

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6271:2007

ISO 9874:2006

Xuất bản lần 2

**SỮA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PHOSPHO TỔNG SỐ –
PHƯƠNG PHÁP ĐO PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ**

*Milk – Determination of total phosphorus content –
Method using molecular absorption spectrometry*

HA NỘI 2007

Lời nói đầu

TCVN 6271:2007 thay thế TCVN 6271:1997;

TCVN 6271:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 9874:2006 và bản đính chính kỹ thuật 1:2007;

TCVN 6271:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa – Xác định hàm lượng phospho tổng số – Phương pháp đo phổ hấp thụ phân tử

*Milk – Determination of total phosphorus content –
Method using molecular absorption spectrometry*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng phospho tổng số trong sữa bằng đo phổ hấp thụ phân tử.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 7151 (ISO 648), Dụng cụ thí nghiệm bằng thuỷ tinh. Pipet một mức

TCVN 7153 (ISO 1042), Dụng cụ thí nghiệm bằng thuỷ tinh. Bình định mức

ISO 4788:2005, Laboratory glassware – Graduated measuring cylinders (Dụng cụ thí nghiệm bằng thuỷ tinh – Ống đong chia độ).

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hàm lượng phospho tổng số (total phosphorus content)

Phần khối lượng của chất được xác định bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng phospho tổng số được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

4 Nguyên tắc

Xử lý mẫu sữa bằng phương pháp vô cơ hoá ướt sử dụng axit sulfuric và hydro peroxit, hoặc bằng cách tro hoá khô. Tạo xanh molyptden được hình thành bằng cách thêm dung dịch molyptat/axit ascorbic. Đo độ hấp thụ bằng quang phổ ở bước sóng 820 nm.

5 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử được sử dụng phải thuộc loại phân tích, trừ khi có qui định khác. Nước được sử dụng là nước cất hoặc nước đã loại ion, không chứa các hợp chất phospho.

5.1 Axit sulfuric đậm đặc, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 18$ mol/l.

5.2 Axit sulfuric loãng, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 5$ mol/l.

Vừa rót vừa khuấy cẩn thận 278 ml axit sulfuric đậm đặc (5.1) vào 722 ml nước.

5.3 Axit clohydric loãng, $c(\text{HCl}) \approx 1$ mol/l. (Dùng cho phương pháp tro hoá).

Pha loãng 83 ml axit clohydric đậm đặc ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml) tới 1 000 ml bằng nước.

5.4 Hydro peroxit, $c(\text{H}_2\text{O}_2) \approx 9$ mol/l, không chứa phospho.

5.5 Natri molyptat, $c(\text{Na}_2\text{MoO}_4) \approx 0,1$ mol/l.

Cân 2,5 g natri molyptat ngâm hai phân tử nước cho vào bình định mức một vạch 100 ml (6.10). Thêm một thể tích vừa đủ dung dịch axit sulfuric loãng (5.2) để hoà tan natri molyptat ngâm hai phân tử nước. Thêm cùng loại axit sulfuric (5.2) cho đến vạch và trộn.

5.6 Axit ascorbic, $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) \approx 0,25$ mol/l.

Cân 5 g axit ascorbic cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.10). Thêm một thể tích nước vừa đủ để hoà tan axit ascorbic. Thêm nước cho đến vạch và trộn.

Sử dụng dung dịch mới chuẩn bị.

5.7 Dung dịch molyptat/axit ascorbic

Ngay trước khi sử dụng, thêm 25 ml dung dịch natri molyptat (5.5) vào 10 ml dung dịch axit ascorbic (5.6) trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.10). Thêm nước cho đến vạch và trộn.

5.8 Dung dịch chuẩn A

Sấy khô khoảng 1 g kali dihydro orthophosphat (KH_2PO_4) ít nhất là 48 h trong bình hút ẩm (6.14). Cân 0,4394 g phosphat khô cho vào bình định mức một vạch dung tích 1 000 ml (6.10). Thêm nước cho đến vạch và trộn.

Hàm lượng phospho của dung dịch chuẩn này là 100 mg/l.

5.9 Dung dịch chuẩn B

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch chuẩn A (5.8) cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.10). Thêm nước cho đến vạch và trộn.

Hàm lượng phospho của dung dịch chuẩn này là 10 mg/l.

6 Thiết bị, dụng cụ

CHÚ Ý – Tất cả các dụng cụ thủy tinh phải được rửa kỹ bằng chất tẩy rửa không chứa phospho và sau đó được tráng bằng nước.

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

- 6.1 **Cân phân tích**, có độ chính xác tới 0,1 mg.
- 6.2 **Nồi cách thủy**, có thể duy trì ở 100 °C.
- 6.3 **Tủ sấy**, có thể duy trì ở 100 °C.
- 6.4 **Bếp điện hoặc đầu đốt khí nhỏ**.
- 6.5 **Bình phân huỷ (Kjeldahl)**, hoặc **các ống nghiệm**, dung tích 50 ml.
- 6.6 **Bi thủy tinh**, đường kính khoảng 5 mm.
- 6.7 **Đĩa**, bằng platin hoặc silic, có đường kính khoảng 55 mm và **mặt kính đồng hồ** thích hợp.
- 6.8 **Lò nung điện có không khí tuần hoàn**, có thể duy trì ở nhiệt độ từ 500 °C đến 550 °C.
- 6.9 **Ống đong chia độ**, dung tích 5 ml và 25 ml phù hợp với qui định của ISO 4788.
- 6.10 **Bình định mức một vạch**, dung tích 50 ml, 100 ml và 1 000 ml phù hợp với loại B của TCVN 7153 (ISO 1042).
- 6.11 **Pipet một vạch**, có thể phân phối 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml và 10 ml phù hợp với loại B của TCVN 7151 (ISO 648).
- 6.12 **Máy đo phổ hấp thụ phân tử**, thích hợp cho việc đo ở bước sóng 820 nm, có các cuvet với chiều dài đường quang là 10 mm.

6.13 Giấy lọc, loại trung bình.

6.14 Bình hút ẩm, chứa chất làm khô tốt.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị thay đổi hoặc suy giảm chất lượng trong quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

8 Chuẩn bị mẫu thử

Để mẫu thử nghiệm ở $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trộn kỹ. Nếu chất béo phân tán không đồng nhất thì đun nóng mẫu từ từ đến $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, khuấy nhẹ và làm nguội đến $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ trước khi lấy mẫu để phân tích.

9 Cách tiến hành

9.1 Phương pháp vô cơ hoá ướt

9.1.1 Cân khoảng 1,5 g phần mẫu thử (điều 8) chính xác đến 1 mg, cho vào bình phân huỷ (6.5). Thêm ba viên bi thủy tinh (6.6) và 4 ml axit sulfuric đậm đặc (5.1).

9.1.2 Thực hiện trong tủ hút tốt có hệ thống lọc bằng nước, đặt bình ở tư thế nghiêng và dùng bếp điện hoặc đầu đốt khí nhỏ (6.4) để đun nóng. Kiểm soát việc đun để hạn chế tạo bọt trong bình.

Giữ cho hỗn hợp sôi nhẹ. Tránh quá nhiệt cục bộ và không làm nóng bình từ trên bề mặt chất lỏng.

9.1.3 Ngay khi kết thúc tạo bọt, để nguội hỗn hợp trong không khí đến nhiệt độ phòng. Thêm cẩn thận 2 ml dung dịch hydro peroxit (5.4) và đun nóng lại. Lặp lại qui trình này cho đến khi thu được hỗn hợp trong suốt và không màu. Trong quá trình đun, luôn luôn xoay bình cẩn thận. Tránh quá nhiệt cục bộ.

9.1.4 Làm nguội hỗn hợp trong không khí tới nhiệt độ phòng và tráng cổ bình với khoảng 2 ml nước. Đun nóng lại hỗn hợp cho đến khi nước bay hơi hết. Để chất lỏng sôi trong 30 min để phân huỷ hết các vết hydro peroxit. Tránh quá nhiệt cục bộ.

9.1.5 Làm nguội hỗn hợp trong không khí tới nhiệt độ phòng. Chuyển hết lượng chất lỏng sang bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.10). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

9.1.6 Dùng pipet lấy 2 ml dung dịch thử cho vào bình định mức một vạch dung tích 50 ml (6.10) và pha loãng với khoảng 25 ml nước. Thêm 2,0 ml dung dịch axit ascorbic/molybdat (5.7). Thêm nước đến vạch và trộn.

9.1.7 Đun sôi lượng chứa trong bình khoảng 15 min trên nổi cách thuỷ (6.2).

9.1.8 Làm nguội hỗn hợp trong nước lạnh tới nhiệt độ phòng. Tiến hành theo qui định trong 9.5.

Tiến hành đo phổ trong vòng 1 h.

9.2 Phương pháp tro hoá khô

9.2.1 Cân khoảng 10 g phần mẫu thử (điều 8) chính xác đến 1 mg cho vào đĩa platin hoặc silic (6.7).

9.2.2 Cho bay hơi đến khô trong tủ sấy (6.3) ở nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng 100 °C, hoặc trên nổi cách thuỷ (6.2).

9.2.3 Sau khi đã khô hoàn toàn, nung mẫu thử trong lò nung điện (6.8) ở nhiệt độ từ 500 °C đến 550 °C đến khi thu được tro màu trắng (hoặc gần trắng).

Tốt nhất là đốt đĩa trên bếp để cháy hết phần dễ cháy trước khi đặt vào lò nung.

9.2.4 Để nguội đĩa và tro trong lò nung và sau đó đập bằng mặt kính đồng hồ. Hoà tan lượng tro trong 2 ml hoặc 3 ml dung dịch axit clohydric loãng (5.3) và pha loãng với khoảng 3 ml nước.

9.2.5 Chuyển hết lượng dung dịch tro sang bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.10). Tráng mặt kính đồng hồ, đĩa bằng nước và đổ nước trảng vào bình định mức. Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn. Lọc qua giấy lọc loại trung bình (6.13).

9.2.6 Dùng pipet lấy 10 ml dịch lọc cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.10). Thêm nước đến vạch và trộn.

9.2.7 Dùng pipet lấy 2 ml dung dịch thử cho vào bình định mức một vạch dung tích 50 ml (6.10) và pha loãng bằng 25 ml nước. Thêm 20 ml dung dịch molybdat/axit ascorbic (5.7). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

9.2.8 Đun sôi lượng chứa trong bình trên nổi cách thuỷ (6.2) khoảng 15 min.

9.2.9 Làm nguội hỗn hợp trong nước lạnh tới nhiệt độ phòng. Tiếp tục theo qui định trong 9.5.

Tiến hành đo phổ trong vòng 1 h.

9.3 Thử mẫu trắng

Tiến hành thử mẫu trắng đồng thời với việc xác định, sử dụng cùng qui trình như đối với phần mẫu thử (9.1 hoặc 9.2) nhưng dùng 1,5 ml hoặc 10 ml nước không chứa phospho thay cho phần mẫu thử.

9.4 Đường chuẩn

9.4.1 Dùng pipet lấy 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml và 5 ml dung dịch chuẩn B (5.9) cho vào một dãy năm bình định mức một vạch dung tích 50 ml (6.10). Pha loãng lượng chứa trong mỗi bình bằng nước tới 25 ml.

9.4.2 Thêm 2,0 ml dung dịch molybdat/axit ascorbic (5.7) vào lượng chứa trong từng bình định mức. Thêm nước vào từng dung dịch cho đến vạch và trộn. Các dung dịch thu được chứa lượng tương ứng: 0 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg và 50 µg phospho trong 50 ml.

9.4.3 Đun sôi lượng chứa trong các bình 15 min trên nổi cách thủy (6.2).

9.4.4 Làm nguội dung dịch trong nước lạnh đến nhiệt độ phòng. Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch hiệu chuẩn dựa vào độ hấp thụ của dung dịch chứa 0 µg phospho (xem 9.4.2) dùng máy đo phổ (6.12) ở bước sóng 820 nm với cuvet có chiều dài đường quang 10 mm, trong vòng 1 h.

Nếu giá trị độ hấp thụ của dung dịch chứa 0 µg phospho/50 ml mà cao thì phải kiểm tra lại thuốc thử.

9.4.5 Vẽ đồ thị các giá trị độ hấp thụ thu được theo khối lượng phospho trong các dung dịch hiệu chuẩn (9.4.2), tính bằng microgam.

9.5 Đo phổ

Tiến hành đo phổ trên dung dịch thử nghiệm (9.1.8 hoặc 9.2.9) dựa vào dung dịch thử mẫu trắng (9.3) sử dụng máy đo phổ (6.12) ở bước sóng 820 nm có cuvet dày 10 mm, trong vòng 1 h.

10 Biểu thị kết quả

Dùng đường chuẩn (9.4), xác định khối lượng phospho tương ứng với giá trị độ hấp thụ của dung dịch thử. Tính hàm lượng phospho tổng số w_p , tính bằng phần trăm khối lượng, theo công thức sau đây:

a) Phương pháp vô cơ hoá ướt

$$w_p = \frac{m_1}{200m_0}$$

b) Phương pháp tro hoá khô

$$w_p = \frac{m_1}{20m_0}$$

trong đó

m_0 là khối lượng phần mẫu thử (9.1.1 hoặc 9.2.1), tính bằng gam.

m_1 là khối lượng phospho ghi được hoặc tính từ đường chuẩn, tính bằng microgam.

Kết quả ghi đến số thập phân thứ ba.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp đã được thiết lập bởi một phép thử liên phòng thử nghiệm quốc tế (xem [2]) phù hợp với qui định của TCVN 6910 (ISO 5725) [3]. Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được biểu thị ở mức xác suất 95 %.

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được của hai lần thử nghiệm độc lập riêng rẽ, khi sử dụng cùng một phương pháp, phân tích trên cùng nguyên liệu, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm, dùng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 0,005 % (phần khối lượng).

Loại bỏ cả hai kết quả nếu chênh lệch quá 0,005 % (phần khối lượng) và tiến hành hai phép xác định mới.

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được của hai lần thử nghiệm độc lập riêng rẽ, khi sử dụng cùng một phương pháp, phân tích trên cùng nguyên liệu, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm, dùng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá 0,016 % (phần khối lượng).

CHÚ THÍCH Đối với các định nghĩa về độ lặp lại và độ tái lập, xem TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) [4].

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về 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) tất cả các điều kiện thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy ý, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- e) kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì ghi kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
- [2] *Bulletin of the International Dairy Federation*, 1986, No.207.
- [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.
-