

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8138 : 2009

ISO 5553 : 1980

Xuất bản lần 1

THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT – PHÁT HIỆN POLYPHOSPHAT

Meat and meat products – Detection of polyphosphates

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8138 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 5553 : 1980;

TCVN 8138 : 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 – Phát hiện polyphosphat

Meat and meat products – Detection of polyphosphates

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện phosphat đậm đặc trong thịt và sản phẩm thịt bằng sắc ký lớp mỏng.

2 Lĩnh vực áp dụng

Vi các polyphosphat được thủy phân từ từ bằng enzym có mặt trong thịt hoặc sản phẩm thịt và trong quá trình xử lý nhiệt thịt hoặc sản phẩm thịt, nên tiêu chuẩn này chỉ áp dụng để phát hiện các polyphosphat bổ sung vẫn còn có mặt trong mẫu tại thời điểm kiểm tra.

3 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).

ISO 3100, *Thịt và sản phẩm thịt - Lấy mẫu*¹⁾.

4 Nguyên tắc

Chiết thịt hoặc sản phẩm thịt bằng axit tricloaxetic. Làm trong dịch chiết thu được này bằng hỗn hợp etanol/ dietyl ete. Tách các phosphat bằng sắc ký lớp mỏng và phát hiện polyphosphat bằng cách phun thuốc thử để hiện màu.

¹⁾ ISO 3100 đã được thay thế bằng hai tiêu chuẩn ISO 3100-1 : 1991 (đã được biên soạn thành TCVN 4833-1 : 2002) và ISO 3100-2 : 1991 (đã được biên soạn thành TCVN 4833-2 : 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*).

5 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử được sử dụng phải là loại phân tích. Nước được sử dụng phải là nước cất hoặc ít nhất là nước có độ tinh khiết tương đương.

CẢNH BÁO – Tuân thủ tất cả các chú ý về an toàn thích hợp khi tiến hành theo các quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

5.1 Axit tricloaxetic

5.2 Ete dietyl

5.3 Etanol, 95 % (thể tích).

5.4 Bột xenluloza, dùng cho sắc ký lớp mỏng.

5.5 Tinh bột có thể hoà tan

5.6 Hỗn hợp đối chứng

Hoà tan trong 100 ml nước:

- 200 mg natri dihydro phosphat ngậm một phân tử nước ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$);
- 300 mg tetranatri diphosphat ngậm mười phân tử nước ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$);
- 200 mg pentanatri triphosphat ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) và
- 200 mg natri hexametaphosphat (NaPO_3)_x [$x > 10$].

Hỗn hợp đối chứng khi được bảo quản ở 4 °C có thể bền được ít nhất 4 tuần.

5.7 Dung môi triển khai

Trộn 140 ml isopropyl alcohol, 40 ml dung dịch axit tricloaxetic 135 g/l, 0,6 ml amoni hydroxit $\rho_{20} = 0,90$ g/ml, dung dịch khoảng 25 % (khối lượng).

Giữ dung môi trong chai kín khí.

5.8 Thuốc thử dạng phun sương I

Trộn đều các thể tích bằng nhau của dung dịch amoni molybdat ngậm bốn phân tử nước [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] 75 g/l và axit nitric đậm đặc ($\rho_{20} = 1,40$ g/ml) và hoà tan 10 g axit tartaric trong 100 ml hỗn hợp này.

Chuẩn bị thuốc thử trong ngày sử dụng.

5.9 Thuốc thử dạng phun sương II

Hoà tan 0,5 g axit 1-amino-2-naphthol-4-sulphonic trong 195 ml hỗn hợp của natri disulphit (natri metabisulphit; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 150 g/l và 5 ml dung dịch natri sulphit (Na_2SO_3) 200 g/l. Hoà tan 40 g natri axetat ngậm ba phân tử nước ($\text{NaOOCCH}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) trong hỗn hợp này.

Bảo quản thuốc thử này trong chai màu nâu đậy kín để trong tủ lạnh. Loại bỏ dung dịch sau 1 tuần.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường, trừ khi có qui định khác và cụ thể như sau:

6.1 Tấm thuỷ tinh, đã khử chất béo, 10 cm x 20 cm.

6.2 Dụng cụ đàn mẫu, dùng để chuẩn bị các lớp có bề dày 0,25 mm. Nếu không sẵn có dụng cụ này thì có thể dùng các tấm lớp mỏng bán sẵn, có độ dày lớp 0,25 mm với điều kiện là tinh bột được sử dụng làm chất kết dính. Các tấm chứa thạch cao (canxi sulfat) là không phù hợp.

6.3 Máy trộn phòng thử nghiệm.

6.4 Tủ hút ẩm.

6.5 Máy xay thịt bằng cơ, cỡ phòng thử nghiệm, có gắn tấm đục lỗ, đường kính lỗ không quá 4 mm.

6.6 Giấy lọc gấp nếp, đường kính 15 cm.

6.7 Micro-pipet, 1 μl , hoặc micro-xyranh có vít định lượng và đầu thuỷ tinh uốn cong.

6.8 Bể thuỷ tinh được lót giấy, kích thước thích hợp, có nắp đậy kín khí, dùng cho sắc ký lớp mỏng.

6.9 Máy sấy tóc, có khả năng cung cấp luồng không khí ở nhiệt độ phòng hoặc dòng khí ẩm.

6.10 Bình phun.

6.11 Tủ sấy, có khả năng kiểm soát được ở 60 °C.

7 Lấy mẫu

7.1 Lấy ít nhất 200 g mẫu phòng thử nghiệm. Xem ISO 3100.

7.2 Chuẩn bị mẫu thử trong ngày nhận mẫu phòng thử nghiệm.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị các tấm lớp mỏng

Hoà tan 0,3 g tinh bột (5.5) trong 90 ml nước sôi. Để nguội, thêm khoảng 15 g bột xenluloza (5.4) và đồng hoá trong máy trộn phòng thử nghiệm (6.3) trong 1 min.

Dàn hỗn hợp này lên tấm thuỷ tinh (6.1) bằng dụng cụ dàn (6.2), điều chỉnh để thu được lớp dày 0,25 mm.

Sấy khô các tấm lớp mỏng được để yên trong 60 min bằng không khí ở nhiệt độ phòng và cuối cùng bằng không khí nóng trong 10 min ở 100 °C.

Bảo quản các tấm này trong tủ hút ẩm (6.4).

Cách khác, có thể sử dụng các tấm lớp mỏng sẵn có (6.2).

8.2 Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hoá mẫu bằng cách xay ít nhất hai lần bằng máy xay (6.5) và trộn đều. Giữ đầy mẫu trong chai kín khí, đậy nắp chai và bảo quản trong tủ lạnh, nếu cần. Phân tích mẫu càng sớm càng tốt, chỉ trong vòng 5 h.

8.3 Chuẩn bị huyết thanh

8.3.1 Làm ướt 50 g mẫu thử (8.2) bằng 15 ml nước ở 40 °C đến 60 °C trong cốc có mỏ, dùng dao trộn hoặc đũa khuấy đều để trộn cho đến khi thu được khối lượng đồng nhất, trong không quá 5 min.

8.3.2 Thêm 10 g axit tricloaxetic (5.1) và trộn kỹ lại.

8.3.3 Cho ngay vào tủ lạnh trong 1 h và gạn qua giấy lọc gấp nếp (6.6) để thu lấy huyết thanh đã tách.

8.3.4 Nếu dịch lọc bị đục, thì lọc một lần với một thể tích tương tự của ete dietyl (5.2). Dùng một pipet nhỏ loại bỏ lớp ete và thêm một thể tích tương tự của etanol (5.3) vào pha lỏng. Lắc 1 min. Để yên hỗn hợp trong vài phút và lọc qua giấy lọc gấp nếp (6.6).

8.4 Tách bằng sắc ký

8.4.1 Rót dung môi triển khai (5.7) vào trong bể triển khai (6.8) với độ sâu từ 5 mm đến 10 mm và đậy nắp. Để yên trong ít nhất 30 min ở nhiệt độ môi trường, tránh ánh nắng mặt trời và gió lùa.

8.4.2 Chấm 3 µl huyết thanh, hoặc 6 µl nếu thực hiện quy trình làm trong 8.3.4, vào lớp xenluloza (8.1) trên đường kẻ bút chì cách đáy khoảng 2 cm. Giữ các điểm nhỏ bằng cách chấm một lần 1 µl.

Dùng máy sấy tóc (6.9) ở chế độ ẩm để sấy khô.

CHÚ THÍCH Phải tránh khi nóng vì nguy cơ làm thủy phân phosphat.

8.4.3 Tương tự, chấm 3 μ l hỗn hợp đối chứng (5.6) lên tấm lớp mỏng, cách điểm mẫu từ 1 cm đến 1,5 cm, nhưng có cùng khoảng cách chính xác tính từ đáy.

8.4.4 Mờ nắp bể và cẩn thận đặt ngay tấm xenluloza vào bể. Đậy ngay nắp. Triển khai tấm lớp mỏng ở nhiệt độ môi trường, tránh ánh nắng mặt trời và gió lùa.

8.4.5 Tiếp tục triển khai cho đến khi mặt dung môi dâng lên khoảng 10 cm kể từ đường bút chì. Lấy tấm lớp mỏng ra khỏi bể và sấy 10 min trong tủ sấy (6.11) ở 60 °C, hoặc 30 min ở nhiệt độ môi trường, hoặc trong luồng khí lạnh.

8.5 Phát hiện phosphat

8.5.1 Đặt tấm lớp mỏng theo phương thẳng đứng dưới tủ hút, phun nhẹ và đều lên tấm lớp mỏng thuốc thử dạng phun sương I (5.8).

Nếu có polyphosphat, thì xuất hiện ngay các chấm vàng.

8.5.2 Dùng máy sấy tóc (6.9) ở chế độ ẩm để sấy khô tấm lớp mỏng. Sau đó sấy khô trong tủ sấy ít nhất 1 h ở 100 °C đến khi loại bỏ hẳn axit nitric. Lấy tấm lớp mỏng ra khỏi tủ sấy và kiểm tra để biết chắc chắn không còn mùi hăng của axit nitric.

8.5.3 Để tấm lớp mỏng nguội đến nhiệt độ phòng và đặt dưới tủ hút. Phun nhẹ và đều lên tấm lớp mỏng thuốc thử dạng phun sương II (5.9).

Nếu có polyphosphat, thì xuất hiện ngay các chấm màu xanh nước biển.

CHÚ THÍCH không nhất thiết phải phun bằng thuốc thử II. Tuy nhiên, cường độ màu của các chấm xanh được tạo ra bởi thuốc thử này sẽ giúp cho việc phát hiện được dễ dàng.

9 Diễn giải

So sánh khoảng cách di chuyển của các điểm phosphat từ mẫu so với các điểm phosphat khác của hỗn hợp đối chứng.

Luôn luôn có mặt một điểm chấm orthophosphat, nếu mẫu có chứa các phosphat đậm đặc, thì sẽ thấy được điểm diphosphat và/ hoặc các điểm phosphat trùng hợp cao hơn.

Giá trị R_f của các phosphat trong hỗn hợp đối chứng là:

orthophosphat

từ 0,80 đến 0,90

diphosphat (pyrophosphat)	từ 0,50 đến 0,60
triphosphat	từ 0,25 đến 0,35
hexametapolyphosphat (muối Graham's)	0,0

Nhìn chung, các giá trị R_F của các polyphosphat trong chất chiết thịt và sản phẩm thịt hơi thấp hơn.

CHÚ THÍCH Việc hiệu chỉnh chênh lệch các giá trị R_F của phosphat trong chất chiết mẫu và trong hỗn hợp đối chứng có thể thu được bằng cách cho chất chiết mẫu thịt tươi lên cùng một tấm lớp mỏng. Vì thịt tươi chỉ chứa các monophosphat, nên phần trăm hiệu chỉnh có thể thu được bằng cách so sánh khoảng di chuyển của điểm chuẩn này với điểm tương ứng của hỗn hợp đối chứng.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm cần chỉ rõ phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được. Báo cáo thử nghiệm cũng cần đề cập đến mọi chi tiết thao tác không được 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 chi tiết cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu.
