

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7080:2010

ISO 14378:2009

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SỮA BỘT –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG IODUA –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Milk and dried milk – Determination of iodide content –
Method using high-performance liquid chromatography*

HÀ NỘI - 2010

Lời nói đầu

TCVN 7080:2010 thay thế TCVN 7080:2002;

TCVN 7080:2010 hoàn toàn tương đương với ISO 14378:2009/IDF 167:2009;

TCVN 7080:2010 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 đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa và sữa bột – Xác định hàm lượng iodua – Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

*Milk and dried milk – Determination of iodide content –
Method using high-performance liquid chromatography*

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn và sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định hàm lượng iodua trong sữa nguyên chất thanh trùng với các mức từ 0,03 µg/g đến 1 µg/g và trong sữa bột gầy từ 0,3 µm/g đến 10,0 µg/g.

CHÚ THÍCH 1: Phương pháp này đã nghiên cứu cộng tác trên các mẫu sữa nguyên chất dạng lỏng và sữa bột gầy. Phương pháp này cũng có thể áp dụng cho sữa gầy hoặc sữa bột tách một phần chất béo cũng giống như sữa bột nguyên chất.

CHÚ THÍCH 2: Phương pháp này dùng để định lượng iodua tự do (dạng ion). Tuy nhiên, tổng hàm lượng iodua của sữa tươi và sữa bột có chất lượng tốt, không có vi sinh vật phát triển, thì có thể chứa từ 5 % đến 10 % khối lượng iodua liên kết hữu cơ. Hàm lượng iodua liên kết hữu cơ có thể nhiều hơn trong sữa đã bị giảm chất lượng do vi khuẩn phát triển.

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 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thử nghiệm* Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hàm lượng iodua trong sữa nguyên chất thanh trùng (iodide content of pasteurized whole milk)

Hàm lượng iodua trong sữa bột gầy (iodide content of dried skimmed milk)

Phần khối lượng của các chất xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng iodua thường được biểu thị bằng microgam trên gam.

4 Nguyên tắc

Phân mẫu thử được pha loãng bằng nước. Chất không tan và chất có khối lượng phân tử cao được loại bỏ bằng cách lọc qua màng lọc ngưỡng 25 000 D. Các ion iodua được tách bằng HPLC cặp ion pha đảo với detector điện hoá và điện cực làm việc bằng bạc ở 0 mV đến 50 mV. Hàm lượng iodua được tính từ đường chuẩn.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích, hoặc loại chuyên dùng cho HPLC, nếu thích hợp.

5.1 Nước, phù hợp với nước loại 2 của TCVN 4851 (ISO 3696).

5.2 Dung dịch chuẩn iodua

CẢNH BÁO – Các dung dịch iodua không bền khi tiếp xúc với ánh sáng vì thế cần được bảo vệ tránh ánh sáng.

5.2.1 Dung dịch gốc iodua, tương đương với 100 mg iodua trong 1 lít.

Hoà tan 130,8 mg kali iodua (KI) trong nước đựng trong bình định mức một vạch dung tích 1 000 ml (6.2). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn đều.

Dung dịch gốc iodua bền trong 1 tháng nếu được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ phòng.

5.2.2 Dung dịch chuẩn làm việc iodua, có nồng độ tương ứng với 20 µg, 50 µg, 150 µg và 250 µg của iodua trong 1 lít.

Dùng pipet lấy 20 µl, 50 µl, 150 µl và 250 µl dung dịch gốc iodua (5.2.1) cho vào bốn bình định mức một vạch dung tích 100 ml riêng biệt (6.2). Thêm nước vào từng dung dịch đến vạch và trộn đều.

Các dung dịch chuẩn làm việc iodua bền trong một tuần nếu được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ phòng.

5.3 Axetonitril (CH_3CN), loại dùng cho HPLC.

5.4 Dung dịch hexadexyltrimetyl amoni clorua [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$], dung dịch 25 % (phần khối lượng) trong nước, loại dùng cho sắc kí cặp ion.

5.5 Dịch rửa giải dùng cho HPLC: Hỗn hợp của dinatri hydrophosphat và hexadexyltrimetyl amoni clorua trong hỗn hợp của axetonitril và nước (68 + 32 tính theo phần thể tích), pH = 6,8.

Hoà tan 1,42 g dinatri hydrophosphat (Na_2HPO_4) trong khoảng 600 ml nước trong bình định mức một vạch dung tích 1 000 ml (6.2). Thêm 1,3 ml dung dịch hexadexyltrimetyl amoni clorua (5.4) và trộn đều. Sau đó thêm 320 ml axetonitril (5.3) và lắc lại. Chính pH đến 6,8 bằng axit ortophosphoric (H_3PO_4) đậm đặc. Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn đều.

Làm trong dung dịch bằng cách lọc qua màng lọc 1,2 μm rồi lọc tiếp qua màng lọc 0,5 μm . Khuấy dung dịch để trộn đều, đồng thời loại khí bằng siêu âm ở chế độ chân không trong 2 min trước khi bắt đầu sử dụng. Dịch rửa giải có thể thay đổi bằng cách thêm một ít nước hoặc axetonitril để việc chỉnh thời gian lưu của iodua là không đáng kể. Dịch rửa giải bền trong 1 năm, nếu được bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín.

5.6 *n*-Pentanol.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 g, có thể đọc đến số thập phân thứ ba.

6.2 Bình định mức một vạch, dung tích 100 ml và 1 000 ml, loại A của TCVN 7153 (ISO 1042) ^[3].

6.3 Micropipet, có thể phân phối được 20 μl , 50 μl , 150 μl và 250 μl , ISO 8655-2 ^[6].

6.4 Pipet chia độ, dung tích 2 ml, chia độ đến 0,1 ml, loại A của TCVN 7150 (ISO 835) ^[2] hoặc loại AS.

6.5 Ống đong chia độ, dung tích 500 ml, loại A của TCVN 8488 (ISO 4788) ^[4].

6.6 Máy đo pH, có điện cực thủy tinh kết hợp.

6.7 Bộ lọc màng, cỡ lỗ 1,2 μm và 0,5 μm , bằng Nylon-6-6 hoặc vật liệu tương đương, có thiết bị lọc để làm trong dịch rửa giải HPLC.

6.8 Máy ly tâm, có thể giữ các ống ly tâm 50 ml và có thể tạo gia tốc quay 1 000 g.

6.9 Ống ly tâm, hình nón, dung tích 50 ml, đường kính trong 27 mm, bằng chất dẻo dùng một lần, có nắp vặn.

TCVN 7080:2010

6.10 Dụng cụ đỡ màng lọc hình nón, để đỡ phễu lọc màng (6.11) trong các ống ly tâm (6.9) (Amicon CS1A¹⁾, hoặc tương đương).

6.11 Phễu lọc màng, ngưỡng từ 25 000 D đến 30 000 D (Amicon Centreflo¹⁾ CF-25, hoặc tương đương).

Chuẩn bị các phễu lọc màng mới trước khi sử dụng như sau: Ngâm phễu trong hỗn hợp của etanol và nước (2 + 8 tính theo phần thể tích) trong 1 h. Lấy phễu ra và để ráo nước. Đặt phễu vào trong dụng cụ đỡ màng lọc hình nón (6.10) và đặt dụng cụ đỡ vào trong ống ly tâm 50 ml. Ly tâm phễu ở gia tốc quay 900 g đến 1 000 g trong khoảng từ 5 min đến 10 min.

Lật ngược phễu lọc màng mới để làm khô hết phần dung môi còn sót lại. Đặt phễu đã chuẩn bị vào các dụng cụ đỡ trong ống ly tâm sạch đã được dán nhãn (6.9) dùng cho mẫu phân tích. Sau mỗi lần sử dụng, ngâm phễu ngay vào nước nóng, rửa bằng nước nóng và bảo quản trong hỗn hợp của etanol và nước (1 + 5 tính theo phần thể tích). Loại bỏ dung môi trước khi sử dụng phễu cho lần tiếp theo như trên đối với phễu mới.

Cách khác, có thể dùng bộ lọc Milipore Ultrare-PF¹⁾ (UFP1, ngưỡng 10 000 D). Bộ lọc dùng một lần không cần phải xử lý trước và quá trình lọc có thể được thực hiện bằng áp suất nhẹ hoặc chân không; không cần ly tâm.

6.12 Thiết bị HPLC, bao gồm:

6.12.1 Bơm, có thể cài đặt ở tốc độ dòng 2 ml/min.

6.12.2 Bộ phận bơm mẫu, bằng tay hoặc tự động, dung tích bơm từ 50 µl đến 200 µl.

6.12.3 Cột phân tích, Partisphere C-18¹⁾, 5 µm, đường kính trong 4,7 mm, dài 110 mm, hoặc tương đương.

6.12.4 Cột bảo vệ (tuỳ chọn), cột SPHERI-5 C-18¹⁾, đường kính trong 3,2 mm, dài 15 mm, hoặc tương đương.

6.12.5 Detector điện hoá, dùng chế độ dòng một chiều hoặc chế độ đo ampe xung, có điện cực làm việc bằng bạc ở điện thế từ 0 mV đến + 50 mV.

6.12.6 Bộ ghi hoặc bộ tích phân, có thể đo diện tích pic, tốt nhất là dùng bộ máy tích phân điện tử có chức năng đo "pic âm" (ví dụ Spectra Physics¹⁾ là thích hợp).

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)^[2].

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

¹⁾ Đây là các ví dụ về các sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho các kết quả tương tự.

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Yêu cầu chung

Tránh làm nhiễm khuẩn trong suốt quá trình chuẩn bị mẫu.

8.2 Sữa

Đưa mẫu thử về nhiệt độ $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trộn đều. Nếu không thu được sự phân tán đồng đều của chất béo thì đun nóng mẫu từ từ đến $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trộn nhẹ bằng cách đảo ngược hộp chứa mẫu. Sau đó làm nguội đến nhiệt độ $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.3 Sữa bột

Chuyển mẫu sang hộp chứa có nắp đậy kín khí, có dung tích lớn gấp hai lần thể tích mẫu. Đậy ngay hộp và trộn đều mẫu bằng cách lắc và đảo chiều hộp chứa nhiều lần.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử

9.1.1 Sữa

Cân $45\text{ g} \pm 5\text{ g}$ phần mẫu thử, chính xác đến $0,1\text{ g}$, cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.2). Thêm nước đến vạch và trộn đều.

9.1.2 Sữa bột

Cân $4,2\text{ g} \pm 0,2\text{ g}$ mẫu thử, chính xác đến $0,01\text{ g}$ cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.2). Thêm từ 70 ml đến 80 ml nước và lắc mạnh trong 5 min đến 10 min để hoà tan mẫu. Cho 1 giọt n-pentanol (5.6) để khử bọt và trộn. Thêm nước đến vạch và trộn đều.

9.2 Làm sạch

Rót đầy phần mẫu thử đã được pha loãng (9.1.1 hoặc 9.1.2) vào hai phễu lọc màng đến cách miệng khoảng 5 mm và cho li tâm ở gia tốc từ 900 g đến 1 000 g khoảng từ 15 min đến 20 min. Phần dịch lọc trong thu được (nghĩa là đối với một mẫu hai dung dịch thử) có thể bơm trực tiếp lên hệ thống HPLC.

CHÚ THÍCH: Về quy trình làm sạch thay thế, xem 6.11, đoạn cuối.

9.3 Xác định bằng HPLC

9.3.1 Tối ưu hoá các điều kiện HPLC

TCVN 7080:2010

Rửa cột HPLC mới bằng cách bơm qua cột một hỗn hợp axetonitril (5.3) và nước (5.1) (1 + 1 tính theo phần thể tích) và chạy tiếp 30 ml dịch rửa giải HPLC (5.5). Sau đó chạy lại dịch rửa giải với tốc độ 2 ml/min trong vòng ít nhất 1 h.

Bật detector điện hoá (6.12.5) (điện thế 0 mV đến + 50 mV; đầu ra với thang đo từ 10 nA đến 20 nA). Tiếp tục bơm dịch rửa giải HPLC (5.5) cho đến khi thu được đường nền ổn định.

Bơm lặp lại 50 μ l dung dịch chuẩn làm việc iodua với nồng độ iodua 250 μ g/l (5.2.2) cho đến khi thời gian lưu và chiều cao pic là ổn định; tức là chênh lệch tuyệt đối giữa các chiều cao pic của hai lần bơm kế tiếp nhau không vượt quá 3 %. Thời gian lưu các iodua nằm trong khoảng từ 4 min đến 8 min; nếu không, thì chỉnh lại thành phần của dịch rửa giải (5.5). Chỉnh điện thế của điện cực trong khoảng từ 0 mV đến + 50 mV để tối ưu hình dạng và chiều cao pic (xem Hình 1).

Xác định thể tích bơm của dung dịch chuẩn làm việc iodua 250 μ g/l (5.2.2) cho chiều cao pic khoảng 80 % toàn thang đo. Sử dụng thể tích bơm này cho tất cả các dung dịch thử và các dung dịch chuẩn.

Dịch rửa giải HPLC (5.5) được bơm lại giữa các lần phân tích mẫu hoặc khi chỉ bơm các dung dịch chuẩn. Tuy nhiên, không bơm dịch rửa giải khi đang bơm các dung dịch thử. Để duy trì tính sẵn sàng của hệ thống khi sử dụng, cần đặt tốc độ dòng của dịch rửa giải 0,2 ml/min. Khi các lần sử dụng cách nhau trong khoảng thời gian dài, thì hệ thống HPLC cần được rửa bằng hỗn hợp axetonitril (5.3) và nước (5.1) (1 + 1 tính theo phần thể tích) và cân bằng lại bằng dịch rửa giải HPLC (5.5) trước khi dùng tiếp.

9.3.2 Tiến hành đo

Bơm bốn dung dịch chuẩn làm việc iodua (5.2.2). Sau khi rửa giải iodua đợi 5 min rồi bơm tiếp. Đo các chiều cao pic iodua hoặc các diện tích pic của các dung dịch chuẩn làm việc iodua.

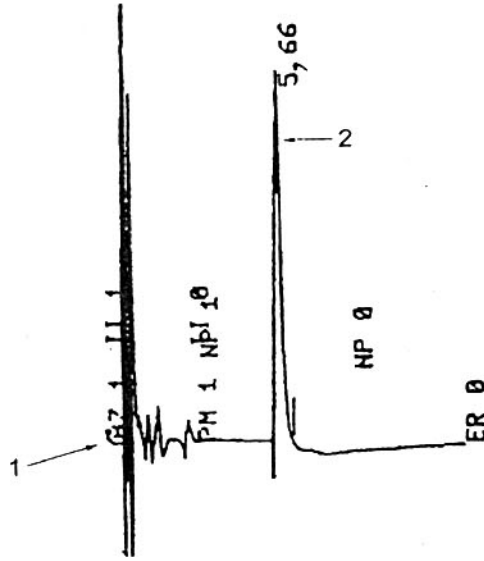
Bơm các phần mẫu thử (lặp lại hai lần như trong 9.2). Sau khi rửa giải iodua đợi 5 min rồi bơm tiếp. Đo các chiều cao pic hoặc các diện tích pic của iodua.

Sau khi bơm 6 lần đến 8 lần các dung dịch thử, bơm lại dung dịch chuẩn làm việc iodua 150 μ g/l (5.2.2). Chênh lệch về chiều cao pic hoặc diện tích pic của iodua không được quá 5 % so với giá trị thu được trước đó.

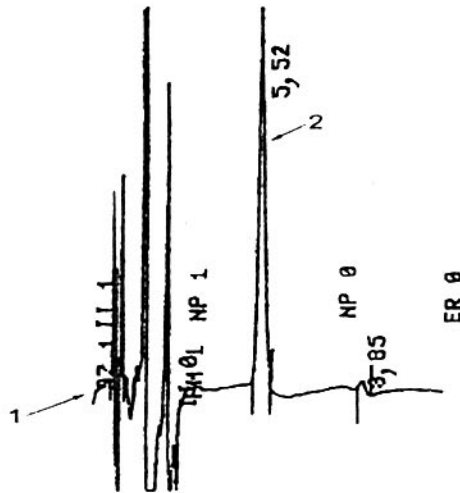
Tùy thuộc vào các điều kiện làm sạch, chất lượng của các dung môi HPLC và điện cực mà có thể quan sát thấy phần pic âm nằm cạnh pic iodua trong sắc kí đồ. Máy tích phân phải được chỉnh sao cho phần âm của pic (dưới đường nền) không nằm trong phép đo chiều cao pic hoặc diện tích pic.

9.4 Dạng đường chuẩn

Thực hiện phép phân tích bình phương nhỏ nhất tuyến tính trên mối tương quan giữa nồng độ và tín hiệu thu được (chiều cao pic hoặc diện tích pic) đối với bốn dung dịch chuẩn làm việc iodua. Không tính điểm zero (0,0) trong phép tính. Hệ số tương quan phải $\geq 0,99$.



a) Sắc kí đồ của chuẩn iodua (102 µg/l)



b) Sắc kí đồ của sữa bột gầy (2,3 µg/l)

CHÚ DẪN:

- 1 Bơm
- 2 Iodua

CHÚ THÍCH: Sắc kí đồ LC điển hình trong dung dịch chuẩn làm việc iodua và trong mẫu sữa bột phân tích trên cột Partisphere C-18 5 µm, đường kính trong 4,7 mm, chiều dài 110 mm.

Hình 1 – Sắc kí đồ điển hình của các dung dịch iodua

TCVN 7080:2010

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Tính toán

Hàm lượng iodua, w_1 , tính bằng microgam trên gam, theo công thức:

$$w_1 = \frac{\rho_1}{m} \times 0,1$$

trong đó:

ρ_1 là hàm lượng iodua của dung dịch thử được tính từ đường hồi quy hoặc đọc từ đường chuẩn, tính bằng microgam trên lít ($\mu\text{g/l}$);

m là khối lượng của phần mẫu thử (9.1), tính bằng gam (g).

10.2 Biểu thị kết quả

10.2.1 Sữa

Biểu thị kết quả thử nghiệm đến ba chữ số thập phân đối với hàm lượng iodua nhỏ hơn 0,1 $\mu\text{g/g}$ và đến hai chữ số thập phân đối với hàm lượng iodua từ 0,1 $\mu\text{g/g}$ đến 1 $\mu\text{g/g}$.

10.2.2 Sữa bột

Biểu thị kết quả thử nghiệm đến hai chữ số thập phân đối với hàm lượng iodua nhỏ hơn 1 $\mu\text{g/g}$ và đến một chữ số thập phân đối với hàm lượng iodua từ 1 $\mu\text{g/g}$ đến 10 $\mu\text{g/g}$.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị lặp lại và tái lập thu được từ các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm theo ISO 5725:1986^[5]. Các kết quả này được nêu trong Tài liệu tham khảo [7].

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 25 % trung bình cộng của hai kết quả.

10.1 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống thử hết nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 30 % trung bình cộng của hai kết quả.

12 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 dùng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thu được hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại, nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Lấy mẫu.*
- [2] TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ.*
- [3] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức một vạch.*
- [4] TCVN 8488 (ISO 4788), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Ống đong chia độ*
- [5] ISO 5725:1986²⁾, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.*
- [6] ISO 8655-2, *Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes.*
- [7] SERTL, D., MALONE, W. Liquid chromatographic method for determination of iodine in milk: Collaborative study. J. AOAC Int. 1993. **76**. pp. 711-719.

²⁾ Tiêu chuẩn này đã hủy.