

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8178 : 2009

ISO/TS 2963 : 2006

Xuất bản lần 1

**PHOMAT VÀ SẢN PHẨM PHOMAT CHẾ BIẾN –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AXIT XITRIC –
PHƯƠNG PHÁP ENZYM**

*Cheese and processed cheese products –
Determination of citric acid content – Enzymatic method*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8178 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 2963 : 2006;

TCVN 8178 : 2009 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.

Phomat và sản phẩm phomat chế biến –

Xác định hàm lượng axit xitric – Phương pháp enzym

Cheese and processed cheese products –

Determination of citric acid content – Enzymatic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp enzym để xác định hàm lượng axit xitric trong phomat và sản phẩm phomat chế biến.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Hàm lượng axit xitric (citric acid content)

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

CHÚ THÍCH Hàm lượng axit xitric được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

3 Nguyên tắc

Dịch chiết của mẫu được xử lý bằng các enzym và các chất sinh hóa dưới đây:

- a) lyaza xitrat (CL) để chuyển hóa axit xitric về oxalaxetat và axetat;
- b) malat dehydrogenaza (MDH) và lactat dehydrogenaza (LDH) khi có mặt nicotilamide adenine dinucleotide (NADH) khử, xúc tác việc khử oxalaxetat và sản phẩm pyruvat tách nhóm carboxyl của nó về L-malat và L-lactat tương ứng, sau đó chuyển NADH về dạng oxi hóa của nó (NAD⁺).

Việc giảm nồng độ NADH được xác định bằng cách đo độ hấp thụ của dung dịch thử ở bước sóng 340 nm. Hàm lượng axit xitric tỷ lệ với việc giảm nồng độ NADH.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng là nước đã loại khoáng hoặc nước ít nhất có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có qui định khác. Lưu ý ngày sản xuất và hạn sử dụng của nhà sản xuất thuốc thử.

4.1 Emzym

Nếu sử dụng huyền phù enzym có hoạt độ khác với qui định, thì cần nêu rõ thể tích huyền phù trong sơ đồ dùng pipet (8.5.1) phải tăng hoặc giảm tỷ lệ.

Các thuốc thử nêu trong 4.7 đến và kể cả 4.10 có thể có bán sẵn như hỗn hợp thử nghiệm.

4.2 Dung dịch axit tricloaxetic (CCl_3COOH)

Hòa tan 200,0 g axit tricloaxetic trong nước. Thêm nước đến 1000 ml và trộn.

4.3 Dung dịch natri hydroxit I, $c(\text{NaOH}) = 5,0 \text{ mol/l}$.

Hòa tan 200,0 g dung dịch natri hydroxit trong nước. Thêm nước đến 1000 ml và trộn.

4.4 Dung dịch natri hydroxit II, $c(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mol/l}$.

Hòa tan 40,0 g dung dịch natri hydroxit trong nước. Thêm nước đến 1000 ml và trộn.

4.5 Dung dịch natri hydroxit III, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Hòa tan 4,0 g dung dịch natri hydroxit trong nước. Thêm nước đến 1000 ml và trộn.

4.6 Dung dịch kẽm clorua, $c(\text{ZnCl}_2) = 800 \text{ mg/l}$.

Hòa tan 800 g kẽm clorua trong nước. Thêm nước đến 1000 ml và trộn.

4.7 Dung dịch đệm, pH 7,8

Hòa tan 71,3 g glyxylglyxin trong khoảng 700 ml nước. Chỉnh pH 7,8 bằng dung dịch natri hydroxit I (4.3). Thêm 100 ml dung dịch kẽm clorua (4.6). Thêm nước đến 1 000 ml và trộn.

Dung dịch này có thể ổn định được 4 tuần nếu được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C.

4.8 Dung dịch nicotilamide adenine dinucleotide (NADH) khử

Hòa tan 50 mg muối dinatri dinucleotide adenine nicotilamide khử ($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2\text{Na}_2$) và 100 mg natri hydro cacbonat (NaHCO_3) trong 10 ml nước.

Dung dịch dinucleotide adenine nicotilamide khử này có thể ổn định được 4 tuần nếu được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C.

4.9 Huyền phù dehydrogenaza malate/lactate dehydrogenaza

Trộn các lượng thích hợp của dehydrogenaza malat (MDH từ tim lợn, tạo huyền phù trong dung dịch amoni sulfat, 3,2 mol/l ở pH $6,0 \pm 0,2$; EC 1.1.1.37)¹ và dehydrogenaza lactat (LDH từ cơ thỏ, tạo huyền phù trong dung dịch amoni sulfat, 3,2 mol/l ở pH $7,0 \pm 0,2$; EC 1.1.1.27). Pha loãng với dung dịch amoni sulfat (nồng độ 3,2 mol/l) sao cho thu được huyền phù cuối cùng của MDH/ml chứa 600 đơn vị² và của LDH/ml chứa 1400 đơn vị².

Huyền phù dehydrogenaza lactat/dehydrogenaza malat có thể ổn định được 1 năm nếu được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C.

4.10 Dung dịch lyaza xitrat

Hòa tan một lượng thích hợp của lyaza xitrat [lyophilisat (CL) từ *Aerobacter aerogen*; EC 4.1.3.6] trong nước đá sao cho thu được dung dịch chứa 40 đơn vị/ml².

Dung dịch lyaza xitrat này có thể ổn định được 1 tuần nếu được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C và 4 tuần nếu được bảo quản ở âm 20 °C.

4.11 Dung dịch chuẩn axit xitric

Hòa tan 1,600 g axit xitric ngậm một phân tử nước ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) trong nước. Thêm nước đến 1 000 ml và trộn.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 1 mg, có thể đọc chính xác đến 0,1 mg.

5.2 Máy đo pH.

5.3 Cốc thủy tinh có mỏ, dung tích 50 ml.

5.4 Máy nghiền, được trang bị cốc có mỏ thích hợp.

5.5 Bình định mức một vạch, dung tích 100 ml.

5.6 Pipet, có thể phân phối 0,02 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 25 ml và 40 ml, tương ứng.

¹ Số EC đưa ra số phân loại Enzym như trong [4].

² Đơn vị này (thường được gọi là đơn vị chuẩn hoặc đơn vị quốc tế) định nghĩa là lượng enzym xúc tác chuyển hoá 1 μ mol cơ chất trong phút ở điều kiện chuẩn.

TCVN 8178 : 2009

5.7 Pipet chia độ, có thể phân phối 10 ml, được chia vạch 0,1 ml.

5.8 Ống đong, dung tích 50 ml.

5.9 Phễu lọc, có đường kính khoảng 7 cm.

5.10 Giấy lọc, loại trung bình, đường kính khoảng 15 cm.

5.11 Máy đo phổ, thích hợp để đo ở bước sóng 340 nm, có cuvet 1 cm.

5.12 Cánh trộn bằng chất dẻo, thích hợp để trộn hỗn hợp enzym-mẫu trong cuvet của máy đo quang.

5.13 Nồi cách thủy, có thể duy trì ở 20 °C đến 25 °C, có giá thích hợp để giữ cuvet của máy đo phổ (5.11) trong giai đoạn ủ (tùy chọn; xem 8.5.1).

Việc ủ cuvet trong nồi cách thủy cần đến khi nhiệt độ phòng thấp hơn 20 °C.

6 Lấy mẫu

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

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

7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu đồng nhất chú ý không làm thất thoát ẩm, sử dụng kỹ thuật sau đây:

a) Trong trường hợp phomat, loại bỏ cùi hoặc lớp bề mặt mốc của phomat sao cho thu được mẫu đại diện của phomat.

Nghiền hoặc xay mẫu thử bằng dụng cụ nghiền thích hợp, trộn nhanh mẫu đã nghiền hoặc xay và nghiền hoặc xay lần thứ hai, nếu có thể và trộn kỹ bằng cách khuấy trộn mạnh.

b) Trong trường hợp phomat chế biến, lấy phần mẫu đại diện cho sản phẩm. Trộn mẫu càng nhanh càng tốt và nghiền mẫu, nếu cần. Trộn kỹ bằng cách khuấy trộn mạnh.

c) Trong trường hợp phomat chế biến chứa các thành phần thức ăn khác (ví dụ: dăm bông, quả, hạt, rau thơm), thì xác định xem mục tiêu của phép phân tích là xác định hàm lượng axit xitric của phomat chế biến hay của toàn bộ sản phẩm. Đối với trường hợp xác định hàm lượng axit xitric của phomat thì tách riêng các phần thực phẩm khác rồi tiến hành như đối với phomat chế biến.

Chuyển mẫu thử sang hộp chứa có nắp đậy kín, để bảo quản trước khi phân tích. Đậy ngay hộp chứa. Tiến hành phân tích càng sớm càng tốt ngay sau khi chuẩn bị xong mẫu thử.

8 Cách tiến hành

8.1 Phép thử kiểm tra

8.1.1 Thực hiện phép thử trong 8.1.2 đến 8.1.4 để kiểm tra độ thu hồi của axit xitric khi

- mỗi mẻ thuốc thử mới (4.7 đến và kể cả 4.10) được đưa vào sử dụng,
- các thuốc thử đã được giữ trong tủ lạnh quá 2 tuần mà chưa được sử dụng,
- bắt đầu lại việc phân tích sau quá trình ngừng phân tích, hoặc
- các điều kiện xác minh chính phép thử đó.

8.1.2 Dùng pipet lấy 5,0 ml và 10,0 ml dung dịch chuẩn axit xitric (4.11) cho từng bình định mức một vạch 100 ml (5.5).

Cho 10 ml dung dịch axit tricloaxetic (4.2) vào mỗi bình. Pha loãng bằng nước đến 100 ml và trộn cho mỗi bình.

Xác định hàm lượng axit xitric trong cả hai dung dịch như trong 8.4.3 đến 8.5.3.

8.1.3 Tính hàm lượng axit xitric ngậm một phân tử nước của dung dịch chuẩn axit xitric (4.11) theo công thức (2) trong 9.1, nhưng sử dụng các giá trị sau:

- V_5 là thể tích của dung dịch chuẩn axit xitric (4.11) ($V_5 = 1\ 000$ ml), tính bằng mililit (ml);
- V_6 là thể tích của dung dịch chuẩn axit xitric (8.1.2) ($V_6 = 5$ ml và 10 ml tương ứng), tính bằng mililit (ml);
- V_7 là tổng thể tích của dung dịch chuẩn axit xitric đã pha loãng (8.1.2) ($V_7 = 100$ ml), tính bằng mililit (ml);

8.1.4 Khi tính đến độ tinh khiết của axit xitric ngậm một phân tử nước, độ thu hồi thu được đối với cả hai dung dịch (8.1.2) phải nằm trong dải $100\% \pm 5\%$. Nếu các độ thu hồi không nằm trong dải này, thì các thuốc thử, các kỹ thuật thao tác, độ chính xác của pipet và điều kiện của máy đo phổ phải được kiểm tra để thu được các kết quả thích hợp. Phép thử phải được lặp lại cho đến khi thu được các kết quả đáp ứng được yêu cầu.

8.2 Phần mẫu thử

Cân khoảng 1 g, chính xác đến 0,1 mg, mẫu thử đã chuẩn bị (Điều 7) cho vào cốc có mỏ (5.3). Hòa tan mẫu thử trong khoảng 50 ml nước đã được làm ấm sơ bộ máy nghiền (5.4) đến khoảng từ 40 °C đến

TCVN 8178 : 2009

50 °C. Chuyển hết lượng chứa trong cốc có mỏ sang bình định mức một vạch 100 ml (5.5). Làm nguội lượng chứa trong bình đến khoảng 20 °C.

8.3 Phép thử trắng đối với thuốc thử

Thực hiện phép thử trắng đối với thuốc thử lặp lại hai lần. Thực hiện theo qui định trong 8.4 và 8.5, sử dụng tất cả các thuốc thử nhưng bỏ qua phần mẫu thử.

8.4 Khử protein

8.4.1 Cho 10 ml axit tricloaxetic (4.2) vào huyền phù (8.2) trong bình định mức một vạch 100 ml. Thêm nước đến vạch và trộn kỹ.

8.4.2 Để yên hỗn hợp trong 30 min. Không trộn lại lượng chứa trong bình trước khi lọc.

8.4.3 Lọc phần chất lỏng nổi phía trên qua giấy lọc (5.10), gạn bỏ phần dịch lọc đầu tiên.

8.4.4 Dùng pipet lấy 25 ml dịch lọc cho vào cốc thủy tinh có mỏ (5.3). Chỉnh pH đến khoảng 4 bằng cách cho thêm dung dịch natri hydroxit II (4.4) và tiếp đó chỉnh pH đến 8 bằng dung dịch natri hydroxit III (4.5) trong khi đó dùng máy đo pH (5.2) để kiểm tra.

Chuyển hết lượng chứa trong cốc có mỏ sang bình định mức một vạch 100 ml (5.5). Thêm nước đến vạch và trộn.

8.4.5 Lọc qua giấy lọc (5.10), gạn bỏ phần dịch lọc đầu tiên.

8.5 Phương pháp xác định

8.5.1 Sơ đồ cách tiến hành

Tiến hành xác định theo sơ đồ trong Bảng 1, chú ý đưa dung dịch đệm (4.7) và nước được sử dụng đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Bảng 1 – Sơ đồ xác định

Lấy bằng pipet cho vào các cuvet của máy đo phổ	Phần mẫu thử hoặc phép thử kiểm tra	Phép thử trắng
Dung dịch đệm (4.7)	1,00 ml	1,00 ml
Dung dịch NADH (4.8)	0,10 ml	0,10 ml
Huyền phù MDH/LDH (4.9)	0,02 ml	0,02 ml
Thử hoặc phép thử kiểm tra dịch lọc	2,00 ml	–
Dịch lọc của phép thử trắng	–	2,00 ml
Trộn lượng chứa trong cuvet, dùng dao trộn bằng chất dẻo (5.12) và ủ ở nhiệt độ trên 20 °C trong 5 min (xem 5.13). Đo độ hấp thụ, A_0 , của dung dịch trong từng cuvet dựa vào không khí ở bước sóng 340 nm. Sau đó cho thêm vào cuvet của máy đo phổ:		
Dung dịch Iyaza xitrat (4.10)	0,02 ml	0,02 ml
Trộn lượng chứa trong cuvet và ủ ở nhiệt độ trên 20 °C khoảng 10 min (xem 5.13). Đo độ hấp thụ, A_{10} , của dung dịch trong từng cuvet dựa vào không khí.		

8.5.2 Tính độ hấp thụ

Tính độ hấp thụ A , của từng cuvet được dùng để tính hàm lượng axit xitric (9.1), theo công thức (1):

$$A = A_0 - A_{10} \quad (1)$$

Trong đó

A_0 là độ hấp thụ đo được trước khi thêm dung dịch Iyaza xitrat;

A_{10} là độ hấp thụ đo được sau khi thêm dung dịch Iyaza xitrat và ủ trong 10 min.

8.5.3 Kiểm tra xác nhận

Nếu độ hấp thụ, A , vượt quá 0,800, thì lặp lại qui trình qui định trong 8.5.1 và 8.5.2, sử dụng dung dịch lỏng thích hợp của dịch lọc từ cả phần mẫu thử (8.2) lẫn mẫu thử trắng (8.3).

9 Tính và biểu thị kết quả

9.1 Phương pháp tính

Tính hàm lượng axit xitric, w , bằng phần trăm khối lượng axit xitric khan, theo công thức (2):

$$w = \frac{(A_s - A_r) \times M_r}{K \times l \times m} \times \frac{V_1 \times V_3 \times V_5 \times V_7}{V_2 \times V_4 \times V_6} \times 100\% \quad (2)$$

trong đó

A_s là độ hấp thụ đo được của phần mẫu thử hoặc của phép thử kiểm tra;

A_r là giá trị trung bình của độ hấp thụ đo được đối với phép thử trắng;

M_r là khối lượng phân tử của axit xitric (đối với axit xitric khan, $M_r = 192,1$);

K là hệ số hấp thụ phân tử tương đối của NADH ở 340 nm (nghĩa là $K = 6,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$);

l là chiều dài đường quang của cuvet đo phổ, tính bằng centimet ($l = 1 \text{ cm}$);

m là khối lượng phần mẫu thử (8.3), tính bằng gam (g);

V_1 là tổng thể tích của chất lỏng trong cuvet đo phổ, tính bằng mililit (ml) ($V_1 = 3,14 \text{ ml}$);

V_2 là thể tích của dịch lọc (8.4.5) trong cuvet đo phổ, tính bằng mililit (ml) ($V_2 = 2,0 \text{ ml}$);

V_3 là thể tích của dịch lọc đã khử protein (8.4.3), sau khi đã chỉnh pH đến 8, đã được pha loãng (8.4.4), tính bằng mililit (ml) ($V_3 = 100 \text{ ml}$);

V_4 là thể tích của dịch lọc đã khử protein (8.4.3) được lấy để chỉnh pH đến 8 (8.4.4), tính bằng mililit (ml) ($V_4 = 25 \text{ ml}$);

V_5 là thể tích của dung dịch trong 8.1.2, tính bằng mililit (ml) ($V_5 = 100 \text{ ml}$);

V_6 là thể tích của dịch lọc (8.4.5) được lấy để pha loãng (8.5.4) tính bằng mililit (ml), nếu thích hợp, còn nếu không thì ($V_6 = 1 \text{ ml}$);

V_7 là thể tích của dịch lọc (8.5.3) đã được pha loãng, tính bằng mililit (ml), nếu thích hợp, còn nếu không thì ($V_7 = 1 \text{ ml}$).

9.2 Biểu thị kết quả

Báo cáo kết quả đến ba chữ thập phân.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này không hoàn toàn đáp ứng được các yêu cầu của ISO 5725³, do đó độ tin cậy của các kết quả này là không chắc chắn.

CHÚ THÍCH Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm này sẽ được công bố trong tạp chí của Hiệp hội Sữa Quốc tế.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên vật liệu thử giống hệt nhau trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá 5 % (tương đối) của trung bình các kết quả.

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên vật liệu thử giống hệt 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 vượt quá 8 % (tương đối) của trung bình các kết quả.

11 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 sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- e) kết quả thử nghiệm thu được; nếu thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được theo 10.1.

³ ISO 5725:1986, Độ chính xác của phương pháp thử. Xác định độ lặp lại và độ tái lập đối với phương pháp thử chuẩn bởi các phép thử liên phòng thử nghiệm (đã thay thế), đã thu được số liệu chính xác.

Phụ lục A

(Qui định)

Các nguyên tắc Thực hành Phòng thử nghiệm tốt (GLP) đối với việc thực hiện phân tích bằng enzym

A.1 Giới thiệu

Các nguyên tắc Thực hành Phòng thử nghiệm tốt (GLP) đối với việc thực hiện phân tích bằng enzym thường ít được biết đến hơn so với các phép phân tích hóa học khác.

Nên đặc biệt chú ý về các nguyên tắc này để thu được các kết quả có độ chính xác và độ chụm thỏa mãn yêu cầu.

Do đó, trước khi phân tích cần đọc kỹ các nguyên tắc GLP dưới đây.

A.2 Thuốc thử

A.2.1 Chỉ sử dụng các enzym thuộc loại qui định (hoạt độ cụ thể, nồng độ, các chất nhiễm bẩn các hoạt độ của enzym, dung môi).

A.2.2 Chỉ sử dụng các coenzym thuộc loại qui định (cấp loại tinh khiết, dạng muối hoặc axit, các chất nhiễm bẩn).

A.2.3 Tất cả các thuốc thử không phải là enzym và coenzym phải là loại phân tích.

A.2.4 Nước để chuẩn bị các dung dịch enzym và các loại thuốc thử khác phải là nước được cất hai lần bằng dụng cụ thủy tinh.

A.2.5 Nước để chuẩn bị các dung dịch mẫu thử phải là nước cất bằng thủy tinh hoặc nước đã loại ion.

A.2.6 Bảo quản các thuốc thử và dung dịch/huyền phù enzym theo hướng dẫn (thường từ 2 °C đến 8 °C).

A.2.7 Không làm đông lạnh các huyền phù enzym.

A.2.8 Khi đã quá hạn sử dụng, phải loại bỏ thuốc thử hoặc kiểm tra hiệu quả của thuốc thử này bằng các dung dịch chuẩn có các lượng chất phân tích khác nhau. Các độ hấp thụ thu được phải tỷ lệ thuận với các nồng độ.

A.2.9 Các dung dịch đậm được lấy ra khỏi tủ lạnh phải được làm ấm đến nhiệt độ phòng trước khi bổ sung vào hỗn hợp phân tích.

A.3 Cuvet đo phổ và cuvet đo quang

A.3.1 sử dụng các cuvet bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo có chiều dài đường quang 1 cm.

CHÚ THÍCH Các cuvet bằng chất dẻo có các ưu điểm hơn cuvet thủy tinh như sau:

- Giá rẻ (dùng một lần);
- Có khả năng phân tích với các lượng lớn hơn;
- Trong một mẻ, thì các cuvet bằng chất dẻo có độ hấp thụ tốt hơn.

A.3.2 Khi một mẻ các cuvet mới được đưa vào sử dụng, thì kiểm tra chiều dài đường quang của các cuvet dựa vào cuvet chính xác (ví dụ: cuvet thạch anh), như sau:

Làm đầy cuvet chính xác và cuvet bằng chất dẻo bằng nước và đo độ hấp thụ (A_1) của từng cuvet dựa vào không khí. Sau khi tráng rửa, làm đầy các cuvet bằng dung dịch NADH (khoảng 0,15 mg/ml) và đo lại độ hấp thụ (A_2) dựa vào không khí.

Đối với cả cuvet chính xác lẫn các cuvet bằng chất dẻo, tính ($A_2 - A_1$). Chênh lệch của các ($A_2 - A_1$) giữa hai loại cuvet không được khác nhau nhiều. Nếu chênh lệch ($A_2 - A_1$) vượt quá 0,5 % độ hấp thụ của cuvet chính xác, thì tính trung bình phần trăm chênh lệch và đưa vào để tính chiều dài đường quang (1 cm) trong phần tính kết quả (9.1).

A.3.3 Luôn sử dụng các cuvet không bị xước và sạch. Chỉ làm sạch hoặc làm khô các mặt của cuvet quang học bằng khăn mềm.

A.3.4 Không đo độ hấp thụ của cuvet mẫu thử dựa vào cuvet thử mẫu trắng, vì sẽ không thu được thông tin về mức cường độ hấp thụ của chính phép thử trắng. Cần đo độ hấp thụ của hai cuvet mẫu thử và cuvet mẫu thử trắng dựa vào không khí và tính chênh lệch.

A.3.5 Không đo độ hấp thụ của cuvet đựng mẫu hoặc cuvet mẫu trắng dựa vào cuvet trống (bởi vì tán xạ ánh sáng).

A.3.6 Trộn lượng chứa trong cuvet bằng cách trộn bằng chất dẻo hoặc bằng cách dùng parafin làm kín cuvet rồi xoay nhẹ cuvet.

A.3.7 Loại hết bọt khí trên thành cuvet bằng cách trộn. Tránh làm xước mặt trong cuvet.

A.3.8 Luôn sử dụng cùng một loại cuvet để đo mẫu thử và đo mẫu trắng.

A.3.9 Luôn đặt cuvet ở cùng một vị trí và cùng hướng trong giá đựng cuvet. Chú ý đánh dấu một mặt của cuvet.

A.4 Đo quang và đo phổ

A.4.1 Yêu cầu chung

Sử dụng máy đo phổ (chiều rộng dải tần ≤ 10 nm) có gắn bộ lọc nhiễu (chiều rộng dải tần ≤ 10 nm), hoặc máy đo quang vạch phổ được gắn với đèn hơi thủy ngân. Các phép đo được tiến hành bằng máy đo phổ hoặc máy đo quang có bộ lọc phải được thực hiện ở độ hấp thụ tối đa của NADH hoặc NADPH, nghĩa là 340 nm; phép thử được tiến hành sử dụng máy đo quang vạch phổ có đèn hơi thủy ngân phải được đo ở 365 nm hoặc 334 nm.

CHÚ THÍCH Các hệ số hấp thụ phân tử của NADH và NADPH được đo ở 334 nm, 340 nm và 365 nm như sau:

NADH và NADPH ở bước sóng 334 nm (Hg): $6,18 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$

NADH và NADPH ở bước sóng 340 nm: $6,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$

NADPH ở bước sóng 365 nm (Hg): $3,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$

NADH ở bước sóng 365 nm (Hg): $3,4 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$

A.4.2 Kiểm tra độ tuyến tính

Mối quan hệ tuyến tính đến độ hấp thụ 2,0 phải tồn tại giữa độ hấp thụ và nồng độ của NADH hoặc NADPH. Kiểm tra như sau:

- Dùng pipet lấy 2,0 ml nước cất cho vào cuvet. Đo độ hấp thụ A_0 dựa vào không khí;
- Dùng pipet lấy 0,10 ml dung dịch NADH (0,5 mg/ml) cho vào cuvet và trộn. Đo độ hấp thụ A_1 .

Tính độ hấp thụ giảm, A_{r1} , theo công thức sau:

$$A_{r1} = (A_1 - A_0) \times \frac{2,1}{3,5}$$

trong đó

A_1 độ hấp thụ thu được của dung dịch NADH [xem b)];

A_0 độ hấp thụ thu được của nước [xem a)].

- Lặp lại qui trình mô tả trong b) ở trên thêm 14 lần. Sau mỗi cặp phép đo, tính độ hấp thụ giảm A_m , theo công thức sau:

$$A_m = (A_n - A_0) \times \frac{2,1}{3,5}$$

trong đó

A_n là độ hấp thụ thu được trong phép đo thứ n ;

V là thể tích lượng chứa trong cuvet tại phép đo thứ n .

d) Đối với mỗi phép đo, vẽ đồ thị của thể tích dung dịch NADH có mặt trong cuvet dựa theo các độ hấp thụ giảm. Phải thu được đường thẳng nối từ các điểm giao nhau thu được.

A.5 Pipet tự động và các bộ phân phối khác

A.5.1 Sử dụng các pipet tự động và các bộ phân phối khác theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

A.5.2 Sử dụng các đầu tip thích hợp cho từng pipet.

A.5.3 Kiểm tra định kỳ các qui định về thể tích, độ lặp lại của pipet tự động và các bộ phân phối khác (ví dụ: hàng tháng), như sau:

- a) cân cốc thủy tinh có mỏ với nước ở thời điểm t ;
- b) một pipet hoặc bộ phân phối đong nước cho vào cốc có mỏ và cân chính xác ở thời điểm $t + 1$ min sau lần cân thứ nhất;
- c) lặp lại qui trình hút bằng pipet hoặc bộ phân phối như ở b) 9 lần;
- d) cân cốc có mỏ không có pipet hoặc bộ phân phối ở thời điểm $t + 11$ min, $t + 12$ min, $t + 13$ min, $t + 14$ min và $t + 15$ min; tính khối lượng hao hụt hơi sau mỗi phút.
- e) tính thể tích và độ lặp lại của pipet hoặc bộ phân phối, có tính đến hao hụt nước do bay hơi.

A.5.4 Thể tích của một số pipet tự động có thể bị ảnh hưởng bởi nhiệt truyền từ lòng bàn tay trong quá trình sử dụng bị kéo dài.

Kiểm tra hiện tượng này bằng qui trình trong A.5.3 và tránh sử dụng các pipet này.

A.5.5 Ngay trước khi sử dụng, tráng đầu tip của pipet vài lần bằng dung dịch/huyền phù cần được phân phối. Đối với mỗi dung dịch mẫu, nên sử dụng một pipet mới.

A.5.6 Dùng pipet lấy nước, dung dịch đệm, enzym, coenzym và dung dịch mẫu (cho đầu tip pipet càng thấp càng tốt) trong các góc khác nhau của cuvet.

Có thể dùng pipet để lấy các lượng nhỏ dung dịch/huyền phù enzym (10 μ l đến 50 μ l) cho vào cánh trộn để đưa vào cuvet và dùng cánh trộn để trộn với lượng chứa trong cuvet.

A.5.7 Tránh nhiễm bẩn.

TCVN 8178 : 2009

A.6 Thông tin bổ sung

A.6.1 Kiểm tra về các khả năng gây nhiễu và về các sai số tổng thể bằng cách xác định các độ hấp thụ của hai dung dịch với các nồng độ khác nhau của chất phân tích. Các độ hấp thụ thu được phải tỷ lệ thuận với các nồng độ của chất phân tích.

A.6.2 Sử dụng dung dịch chuẩn để kiểm tra phản ứng enzym. Chất chuẩn này phải được coi là dung dịch chuẩn làm việc.

CHÚ THÍCH Các chất chuẩn có độ tinh khiết đã được xác nhận có thể thu được từ các tổ chức như là Viện Tiêu chuẩn và Công nghệ Quốc gia hoặc Trung tâm chuẩn của Châu Âu (BCR).

A.6.3 Tiến hành phép thử độ thu hồi khi có mặt dung dịch thử. Lượng chất phân tích được thêm vào phải giống như lượng có mặt trong mẫu thử.

A.6.4 Sử dụng một cánh trộn bằng chất dẻo cho mỗi cuvet hoặc mỗi cánh trộn chỉ được sử dụng một lần.

CHÚ THÍCH Lượng chất lỏng dính lại trên cánh trộn phải không đáng kể.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.*
 - [2] 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: Các định nghĩa và nguyên tắc chung.*
 - [3] 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 để xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo.*
 - [4] Giới thiệu danh pháp Enzym (1984) của Ủy ban danh pháp của Hiệp hội hoá sinh quốc tế. Academic Press, New York, 1984.
-