

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 10023:2013**

**ISO 27105:2009**

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA –  
XÁC ĐỊNH LYSOZYM LÒNG TRẮNG TRỨNG GÀ  
BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Milk and milk products – Determination of hen's egg white lysozyme by HPLC*

**HÀ NỘI – 2013**

**Lời nói đầu**

TCVN 10023:2013 hoàn toàn tương đương ISO/TS 27105:2009;

TCVN 10023:2013 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## **Sữa và sản phẩm sữa – Xác định lysozym lòng trắng trứng gà bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao**

*Milk and milk products – Determination of hen's egg white lysozyme by HPLC*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng lysozym lòng trắng trứng gà trong sữa và sản phẩm sữa.

Phương pháp này thích hợp để đo các mức thấp lysozym lòng trắng trứng gà với giới hạn định lượng là 5 mg/kg.

### **2 Thuật ngữ và định nghĩa**

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

#### **2.1**

**Hàm lượng lysozym lòng trắng trứng gà (hen's egg white lysozyme content)**

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

CHÚ THÍCH: Hàm lượng lysozym lòng trắng trứng gà được biểu thị bằng miligam trên kilogam.

### **3 Nguyên tắc**

Các whey protein biến tính và casein từ sữa và sản phẩm sữa được kết tủa đẳng điện ở pH 4,3 (phomat và các sản phẩm sữa dạng rắn) hoặc ở pH 2,2 (sữa và sản phẩm sữa dạng lỏng). Lysozym lòng trắng trứng gà đã hòa tan trong axit sau đó được xác định bằng HPLC pha đảo với detector huỳnh quang. Pic của lysozym có thể được kiểm tra xác nhận bằng LC/MS (xem Phụ lục A).

### **4 Thuốc thử và chất chuẩn**

## TCVN 10023:2013

Chỉ sử dụng thuốc thử phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

### 4.1 Thuốc thử

#### 4.1.1 Dung dịch natri clorua, $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/l}$ .

Hòa tan 58,44 g natri clorua trong 1 lít nước.

#### 4.1.2 Dung dịch axit clohydric, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$

Cho 4,0 ml axit clohydric 37 % khối lượng vào bình định mức một vạch 50 ml (5.9). Thêm nước đến vạch và trộn.

#### 4.1.3 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$

Cho 2,6 ml natri hydroxit 50 % khối lượng vào bình định mức một vạch 50 ml (5.9). Thêm nước đến vạch và trộn.

#### 4.1.4 Axit trifluoaxetic ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ )

#### 4.1.5 Axetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), loại dùng cho HPLC.

#### 4.1.6 Nước, loại dùng cho HPLC.

### 4.2 Lysozym

Sử dụng lysozym lòng trắng trứng gà tinh khiết<sup>1)</sup>.

CHÚ THÍCH: Lysozym (EC 3.2.1.17, muramidase) là loại enzym có trong tự nhiên, ví dụ: trong lòng trắng trứng gà (từ 3 g/100 g đến 4 g/100 g), trong nước bọt và nước mắt. Lysozym có tác dụng bảo quản do hoạt tính phân giải trên vách tế bào của một số vi khuẩn. Lysozym lòng trắng trứng gà được sử dụng trong chế biến phomat để ngăn ngừa sự phồng vè sau của phomat cứng và phomat bán cứng.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

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

### 5.1 Máy đo pH.

### 5.2 Giấy lọc gấp nếp, đường kính 150 mm<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Sigma L-7651 là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

<sup>2)</sup> Schleicher & Schuell 595½ là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

5.3 Bộ lọc màng, cỡ lỗ 0,22  $\mu\text{m}$ <sup>3)</sup>.

5.4 Cân, có thể cân chính xác đến 100 mg, có thể đọc được đến 10 mg.

5.5 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg, có thể đọc được đến 0,01 mg.

5.6 Máy khuấy từ.

5.7 Bộ đồng hóa, có tốc độ từ 2 500 r/min đến 3 000 r/min.

5.8 Thiết bị HPLC

5.8.1 Hệ thống bơm gradient rửa giải, có tốc độ dòng 1,0 ml/min.

5.8.2 Bộ bơm thủ công hoặc tự động, có thể bơm các thể tích 50  $\mu\text{l}$ .

5.8.3 Bộ gia nhiệt cho cột, có thể duy trì nhiệt độ cột ở  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

5.8.3.4 Cột dùng cho sắc ký pha đảo, PLRP-S 300  $\text{\AA}$ <sup>4)</sup>, cỡ hạt 5  $\mu\text{m}$ , kích thước 250 mm x 4,6 mm.

5.8.5 Detector huỳnh quang, có thể vận hành ở bước sóng kích thích 280 nm và bước sóng phát xạ 340 nm.

5.9 Bình định mức một vạch, dung tích 10 ml và 50 ml, loại A trong TCVN 7153 (ISO 1042).

## 6 Lấy mẫu

Phòng thử nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong 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 Cách tiến hành

### 7.1 Chuẩn bị dung dịch chuẩn lysozym

#### 7.1.1 Dung dịch chuẩn gốc lysozym

Cân 10 mg lysozym (4.2), chính xác đến 0,01 mg, cho vào bình định mức một vạch 10 ml (5.9). Thêm dung dịch natri clorua (4.1.1) đến vạch và trộn.

<sup>3)</sup> Millex-GV PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

<sup>4)</sup> PLRP-S 300  $\text{\AA}$  là tên của sản phẩm được cung cấp bởi Polymer Laboratories, Ltd. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này.

## **TCVN 10023:2013**

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc trong ngày sử dụng.

### **7.1.2 Dung dịch chuẩn làm việc lysozym**

Dùng pipet lấy 80  $\mu$ l dung dịch chuẩn gốc lysozym (7.1.1) cho vào bình định mức một vạch 10 ml (5.9). Thêm dung dịch natri clorua (4.1.1) đến vạch và trộn.

Dung dịch chuẩn làm việc chứa 8,0 mg lysozym trên lít.

## **7.2 Phần mẫu thử**

### **7.2.1 Sữa hoặc sản phẩm sữa dạng lỏng khác**

Cân 10,00 g mẫu thử, chính xác đến 0,01 g, cho vào cốc có mỏ 100 ml.

### **7.2.2 Phomat hoặc sản phẩm sữa dạng rắn khác**

Trước khi cân, nghiền mẫu phomat. Cân 2,00 g mẫu thử, chính xác đến 0,01 g, cho vào cốc có mỏ 100 ml.

CHÚ THÍCH: Có thể nghiền phomat mềm sau khi làm đông lạnh.

### **7.2.3 Chuẩn bị phần mẫu thử**

Cho 20 ml dung dịch natri clorua (4.1.1) vào phần mẫu thử (7.2.1 hoặc 7.2.2) và trộn. Chỉnh pH của dung dịch thu được bằng cách nhỏ từng giọt dung dịch natri hydroxit (4.1.3) đến pH 6,0.

Trộn đều phần mẫu thử trong 30 s, sử dụng bộ đồng hóa (5.7) ở tốc độ 2 500 r/min đến 3 000 r/min. Tráng bộ đồng hóa vào cốc có mỏ 100 ml khác sử dụng 10 ml dung dịch natri clorua (4.1.1). Cho phần nước rửa vào dung dịch thử.

Khuấy dung dịch mẫu trong cốc có mỏ bằng bộ khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 1 h. Chỉnh pH của dung dịch thử thu được từ sữa và sản phẩm sữa dạng lỏng (7.2.1) đến pH 2,2 và pH của dung dịch thử từ phomat và các sản phẩm sữa dạng rắn khác đến pH 4,3 bằng dung dịch axit clohydric (4.1.2).

Chuyển dung dịch thử sang bình định mức một vạch 50 ml (5.9). Sử dụng dung dịch natri clorua (4.1.1) để tráng rửa cốc có mỏ 100 ml. Thêm dung dịch natri clorua (4.1.1) đến vạch và trộn.

Để yên dung dịch thử 15 min ở nhiệt độ phòng.

Trước tiên lọc dung dịch thử qua giấy lọc gấp nếp (5.2) rồi lọc qua bộ lọc màng (5.3) trực tiếp vào lọ phân tích của thiết bị HPLC.

### 7.3 Xác định bằng HPLC

#### 7.3.1 Điều kiện sắc ký

Chuẩn bị như sau:

- 1) dung dịch gốc I: 1 ml axit trifluoaxetic (4.1.4) trong 1 lit nước (4.1.6).
- 2) dung dịch gốc II: 1 ml axit trifluoaxetic (4.1.4) trong 1 lit axetontril (4.1.5).

Sử dụng như sau cho phép phân tích HPLC:

- 1) dung môi rửa giải A có chứa: các dung dịch gốc I và II với tỷ lệ khối lượng tương ứng là 100:38,4.
- 2) dung môi rửa giải B có chứa: dung dịch gốc II.

Gradient rửa giải được khuyến cáo như trong Bảng 1.

**Bảng 1 – Gradient rửa giải khuyến cáo**

Thời gian min	Dung môi rửa giải A <sup>a</sup> %	Dung môi rửa giải B <sup>a</sup> %
0,0	100	0
20,0	100	0
21,0	50	50
22,0	50	50
23,0	100	0
35,0	100	0

<sup>a</sup> gradient rửa giải có thể cần sửa đổi chút để đạt được độ phân giải như trong Bảng 1.

Cài đặt tốc độ dòng của hệ thống bơm gradient rửa giải của thiết bị HPLC ở 1,0 ml/min.

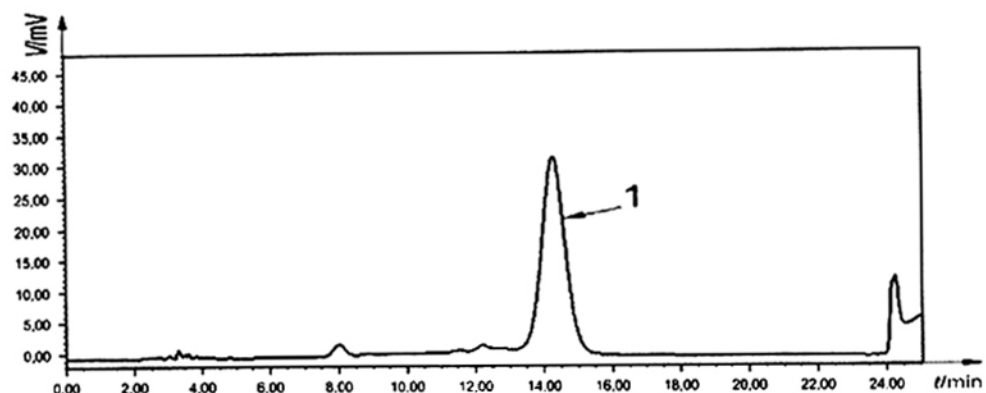
Cài đặt nhiệt độ của bộ gia nhiệt cho cột ở 45 °C. Xác định thời gian cân bằng cách kiểm tra độ phân giải của cột.

Độ đáp ứng của detector tại cuối mỗi lần chạy sắc ký (đường nền) cân bằng giá trị ban đầu. Rửa đẳng dòng 15 min thường là đủ.

## TCVN 10023:2013

Bơm: sử dụng bộ bơm bằng tay hoặc tự động để bơm 50  $\mu$ l dung dịch (7.2.3) vào cột.

Các tín hiệu huỳnh quang HPLC từ dung dịch chuẩn làm việc (7.1.2) và mẫu phomat cứng (7.2.3) được nêu trong Hình 1 và Hình 2.



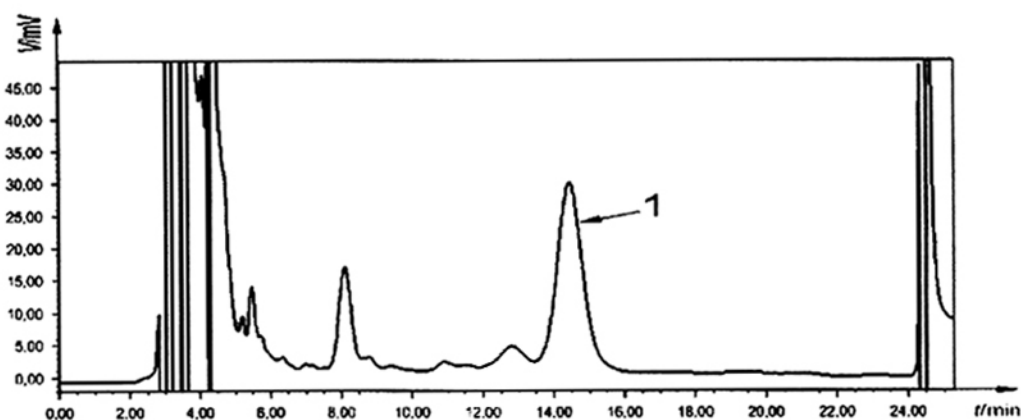
### CHÚ DẪN:

t là thời gian

V là độ đáp ứng của pic

1 là lysozym

Hình 1 – Tín hiệu huỳnh quang HPLC từ dung dịch chuẩn làm việc (7.1.2)



### CHÚ DẪN:

t là thời gian

V là độ đáp ứng của pic

1 là lysozym

Hình 2 – Tín hiệu huỳnh quang HPLC từ mẫu phomat cứng

## 8 Tính và biểu thị kết quả



### 8.1 Hiệu chuẩn một điểm

Tính hàm lượng lysozym của mẫu thử,  $w_L$ , biểu thị bằng miligam trên kilogam, sử dụng công thức sau:

$$w_L = \frac{h_t \rho_s V_t}{h_s m_t}$$

Trong đó:

$\rho_s$  là nồng độ của dung dịch chuẩn làm việc (7.1.2), tính bằng miligam trên lit (mg/l);

$h_t$  là chiều cao pic hoặc diện tích pic của dung dịch thử (7.2);

$h_s$  là chiều cao pic hoặc diện tích pic của dung dịch chuẩn làm việc (7.1.2);

$m_t$  là khối lượng phần mẫu thử (7.2), tính bằng gam (g);

$V_t$  là thể tích phần mẫu thử (7.2), tính bằng mililit (ml).

Định kỳ kiểm tra độ tuyến tính của thiết bị và mẫu trắng thuốc thử.

### 8.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả chính xác đến hai chữ số thập phân. Biểu thị kết quả thấp hơn 5 mg/kg "nhỏ hơn 5 mg/kg".

## 9 Độ chụm

Tiêu chuẩn này chưa được thử nghiệm và đánh giá liên phòng thử nghiệm, do đó chưa có giá trị độ chụm cũng như giới hạn phát hiện.

Dựa vào kinh nghiệm, giới hạn thấp nhất về định lượng hàm lượng lysozym là 5 mg/kg (xem 8.2).

## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- 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 và viện dẫn tiêu chuẩn này;

## **TCVN 10023:2013**

- d) tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với mọi chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được và nếu đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

### Đánh giá xác nhận bằng LC/MS

#### A.1 Yêu cầu chung

Đối với các pic lysozym trong các dung dịch thử, kết quả tìm được có thể đánh giá xác nhận bằng LC/MS. Các thông số MS về lysozym cần được tối ưu và cần điều chỉnh cho phù hợp với hệ thống thiết bị thử công (ví dụ: điện áp của kim 3,0 kV, đầu dò 550 °C, điện áp cone 130 V).

Sử dụng thiết bị LC/MS có khả năng vận hành trong các điều kiện sắc ký nêu trong A.3, khác với điều kiện đối với HPLC (7.3) vì không sử dụng axit trifluoaxetic và đo các tín hiệu khối  $m/z = 1\ 431$   $[M+H_{10}]^{10+}$ ;  $1\ 590$   $[M+H_9]^{9+}$  và  $1\ 788$   $[M+H_8]^{8+}$ , thời gian lưu khoảng 12,5 min.

Kiểm tra xác nhận sự có mặt của lysozym qua việc phân bố đồng đều các mảnh phổ này trên toàn bộ pic lysozym giả định.

#### A.2 Thiết bị LC/MS

**A.2.1 Hệ thống bơm gradient rửa giải**, có thể vận hành ở 0,25 ml/min.

**A.2.2 Bộ bơm thủ công hoặc tự động**, có thể bơm các lượng 5  $\mu$ l.

**A.2.3 Bộ phận gia nhiệt cột**, có thể duy trì ở 40 °C  $\pm$  2 °C.

**A.2.4 Cột pha đảo**, kích thước 250 mm x 4,6 mm, cỡ hạt 5  $\mu$ m, được ổn định vài giờ không có axit trifluoaxetic.

**A.2.5 Detector khối phổ**, có thể vận hành ở chế độ ion ESI+ tại  $m/z$  1 431; 1 590 và 1 788.

#### A.3 Điều kiện sắc ký

Sử dụng các dung môi rửa giải sau đây đối với LC/MS:

- 1) dung môi rửa giải A chứa 5 ml axit formic (loại phân tích) trong 1 lít nước (4.1.6).
- 2) dung môi rửa giải B chứa 5 ml axit formic trong 1 lít axetonitrile (4.1.5).

## TCVN 10023:2013

Cài đặt tốc độ dòng của hệ thống bơm gradient rửa giải của thiết bị HPLC ở 0,80 ml/min. Việc chia dòng cần là: 0,5 ml/min MS; 0,3 ml/min thải (khi 25 % B); van chuyển đổi 0,0 min vào MS; 0,5 min ra thải; 7,0 min vào MS.

Sử dụng bộ bơm thủ công hoặc tự động, bơm 5  $\mu$ l.

Gradient rửa giải khuyến cáo nêu trong Bảng A.1.

**Bảng A.1 – Gradient rửa giải khuyến cáo**

Thời gian	Dung môi rửa giải A <sup>a</sup>	Dung môi rửa giải B <sup>a</sup>
(min)	%	%
0,0	70	30
9,0	30	70
9,1	0	100
12,0	0	100
12,1	70	30
16,0	70	30

<sup>a</sup> Gradient rửa giải có thể cần được điều chỉnh để có được độ phân giải như trong Hình 1.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
  - [2] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*
  - [3] PELLEGRINO, L., TIRELLI, A. Phương pháp HPLC phát hiện lysozym lòng trắng trứng gà trong sữa và sản phẩm sữa. *Int. Dairy J.* 2000, **10**, pp. 435-442
  - [4] BÄRTSCHI, F., MURALT, L., RIEDER, KAMPFER, U., SCHALLER, J. Bestimmung von Lysozym in Käse mittels LC-MS [Xác định lysozym trong phomat bằng LC-MS]. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 2006, **97**, pp. 478-488
-