

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 11680:2016
ISO/TS 17193:2011**

Xuất bản lần 1

**SỮA - XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ LACTOPEROXIDASE -
PHƯƠNG PHÁP ĐO QUANG (PHƯƠNG PHÁP CHUẨN)**

Milk - Determination of the lactoperoxidase activity - Photometric method (Reference method)

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11680:2016 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 17193:2011;

TCVN 11680:2016 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa - Xác định hoạt độ lactoperoxidase - Phương pháp đo quang (Phương pháp chuẩn)

Milk - Determination of the lactoperoxidase activity -

Photometric method (Reference method)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đo quang để xác định hoạt độ lactoperoxidase trong sữa trên 50 U/L.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây.

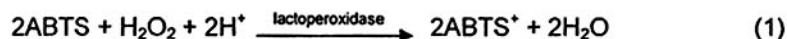
2.1

Đơn vị hoạt độ lactoperoxidase (unit of lactoperoxidase activity)

Lượng enzym lactoperoxidase xúc tác chuyển đổi 1 μmol cơ chất trên mỗi phút.

3 Nguyên tắc

Với sự có mặt của enzym lactoperoxidase có trong mẫu, ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)] được xúc tác chuyển đổi thành cation gốc tự do (ABTS^+) ở pH 6,0 và 25 °C. Lượng (ABTS^+) giải phóng trong mỗi phút tỷ lệ với hoạt độ lactoperoxidase và được đo quang phổ ở 420 nm. Việc giải phóng ABTS^+ được dựa trên các phản ứng hóa học sau đây:



4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử thuộc loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hai lần hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Dung dịch đệm, pH 6,0

Hòa tan 0,72 g dinatri hydrophosphat ngậm hai phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) và 3,99 g kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) trong khoảng 450 ml nước đựng trong cốc có mỏ. Chỉnh pH của dung dịch đến khoảng $6,0 \pm 0,03$ bằng natri hydroxit, kali hydroxit lỏng hoặc dung dịch axit phosphoric, nếu cần. Chuyển dung dịch này vào bình định mức 500 ml (5.6). Thêm nước đến vạch và trộn.

CHÚ THÍCH: Dung dịch đệm chứa dinatri hydrophosphat ngậm hai phân tử nước nồng độ $8,09 \text{ mmol/l}$ và kali dihydrophosphat nồng độ $58,6 \text{ mmol/l}$.

4.2 Dung dịch hydro peroxit

CẢNH BÁO - Hydro peroxit là chất ăn mòn và không được để tiếp xúc với các kim loại hoặc các chất hữu cơ dễ cháy để ngăn ngừa hình thành các hỗn hợp gây nổ.

Dùng pipet lấy 0,1 ml H_2O_2 30 % khối lượng cho vào bình định mức một vạch 100 ml (5.6). Thêm nước đến vạch và trộn.

Chuẩn bị dung dịch hydro peroxit ngay trước khi sử dụng (xem 4.3).

4.3 Dung dịch thuốc thử ABTS, dung dịch muối diamoni của 2,2-azino-bis(axit 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) [$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4 (\text{NH}_4)_2$] 2 mmol/l

Cân 55 mg muối di-amonit của ABTS cho vào bình định mức 50 ml (5.6). Thêm khoảng 30 ml dung dịch đệm (4.1) để hòa tan muối. Sau đó, thêm 1,0 ml dung dịch hydro peroxid (4.2). Thêm dung dịch đệm đến vạch 50 ml và trộn.

Chuẩn bị dung dịch thuốc thử mới trong ngày sử dụng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 1 mg, có thể đọc đến 0,1 mg.

5.2 Máy đo pH, có khả năng đo được 0,1 đơn vị pH, có thể đọc đến 0,01 đơn vị.

5.3 Máy đo quang phổ, có khả năng đo độ hấp thụ ở 420 nm, có bộ giữ cuvet kiểm soát được nhiệt độ ở $25^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$.

5.4 Cuvet bằng chất dẻo, chiều dài đường quang 1,0 cm, có nắp đậy.

CHÚ THÍCH: Việc sử dụng cuvet thủy tinh hoặc thạch anh có thể cho kết quả quá thấp do thất thoát hấp phụ.

5.5 Pipet xả hết hoặc pipet có cơ cấu piston, phù hợp với TCVN 10505 (ISO 8655-2)^[5], có dung tích danh nghĩa 0,05 ml, 0,1 ml, 1,0 ml và 2,0 ml.

5.6 Bình định mức một vạch, dung tích danh nghĩa 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml và 500 ml, loại A của TCVN 7153 (ISO 1042)^[2].

5.7 Nồi cách thủy hoặc bể làm khô, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)^[3].

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.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Làm ấm mẫu thử bảo quản lạnh đến nhiệt độ phòng và trộn kỹ. Thường không cần phải làm nóng lại mẫu thử để trộn đúng. Trong mọi trường hợp, nhiệt độ không được vượt quá $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tùy thuộc vào hàm lượng lactoperoxidase của mẫu, trộn mẫu thử với nước theo tỷ lệ phù hợp tính theo thể tích ít nhất 1 → 5.

Để tính hoạt độ lactoperoxidase, chênh lệch độ hấp thụ, ΔA nằm trong khoảng $0,02\text{ min}^{-1}$ đến $0,5\text{ min}^{-1}$. Phụ thuộc vào phạm vi đo, áp dụng các dung dịch pha loãng với nước như trong Bảng 1.

Bảng 1 – Dung dịch mẫu thử

Dải đo U/L	Pha loãng
50 đến 1 200	1 → 5
100 đến 2 500	1 → 10
250 đến 6 000	1 → 25

Để pha loãng các mẫu sữa tiệt trùng UHT, phải sử dụng tỷ lệ 1 → 5 (theo thể tích).

7.2 Xác định

Trước khi đo quang, chỉnh máy đo quang phổ (5.3) đến mức zero ở bước sóng 420 nm so với không khí (không có cuvet trong đường quang).

Dùng pipet lấy 2 ml dung dịch thuốc thử ABTS (4.3) cho vào cuvet (5.4). Đậy cuvet và đặt vào nồi cách thủy hoặc bể làm khô (5.7) ở 25 °C với thời gian cần thiết để đạt được nhiệt độ này trong cuvet.

Sau đó, thêm 0,05 ml mẫu thử đã pha loãng theo quy định trong 7.1. Đậy ngay cuvet và trộn lượng chứa trong cuvet bằng cách cẩn thận đảo chiều cuvet. Đặt ngay cuvet vào bộ giữ cuvet trong máy đo quang phổ (5.3) đã làm nóng trước đến 25 °C.

Trong vòng 15 s sau khi cho mẫu thử đã pha loãng vào dung dịch thuốc thử trong cuvet, đo độ hấp thụ A_1 ở bước sóng 420 nm sử dụng không khí để so sánh. Ghi lại độ hấp thụ A_2 sau đúng 2 min.

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Đối với một phép đo đáng tin cậy, đảm bảo rằng khoảng thời gian từ khi cho mẫu thử đã pha loãng vào thuốc thử và đọc độ hấp thụ A_1 phải ≤ 15 s.

Nếu sử dụng pipet có cơ cấu piston 0,05 ml, đảm bảo rằng đầu tip được rửa sạch trước bằng mẫu pha loãng.

8 Tính và biểu thị kết quả

8.1 Tính kết quả

CHÚ THÍCH: Trong phản ứng hóa học (1) của phép xác định này, có mối quan hệ tuyến tính giữa sự thay đổi độ hấp thụ trên phút với hoạt độ lactoperoxidase. Hoạt độ enzym trong dung dịch pha loãng được xác định bằng độ hấp thụ quang phù hợp với định luật Beer-Lambert.

Tính hoạt độ lactoperoxidase, a_1 bằng đơn vị trên lít (U/l) của mẫu, sử dụng Công thức (2):

$$a_1 = \frac{V_1 \times \Delta A \times f \times 1000}{\varepsilon \times d \times V_2 \times 2} \quad (2)$$

Trong đó:

V_1 là tổng thể tích dung dịch thử (7.2) ($V_1 = 2,05$ ml), tính bằng mililit (ml);

V_2 là thể tích pha loãng mẫu (7.1) ($V_2 = 0,05$ ml), tính bằng mililit (ml);

ΔA là chênh lệch độ hấp thụ, ($A_2 - A_1$)/min;

ε là độ hấp thụ của ABTS đã oxy hóa đo ở bước sóng 420 nm ($\varepsilon = 43,2 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$);

d là chiều dài đường quang của cuvet, tính bằng centimet (cm) ($d = 1,0$ cm);

f là hệ số pha loãng ($f = 5$ đối với sữa UHT);

1000 là hệ số chuyển đổi đơn vị trên lít [U/l];

2 là hệ số tỷ lượng.

8.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến số nguyên gần nhất.

9 Độ chụm

Tại thời điểm công bố, không có nghiên cứu liên phòng đáp ứng các yêu cầu của TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[3] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[4] được thực hiện.

10 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã dùng, 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;
- f) kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
 - [2] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*
 - [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 10505-2 (ISO 8655-2) *Dụng cụ đo thể tích có cơ cấu pittông – Phần 2: Pipet pittông*
-