

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6687:2007**

**ISO 8381:2000**

Xuất bản lần 2

**THỰC PHẨM TỪ SỮA DÙNG CHO TRẺ SƠ SINH –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CHẤT BÉO – PHƯƠNG PHÁP  
KHỐI LƯỢNG (PHƯƠNG PHÁP CHUẨN)**

*Milk-based infant foods – Determination of fat content –  
Gravimetric method (Reference method)*

HÀ NỘI - 2007

**Lời nói đầu**

TCVN 6687:2007 thay thế TCVN 6687:2000;

TCVN 6687:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 8381:2000;

TCVN 6687:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Thực phẩm từ sữa dùng cho trẻ sơ sinh – Xác định hàm lượng chất béo – Phương pháp khối lượng (phương pháp chuẩn)

*Milk-based infant foods – Determination of fat content – Gravimetric method (Reference method)*

**CẢNH BÁO** – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp chuẩn để xác định hàm lượng chất béo trong thực phẩm từ sữa dùng cho trẻ sơ sinh.

Phương pháp này có thể áp dụng cho thực phẩm sữa dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng, dạng cô đặc hoặc dạng bột, không chứa hoặc chứa nhỏ hơn 5 % phần khối lượng (tính theo chất khô) tinh bột hoặc dextrin, hoặc rau, quả, thịt ...

**CHÚ THÍCH 1** Các Malto-Dextrin không chứa các dextrin có phân tử lượng cao hơn thường có mặt trong thực phẩm dành cho trẻ sơ sinh, các Malto-Dextrin này ngay cả khi có mặt với lượng lớn cũng không cản trở việc chiết bằng qui trình Rose-Gottlieb (RG).

Phương pháp này không áp dụng cho các sản phẩm không hoà tan hoàn toàn trong amoniac do sự có mặt một lượng không nhỏ tinh bột hoặc dextrin, hoặc các miếng sản phẩm cứng. Tiêu chuẩn này cũng không áp dụng cho các sản phẩm có chứa một lượng đáng kể các axit béo tự do. Các kết quả xác định thu được đối với các loại sản phẩm này sẽ rất thấp.

CHÚ THÍCH 2 Đối với các loại sản phẩm như thế, nên sử dụng phương pháp theo nguyên tắc Weibull-Berntrop (WB) [xem TCVN 6688-1 (ISO 8262-1)].

## 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

ISO 3889 Milk and milk products – Determination of fat content – Mojonnier-type fat extraction flasks (Sữa và sản phẩm sữa – Xác định hàm lượng chất béo – Bình chiết chất béo kiểu Mojonnier).

## 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

### 3.1

#### **hàm lượng chất béo của sữa** (fat content of milk)

khối lượng của các chất xác định được bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng chất béo được biểu thị bằng phần trăm khối lượng [thường được biểu thị theo % (m/m)].

## 4 Nguyên tắc

Dung dịch etanol amoniac của phần mẫu thử được chiết bằng ete dietyl và xăng nhẹ. Sau đó loại bỏ dung môi bằng chưng cất hoặc cho bay hơi. Xác định khối lượng của các chất chiết được.

CHÚ THÍCH Điều này thường được gọi là nguyên tắc Rose-Gottlieb.

## 5 Thuốc thử

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

Tất cả các thuốc thử được sử dụng không được để lại lượng cặn đáng kể khi xác định theo phương pháp qui định (xem 9.2.2).

### 5.1 Dung dịch amoniac, chứa NH<sub>3</sub> khoảng 25 % phần khối lượng ( $\rho_{20} = 910$ g/l).

CHÚ THÍCH Nếu không có sẵn dung dịch amoniac nồng độ này thì có thể sử dụng dung dịch có nồng độ cao hơn đã biết (xem 9.4.2).



**5.2 Etanol** ( $C_2H_5OH$ ), hoặc etanol đã bị metanol làm biến tính, có độ tinh khiết tối thiểu là 94 % phần thể tích (xem A.5).

### 5.3 Dung dịch Congo đỏ

Hoà tan 1 g đỏ Congo trong nước trong bình định mức một vạch (6.14). Pha loãng đến vạch mức.

**CHÚ THÍCH** Việc sử dụng dung dịch này để phân biệt rõ hơn lớp phân cách giữa dung môi và nước là tùy chọn (xem 9.4.4). Có thể sử dụng các dung dịch màu dạng lỏng khác với điều kiện là chúng không ảnh hưởng đến kết quả xác định.

**5.4 Ete dietyl** ( $C_2H_5OC_2H_5$ ), không chứa các peroxit (xem A.3) hoặc chứa không quá 2 mg/kg chất chống oxi hoá và phù hợp các yêu cầu đối với thử mẫu trắng (xem 9.2.2, A.1 và A.4).

**CHÚ THÍCH** Việc sử dụng ete dietyl có thể dẫn đến các tình huống độc hại. Vì vấn đề an toàn mà hiện nay người ta đang nghiên cứu để thay thế ete dietyl bằng thuốc thử khác với điều kiện là nó không ảnh hưởng đến kết quả cuối cùng của phép xác định.

**5.5 Xăng nhẹ**, có nhiệt độ sôi trong khoảng từ 30 °C đến 60 °C, hoặc tương đương như pentan ( $CH_3[CH_2]_3CH_3$ ) có điểm sôi ở 36 °C hoặc phù hợp với các yêu cầu thử mẫu trắng (xem 9.2.2, A.1 và A.4).

**CHÚ THÍCH** Nên sử dụng pentan vì pentan có độ tinh khiết cao hơn và có chất lượng ổn định.

### 5.6 Dung môi hỗn hợp

Ngay trước khi sử dụng, trộn ete dietyl (5.4) và xăng nhẹ (5.5) với thể tích bằng nhau.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

**CẢNH BÁO** – Vì việc xác định cần phải sử dụng các dung môi bay hơi dễ cháy, nên các thiết bị điện được dùng phải tuân theo qui định an toàn trong khi sử dụng các dung môi này.

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

**6.1 Cân phân tích**, cân chính xác đến 1 mg, có thể đọc được đến 0,1 mg.

**6.2 Máy ly tâm**, có các bình hoặc có các ống chiết chất béo (6.6) có thể quay từ 500 vòng/phút đến 600 vòng/phút để tạo ra được trường hấp dẫn khoảng 80 g đến 90 g ở miệng bình hoặc ống.

**CHÚ THÍCH** Việc sử dụng máy ly tâm là tùy chọn, nhưng khuyến cáo sử dụng loại thiết bị này (xem 9.4.7).

**6.3 Thiết bị chung cất hoặc làm bay hơi**, để chung cất các dung môi hoặc etanol ra khỏi bình đun sôi hoặc bình nón, hoặc làm bay hơi các cốc và các đĩa (xem 9.4.14) ở nhiệt độ không vượt quá 100 °C.

**6.4 Tủ sấy**, được đốt nóng bằng điện, có cửa thông gió mở hoàn toàn, có thể duy trì được nhiệt độ ở  $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong suốt khoảng sấy.

Tủ có gắn một nhiệt kế thích hợp.

**6.5 Nồi cách thủy**, có thể duy trì ở các nhiệt độ từ 30 °C đến 40 °C, 40 °C đến 60 °C và 60 °C đến 70 °C.

**6.6 Bình chiết chất béo kiểu Mojonnier**, như qui định trong ISO 3889.

**CHÚ THÍCH** Cũng có thể dùng ống chiết chất béo (hoặc bình), có si phông hoặc nối với chai rửa, nhưng qui trình này có khác và được qui định trong phần phụ lục B.

Các bình này phải được đậy bằng nút bản chất lượng tốt, hoặc được đậy bằng nắp làm bằng vật liệu khác [ví dụ như cao su silicon hoặc polytetrafluoroetylen (PTFE)] không bị ảnh hưởng bởi thuốc thử được sử dụng. Nút bản phải được chiết bằng ete dietyl (5.4), giữ ít nhất là 15 phút ở nhiệt độ 60 °C hoặc lớn hơn và sau đó được ngâm trong nước sao cho chúng bão hoà nước khi sử dụng.

**6.7 Giá đỡ**, để giữ bình (hoặc ống) chiết chất béo (6.6).

**6.8 Chai rửa**, thích hợp để dùng với dung môi hỗn hợp (5.6).

Không dùng chai rửa bằng chất dẻo.

**6.9 Bình thu nhận chất béo**, ví dụ như bình đun sôi (đáy phẳng), dung tích từ 125 ml đến 250 ml, bình nón dung tích 250 ml, hoặc các đĩa kim loại.

Nếu sử dụng đĩa kim loại, thì tốt nhất là đĩa bằng thép không gỉ, đáy phẳng, có rãnh rớt, đường kính từ 80 mm đến 100 mm và có chiều cao khoảng 50 mm.

**6.10 Chất trợ sôi**, không chứa chất béo, bằng sứ không xốp hoặc cacbua silicon (tùy chọn trong trường hợp dùng đĩa kim loại).

**6.11 Ống đong**, dung tích 5 ml và 25 ml.

**6.12 Pipet**, được chia độ, dung tích 10 ml.

**6.13 Bộ kẹp**, bằng kim loại thích hợp để giữ bình, cốc hoặc đĩa.

**6.14 Bình định mức**, một vạch, dung tích 100 ml.

## 7 Lấy mẫu

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

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

Bảo quản tất cả các mẫu dạng lỏng, sánh hoặc nhão ở nhiệt độ từ 2 °C đến 6 °C ngay từ thời điểm lấy mẫu đến lúc tiến hành thử nghiệm. Trong trường hợp các mẫu được đựng trong chai hoặc lọ gắn kín thì bảo quản các mẫu này trong lọ hoặc chai nguyên không mở ở nhiệt độ dưới 20 °C.

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

### 8.1 Sản phẩm dạng lỏng

Lắc và đảo chiều hộp chứa mẫu. Mở nắp hộp, rót từ từ sản phẩm sang hộp chứa thứ hai (có nắp đậy kín). Trộn bằng cách chuyển qua chuyển lại sản phẩm, tránh để chất béo hoặc bất kỳ thành phần nào khác trong mẫu sót lại trên thành và đáy của hộp thứ nhất. Cuối cùng, chuyển hết sản phẩm sang hộp chứa thứ hai. Đậy nắp hộp.

Nếu cần, để hộp đang đậy kín vào nồi cách thủy (6.5) ở nhiệt độ từ 40 °C đến 60 °C. Cứ 15 phút lại lấy ra và lắc mạnh. Sau 2 giờ, lấy hộp chứa ra, làm khô mặt ngoài bằng khăn khô và để nguội đến nhiệt độ phòng. Mở hẳn nắp và trộn kỹ lượng chứa bằng thìa hoặc dao trộn. (Nếu chất béo đã tách hẳn, thì không thử mẫu). Chuyển hết mẫu thử sang hộp chứa thứ hai. Đậy nắp hộp.

### 8.2 Sản phẩm dạng sánh hoặc nhão

Mở nắp hộp chứa mẫu và trộn kỹ lượng chứa bên trong bằng thìa hoặc dao trộn. Nếu có thể, sử dụng máy quay để trộn dưới lên trên theo cách sao cho các lớp trên cùng với các phần ở các góc dưới của hộp được trộn đều với nhau. Tránh để chất béo hoặc bất kỳ thành phần nào khác trong mẫu sót lại trên thành và đáy của hộp. Chuyển hết mẫu thử sang hộp chứa thứ hai (có nắp đậy kín). Đậy nắp hộp.

Nếu cần, để hộp chứa mẫu đang đậy kín vào nồi cách thủy (6.5) ở nhiệt độ từ 30 °C đến 40 °C. Lấy hộp, dùng khăn khô lau mặt ngoài và mở nắp hộp. Vét sạch tất cả sản phẩm phía trong hộp cho sang đĩa đủ rộng để có thể trộn được kỹ cho đến khi thu được sản phẩm đồng nhất. Chuyển hết sản phẩm sang hộp thứ hai như trên. Đậy nắp hộp.

### 8.3 Sản phẩm dạng bột

Trộn kỹ bằng cách quay và đảo chiều hộp đựng. Nếu cần, chuyển mẫu thử nghiệm sang một hộp chứa kín thích hợp có dung tích đủ rộng để thực hiện thao tác này.

## 9 Cách tiến hành

CHÚ THÍCH 1 Nếu cần phải kiểm tra sự thoả mãn của giới hạn lặp lại (11.2), thì thực hiện hai phép xác định độc lập theo 9.1 đến 9.4.

CHÚ THÍCH 2 Qui trình khác có sử dụng ống chiết chất béo có si phòng hoặc nối với chai nửa (xem chú thích ở 6.6) được mô tả trong phụ lục B.

### 9.1 Phần mẫu thử

Trộn mẫu thử (điều 8) bằng cách khuấy nhẹ (trong trường hợp sản phẩm dạng sáp, nhão hoặc dạng khô) hoặc bằng cách đảo chiều hộp chứa nhẹ nhàng ba hoặc bốn lần (trường hợp sản phẩm dạng lỏng) và cân trực tiếp hoặc cách khác từ 1,5 g đến 10 g mẫu thử, chính xác đến 1 mg, tương ứng với 1,0 g đến 1,5 g chất khô cho vào bình chiết chất béo (6.6).

Phần mẫu thử phải được chuyển hết sang bầu thấp hơn (bầu nhỏ) của bình chiết chất béo.

### 9.2 Phép thử trắng

#### 9.2.1 Phép thử trắng đối với phương pháp

Tiến hành phép thử trắng đồng thời với phép xác định, sử dụng cùng một trình tự và cùng loại thuốc thử, nhưng thay phần mẫu thử đã pha loãng (xem 9.4.1) bằng 10 ml nước (xem A.2).

Nếu giá trị thu được trong phép thử trắng này vượt quá 1,0 mg, thì kiểm tra thuốc thử, nếu trước đó chưa được thực hiện (9.2.2). Việc điều chỉnh giá trị lớn hơn 2,5 mg cần được nêu trong báo cáo thử nghiệm.

#### 9.2.2 Phép thử trắng đối với thuốc thử

Để kiểm tra chất lượng của thuốc thử, tiến hành phép thử trắng như qui định trong 9.2.1. Sử dụng thêm một bình thu nhận chất béo rỗng, được chuẩn bị theo 9.3 với mục đích kiểm soát khối lượng. Các thuốc thử phải không để lại lượng cặn lớn hơn 1,0 mg (xem A.1).

Nếu lượng cặn thu được trong phép thử trắng thuốc thử hoàn chỉnh lớn hơn 1,0 mg, thì xác định lượng cặn của các dung môi riêng rẽ bằng chưng cất 100 ml ete dietyl (5.4) và xăng nhẹ (5.5), tương ứng. Sử dụng một bình thu nhận chất béo rỗng, được chuẩn bị với mục đích kiểm chứng khối lượng như mô tả ở trên, để thu được khối lượng thực của cặn mà không vượt quá 1,0 mg.

Rất hiếm khi các dung môi có thể chứa chất bay hơi mà bị giữ lại nhiều trong chất béo. Nếu có các dấu hiệu cho thấy sự có mặt của các chất như thế, thì tiến hành các phép thử trắng đối với tất cả các thuốc thử và đối với từng dung môi, sử dụng một bình thu nhận chất béo với khoảng 1 g butterfat khan. Nếu

cân, chung cất lại các dung môi trong sự có mặt 1 g butterfat khan trên 100 ml dung môi. Sử dụng dung môi này ngay sau khi chung cất lại.

Thay các thuốc thử và các dung môi không đạt yêu cầu, hoặc chung cất lại các dung môi.

### 9.3 Chuẩn bị bình thu nhận chất béo

Sấy khô bình thu nhận chất béo (6.9) cùng vài hạt trợ sôi (6.10) trong tủ sấy (6.4) ở nhiệt độ 102 °C trong vòng 1 giờ.

**CHÚ THÍCH 1** Chất trợ sôi là để giúp cho sôi nhẹ trong suốt quá trình loại bỏ các dung môi, đặc biệt trong trường hợp các bình thu nhận chất béo bằng thủy tinh; trong trường hợp đĩa kim loại thì tùy ý.

Bảo vệ bình thu nhận chất béo tránh bụi và để bình nguội đến nhiệt độ phòng cân (bình thủy tinh để ít nhất 1 giờ, đĩa kim loại ít nhất 30 phút).

**CHÚ THÍCH 2** Không nên đặt bình trong tủ hút ẩm, tránh chưa đủ nguội hoặc thời gian làm nguội bị kéo dài.

Dùng kẹp (6.13) đặt bình lên bàn cân. Cân bình chính xác đến 1,0 mg.

**CHÚ THÍCH 3** Nên dùng kẹp đặt bình lên bàn cân để tránh làm thay đổi nhiệt độ.

### 9.4 Xác định

#### 9.4.1 Tiến hành xác định ngay.

Nếu cần, cho nước đã được làm ấm trước đến nhiệt độ  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  vào phần mẫu thử đựng trong bình chiết chất béo (9.1) để có được tổng thể tích từ 10 ml đến 11 ml. Dùng nước để tráng phần mẫu thử trên đáy bình. Lắc nhẹ trên nổi cách thủy (6.5) với nước hơi ấm, ở nhiệt độ từ 40 °C đến 60 °C cho đến khi phần mẫu thử tan hết.

**9.4.2** Cho 2 ml dung dịch amoniac (5.1), hoặc một thể tích tương đương của dung dịch amoniac đậm đặc hơn (xem chú thích trong 5.1) vào phần mẫu thử đã đồng nhất trong bình chiết chất béo (9.4.1). Trộn kỹ với phần mẫu thử trong bầu nhỏ của bình chiết chất béo.

**9.4.3** Làm nóng bình chiết chất béo trên nổi cách thủy (6.5) từ 15 phút đến 20 phút ở nhiệt độ  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , thỉnh thoảng lắc bình (khi sản phẩm dạng lỏng thì tùy ý). Làm nguội bình dưới dòng nước chảy đến nhiệt độ phòng.

**9.4.4** Thêm 10 ml etanol (5.2). Trộn kỹ một cách nhẹ nhàng, bằng cách cho lượng chứa trong bình chạy qua chạy lại giữa hai bầu. Không để chất lỏng chạm đến sát cổ bình. Nếu cần, thêm 2 giọt dung dịch phẩm Congo đỏ (5.3). Làm nguội bình dưới dòng nước chảy đến nhiệt độ phòng.

**9.4.5** Thêm 25 ml ete dietyl (5.4). Đậy bình bằng nút bần đã bão hoà nước hoặc đậy bằng nút làm bằng chất liệu khác (xem 6.6) đã được làm ướt bằng nước. Lắc mạnh bình trong vòng 1 phút nhưng không lắc quá mạnh để tránh tạo nhũ.

Trong khi lắc, giữ bình chiết ở tư thế nằm ngang và bầu nhỏ hướng lên trên, cho chất lỏng trong bầu lớn chảy sang bầu nhỏ một cách định kỳ. Nếu cần, làm mát bình dưới dòng nước chảy đến nhiệt độ phòng. Mở nút một cách cẩn thận, để tráng nút và cổ bình bằng một ít dung môi hỗn hợp (5.6). Sử dụng chai rửa (6.8) sao cho nước tráng chảy vào bình chiết.

**9.4.6** Thêm 25 ml xăng nhẹ (5.5). Đậy nắp bình chiết chất béo bằng nút bần hoặc nút khác đã làm ướt lại bằng nước (ngâm trong nước). Trộn nhẹ nhàng một lần nữa khoảng 30 giây theo 9.4.4. Tiến hành lắc bình theo 9.4.5.

**9.4.7** Ly tâm bình chiết đã đậy nút từ 1 phút đến 5 phút ở gia tốc 80 g đến 90 g. Nếu không có sẵn máy li tâm, thì đặt bình trên giá đỡ (6.7) ít nhất 30 phút cho đến khi thấy có lớp nổi trên bề mặt rõ rệt và phân biệt rõ với lớp chất lỏng. Nếu cần, làm mát bình dưới dòng nước chảy đến nhiệt độ phòng.

**9.4.8** Cẩn thận tháo bỏ nút, tráng nút và tráng phía trong cổ bình bằng một ít dung môi hỗn hợp (5.6). Sử dụng chai rửa (6.8) sao cho nước rửa chảy vào bình chiết. Nếu mặt lớp phân cách thấp hơn chỗ thắt cổ bình, thì hơi nâng cao lớp phân cách này lên bằng cách nhẹ nhàng thêm nước dọc theo thành bình (xem Hình 1) để gạt dung môi được dễ dàng.

**CHÚ THÍCH** Trong hình 1 và hình 2 mô tả một trong ba loại bình được qui định trong ISO 3889 đã được chọn, nhưng điều này không có nghĩa là nó được ưu tiên hơn loại khác.

**9.4.9** Giữ bình chiết tại bầu nhỏ, cẩn thận gạt được càng nhiều càng tốt lớp nổi trên bề mặt vào bình nhận chất béo đã được chuẩn bị (xem 9.3) có chứa một ít chất trợ sôi (6.10) trong trường hợp đối với bình thủy tinh (còn đối với đĩa kim loại thì tùy ý). Khi gạt tránh để bất kỳ một tí chất lỏng nào vào bình (xem hình 2).

**9.4.10** Tráng phía ngoài cổ bình chiết bằng một ít dung môi hỗn hợp (5.6). Thu lấy nước tráng vào bình nhận chất béo. Không để dung môi hỗn hợp tràn ra thành ngoài của bình chiết. Nếu cần, có thể loại bỏ dung môi hoặc một phần dung môi khỏi bình thu nhận chất béo bằng cách chưng cất hoặc làm bay hơi như mô tả trong 9.4.14.

**9.4.11** Thêm 5 ml etanol (5.2) vào lượng chất chứa trong bình chiết chất béo. Dùng etanol để tráng thành trong cổ bình và trộn như mô tả trong 9.4.4.

**9.4.12** Thực hiện chiết lần hai bằng cách lặp lại các thao tác như mô tả trong 9.4.5 đến hết 9.4.9. Thay cho 25 ml chỉ dùng 15 ml ete dietyl (5.4) và 15 ml xăng nhẹ (5.5). Sử dụng ete dietyl để tráng thành trong của cổ bình chiết chất béo.

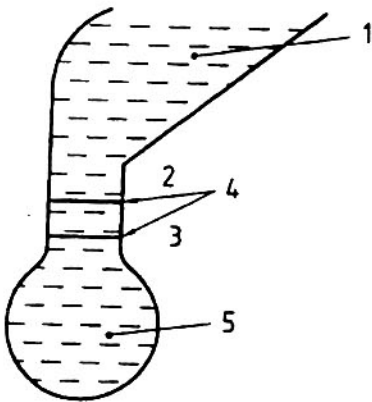
Nếu cần, nâng cao mặt lớp phân cách đến giữa cổ bình (xem Hình 1) bằng cách nhẹ nhàng cho thêm nước theo thành bình (xem Hình 1) để có thể gạn hết dung môi càng nhiều càng tốt (xem Hình 2).

**9.4.13** Thực hiện chiết lần ba mà không cho thêm etanol, bằng cách lặp lại các thao tác như mô tả trong 9.4.5 đến hết 9.4.9. Chỉ dùng 15 ml ete dietyl (5.4) và 15 ml xăng nhẹ (5.5). Sử dụng ete dietyl để tráng thành trong của cổ bình chiết chất béo.

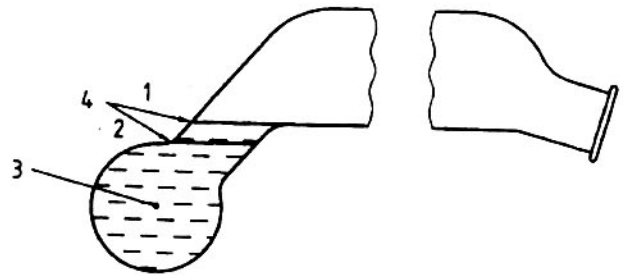
Nếu cần, nâng cao mặt lớp phân cách đến giữa cổ bình (xem Hình 1) bằng cách nhẹ nhàng cho thêm nước theo thành bình (xem Hình 1) để có thể gạn hết dung môi càng nhiều càng tốt (xem Hình 2).

**CHÚ THÍCH** Việc chiết lần ba có thể bỏ qua đối với các sản phẩm có hàm lượng chất béo nhỏ hơn 5 % (tính theo hàm lượng chất khô).

**9.4.14** Loại bỏ các dung môi (kể cả etanol) càng hết càng tốt khỏi bình thu nhận chất béo bằng cách chưng cất nếu sử dụng bình đun sôi hoặc bình nón, hoặc bằng cách cho bay hơi nếu sử dụng cốc cổ mở hoặc đĩa (xem 6.3). Tráng thành trong của cổ bình nón bằng một ít dung môi hỗn hợp (5.6) trước khi bắt đầu chưng cất.



Hình 1 – Trước khi gạn



Hình 2 – Sau khi gạn

**Chú giải**

- 1 Dung môi
- 2 Tại lần chiết thứ hai và thứ ba
- 3 Tại lần chiết thứ nhất
- 4 Lớp phân cách
- 5 Lớp chất lỏng

**Chú giải**

- 1 Tại lần chiết thứ hai và thứ ba
- 2 Tại lần chiết thứ nhất
- 3 Lớp chất lỏng
- 4 Lớp phân cách

**9.4.15** Đun nóng bình thu nhận chất béo với bình đun sôi và bình nón (đặt bình nằm nghiêng để hơi dung môi thoát ra được), 1 giờ trong tủ sấy (6.4) ở nhiệt độ 102 °C. Lấy bình thu nhận chất béo ra khỏi tủ và kiểm tra ngay xem chất béo đã trong hay chưa. Nếu chất béo không trong, chúng tỏ trong chất béo có tạp chất và phải lập lại toàn bộ quy trình. Nếu chất béo đã trong, bảo vệ bình thu nhận chất béo khỏi bụi và để nguội bình (tốt nhất là không để trong bình hút ẩm) tới nhiệt độ phòng cân (đối với bình thủy tinh tối thiểu 1 giờ, đĩa kim loại tối thiểu 30 phút).

Không lau bình ngay trước lúc cân. Dùng kẹp (6.13) để đặt bình thu nhận chất béo lên cân. Cân bình thu nhận chất béo chính xác đến 1,0 mg.

**9.4.16** Đun nóng bình thu nhận chất béo, đối với bình nón hoặc bình đun sôi thì đặt chúng nằm nghiêng để hơi dung môi thoát ra được, tiếp theo 30 phút trong tủ sấy (6.4) ở nhiệt độ 102 °C. Để nguội và cân lại theo 9.4.15. Nếu cần, lập lại các quy trình đun nóng và cân cho đến khi chênh lệch khối lượng của bình thu nhận chất béo giữa hai lần cân liên tiếp nhỏ hơn hoặc bằng 1,0 mg. Ghi khối lượng tối thiểu là khối lượng của bình thu nhận chất béo và của chất chiết được.

## 10 Biểu thị kết quả

### 10.1 Phương pháp tính và công thức

Tính hàm lượng chất béo của mẫu theo công thức:

$$w_f = \frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100\%$$

trong đó

$w_f$  là phần khối lượng chất béo có trong mẫu, tính bằng phần trăm;

$m_0$  là khối lượng của phần mẫu thử (9.1), tính bằng gam;

$m_1$  là khối lượng của bình thu nhận chất béo và chất chiết, xác định được trong 9.4.16, tính bằng gam;

$m_2$  là khối lượng của bình thu nhận chất béo đã chuẩn bị (9.3), tính bằng gam;

$m_3$  là khối lượng của bình thu nhận chất béo sử dụng trong phép thử trắng (9.2) và chất chiết xác định được trong 9.4.16, tính bằng gam;

$m_4$  là khối lượng của bình thu nhận chất béo (9.3) được sử dụng trong phép thử trắng (9.2), tính bằng gam.



## 10.2 Biểu thị kết quả

Làm tròn kết quả đến hai chữ số thập phân.

## 11 Độ chụm

### 11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm theo ISO 5725<sup>1)</sup> về độ chụm của phương pháp đã được công bố (xem [6]).

Các giá trị về giới hạn độ lặp lại và độ tái lập được biểu thị ở mức xác suất 95 % và có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với các giá trị đã nêu.

### 11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ độc lập, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người phân tích, sử dụng cùng một thiết bị thực hiện trong cùng một phòng thử nghiệm, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá phần khối lượng sau đây:

- 0,05 % đối với các sản phẩm dạng lỏng;
- 0,1 % đối với các sản phẩm có hàm lượng chất béo nhỏ hơn hoặc bằng 5 %.
- 0,2 % đối với sản phẩm có hàm lượng chất béo lớn hơn 5 %.

### 11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ độc lập, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, do các người phân tích khác nhau thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn phần khối lượng sau đây:

- 0,1 % đối với các sản phẩm dạng lỏng;
- 0,2 % đối với các sản phẩm có hàm lượng chất béo nhỏ hơn hoặc bằng 5 %.
- 0,4 % đối với sản phẩm có hàm lượng chất béo lớn hơn 5 %.

<sup>1)</sup> ISO 5725:1986 đã được sử dụng để thu được số liệu về độ chụm (đã hủy bỏ).

## **12 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả thử;
- việc điều chỉnh, nếu giá trị lớn hơn 2,5 mg thu được trong phép thử trắng đối với phương pháp;
- kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu độ lặp lại được kiểm tra thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

## Phụ lục A

(tham khảo)

### Các chú ý về cách tiến hành

#### A.1 Phép thử trắng để kiểm tra thuốc thử (xem 9.2.2)

Trong phép thử trắng này, bình thu nhận chất béo dùng để kiểm tra khối lượng được sử dụng để đảm bảo các thay đổi trong điều kiện môi trường của phòng cân hoặc ảnh hưởng nhiệt độ của bình thu nhận chất béo không làm ảnh hưởng đến việc xem xét sự có mặt hay không có mặt của chất không bay hơi có trong phần chiết của thuốc thử. Bình này có thể được dùng như bình đối trọng trong trường hợp cân có hai đĩa cân. Mặt khác, chênh lệch khối lượng biểu kiến ( $m_3 - m_4$  trong công thức ở 10.1) của bình kiểm chứng phải được xem xét khi kiểm tra khối lượng của bình thu nhận chất béo dùng trong phép thử trắng. Do đó, sự thay đổi khối lượng biểu kiến của bình thu nhận chất béo, được điều chỉnh theo sự thay đổi khối lượng biểu kiến của bình kiểm tra, sẽ không tăng quá 1,0 mg.

Rất hiếm khi dung môi có chứa chất bay hơi bị giữ lại nhiều trong chất béo. Nếu thấy sự có mặt của các chất như thế, cần tiến hành phép thử trắng đối với tất cả các thuốc thử và từng dung môi thì sử dụng bình chất béo với khoảng 1 g butterfat khan. Nếu cần, chung cất lại các dung môi với sự có mặt của 1 g butterfat trong 100 ml dung môi. Chỉ dùng các dung môi này trong khoảng thời gian ngắn sau khi chúng cất lại.

#### A.2 Tiến hành phép thử trắng đồng thời với việc xác định (xem 9.2.1)

Giá trị thu được trong thử mẫu trắng, tiến hành đồng thời với việc xác định, cho phép giá trị biểu kiến của các chất chiết được từ phần mẫu thử ( $m_1 - m_2$ ) điều chỉnh cho sự có mặt của chất không bay hơi chiết được từ thuốc thử và cũng như khi có bất kì sự thay đổi nào về điều kiện môi trường của phòng cân và chênh lệch nhiệt độ giữa bình thu nhận chất béo và phòng cân của hai lần cân (9.4.16 và 9.3).

Trong các điều kiện thích hợp (giá trị thấp trong phép thử trắng đối với thuốc thử, nhiệt độ cân bằng của phòng cân, thời gian để cho bình thu nhận chất béo đủ nguội), thì giá trị này sẽ luôn luôn nhỏ hơn 1,0 mg và sau này có thể được bỏ qua trong phần tính kết quả trong trường hợp xác định thông thường. Cũng thường gặp giá trị lớn hơn đến 2,5 mg (dương và âm). Sau khi điều chỉnh các giá trị này, các kết quả sẽ đúng. Khi phải điều chỉnh giá trị lớn hơn 2,5 mg thì phải nêu lên trong phần báo cáo thử nghiệm (điều 12).

Nếu giá trị thu được trong phép thử trắng thường lớn hơn 1,0 mg thì cần kiểm tra lại thuốc thử nếu ngay trước đó chưa kiểm tra. Thuốc thử có lẫn tạp chất hoặc có vết thì cần phải thay thế hoặc làm sạch lại (xem 9.2.2 và A.1).

### A.3 Phép thử đối với peroxit

Để thử peroxit, cho 1 ml dung dịch kali iodua 100 g/l mới chuẩn bị vào 10 ml ete dietyl đựng trong ống đong nhỏ bằng thủy tinh có nắp đậy, trước đó đã được tráng bằng ete. Lắc ống đong và sau đó để yên trong 1 phút. Phải không còn thấy màu vàng trong lớp ete dietyl.

Có thể sử dụng các phương pháp thử thích hợp khác để kiểm tra peroxit.

Để đảm bảo rằng ete dietyl không còn chứa peroxit, xử lý ete dietyl ít nhất là ba ngày trước khi sử dụng như sau:

Cắt lá kẽm thành những dải để chúng ít nhất chạm được đến nửa chai đựng ete dietyl, dùng khoảng 80 cm<sup>2</sup> lá kẽm cho 1 lít ete dietyl.

Trước khi sử dụng, nhúng toàn bộ các dải lá kẽm này 1 phút trong dung dịch chứa 10 g/l đồng (II) sunfat ngậm 5 phân tử nước (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) và 2 ml/l axit sunfuric đậm đặc [98 % (phần khối lượng)].

Rửa kỹ các dải này nhẹ nhàng bằng nước, rồi đặt các dải đã mạ đồng còn ướt này vào trong chai đựng ete dietyl và để chúng trong chai.

Có thể dùng các phương pháp khác với điều kiện là chúng không làm ảnh hưởng đến kết quả xác định.

### A.4 Ete dietyl có chứa chất chống oxi hoá

Ở một số quốc gia có bán sẵn ete dietyl chứa khoảng 1 mg chất chống oxi hoá trên kilogam, đặc biệt dùng để xác định chất béo. Hàm lượng này không dùng cho mục đích đối chứng.

Tại một số quốc gia có bán sẵn ete dietyl chứa hàm lượng chất chống oxi hoá cao hơn, thí dụ như lên đến 7 mg/kg. Những loại như thế chỉ nên sử dụng đối với những xác định thông thường và phải tiến hành phép thử tráng đồng thời với phép xác định, để điều chỉnh những sai số hệ thống do lượng dư của chất chống oxi hoá gây ra. Đối với mục đích đối chiếu, loại ete dietyl như vậy luôn phải chưng cất trước khi sử dụng.

### A.5 Etanol

Có thể sử dụng etanol đã biến tính bởi metanol với điều kiện là etanol đó không làm ảnh hưởng đến kết quả của việc xác định.

## Phụ lục B

(tham khảo)

### Quy trình khác dùng ống chiết chất béo có si phông hoặc có nối với chai rửa

#### B.1 Khái quát

Nếu sử dụng ống chiết chất béo có si phông hoặc có nối với chai rửa, thì sử dụng quy trình được qui định trong phụ lục này. Các ống phải có nắp hoặc nút bần chất lượng tốt như qui định đối với bình cầu trong 6.6 (xem hình B.1 như một ví dụ).

#### B.2 Cách tiến hành

##### B.2.1 Chuẩn bị mẫu thử

Xem điều 8.

##### B.2.2 Phần mẫu thử

Tiến hành theo qui định trong 9.1 nhưng sử dụng các ống chiết chất béo (xem chú thích trong 6.6 và hình B.1).

Cần chuyển hết phần mẫu thử này sang đáy của ống chiết chất béo.

##### B.2.3 Phép thử trắng

Xem 9.2 và A.2.

##### B.2.4 Chuẩn bị bình thu nhận chất béo

Xem 9.3.

##### B.2.5 Xác định

###### B.2.5.1 Tiến hành phép xác định ngay.

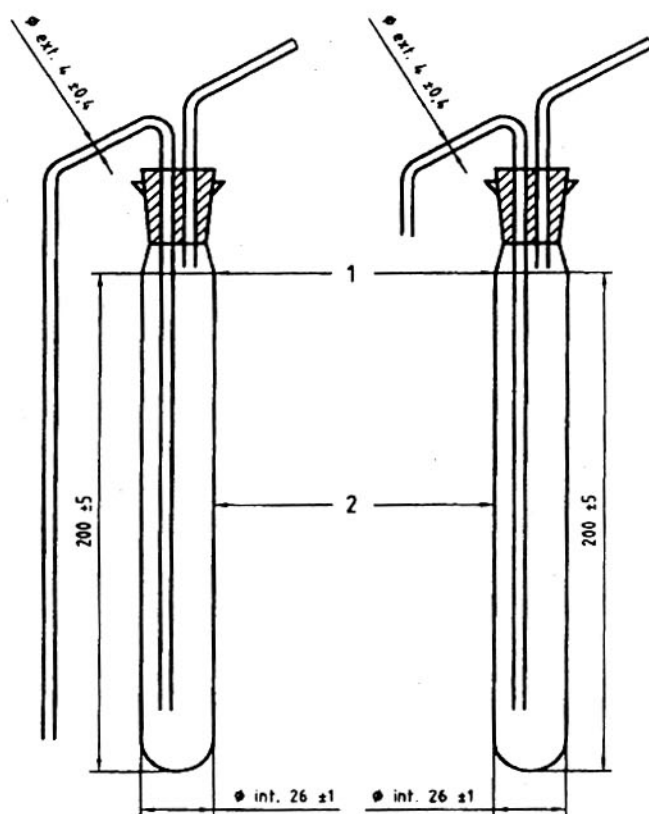
Nếu cần, thêm nước đã được làm ấm trước đến nhiệt độ  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  vào phần mẫu thử trong ống chiết chất béo để thu được tổng thể tích từ 10 ml đến 11 ml. Dùng nước để tráng phần mẫu thử trên đáy của ống. Lắc nhẹ ống với nước hơi ấm trên nồi cách thủy (6.5) ở nhiệt độ từ  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  cho đến khi mẫu thử tan hết hoàn toàn.

**B.2.5.2** Cho 2 ml dung dịch amoniac (5.1) hoặc một thể tích tương ứng của dung dịch amoniac đậm đặc hơn (xem chú thích trong 5.1), vào phần mẫu thử trong ống chiết chất béo (B.2.5.1). Lắc kỹ với phần mẫu thử đã xử lý trước ở đáy ống chiết chất béo.

**B.2.5.3** Làm nóng ống chiết chất béo ở nhiệt độ  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  trên nồi cách thủy (6.5) từ 15 phút đến 20 phút, thỉnh thoảng lắc ống (đối với sản phẩm dạng lỏng thì tùy ý). Làm nguội dưới dòng nước chảy đến nhiệt độ phòng.

**B.2.5.4** Cho thêm 10 ml etanol (5.2). Trộn kỹ một cách nhẹ nhàng hỗn hợp trên đáy ống chiết chất béo. Tốt hơn là thêm 2 giọt dung dịch đỏ Congo (5.3).

Kích thước tính bằng milimet



a) có gắn ống si-phông

b) có gắn bình rửa

**Chú giải**

- 1 Dung tích 105 ml  $\pm$  5 ml khi tháo nút
- 2 Độ dày thành ống 1,5 mm  $\pm$  0,5 mm

**Hình B.1 – Các ví dụ về ống chiết chất béo**

**B.2.5.5** Cho thêm 25 ml ete dietyl (5.4). Đậy nắp ống chiết chất béo bằng nút bần đã bão hoà nước hoặc bằng nắp làm bằng chất liệu khác đã làm ướt bằng nước (6.6). Lắc mạnh ống, nhưng không quá mạnh để tránh tạo nhũ bằng cách đảo chiều trong khoảng 1 phút. Nếu cần, làm mát ống dưới dòng nước chảy. Cần thận tháo bỏ nút, tráng nút và cổ ống bằng một ít hỗn hợp dung môi (5.6), Sử dụng chai rửa (6.8) sao cho nước rửa chảy vào ống.

**B.2.5.6** Cho thêm 25 ml xăng nhẹ (5.5). Đậy ống chiết chất béo bằng nút bần hoặc nút khác đã thấm lại nước (bằng cách ngâm vào trong nước). Lắc nhẹ ống 30 giây như mô tả trong B.2.5.5.

**B.2.5.7** Cho ly tâm ống chiết chất béo đã đậy nút từ 1 phút đến 5 phút ở gia tốc 80 g đến 90 g. Nếu không có sẵn máy ly tâm (6.2), thì đặt ống chiết chất béo trên giá đỡ (6.7) ít nhất 30 phút cho đến khi thấy rõ lớp nổi lên bề mặt và phân biệt rõ với lớp chất lỏng. Nếu cần, làm mát ống dưới dòng nước chảy đến nhiệt độ phòng.

**B.2.5.8.** Cần thận tháo bỏ nút hoặc nắp, tráng nút và cổ của ống chiết chất béo bằng một ít hỗn hợp dung môi (5.6). Sử dụng chai rửa (6.8) sao cho nước tráng chảy vào ống.

**B.2.5.9** Lắp khớp nối si phông hoặc khớp nối với chai rửa vào ống chiết chất béo. Đẩy ống nối bên trong cho đến khoảng 4 mm cao hơn mặt tiếp xúc giữa các lớp. Ống nối phía bên trong phải song song với trục của ống chiết chất béo.

Cần thận gạt được càng nhiều càng tốt lớp nổi bên trên ống chiết chất béo vào bình thu nhận chất béo (xem 9.3) có chứa một ít chất trợ sôi (6.10) trong trường hợp đối với bình đun sôi hoặc bình nón (còn đối với đĩa kim loại thì tùy ý). Không được để lớp chất lỏng lẫn vào. Tráng phía ngoài khớp nối bằng một ít hỗn hợp dung môi, thu lấy nước rửa vào bình thu nhận chất béo.

**CHÚ THÍCH** Lớp nổi phía trên có thể được chuyển ra khỏi ống chiết chất béo, ví dụ như bằng cách dùng bầu cao su được nối với một thân ngắn để tạo áp lực.

**B.2.5.10** Tháo lỏng khớp nối khỏi cổ của ống chiết chất béo. Nâng nhẹ ống nối và tráng phần thấp hơn của ống nối bên trong bằng một ít hỗn hợp dung môi (5.6). Hạ thấp và chèn lại ống nối và chuyển nước rửa vào bình thu nhận chất béo.

Tráng rửa lại khớp nối bằng một ít hỗn hợp dung môi, cho nước rửa vào bình nhận chất béo. Tốt nhất là loại bỏ dung môi hoặc một phần dung môi khỏi bình nhận bằng cách chưng cất hoặc làm bay hơi như trong 9.4.14.

**B.2.5.11** Tháo lại khớp nối khỏi cổ của ống chiết. Nâng nhẹ ống nối và thêm 5 ml etanol vào lượng chứa trong ống chiết chất béo. Dùng etanol để tráng thành trong của khớp nối. Trộn đều như mô tả trong B.2.5.4.

## TCVN 6687:2007

**B.2.5.12** Thực hiện chiết lần hai bằng cách lặp lại các thao tác như mô tả trong B.2.5.5 đến hết B.2.5.10. Thay 25 ml bằng cách chỉ sử dụng 15 ml ete dietyl (5.4) và 15 ml xăng nhẹ (5.5). Dùng ete dietyl để tráng thành trong của khớp nối trong suốt quá trình tháo khớp nối ra khỏi ống sau lần chiết lần trước.

**B.2.5.13** Thực hiện chiết lần ba mà không thêm etanol, bằng cách lặp lại các thao tác như mô tả trong B.2.5.5 đến B.2.5.10. Chỉ sử dụng 15 ml ete dietyl và 15 ml xăng nhẹ. Sử dụng ete dietyl để tráng thành trong của khớp nối như mô tả trong B.2.5.12.

**B.2.5.14** Tiến hành tiếp theo như mô tả trong 9.4.14 đến 9.4.16.



**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 6400 (ISO 707) Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
  - [2] ISO 5725:1986, Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for standard tests methods by inter-laboratory tests.
  - [3] 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.
  - [4] 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.
  - [5] TCVN 6688-1 (ISO 8262-1), Sản phẩm sữa và thực phẩm từ sữa – Xác định hàm lượng chất béo bằng phương pháp khối lượng Weibull-Berntrop (phương pháp chuẩn) – Phần 1: Thực phẩm dành cho trẻ nhỏ.
  - [6] International Dairy Federation. Interlaboratory Collaborative Studies, Second series, Bull. Int. Dairy Fed., No. 235, 1988.
-