

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 13279:2021**

**Xuất bản lần 1**

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ PAPAIN  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ**

*Foodstuffs – Determination of papain activity  
by spectrophotometric method*

**HÀ NỘI – 2021**

## **Lời nói đầu**

TCVN 13279:2021 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 971.16  
*Papain proteolytic activity. Spectrophotometric method;*

TCVN 13279:2021 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Thực phẩm – Xác định hoạt độ papain bằng phương pháp quang phổ

*Foodstuffs – Determination of papain activity by spectrophotometric method*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp quang phổ để xác định hoạt độ papain trong thực phẩm.

### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 2.1

**Đơn vị hoạt độ papain** (unit of papain activity)

**U**

Lượng papain xúc tác đủ để giải phóng 1  $\mu$ g tyrosin từ cơ chất casein trong thời gian 1 min ở nhiệt độ 40 °C, tại pH 6,0.

### 3 Nguyên tắc

Hoà tan mẫu thử enzym trong dung dịch đệm phosphat-xystein dinatri etylenedinitrilotetraacetat, tiến hành thủy phân cơ chất casein ở 40 °C, tại pH 6,0 trong 60 min sau đó dừng phản ứng bằng cách thêm dung dịch axit tricloaxetic (TCA) để kết tủa protein và lọc. Đo độ hấp thụ của dung dịch mẫu thử và mẫu trắng tương ứng ở bước sóng 280 nm. Xây dựng đường chuẩn biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa chênh lệch độ hấp thụ của dung dịch chuẩn và mẫu trắng với nồng độ enzym tương ứng. Hoạt độ papain trong mẫu thử được xác định dựa trên đường chuẩn đã xây dựng.

### 4 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước sử dụng phải là nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

#### 4.1 Dung dịch dinatri phosphat, 0,05M

Hòa tan 7,1 g dinatri hydrophosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) khan vào nước đựng trong bình định mức 1 L (5.7). Pha loãng bằng nước đến vạch và thêm 1 giọt toluen để bảo quản.

#### 4.2 Dung dịch axit xitric, 0,05 M

Hòa tan 10,5 g axit xitric trong nước sau đó chuyển vào bình định mức 1 lít (5.7). Pha loãng bằng nước đến vạch và thêm 1 giọt toluen để bảo quản.

#### 4.3 Cơ chất casein

Phân tán 5 g casein (ví dụ: loại Hammersten) trong 250 mL dung dịch dinatri phosphat 0,05 M (4.1) đựng trong cốc có mỏ 500 mL (5.8). Đặt cốc trên nồi cách thủy (5.3) và đun sôi trong 30 min, thỉnh thoảng khuấy đều. Để nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng và chỉnh đến pH  $6,0 \pm 0,1$  bằng axit xitric 0,05 M (4.2). Khuấy nhanh và liên tục trong quá trình thêm axit xitric để ngăn casein kết tủa. Chuyển dung dịch sang bình định mức 500 mL (5.7), pha loãng bằng nước đến vạch và trộn đều.

Chuẩn bị dung dịch mới mỗi lần phân tích.

#### 4.4 Dung dịch đệm phosphat-xystein dinatri etylenedinitrilotetraaxetat

Hòa tan 3,55 g dinatri hydrophosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) trong 400 mL nước đựng trong bình định mức 500 mL (5.7). Thêm 7,0 g axit dinatri dihydrat etylendiamietetraaxetic ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ETDA}$ ) và 3,05 g xystein.HCl.H<sub>2</sub>O. Trộn đều đến khi tan hoàn toàn và chỉnh đến pH  $6,0 \pm 0,1$  bằng dung dịch axit clohydric 1 M (4.7) hoặc natri hydroxit 1 M (4.8). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn đều.

Chuẩn bị dung dịch mới mỗi lần phân tích.

#### 4.5 Dung dịch axit tricloaxetic (TCA), 30 % (khối lượng/thể tích)

Hòa tan 60 g TCA vào nước sau đó chuyển vào bình định mức 200 mL (5.7). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn đều.

#### 4.6 Dung dịch chuẩn papain

##### 4.6.1 Dung dịch chuẩn gốc

Dùng cân (5.2), cân chính xác 100 mg chất chuẩn đối chứng papain USP (có hoạt độ papain  $\geq 6000$  U/mg) cho vào bình định mức 100 mL (5.7) và thêm dung dịch đệm (4.4) để hòa tan. Pha loãng bằng dung dịch đệm đến vạch và trộn. Tính lại nồng độ chính xác dựa trên khối lượng cân thực tế và độ tinh khiết của chuẩn.

#### 4.6.2 Dung dịch chuẩn làm việc

Dùng pipet (5.6), lấy 4 mL dung dịch chuẩn gốc (4.6.1) cho vào bình định mức 100 mL (5.7). Pha loãng tiếp bằng dung dịch đệm phosphat-xystein dinatri etylenedinitrilotetraaxetat (4.4) đến vạch. Sử dụng dung dịch trong vòng 30 min sau khi chuẩn bị.

#### 4.7 Dung dịch axit clohydric, 1 M.

#### 4.8 Dung dịch natri hydroxit, 1 M.

### 5 Thiết bị, dụng cụ

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

#### 5.1 Máy đo quang phổ, đo được ở bước sóng 280 nm.

#### 5.2 Cân, có thể cân chính xác đến 0,001 g.

#### 5.3 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.4 Nồi cách thủy đun sôi

#### 5.5 Máy đo pH

#### 5.6 Pipet, có thể phân phối được các lượng 2,5 mL, 5 mL, 7,5 mL, 10 mL.

#### 5.7 Bình định mức, dung tích 50 mL, 100 mL, 200 mL, 500 mL và 1 lít

#### 5.8 Cốc có mỏ, dung tích 500 mL

#### 5.9 Giấy lọc, ví dụ Whatman No.42 hoặc loại tương đương.

### 6 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Tham khảo các tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm. Trong trường hợp chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm, việc lấy mẫu theo thỏa thuận giữa các bên liên quan.

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

### 7 Cách tiến hành

#### 7.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Dùng cân (5.2), cân chính xác phần mẫu thử có hoạt độ papain dự kiến tương ứng với 100 mg chất chuẩn đối chứng và tiến hành chuẩn bị như dung dịch chuẩn papain (4.6).

## 7.2 Phép xác định

Cho vào 12 bình định mức dung tích 100 mL (5.7) có nắp đậy bằng thủy tinh, mỗi bình 25 mL cơ chất casein (4.3). Dán nhãn các bình thành 2 dãy, trong đó  $S_1$ ,  $S_2$  và  $S_3$  chứa dung dịch chuẩn làm việc papain (4.6.2); bình  $U_2$  chứa dung dịch mẫu thử (7.1); các bình còn lại  $S_{1B}$ ,  $S_{2B}$ ,  $S_{3B}$  và  $U_{2B}$  chứa mẫu trắng. Các bình  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  và  $U_2$  được tiến hành lặp lại 2 lần.

Thêm 5 mL, 2,5 mL và 0 mL dung dịch đệm (4.4) lần lượt vào các bình  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  và các bình mẫu trắng  $S_{1B}$ ,  $S_{2B}$ ,  $S_{3B}$  tương ứng. Thêm 2,5 mL dung dịch đệm (4.4) vào các bình  $U_2$  và  $U_{2B}$ . Đặt các bình trong nồi cách thủy (5.3) ở 40 °C trong 10 min.

Cho vào hai bình  $S_1$ , mỗi bình 5 mL dung dịch chuẩn làm việc papain (4.6.2), sử dụng pipet (5.6), vừa thêm vừa xoay bình để trộn. Thời gian bắt đầu được tính từ thời điểm chuyển hết dung dịch chuẩn vào bình định mức. Đậy nắp bình và đặt vào nồi cách thủy (5.3) ở 40 °C. Tiến hành tương tự với 2 bình  $S_2$ : mỗi bình cho 7,5 mL dung dịch chuẩn làm việc papain (4.6.2), 2 bình  $S_3$ : mỗi bình cho 10 mL dung dịch chuẩn làm việc papain (4.6.2) và 2 bình  $U_2$ : mỗi bình cho 7,5 mL dung dịch mẫu thử.

Sau chính xác 60 min, thêm 15 mL dung dịch TCA 30 % (4.5) vào cả 12 bình và trộn kỹ. Thêm lần lượt 5 mL, 7,5 mL, 10 mL dung dịch chuẩn làm việc papain (4.6.2) vào các bình  $S_{1B}$ ,  $S_{2B}$ ,  $S_{3B}$  và 7,5 mL mẫu thử vào bình  $U_{2B}$ . Đặt các bình trong nồi cách thủy ở 40 °C trong 30 min đến 40 min và để yên để protein kết tủa hoàn toàn. Lọc các dung dịch qua giấy lọc (5.9) và thu lấy dịch trong. Lọc lại khoảng một nửa phần dịch đã lọc để đảm bảo dịch lọc trong hoàn toàn. Đo độ hấp thụ của các dịch lọc bằng máy đo quang phổ (5.1) ở bước sóng 280 nm so với mẫu trắng.

## 7.3 Dựng đường chuẩn

Xác định chênh lệch độ hấp thụ của các dung dịch chuẩn  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  với độ hấp thụ của các dung dịch mẫu trắng  $S_{1B}$ ,  $S_{2B}$ ,  $S_{3B}$  tương ứng. Dựng đường chuẩn giữa độ chênh lệch giá trị độ hấp thụ thu được với nồng độ enzym tương ứng trong 50 mL hỗn hợp dung dịch chuẩn, tính bằng miligam trên mililit.

## 8 Tính kết quả

Xác định chênh lệch độ hấp thụ giữa mẫu thử  $U_2$  và mẫu trắng  $U_{2B}$  tương ứng, sau đó nội suy từ đường chuẩn, hoạt độ của papain trong mẫu thử,  $X$ , được tính bằng đơn vị hoạt độ của papain USP trên miligam (U/mg) theo Công thức (1):

$$X = C \times \frac{100}{4} \times \frac{50}{7,5} \times X_s \times \frac{100}{W} \quad (1)$$

Trong đó:

$C$  là nồng độ papain trong dung dịch mẫu thử thu được từ đường chuẩn, tính bằng miligam trên mililit (mg/mL);

100/4 là hệ số pha loãng của dung dịch chuẩn;

50/7,5 là hệ số pha loãng của dung dịch mẫu thử.

$X_s$  là hoạt độ của chất chuẩn đối chứng papain, tính bằng đơn vị hoạt độ của papain USP trên miligam (U/mg);

100 là thể tích định mức của mẫu thử, tính bằng mililit (mL);

$W$  là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng miligam (mg);

## 9 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
  - b) phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
  - c) phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
  - d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
  - e) kết quả thử nghiệm thu được.
-