trong lọ kín và thực hiện trong tủ hút Hình thành các phản ứng phụ	Trên cột chia dòng/không chia dòng	Dung dịch 14 % BF ₃ trong metanol phải được mua sẵn và không cần chuẩn bị vì lý do rất độc Dung dịch có hạn sử dụng ngắn	Áp dụng cho dầu cá. Không áp dụng cho hợp chất chứa các nhóm oxy hóa bậc hai
4.5 của TCVN 9675-2 (ISO 12966-2)	Methyl hóa trong axit sulfuric hoặc axit clohydric Hình thành các phản ứng phụ. Cần bay hơi, không bay hơi đối với axit béo epoxy	Trên cột chia dòng/không chia dòng	Cần chuẩn bị thuốc thử; este hóa trong điều kiện đun sôi trong ống hàn kín 3 h	Áp dụng đối với mẫu có hàm lượng axit béo tự do cao
TCVN 9675-3 (ISO 12966-3)	Trimethylsulfoni hydroxit (TMSH) Các pic của sản phẩm phụ của phản ứng bị nhiễu xuất hiện trên sắc ký đồ gần với tín hiệu của FAME mạch ngắn	Chỉ dùng bơm chia dòng	Dung dịch TMSH có bán sẵn để sử dụng	Phương pháp phân tích nhanh đối với C4 đến C26, việc este hóa các axit béo tự do chuẩn khoảng 80 %, hình thành một lượng nhỏ <i>trans</i> -FA

5 Cột

Các cột mao quản phim mỏng (WCOT) được sử dụng để tách các FAME do có nhiều ưu điểm hơn cột nhỏ như: việc tách được cải thiện với độ phân giải cao hơn, giảm thời gian phân tích, dùng cỡ mẫu thử nhỏ hơn và có độ nhạy cao hơn. Tất cả điều này có thể đạt được khi sử dụng cột rất dài với số lượng lớn các đĩa lý thuyết.

Dung tích mẫu tăng theo đường kính cột, đường kính nhỏ hơn sẽ cho hiệu quả lớn hơn và độ phân giải tốt hơn. Do đó, đối với các mẫu phức hợp, sử dụng các cột mẫu có đường kính nhỏ và dung tích mẫu nhỏ. Cột có đường kính trong (ID) là 0,1 mm (cột GC nhanh) đến 0,53 mm (cột có lỗ rộng); độ dày màng trong khoảng từ 0,1 μm đến 0,3 μm . Đường kính cột phải phù hợp với hệ thống ống dẫn mẫu: đường kính trong của cột là 0,20 mm, 0,25 mm hoặc 0,32 mm dùng cho hệ thống bơm chia dòng và không chia dòng, đường kính trong của cột là 0,32 mm dùng cho bơm không chia dòng và bơm lên cột, đường kính trong 0,53 mm dùng cho hệ thống bơm trực tiếp. Thời gian lưu và dung tích mẫu tăng theo việc tăng độ dày màng, đồng thời hiệu quả của cột sẽ giảm. Độ dày màng tỷ lệ nghịch với số lượng đĩa nhưng tỷ lệ thuận với thời gian phân tích. Điều này chứng tỏ độ dày màng lớn hơn cho thời gian lưu lớn hơn, do vậy cần nhiệt độ lò cao hơn trong các điều kiện đẳng nhiệt.

Chiều dài cột từ 10 m đến 100 m phụ thuộc vào độ phân giải yêu cầu và khó khăn trong việc tách. Với cột ngắn thì có hạn chế nhưng phân tích nhanh, thông tin có thể thu được trong kiểm soát quá trình v.v... Thường sử dụng các loại cột mao quản khác nhau có pha tĩnh không phân cực, phân cực và phân cực cao để tách các FAME. Trình tự rửa giải các cột có độ phân cực khác nhau được nêu trong TCVN 9675-4 (ISO 12966-4) (xem Phụ lục B và Phụ lục C).

Cột silica nung chảy phủ pha tĩnh phân cực cao như polysiloxan cyanoalkyl được dùng để phân tích các mẫu có các hỗn hợp phức tạp về các đồng phân hình học và đồng phân vị trí của axit béo chưa bão hòa đa (PUFA). Thuận lợi chính của pha phân cực cao này so với các pha không phân cực là độ phân giải cao các FAME chưa bão hòa, đặc biệt là trong việc tách các đồng phân FA dạng *cis* và *trans*. Tuy nhiên, độ phân cực của cột này cho thấy ít ổn định nhiệt so với các pha tĩnh khác.

Chiều dài cột là yếu tố quan trọng đối với việc tách các FAME, đặc biệt là trong việc tách các đồng phân. Cột dài hơn sẽ cho độ phân giải tốt hơn so với cột ngắn, mặc dù có một số hạn chế thực tế đối với việc tăng chiều dài của cột. Tăng chiều dài cột gấp đôi (ví dụ: 30 m lên 60 m) sẽ làm tăng độ phân giải theo hệ số $\sqrt{2} = 1,41$ là 40 %. Ở cùng thời điểm, thời gian phân tích sẽ tăng cũng như tăng áp suất đầu vào. Cột ngắn hơn được điều chỉnh giữa tốc độ và độ phân giải. Tuy nhiên, tách các FAME đồng phân hình học và đồng phân vị trí yêu cầu trong một số trường hợp cột có chiều dài 100 m. Nên sử dụng cột dài 100 m, có đường kính trong 0,20 mm hoặc 0,25 mm, độ dày màng 0,20 μm , có pha tĩnh phân cực biscyanopropyl (SP-2560) hoặc pha tĩnh cyanopropyl thay thế (CP-Sil 88) vì khả năng tách của các cột này đủ để tách hầu hết các đồng phân C18:1 dạng *trans*- và *cis*-. Một số cột dài 50 m hoặc 60 m cũng có thể đạt được độ tách yêu cầu đối với hầu hết các loại dầu thực vật. Cũng có thể sử dụng các loại cột khác có các cyanopropyl polysilphenylen-siloxan (BPX70, DB-23, HP-23, Rtx-2330, SP-2330, SP-2380,

SLB-IL111 v.v...) khác nhau, nhưng có thể thay đổi thứ tự rửa giải. Trong phương pháp AOCS Ce 1h-05 (2009) nên sử dụng cột dài 100 m SP-2560 hoặc cột mao quản CP-Sil 88 để xác định các FAME dạng *cis*-, *trans*- và các FAME chưa bão hòa trong dầu thực vật hoặc chất béo động vật không phải từ động vật nhai lại. Để xác định các FAME trong chất béo động vật biển và chất béo khác chứa các PUFA mạch dài, nên sử dụng phương pháp AOCS Ce 1i-07 (2009), cột mao quản Supelcowax 10, phân cực cao có pha polyetylen glycol và phương pháp AOCS Ce 1b-89 (2009) dùng Omegawax để xác định các FAME omega-3 mạch dài¹⁾.

Pha tĩnh của tất cả các cột này là màng mỏng trên bề mặt trơ của ống mao quản, được làm bằng thủy tinh thạch anh đặc biệt, được phủ bằng polyimid để ổn định (silica nung chảy). Tuy nhiên, có thể chấp nhận cột mao quản bằng thép hoặc thủy tinh.

CHÚ THÍCH 1: Cột nhồi hiện nay ít được sử dụng, tuy nhiên trong một số trường hợp vẫn còn sử dụng.

Loại pha tĩnh rất quan trọng trong việc chọn cột, độ phân giải và độ tách. Pha tĩnh có độ phân cực càng cao thì axit béo không bão hòa được giữ lại càng nhiều.

Các axit béo dạng *trans* nằm giữa các axit béo chưa bão hòa dạng *cis* và các axit béo bão hòa. Trên cột không phân cực, các axit béo chưa bão hòa rửa giải trước axit béo bão hòa.

CHÚ THÍCH 2: Thứ tự rửa giải phụ thuộc vào nhiệt độ cột. Kiểu rửa giải đối với một số FAME có thể thay đổi sử dụng các chương trình nhiệt độ lò khác nhau.

Nếu phân tích dầu và mỡ có chứa các axit béo đã polyme hóa và/hoặc ôxi hóa thì tất cả các axit này không chuyển hóa thành các FAME. FAME đã polyme hóa không bay hơi ở các điều kiện phân tích khuyến cáo và sẽ không phân hủy trong bộ bơm. Điều này dẫn đến hao hụt FAME không mong muốn trong suốt quá trình phân tích tiếp theo.

6 Phân tích sắc ký khí lỏng các FAME

Áp dụng TCVN 9675-4 (ISO 12966-4) để định tính và định lượng các FAME. Tùy thuộc vào độ rửa giải và độ tách yêu cầu, mà sử dụng phương pháp đẳng nhiệt hoặc chương trình nhiệt độ đối với các cột có độ phân cực và chiều dài khác nhau.

7 Đánh giá sắc ký đồ

7.1 Diện tích pic và phần trăm diện tích

Thông thường, dầu và mỡ, loại trừ dầu lauric, chứa các axit béo có mạch carbon từ 16 đến 22. Trong trường hợp này, có thể không cần sử dụng hệ số đáp ứng hoặc hệ số hiệu chỉnh vì tín hiệu FID lý

¹⁾ Supelcowax 10 và Omegawax là tên thương mại của các sản phẩm từ các nhà cung cấp khác nhau. 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.

TCVN 9675-1:2017

thuyết từ các FAME này gần giống với diện tích pic của FAME. Tuy nhiên, cần kiểm tra phương pháp công cụ theo các chuẩn đã được chứng nhận và các chuẩn thích hợp để xác định các hệ số đáp ứng thực tế/hệ số đáp ứng của thiết bị. Nếu các hệ số đáp ứng này khác 1 hoặc yêu cầu các kết quả có độ chính xác cao hơn thì cần áp dụng hệ số đáp ứng của thiết bị.

Luôn luôn áp dụng hệ số đáp ứng của thiết bị đối với dầu dừa, dầu cọ, dầu lauric khác và dầu cá, nếu không sẽ cho kết quả sai lỗi nghiêm trọng.

Các hệ số hiệu chỉnh FID lý thuyết nêu trong Phụ lục A của TCVN 9675-4 (ISO 12966-4).

7.2 Đánh giá bằng chất nội chuẩn hoặc hệ số hiệu chỉnh

Trong một số phép phân tích nhất định, ví dụ nếu không định lượng được tất cả các FAME thì nên sử dụng chất nội chuẩn. Đối với dầu và mỡ có axit béo mạch ngắn và axit béo không thông dụng thì tất cả các thành phần phải được hiệu chuẩn dùng chất nội chuẩn và hệ số hiệu chỉnh, ví dụ: đối với palmitic, stearic hoặc methyl este của axit béo heneicosanoic hoặc các triacylglycerol bao gồm các axit béo chuẩn này.

Trong một số trường hợp, nên sử dụng triacylglycerol tinh khiết làm chất nội chuẩn. Chất nội chuẩn này được thêm vào trước khi chuẩn bị các FAME.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phép phân tích FAME phải cụ thể như sau:

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

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] DELMONTE P. & KIA F. Ali-Reza; Kramer, John K. G.; Mossoba, Magdi M.; Sidisky, Len; Rader, Jeanne I.: Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. *J. Chromatogr. A.* 2011, **1218** (3) pp. 545-554
- [2] MJØS Svein A.; Haugsgjerd, Bjørn Ole: *Trans* Fatty Acid Analyses in Samples of Marine Origin: The Risk of False Positives. *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59** (8) pp. 3520–3531
- [3] ALVES S.P., & BESSA. B: Comparison of two gas–liquid chromatograph columns for the analysis of fatty acids in ruminant meat. *J. Chromatogr. A.* 2009, **1216** (26) pp. 5130–5139
- [4] MARTIN C., DEOLEVEIRA C., VISENTAINER J., MATSUSHITA M., DESOUZA N. Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for the gas chromatographic analysis of *trans* fatty acids. *J. Chromatogr. A.* 2008, **1194** (1) pp. 111–117
- [5] YAMAMOTO K., KINOSHITA A., SHIBAHARA A. Gas chromatographic separation of fatty acid methyl esters on weakly polar capillary columns. *J. Chromatogr. A.* 2008, **1182** (1) pp. 132–135
- [6] DELMONTE P., & RADER J.I Evaluation of gas chromatographic methods for the determination of *trans* fat. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, **389** (1) pp. 77–85
- [7] MJØS Svein A; Grahn Nielsen, O: Prediction of gas chromatographic retention of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. A.* 2006, **1110** (1-2) pp. 171–180
- [8] RATANAYAKE W.M. Nimal; Hansen, Steven L.; Kennedy, Michael P.: Evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 GC Columns Used in the Recently Approved AOCS Official Method Ce 1h-05: Determination of *cis*-, *trans*-, Saturated, Monounsaturated, and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC Method. In: *Journal of The American Oil Chemists' Society.* 2006, **83** (6) pp. 475–488
- [9] MJØS Svein A: Properties of *trans* isomers of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid methyl esters on cyanopropyl stationary phases. *J. Chromatogr. A.* 2005, **1100** (2) pp. 185–192
- [10] RATNAYAKE W.M.N.: Overview of Methods for the Determination of *trans* Fatty Acids by Gas Chromatography, Silver–Ion Thin-Layer Chromatography, Silver–Ion Liquid Chromatography, and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Ratnayake J. AOAC Int.* 2004, **87** pp. 523–539

- [11] Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 21 CFR Part 101 [Docket No. 94P-0036]. Food Labelling: *Trans* Fatty Acids in Nutrition Labelling, Nutrient Content Claims, and Health Claims. Washington, DC. July 2003, pp. 254
- [12] Regulations Amending the Food and Drug Regulations (Nutrition Labelling, Nutrient Content Claims and Health Claims). Department of Health, Canada Gazette, Part 11. January 1, 2003
- [13] RATNAYAKE W.M.N., Cruz-Hernandez C.: Ratnayake Analysis of trans fatty acids of partially hydrogenated vegetable oils and dairy products. In *Trans Fatty Acids in Human Nutrition*. Eds. J.L. Sebedio and W.W. Christie. The Oily Press, Dundee, pp. 115-161 (1998)
- [14] GARFIELD F.M. *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories*. AOAC International, 1995
- [15] CRASKE J.D., & BANNON C.D.: Letter to the Editor. *Oil Chem. Soc.* 1988, 65 p. 1190-1191
- [16] CRASKE J.D., & BANNON C.D. Gas liquid chromatography analysis of the fatty acid composition of fats and oils: A total system for high accuracy *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1987, 64 pp. 1413-1417
- [17] SNYDER J.M. Scholfield C.R.: *cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids with p-toluenesulfonic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1982, 59 pp. 469-470
- [18] ACKMAN R.G. & SIPOS J.C Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detectors. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1964, 41 p. 377-378
- [19] Official Methods and recommended practices of the AOCS, Method Ce 1h-05 (2009), Determination of *cis*-, *trans*-, Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-Ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC
- [20] Official Methods and recommended practices of the AOCS, Method Ce 1i-07 (2009), Acids in Marine and Other Oils Containing Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) by Capillary GLC
- [21] Official Methods and recommended practices of the AOCS, Method AOCS Ce 1b-89 (2009), Marine Oil - Fatty Acid Composition by GLC
-