

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9526:2012

Xuất bản lần 1

**SỮA – XÁC ĐỊNH CÁC CHẤT KHỬ PROTEIN –
PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ**

*Milk – Determination of protein-reducing substances –
Spectrophotometric method*

HÀ NỘI – 2012

Lời nói đầu

TCVN 9526:2012 được xây dựng trên cơ sở AOAC 953.08
*Protein-reducing substances in milk Spectrophotometric
method;*

TCVN 9526:2012 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia
TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên
soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị,
Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa – Xác định các chất khử protein – Phương pháp quang phổ

Milk – Determination of protein-reducing substances – Spectrophotometric method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp quang phổ để xác định các chất khử protein trong sữa.

2 Thuốc thử

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

2.1 Dung dịch đệm phthalat, pH 5,6

Hòa tan 2,0 g natri hydroxit trong nước và pha loãng đến 250 ml.

Hòa tan 10,2 g kali hydro phthalat trong nước và pha loãng đến 250 ml. Trộn 159 ml dung dịch natri hydroxit với 200 ml dung dịch phthalat và pha loãng đến vạch mức 800 ml. Chính đến pH 5,6 bằng cách bổ sung dung dịch natri hydroxit hoặc dung dịch phthalat.

2.2 Dung dịch kali ferixyanua $[K_3Fe(CN)_6]$, 1 %

Hòa tan 10 g kali ferixyanua trong nước và pha loãng đến 1 lít. Nếu dung dịch xuất hiện màu xanh lá cây hoặc có kết tủa màu xanh nước biển thì loại bỏ. Chuẩn bị đường chuẩn mới sử dụng mẻ thuốc thử mới.

2.3 Dung dịch sắt (III) clorua ($FeCl_3$), 0,1 %

Hòa tan 0,1 g hoặc 0,1 ml sắt (III) clorua ngậm 6 phân tử nước đã hóa lỏng bằng 100 ml nước. Chuẩn bị dung dịch mới hàng ngày.

2.4 Dung dịch ure bão hòa

Hòa tan 600 g ure trong nước, làm ấm nhẹ và pha loãng trong bình định mức đến vạch 1000 ml. Dung dịch có nồng độ 10 M.

2.5 Dung dịch axit trichloroaxetic, 10 % (khối lượng/thể tích).

Pha loãng 10 g axit trichloroaxetic vào bình định mức 100 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Trộn kỹ.

2.6 Dung dịch axit axetic (CH_3COOH), 5 % (khối lượng/thể tích)

Hòa tan 5 g axit axetic bằng vào bình định mức 100 ml và thêm nước đến vạch. Trộn kỹ.

2.7 Dung dịch kali feroxyanua ngậm 3 phân tử nước.

3 Thiết bị, dụng cụ

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

3.1 Ống li tâm, dung tích 50 ml, hình nón.

3.2 Máy quang phổ.

Dùng trong dải khả kiến, có bộ cuvet Corex 10 mm thích hợp.

3.3 Bình định mức, dung tích 100 ml.

3.4 Đũa khuấy bằng thủy tinh.

3.5 Giấy semilog (bán logarit).

3.6 Pipet.

3.7 Máy li tâm, có thể li tâm với tốc độ 1000 r/min đến 1500 r/min.

3.8 Nồi cách thủy.

3.9 Giấy lọc Whatman số 40, đường kính 11 cm hoặc loại tương đương.

3.10 Bình hứng.

3.11 Ống nghiệm.

4 Lấy mẫu

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

Bảo quản mẫu thử tốt nhất ở khoảng nhiệt độ là 3 °C. Không nên đông lạnh hoặc cấp đông mẫu thử.

5 Cách tiến hành

5.1 Chuẩn bị dung dịch thử mẫu trắng

Pha loãng 3 ml dung dịch ure bão hòa (2.4) bằng nước đến 15 ml. Thêm 5 ml dung dịch đệm phthalat (2.1), 5 ml dung dịch kali ferixyanua (2.2) và 5 ml dung dịch axit trichloroaxetic 10 % (2.5). Trộn kỹ bằng đũa khuấy (3.4).

5.2 Chuẩn bị đường chuẩn

Ngay trước khi sử dụng, cân chính xác 0,1147 g kali feroxyanua ngâm ba phân tử nước (2.7) và pha loãng bằng nước đến 1 lít. Pha loãng từ 50 ml đến 100 ml trong bình định mức (3.3) (1 ml dung dịch đã pha loãng chứa 0,05 mg kali feroxyanua). Dùng pipet (3.6) lấy lần lượt các thể tích sau: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 và 4 ml dung dịch pha loãng cho vào một dãy gồm chín ống thử nghiệm khô, sạch. Thêm nước vào từng ống sao cho tổng thể tích có được là 5,0 ml. Mỗi ống bổ sung 5 ml dung dịch thử mẫu trắng (5.1).

Ở những khoảng thời gian thích hợp, thêm 1 ml dung dịch sắt (III) clorua (2.3) vào từng ống, trộn và cứ sau chính xác 10 min lại đọc kết quả trên máy quang phổ (3.2) mà giá trị độ hấp thụ ở bước sóng 610 nm đã được xét với 100 % T, với dung dịch kiểm soát [0,0 ml dung dịch kali feroxyanua (2.7)]. Dựng đường chuẩn của % T theo số miligam kali feroxyanua (2.7) trên giấy semilog (3.5).

5.3 Xác định

CHÚ Ý: Phép phân tích phải được tiến hành trong cùng ngày. Không cho phép để mẫu quá lâu sau khi làm nguội và sau khi lọc. Trong quá trình xác định trong phòng thử nghiệm, không được có các khí có tính khử [hydro sulfua, clorua, axit nitric, v.v..].

Trộn kỹ mẫu thử bằng cách rót qua lại vào các vật chứa để đồng hóa mẫu. Dùng pipet (3.6) lấy 15 ml phần mẫu thử cho vào ống li tâm 50 ml (3.1) có chứa 15 ml nước. Thêm 3 ml dung dịch axit axetic 5 % (2.6), khuấy kỹ và cho li tâm 5 min trong máy li tâm (3.7) ở tốc độ li tâm 1 000 r/min đến 1 500 r/min. Gạn lớp phía trên chất kết tủa. Rửa phần kết tủa hai lần bằng 15 ml nước, dùng đũa khuấy (3.4) để trộn kỹ chất kết tủa. Li tâm 5 min và gạn.

CHÚ THÍCH Khi có một lượng nhỏ vẩn sữa phía trên thì có thể bị bỏ qua nếu phần mẫu thử chứa nhiều cream, khi vẩn sữa phía trên gây khó khăn cho việc gạn phần kết tủa, thì loại bỏ phép thử và trộn kỹ lại phần mẫu thử.

Cho 3 ml dung dịch ure bão hòa (2.4) vào phần kết tủa và vào ống li tâm sạch làm mẫu trắng, sau đó pha loãng bằng nước đến 15 ml. Khuấy mạnh và thêm 5 ml dung dịch đệm phthalat (2.1), 5 ml dung dịch kali ferixyanua 1 % (2.2) rồi khuấy. Đặt hỗn hợp vào nồi cách thủy (3.8) ở nhiệt độ 70 °C trong đúng 20 min và làm nguội trong nước đá.

Sau khi hỗn hợp đã nguội, thêm 5 ml dung dịch axit trichloroacetic 10 % (2.5), khuấy và lọc qua giấy lọc (3.9). Dùng vài mililit dịch lọc đầu tiên để rửa thành và đáy của bình hứng (3.10) và loại bỏ. Lọc phần dung dịch còn lại và cho chảy hết, sau đó lọc lại nếu vẫn còn vẩn đục.

Cho 5 ml nước vào ống nghiệm (3.11) khô, sạch và thêm 5 ml dịch lọc đã trong. Thêm 1 ml dung dịch sắt (III) clorua 0,1 % (2.3) để tạo màu. Khuấy và để yên 10 min. Đọc kết quả trên máy quang phổ (3.2) đã được cài đặt để đọc 100 % T ở bước sóng 610 nm so với mẫu trắng. Với một dãy mẫu thử, định kỳ thêm dung dịch sắt (III) clorua 0,1 % (2.3) và đọc sau đúng 10 min.

6 Tính kết quả

Hàm lượng các chất khử có trong mẫu thử, tính theo số miligam kali feroxyanua trên 100 ml sữa, được tính theo công thức:

$$X = w \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{100}{V_3}$$

Trong đó:

w là khối lượng kali feroxyanua xác định được từ đường chuẩn (xem 5.3), tính bằng miligam (mg);

V_1 là thể tích phần mẫu thử được sử dụng, tính bằng mililit (ml) ($V_1 = 15$ ml);

V_2 là thể tích dịch lọc cuối cùng thu được, tính bằng mililit (ml) ($V_2 = 30$ ml);

V_3 là thể tích dịch lọc sử dụng để đo quang phổ, tính bằng mililit (ml) ($V_3 = 5$ ml).

7 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi 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;
- mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn và các chi tiết bất thường khác có ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Milk Food Technol. **16**, 241(1953).
 - [2] Journal of AOAC International **38**, 310(1955).
 - [3] Journal of AOAC International **39**, 345(1956).
 - [4] Journal of AOAC International **43**, 407(1960).
-