

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9674:2013

ISO 6800:1997

Xuất bản lần 1

**DẦU MỠ ĐỘNG VẬT VÀ THỰC VẬT –
XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN AXIT BÉO Ở VỊ TRÍ SỐ 2
CỦA CÁC PHÂN TỬ TRIGLYCERID**

*Animal and vegetable fats and oils – Determination of the composition
of fatty acids in the 2-position of the triglyceride molecules*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 9674:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 6800:1997;

TCVN 9674:2013 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 động vật và thực vật – Xác định thành phần axit béo ở vị trí số 2 của các phân tử triglycerid

Animal and vegetable fats and oils – Determination of the composition of fatty acids in the 2-position of the triglyceride molecules

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định thành phần của các axit béo đã este hóa ở vị trí số 2 (vị trí β hoặc bên trong) của các phân tử triglycerid trong dầu mỡ động vật và thực vật.

Phương pháp này chỉ có thể áp dụng cho dầu và mỡ có điểm nóng chảy dưới 45 °C vì bản chất của hoạt động enzym lipase tuyến tụy.

Phương pháp này được áp dụng không hạn chế đối với tất cả dầu và mỡ có chứa hàm lượng đáng kể của:

- các axit béo có ít hơn hoặc bằng 12 nguyên tử cacbon (ví dụ: dầu dừa, dầu cọ, butyric butter fat);
- các axit béo có nhiều hơn hoặc bằng 20 nguyên tử cacbon và có độ chưa bão hòa cao (nhiều hơn bốn liên kết đôi) (ví dụ: dầu cá hoặc dầu từ động vật biển);
- các axit béo có các nhóm thứ cấp chứa oxy.

CHÚ THÍCH: Các axit béo với các liên kết đôi ở vị trí ($n-16$) đến ($n-11$) (ví dụ: axit petroselinic) được chuyển đổi rất chậm bởi enzym lipase tuyến tụy. Điều này có thể dẫn đến kết quả sai.

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 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*.

TCVN 9674:2013

TCVN 6127:2007 (ISO 660:1996), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Xác định trị số axit và độ axit.*

TCVN 6128:1996 (ISO 661:1989)¹⁾, *Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị mẫu thử.*

ISO 5508, *Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids (Dầu mỡ động vật và thực vật – Phân tích các metyl este của axit béo bằng sắc kí khí).*

ISO 5509²⁾, *Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids (Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị các metyl este của axit béo).*

3 Nguyên tắc

Sau khi trung hòa các axit béo tự do, tinh sạch phần mẫu thử bằng sắc kí cột, nếu cần. Thủy phân từng phần các glycerid bằng enzym để tạo thành các 2-monoglycerid. Tách các monoglycerid bằng sắc kí lớp mỏng (TLC) và xác định thành phần axit béo của chúng bằng sắc kí khí.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước phù hợp với loại 2 quy định trong TCVN 4851 (ISO 3696).

4.1 Thuốc thử để tinh sạch phần mẫu thử

4.1.1 **2-Propanol**, hoặc **etanol**, 95 % (thể tích).

4.1.2 **Hexan** (nếu có sẵn) hoặc **dầu nhẹ** (dải sôi từ 30 °C đến 60 °C).

4.1.3 **2-Propanol**, 50 % (thể tích), hoặc **etanol**, 50 % (thể tích).

4.1.4 **Natri hydroxit**, dung dịch 0,5 mol/l.

4.1.5 **Dung dịch phenolphthalein**, 1 g trên 100 ml etanol, 95 % (thể tích).

4.1.6 **Alumin trung tính đã hoạt hóa**, dành cho sắc kí hoạt tính Brockmann I, mới được hoạt hóa trong 2 h ở 260 °C và được giữ trong bình hút ẩm.

4.1.7 **Nitơ**.

¹⁾ TCVN 6128:1996 (ISO 661:1989) đã được thay thế bởi TCVN 6128:2007 (ISO 661:2003), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Chuẩn bị mẫu thử.*

²⁾ ISO 5509 đã được thay thế bởi ISO 12966-2:2011, tiêu chuẩn này đã được biên soạn thành TCVN 9675-2:2013 (ISO 12966-2:2011), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Sắc kí khí các metyl este của axit béo – Phần 2: Chuẩn bị metyl este của axit béo.*

4.2 Thuốc thử để thủy phân triglycerid

4.2.1 Dietyl ete, không chứa peroxit.

4.2.2 Axit clohydric, dung dịch 6 mol/l.

4.2.3 Natri cholat, dung dịch 1 g/l, chất lượng phù hợp với phương pháp enzym.

4.2.4 Canxi clorua, dung dịch 220 g/l.

4.2.5 Dung dịch đệm, 2-amino-2-(hydroxymetyl)propan-1,3-diol³⁾ 1 mol/l, được chỉnh đến pH 8 bằng axit clohydric (4.2.2), sử dụng máy đo pH.

Bảo quản dung dịch này trong khoảng từ 0 °C đến 4 °C và sử dụng trong vòng 14 ngày.

4.2.6 Lipase tuyến tụy, có hoạt độ trong khoảng từ 8 đơn vị/mg đến 20 đơn vị/mg.

Bảo quản khô trong tủ lạnh. Trước khi sử dụng, đưa phần bột đến nhiệt độ môi trường.

CHÚ THÍCH: Lipase với hoạt độ thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Nếu cần, có thể chuẩn bị và phân tích lipase theo quy trình mô tả trong Phụ lục A.

4.3 Thuốc thử để tách 2-monoglycerid

4.3.1 Etanol, 95 % (thể tích).

4.3.2 Hexan (nếu có sẵn) hoặc dầu nhẹ, dải sôi từ 30 °C đến 60 °C.

4.3.3 Axeton.

4.3.4 Bột silica, với chất kết dính, dùng cho sắc kí lớp mỏng.

4.3.5 Dung môi triển khai, được chuẩn bị như sau:

hexan (nếu có sẵn) hoặc dầu nhẹ:	70 ml
dietyl ete:	30 ml
axit formic, 98 % (thể tích)	1 ml

4.3.6 2',7'-Diclorofluresin, dung dịch chỉ thị, 2 g/l trong etanol được kiềm hóa nhẹ bằng cách thêm một giọt natri hydroxit 1 mol/l trên 100 ml dung dịch.

4.4 Thuốc thử để phân tích 2-monoglycerid bằng sắc kí khí

Xem ISO 5508 và ISO 5509.

³⁾ Các tên khác là: tris(hydroxymetyl)metylamin; tris(hydroxymetyl)aminometan.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Thiết bị để tinh sạch phần mẫu thử

5.1.1 Nồi cách thủy, kiểm soát được nhiệt độ và có thể duy trì được ở 30 °C đến 40 °C.

5.1.2 Cột thủy tinh, dùng cho sắc kí, đường kính trong 13 mm và dài 400 mm, có đáy thủy tinh siêu kết và vôi.

5.1.3 Máy cô quay, có bình cầu dung tích 250 ml.

5.1.4 Hệ thống ống, dùng cho bột khí nitơ.

5.1.5 Phễu chiết, dung tích 500 ml.

5.1.6 Bình cầu đáy tròn, dung tích 100 ml.

5.2 Thiết bị để thủy phân triglycerid

5.2.1 Máy ly tâm.

5.2.2 Ống ly tâm, bằng thủy tinh, dung tích 10 ml, có nút mài.

5.2.3 Máy lắc rung bằng điện, để khuấy trộn mạnh ống ly tâm.

5.2.4 Nồi cách thủy, kiểm soát được nhiệt độ ổn định và có khả năng duy trì ở 40 °C ± 0,5 °C.

5.2.5 Bơm tiêm, dung tích 1 ml, có kim nhỏ.

5.2.6 Đồng hồ bấm giờ.

5.3 Thiết bị để tách 2-monoglycerid

5.3.1 Bình triển khai sắc kí, dùng cho sắc kí lớp mỏng, có nắp bằng thủy tinh mài, thích hợp để chứa các tấm thủy tinh kích thước 200 mm x 200 mm.

5.3.2 Bộ dàn mẫu và giá đựng, để chuẩn bị các tấm thủy tinh.

5.3.3 Tấm thủy tinh, kích thước 200 mm x 200 mm.

5.3.4 Microxyranh, có thể phân phối các giọt từ 3 µl đến 4 µl.

5.3.5 Thiết bị dùng để phun dung dịch chỉ thị lên các tấm thủy tinh.

5.3.6 Dao trộn nhỏ

5.3.7 Tủ sấy, có thể duy trì nhiệt độ ở $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.8 Đèn cực tím, để kiểm tra các tấm sắc kí, ví dụ với bước sóng 254 nm.

5.3.9 Bình cầu đáy tròn, dung tích 25 ml, có **bộ sinh hàn không khí** dài khoảng 1 m với khớp nối mài.

5.3.10 Bình nón, dung tích 250 ml có nắp mài.

5.3.11 Bình nón, dung tích 50 ml (nếu cần).

5.3.12 Bộ lọc, bằng thủy tinh xốp, với độ xốp P 40 (16 μm đến 40 μm) (nếu cần).

5.3.13 Bình hút ẩm, có chứa chất hút ẩm hiệu quả.

5.4 Thiết bị để phân tích 2-monoglycerid bằng sắc kí khí

Xem ISO 5508 và ISO 5509.

6 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 và vận chuyển.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555)^[1].

7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử từ mẫu phòng thử nghiệm theo TCVN 6128 (ISO 661).

8 Cách tiến hành

CHÚ THÍCH Nếu có yêu cầu kiểm tra độ lặp lại thì cần tiến hành hai phép xác định đơn lẻ theo 8.1 đến 8.6.

8.1 Xác định độ axit của mẫu thử

Xác định độ axit của mẫu thử theo TCVN 6127 (ISO 660).

Nếu độ axit dưới 3 % (khối lượng) thì tinh sạch mẫu qua alumin theo 8.3.

Nếu độ axit vượt quá 3 % (khối lượng) thì trước tiên trung hòa mẫu bằng natri hydroxit với sự có mặt của dung môi theo 8.2 sau đó tinh sạch qua alumin theo 8.3.

8.2 Trung hòa bằng natri hydroxit

Hòa tan khoảng 10 g mẫu thử trong 100 ml hexan (nếu có sẵn) hoặc dầu nhẹ (4.1.2) và chuyển dung dịch vào phễu chiết (5.1.5). Thêm 50 ml 2-propanol hoặc etanol (4.1.1), vài giọt dung dịch phenolphthalein (4.1.5) và một thể tích dung dịch natri hydroxit (4.1.4) tương đương với độ axit tự do của mỡ và dầu, với lượng dư 0,5 %. Lắc mạnh khoảng 1 min, thêm 50 ml nước, tiếp tục lắc và để yên. Sau khi tách pha, tháo bỏ lớp dưới có chứa xà phòng và lớp ở giữa (các chất nhớt và chất không tan). Rửa dung dịch hexan hoặc dầu nhẹ của dầu đã trung hòa lần lượt với 25 ml hoặc 30 ml các phần dung dịch 2-propanol hoặc etanol (4.1.3) cho đến khi mất màu hồng của phenolphthalein.

Chuyển dung dịch vào bình cô quay (5.1.3) và loại bỏ hầu hết dung môi bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm. Làm khô dầu ở 30 °C đến 40 °C dưới áp suất giảm sử dụng dòng khí nitơ (4.1.7) cho đến khi dung môi được loại hết.

8.3 Tinh sạch phần mẫu thử qua alumin

Chuẩn bị huyền phù của 15 g alumina đã hoạt hóa (4.1.6) trong 50 ml hexan (nếu có sẵn) hoặc dầu nhẹ (4.1.2) và vừa lắc vừa rót vào cột thủy tinh để chạy sắc kí (5.1.2). Đảm bảo rằng alumin lắng đều và cho phép mức dung môi giảm xuống đến 1 mm đến 2 mm trên mức cao hơn của chất hấp phụ. Care thận rót vào cột dung dịch đã chuẩn bị bằng cách hòa tan 5 g phần mẫu thử đã trung hòa, nếu cần, trong 25 ml hexan (nếu có sẵn) hoặc dầu nhẹ (4.1.2) và thu tất cả dịch rửa giải từ cột vào bình cầu đáy tròn 100 ml (5.1.6).

Loại bỏ hầu hết dung môi bằng cách làm bay hơi dưới áp suất giảm, sau đó làm khô dầu ở 30 °C đến 40 °C sử dụng dòng khí nitơ (4.1.7) cho đến khi dung môi được loại bỏ hoàn toàn.

8.4 Thủy phân các triglycerid

8.4.1 Cân khoảng 0,1 g phần mẫu thử đã tinh sạch (8.3) cho vào ống ly tâm 10 ml (5.2.2). Nếu phần mẫu thử này không ở dạng lỏng, ở nhiệt độ môi trường thì đặt ống vào nồi cách thủy có nhiệt độ trong khoảng từ 60 °C đến 65 °C. Nếu sau đó phần mẫu thử không hóa lỏng hoàn toàn thì tiếp tục ngâm thêm không quá 10 s.

Lấy ống nghiệm ra khỏi nồi cách thủy và tiếp tục ngay các bước quy định trong 8.4.2 đến 8.4.5.

8.4.2 Thêm 20 mg lipase (4.2.6) vào phần mẫu thử đã hóa lỏng đã biết trước khối lượng và thêm 2 ml dung dịch đệm (4.2.5). Lắc cẩn thận và thêm lần lượt 0,5 ml dung dịch natri cholat (4.2.3) và 0,2 ml dung dịch canxi clorua (4.2.4).

Đậy nắp, lắc thật cẩn thận và đặt ngay ống vào nồi cách thủy ở 40 °C, tiếp tục lắc bằng tay khoảng 60 s ± 2 s. Các thao tác này phải được thực hiện trong khoảng 30 s.

8.4.3 Lấy ống nghiệm ra khỏi nồi cách thủy và lắc mạnh ở 40 °C trong 120 s ± 2 s sử dụng máy lắc (5.2.3).

8.4.4 Thêm ngay 1 ml axit clohydric (4.2.2) và khoảng 1 ml dietyl ete (4.2.1). Đậy nắp và dùng máy lắc (5.2.3) lắc mạnh.

8.4.5 Ly tâm và chuyển pha hữu cơ vào ống nghiệm sử dụng xyranh (5.2.5). Nếu phần mẫu thử dạng rắn ở nhiệt độ môi trường thì lặp lại quá trình chiết bằng cách thêm 1 ml dietyl ete và gộp dịch chiết vào ống nghiệm.

8.5 Phân tách 2-monoglycerid

8.5.1 Chuẩn bị các tấm thủy tinh

CHÚ THÍCH Các tấm thủy tinh đã chuẩn bị có bán sẵn trên thị trường.

Làm sạch cẩn thận các tấm thủy tinh (5.3.3) bằng etanol (4.3.1), hexan hoặc dầu nhẹ (4.3.2) và axeton (4.3.3) cho đến khi chất béo được loại bỏ hoàn toàn.

Cân 30 g silica (4.3.4) cho vào bình nón 250 ml (5.3.10). Thêm 60 ml nước. Đậy nắp và lắc mạnh khoảng 1 min. Đưa ngay chất huyền phù vào bộ dàn mẫu (5.3.2). Dàn một lớp dày 0,25 mm trên các tấm thủy tinh sạch. Để tấm thủy tinh khô ít nhất 1 h trong không khí.

Trong mọi trường hợp, khi các tấm sắc kí đã được chuẩn bị như trên hoặc đã chuẩn bị sẵn thì hoạt hóa các tấm này trong tủ sấy (5.3.7) đã cài đặt ở nhiệt độ 103 °C trong 1 h. Trước khi sử dụng, để các tấm này nguội đến nhiệt độ môi trường trong bình hút ẩm (5.3.13).

Để tránh dịch chuyển acyl, các tấm silica gel phải được làm ướt bằng axit boric. Hỗn hợp phản ứng phải được tách bằng TLC càng sớm càng tốt.

Do một số silica có chứa các sản phẩm hữu cơ có thể ảnh hưởng đến các axit béo trong quá trình phân tích bằng sắc kí, nên cần tiến hành phép thử trắng để đảm bảo rằng các chất này không có mặt. Mặt khác, làm sạch các tấm đã chuẩn bị trước bằng cách đặt chúng trong bình triển khai sắc kí với dung môi (4.3.5) và để dung môi chạm đến đỉnh của tấm sắc kí.

8.5.2 Tách 2-monoglycerid

Dùng microxyranh (5.3.4), chuyển dịch chiết (8.4.5) vào tấm đã chuẩn bị (8.5.1) theo một dải liên tục các giọt đều nhau cách mỗi cạnh 15 mm.

Để tấm trong bình triển khai sắc kí (5.3.1) đã được bão hòa trước với dung môi triển khai (4.3.5). Đậy nắp và triển khai tấm cho đến khi dung môi chạm đến điểm cách mép 10 mm.

Cho khai triển các tấm ở nhiệt độ khoảng 20 °C.

TCVN 9674:2013

Làm khô tẩm trong không khí ở khoảng 20 °C và phun dung dịch chỉ thị (4.3.6) lên tẩm, sử dụng thiết bị phun (5.3.5). Đánh dấu dải monoglycerid (khoảng $R_f = 0,035$) dưới đèn cực tím (5.3.8) và dùng dao trộn nhỏ (5.3.6) để vết sạch. Tránh lấy phải các thành phần còn lại trên đường vạch khởi đầu.

Đối với các phần mẫu thử đã tinh sạch (8.3) ở dạng lỏng khi ở nhiệt độ môi trường, chuyển silica thu được vào bình metyl hóa 25 ml (5.3.9) và tiến hành theo 8.6.

Đối với tất cả các phần mẫu thử đã tinh sạch (8.3) ở dạng rắn khi ở nhiệt độ môi trường, chuyển silica vào bình nón 50 ml (5.3.11) với 15 ml dietyl ete. Lắc mạnh và chuyển tất cả silica vào bộ lọc thủy tinh xốp (5.3.12). Rửa bộ lọc ba lần, mỗi lần với 15 ml dietyl ete và thu lấy dịch lọc vào bình cô quay. Làm bay hơi dung dịch dietyl ete xuống khoảng 4 ml đến 5 ml và chuyển vào bình cầu đáy tròn 25 ml (5.3.9) đã biết trước khối lượng. Làm bay hơi dung môi trong dòng khí nitơ. Cân phần còn lại. Lượng monoglycerid thu được cần nằm trong khoảng 10 % đến 30 % (khối lượng) của phần mẫu thử. Nếu không thì thực hiện lại quá trình thủy phân triglycerid (8.3) hoặc kiểm tra lại hoạt độ của lipase (xem Phụ lục A).

8.6 Phân tích 2-monoglycerid bằng sắc kí khí

Chuẩn bị metyl este của các axit béo trong monoglycerid bằng cách xử lý silica thu được (hoặc monoglycerid chiết được từ silica) ngay theo ISO 5509, sử dụng phương pháp bo triflorua hoặc phương pháp khác có thể áp dụng cho dầu và mỡ trung tính. Tiến hành sắc kí khí metyl este theo ISO 5508.

9 Biểu thị kết quả

Tính tỷ lệ của các este axit béo với vị trí số 2, biểu thị bằng phần trăm khối lượng của tổng este axit béo của 2-monoglycerid.

Ghi kết quả đến một chữ số thập phân.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các 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 chất nền khác với các dải nồng độ và các chất nền đã nêu.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng 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, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá:

0,2 % (khối lượng) đối với các thành phần hàm lượng < 5 % (khối lượng);

1 % (khối lượng) hoặc 3 % giá trị trung bình của hai kết quả đối với các thành phần hàm lượng \geq 5 % (khối lượng).

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử 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 khác nhau, không được quá:

0,5 % (khối lượng) đối với các thành phần hàm lượng < 5 % (khối lượng);

3 % (khối lượng) hoặc 10 % giá trị trung bình của hai kết quả đối với các thành phần hàm lượng \geq 5 % (khối lượng).

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Cũng phải đề cập đến 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.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

Phụ lục A

(Qui định)

Chuẩn bị và kiểm tra hoạt tính của lipase

A.1 Chuẩn bị lipase

Làm lạnh 5 kg tụy lợn tươi đến 0 °C. Loại bỏ phần mỡ rắn và mô liên kết xung quanh và ngâm tụy cho đến khi thu được dạng nhão. Khuấy trộn phần nhão này từ 4 h đến 6 h với 2,5 lít axeton khô trong điều kiện lạnh và sau đó ly tâm.

Chiết phần còn lại ba lần nữa sử dụng cùng thể tích axeton như trên, chiết tiếp hai lần bằng hỗn hợp của một phần thể tích axeton với một phần thể tích dietyl ete và chiết thêm hai lần với dietyl ete.

Làm khô phần còn lại trong 48 h dưới áp suất giảm cho đến khi thu được bột ổn định. Bảo quản bột này trong tủ lạnh.

A.2 Kiểm tra hoạt độ của lipase

Chuẩn bị nhũ dầu bằng cách lắc hỗn hợp của 165 ml dung dịch gôm arab 100 g/l, 15 g đá lạnh nghiền và 20 ml dầu đã trung hòa trước, trong khoảng 10 min, trong bộ trộn thích hợp.

Cho lần lượt 10 ml nhũ dầu, 0,3 ml dung dịch natri clorat (200 g/l) và 20 ml nước cất vào cốc có mỏ 50 ml.

Đặt cốc có mỏ trong nồi cách thủy ở 37 °C (xem Chú thích 1).

Cho các điện cực của máy đo pH và cánh khuấy vào trong cốc có mỏ và sử dụng buret 5 ml thêm từng giọt dung dịch natri hydroxyt 0,1 mol/l cho đến pH 8,5.

Thêm chính xác một lượng vừa đủ (xem Chú thích 2) dung dịch huyền phù 0,1 % (khối lượng) của bột lipase dùng cân phân tích. Ngay khi máy đo pH chỉ giá trị 8,3 thì bật đồng hồ bấm giờ và thêm dung dịch natri hydroxit 0,1 mol/l sao cho giá trị pH duy trì ở 8,3. Ghi lại thể tích của dung dịch kiềm được sử dụng cho từng phút trong khoảng 10 min.

Dùng đồ thị các dữ liệu thu được, trục x là thời gian và trục y là số mililit dung dịch kiềm đã sử dụng để duy trì pH không đổi. Kết quả thu được phải là đường thẳng.

CHÚ THÍCH:

- 1 Nếu sử dụng dầu lỏng thì nhiệt độ thủy phân được cố định ở 37 °C. Tuy nhiên đối với phép thử, mà nhiệt độ cố định ở 40 °C thì có thể xác định được các chất béo có điểm tan chảy dưới 45 °C.
- 2 Đối với mục đích của phép thử, sử dụng một lượng huyền phù lipase sao cho tiêu tốn 1 ml dung dịch kiềm trong khoảng 4 min hoặc 5 min. Các kết quả như vậy thường thu được bằng cách sử dụng từ 2 ml đến 5 ml huyền phù lipase, nghĩa là từ 1 mg đến 5 mg bột.

Đơn vị lipase được xác định là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μmol axit mỗi phút ở 37 °C và pH 8,3.

Hoạt độ, A , của bột được sử dụng, được biểu thị bằng đơn vị lipase trên miligam, tính bằng công thức sau:

$$A = \frac{V \times c}{m}$$

Trong đó:

- V là thể tích của dung dịch natri hydroxit đã tiêu tốn, chia cho thời gian, tính được từ đồ thị, tính bằng mililit trên phút (ml/min);
- m là khối lượng của phần mẫu thử của bột lipase, tính bằng miligam lipase được sử dụng phải có hoạt độ trong khoảng 8 đơn vị lipase đến 20 đơn vị lipase trên miligam;
- c là nồng độ của dung dịch natri hydroxit, tính bằng milimol trên lít ($c = 100 \text{ mmol/l}$).

Phụ lục B

(Tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

B.1 Phương pháp sử dụng cột nhồi

Phép thử liên phòng thử nghiệm được thực hiện ở Hà Lan với các mẫu mỡ lợn, mỡ bò và hỗn hợp 40/60 (thể tích) của mỡ lợn và mỡ bò. Có 8 phòng thử nghiệm tham gia. Các kết quả thống kê (đánh giá theo ISO 5725^[2]) được nêu trong Bảng B.1 sau khi loại trừ ngoại lệ. Các kết quả được biểu thị bằng methyl este của axit béo, bằng phần trăm khối lượng.

B.2 Phương pháp sử dụng cột mao quản GLC

Phép thử liên phòng thử nghiệm được thực hiện bởi AOCS/IOOC năm 1993, trên ba mẫu dầu ôliu. Có 24 phòng thử nghiệm tham gia. Các kết quả thống kê (đánh giá theo ISO 5725^[2]) được nêu trong Bảng B.2. Các kết quả là C16:0 và C18:0 axit béo ở vị trí 2 của phân tử triglycerid.

Bảng B.1 – Các kết quả thống kê nghiên cứu trên mỡ lợn và mỡ bò sử dụng cột nhỏ

Axit béo	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
A) Mỡ lợn							
Hàm lượng trung bình, % (khối lượng)	4,0	70,6	3,0	4,5	11,3	4,0	0,39
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,14	1,41	0,51	0,40	0,32	0,15	0,04
Hệ số biến thiên lặp lại (%)	3,5	2,0	17,0	8,8	2,8	3,7	9,8
Giới hạn lặp lại, r	0,40	4,00	1,45	1,13	0,89	0,41	0,12
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,16	1,78	0,82	0,40	0,72	0,81	0,09
Hệ số biến thiên tái lập (%)	4,1	2,5	27,4	8,9	6,3	20,4	22,6
Giới hạn tái lập, R	0,46	5,05	2,33	1,14	2,02	2,28	0,27
B) Mỡ bò							
Hàm lượng trung bình, % (khối lượng)	7,8	14,2	4,5	9,0	55,0	2,5	0,86
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,83	0,54	0,26	0,33	1,93	0,37	0,11
Hệ số biến thiên lặp lại (%)	10,6	3,8	5,8	3,6	3,5	15,0	12,5
Giới hạn lặp lại, r	2,34	1,51	0,73	0,92	5,45	1,05	0,30
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,84	0,79	0,26	0,50	2,18	0,69	0,49
Hệ số biến thiên tái lập (%)	10,7	5,6	5,9	5,5	4,0	27,8	57,4
Giới hạn tái lập, R	2,37	2,23	0,74	1,40	6,16	1,96	1,39
C) Hỗn hợp mỡ lợn và mỡ bò, 40/60 (theo thể tích)							
Hàm lượng trung bình, % (khối lượng)	6,2	36,8	3,7	7,2	38,2	3,0	0,74
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,58	0,44	0,28	0,74	1,02	0,20	0,13
Hệ số biến thiên lặp lại (%)	9,4	1,2	7,5	10,3	2,7	6,7	17,3
Giới hạn lặp lại, r	1,65	1,26	0,78	2,11	2,90	0,57	0,36
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,58	1,78	0,49	0,79	1,36	0,48	0,25
Hệ số biến thiên tái lập (%)	9,4	4,8	13,1	10,9	3,6	16,2	33,7
Giới hạn tái lập, R	1,65	5,05	1,38	2,23	3,84	1,37	0,71

**Bảng B.2 – Các kết quả thống kê nghiên cứu trên dầu ôliu
sử dụng phương pháp cột mao quản GLC**

Mẫu	1	5	8
Số lượng phòng thử nghiệm giữ lại sau khi đã trừ ngoại lệ	23	23	22
Hàm lượng trung bình, % (khối lượng)	0,86	1,39	1,02
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,06	0,07	0,06
Hệ số biến thiên lặp lại (%)	6,70	5,42	5,98
Giới hạn lặp lại, r	0,16	0,21	0,17
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,19	0,26	0,17
Hệ số biến thiên tái lập (%)	21,91	18,51	17,05
Giới hạn tái lập, R	0,53	0,73	0,49

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 2625:2007 (ISO 5555:2001), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu*
 - [2] ISO 5725:1986, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests*
-