

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 10709:2015**

**ISO 12872:2010**

Xuất bản lần 1

**DẦU ÔLIU VÀ DẦU BÃ ÔLIU –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG 2-GLYCERYL MONOPALMITATE**

*Olive oils and olive-pomace oils –  
Determination of the 2-glycerol monopalmitate content*

HÀ NỘI – 2015



## Lời nói đầu

TCVN 10709:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 12872:2010;

TCVN 10709:2015 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 ôliu và dầu bã ôliu – Xác định hàm lượng 2-glycerol monopalmitate

*Olive oils and olive-pomace oils – Determination of the 2-glycerol monopalmitate content*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định qui trình để xác định hàm lượng của 2-glycerol monopalmitate trong dầu ôliu và dầu bã ôliu dạng lỏng trong điều kiện nhiệt độ môi trường (20 °C), tính bằng phần trăm khối lượng<sup>[6]</sup>.

### 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 đây:

#### 3.1

##### **Hàm lượng 2-glycerol monopalmitate** (2-glycerol monopalmitate content)

Phần khối lượng 2-glycerol monopalmitate trong phân đoạn monoacylglycerol xác định được theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng 2-glycerol monopalmitate được tính bằng phần trăm.

#### 4 Nguyên tắc

Sau khi chuẩn bị thích hợp, mẫu được tác động với lipase tuyến tụy (pancreatic lipase). Việc thủy phân xảy ra ở vị trí số 1 và 3 của phân tử triacylglycerol sao cho thu được sản phẩm phản ứng là 2-monnoacylglycerol. Phần trăm 2-glyceryl monopalmitate trong phân đoạn monoacylglycerol sau khi silyl hóa được xác định bằng sắc kí khí mao quản.

#### 5 Thuốc thử

**CẢNH BÁO – Cần chú ý các qui định cụ thể về việc xử lý các chất gây nguy hiểm. Các tổ chức và cá nhân cần phải tuân thủ các biện pháp kỹ thuật an toàn.**

Trong suốt quá trình phân tích, chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích, nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương trừ khi có các qui định khác.

**5.1 Silica gel**, cỡ hạt 0,063 mm đến 0,200 mm (70/280 mesh), được chuẩn bị như sau: cho silica gel vào cốc sứ, sấy khô 4 h trong tủ sấy ở 160 °C, làm nguội đến nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm. Bổ sung một lượng nước tương đương với 5 % khối lượng silica gel như sau: cân 152 g silica gel vào bình nón dung tích 500 ml, thêm 8 g nước, đậy nắp và đồng hóa cẩn thận. Để yên trong ít nhất 12 h trước khi sử dụng.

**5.2 *n*-Hexan**, loại dùng cho sắc kí

**5.3 Isopropanol.**

**5.4 Hỗn hợp isopropanol-nước**, 50 ml/100 ml phần thể tích.

**5.5 Lipase tuyến tụy (pancreatic lipase)**, có hoạt độ từ 2,0 đến 10 đơn vị lipase trên miligam (xem Phụ lục C).

**5.6 Dung dịch đệm tris(hydroxymetyl) aminometan:** chuẩn bị dung dịch nước (1 mol/l) có pH bằng 8 và trộn với HCl đậm đặc với 50 ml/100 ml phần thể tích.

**5.7 Natri colat, loại enzym đặc biệt**, dung dịch nước, 0,1 g/100 g phần khối lượng.

Sử dụng dung dịch này trong vòng 15 ngày sau khi chuẩn bị.

**5.8 Canxi clorua**, dung dịch nước, 22 g/100 g phần khối lượng.

**5.9 Dietyl ete**, loại dùng cho sắc kí.

**5.10 Dung môi rửa giải:** hỗn hợp của *n*-hexan-dietyl ete, phần thể tích của *n*-hexan 87 ml/100 ml và của dietyl ete 13 ml/100 ml.

- 5.11 Natri hydroxit**, dung dịch nước, 12 g/100 g phần khối lượng.
- 5.12 Phenolphthalein**, dung dịch trong etanol, 1 g/100 ml nồng độ khối lượng.
- 5.13 Khí mang**: hydro hoặc heli, loại dùng cho sắc kí khí.
- 5.14 Các loại khí phụ trợ**, loại dùng cho sắc kí khí: khí hydro, không ẩm và không chứa các chất hữu cơ, không khí nhân tạo.
- 5.15 Thuốc thử silyl hóa**: hỗn hợp của pyridin, hexamethyldisilazane (HMDS) và trimethylchlorosilane (TMCS); các phần thể tích tương ứng: 9 ml/13 ml, 3 ml/13 ml và 1 ml/13 ml.
- 5.16 Mẫu chuẩn**: các monoacylglycerol tinh khiết và các hỗn hợp của monoacylglycerol có thành phần đã biết tương tự với mẫu.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

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

- 6.1 Bình nón**, dung tích 25 ml.
- 6.2 Cốc có mỏ**, các dung tích 100 ml, 250 ml và 300 ml.
- 6.3 Cột sắc kí bằng thủy tinh**, đường kính trong từ 21 mm đến 23 mm, dài 400 mm, có màng ngăn và nắp đậy.
- 6.4 Ống đong**, các dung tích 10 ml, 50 ml, 100 ml và 200 ml, loại A qui định trong TCVN 8488 (ISO 4788)<sup>[2]</sup>.
- 6.5 Bình cầu đáy tròn**, dung tích 100 ml và 250 ml.
- 6.6 Bộ cô quay**.
- 6.7 Ống li tâm**, đáy hình nón, dung tích 10 ml, có nắp thủy tinh mài.
- 6.8 Máy li tâm**, thích hợp với các ống 10 ml và 100 ml.
- 6.9 Nồi cách thủy**, có khả năng duy trì nhiệt độ ở  $(40 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .
- 6.10 Pipet chia độ**, dung tích 1 ml và 2 ml, loại A qui định trong TCVN 7150 (ISO 835)<sup>[1]</sup>.
- 6.11 Xyranh**, dung tích 1 ml.
- 6.12 Microxyranh**, dung tích 100  $\mu\text{l}$ .

**6.13 Phễu chiết**, dung tích 1 000 ml.

**6.14 Máy sắc kí khí**, thích hợp để dùng với các cột mao quản, được trang bị các bộ phận qui định trong 6.14.1 đến 6.14.5.

**6.14.1 Bộ bơm lên cột lạnh.**

**6.14.2 Detector ion hóa ngọn lửa.**

**6.14.3 Lò cột**, có thể duy trì nhiệt độ chính xác  $\pm 1$  °C.

**6.14.4 Hệ thống tích phân sử dụng máy tính.**

**6.14.5 Cột mao quản silica nung chảy**, dài từ 8 m đến 12 m và đường kính trong từ 0,25 mm đến 0,32 mm, được phủ methylpolysiloxane hoặc phenyl methylpolysiloxane 5 %, có độ dày màng từ 0,10  $\mu\text{m}$  đến 0,30  $\mu\text{m}$ , thích hợp để sử dụng ở 370 °C.

**6.15 Microxyranh**, dung tích 10  $\mu\text{l}$ , có kim tiêm, dài tối thiểu 7,5 cm, thích hợp để bơm lên cột.

## **7 Lấy mẫu**

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555) <sup>[3]</sup>.

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

## **8 Chuẩn bị mẫu thử**

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6128 (ISO 661). Các loại dầu có độ axit tự do lớn hơn 3 % cần được trung hòa như sau.

Cho 50 g dầu vào phễu chiết 1 000 ml (6.13) và hòa tan trong 200 ml *n*-hexan (5.2). Thêm 100 ml isopropanol (5.3) và một lượng dung dịch natri hydroxit (5.11) tương đương với độ axit tự do của dầu cộng với một lượng dư 5 %. Lắc mạnh trong 1 min, thêm 100 ml nước, lắc lại rồi để lắng.

Sau khi tách lớp, loại bỏ lớp xà phòng phía dưới. Loại bỏ tiếp lớp trung gian của chất nhầy và chất không tan thường có. Rửa tiếp dung dịch *n*-hexan của dầu với các phần từ 50 ml đến 60 ml hỗn hợp isopropanol-nước (5.4) cho đến khi nước rửa trung tính với phenolphthalein (5.12).

Loại bỏ hầu hết hexan bằng cách chưng cất trong điều kiện chân không, ví dụ, dùng bộ cô quay (6.6) và chuyển dầu vào bình cầu đáy tròn 100 ml (6.5). Làm khô trong điều kiện không để loại bỏ hết dung môi còn lại.



Khi kết thúc qui trình này, đảm bảo rằng độ axit của dầu dưới 0,5 %.

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Bước chuẩn bị sơ bộ

**9.1.1** Cho 1,0 g dầu, đã xử lý sơ bộ (Điều 8) nếu cần, vào bình nón 25 ml (6.1) và hòa tan trong 10 ml dung môi rửa giải (5.10). Để dung dịch lắng trong ít nhất 15 min trước khi bắt đầu qui trình sắc kí cột silica gel.

Nếu dung dịch bị đục thì li tâm để đảm bảo các điều kiện tối ưu cho sắc kí.

Có thể sử dụng các cột chiết pha rắn silica gel (SPE) 500 mg có sẵn.

**9.1.2** Đổ đầy cột sắc kí (6.3) với khoảng 30 ml dung môi rửa giải (5.10), dùng que thủy tinh chèn miếng bông cotton vào đáy cột; ấn để loại khí.

Chuẩn bị huyền phù của 25 g silica gel (5.1) trong khoảng 80 ml dung môi rửa giải vào cốc có mở rồi dùng phễu chuyển lên cột.

Đảm bảo rằng tất cả silica gel được chuyển lên cột; rửa bằng dung môi rửa giải, mở nút và để dung môi tháo chảy cho đến khi còn khoảng 2 mm dung môi phía trên silica gel.

### 9.2 Sắc kí cột

#### 9.2.1 Qui trình qui ước (chuẩn)

Cân 1,0 g mẫu thử đã chuẩn bị (9.1.1), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình nón 25 ml (6.1).

Hòa tan mẫu trong 10 ml dung môi rửa giải (5.10). Chuyển dung dịch lên cột sắc kí (9.1.2). Tránh xáo trộn bề mặt cột.

Mở nút và để dung dịch mẫu chảy hết cho đến khi chạm mức silica gel. Rửa giải bằng 150 ml dung môi rửa giải. Chỉnh tốc độ dòng 2 ml/min (150 ml phải đi qua cột trong vòng 60 min đến 70 min).

Thu dịch rửa giải vào bình cầu đáy tròn dung tích 250 ml (6.5) đã được cân trước. Làm bay hơi dung môi trong điều kiện chân không rồi loại bỏ các vết dung môi cuối cùng dưới dòng nitơ.

Cân bình rồi tính chênh lệch khối lượng.

#### 9.2.2 Qui trình sử dụng các cột silica SPE sẵn có

Đưa 1 ml dung dịch (9.1.1) vào các cột đã được ổn định trước bằng 3 ml *n*-hexan (5.2). Sau khi ngâm chiết dung dịch, rửa giải bằng 4 ml dung môi rửa giải *n*-hexan-dietyl ete (5.10). Thu lại dịch rửa giải vào

ống 10 ml và cho bay hơi đến khô dưới dòng nitơ. Cho cặn khô tác động với lipase tuyến tụy (pancreatic lipase) (5.5). Kiểm tra thành phần axit béo trước và sau khi đi qua cột SPE.

### **9.3 Thủy phân bằng lipase tuyến tụy (pancreatic lipase)**

**9.3.1** Cân 0,1 g dầu cho vào ống li tâm (6.7). Thêm 2 ml dung dịch đệm (5.6), 0,5 ml dung dịch natri colat (5.7) và 0,2 ml dung dịch canxi clorua (5.8), lắc đều sau mỗi lần thêm. Đậy ống bằng nắp thủy tinh và đặt vào nồi cách thủy (6.9) ở  $(40 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

**9.3.2** Thêm 20 mg lipase (5.5), trộn kỹ (không làm ướt nắp) và đặt vào nồi cách thủy chính xác 2 min, lấy ống ra, lắc mạnh chính xác trong 1 min rồi để nguội.

**9.3.3** Thêm 1 ml dietyl ete (5.9), đậy nắp và lắc mạnh, sau đó li tâm rồi dùng microxyranh chuyển dung dịch ete vào ống khô, sạch khác.

### **9.4 Chuẩn bị các dẫn xuất đã silyl hóa**

Dùng microxyranh lấy 100  $\mu\text{l}$  dung dịch (9.3.3) và chuyển vào ống li tâm 10 ml (6.7). Loại bỏ dung môi dưới dòng nitơ nhẹ, thêm 200  $\mu\text{l}$  thuốc thử silyl hóa (5.15), đậy ống rồi để lắng trong 20 min.

Sau 20 min, thêm 5 ml *n*-hexan (5.2). Dung dịch này sẵn sàng để chạy sắc kí khí.

### **9.5 Sắc kí khí**

#### **9.5.1 Các điều kiện vận hành**

Các điều kiện sau đây được khuyến cáo:

- a) nhiệt độ bơm: dưới điểm sôi của dung môi ( $68 ^\circ\text{C}$ );
- b) nhiệt độ detector:  $350 ^\circ\text{C}$ ;
- c) chương trình nhiệt độ lò: đẳng nhiệt ở  $60 ^\circ\text{C}$  trong 1 min; tiếp theo tăng với tốc độ  $15 ^\circ\text{C}/\text{min}$  đến  $180 ^\circ\text{C}$ , sau đó với tốc độ  $5 ^\circ\text{C}/\text{min}$  đến  $340 ^\circ\text{C}$ ; cuối cùng duy trì ở nhiệt độ  $340 ^\circ\text{C}$  trong 20 min.
- d) khí mang: hydro hoặc heli, được điều chỉnh tốc độ tuyến tính thích hợp để thu được độ phân giải nêu trong Phụ lục A.
- e) thời gian lưu của triacylglycerol  $\text{C}_{54}$ :  $(40 \pm 5)$  min (xem Hình A.2);
- f) thể tích bơm: 0,5  $\mu\text{l}$  đến 1  $\mu\text{l}$  dung dịch thu được trong 9.4.

Tối ưu hóa các điều kiện chiết để có được độ phân giải yêu cầu. Đảm bảo rằng chiều cao pic đối với 2-glyceryl monopalmitate ít nhất là 10 % giá trị toàn thang đo.

## 9.5.2 Nhận biết các pic

Các monoacylglycerol riêng lẻ được nhận biết bằng cách so sánh thời gian lưu thu được với thời gian lưu của hỗn hợp monoacylglycerol chuẩn được phân tích trong cùng điều kiện.

### 9.5.1 Đánh giá định lượng

Diện tích của từng pic được tính bằng tích phân điện tử.

## 10 Biểu thị kết quả

Hàm lượng 2-glyceryl monopalmitate,  $w_{MP}$ , biểu thị bằng phần trăm khối lượng, được tính từ tỷ số giữa diện tích pic tương ứng và tổng diện tích pic của tất cả các monoacylglycerol (xem Hình A.2) như sau:

$$w_{MP} = \frac{A_{MP}}{\sum A} \times 100$$

trong đó

$A_{MP}$  là diện tích pic của 2-glyceryl monopalmitate;

$\sum A$  là tổng diện tích pic của tất cả các monoacylglycerol.

Báo cáo kết quả đến một 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 về độ chụm 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 các 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 một phương pháp thử, tiến hành trên cùng một vật liệu thử, thực hiện trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người phân tích, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị  $r$  nêu trong Bảng B.1.

### 11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử, tiến hành trên cùng một vật liệu thử, thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những

## **TCVN 10709:2015**

người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị  $R$  nêu trong Bảng B.1.

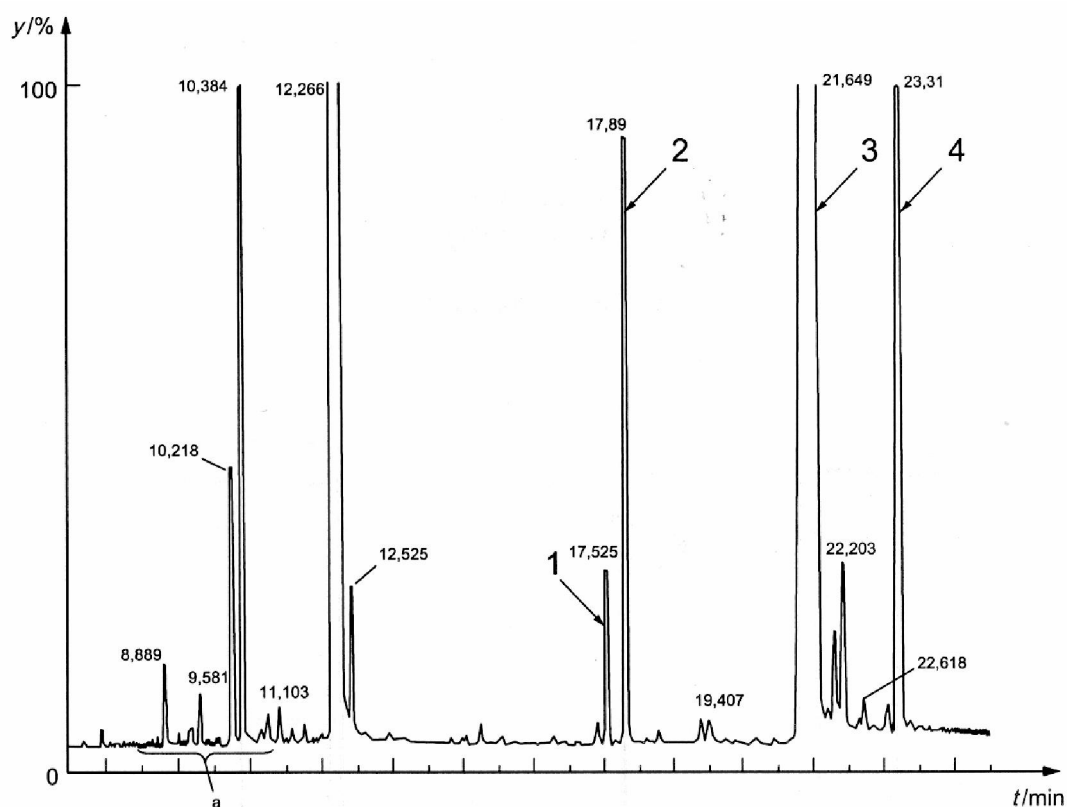
### **12 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải ít nhất bao gồm các thông tin sau đây:

- a) mọi thông tin cần thiết về 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) kết quả thử nghiệm thu được;
- e) nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.
- f) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Sắc ký đồ**

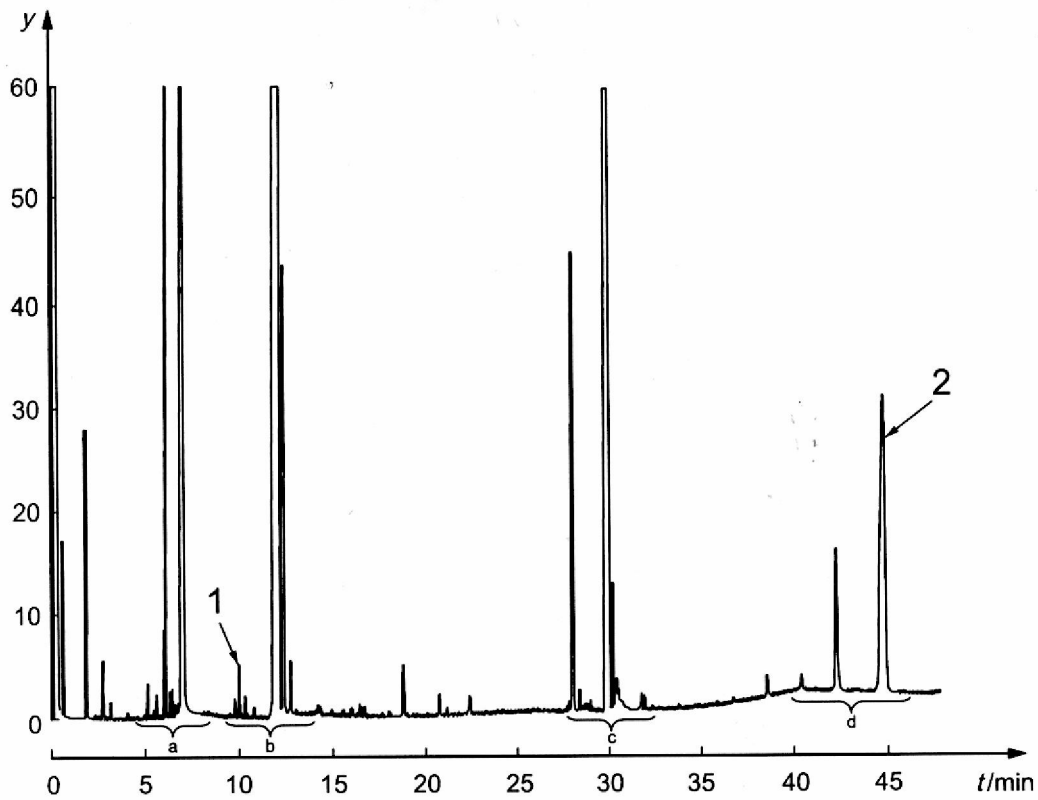


**CHÚ DẪN**

- 1 2-monopalmitoleine
- 2 2-monopalmitate
- 3 2-mono C<sub>18</sub> chưa bão hòa
- 4 squalene

$t$  thời gian  
 $y$  số đo kích thước pic tương ứng  
 a các axit béo tự do

**Hình A.1 – Sắc ký đồ của các sản phẩm phản ứng silyl hóa thu được bằng tác động của lipase lên dầu ô liu tinh luyện đã bổ sung 20 % thể tích dầu đã este hóa**



**CHÚ DẪN**

- 1 2-monopalmitate
- 2 triacylglycerol C<sub>54</sub>

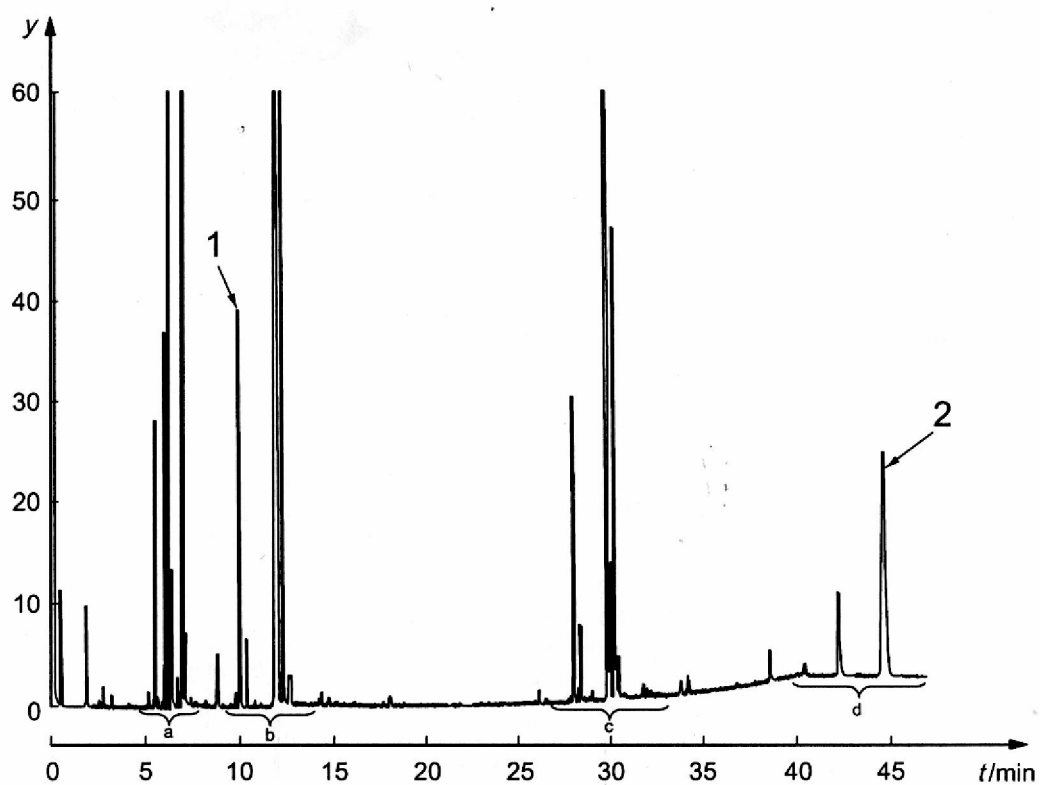
*t* thời gian

*y* số đo kích thước pic tương ứng, đơn vị tùy chọn

**CHÚ THÍCH** Trong các điều kiện này (cột mao quản từ 8 m đến 12 m), phân đoạn sáp được rửa giải cùng với diacylglycerol hoặc ngay sau đó. Sau khi tác động lipase, hàm lượng triacylglycerol không được quá 15 % khối lượng.

- <sup>a</sup> Các axit béo tự do.
- <sup>b</sup> Các monoacylglycerol.
- <sup>c</sup> Các diacylglycerol.
- <sup>d</sup> Các triacylglycerol.

**Hình A.2 – Dầu ôliu chưa qua xử lý sau khi tác động lipase và sau khi silyl hóa**

**CHÚ DẪN**

- 1 2-monopalmitate  
2 triacylglycerol C<sub>54</sub>

$t$  thời gian

$y$  số đo kích thước pic tương ứng, đơn vị tùy chọn

**CHÚ THÍCH** Trong các điều kiện này (cột mao quản 8 m đến 12 m), phân đoạn sáp được rửa giải cùng với phân đoạn diacylglycerol hoặc ngay sau đó. Sau khi tác động lipase, hàm lượng triacylglycerol không được quá 15 % khối lượng.

- <sup>a</sup> Các axit béo tự do.  
<sup>b</sup> Các monoacylglycerol.  
<sup>c</sup> Các diacylglycerol.  
<sup>d</sup> Các triacylglycerol.

**Hình A.3 – Dầu este hóa sau khi tác động lipase và sau khi silyl hóa**

**Phụ lục B**

(Tham khảo)

**Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm**

Dữ liệu về độ chụm trong Bảng B.1 được lấy từ các kết quả của thử nghiệm cộng tác quốc tế.

Phép thử liên phòng thử nghiệm do Hội đồng dầu quốc tế tổ chức và do Trường Đại học Genoa điều phối. Thành phần tham gia gồm 12 phòng thử nghiệm của năm quốc gia.

Các kết quả thử nghiệm đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)<sup>[4]</sup> và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)<sup>[5]</sup> cho dữ liệu về độ chụm nêu trong Bảng B.1. Các phòng thử nghiệm ngoại lệ được kiểm tra bằng các phép thử Cochran và Grubbs đối với các kết quả phòng thử nghiệm cho mỗi phép xác định (lặp lại a và b) và cho mỗi mẫu thử.

**Bảng B.1 – Các kết quả thống kê**

Thông số	A	B	C	D	E
	Dầu ôliu nguyên chất đặc biệt	Dầu ôliu nguyên chất dùng để đốt (lampante)	Dầu ôliu tinh luyện	Dầu ôliu tinh luyện và dầu este hóa lại (90 + 10) % phần thể tích	Dầu ôliu tinh luyện và dầu este hóa lại (80 + 20) % phần thể tích
Số lượng các phòng thử nghiệm tham gia, $n_p$	12	12	12	12	12
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ, $n_p$	12	12	12	12	12
Số lượng kết quả trong tất cả các phòng thử nghiệm, $n_t$	24	24	24	24	24
Hàm lượng glyceryl monopalminat trung bình, $\bar{w}_{MP}$ , % khối lượng	0,46	0,75	0,90	1,81	2,82
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ , %	0,04	0,04	0,06	0,04	0,09
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{V,r}$ , %	8,91	5,44	6,77	1,95	3,32
Giới hạn tái lập, $r$ , %	0,11	0,11	0,17	0,10	0,26
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , %	0,05	0,10	0,09	0,20	0,31
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$ , %	11,07	12,66	10,16	11,07	10,88
Giới hạn tái lập, $R$ , %	0,14	0,27	0,26	0,56	0,86



## Phụ lục C

(Tham khảo)

### Chuẩn bị và hoạt độ của lipase

#### C.1 Các thuốc thử bổ sung

C.1.1.1 Axeton, khan.

C.1.1.2 Dung dịch gôm arabic, 100 g/l.

C.1.1.3 Natri colat, dung dịch emzym loại đặc biệt, 0,2 g/ml.

C.1.1.4 Dung dịch natri hydroxit, 0,1 mol/l.

#### C.2 Chuẩn bị lipase

Lipase có bán sẵn nhưng có thể cũng được chuẩn bị trong phòng thử nghiệm như sau.

Lấy 5 kg tụy lợn tươi đã được làm lạnh đến 0 °C. Loại bỏ chất béo rắn xung quanh và mô liên kết rồi nghiền nhỏ trong máy nghiền trộn để thu được hỗn hợp nhão dạng lỏng. Khuấy hỗn hợp nhão này trong 4 h đến 6 h với 2,5 l axeton (C.1.1.1) và li tâm. Chiết phần còn lại hơn ba lần với cùng một thể tích axeton, sau đó hai lần với hỗn hợp axeton và dietyl ete (5.9) (50 ml/100 ml phần thể tích) và hai lần với dietyl ete.

Làm khô phần còn lại 48 h trong kiện chân không để thu được dạng bột ổn định. Hỗn hợp này khi được bảo quản trong tủ lạnh và tránh ẩm có thể ổn định trong thời gian dài.

#### C.3 Kiểm tra hoạt độ của lipase

Chuẩn bị nhũ tương dầu ôliu như sau:

Lắc hỗn hợp của 165 ml dung dịch gôm arabic (C.1.1.2), 15 g đá lạnh nghiền nhỏ và 20 ml dầu ôliu trung tính trong bộ khuấy thích hợp 10 min.

Cho 10 ml nhũ tương này vào cốc có mỏ 50 ml, sau đó thêm tiếp 0,3 ml dung dịch natri colat (C.1.1.3) và 20 ml nước vào cốc.

Đặt cốc có mỏ vào tủ ổn định nhiệt ở 37 °C; nhúng các điện cực của máy đo pH và thanh khuấy.

Dùng buret thêm dung dịch natri hydroxit (C.1.1.4) từng giọt cho đến khi pH đạt 8,3.

## TCVN 10709:2015

Bổ sung huyền phù nước của lipase được kiểm tra (nồng độ khối lượng lipase 0,1 g/ml). Kiểm tra pH. Ngay khi pH đạt 8,3, bật đồng hồ bấm giây và cho chảy nhỏ giọt vào dung dịch natri hydroxit ở tốc độ như trên sao cho duy trì được pH ở 8,3. Ghi lại thể tích dung dịch đã tiêu tốn trong mỗi phút.

Ghi lại những quan sát được theo dạng đồ thị, dựng các số đọc thời gian trên trục hoành và thể tích dung dịch natri hydroxit cần thiết để duy trì pH không đổi, tính bằng mililit trên trục tung. Đồ thị thu được phải tuyến tính.

Hoạt độ, lipase, A, đo được tính bằng đơn vị lipase trên milgam, được tính bằng công thức sau:

$$A = \frac{q_v c \times 1000}{m}$$

Trong đó

- $q_v$  là tốc độ tiêu tốn, của dung dịch natri hydroxit (tính được từ đồ thị), tính bằng mililit trên phút (ml/min);
- $c$  là hàm lượng nồng độ dung dịch natri hydroxit (0,1 mol/l), tính bằng mol trên lit (mol/l);
- $m$  là khối lượng lipase được sử dụng trong phép thử, tính bằng gam (g).

Đơn vị lipase được xác định là lượng enzym giải phóng 10 micro đương lượng axit trên phút.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*
  - [2] TCVN 8488 (ISO 4788), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Ống đong chia độ.*
  - [3] TCVN 2625 (ISO 5555) *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
  - [4] 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.*
  - [5] 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.*
  - [6] COI/T.20/Doc. 23:2006, *Method of analysis: Determination of wax content by capillary column gas chromatography.*
-