

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6270:2011

ISO 6732:2010

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG SẮT –
PHƯƠNG PHÁP ĐO PHỔ (PHƯƠNG PHÁP CHUẨN)**

*Milk and milk products – Determination of iron content –
Spectrometric method (Reference method)*

HÀ NỘI – 2011

Lời nói đầu

TCVN 6270:2011 thay thế TCVN 6270:1997;

TCVN 6270:2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6732:2010/IDF 103:2010;

TCVN 6270:2011 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 sản phẩm sữa – Xác định hàm lượng sắt – Phương pháp đo phổ (Phương pháp chuẩn)

*Milk and milk products – Determination of iron content –
Spectrometric method (Reference method)*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuẩn để xác định hàm lượng sắt trong sữa và sản phẩm sữa bằng đo phổ.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- sữa, sữa gầy, whey và buttermilk;
- sữa chua;
- sữa cô đặc và sữa đặc có đường;
- sữa bột nguyên chất và sữa bột gầy, whey bột và buttermilk bột;
- cream và bơ;
- butterfat khan, butteroil, butterfat và ghee;
- kem lạnh thực phẩm;
- phomat và phomat đã chế biến;
- casein, caseinat và các chất đồng kết tủa.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Hàm lượng sắt trong sữa và sản phẩm sữa (iron content in milk and milk products)

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

CHÚ THÍCH Hàm lượng sắt thường được biểu thị bằng miligam trên kilogam mẫu.

3 Nguyên tắc

Chất hữu cơ được phân hủy bằng hỗn hợp của axit nitric và axit sulfuric, đối với cream, butterfat khan, butteroil, butterfat và ghee thì trước đó phải loại bỏ chất béo. Đối với bơ thì tách và vô cơ hoá serum.

Khử ion sắt(III) thành ion sắt(II) rồi tạo phức của ion sắt(II) với bathophenanthrolin. Hợp chất sắt(II) được chiết bằng isoamyl alcohol. Đo phổ hấp thụ của dung dịch màu đỏ tạo thành ở bước sóng 533 nm.

4 Thuốc thử

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Bảo quản thuốc thử, dụng cụ thủy tinh và thiết bị cũng như môi trường của phòng thử nghiệm càng sạch càng tốt để tránh bụi. Mỗi phòng thử nghiệm cần kiểm tra và nhận biết các nguồn nhiễm bẩn.

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích không chứa ion sắt, ngoại trừ các dung dịch chuẩn sắt (4.14 và 4.15).

4.1 Nước, phù hợp với loại 2 của TCVN 4851(ISO 3696)^[5].

4.2 Etanol (C₂H₅OH), khoảng 96 % (thể tích).

Nếu cần, chưng cất bằng bộ chưng cất không chứa sắt.

4.3 Diethyl ete (C₂H₅OC₂H₅)

Nếu cần, chưng cất bằng bộ chưng cất không chứa sắt.

4.4 Dầu nhẹ, nhiệt độ sôi từ 40 °C đến 60 °C

Nếu cần, chưng cất bằng bộ chưng cất không chứa sắt.

4.5 Axit nitric (HNO₃), đậm đặc, ρ₂₀ = 1,42 g/ml

Chưng cất bằng bộ chưng cất không chứa sắt. Loại bỏ 50 ml dịch cất đầu tiên. Không bảo quản axit nitric trong chai thủy tinh màu nâu.

4.6 Axit sulfuric ¹⁾ (H₂SO₄), đậm đặc, ρ₂₀ = 1,84 g/ml.

4.7 Kali sulfat ¹⁾, dung dịch, trong axit sulfuric

Hoà tan 25 g kali sulfat (K₂SO₄) khan trong axit sulfuric (4.6) và thêm axit sulfuric này đến 100 ml. Lọc dung dịch qua phễu lọc bằng thủy tinh xốp không chứa sắt, có độ xốp P100 (đường kính lỗ từ 40 μm đến 100 μm), không được hút.

¹⁾ Các thuốc thử Aristar, Suprapur và Ultrex là các ví dụ về các sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng các sản phẩm nêu trên.

Nếu kali sulfat có chứa sắt thì tinh sạch như sau:

Hoà tan 40 g kali sulfat trong 500 ml nước (4.1) và thêm 3 ml dung dịch hydroxylamoni clorua (4.10). Chiết dung dịch này bằng 10 ml dung dịch bathophenanthrolin (4.12). Loại bỏ lớp phía trên. Lặp lại hai thao tác này cho đến khi lớp trên cùng còn lại không màu. Cho bay hơi nước trong tủ sấy sạch.

4.8 Hydro peroxit ¹⁾ (H₂O₂), dung dịch, $\rho_{20} = 1,099$ g/ml đến 1,103 g/ml

Bảo quản trong tủ lạnh.

4.9 Natri axetat ¹⁾, dung dịch bão hoà

Hoà tan 232,5 g natri axetat khan (CH₃COONa) trong 500 ml nước (4.1).

Nếu natri axetat còn chứa sắt thì tinh sạch như sau:

Hoà tan 232,5 g natri axetat trong 500 ml nước. Lọc qua giấy lọc. Thêm 3 ml dung dịch hydroxylamoni clorua (4.10). Chiết dung dịch bằng 10 ml dung dịch bathophenanthrolin (4.12). Loại bỏ lớp phía trên. Lặp lại hai thao tác này cho đến khi lớp trên cùng còn lại không màu.

4.10 Hydroxylamoni clorua, dung dịch

Hoà tan 20 g hydroxylamoni clorua (HONH₂Cl) trong nước (4.1) và thêm nước đến 100 ml. Lọc qua giấy lọc. Chiết dung dịch bằng 5 ml dung dịch bathophenanthrolin (4.12). Để cho tách lớp. Loại bỏ lớp phía trên. Lặp lại hai thao tác này cho đến khi lớp trên cùng còn lại không màu.

CHÚ THÍCH Thông thường chiết năm lần là đủ.

Nếu dung dịch đã chuẩn bị quá 24 h trước khi sử dụng thì nên lặp lại việc chiết bằng bathophenanthrolin.

Có thể dùng dung dịch axit ascorbic mới pha để thay cho dung dịch hydroxylamoni clorua làm chất khử. Có thể chuẩn bị dung dịch axit ascorbic này bằng cách hoà tan 10 g axit ascorbic trong 100 ml nước. Dung dịch này cũng cần được chiết bằng dung dịch bathophenanthrolin đúng theo cách đã mô tả đối với dung dịch hydroxylamoni clorua. Cần bảo quản dung dịch này trong tủ lạnh. Có thể dùng 3 ml dung dịch axit ascorbic này để thay thế cho 3 ml dung dịch hydroxylamoni clorua được dùng trong 4.7, 4.9 và 8.2.1.4.

4.11 Isoamyl alcohol (3-metyl-1-butanol)

Nếu cần, chưng cất bằng bộ chưng cất không chứa sắt.

4.12 Bathophenanthrolin, dung dịch

Hoà tan 83,1 mg bathophenanthrolin [4,7 diphenyl-1,10-phenanthrolin (C₂₄H₁₆N₂)] trong 100 ml isoamyl alcohol (4.11).

TCVN 6270:2011

4.13 Kali pemanganat, dung dịch

Hoà tan 100 mg kali pemanganat (KMnO_4) trong 50 ml nước (4.1).

4.14 Sắt, dung dịch chuẩn 1 000 mg sắt trên lít.

Hoà tan 7,022 g amoni sắt(II) sulfat ngậm sáu phân tử nước $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ trong 250 ml nước (4.1). Thêm 8 ml axit sulfuric (4.6) và để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm nước đến 1 000 ml.

1 ml dung dịch chuẩn này chứa 1 mg sắt.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng các chế phẩm có bán sẵn trên thị trường chứa 1 000 mg sắt để thay cho amoni sắt(II) sulfat ngậm sáu phân tử nước.

4.15 Sắt, dung dịch chuẩn 1 mg sắt trên lít

Trong ngày sử dụng, dùng pipet (5.11) lấy 1 ml dung dịch chuẩn sắt (4.14) cho vào 250 ml nước (4.1). Thêm 1 ml axit sulfuric (4.6) và thêm nước đến 1 000 ml.

Thể tích của 1 ml dung dịch chuẩn này chứa 1 μg sắt.

5 Thiết bị, dụng cụ

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Bảo quản dụng cụ thủy tinh và thiết bị cũng như môi trường của phòng thử nghiệm càng sạch càng tốt để tránh bụi. Mỗi phòng thử nghiệm cần kiểm tra và nhận biết các nguồn nhiễm bẩn.

Bảo quản dụng cụ thủy tinh sạch, kể cả bi thủy tinh (5.8) trong dung dịch axit nitric 10 % khối lượng. Trước khi dùng, tráng ba lần bằng nước cất sau đó lại tráng ba lần bằng nước cất hai lần. Nếu cần, làm khô bằng cách tráng lần lượt bằng etanol (4.2) và bằng dietyl ete (4.3).

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

5.1 Cân phân tích.

5.2 Máy li tâm, có khả năng tạo gia tốc quay 2 500g, với các ống có dung tích ít nhất 150 ml.

5.3 Dụng cụ nghiền, phù hợp với mẫu.

5.4 Rây, có lỗ với kích thước 500 μm , ISO 565^[1] làm bằng vật liệu không chứa sắt.

5.5 Nồi cách thủy.

5.6 Đầu đốt nhỏ hoặc bếp điện, loại không phát ra các hạt chứa sắt.

5.7 Bình phân hủy (Kjeldahl), có dung tích khoảng 70 ml, có nút mài thủy tinh, được hiệu chuẩn ở phần dưới cổ bình ở 50 ml.

5.8 Bi thủy tinh, tốt nhất là bi thạch anh, không giải phóng sắt trong quá trình phân hủy (8.2.1).

5.9 Ống đong, có dung tích 5 ml, 10 ml và 25 ml phù hợp với yêu cầu trong TCVN 8488 (ISO 4788)^[6].

5.10 Pipet chia độ, dung tích 1 ml, 2 ml và 5 ml, chia độ từng khoảng 0,1 ml, phù hợp với quy định trong TCVN 7150 (ISO 835)^[4].

5.11 Pipet một vạch, dung tích 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml và 25 ml, phù hợp với quy định của loại A trong TCVN 7151 (ISO 648)^[2].

5.12 Máy đo phổ, thích hợp để đo độ hấp thụ ở sóng 533 nm, được trang bị các cuvet có chiều dài đường quang 10 mm.

6 Lấy mẫu

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Tránh nhiễm bẩn sắt. Bảo quản các bình lấy mẫu bằng thủy tinh trong dung dịch axit nitric 10 % khối lượng. Tránh kĩ và làm khô trước khi sử dụng.

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 Chuẩn bị mẫu thử

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Tránh bị nhiễm bẩn sắt.

7.1 Sữa, sữa gầy và whey

Đưa mẫu về nhiệt độ $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trộn thật đều. Nếu trong trường hợp sữa có chất béo phân tán không đều thì làm nóng mẫu từ từ đến $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, trộn nhẹ chỉ bằng cách đảo chiều vật chứa và làm nguội thật nhanh đến $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.2 Buttermilk

Nếu cần, loại bỏ các hạt bơ. Đưa mẫu về nhiệt độ $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trộn thật kĩ ngay trước khi cân (xem 8.1.1).

7.3 Sữa chua

Đưa mẫu về nhiệt độ $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trộn thật kĩ. Nếu tách phần dịch lỏng thì khuấy thật mạnh ngay trước khi cân (xem 8.1.1).

7.4 Cream

Đưa mẫu về nhiệt độ $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trộn hoặc khuấy thật kĩ, nhưng không quá mạnh để tránh tạo bọt hoặc đánh kem.

Nếu cream quá đặc hoặc nếu chất béo phân tán không đều thì đun nóng từ từ đến $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ để dễ trộn.

Làm nguội nhanh mẫu thử đến $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Khuấy mẫu trong bình chứa thật kĩ. Khuấy cho đến khi toàn bộ khối lượng mẫu đồng nhất. Đóng nắp bình chứa lại.

Nếu mẫu không được trộn kĩ hoặc nếu có dấu hiệu cho thấy mẫu bị đánh kem hoặc có các dấu hiệu khác không bình thường thì sẽ không thu được kết quả đúng.

7.5 Sữa cô đặc

Lắc kĩ hộp đựng mẫu, thỉnh thoảng đảo chiều. Mở hộp chứa và rót sữa từ từ vào một bình thủy tinh khác, có nắp kín, cẩn thận lấy hết chất béo hoặc các thành phần khác bám ở thành hộp ban đầu cho vào mẫu. Khuấy thật mạnh và đậy nắp bình lại.

Đun nóng bình đã đậy nắp trong nồi cách thủy từ $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cứ 15 min lại lấy bình ra và lắc mạnh. Sau 2 h, lấy hẳn bình ra và làm nguội đến $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mở nắp và khuấy kĩ mẫu bằng thìa hoặc bằng dao trộn.

Nếu chất béo bị tách ra thì sẽ không thu được kết quả đúng.

7.6 Sữa đặc có đường

Mở nắp hộp và trộn đều sữa bằng thìa hoặc dao trộn, trộn kĩ từ trên xuống dưới sao cho các lớp sữa ở đáy và ở trên được trộn lẫn với nhau. Cẩn thận lấy hết tất cả sữa bám ở thành hộp và đáy hộp cho vào mẫu.

Chuyển mẫu càng triệt để càng tốt sang bình thủy tinh thứ hai, có nắp đậy kín và đóng nắp lại. Đun nóng bình đã đậy nắp trong nồi cách thủy ở nhiệt độ từ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Làm nguội đến $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Khuấy mẫu trong bình thật kĩ. Khuấy cho đến khi toàn bộ lượng mẫu đồng nhất. Đóng nắp bình lại.

Trong trường hợp ống có thể gấp lại, mở ống và chuyển lượng chứa trong đó sang bình thủy tinh. Cắt mở ống và chuyển càng triệt để càng tốt mẫu và các phần còn bám vào thành trong của ống sang bình thủy tinh.

7.7 Sữa bột nguyên chất, sữa bột gầy, whey bột và bột buttermilk

Chuyển mẫu sang bình chứa có thể tích gấp đôi thể tích mẫu và có nắp đậy kín. Đậy ngay nắp bình lại. Trộn mẫu thật kĩ bằng cách lắc bình chứa và đảo chiều liên tục.

7.8 Bơ

Do sắt có thể phân bố không đồng nhất trong bơ nên sắt được xác định trong serum. Hàm lượng sắt của phần chất béo được tách từ bơ theo cách được mô tả trong tiêu chuẩn này là không đáng kể so với hàm lượng có trong serum và có thể bỏ qua.

Cân 100 g mẫu, chính xác đến 100 mg, cho vào ống li tâm (5.2) trước đó đã được sấy khô và cân. Đặt ống vào nồi cách thủy duy trì nhiệt độ ở $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ngay sau khi bơ tan hết, cho ống vào máy li tâm chạy với gia tốc quay 2 500g. Dùng pipet loại bỏ lớp chất béo màu sáng, càng triệt để càng tốt. Chiết bằng 10 ml dầu nhẹ (4.4) và dùng pipet loại bỏ lớp trên cùng. Lặp lại hai thao tác này hai lần. Loại bỏ dầu nhẹ còn lại bằng cách làm ấm trong nồi cách thủy ở $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dùng giấy sạch lau khô mặt ngoài của ống. Làm nguội đến $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cân ống cùng chất chứa bên trong, chính xác đến 100 mg. Trộn lượng chứa trong ống thật kĩ, ngay trước khi cân mẫu thử (xem 8.1.5).

7.9 Butterfat khan, butteroil, butterfat và ghee

Đưa mẫu về nhiệt độ $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, duy trì ở nhiệt độ này trong 5 min và khuấy nhẹ. Làm nguội đến $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.10 Kem lạnh thực phẩm

Đối với mẫu đựng trong các gói nhỏ thì mở bao gói và cho mẫu vào bình có nắp đậy kín.

Đối với mẫu lấy từ khối kem hoặc từ bao gói lớn thì giữ nguyên chúng trong hộp chứa. Trong cả hai trường hợp, làm tan chảy mẫu bằng cách đặt bình mẫu vào nồi cách thủy ở $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong một khoảng thời gian đủ để mẫu trở thành dạng lỏng. Lắc bình để trộn mẫu. Làm nguội đến $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiếp tục trộn cho đến nguội.

7.11 Phomat và phomat chế biến

Cắt bỏ lớp vỏ, vết bẩn hoặc lớp bề mặt mốc ra khỏi phomat, sao cho lấy được phần đại diện của phomat như vẫn thường được sử dụng. Dùng dụng cụ nghiền (5.3) thích hợp để nghiền mẫu. Trộn nhanh toàn bộ cả khối và tốt hơn là nghiền nhanh một lần nữa. Nếu mẫu không thể nghiền nhỏ thì trộn toàn bộ mẫu thật kĩ.

Chuyển ngay mẫu đã xử lí sơ bộ hoặc phần đại diện của mẫu sang bình có nắp đậy kín. Phân tích mẫu ngay sau khi nghiền xong mẫu, càng sớm càng tốt. Phomat đã nghiền mà thấy có nấm mốc ngoài ý muốn hoặc bắt đầu hỏng thì không tiếp tục phân tích nữa.

7.12 Casein, caseinat và các chất đồng kết tủa

7.12.1 Nếu phần lớn mẫu đủ mịn để có thể lọt qua sàng (5.4) thì không cần phải nghiền nữa.

TCVN 6270:2011

Lấy khoảng 50 g mẫu cho vào bình chứa có dung tích gấp đôi thể tích mẫu và có nắp đậy kín. Đậy ngay bình lại và trộn mẫu thật kĩ bằng cách lắc và đảo chiều bình liên tục.

7.12.2 Nếu phần lớn mẫu không đủ mịn để lọt qua sàng (5.4) thì nghiền khoảng 50 g mẫu cho đến khi đủ mịn. Chuyển tất cả mẫu vào bình chứa. Tiến hành tiếp như quy định trong 7.12.1.

8 Cách tiến hành

CẢNH BÁO – Phương pháp này đòi hỏi phải có kinh nghiệm về phân tích vi lượng và phải thực hiện cẩn thận. Trong suốt quá trình phân tích, cần chú ý đặc biệt về vấn đề nhiễm bẩn mà có thể ảnh hưởng đến độ chính xác và độ lặp lại của phương pháp.

8.1 Cân và xử lí sơ bộ mẫu thử

8.1.1 Sữa, sữa gầy, whey, buttermilk và sữa chua

Cân 10 g mẫu thử, chính xác đến 10 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 3 ml axit nitric (4.5) và 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.1.2 Cream

Cân 10 g mẫu thử, chính xác đến 10 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 8 ml axit nitric (4.5). Đun nóng bình trong nồi cách thủy từ 80 °C đến 90 °C trong 1 h.

Cứ sau 3 min, lắc mạnh bình để axit nitric rửa chất béo. Làm nguội đến 40 °C và dùng pipet loại bỏ lớp chất béo càng triệt để càng tốt.

Thêm 15 ml dầu nhẹ (4.4), xoay cẩn thận và dùng pipet loại bỏ dung môi. Làm lại hai lần, mỗi lần dùng 15 ml dầu nhẹ mới. Loại bỏ phần dầu nhẹ còn lại bằng cách làm ấm trong nồi cách thủy ở 65 °C. Làm nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.1.3 Sữa cô đặc và sữa đặc có đường

Cân 2,5 g mẫu thử, chính xác đến 1 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 4 ml nước (4.1), 3 ml axit nitric (4.5) và 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.1.4 Sữa bột nguyên chất, sữa bột gầy, whey bột và buttermilk

Cân 1 g mẫu thử, chính xác đến 1 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 4 ml nước và trộn kĩ. Sau đó thêm 3 ml axit nitric (4.5) và 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.1.5 Bơ

Cân 2 g serum của bơ (7.8), chính xác đến 1 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 3 ml axit nitric (4.5) và 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.1.6 Butterfat khan, butteroil, butterfat và ghee

Cân 20 g mẫu thử dạng lỏng, chính xác đến 10 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 4 ml nước (4.1) và 8 ml axit nitric (4.5).

Đun nóng bình phân hủy trong nồi cách thủy từ 80 °C đến 90 °C trong 1 h. Cứ 3 min lắc kỹ bình một lần để axit nitric rửa chất béo. Làm nguội đến 40 °C và dùng pipet loại bỏ lớp chất béo càng triệt để càng tốt.

Thêm 15 ml dầu nhẹ (4.4), xoay cẩn thận và dùng pipet loại bỏ dung môi. Lặp lại hai lần mỗi lần dùng 15 ml dầu nhẹ mới. Loại bỏ phần dầu nhẹ còn lại bằng cách làm ấm trong nồi cách thủy ở 65 °C. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.1.7 Kem lạnh thực phẩm

Cân 2,5 g mẫu thử, chính xác đến 1 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 3 ml axit nitric (4.5) và 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.1.8 Phomat và phomat chế biến

Cân 1 g mẫu thử, chính xác đến 1 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 4 ml nước (4.1), 3 ml axit nitric (4.5) và 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.1.9 Casein, caseinat và các chất đồng kết tủa

Đối với casein và caseinat, cân 0,75 g mẫu thử và đối với các chất đồng kết tủa thì cân 0,35 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình phân hủy (5.7). Thêm 4 ml nước (4.1), 3 ml axit nitric (4.5) và 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7). Tiếp tục theo quy định trong 8.2.

8.2 Phép xác định**8.2.1 Phân hủy**

8.2.1.1 Cho 3 viên bi thủy tinh (thạch anh) (5.8) vào phần mẫu thử chứa trong bình phân hủy (5.7). Thao tác trong tủ hút hoạt động tốt, đặt bình ở tư thế nghiêng và dùng đầu đốt nhỏ (5.6) để đốt. Giám sát chiều cao của ngọn lửa để hạn chế tạo bọt trong bình. Cho phép bọt dâng cao đến cổ bình nhưng không được để bọt tràn ra ngoài. Giữ cho hỗn hợp sôi nhẹ và tránh quá nhiệt từng phần.

8.2.1.2 Khi dung dịch đã chuyển sang màu nâu, cẩn thận thêm từ 3 giọt đến 5 giọt axit nitric (4.5). Đun nóng mạnh càng sớm càng tốt. Tiếp tục đun và thêm axit nitric, mỗi lần từ 5 giọt đến 20 giọt, thỉnh thoảng xoay bình để lấy hết các chất bám ở thành bình, cho đến khi nào hỗn hợp còn lại không màu. Làm nguội đến nhiệt độ phòng.

TCVN 6270:2011

8.2.1.3 Thêm cẩn thận 2 ml nước (4.1) và 1 ml dung dịch hydro peroxit (4.8). Xoay và đun tiếp cho đến khi có khói trắng. Tránh tổn thất do bay hơi bằng cách để cho khói axit sulfuric đối lưu trong cổ bình. Nếu dung dịch chuyển thành màu vàng thì làm nguội đến nhiệt độ phòng. Cho tiếp 0,5 ml dung dịch hydro peroxit và sau đó đun cho đến khi có khói trắng bốc lên. Tiếp tục đun thêm 45 min tính từ khi bắt đầu có khói trắng bốc lên. Làm nguội đến nhiệt độ phòng, thêm nước cẩn thận để tổng thể tích ở khoảng 20 ml.

8.2.1.4 Cho thêm một hoặc hai giọt dung dịch kali pemanganat (4.13) cho đến khi chất phân hủy có màu tím nhạt. Khi đó thêm 3 ml dung dịch hydroxylamoni clorua (4.10) và lắc kĩ. Thêm 20 ml dung dịch natri axetat (4.9) và khoảng 15 ml nước (4.1). Lắc kĩ và để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm nước đến vạch 50 ml.

8.2.2 Hiện màu

Dùng pipet thêm 4 ml dung dịch bathophenanthrolin (4.12) cho vào lượng chất trong bình phân hủy (xem 8.2.1.4) và đóng bình lại. Lắc mạnh bình trong 3 min, đảm bảo chắc chắn là nắp bình vẫn cố định.

Làm nguội dưới vòi nước chảy ít nhất 10 min và cẩn thận nghiêng bình vài lần sau khi đã nguội. Giữ bình trong nồi cách thủy ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1 h.

8.3 Phép thử trắng

Tiến hành phép thử trắng song song với phép xác định.

Thực hiện phép thử trắng sử dụng tất cả các thuốc thử được sử dụng trong phép xác định nhưng thay phần mẫu thử bằng 10 ml nước (4.1). Trong suốt quá trình phân hủy, dùng cùng một lượng axit nitric (4.5) và dung dịch hydro peroxit (4.8) như đã dùng để phân hủy phần mẫu thử.

Độ hấp thụ của dung dịch thử trắng phải tương ứng với độ hấp thụ của dung dịch chứa ít hơn 0,5 μg sắt. Nếu độ hấp thụ của dung dịch thử trắng mà tương ứng với độ hấp thụ của dung dịch chứa nhiều hơn 0,5 μg sắt thì tất cả các thuốc thử phải được kiểm tra lại.

Chênh lệch giữa hai giá trị thử trắng nên càng thấp càng tốt (thông thường chênh lệch này không được vượt quá 0,004 đơn vị hấp thụ).

8.4 Đo phổ

Dùng pipet lấy (lớp trên) isoamyl alcohol cho vào cuvet có chiều dài đường quang 10 mm (5.12). Đo độ hấp thụ của lớp isoamyl alcohol của dung dịch thử (xem 8.2) và của dung dịch thử trắng (8.3) ở bước sóng 533 nm dùng nước (4.1) để so sánh. Lấy độ hấp thụ của phần mẫu thử trừ đi độ hấp thụ của mẫu thử trắng.

8.5 Số lần xác định

Thực hiện tất cả các phép xác định, kể cả phép thử trắng (8.3) mỗi loại hai lần.

8.6 Chuẩn bị đồ thị chuẩn

8.6.1 Dùng pipet (5.11) lấy 0 ml (thành phần zero); 1 ml; 2 ml; 3 ml; 5 ml và 10 ml dung dịch chuẩn sắt (4.15) cho vào một dãy sáu bình phân hủy (5.7). Pha loãng với nước (4.1) đến khoảng 10 ml. Cho vào mỗi bình 3 ml axit nitric (4.5) và 1,8 ml dung dịch kali sulfat (4.7).

8.6.2 Tiến hành phân hủy như trong 8.2.1 và hiện màu như trong 8.2.2.

8.6.3 Dùng pipet lấy (lớp trên) isoamyl alcohol cho vào cuvet có chiều dài đường quang 10 mm (5.12). Đo độ hấp thụ của mỗi lớp isoamyl alcohol ở bước sóng 533 nm, dùng nước (4.1) để so sánh. Lấy độ hấp thụ của các dung dịch khác trừ đi độ hấp thụ của dung dịch làm thành phần zero.

8.6.4 Dùng đồ thị các giá trị độ hấp thụ này dựa vào lượng sắt chứa trong dung dịch hiệu chuẩn.

8.6.5 Hàng tuần phải kiểm tra đồ thị chuẩn.

8.7 Hiệu năng của phương pháp

Nên kiểm tra tính năng của phương pháp này bằng cách phân tích sữa bột (hoặc sản phẩm sữa khác) có hàm lượng sắt đã được biết trước hoặc đã được chứng nhận.

9 Tính và biểu thị kết quả

9.1 Tính kết quả

9.1.1 Các sản phẩm ngoại trừ bơ

Hàm lượng sắt, w_{Fe} , được biểu thị bằng miligam trên kilôgam (mg/kg), được tính theo công thức:

$$w_{Fe} = \frac{m_1}{m_0}$$

Trong đó:

m_0 là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

m_1 là khối lượng của sắt đọc được từ đồ thị chuẩn (hoặc được tính từ đường hồi quy thu được bởi phương pháp bình phương tối thiểu), tính bằng microgam (μg).

9.1.2 Bơ

Tính hàm lượng sắt trong serum của bơ như mô tả trong 9.1.1.

Hàm lượng sắt của bơ, w'_{Fe} , biểu thị bằng miligam trên kilôgam (mg/kg), được tính theo công thức:

$$w'_{Fe} = \frac{m_3}{m_2} \times w_{Fe}$$

Trong đó:

m_2 là khối lượng của bơ được cho vào ống của máy li tâm (xem 7.8), tính bằng gam (g);

m_3 là khối lượng serum của bơ thu được trong 7.8, tính bằng gam (g);

w_{Fe} là hàm lượng sắt trong serum của bơ, tính được trong 9.1.1, bằng miligam trên kilôgam (mg/kg).

9.2 Biểu thị kết quả

Lấy kết quả là trung bình cộng của các kết quả thu được với điều kiện là đáp ứng được các yêu cầu về độ lặp lại (Điều 10).

Biểu thị kết quả đến chữ số thập phân như trong Bảng 1.

10 Độ lặp lại

Độ chênh lệch giữa các kết quả của hai lần xác định lặp lại (các kết quả thu được gần như đồng thời hoặc liên tục do cùng một người phân tích), không được lớn hơn giá trị của độ lặp lại đối với sản phẩm được phân tích, được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Biểu thị kết quả và độ lặp lại

Tên sản phẩm	Biểu thị kết quả chính xác đến mg/kg	Độ lặp lại mg/kg
Sữa	0,001	0,02
Sữa gầy	0,001	0,02
Whey	0,001	0,02
Buttermilk	0,001	0,03
Sữa chua	0,001	0,03
Sữa cô đặc	0,01	0,1
Sữa đặc có đường	0,01	0,1
Sữa bột nguyên chất	0,01	0,2
Sữa bột gầy	0,01	0,2
Whey bột và buttermilk bột	0,01	0,2
Cream	0,001	0,02
Bơ	0,001	0,03
Butterfat khan, butteroil, butterfat và ghee	0,001	0,005
Kem lạnh thực phẩm	0,01	0,2
Phomat và phomat chế biến	0,01	0,2
Casein, caseinat và các chất đồng kết tủa	0,1	0,4

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- 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;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 565, *Test sieves – Metal wire cloth, perforated metal plate and electroformed sheet – Nominal sizes of openings*
 - [2] TCVN 7151 (ISO 648), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet một mức*
 - [3] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
 - [4] TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*
 - [5] TCVN 4851 (3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*
 - [6] TCVN 8488 (ISO 4788), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Ống đong chia độ.*
-