

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8142 : 2009

ISO 3496 : 1994

Xuất bản lần 1

**THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
HYDROXYPROLIN**

Meat and meat products – Determination of content hydroxyproline content

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8142 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 3496 : 1994;

TCVN 8142 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F8
Thịt và sản phẩm thịt biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thịt và sản phẩm thịt – Xác định hàm lượng hydroxyprolin

Meat and meat products – Determination of hydroxyproline content

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng hydroxyprolin trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho thịt và sản phẩm thịt chứa hàm lượng hydroxyprolin nhỏ hơn 0,5 % (khối lượng).

2 Thuật ngữ, định nghĩa

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

Hàm lượng hydroxyprolin trong thịt và sản phẩm thịt (hydroxyproline content of meat and meat products):

Hàm lượng hydroxyprolin xác định được theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

Hàm lượng hydroxyprolin được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

3 Nguyên tắc

Thủy phân phần mẫu thử trong axit sulfuric ở 105 °C. Lọc và pha loãng dịch thủy phân. Oxi hoá hydroxyprolin bằng cloramin-T, sau đó tạo phức màu đỏ với *p*-dimetyl-aminobenzaldehyt. Đo quang phổ ở bước sóng 558 nm.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng phân tích và nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

4.1 Dung dịch axit sulfuric, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 3 \text{ mol/l}$.

Cho 750 ml nước vào bình định mức một vạch dung tích 2 l. Vừa thêm từ từ vừa khuấy 320 ml axit sulfuric đậm đặc ($\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$). Để nguội đến nhiệt độ phòng và thêm nước đến vạch.

4.2 Dung dịch đệm, pH = 6,8, gồm:

26,0 g axit xitric ngâm một phân tử nước ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$);

14,0 g natri hydroxit;

78,0 g natri axetat khan [$\text{Na}(\text{CH}_3\text{CO}_2)$].

Hoà tan các thuốc thử trong 500 ml nước và chuyển hết vào bình định mức một vạch dung tích 1 l. Thêm 250 ml propan-1-ol và thêm nước đến vạch.

Khi được bảo quản ở 4 °C, nơi tối, dung dịch này có thể bền trong vài tuần.

4.3 Thuốc thử Cloramin-T

Hoà tan 1,41 g natri *N*-clo-*p*-toluen-sulfonamid ngâm ba phân tử nước (cloramin-T) trong 100 ml dung dịch đệm (4.2).

Chuẩn bị dung dịch ngay trước khi sử dụng.

4.4 Thuốc thử màu

Hoà tan 10,0 g *p*-dimethylaminobenzaldehyt trong 35 ml dung dịch axit perchloric [60 % (khối lượng)] sau đó thêm từ từ 65 ml propan-2-ol.

Chuẩn bị dung dịch này trong ngày sử dụng.

Nếu cần tinh sạch *p*-dimethylaminobenzaldehyt (xem chú thích 3 trong 8.4), thì tiến hành như sau: Chuẩn bị dung dịch bão hoà *p*-dimethylaminobenzaldehyt trong etanol nóng 70 % (thể tích). Làm nguội, đầu tiên ở nhiệt độ phòng, sau đó để trong tủ lạnh. Sau khoảng 12 h, lọc bằng phễu Bunchner. Rửa bằng một ít etanol 70 % (thể tích). Hoà tan lại trong etanol nóng 70 % (thể tích). Thêm nước nguội và khuấy kỹ. Lặp lại thao tác này cho đến khi hình thành đủ một lượng tinh thể màu trắng sữa. Để trong tủ lạnh qua đêm. Lọc bằng phễu Bunchner. Rửa bằng etanol 50 % (thể tích) và sấy chân không trên oxit phospho (V).

4.5 Hydroxyprolin, dung dịch chuẩn.

Chuẩn bị dung dịch gốc bằng cách hoà tan 50 mg axit 4-hydroxyprolidin- α -cacbohic (hydroxyprolin) trong nước đựng trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml. Thêm 1 giọt dung dịch axit sulfuric (4.1) và thêm nước đến vạch. Khi được bảo quản ở 4 °C dung dịch này có thể bền ít nhất trong 1 tháng.

Trong ngày sử dụng, chuyển 5 ml dung dịch gốc vào bình định mức một vạch dung tích 500 ml và thêm nước đến vạch. Sau đó chuẩn bị bốn dung dịch chuẩn bằng cách pha loãng 10 ml, 20 ml, 30 ml và 40 ml dung dịch này trong 100 ml nước để thu được các nồng độ hydroxyprolin tương ứng 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 1,5 µg/ml và 2 µg/ml

5 Thiết bị, dụng cụ

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

- 5.1 **Máy xay thịt bằng điện**, có các lưỡi dao nằm ngang, có khả năng quay ở tốc độ cao.
- 5.2 **Bình thủy phân đáy tròn hoặc đáy phẳng**, có dung tích khoảng 200 ml, cổ rộng.
- 5.3 **Tủ sấy**, có khả năng hoạt động ở $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.4 **Đĩa bằng giấy lọc**, đường kính 12,5 cm.
- 5.5 **Máy đo pH**.
- 5.6 **Lá nhôm hoặc lá bằng chất dẻo mờ**.
- 5.7 **Nồi cách thủy**, có khả năng duy trì được ở $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.8 **Máy đo phổ**, phù hợp khi sử dụng ở bước sóng $558\text{ nm} \pm 2\text{ nm}$, **máy đo màu quang điện** có bộ lọc nhiễu với độ hấp thụ tối đa ở bước sóng $558\text{ nm} \pm 2\text{ nm}$.
- 5.9 **Cuvet thủy tinh**, chiều dài đường quang 10 mm.
- 5.10 **Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến $\pm 0,001\text{ g}$.
- 5.11 **Bình định mức**, dung tích 250 ml.
- 5.12 **Mặt kính đồng hồ**, đường kính từ 5 cm đến 6 cm.

6 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo ISO 3100-1¹⁾.

Lấy ít nhất 200 g mẫu đại diện.

Bảo quản mẫu sao cho mẫu không bị giảm chất lượng và không bị thay đổi thành phần.

¹⁾ ISO 3100-1 : 1991 (đã được biên soạn thành TCVN 4833-1 : 2002).

Hiện nay, ISO 3100-1 : 1991 đã bị hủy và được thay thế bằng ISO 17604 : 2003 (được biên soạn thành TCVN 7925 : 2008 *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp lấy mẫu thân thịt tươi để phân tích vi sinh vật*).

7 Chuẩn bị mẫu thử

7.1 Thịt nguyên liệu và sản phẩm thịt

Cắt miếng thịt thành các khối lập phương nhỏ (khoảng $0,5 \text{ cm}^3$, nghĩa là các cạnh dài khoảng 8 mm) bằng cách dùng dao sắc cắt trong khi thịt vẫn còn lạnh (dưới 0°C).

Cho mẫu vào vật chứa rồi hàn kín hoặc đóng gói chân không mẫu trong màng chất dẻo chịu nhiệt. Sau đó gia nhiệt vật chứa và mẫu sao cho duy trì được nhiệt độ ở ít nhất 70°C trong ít nhất 30 min. Để nguội và tiến hành theo 7.2.

Trong suốt giai đoạn còn lại của quá trình chuẩn bị mẫu thử và cân phần mẫu thử, đảm bảo rằng mẫu đã được trộn kỹ, cụ thể là tất cả chất béo hoặc dịch lỏng được phân bố đồng đều.

CHÚ THÍCH 1 Việc xử lý nhiệt làm mềm mô liên kết và làm độ bền kém đi khi đông hoá bằng cách xay. Tuy nhiên, điều này cũng làm tách chất lỏng có chứa gelatin. Sự có mặt của chất béo có thể phải đặc biệt chú ý khi tạo mẫu thử đồng nhất.

7.2 Thịt nấu chín và sản phẩm thịt đã nấu chín

Đông hoá mẫu trong máy xay thịt (5.1). Cho đầy mẫu đã đồng nhất vào vật chứa kín khí, đậy nắp vật chứa và bảo quản sao cho không bị giảm chất lượng và thay đổi thành phần. Phân tích mẫu càng sớm càng tốt, chỉ trong vòng 24 h.

8 Cách tiến hành

8.1 Phần mẫu thử

Cân khoảng 4 g mẫu thử, chính xác đến $0,001 \text{ g}$ vào bình thủy phân (5.2). Đảm bảo rằng nguyên liệu mẫu không bị bám dính trên thành bình.

8.2 Thủy phân

8.2.1 Cho $30 \text{ ml} \pm 1 \text{ ml}$ dung dịch axit sulfuric (4.1) vào bình. Đậy bình bằng mặt kính đồng hồ (5.12) và đặt trong tủ sấy (5.3) trong 16 h (thích hợp nhất là để bình qua đêm) ở 105°C .

8.2.2 Lọc dịch thủy phân nóng qua giấy lọc (5.4) vào bình định mức một vạch (5.11) 250 ml. Rửa bình và giấy lọc ba lần bằng 10 ml phần dung dịch axit sulfuric nóng (4.1) và cho nước rửa vào dịch thủy phân. Thêm nước đến vạch.

8.3 Hiện màu và đo độ hấp thụ

8.3.1 Dùng pipet chuyển vào bình định mức một vạch 250 ml (5.11) thể tích (V) dịch thủy phân (8.2.2) sao cho sau khi pha loãng đến 250 ml thì nồng độ hydroxyprolin sẽ trong khoảng từ $0,5 \mu\text{g/ml}$ đến $2 \mu\text{g/ml}$. Thêm nước đến vạch.

CHÚ THÍCH 2 Trong hầu hết các trường hợp, V sẽ từ 5 ml đến 25 ml, tùy thuộc vào lượng mô liên kết có mặt trong mẫu.

8.3.2 Chuyển 4,00 ml dung dịch này (8.3.1) vào ống nghiệm và thêm 2,00 ml thuốc thử cloramin-T (4.3). Trộn đều và để yên ở nhiệt độ phòng trong 20 min \pm 1 min.

8.3.3 Thêm 2,00 ml thuốc thử màu (4.4), trộn kỹ và đậy nắp ống bằng lá nhôm hoặc lá bằng chất dẻo (5.6).

8.3.4 Chuyển nhanh ống vào nồi cách thủy (5.7) ở 60 °C và làm nóng đúng 20 min.

8.3.5 Làm nguội ống dưới vòi nước chảy ít nhất 3 min và để ở nhiệt độ phòng trong 30 min.

8.3.6 Dùng máy đo phổ hoặc máy đo màu quang điện có bộ lọc nhiễu (5.8) để đo độ hấp thụ ở 558 nm \pm 2 nm trong cuvet thủy tinh (5.9) chứa nước.

8.3.7 Lấy độ hấp thụ thu được của dung dịch mẫu trừ đi độ hấp thụ thu được của dung dịch trắng (8.4) rồi đọc nồng độ hydroxyprolin của dịch thủy phân pha loãng từ đường chuẩn thu được trong 8.5.

8.4 Phép thử trắng

Tiến hành lặp lại hai lần các quy trình trong 8.3.2 đến 8.3.7, nhưng thay phần dịch thủy phân pha loãng bằng nước.

CHÚ THÍCH 3 Nếu độ hấp thụ của mẫu trắng vượt quá 0,040, thì phải chuẩn bị thuốc thử màu mới (4.4) và *p*-dimetylaminobenzaldehyt phải được tinh sạch (xem chú thích 1 trong 4.4), nếu cần.

8.5 Đường chuẩn

8.5.1 Tiến hành quy trình trong 8.3.2 đến 8.3.7, nhưng thay dịch thủy phân pha loãng bằng bốn dung dịch hydroxyprolin chuẩn pha loãng (4.5), mỗi dung dịch 4,00 ml.

8.5.2 Vẽ giá trị độ hấp thụ đo được, đã hiệu chỉnh với giá trị trắng, dựa vào nồng độ của các dung dịch hydroxyprolin chuẩn. Dựng đường thẳng đi qua các điểm và gốc tọa độ.

Chuẩn bị đường chuẩn mới đối với từng dãy phân tích.

9 Tính toán

Đối với từng phần mẫu thử, tính hàm lượng hydroxyprolin, biểu thị bằng phần trăm khối lượng theo công thức:

$$w_h = \frac{6,25c}{m \times V}$$

trong đó

w_h là hàm lượng hydroxyprolin theo công thức, được biểu thị bằng phần trăm khối lượng;

- c là nồng độ hydroxyprolin của dịch thủy phân loãng đọc được từ đường chuẩn, tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$);
- m là khối lượng phần mẫu thử (8.1), tính bằng gam (g);
- V là thể tích phần dịch lỏng của dịch thủy phân đã lấy để pha loãng đến 250 ml (xem 8.3.1), tính bằng mililit (ml).

Lấy kết quả chính xác đến 0,01 %.

10 Độ chụm

Độ chụm của phương pháp này được thiết lập bởi liên phòng thử nghiệm quốc tế, tiến hành thử nghiệm theo ISO 5725.

Đối với các giá trị thu được về độ lặp lại và độ tái lập, được tính ở mức xác suất 95 %.

10.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai lần xác định độc lập, riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp trên cùng một loại vật liệu thử trong cùng phòng thử nghiệm, do cùng một người thao tác, sử dụng cùng thiết bị trong một khoảng thời gian ngắn, không lớn hơn giá trị r trong công thức:

$$r = 0,013 \ 1 + 0,032 \ 2 \ \bar{w}_n$$

trong đó \bar{w}_n là trung bình của hai kết quả thử nghiệm về hàm lượng hydroxyprolin, biểu thị theo phần trăm khối lượng.

Loại bỏ cả hai kết quả nếu chênh lệch vượt quá giá trị trên và tiến hành hai phép xác định riêng rẽ mới.

10.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên cùng một loại vật liệu thử trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người thao tác khác nhau thực hiện và sử dụng các thiết bị khác nhau, không lớn hơn giá trị R trong công thức:

$$R = 0,019 \ 5 + 0,052 \ 9 \ \bar{w}_n$$

trong đó \bar{w}_n là trung bình của hai kết quả thử nghiệm về hàm lượng hydroxyprolin, biểu thị theo phần trăm khối lượng.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- phương pháp tiến hành lấy mẫu, nếu biết;
- phương pháp đã sử dụng;
- kết quả thử nghiệm thu được, và
- nếu đáp ứng được yêu cầu độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Báo cáo thử nghiệm cũng cần đề cập đến mọi chi tiết thao tác không quy 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.

Báo cáo thử nghiệm cũng phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] ISO 3100-1 : 1991, *Thịt và sản phẩm thịt. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử. Phần 1: Lấy mẫu.*

[2] ISO 5725 : 1986, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for standard tests methods by inter-laboratory tests.*

