

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 12320:2018

Xuất bản lần 1

**BIA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ AMIN TỰ DO -
PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ**

Beer - Determination of free amino nitrogen content. Spectrophotometric method

HÀ NỘI – 2018

Lời nói đầu

TCVN 12320:2018 được xây dựng trên cơ sở tham khảo tiêu chuẩn của Hiệp hội Đồ uống châu Âu EBC Method 9.10 (2000) *Free amino nitrogen in beer by spectrophotometry*;

TCVN 12320:2018 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F9 *Đồ uống* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bia – Xác định hàm lượng nitơ amin tự do – Phương pháp quang phổ

*Beer – Determination of free amino nitrogen content –
Spectrophotometric method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp quang phổ để xác định hàm lượng nitơ amin tự do của các loại bia, bao gồm bia vàng và bia đen.

Phương pháp này có thể ước tính các axit amin, amoniac, ngoài ra có thể xác định các nhóm nitơ α -amin cuối mạch của các peptit và các protein. Prolin có đóng góp một phần ở bước sóng sử dụng.

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*

3 Nguyên tắc

Mẫu thử và dung dịch chuẩn được gia nhiệt với sự có mặt của ninhydrin ở pH 6,7, đo độ hấp thụ ở 570 nm so với mẫu trắng thuốc thử. Đối với mẫu bia đen, thực hiện hiệu chỉnh màu của mẫu thử.

4 Thuốc thử

Sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước được sử dụng ít nhất đạt loại 3 theo TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), trừ khi có quy định khác.

TCVN 12320:2018

4.1 Thuốc thử màu

Hòa tan 100 g dinatri hydro phosphat ngậm 12 phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 60 g kali dihydro phosphat (KH_2PO_4), 5 g ninhydrin và 3 g fructose vào nước đựng trong bình định mức dung tích 1 L, thêm nước đến vạch.

Dung dịch này bền trong 2 tuần nếu bảo quản lạnh trong chai tối màu. pH phải nằm trong khoảng 6,6 đến 6,8, chỉnh pH nếu cần.

4.2 Dung dịch pha loãng

Hòa tan 2 g kali iodat (KIO_3) trong 600 ml nước và thêm 400 ml etanol 96 % (thể tích).

4.3 Dung dịch chuẩn glycin

4.3.1 Dung dịch chuẩn gốc

Hòa tan 0,1072 g glycin trong nước và pha loãng đến 100 ml.

Bảo quản dung dịch ở 0 °C đến 4 °C.

4.3.2 Dung dịch chuẩn làm việc

Pha loãng 1 ml dung dịch chuẩn gốc (4.3.1) với nước thành 100 ml.

Dung dịch pha loãng chứa hàm lượng nitơ amin 2 mg/L.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Ống nghiệm, 16 mm x 150 mm.

5.2 Bì thủy tinh, đường kính từ 20 mm đến 25 mm.

5.3 Pipet, loại pipet bơm hoặc loại phân phối tự động.

5.4 Nồi cách thủy đun sôi.

5.5 Nồi cách thủy, ổn định được nhiệt độ $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.6 Máy đo quang phổ, có thể hoạt động ở bước sóng 570 nm.

5.7 Cuvet, chiều dài đường quang 10 mm.

5.8 Bình định mức, dung tích 100 ml và 1 000 ml.

6 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 5519 (ST SEV 5808)¹⁾.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Pha loãng mẫu thử với nước để thu được nồng độ nitơ amin từ 1 mg/L đến 3 mg/L. Nên pha loãng mẫu 50 lần.

7.2 Mẫu trắng thuốc thử

Lấy 2 ml nước, cho vào ống nghiệm (5.1) và thêm 1 ml thuốc thử màu (4.1). Đậy ống nghiệm bằng bi thủy tinh (5.2) và đặt vào nồi cách thủy đun sôi (5.4) trong đúng 16 min, sau đó để nguội trong nồi cách thủy 20 °C (5.5) trong 20 min.

Sau thời gian nêu trên, thêm 5 ml dung dịch pha loãng (4.2) và trộn.

7.3 Phép xác định

Lấy 2 ml mẫu đã pha loãng (7.1), cho vào ống nghiệm (5.1) và thêm 1 ml thuốc thử màu (4.1). Đậy ống nghiệm bằng bi thủy tinh (5.2) và đặt vào nồi cách thủy đun sôi (5.4) trong đúng 16 min, sau đó để nguội trong nồi cách thủy 20 °C (5.5) trong 20 min.

Sau thời gian nêu trên, thêm 5 ml dung dịch pha loãng (4.2), trộn và đo độ hấp thụ ở 570 nm trong cuvet 10 mm (5.7) so với mẫu trắng thuốc thử (7.2).

Với mỗi dãy phép thử, thực hiện ba lần kiểm tra lặp lại với chất chuẩn glycine, sử dụng 2 ml dung dịch glycine pha loãng (4.3.2).

Với các mẫu bia đen, phải hiệu chỉnh đối với màu của mẫu thử. Lấy 2 ml mẫu thử đã pha loãng, cho vào ống nghiệm (5.1) và thêm 1 ml nước, 5 ml dung dịch pha loãng (4.2). Đo độ hấp thụ so với mẫu trắng thuốc thử (7.2) ở 570 nm và trừ giá trị này vào giá trị tương ứng của mẫu thử.

8 Tính và biểu thị kết quả

Hàm lượng nitơ amin tự do của mẫu thử, X , biểu thị bằng miligam trên lít (mg/L), được tính theo Công thức:

$$X = \frac{A_1 \times 2 \times d}{A_2}$$

Trong đó:

A_1 là độ hấp thụ của dung dịch thử ở 570 nm trong cuvet 10 mm;

A_2 là độ hấp thụ trung bình của các dung dịch chuẩn glycine ở 570 nm trong cuvet 10 mm;

2 là nồng độ của dung dịch chuẩn glycine đã sử dụng, tính bằng miligam trên lít (mg/L);

d là hệ số pha loãng ($d = 50$ nếu pha loãng 50 lần).

Biểu thị kết quả đến số nguyên gần nhất.

9 Độ chụm

Các giá trị độ chụm dưới đây được xác định từ dữ liệu thử nghiệm liên phòng ở năm mức trong dải hàm lượng nitơ amin tự do từ 37 mg/L đến 200 mg/L. Các giá trị độ chụm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và nền mẫu khác với dải nồng độ và nền mẫu đã nêu.

9.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập, đơn lẻ về hàm lượng nitơ amin tự do, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong cùng một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giá trị giới hạn lặp lại $r = 0,7 + 0,032 m$ (mg/L).

Trong đó m là giá trị trung bình của hàm lượng nitơ amin tự do.

9.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ về hàm lượng nitơ amin tự do, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giá trị giới hạn tái lập $R = 7,2 + 0,105 m$ (mg/L).

Trong đó m là giá trị trung bình của hàm lượng nitơ amin tự do.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- 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 sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc nếu thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 5519 (ST SEV 5808), *Bia – Quy tắc nghiệm thu và phương pháp lấy mẫu*
 - [2] EBC Method 8.10, *Free amino nitrogen in wort by spectrophotometry*
-