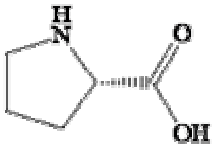
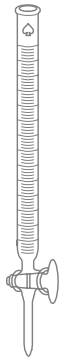
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ
KHOA NÔNG NGHIỆP VÀ SINH HỌC ỨNG DỤNG

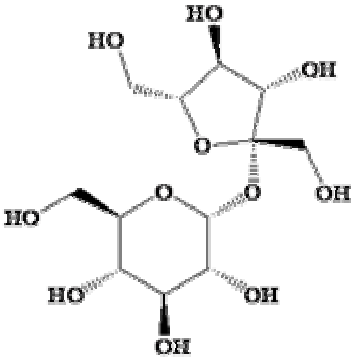


GIÁO TRÌNH

THỰC TẬP SINH HÓA

Mã số môn học: HS 632



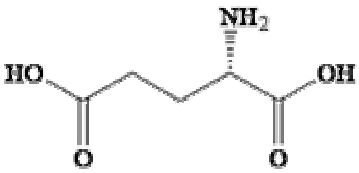


Biên soạn:

Tiến sĩ **Nguyễn Minh Chơn**

Thạc sĩ **Phan Thị Bích Trâm**

Thạc sĩ **Nguyễn Thị Thu Thủy**



NĂM 2005

LỜI NÓI ĐẦU

Giáo trình thực tập sinh hóa được biên soạn trên cơ sở kế thừa và phát huy giáo trình được quí Thầy Cô tiền nhiệm biên soạn trước đây. Giáo trình này còn bổ sung và sửa đổi nội dung cho phù hợp với chương trình cải cách, phù hợp với điều kiện hiện tại và hướng phát triển của phòng thí nghiệm trong tương lai. Một số phương pháp có sử dụng thiết bị phân tích cũng được đưa vào để người đọc tham khảo và có thể ứng dụng được trong tương lai khi điều kiện phòng thí nghiệm được trang bị tốt hơn. Nội dung giáo trình nhằm giúp cho sinh viên các chuyên ngành Trồng Trọt, Nông Học, Công Nghệ Thực Phẩm, Thủy Sản, Chăn Nuôi, Môi Trường, Bảo Vệ Thực Vật, Hoa Viên Cây Kiểng, Khoa Học Đất, Công Nghệ Sinh Học, Cử Nhân Hóa Học, Sư Phạm Sinh Học, Sư Phạm Hóa Học và các ngành có liên quan hiểu được các kiến thức cơ bản trong thí nghiệm sinh hóa và các phương pháp thí nghiệm để khảo sát carbohydrate (glucid), lipid, amino acid, enzyme, nucleic acid, vitamin, và các chất khác. Trên cơ sở của các phương pháp phân tích này, các bài thực tập sẽ được lựa chọn ra cho phù hợp với từng chuyên ngành và điều kiện của từng năm học. Các bài thực hành còn giúp làm sàng tỏ những vấn đề đã được nêu ra trong phần lý thuyết.

Nhóm biên soạn xin chân thành biết ơn Cô Phạm Thu Cúc và quí Thầy Cô tiền nhiệm đã dày công xây dựng giáo trình thực tập trước đây và chúng tôi là những người tiếp tục phát huy.

Với những điều kiện nhất định của phòng thí nghiệm, những bài thực hành chắc hẳn chưa đáp ứng hết yêu cầu nghiên cứu sinh hóa hiện đại. Chúng tôi xin chân thành biết ơn tất cả những ý kiến đóng góp để giáo trình ngày một hoàn thiện hơn.

Thay mặt nhóm biên soạn

Nguyễn Minh Chơn

MỤC LỤC

CHƯƠNG 1. NHỮNG KIẾN THỨC CƠ BẢN 1
1.1. NỘI QUI PHÒNG THÍ NGHIỆM 1
1.2. KỸ THUẬT PHÒNG THÍ NGHIỆM 1
1.2.1. Các điểm cần lưu ý để tránh tai nạn trong khi làm việc và thực tập trong phòng thí nghiệm 1
1.3. KỸ THUẬT SINH HÓA 3
1.3.1. Các dụng cụ thường dùng trong thực tập sinh hóa 3
1.3.2. Cách chuẩn bị một dung dịch hóa chất 7
CHƯƠNG 2. GLUCID 13
2.1. KHÁI QUÁT VỀ GLUCID 13
2.2. ĐỊNH TÍNH MONOSACCHARIDE VÀ TINH BỘT 13
2.2.2. Khảo sát tinh bột 13
2.2.3. Định tính monosaccharide (glucose) và tinh bột 14
2.3. ĐỊNH LƯỢNG ĐƯỜNG KHỬ 15
2.3.1. Định lượng đường khử theo phương pháp Bertrand 16
2.3.2. Định lượng đường khử theo Hagedorn-Jensen 18
2.4. PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐƯỜNG TỔNG SỐ 19
2.5. ĐỊNH LƯỢNG ĐƯỜNG SACCHAROSE 20
2.6. ĐỊNH LƯỢNG TINH BỘT VÀ CELLULOSE 21
2.6.1 Định lượng tinh bột 21
2.6.2 Định lượng cellulose 22
2.7. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AMYLOSE 23
CHƯƠNG 3. LIPID 25
3.1. KHÁI QUÁT VỀ LIPID 25
3.2. KHẢO SÁT TÍNH HÒA TAN CỦA LIPID 25
3.3. CÁC CHỈ SỐ ĐÁNH GIÁ LIPID 25
3.3.1. Xác định chỉ số xà phòng 25
3.3.2. Xác định chỉ số iod 26
3.3.3. Xác định chỉ số acid 27
3.3.4. Xác định chỉ số peroxid 28
3.4. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG LIPID THÔ BẰNG MÁY SOXHLET 29
3.5. XÁC ĐỊNH ACID BÉO BẰNG SẮC KÝ KHÍ 31
3.6. CHIẾT TÁCH LECITHIN TỪ LÒNG ĐỎ TRỨNG 32
CHƯƠNG 4. KHẢO SÁT VITAMIN 34

4.1. KHÁI QUÁT 34
4.2. ĐỊNH TÍNH VITAMIN D 34
4.3. ĐỊNH TÍNH VITAMIN B1 34
4.3.1. Phản ứng tạo thiocrome 34
4.3.2. Phản ứng với thuốc thử Diazo 35
4.4. ĐỊNH TÍNH VITAMIN B2 36
4.5. ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN C 36
4.5.1. Định lượng vitamin C theo phương pháp Muri 36
4.5.2. Định lượng vitamin C bằng enzyme peroxidase 39
4.6. XÁC ĐỊNH VITAMIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG CAO ÁP (HPLC) 39
4.6.1. Phân tích vitamin A và vitamin D 39
4.6.2. Phân tích vitamin E 40
4.6.3. Phân tích vitamin K 40
4.6.4. Phân tích acid nicotinic (vitamin B3) 41
CHƯƠNG 5. KHẢO SÁT AMINO ACID VÀ PROTEIN 42
5.1. KHÁI QUÁT VỀ AMINO ACID VÀ PROTEIN 42
5.2. PHÂN TÍCH HỖN HỢP ACID AMIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ TRÊN GIẤY 42
5.3. CÁC PHẢN ỨNG MÀU ĐẶC TRƯNG CỦA PROTEIN 44
5.3.1. Phản ứng Biuret 44
5.3.2. Phản ứng Nynhydrin 45
5.4. SỰ KẾT TỦA PROTEIN 47
5.4.1. Sự kết tủa thuận nghịch 47
5.4.2. Sự kết tủa bất thuận nghịch 47
5.5. ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SO MÀU 48
5.5.1. Khái quát 48
5.5.2. Định luật Lambert- Beer 49
5.5.3. Phương pháp định lượng protein theo phản ứng biuret 50
5.5.4. Định lượng protein theo phương pháp Lowry 52
5.6. ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN TỔNG SỐ THEO PHƯƠNG PHÁP KJELDAHL 53
CHƯƠNG 6. ENZYME 56
6.1. KHÁI QUÁT 56
6.1. KHÁI QUÁT 56
6.2. KHẢO SÁT HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME AMYLASE TỪ MẦM LÚA 56
6.2.1. Hệ enzyme amylase 56

6.2.2. Sự tạo màu giữa iod với tinh bột và các chuyển hóa của tinh bột khi thuỷ phân bằng amylase 57
6.2.3. Ly trích và khảo sát hoạt tính tương đối của amylase mầm lúa 57
6.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cơ chất lên tốc độ thủy giải của amylase 58
6.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của pH lên tốc độ thủy giải của amylase 59
6.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của chất hoạt hóa và chất ức chế 59
6.3. KHẢO SÁT ENZYME UREASE TRONG BỘT ĐẬU NÀNH 60
6.4. ENZYME HÓA NÂU 61
6.4.1. Khái quát về phản ứng hóa nâu 61
6.4.2. Khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme hóa nâu 64
6.5. KHẢO SÁT HOẠT TÍNH TƯƠNG ĐỐI CỦA ENZYME β-CYANOALANINE SYNTHASE 65
6.5.1. Trích enzyme CAS 65
6.5.2. Khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme CAS 65
CHƯƠNG 7. PHƯƠNG PHÁP KHẢO SÁT ACID NUCLEIC 66
7.1. KHÁI QUÁT 66
7.2. PHƯƠNG PHÁP LY TRÍCH ACID NUCLEIC 66
7.2.1. Ly trích ADN từ tế bào vi khuẩn 66
7.2.2. Ly trích ARN 67
7.3. ĐỊNH TÍNH ACID NUCLEIC 68
7.3.1.Tính tan của acid nucleic 68
7.3.2. Các phản ứng màu của acid nucleic 68
7.4. ĐỊNH LƯỢNG ACID NUCLEIC 69
7.4.1. Định lượng ADN 69
7.4.2. Định lượng ARN 71
CHƯƠNG 8. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH KHÁC 73
8.1. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM 73
8.2. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TRO 74
8.2.1. Hàm lượng tro toàn phần 74
8.2.2. Xác định hàm lượng tro hòa tan và không hòa tan trong nước 74

CHƯƠNG 1. NHỮNG KIẾN THỨC CƠ BẢN

1.1. CÁC QUI ĐỊNH CHUNG CỦA PHÒNG THÍ NGHIỆM

1. Mỗi nhóm thực tập phải chịu trách nhiệm về: trật tự, an toàn, dụng cụ, hóa chất và kết quả thí nghiệm cho bài thực tập của mình.

2. Sinh viên phải có mặt ở phòng thí nghiệm đúng giờ qui định: Sáng 7 giờ, chiều 13 giờ và phải có mặt tại phòng thí nghiệm suốt thời gian thực tập. Sinh viên đến trễ 10 phút không được vào phòng thí nghiệm. Khi kết thúc thí nghiệm sinh viên phải báo cáo kết quả với giáo viên hướng dẫn trước lúc ra về.

3. Sinh viên vắng mặt phải có giấy phép và phải xin thực tập bù buổi khác.

4. Sinh viên phải xem kỹ bài thực tập trước khi vào phòng thí nghiệm.

5. Mỗi nhóm thực tập cử một sinh viên đại diện ký nhận mượn dụng cụ: kiểm tra tình hình dụng cụ (thiếu, hỏng, bể) báo cáo ngay cho giáo viên hướng dẫn. Sinh viên phải rửa dụng cụ sạch sẽ trước và sau khi thực tập. Kết thúc buổi thực tập mỗi nhóm phải lau dọn, làm sạch chỗ nhóm mình làm thí nghiệm, nếu dụng cụ bị mất mát, hư hỏng phải báo ngay cho người phụ trách phòng thí nghiệm biết.

6. Mỗi buổi thực tập, nhóm trực nhật có nhiệm vụ: nhắc nhở các nhóm dọn vệ sinh, kiểm tra điện, nước và cửa trước khi ra về.

7. Mỗi nhóm sinh viên làm bài tường trình kết quả theo yêu cầu của từng bài thực tập, nộp kết quả cho giáo viên hướng dẫn vào buổi thực tập kế tiếp. Kết thúc các bài thực tập có thi kiểm tra.

1.2. KỸ THUẬT PHÒNG THÍ NGHIỆM

1.2.1. Các điểm cần lưu ý để tránh tai nạn trong khi làm việc và thực tập trong phòng thí nghiệm

1. Cẩn thận khi tiến hành thí nghiệm, không được sử dụng những máy móc, dụng cụ khi chưa biết rõ cách sử dụng. Phải hiểu biết rõ tính chất của các hóa chất để tránh tai nạn đáng tiếc.

2. Tất cả chai lọ đựng hóa chất đều có nhãn, khi dùng phải đọc kỹ tên và nồng độ, dùng xong phải đậy đúng nút và để lại đúng chỗ cũ. Phần lớn các hóa chất là độc nên phải hết sức cẩn thận.

3. Đối với các chất kiềm, acid đậm đặc phải lưu ý:

- Không được hút bằng miệng.
- Phải dùng ống đong hoặc bình nhỏ giọt.
- Phải đổ acid hoặc kiềm vào nước khi cần pha loãng chúng.
- Phải đặt nghiêng miệng ống nghiệm hoặc cốc về phía không có người.
- Khi acid bị đổ ra ngoài thì cho nhiều nước để làm loãng acid.

4. Khi theo dõi dung dịch đang sôi không được đưa mặt gần hay khi để một chất lỏng (chất kiềm) vào cốc phải đưa ra xa. Khi đun một chất lỏng trong ống nghiệm hay cho acid, kiềm vào phải đặt ống nghiệm nghiêng một góc 45°. Khi đun phải lắc đều và hướng miệng ống nghiệm về phía không có người.

5. Khi làm việc với chất dễ cháy thì tuyệt đối:

Khi sử dụng các chất dễ cháy như ether, xăng, benzen, chloroform, natri, kali cần chú ý:

- Không dùng lửa ngọn và tránh xa lửa ngọn.

- Không để chất dễ cháy bên cạnh nguồn sinh nhiệt (chất dễ cháy, dễ bốc hơi có thể làm nổ hay bật nút, hơi bốc ra gặp ngọn lửa sẽ cháy, cả khi ngọn lửa ở xa).

- Khi chữa cháy phải bình tĩnh dập tắt ngọn lửa bằng khăn ướt hay bình chửa cháy.

6. Khi làm việc với dụng cụ thủy tinh:

- Kiểm tra kỹ dụng cụ trước khi dùng.

- Tránh đổ vỡ.

- Dụng cụ nào dùng cho việc đó. Khi đun, chỉ được đun bằng dụng cụ thủy tinh chịu nhiệt.

- Dụng cụ phải được rửa sạch trước và sau khi sử dụng.

- Không dùng dụng cụ thủy tinh, chai lọ để chứa các chất kiềm mạnh hoặc acid đậm đặc có tác dụng bề mặt ăn mòn thủy tinh như HF.

7. Khi làm việc với dụng cụ điện hoặc sử dụng điện tay phải khô, chỗ làm việc phải khô. Kiểm tra kỹ nguồn điện và dây dẫn điện khi sử dụng.

1.2.2. Sơ cấp cứu trong phòng thí nghiệm

Sơ cấp cứu là biện pháp tạm thời đối với các trường hợp thương tích nhẹ hoặc trước khi đưa bệnh nhân đến bệnh viện như:

1.2.2.1. Phỏng

a. Phỏng do nhiệt (hay vật nóng)

- Phỏng nhẹ: Lấy vải mùng tẩm dung dịch acid picric bão hòa đắp lên mặt vết phỏng.

- Phỏng nặng: Đắp nhẹ vải mùng tẩm dung dịch acid picric lên vết phỏng, sau đó chuyển đi bệnh viện.

b. Phỏng do hóa chất

Việc trước tiên là ngâm vết thương vào chậu nước to hoặc để vết thương dưới vòi nước chảy thật nhẹ. Sau đó mới trung hòa hóa chất. Chú ý các trường hợp sau:

- Phỏng do acid: Đắp vải mùng tẩm dung dịch bicarbonat natri 8%.

- Phỏng do kiềm: Đắp vải mùng tẩm dung dịch acid picric 3%.

1.2.2.2. Tai nạn về mắt

- Acid hay brom vào mắt: Rửa mắt tức khắc nhiều lần bằng nước sạch, sau đó tẩm mắt trong dung dịch bicarbonat natri 1%.

- Chất kiềm vào mắt: Xử lý như trên rồi tẩm mắt bằng dung dịch acid boric 1%.

1.2.2.3. Ngộ độc

Khi bị chất độc vào miệng:

- Acid: Xúc miệng nhiều lần bằng dung dịch bicarbonat natri 1%.

- Kiềm: Xúc miệng nhiều lần bằng dung dịch acid 1%.

- Các hóa chất khác: Xúc miệng nhiều lần bằng nước lạnh.

1.2.2.4. Nhiễm hơi độc

Đưa nạn nhân ra nơi thoáng khí, nới rộng quần áo cho dễ thở. Hô hấp nhân tạo trong lúc di chuyển đến bệnh viện.

1.2.2.5. Điện giật

Trước hết ngắt mọi cầu dao điện có liên quan đến phòng thí nghiệm. Nới rộng quần áo nạn nhân sau khi đem ra nơi thoáng. Hô hấp nhân tạo trong khi chờ chuyển đến bệnh viện nếu là trường hợp nặng.

1.2.2.6. Hỏa hoạn

- Ngọn lửa nhỏ: dập tắt bằng khăn, vải bố ướt hay cát.
- Lửa bắt đầu cháy quần áo: lăn vài vòng dưới đất để dập tắt ngọn lửa, trong khi các bạn lấy vải ướt trùm lên chỗ cháy và ép sát cho đến khi lửa tắt. Tránh chạy hoảng.
- Dùng bình chửa cháy trước phòng thí nghiệm để dập lửa.

Lưu ý: Sinh viên phải báo ngay cho nhân viên phòng thí nghiệm hoặc giáo viên hướng dẫn về mọi sự cố trong phòng thí nghiệm.

1.3. KỸ THUẬT SINH HÓA

1.3.1. Các dụng cụ thường dùng trong thực tập sinh hóa

1.3.1.1. Cách rửa các dụng cụ

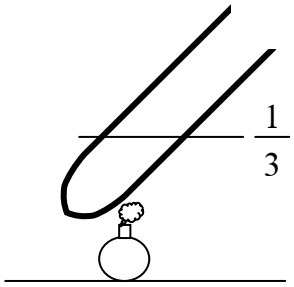
Độ sạch của các dụng cụ ảnh hưởng rất lớn đến kết quả thí nghiệm, do đó rửa dụng cụ hóa học là một phần kỹ thuật phòng thí nghiệm mà sinh viên cần phải biết. Để chọn phương pháp rửa dụng cụ trong từng trường hợp riêng biệt thường phải biết tính chất của những chất làm bẩn dụng cụ. Sau đó sử dụng tính chất hòa tan của những chất bẩn này trong nước nóng hay trong nước lạnh, trong dung dịch kiềm, acid, trong các muối hay các dung môi hữu cơ. Thường dùng cây cọ rửa hoặc dùng bàn chải chà xát vào các dụng cụ (dùng cây cọ rửa phải chú ý vì ngọn cây cọ có thể làm thủng đáy dụng cụ).

Các dụng cụ sau khi rửa sạch chất bẩn được ngâm vào dung dịch sulfo- cromic (hỗn hợp của $K_2Cr_2O_7$ 10% và H_2SO_4 đậm đặc cùng tỉ lệ thể tích) trong một ngày; sau đó đem rửa sạch với nước máy và tráng một lần với nước cất, xong để vào tủ sấy khô. Dụng cụ thủy tinh được gọi là sạch khi nước trên thành không tạo thành những giọt riêng mà dàn mỏng đều.

1.3.1.2. Các loại dụng cụ và cách sử dụng

a. Ống nghiệm

Ống nghiệm thường là hình trụ có thể tích khác nhau (Xem hình 1.1). T không được đun nóng ngay tại đáy ống nghiệm mà ngọn lửa phải được để vào thành của ống.



Hình1.1. Ống nghiệm

Điều kiện khi đun nóng một dung dịch trong ống nghiệm.

- Dung dịch không được nhiều quá 1/3 ống nghiệm.
- Ống nghiệm được giữ nghiêng khoảng 45° luôn luôn lắc hoặc khuấy đều.

- Miệng ống nghiệm không được hướng vào một người nào vì nó có thể gây phỏng.

b. Ống hút (pipet)

Có nhiều loại ống hút thông dụng:

- Loại có bầu an toàn: Dùng để hút những dung dịch độc.
- Loại có hai vạch: Thể tích ghi trên ống là thể tích giữa hai vạch.
- Loại bình thường có phân độ.

Đối với các loại chất lỏng độc, ta dùng một quả bóp cao su đặc biệt gắn vào đầu ống hút, quả bóp này có thể hút hoặc để chất lỏng tự do nhờ một hế thống khóa (valve).

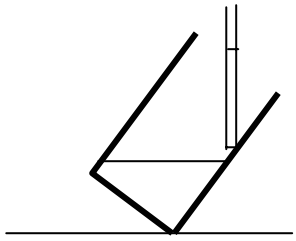
**** Cách sử dụng:***

+ Tráng ống hút bằng một lượng nhỏ dung dịch sẽ hút.

+ Hút dung dịch lên đến bên trên vạch ngang. (xem hình 1.2).

+ Lấy ngón trỏ bịt đầu trên ống hút lại (ngón trỏ phải sạch, khô), lau sạch bên ngoài đầu ống hút bằng giấy thấm.

+ Nâng ống lên cao cho vạch chia độ trên ống hút ngang tầm mắt, đầu ống dựa vào thành bình rồi cho dung dịch chảy từ từ theo thành bình đến khi đã lấy đủ thể tích cần dùng cho thí nghiệm thì ngưng (lúc này cần quan sát mực nước cong tiếp xúc với vạch trên ống hút)



Hình 1.2. Pipet

+ Giữ ống hút thẳng đứng rồi chuyển qua bình hứng, đặt đầu ống hút chạm vào thành bình rồi buông ngón trỏ để dung dịch chảy tự do (bình hứng phải để hơi nghiêng).

+ Khi dung dịch ngưng không chảy nữa, ta xoay đầu ống hút 2-3 vòng trước khi lấy ống hút ra khỏi bình (không thổi vào ống hút để đuổi giọt thừa còn lại trong ống).

+ Khi đọc thể tích cần chú ý đọc theo mặt cầu lõm của chất lỏng không màu hoặc trong suốt như nước, đọc theo mặt cầu lồi đối với chất lỏng có màu sậm như dung dịch chứa iod.

c. Micropipet

- Chỉnh thể tích trong khoảng sử dụng của pipet bằng cách vặn nút phía trên đầu pipet cùng hoặc ngược chiều kim đồng hồ cho đến khi các chữ số hiện rõ đúng thể tích cần dùng.
- Gắn đầu tip lấy hóa chất vào đầu pipet sao cho khít với đầu pipet.
- Giữ pipet thẳng đứng rồi dùng ngón tay cái nhấn nút đến mức vừa cứng tay đầu tiên. Sau đó cho đầu tip ngập dưới bề mặt dung dịch khoảng 2-3 mm và nhẹ nhàng buông nút để hút dung dịch. Cẩn thận nhấc pipet ra khỏi dung dịch, chạm nhẹ đầu tip vào thành dụng cụ đựng để gạt bỏ dung dịch thừa.
- Bơm dung dịch vào dụng cụ đựng bằng cách nhấn nút tới mức cuối cùng sao cho không còn dung dịch bám trên thành tip.

**** Lưu ý:*** Cần tráng tip mới vài lần bằng dung dịch sắp hút trước khi lấy hóa chất, đặc biệt khi dung dịch cần lấy có độ nhớt và tỉ trọng khác với nước.

d. Ống chuẩn độ (Buret)

Được gắn trên giá và có một khóa để điều chỉnh lượng dung dịch chảy ra trên ống có phân độ. (Hình 1.3).

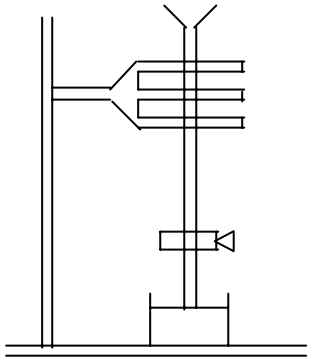
**** Cách sử dụng:***

+ Kiểm tra xem khóa đã được bôi vaselin để tránh chảy nước, hoặc xem có bị quá xít, khó vặn không.

+ Tráng một lần với nước cất và một lần với dung dịch định dùng để chuẩn độ.

+ Đổ đầy dung dịch vào ống lên đến mức trên số 0.

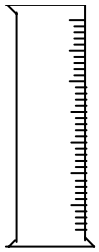
+ Dùng tay trái mở khóa cho dung dịch chảy từ từ cho đến khi mực dung dịch tiếp xúc với vạch 0 (nếu một giọt dung dịch còn dính lại đầu ống chuẩn độ thì phải lấy ra bằng cách chạm vào thành bình chứa).



Hình 1.3. Buret

e. Ống đong (Cylinder)

Có dung tích thay đổi từ 5 mL đến 2 L, có thể có mặt đáy và được phân độ (hình 1.4), tùy sự phân độ này chỉ gần đúng nhưng thể tích toàn phần vẫn đúng nhất. Vì thế không nên dùng ống đong để chia những lượng quá nhỏ (Hình 1.4).



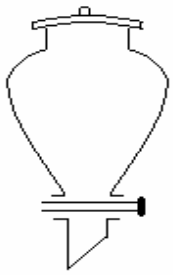
Hình 1.4. Ống đong

f. Bình tam giác (Erlenmeyer)

Được sử dụng rộng rãi ở các thí nghiệm phân tích (chuân độ). Bình tam giác có nút mài được gọi là "Bình xác định chỉ số iod".

g. Bình chiết

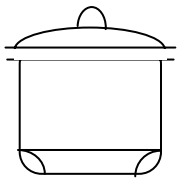
Dùng để tách riêng những dung dịch lỏng không hòa tan với nhau (ví dụ nước và dầu). Khi lắc bình chiết, ngón tay phải giữ nút ở đầu trên và khóa ở đầu dưới bình (Hình 1.5).



Hình 1.5. Bìnhchiết

h. Bình hút ẩm (Desiccator):

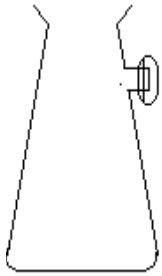
Là dụng cụ thủy tinh có thành dày và có nắp, dùng để làm khô mẫu từ từ và để bảo quản những chất dễ hút hơi ẩm từ không khí. (Hình 1.6) Phần dưới của bình có đặt những chất hút ẩm. Muốn mở nắp bình phải đẩy nắp về một phía, tránh nhắc nắp lên cao.



Hình 1.6. Bình hút ẩm

i. Bình hút chân không:

Được sử dụng khi bơm chân không để lọc. Bình có ống nhánh ở phần trên, ống nhánh này được nối với bơm chân không (Hình 1.7).

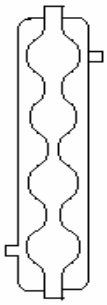


Hình 1.7. Bình hút chân không

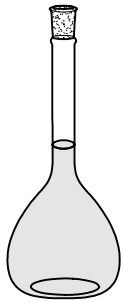
j. Ống sinh hàn:

Là dụng cụ để làm lạnh và ngưng hơi (Hình 1.8). Tùy theo điều kiện mà chất lỏng được tạo thành trong ống sinh hàn khi làm lạnh hơi hoặc đi sang bình thu hoặc là trở lại bình đun nóng. Sự khác nhau về chức năng của ống sinh hàn quyết định hình dạng và tên gọi

của chúng. Khi nối ống sinh hàn cần tuân theo quy tắc: Nước đi vào từ đầu thấp ở phía dưới và đi ra từ đầu phía trên.



Hình 1.8. Ống sinh hàn



Hình 1.9. Bình định mức

k. Bình định mức:

Là dụng cụ tối cần thiết đối với các thí nghiệm phân tích. Chúng là những bình cầu đáy bằng có nút thủy tinh mài nhám. Bình định mức dùng để pha loãng một dung dịch bất kỳ đến một thể tích xác định hoặc để hòa tan một chất nào đó trong một dung môi với thể tích xác định (hình 1.9).

Khi cho dung dịch vào bình định mức cổ hẹp, phải dùng phễu, xong đậy nắp chặt và dốc ngược bình nhiều lần để trộn đều. Khi cho nước gần tới vạch, cẩn thận dùng ống hút đưa thêm từng giọt đến vạch mức.

1.3.2. Cách chuẩn bị một dung dịch hóa chất

1.3.2.1. Nồng độ của dung dịch

Khi hòa tan muối vào nước ta được nước muối.

+ Muối: chất hòa tan hay dung chất.

+ Nước: dung môi.

+ Nước muối: dung dịch.

Nồng độ của dung dịch có thể được diễn tả nhiều cách khác nhau:

1. Nồng độ phần trăm khối lượng theo khối lượng (% w/w): Số gam chất hòa tan có trong 100 gam dung dịch.

Ví dụ: Dung dịch NH_4Cl 5% theo khối lượng là trong 100g dung dịch đó có 5g NH_4Cl tinh khiết.

2. Nồng độ phần trăm khối lượng theo thể tích (% w/v): Số gam chất hòa tan có trong 100 mL dung dịch.

Ví dụ: Dung dịch $CuSO_4$ 10% theo thể tích là trong 100 mL dung dịch đó có 10g $CuSO_4$ tinh khiết.

3. Nồng độ phần trăm thể tích theo thể tích (% v/v): Là số mL dung chất có trong 100mL dung dịch.

Ví dụ: Dung dịch glycerin 10% theo thể tích là trong 100 mL dung dịch đó có 10 mL glycerin nguyên chất.

4. Nồng độ phân tử - nồng độ mol (mol/L hay M): Là số phân tử gam (số mol) trong 1 L dung dịch.

5. Nồng độ gam/L (g/l): Là số gam chất tan có trong 1 L dung dịch.

6. Dung dịch nguyên chuẩn (N): Một dung dịch được gọi là nguyên chuẩn khi 1 L dung dịch ấy chứa một khối lượng chất hòa tan được gọi là đương lượng gam.

1.3.2.2. Cách pha các nồng độ

a. Nồng độ phần trăm theo khối lượng

Thí dụ: Pha 80 gam dung dịch NH_4Cl 40%.

Dung dịch NH_4Cl 40% nghĩa là cần có 40g NH_4Cl cho 100g dung dịch. Vậy muốn có 80g dung dịch thì cần một lượng NH_4Cl là:

$$\frac{40 \text{ x } 80}{100} = 32g$$

Lượng nước phải thêm cho đủ 80g: 80g - 32g = 48g hay 48 mL

Vậy ta cần 32g NH_4Cl rồi đong 48 mL H_2O bằng ống đong. Đổ nước vào hòa tan, được dung dịch NH_4Cl 40%.

* **Trường hợp các hóa chất có ngậm nước** ($CuSO_4.5H_2O$, $Na_2S_2O_3.5H_2O$, $NaCO_3.10H_2O$...) khi cần pha các chất đó ta phải tính tới lượng nước kết tinh trong chúng.

Ví dụ: Muốn pha 500g dung dịch $CuSO_4$ 20% từ tinh thể ngậm nước ($CuSO_4.5H_2O$):

Phân tử khối của $CuSO_4$ khan nước là 160g.

Phân tử khối của $CuSO_4.5H_2O$ là 250g.

Muốn pha 500g dung dịch $CuSO_4$ 20% thì ta cần một lượng $CuSO_4$ khan nước là.

$$\frac{20 \text{ x } 500}{100} = 100 \text{ g}$$

Muốn có 160g $CuSO_4$ khan nước ta cần 250g $CuSO_4.5H_2O$.

Vậy muốn có 100g $CuSO_4$ khan nước thì phải cần một lượng $CuSO_4.5H_2O$ là:

$$\frac{250 \text{ x } 100}{160} = 156gam$$

Lượng nước cần đổ thêm: 500g - 156g = 344g

Vậy ta cần 156 g $CuSO_4.5H_2O$ và thêm 344 mL nước để hòa tan, ta được 500g dung dịch $CuSO_4$ 20%.

b. Nồng độ phần trăm khối lượng theo thể tích

Ta hòa tan lượng chất đã cân trong nước và thêm nước tới thể thể tích đúng.

Ví dụ: Cần chuẩn bị 1 L dung dịch NaCl 30% thì ta cần một lượng NaCl là:

$$\frac{30 \text{ x } 1000}{100} = 300gam$$

Để hòa tan trong nước và thêm nước cho đủ thể tích 1 L.

* Trường hợp các hóa chất có ngậm nước: Khi cần ta phải tính thêm cả lượng nước trong phân tử như trường hợp trên.

* Trường hợp chất hòa tan là dung dịch: Ta cũng làm tương tự như trên, nghĩa là cân chất tan và dung môi đem trộn lẫn với nhau cho đều là được. Nhưng việc cân

chất lỏng không được thuận lợi cho lắm nên cần phải đưa chất lỏng về đơn vị thể tích cho tiện theo công thức:

$$V = \frac{P}{d}$$

V: Thể tích chất lỏng
P: Trọng lượng chất lỏng
d: Tỷ trọng chất lỏng

Mặt khác, đối với chất lỏng thường dùng có giới hạn hòa tan tối đa tính theo %. Ví dụ: H_2SO_4 hòa tan tối đa 96%, HCl là 37%, H_3PO_4 là 65%...

Cho nên khi cân các chất lỏng này phải tính cả số gam có thực trong dung dịch để pha cho chính xác.

Nếu ta xem HCl là 100% thì khi pha dung dịch 10% ta chỉ cân 10g HCl và thêm vào 90 mL, trộn đều là được. Nhưng thực ra HCl chỉ có 37% nên trọng lượng cần phải là:

$$x = \frac{100 \text{ x } 10}{37} = 27{,}02g$$

Hay

$$\frac{27{,}02}{1{,}19} = 22{,}7ml$$

Và ta thêm lượng nước:

100g - 27,02g = 72,98g (hay 72,98 mL)

c. Nồng độ phân tử gam

Mol hoặc phân tử gam là khối lượng của các chất tính ra gam bằng khối lượng phân tử của nó. Dung dịch phân tử gam là dung dịch chứa 1 phân tử gam chất hòa tan trong 1 L.

Để chuẩn bị dung dịch 1M của chất nào đó, người ta tính khối lượng phân tử (được gọi là tổng khối lượng các nguyên tố có trong chất) hoặc tìm trị số của nó trong bảng tra cứu.

Lấy lượng cân chính xác đem hòa tan trong dung môi cho thành 1 L dung dịch (dùng bình định mức).

Khi phải đun nóng dung dịch, hay khi phản ứng tỏa nhiệt hay thu nhiệt, phải để cho về nhiệt độ bình thường ($20^{O}C$) rồi mới thêm tới vạch. Cũng tương tự như thế, người ta pha các dung dịch 2-3 M... hay 0,1; 0,01M... bằng cách tính lượng tương ứng để hòa tan.

Ví dụ: Cần 0,5 L dung dịch $K_2C_2O_7$ 0,1M

$K_2C_2O_7$ = 294,2 g

Để chuẩn bị 1 L dung dịch $K_2C_2O_7$ 0,1M cần lấy 0,1 phân tử gam nghĩa là 29,42g $K_2C_2O_7$.

Để chuẩn bị 0,5 L ta chỉ cần 29,42g x 0,5 = 14,71g pha trong bình định mức 500 mL.

+ Trong trường hợp chất rắn có ngậm nước, phân tử gam chất đó phải tính cả khối lượng các phân tử nước trong chất đó.

+ Đối với chất tan là dung dịch tinh khiết (100%) ta cũng tiến hành cân và pha như đối với chất rắn không ngậm nước.

+ Đối với chất tan là chất lỏng có phần trăm thấp (chưa được 100%) ta phải chú ý tới nồng độ phần trăm tối đa của chúng để tính toán cho đúng.

Thí dụ: Pha HCl 1M từ HCl 37% (M_{HCl} = 36,5) ta phải cân:

$$\frac{365x100}{37} = 98,65 gamHCl$$

Hay $$\frac{98,65}{1,19} = 82,9 \approx 83 mlHCl$$

Vậy ta phải lấy 83 mL HCl 37% để pha thành 1 L là được dung dịch HCl có nồng độ 1M.

d. Nồng độ đương lượng gam (N)

Dung dịch nguyên chuẩn 1N chứa 1 đương lượng gam chất tan trong 1 L. Đương lượng gam sẽ được định nghĩa theo mỗi trường hợp riêng từ phương trình phản ứng dùng trong lúc định phân.

+ Trong sự định phân acid hay base:

Đương lượng gam của acid là khối lượng chất đó có thể cho ra trong phản ứng 1 ion gam H^+.

Đương lượng gam của một base là khối lượng chất đó có thể cho ra trong phản ứng 1 ion gam OH^-

Ví dụ:

a. $H^+ + Cl^- + Na^+ + OH^- \rightarrow Na^+ + Cl^- + H_2O$

1 phân tử gam HCl cho ra 1 ion gam H^+

Vậy đương lượng gam HCl = 1 phân tử gam HCl

b. $2H^+ + SO_4^{2-} + 2Na^+ + 2OH^- \rightarrow 2Na^+ + SO_4^{2-} + 2H_2O$

1 phân tử gam H_2SO_4 cho ra 2 ion gam H^+

Vậy đương lượng gam H_2SO_4 = 1/2 phân tử gam H_2SO_4

c. Một phân tử gam NaOH cho ra 1 ion gam OH^-

Vậy 1 đương lượng gam NaOH = 1 phân tử gam NaOH.

- Một dung dịch nguyên chuẩn HCl chứa 36,5g HCl trong 1 L
- Một dung dịch nguyên chuẩn H_2SO_4 chứa 98g/2 = 49 gam H_2SO_4 trong 1 lít.

Con số 1 hay 2 được dùng để chia phân tử gam trong những thí dụ trên được gọi là hệ số nguyên chuẩn độ.

Trong trường hợp tổng quát số đó được gọi là γ và M/γ được gọi là đương lượng gam phản ứng.

+ Trong trường hợp phản ứng oxy hóa khử:

Muốn tìm đương lượng của 1 chất trong hệ thống oxy hóa khử, người ta đem chia phân tử gam cho số điện tử trao đổi trong phản ứng mà chất đó tham gia.

Thí dụ:

$2Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2NaI$

$I_2 + 2e \rightarrow 2I^-$

$2S_2O_3^{2-} - 2e^- \rightarrow 2S_4O_6^{2-}$

Số điện tử trao đổi ở phản ứng này là 1. Do đó N=M/1

Cách pha: việc pha dung dịch nồng độ đương lượng gam (N) cũng tương tự như pha nồng độ phản ứng gam (M) nhưng thay đổi phân tử gam (M) bằng đương lượng gam (N).

1.3.2.3. Cách xác định lại nồng độ dung dịch

a. Dung dịch chuẩn

Trong quá trình pha hóa chất, có nhiều yếu tố làm sai nồng độ như:

+ Việc cân đo không chính xác.

+ Các chất chưa tinh khiết hay hút nước.

+ Để lâu bị thăng hoa hay oxy hóa.

Do người ta phải kiểm tra nồng độ thực của các dung pha dựa vào các chất ổn định hay nồng độ chính xác được gọi coi là dung dịch chuẩn.

Các chất dùng trong dung dịch chuẩn phải bền vững để nồng độ chất phản ứng này không thay đổi nhanh chóng với thời gian. Thông thường các thuốc thử chuẩn là một lượng cân chính xác thuốc thử hoặc dung dịch thuốc thử đúng kín trên ống thủy tinh, trên có ghi 0,1 hay 0,01 đương lượng gam của chất đong trong ống.

Khi chuyển hết lượng chất có trong ống thủy tinh vào bình định mức dung tích 1 L rồi pha bằng nước cất tới vạch mức, ta được dung dịch chính xác 0,1 hay 0,01 M.

Trong vài trường hợp, dung dịch chuẩn có thể được làm trực tiếp bằng cách cân chất rắn và pha loãng dung dịch tới 1 thể tích đúng. Điều này có thể áp dụng với 1 vài hợp chất bền vững có thành phần không thay đổi như NaCl, $AgNO_3$, acid oxalic... Các chất này được gọi là các chất gốc. Tuy nhiên, đối với những chất khác như NaOH, HCl và $Na_2S_2O_3$ cách này không thực dụng vì các chất này không có hiệu lực về độ tinh khiết và dạng cố định để được cân trực tiếp. Ví dụ: NaOH thường bị nhiễm với 1 lượng Na_2CO_3 thay đổi và rất dễ bị chảy nước, HCl bốc hơi ở nhiệt độ phòng thí nghiệm và $Na_2S_2O_3.5H_2O$ rã thành bột nó sẽ bị mất nước của tinh thể khi để ngoài không khí và vì vậy có thành phần không cố định. trong những trường hợp này, điều cần thiết là pha 1 dung dịch gần đúng nồng độ mong muốn và sau đó định nồng độ chính xác của nó với 1 dung dịch chuẩn.

b. Cách xác định nồng độ

Trở lại ví dụ phản ứng một acid và một base, phản ứng có thể tóm tắt:

$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$

1 hóa trị gam acid phản ứng với 1 hóa trị gam base

1 L dung dịch nguyên chuẩn acid sẽ phản ứng trên 1 L dung dịch nguyên chuẩn base, hai dung dịch nguyên chuẩn sẽ trung hoà với nhau cùng 1 thể tích.

Một cách tổng quát, 2 dung dịch phản ứng với cùng 1 thể tích sẽ có cùng 1 chuẩn độ. Khi 1 thể tích V_1 của dung dịch có chuẩn độ C_1 (C_1, N) tác dụng lên 1 thể tích V_2 của dung dịch có chuẩn độ C_2 (C_2, N) chúng ta có thể viết rằng số hóa trị gam tác dụng lẫn nhau đều bằng nhau trong 2 trường hợp : $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

Ta sẽ dùng hệ thức này để hiệu chỉnh lại nồng độ 1 số dung dịch chính xác.

Thí dụ: Ta có một dung dịch chuẩn H_2SO_4 0,1N chính xác. Một dung dịch NaOH ta pha lấy có nồng độ định pha là 0,1N. Đem chuẩn độ ta thấy 10 mL H_2SO_4 0,1N tác dụng với 11 mL NaOH ta pha. Vậy nồng độ của dung dịch NaOH ta pha là:

$$C_1 = \frac{V_2 x C_2}{V_1} = \frac{10x0,1}{11} = 0,091N$$

Hệ số (10/11 = 0,91) được gọi là hệ số hiệu chỉnh.

Ta cũng có thể áp dụng công thức trên để thay đổi nồng độ của dung dịch từ đậm đặc sang pha loãng hơn.

Ví dụ:

a. Pha 250mL dung dịch HCl N/5 từ dung dịch HCl 1N

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

=> $N \times V_1 = N/5 \times 250$

=> $V_1 = 50$ mL

Vậy lấy 50 mL dung dịch HCl và thêm nước cho đủ 250 mL ta được dung dịch HCl N/5.

b. Pha 50 mL ethanol 70% từ ethanol 95%

$50 \times 70 = V_2 \times 95$

=> $V_2 = 36,9$ mL

Vì vậy thêm 13,1 mL nước vào 36,9 mL etanol 96% ta sẽ được 50 mL ethanol 70%.

c. Được thể tích bao nhiêu khi làm loãng 25 mL HCl 0,08N sang HCl 0,05N

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$0,08 \times 25 = 0,05 \times V_2$

⇨ $V_2 = 40$ mL

1.3.2.4. Cách pha và định chuẩn một số dung dịch thường dùng

Với điều kiện phòng thực tập sinh hóa hiện nay, chúng ta có thể pha 2 dung dịch chuẩn gốc sau đây:

a. Dung dịch acid oxalic $(COOH)_2$ N(γ=2). Cân thật chính xác M/2 lượng $(COOH)_2$ để hòa tan với nước cất thành 1 L, ta được dung dịch chuẩn acid oxalic 1N bảo quản trong chai thủy tinh nút mài và để trong chỗ không ánh sáng.

b. Dung dịch KIO_3 N/10 (γ=6). Cân thật chính xác M/6x10 lượng KIO_3 hòa tan với nước cất thành 1 lít, ta được dung dịch chuẩn KIO_3 N/10.

Hai dung dịch trên dùng để chuẩn độ lại các dung dịch chúng ta pha sau:

+ Dung dịch NaOH 1N.

Cân 40g NaOH hòa tan thành 1 lít dung dịch với nước cất.

Định lại chuẩn độ NaOH này với dung dịch $(COOH)_2$ N đã pha trên: lấy 10mL dung dịch NaOH mới pha chuẩn độ với dung dịch $(COOH)_2$ N trên với sự hiện diện của thuốc thử màu phenolphtalein. Nếu dung dịch NaOH này có nồng độ >1N hay <1N ta phải tính thêm lượng nước hay NaOH thêm vào để được một nồng độ đúng 1N dùng để định chuẩn các acid sau.

+ Acid nguyên chuẩn N.

Muốn pha các dung dịch nguyên chuẩn từ acid đậm đặc. Nếu chưa biết độ hòa tan tối đa và tỷ trọng các acid đậm đặc ta xác định độ nguyên chuẩn của nó bằng cách lấy 1 mL dung dịch chuẩn độ với NaOH N đã biết.

Ví dụ: acid đó là 30N ta phải pha loãng 30 lần ít hơn để được acid 1N. Sau đó hiệu chỉnh lại cho đúng nồng độ 1N với NaOH 1N hay Na_2CO_3 1N.

Dung dịch HCl N(HCl đậm đặc 12M =12N, γ=1). Hòa 1000/12 = 85 mL HCl đậm đặc trong nước cất cho vừa đủ 1 lít. Xác định lại chuẩn độ đúng với NaOH N trên (dùng thuốc thử màu phenolphtalein).

Từ dung dịch chuẩn HCl 1N, ta áp dụng hệ thức $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ để pha loãng thành các dung dịch HCl N/2, N/5, N/10, N/20.

Dung dịch H_2SO_4 1N (H_2SO_4 đậm đặc 18M = 36N, γ=2). Hòa 1000/36 = 29 mL H_2SO_4 đậm đặc với nước cất cho đủ 1 L. Để nguội, hiệu chỉnh lại cho đúng nồng độ 1N với dung dịch NaOH 1N trên (dùng thuốc thử màu phenolphtalein).

Dung dịch permanganat kali ($KMnO_4$) N/10 (γ=5). Cân M/5 x 1/10g KMnO4 hòa tan trong nước cất cho đủ 1 lít. Hiệu chỉnh nồng độ theo cách sau: Hút 10 mL dung dịch $(COOH)_2$ N/10 + 10 mL dung dịch H_2SO_4 N/5. Đun nóng khoảng 40^OC - 50^OC nhỏ $KMnO_4$ vừa pha đến màu hồng nhạt.

Dung dịch $Na_2S_2O_3$ N/10 (γ=1). Cân M/1 x 1/10g $Na_2S_2O_3$ hòa tan thành 1lít với nước cất. Định lại nồng độ với dung dịch KIO_3 N/10 pha ở trên theo cách sau: hút 10 mL dung dịch KIO_3 N/10 thêm vào một ít tinh thể KI+2 mL HCl đậm đặc. Định chuẩn với dung dịch $Na_2S_2O_3$ vừa pha đến khi hết màu nâu của iod sinh ra (thử với hồ tinh bột).

Dung dịch iod I_2 N/10 (γ=1). Cân M/1 x 1/10g + 25,5g KI pha thành 1 lít với nước cất, định phân lại nồng độ với dung dịch $Na_2S_2O_3$ N/10 vừa hiệu chỉnh.

CHƯƠNG 2. KHẢO SÁT CARBOHYDRATE (GLUCID)

2.1 KHÁI QUÁT VỀ CARBOHYDRATE

Các hợp chất carbohydrate gồm 3 loại:

- Monosaccharide: là đơn vị cấu tạo của carbohydrate, không bị thủy phân.

Ví dụ: Glucose và fructose.

- Oligosaccharide: có từ 2 đến 10 monose gồm: di, tri hay tetrasaccharide

Ví dụ: Saccharose (đường mía), lactose (đường sữa), maltose (đường mạch nha).

- Polysaccharide: gồm 2 loại:

+ Polysaccharide thuần: gồm những monomer cùng loại.

Ví dụ: tinh bột, cellulose và glycogen.

+ Polysaccharide tạp: Gồm những monomer khác loại hay dẫn suất của monomer hoặc có thêm chất béo.

Ví dụ: Heparin, acid hyallycoric.

Tính chất

- Monosaccharide: Có tính khử, dễ bị mất nước bởi acid vô cơ mạnh (H_2SO_4, HNO_3 đậm đặc) để cho ra dẫn suất furfural. Chất này dễ kết hợp với các loại phenol (resorcinol, α- naphthol, orcinol...) để cho phản ứng màu.

- Oligosaccharide: Bị thủy phân bằng acid hoặc enzyme thích hợp để cho ra các thành phần cấu tạo tương ứng. Trường hợp disaccharide, tùy cách kết hợp các monomer sẽ có tính khử hay không. Khả năng khử của oligosaccharide yếu hơn monosaccharide.

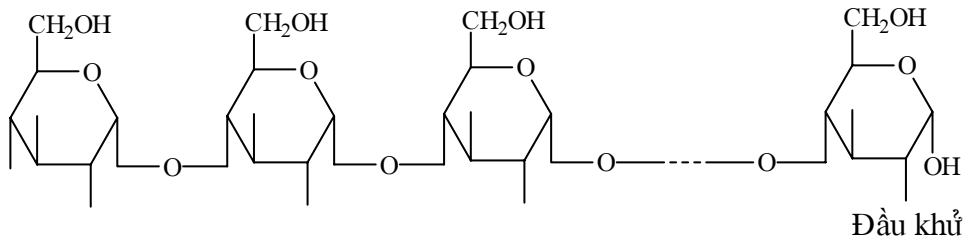
Trong cơ thể sinh vật carbohydrate đóng vai trò lớn, nó là thành phần cấu tạo nên các cơ quan và dịch gian bào. Nó cung cấp phần lớn năng lượng cho tế bào sống.

2.2 ĐỊNH TÍNH MONOSACCHARIDE VÀ TINH BỘT

2.2.1 Khảo sát tinh bột

Tinh bột là chất dự trữ của thực vật, là nguồn thức ăn và nguồn cung cấp năng lượng chính cho người và động vật.

Tinh bột không tan trong nước lạnh. Khi đun nóng với nước thì trương lên và tạo thành hồ (hồ tinh bột), cho màu xanh (đôi khi màu tím đỏ) với iod, không có tính khử. Tinh bột bị thuỷ phân bởi acid đậm đặc (HCl, H_2SO_4).



Cấu tạo một đoạn amylose của tinh bột

Chuẩn bị tinh bột

Khoai lang rửa sạch, mài trên bàn mài đặt trên rây đã để sẵn trong chậu thủy tinh. Mài nhẹ tay cho nhuyễn, xong vắt thật kỹ bã khoai lang với 200 mL nước cất, chuyển nước bột từ chậu thủy tinh vào cốc 250 mL, để yên cho bột lắng. Khi bột đã lắng kỹ, gạn bỏ phần nước ở trên rồi tiếp tục cho nước cất vào khuấy đều, để lắng tiếp tục rồi lại gạn bỏ phần nước trên. Lặp lại vài lần cho đến khi tinh bột trắng và sạch. Khuấy tinh bột với vài mL nước cất rồi cho vào 100 mL nước cất đang sôi thì ta được dung dịch hồ tinh bột.

Lấy dung dịch hồ tinh bột vừa nhận được để làm các thí nghiệm sau.

Tiến hành

a. Cho màu với iod

Tiến hành: Cho vào ống nghiệm 5 mL dung dịch hồ tinh bột, cho tiếp 2 giọt iod. Nhận xét kết quả. Sau đó xem ống nghiệm đun cách thủy khoảng 5 phút - Nhận xét. Để nguội - Quan sát, nhận xét và giải thích.

b. Phản ứng thủy phân

Tiến hành: Dùng ống nghiệm lớn cho vào 15 mL dung dịch hồ tinh bột. Cho tiếp vào 5 mL HCl đậm đặc, khuấy đều. Đun cách thủy, cứ sau 1 phút lấy 1 giọt dung dịch đang thủy phân nhỏ lên 1 giọt iod đã để sẵn trên đĩa kính đồng hồ. Thử như vậy cho đến khi không cho màu với iod. Nhận xét màu thay đổi khi thử dung dịch thủy phân với iod. Kết luận.

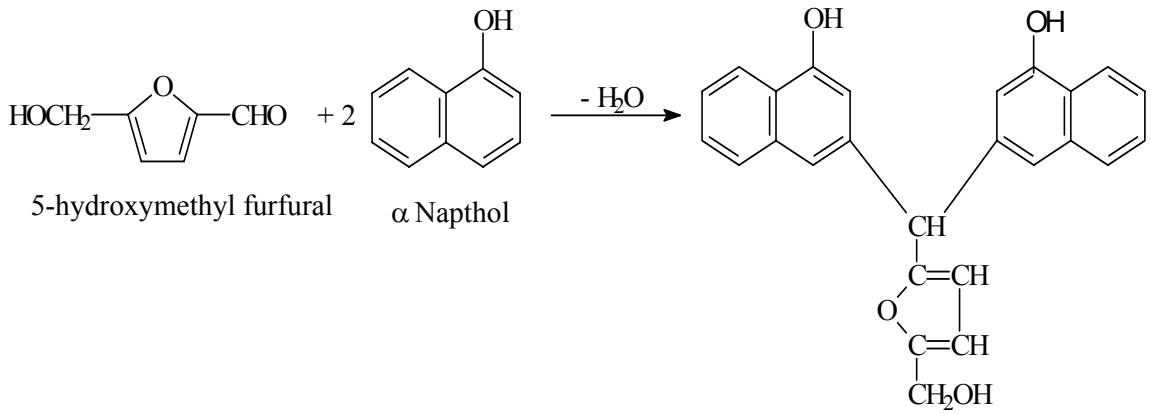
Lưu ý: Giữ dung dịch đã thủy phân để làm các phản ứng sau.

2.2.2 Định tính monosaccharide (glucose) và tinh bột

a. Phản ứng Molish

Nguyên tắc: Các loại carbohydrate đều cho phức màu tím với dung dịch α-naphthol trong acid H_2SO_4 đậm đặc.

α-D-glucose 5-hydroxymethyl furfural



5-hydroxymethyl furfural α Napthol Phức màu tím

Tiến hành

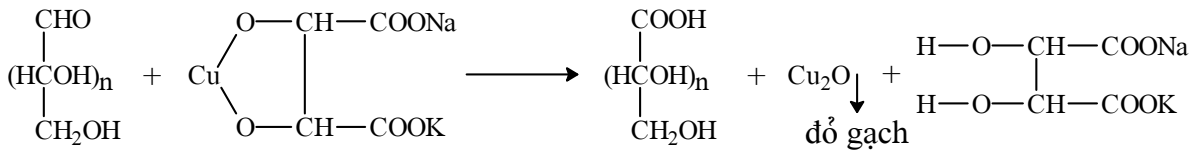
Chuẩn bị các ống nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm / Hoá chất	1 Glucose 1%	2 Hồ tinh bột 1%	3 Hồ tinh bột thủy phân
Dung dịch	2 mL	2 mL	2 mL
Thuốc thử Molish	3 giọt	3 giọt	3 giọt
H_2SO_4 đậm đặc	**Kỹ thuật:** cho từ từ thành dòng chảy liên tục theo thành ống nghiệm, không lắc, đến khi xuất hiện màu tím thì dừng lại, đọc thể tích dung dịch acid đã dùng.		

Nhận xét tốc độ phản ứng của mỗi ống nghiệm. Giải thích và nêu ý nghĩa của phản ứng Molish.

b. Phản ứng với thuốc thử Fehling

Nguyên tắc: Trong môi trường kiềm đun nóng, monosaccharide ở dạng enol-diol không bền, dễ dàng khử các kim loại nặng như Cu^{2+}, Ag^{+}, Hg^{2+}. Monosaccharide sẽ khử đồng II trong dung dịch Fehling thành đồng I có kết tủa đỏ gạch. Các disaccharide có nhóm -OH glycoside tự do đều có tính khử:



Tiến hành

Ống nghiệm / Hoá chất	1	2	3
Glucose 1%	2 mL	0	0
Tinh bột thuỷ phân (phải trung hoà)	0	2 mL	0
Tinh bột khoai lang	0	0	2mL
Fehling (A+B tỉ lệ 1:1)	3 mL	3 mL	3 mL

Đun cách thủy 3 ống nghiệm trong khoảng từ 3- 5 phút. Quan sát hiện tượng xảy ra ở 3 ống nghiệm, giải thích và viết phương trình phản ứng.

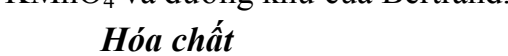
2.3 ĐỊNH LƯỢNG ĐƯỜNG KHỬ

Các phương pháp hóa học xác định đường khử đều dựa trên khả năng khử các hợp chất khác nhau của chúng. Trong thực tế có rất nhiều phương pháp để xác định, tùy thuộc vào hàm lượng nhiều hay ít người ta có thể sử dụng một trong các phương pháp thông dụng sau đây:

2.3.1 Định lượng đường khử theo phương pháp Bertrand

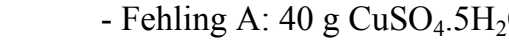
Nguyên tắc

Trong môi trường kiềm các đường khử (glucose, fructose, maltose...) dễ dàng khử đồng II thành đồng I theo phản ứng Fehling. Kết tủa đồng I oxyt có màu đỏ gạch, có khả năng khử với muối Fe^{3+} thành muối Fe^{2+} trong môi trường acid:



$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 + H_2SO_4 \rightarrow 2CuSO_4 + 2FeSO_4 + H_2O$$

Fe^{2+} sinh ra có tính khử lại tác dụng với $KMnO_4$ là chất oxy hóa nên dùng $KMnO_4$ để chuẩn độ Fe^{2+} trong môi trường acid:



$$10FeSO_4 + 2KMnO_4 + 8H_2SO_4 \rightarrow K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 5Fe_2(SO_4)_3 + 8\,H_2O$$

Dựa vào lượng $KMnO_4$ sử dụng ta có thể tính được lượng Cu_2O và từ đó tính được lượng đường khử trong dung dịch bằng cách tra bảng tỉ lệ giữa dung dịch $KMnO_4$ và đường khử của Bertrand.

Hóa chất

- Thuốc thử Fehling = Fehling A+Fehling B tỉ lệ 1:1
- Fehling A: 40 g $CuSO_4.5H_2O$ trong 1 lít nước cất
- Fehling B: 20g natri kali tartrate ($C_4H_4O_6NaK.4H_2O$) và 150g NaOH trong 1 lít nước cất.
- Dung dịch $Fe_2(SO_4)_3$ trong H_2SO_4: 50g $Fe_2(SO_4)_3$ và 20g H_2SO_4 thêm nước đến 1 lít.
- Dung dịch $KMnO_4$ 1/30N.
- Dung dịch acetate chì 30%
- Dung dịch Na_2SO_4 bão hoà

Tiến hành

Chuẩn bị nguyên liệu

Cân và cho vào cối sứ 5-10 gram nguyên liệu tươi, nghiền nhỏ, thêm khoảng 50ml nước cất vào bình tam giác 250 ml. Đem đun cách thủy ở 80^oC trong 15 phút, thỉnh thoảng lắc đều trong khi đun để chiết tách đường. Sau đó lấy ra, để nguội đến nhiệt độ phòng.

Tiến hành khử tạp chất bằng cách:

+ Thêm 7 mL dung dịch acetate chì 30% vào dịch chiết đường cho vào bình định mức 100mL, lắc đều và để lắng 5 phút. Nếu thấy xuất hiện một lớp chất lỏng trong suốt ở bên trên lớp cặn thì việc khử tạp chất đã xong.

+Cho tiếp 20 mL dung dịch Na_2SO_4 bão hoà vào để loại chì thừa. Lắc đều và để tủa lắng xuống.

+Thêm nước cất vừa đủ đến vạch 100 mL, lắc đều và lọc qua giấy lọc khô. Dịch lọc dùng để tiến hành định lượng.

Tiến hành định lượng

Cho 10 mL dung dịch đường cần khảo sát và 10mL thuốc thử Fehling vào bình tam giác 250 mL. Đậy bình bằng nút thủy tinh và đun trên bếp có lưới amiăng. Đun sôi khoảng 3 phút, kết tủa đỏ xuất hiện trong bình. Lấy bình ra để nguội.

Rửa kết tủa vài lần với nước ấm đã đun sôi cho đến khi dịch rửa không còn phản ứng kiềm trên giấy quỳ. Quá trình rửa được tiến hành trên phễu lọc chân không với giấy lọc xốp G4 và chú ý là phần lớn kết tủa trên phễu lọc và trong bình luôn được phủ một lớp nước để Cu_2O không bị oxy hóa bởi oxy không khí.

Hòa tan kết tủa Cu_2O vào bình tam giác bằng cách cho từ từ khoảng 5mL dung dịch $Fe_2(SO_4)_3$ trong H_2SO_4 và dùng đũa thủy tinh khuấy thật cẩn thận để hòa tan hoàn tòan kết tủa trên phễu. Tráng cẩn thận bình và phễu lọc 3-4 lần bằng nước nóng cho vào bình tam giác 100mL.

Chuẩn độ dung dịch thu được bằng $KMnO_4$ 1/30N cho đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 20-30 giây.

Từ lượng $KMnO_4$ 1/30N dùng để chuẩn độ, tra bảng 2.1 để suy ra lượng đường có trong mẫu phân tích. Song song làm thí nghiệm đối chứng bằng cách thay dung dịch đường bằng nước cất.

Tính kết quả

Hàm lượng đường khử tính theo công thức:

$$X = \frac{a \times V \times 100}{V_1 \times m \times 1000}$$

trong đó :

X: hàm lượng đường khử tính theo %

a: số mg glucose tìm được khi tra bảng ứng với số mL $KMnO_4$ 0,1N dùng để chuẩn độ mẫu phân tích trừ đi số mL $KMnO_4$ 1/30N dùng để chuẩn độ mẫu không.

V: thể tích pha loãng mẫu (100mL)

V_1: thể tích mẫu lấy đem xác định đường khử

m: lượng mẫu đem phân tích

1000: hệ số đổi gam thành mg

Bảng 2.1. Tỉ lệ giữa $KMnO_4$ 1/30N và lượng đường khử

$KMnO_4$1/30N(mL)	Glucose(mg)	$KMnO_4$1/30N(mL)	Glucose(mg)
0.2	0,0	18	19,2
1	0,8	19	20,3
2	1,8	20	21,5
3	2,8	21	22,7
4	3,9	22	23,8
5	5,0	23	25,3
6	6,1	24	26,2
7	7,2	25	27,4
8	8,3	26	28,6
9	9,3	27	29,9
10	10,4	28	31,2
11	11,5	29	32,5
12	12,6	30	33,8
13	13,7	31	35,1
14	14,8	32	36,3
15	15,9	33	37,6
16	17,0	34	38,9
17	18,1	35	40,2

2.3.2. Định lượng đường khử theo Hagedorn-Jensen (bổ túc bởi Isskuts và Both)

Nguyên tắc: Dựa vào tính khử của monosaccharide, định lượng glucose theo phản ứng oxy hóa - khử. Glucose là chất khử; fericyanua kali là chất oxy hóa. Phản ứng xảy ra trong môi trường kiềm đun nóng.

$$2K_3Fe(CN)_6 + (HC(CHO)(CH_2OH)-OH)_n + 3Na_2CO_3 + H_2O \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons (HC(COONa)(CH_2OH)-OH)_n + 3NaHCO_3 + 2K_3NaFe(CN)_6 \quad (1)$$

Glucose sẽ khử một phần fericyannua kali. Đây là phản ứng thuận nghịch, để phản ứng xảy ra một chiều, ferocyanua kali được làm kết tủa dạng hóa hợp kẽm không tan:

$2K_3NaFe(CN)_6 + 2ZnSO_4 \rightarrow 2K_2ZnFe(CN)_6\downarrow + Na_2SO_4 + K_2SO_4$ (2)

Phần fericyanua kali thừa được định phân gián tiếp qua phương pháp định phân iod bằng thiosulfit natri ($Na_2S_2O_3$)

$K_3Fe(CN)_6 + KI \rightarrow K_4Fe(CN)_6\downarrow + 1/2I_2$ (3)

$2Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2NaI$ (4)

Tiến hành

+ Dùng dung dịch glucose có nồng độ biết trước 2 mg/mL pha thành 5 dung dịch có nồng độ khác nhau từ 0,4 mg/mL đến 2 mg/mL theo bảng sau:

Hoá chất \ Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ dung dịch glucose (mg/mL)	2	1,6	1,2	0,8	0,4	X	0
Thể tích dung dịch glucose 2 mg/mL (mL)	5	4	3	2	1	0	0
Thể tích dung dịch glucose định phân Xmg/mL	0	0	0	0	0	5	0
Thể tích nước cất (mL)	0	1	2	3	4	0	5
Pha loãng bằng nước cất (mL)	15	15	15	15	15	15	15
Fericianua kali $K_3Fe(CN)_6$ 0,02N (mL)	10	10	10	10	10	10	10

Lưu ý: Nên kết hợp cho nước cất một lần để tránh sai số. Ví dụ: ống 1 cho thêm 15mL nước cất, ống 2 cho 16 mL, ống 3 cho 17 mL...

+ Đun cách thủy các ống nghiệm trên 30 phút

+ Đun xong để nguội (có thể làm lạnh) rồi thêm vào mỗi ống 10 mL $ZnSO_4$.KI

+ Quan sát màu ở mỗi ống nghiệm (không được khuấy)

+ Ghi nhận xét, giải thích và kết luận.

Chuẩn bị định phân

+ Rửa sạch buret bằng nước cất, tráng qua bằng $Na_2S_2O_3$ 0,02 N. Cho tiếp $Na_2S_2O_3$ 0,02 N đến vạch 0 rồi bắt đầu định phân.

+ Định phân mẫu đối chứng trước (ống 7), chuyển dung dịch trong ống qua cốc 250 mL. Cho vào ống nghiệm đó 10 mL CH_3COOH 9% tráng ống nghiệm rồi đổ chung vào cốc 250 mL.

Quan sát hiện tượng, giải thích, viết phương trình phản ứng xảy ra.

+ Cách định phân: cho $Na_2S_2O_3$ 0,02N ở buret xuống cốc từ từ và lắc nhẹ cốc cho đến khi dung dịch chuyển thành màu vàng rơm rất lợt. Thêm vào đó 1-2 giọt hồ tinh bột, dung dịch trong cốc chuyển sang màu xanh, cho tiếp $Na_2S_2O_3$ 0,02N từ từ từng giọt một cho đến khi màu xanh đột ngột biến mất và trở thành màu trắng sữa đục là được. Ghi nhận thể tích $Na_2S_2O_3$ 0,02N trên buret.

+ Tiếp tục định phân từ ống nghiệm 1 đến ống nghiệm 6, tương tự như trên.

Lưu ý: - Khi định phân cho dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,02N chảy từ từ và lắc đều.

- Theo dõi dung dịch trong cốc định phân đến màu vàng rơm rất lợt, nếu không sẽ bị sai số nhiều.

+ Kết quả định phân lập bảng:

Ống nghiệm	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Nồng độ dd glucose (mg/mL)	2	1,6	1,2	0,8	0,4	X	0
Thể tích dd $Na_2S_2O_3$ 0,02N	V_1=	V_2=	V_3=	V_4=	V_5=	V_6=	V_0=
$\Delta V=V_0-V_i$ (mL)	ΔV_1=	ΔV_2=	ΔV_3=	ΔV_4=	ΔV_5=	ΔV_6=	0

Vẽ đường biểu diễn $\Delta V = f(C)$ mg/mL

Đường biển diễn có dạng y = ax.

+ Dựa vào đồ thị, suy ra nồng độ glucose định phân (tức nồng độ dung dịch trong ống 6)

2.4. PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐƯỜNG TỔNG SỐ

Sự định phân này căn bản dựa trên phản ứng màu đặc trưng cho đường và nhiều chất hữu cơ với sự hiện diện của acid sulfuric (H_2SO_4). Sự chính xác của kết quả này tùy thuộc vào:

+ Độ sạch các dụng cụ.

+ Độ tinh khiết của thuốc thử, nhất là H_2SO_4

+ Nhiệt độ phải cố định trong thời gian đun

Hóa chất

- Alcol 90°, 80°
- Phenol 5%
- H_2SO_4 đậm đặc
- Saccharose 0,1%

Tiến hành

Cách trích đường

Lấy 1-2 gam nguyên liệu tươi đã nghiền nhỏ chứa khoảng 5-50 mg đường (cân bằng cân phân tích) cho vào cốc thủy tinh 50ml và thêm 10 ml alcol 90° vào (nếu dùng nguyên liệu khô thì cần lấy ít mẫu hơn). Sau đó để cốc đun trên nồi cách thủy cho sôi 3 lần. Khuấy đều bằng đũa thủy tinh, sau khi để nguội lọc không tro (khi lọc chỉ nên gạn lấy phần alcol) đừng để cặn đổ trên lọc.

Sau đó lại cho 10ml alcol 80° vào cốc đựng bã, khuấy đều đun 2 lần tới sôi trong nồi cách thủy. Để nguội lại lọc tiếp. Chiết rút như vậy khoảng 3 lần, xong đưa bã lên lọc và rửa sạch 2-3 lần bằng alcol 80° nóng (rửa từng ít một), alcol qua lọc được bay hơi ở trong phòng hoặc nồi cách thủy. Đun nhẹ sau khi cho bay hơi alcol, mẫu có thể để lâu trong bình hút ẩm.

Cặn khô trong cốc được pha loãng thành 50ml với nước cất (dùng bình định mức). Nếu có cặn thì để lắng xuống. Khi đem làm hiện màu, dung dịch này có thể pha loãng thêm 5-10 lần tùy theo nồng độ đường nhiều hay ít.

Sau đó có thể tạo phản ứng màu của dung dịch đường theo phương pháp sau:

Dùng Phenol

Hút 1ml dung dịch đường có khoảng 10-70µg đường cho vào ống nghiệm rồi cho thêm 1ml dung dịch phenol 5%. Sau đó, cho vào ống nghiệm 5ml H_2SO_4 đậm đặc. Tuyệt đối không để vây acid vào thành ống nghiệm. Để nguội 10 phút rồi lắc và giữ trên nồi cách thủy 20 phút ở 30^OC để xuất hiện màu. Màu bền vững trong vài giờ, đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 490nm.

Xây dựng đồ thị chuẩn

Pha dung dịch saccharose gốc nồng độ 100 µg/mL.

Từ dung dịch gốc, pha dãy dung dịch có nồng độ từ 0- 70µg/mL. Thêm các hoá chất vào 8 ống nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Nồng độ dung dịch saccharose (µg/mL)	0	10	20	30	40	50	60	70
Thể tích dung dịch saccharose gốc (µL)	0	100	200	300	400	500	600	700
Thể tích nước cất (µL)	1000	900	800	700	600	500	400	300
Thể tích dung dịch phenol 5% (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
H_2SO_4 đậm đặc (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5

Để nguội các ống nghiệm 10 phút, lắc đều. Đem đun cách thủy 20 phút ở 30^OC để xuất hiện màu. Màu bền vững trong vài giờ, đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 490nm.

Vẽ đồ thị tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ saccharose rồi tính hàm lượng đường tổng số có trong mẫu theo công thức sau:

Hàm lượng đường tổng số % = X x V x 100/m

X: nồng độ saccharose được suy ra từ đồ thị chuẩn (µg/mL)

V: thể tích pha loãng sau khi ly trích mẫu.

m: khối lượng mẫu đem phân tích.

Độ chính xác của phương pháp này là ± 2%

2.5. ĐỊNH LƯỢNG ĐƯỜNG SACCHAROSE

Đường saccharose cùng với một số đường khử có nhiều trong các loại trái cây, rau, củ... Saccharose không có tính khử nên không thể xác định trực tiếp bằng các phương pháp Bertrand. Để có thể xác định được saccharose bằng phương pháp này phải thủy phân nó thành các đường khử glucose và fructose.

Nguyên tắc: Khi thủy phân dung dịch saccharose bằng acid ta thu được hỗn hợp đường glucose và fructose. Định lượng đường khử tạo thành cho phép tính được lượng sucrose có trong mẫu phân tích.

$$\underset{\text{saccharose}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + H_2O \xrightarrow{H^+} \underset{\text{glucose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{fructose}}{C_6H_{12}O_6}$$

Hóa chất

- Dung dịch HCl 5%
- Dung dịch Na_2CO_3 bão hòa
- Methyl đỏ 0,02% (0,02 g methyl đỏ trong 60mL cồn và 40mL nước cất)
- Các hóa chất để xác định đường khử theo phương pháp Bertrand

Tiến hành

Lấy 10 mL dung dịch mẫu phân tích (đã loại bỏ protein và tạp chất như phần chuẩn bị đường khử mục **2.3.1** cho vào bình tam giác 250mL.

Cho thêm 5mL HCl 5%. Đun cách thủy qua ống sinh hàn trong 30-40 phút, làm nguội nhanh.

Trung hòa hỗn hợp bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa đến pH 6,5-7,0 có chỉ thị methyl đỏ (3 giọt). Thêm từng giọt kiềm vào cho đến khi dung dịch chuyển từ đỏ sang vàng.

Đem hỗn hợp định lượng đường theo phương pháp Bertrand.

Tính kết quả

Hàm lượng saccharose trong mẫu thí nghiệm được tính theo công thức sau:

$$X = (a-b) \times 0,95$$

trong đó:

X- hàm lượng saccharose tính theo %

a- hàm lượng đường khử theo glucose của dịch đường sau khi thủy phân bằng acid (%)

b- hàm lượng đường khử của dịch đường trước khi thủy phân (%)

0,95- hệ số chuyển đổi từ glucose sang saccharose

2.6. ĐỊNH LƯỢNG TINH BỘT VÀ CELLULOSE

2.6.1. Định lượng tinh bột

Nguyên tắc

Dựa trên sự thủy phân hoàn toàn tinh bột bằng acid thành glucose. Sau đó dùng một trong các phương pháp định luợng glucose tạo thành rồi nhân với hệ số 0,9 để xác định được hàm lượng tinh bột.

$$\underset{162,1}{(C_6H_{10}O_5)n} + n\,H_2O \rightarrow \underset{180,12}{n\,C_6H_{12}O_6}$$

$$F = \frac{162,1}{180,12} = 0,9$$

Tiến hành

Cân chính xác 1-2 gam bột (chứa khoảng 200-250 mg tinh bột) đã nghiền nhỏ và sấy khô trước khi cân, cho vào bình tam giác dung tích 100mL, thêm vào đó 50 mL nước cất, lắc đều để yên 30-45 phút.

Lọc qua giấy lọc, rửa cặn bằng nước cất 2-3 lần. Chọc thủng giấy lọc và chuyển bột vào bình tam giác có chứa 25mL HCl 5%. Đem đun cách thủy qua ống sinh hàn trong 3-5 giờ.

Sau khi tinh bột đã thủy phân hoàn toàn, làm lạnh dung dịch. Trung hòa hỗn hợp bằng dung dịch NaOH 0,5 % đến pH 5,6-6,0 (có thể thử bằng giấy quỳ).

Chuyển hỗn hợp vào bình định mức 100mL. Khử tạp bằng $Pb(CH_3COO)_2$ 30% và loại lượng muối chì thừa bằng 20mL dung dịch Na_2SO_4 bão hòa. Thêm nước cất đến vạch, lắc đều và lọc.

Định lượng đường glucose trong dung dịch bằng phương pháp Bertrand, từ đó tính được hàm lượng tinh bột.

Tính kết quả

Hàm lượng tinh bột trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{a \times V \times 100 \times 0,9}{V_1 \times m}$$

trong đó:

X- hàm lượng tinh bột tính bằng %

a- số mg glucose tìm được khi tra bảng ứng với số mL $KMnO_4$ dùng để chuẩn độ mẫu phân tích trừ đi số mL $KMnO_4$ dùng để chuẩn độ mẫu không.

V_1: thể tích mẫu lấy đem xác định đường khử

V : thể tích pha loãng mẫu (100mL)

m: lượng mẫu đem phân tích

0,9: hệ số đổi glucose thành tinh bột

Chú ý : phương pháp dựa trên cơ sở thủy phân tinh bột bằng acid sẽ không cho kết quả chính xác nếu trong mẫu có chứa hemicellulose, pectin và một số polysaccharide có trọng lượng phân tử thấp. Do đó khi dùng phương pháp thủy phân bằng acid, trước tiên cần phải tách tinh bột ra khỏi nguyên liệu thực vật, sau đó mới tiến hành thủy phân và xác định hàm lượng glucose.

2.6.2. Định lượng cellulose

Nguyên tắc: Định lượng cellulose dựa trên tính chất bền của cellulose đối với tác dụng của acid mạnh và kiềm mạnh, không bị phân hủy dưới tác dụng của acid yếu. Các chất khác thường đi kèm theo cellulose như hemicellulose, lignin, tinh bột ...ít bền hơn đối với tác dụng của acid và kiềm nên bị oxy hóa và phân giải sau đó tan vào dung dịch sau khi xử lý nguyên liệu.

Hóa chất

- Dung dịch NaOH 0,5%
- Dung dịch NaCl 0,5%,
- Dung dịch HCl 10%
- Dung dịch nước javen (natri hypochlorite)

Tiến hành

Cân chính xác 1-2 gam mẫu cho vào bình tam giác 200mL dung dịch NaOH 0,5%, lắp vào ống sinh hàn đun hoàn lưu trong 30 phút kể từ lúc sôi. Chú ý đừng để bọt trào lên.

Lọc qua giấy lọc đã biết trọng lượng hoặc ly tâm. Rửa cặn còn lại với dung dịch NaOH 0,5% nóng. Tiếp tục cho cặn tác dụng với 10mL HCl 10%. Thêm vào đó 10mL dung dịch natri hypochlorite từng giọt một, vừa cho vừa khuấy đều. Để yên trong 5 phút rồi lọc qua giấy lọc đã biết trọng lượng hoặc ly tâm. Cho cặn lại tiếp tục tác dụng trở lại với NaOH 0,5% ở nhiệt độ 40°C. Để yên vài phút và ly tâm. Làm như thế 1-2 lần nữa để có cellulose thật trắng. Sau cùng rửa sạch thật kỹ bằng nước sôi. Sấy khô và cân.

Tính kết quả

Hàm lượng cellulose được tính theo công thức sau:

$$X\% = \frac{ax100}{m}$$ Trong đó:

a: trọng lượng cellulose (g)

m: trọng lượng mẫu thí nghiệm (g)

2.7. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AMYLOSE

Nguyên tắc: Amylose và amylopectin là 2 polysaccharide chiếm 96,1-97% trong thành phần của tinh bột. Tỉ lệ hai polysaccharide sẽ quyết định đến khả năng dẻo của tinh bột. Hiện nay, phương pháp phổ biến để định lượng amylose và amylopectin dựa trên sự tạo phức màu xanh của amylose với iod trong môi trường acid. Sau đó, đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 620nm. Từ hàm lượng amylose sẽ suy ra được hàm lượng amylopectin.

Hóa chất

- Amylose tinh khiết
- Dung dịch trichloro acetic acid (TCA) 0,6%
- Dung dịch NaOH 1N
- Methanol
- Dung dịch Iod 0,01N

Tiến hành

****Xây dựng đường chuẩn với các nồng độ amylose khác nhau***

+ Pha dung dịch amylose gốc nồng độ 2mg/mL trong dung dịch NaOH 1N. Từ dung dịch gốc, pha dãy dung dịch có nồng độ từ 0- 2mg/mL. Thêm các hoá chất vào 7 ống nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ dung dịch amylose (mg/mL)	0	0.4	0.8	1	1.4	1.8	2
Thể tích dung dịch amylose gốc (µL)	0	20	40	50	70	90	100
Thể tích nước cất (µL)	100	80	60	50	30	10	0
Thể tích dung dịch TCA 0,6% (mL)	5	5	5	5	5	5	5
Thể tích dung dịch Iod 0,01N (µL)	50	50	50	50	50	50	50

+ Lắc đều các ống nghiệm, để yên 20 phút rồi đo ở bước sóng 620nm. Vẽ đồ thị tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ amylose.

**** Chuẩn bị mẫu phân tích***

Xác định ẩm độ của mẫu gạo bằng máy đo độ ẩm. Cân chính xác 15mg mẫu gạo. Thêm 5mL dung môi methanol để ly trích béo. Đun cách thủy 60^0C trong 30 phút. Ly tâm ở 6000 vòng trong 15 phút, lấy phần cặn lắng. Lặp lại bước ly trích béo một lần nữa. Phần cặn lắng thêm 2ml NaOH 1N và 4mL nước. Đun cách thủy ở 95^0C trong 30 phút.

*** Tiến hành đo mẫu**

Dùng micropipet hút 100 µl dung dịch mẫu vừa chuẩn bị ở trên cho vào ống nghiệm, thêm vào 5 ml dung dịch TCA 0,6% và 50 µl dung dịch Iod 0,01N. Lắc đều các ống nghiệm và để yên 20 phút. Đo ở bước sóng 620nm

Tính kết quả

Hàm lượng amylose % = X x 6 x 100/m

x: nồng độ amylose được suy ra từ đồ thị chuẩn (mg/mL)

m: khối lượng thực của mẫu gạo

m = 15 x (100- H)/100

H: độ ẩm của mẫu gạo

CHƯƠNG 3. KHẢO SÁT LIPID

3.1. KHÁI QUÁT VỀ LIPID

Lipid thuộc nhóm hợp chất hữu cơ không đồng nhất, không tan trong nước, nhưng dễ tan trong dung môi hữu cơ không phân cực như: cloroform, ether, benzen ... trong alcol chất béo tan có mức độ.

Trong phân tử lipid có ít nhất 1 chức ester của acid béo cao phân tử với alcol.

Khi thủy phân lipid trong môi trường kiềm mạnh như NaOH (KOH) trong alcol đun nóng cho xà phòng và glycerin (gọi là sự xà phòng hóa).

Trong cơ thể sinh vật, lipid được phân giải nhờ enzyme thủy phân lipase để tạo thành các acid béo tương ứng và alcol.

3.2. KHẢO SÁT TÍNH HÒA TAN CỦA LIPID

Lipid không tan trong nước, nhưng tan trong các dung môi hữu cơ khác thì khác nhau.

Tiến hành

Lấy 5 ống nghiệm, cho vào mỗi ống dầu ăn và các dung môi theo bảng sau:

Ống nghiệm / *Dung dịch*	1	2	3	4	5
Dầu ăn	5 giọt	5 giọt	5 giọt	5 giọt	5 giọt
Ether	1 mL	0	0	0	0
Cloroform	0	1 mL	0	0	0
Acetone	0	0	1 mL	0	0
Alcol	0	0	0	1 mL	0
Nước cất	0	0	0	0	1 mL

Lắc kỹ. Quan sát độ hòa tan của dầu và nhận xét, giải thích, kết luận.

Sau đó đem ống nghiệm thứ 4 đun cách thủy 5 phút. Ghi nhận kết quả, giải thích và kết luận.

3.3. CÁC CHỈ SỐ ĐÁNH GIÁ LIPID

3.3.1. Xác định chỉ số xà phòng

Định nghĩa: Chỉ số xà phòng là số miligam KOH cần thiết để trung hòa tất cả những acid béo tự do và kết hợp có trong 1 gam chất béo.

Nguyên tắc: Cho chất béo cần phân tích kết hợp với một lượng KOH thừa để chất béo chuyển hết thành xà phòng. Phần KOH thừa được định phân bằng dung dịch acid chuẩn với phenolphtalein làm chỉ thị màu.

Hoá chất

- KOH 0,5N trong alcol
- HCl 0,5 N trong alcol
- Thuốc thử phenolphtalein

Tiến hành

Cân chính xác khoảng 0,3 gam dầu vào bình tam giác 250 mL, cho vào đó 6mL KOH 0,5N trong alcol (đồng thời tiến hành song song với bình thử không: 0,3 mL nước thay vì dầu). Lắc đều.

Đem 2 bình đun cách thủy qua ống sinh hàn, cho sôi nhẹ trong 45 phút. Như vậy chất béo trong bình đã thủy phân hoàn toàn (phản ứng xà phòng hóa đã kết thúc). Để cho bình nguội, thêm vào đó 2 mL nước cất, 2-3 giọt phenolphtalein và chuẩn độ bằng HCl 0,5N trong alcol cho đến khi màu hồng mất.

Lưu ý: Cần chuẩn độ mẫu thử không trước**.**

Tính kết quả

Chúng ta biết rằng 1mL KOH 0,5N tương đương với 28,05mg KOH

Chỉ số xà phòng được tính theo công thức sau:

$$Cxp = \frac{28,05 \times (a-b)}{m}$$

Trong đó: - C_{xp}: Chỉ số xà phòng

- a: Số mL HCl 0,5N dùng để chuẩn độ bình thử không
- b: Số mL HCl 0,5N dùng để chuẩn độ bình thử thật (bình có mẫu).
- m: Số gam chất béo lấy làm thí nghiệm

3.3.2. Xác định chỉ số iod

Định nghĩa: Chỉ số iod là số gam iod kết hợp với 100 gam chất béo

Nguyên tắc

Trong những điều kiện thí nghiệm xác định những nối đôi -CH=CH- cho với halogen phản ứng cộng chứ không cho phản ứng thế.

Cho một lượng thừa ICl (iodine monochloride) tác dụng với chất béo cần phân tích trong bóng tối để phản ứng cộng xảy ra hoàn toàn. Lượng iod đã phản ứng được xác định dựa vào phản ứng chuẩn độ lượng iod giải phóng ra (sau khi thêm KI) bằng dung dịch $Na_2S_2O_3$ chuẩn với tinh bột làm chỉ thị.

Như vậy chỉ số iod xác định tổng quát các acid béo không no trong chất béo.

Các phương trình phản ứng được trình bày như sau:

$$ICl + KI \rightarrow KCl + I_2$$

$$Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

Hoá chất

- Dung dịch ICl 0,2M
- Dung dịch KI 0,1%
- Dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N
- Cloroform
- Dung dịch hồ tinh bột 1%

Tiến hành

Cân chính xác 0,2 gam dầu cho vào bình tam giác 250 mL (có nút nhám), thêm vào 10 mL cloroform, tiếp tục cho thêm 25 mL dung dịch ICl 0,2M. Lắc kỹ bình, để yên 1 giờ trong bóng tối. Tiến hành chuẩn bị mẫu đối chứng tương tự như mẫu thật.

Tráng nắp và cổ bình tam giác với khoảng 50 mL nước cất, thêm 10 mL dung dịch KI 0,1% (w/v) và định lượng iod giải phóng ra bằng dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N đến khi có màu vàng sậm rồi thêm 1 mL hồ tinh bột 1%. Nếu có màu xanh xuất hiện thì tiếp tục chuẩn độ cho đến khi dung dịch mất màu.

Tính kết quả

Ta biết 1mL $Na_2S_2O_3$ 0,1N tương ứng 0,01269 g I_2

$$C_i = \frac{0{,}01269 \times 100 \times (a - b)}{m}$$

Trong đó: - C_i: Chỉ số iod

- a: Số mL $Na_2S_2O_3$ 0,1 N dùng chuẩn độ bình thử không
- b: Số mL $Na_2S_2O_3$ 0,1 N dùng chuẩn độ bình thí nghiệm
- m: Lượng dầu dùng thí nghiệm (tính bằng gam)
- 100: Để tính trong 100 gam chất béo

3.3.3. Xác định chỉ số acid

Định nghĩa: Chỉ số acid là số miligam KOH cần thiết để trung hòa hết những acid béo tự do có trong 1 gam chất béo.

Nguyên tắc: Người ta dùng KOH 0,01N để trung hòa các acid béo tự do có trong chất béo dùng để phân tích với phenolphtalein làm chỉ thị màu.

Hóa chất

- KOH 0,01N trong alcol
- Alcol tuyệt đối
- Ether ethylic

Tiến hành

Dùng 1 bình tam giác 100 mL cho vào 5 mL alcol tuyệt đối và 5 mL ether (theo tỷ lệ 1:1) cho thêm vào bình này 2-3 giọt phenolphtalein và dùng KOH 0,01N trong alcol để trung hòa hỗn hợp đến khi xuất hiện màu hồng lợt. Sau đó thêm vào hỗn hợp vừa trung hòa 0,5 gam dầu. Đem hỗn hợp này trung hòa bằng KOH 0,01N trong alcol cho đến khi có màu hồng bền vững sau 30 giây. Đọc thể tích KOH đã dùng trên buret.

Tính kết quả

Ta biết 1 mL KOH 0,01N tương ứng với 0,56 mg KOH

Chỉ số acid được tính theo công thức sau:

$$Ca = \frac{a \times 0{,}56}{m}$$

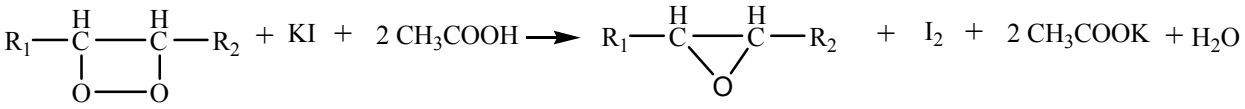
Trong đó: - Ca: Chỉ số acid

- a : Số mL KOH 0,01N đã dùng để trung hòa hỗn hợp có dầu
- m: Khối lượng dầu lấy làm thí nghiệm (tính bằng gam)

3.3.4. Xác định chỉ số peroxid

Định nghĩa: Chỉ số peroxid là số gam iod được giải phóng ra bởi peroxid có trong 100 gam mẫu.

Nguyên tắc: Trong không khí, các acid béo có trong chất béo, đặc biệt là các acdi béo không no dễ dàng bị oxy hóa một phần tạo thành peroxid, gây ra hiện tượng ôi hóa chất béo. Xác định chỉ số peroxid dựa trên phản ứng sau:



Lượng iod giải phóng ra được chuẩn độ bằng dung dịch $Na_2S_2O_3$ với tinh bột làm chỉ thị màu.

$$Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

Hoá chất

- Acid acetic đậm đặc
- Cloroform
- Dung dịch KI bão hòa
- Dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1 N
- Dung dịch hồ tinh bột 1%

Tiến hành

Cân chính xác khoảng 2 gam dầu cho vào bình tam giác 250 mL, thêm vào 10 mL dung dịch hỗn hợp acid acetic : cloroform (tỉ lệ 2: 1) và 1 mL dung dịch KI bão hòa mới pha. Đậy nắp, lắc kỹ bình và để yên trong bóng tối 10 phút. Tiến hành chuẩn bị mẫu đối chứng tương tự như mẫu thật, dùng 2 mL nước cất thay vì dầu.

Cho thêm 25 mL nước cất và tiến hành định lượng iod giải phóng ra bằng dung dịch $Na_2S_2O_3$ 0,1N đến khi có màu vàng sậm rồi thêm 1 mL hồ tinh bột 1%. Nếu có màu xanh xuất hiện thì tiếp tục chuẩn độ cho đến khi dung dịch mất màu.

Tính kết quả

Ta biết 1mL $Na_2S_2O_3$ 0,1N tương ứng 12,69 mg I_2

Chỉ số peroxid được tính theo công thức sau:

$$Cp = \frac{0{,}01269 \times (a - b) \times 100}{m}$$

Trong đó:
- Cp: Chỉ số peroxid
- a: Số mL $Na_2S_2O_3$ 0,1 N dùng chuẩn độ bình thử không
- b: Số mL $Na_2S_2O_3$ 0,1 N dùng chuẩn độ bình thí nghiệm
- m: Lượng dầu dùng thí nghiệm (tính bằng gam)
- 100: Để tính trong 100 gam chất béo

3.4. XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG LIPID THÔ BẰNG MÁY SOXHLET

Nguyên tắc

Dựa trên khả năng hòa tan của lipid trong dung môi hữu cơ không phân cực, dùng dung môi hữu cơ để trích lipid ra khỏi nguyên liệu đã được nghiền nhỏ. Trong quá trình trích, các hợp chất tan được trong chất béo như các sắc tố, các vitamin tan trong chất béo... cũng bị tách ra khỏi nguyên liệu. Do có lẫn các tạp chất khác, nên thành phần trích ly được gọi là lipid tổng số hay lipid thô.

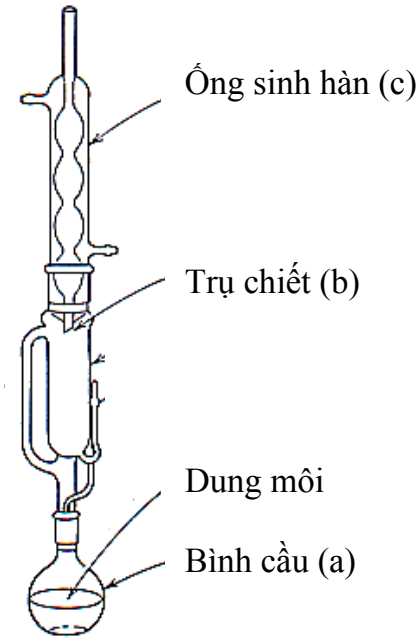
Có 2 phương pháp xác định:

- Phương pháp trực tiếp: Trích lipid ra khỏi nguyên liệu và cân lượng lipid được trích ly.

- Phương pháp gián tiếp: Xác định chênh lệch khối lượng nguyên liệu khô trước và sau khi chiết xuất lipid ra khỏi nguyên liệu, từ đó suy ra khối lượng lipid trong mẫu phân tích.

Dụng cụ, hóa chất

- Bếp cách thủy
- Tủ sấy
- Cân phân tích
- Ether ethylic hoặc ether dầu hỏa.
- Bộ Soxhlet [gồm: bình cầu (a), trụ chiết (b) và ống sinh hàn (c)]. (Xem hình 3.1)



Hình 3.1. Hệ thống Soxhlet

Tiến hành

- Sấy khô nguyên liệu đã được nghiền nhuyển đến khối lượng không đổi. Cân chính xác khoảng 5 gam nguyên liệu (sử dụng cân phân tích), cho vào túi giấy lọc đã được sấy khô và biết khối lượng (Túi giấy phải có đường kính nhỏ hơn đường kính trụ chiết và chiều dài ngắn hơn chiều cao của ông chảy tràn).

- Đặt túi giấy có chứa mẫu vào trụ chiết.

- Lắp trụ chiết vào bình cầu (đã được sấy khô và xác định khối lượng) và lắp ống sinh hàn.

- Cho dung môi vào trụ chiết sao cho một lượng dung môi chảy xuống khoảng ½ bình cầu và còn một lượng trên phểu chiết còn đủ ngập mẫu.

- Mở nước vào ống sinh hàn.

- Đặt hệ thống Soxhlet lên bếp cách thủy và điều chỉnh nhiệt độ sao cho chu kỳ hoàn lưu của dung môi đạt từ 5 đến 8 lần trong một giờ. Chiết trong 8 –12 giờ cho đến khi trích ly hoàn toàn chất béo. Thử thời điểm kết thúc quá trình trích bằng cách lấy vài giọt ether từ đầu cuối trụ chiết cho lên đĩa kính đồng hồ sạch. Sau khi dung môi

bay hơi hết, trên mặt kính đồng hồ không để lại vết dầu loang thì xem như lipid đã được chiết hoàn toàn.

- Sau khi chiết xong, lấy bình cầu và túi đựng mẫu ra, lắp ống sinh hàn vào bình cầu mới và cất thu hồi ether.

Tính toán kết quả

Sấy bình cầu có chứa lipid đến khối lượng không đổi, cân xác định khối lượng. Nếu chiết bằng ether ethylic thì sấy khô ở nhiệt độ 60- 70°C trong 30 phút, nếu chiết bằng ether dầu hỏa thì sấy ở nhiệt độ 80- 90°C trong 45- 50 phút.

Hàm lượng lipid có trong 100gam nguyên liệu được tính theo công thức sau:

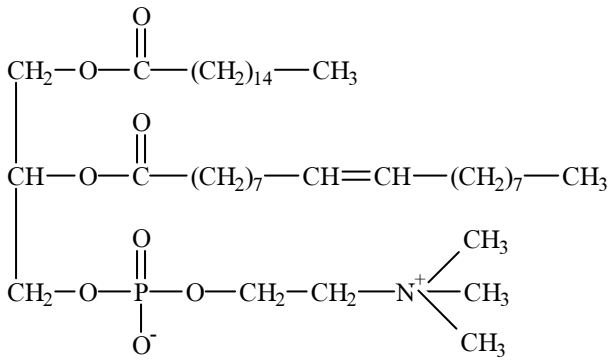
$$X = \frac{(a - b) \times 100}{m}$$

Trong đó: - X: hàm lượng lipid tính theo %
- a: khối lượng bình có chứa chất béo (g)
- b: khối lượng bình cầu ban đầu (g)
- c: khối lượng mẫu khan nước ban đầu (g)

3.5. CHIẾT TÁCH LECITHIN TỪ LÒNG ĐỎ TRỨNG

Lecithin là lipid có chứa gốc phosphate (phospholipid), trong thành phần có nhóm phân cực alcol amincholine.

Công thức cấu tạo của lecithin như sau:



Tiến hành

Dùng 2 mL lòng đỏ trứng đã đánh nhuyễn cho vào 1 ống nghiệm 25 mL, thêm vào ống nghiệm 10 mL alcol tuyệt đối, khuấy đều. Đặt ống nghiệm vào nồi đun cách thủy ở 75 - 80°C, tiếp tục khuấy đều trong 10 phút (là thời gian để rút tách lecithin) (Nếu lượng alcol bị bốc hơi thì ta cho tiếp vào đúng thể tích ban đầu). Lọc hỗn hợp trên qua ống nghiệm khô, dùng dung dịch chiết tiến hành thí nghiệm sau:

Ống nghiệm / Dung dịch	1	2
Dịch chiết	1 mL	1 mL
Aceton	2 mL	0 mL
Nước cất	0 mL	2 mL

Nhận xét hiện tượng, giải thích và kết luận.

CHƯƠNG 4. KHẢO SÁT VITAMIN

4.1. KHÁI QUÁT

Vitamin là những phân tử hữu cơ cần cho cơ thể sinh vật với một lượng rất nhỏ. Tên gọi vitamin xuất hiện lần đầu tiên vào năm 1911 khi thiamine (vitamin B1) được nhận dạng.

Vitamin được chia thành 2 nhóm chính:

- Vitamin tan trong nước: Vitamin nhóm B, vitamin C, vitamin H
- Vitamin tan trong chất béo: Vitamin nhóm A, D, E, K, Q...

4.2. ĐỊNH TÍNH VITAMIN D

Các vitamin D là dẫn suất của các sterol. Khi được chiếu tia tử ngoại các sterol sẽ có hoạt tính của vitamin D.

Nguyên tắc: Khi đun nóng hỗn hợp vitamin D với hỗn hợp anilin và acid HCl đậm đặc thu được chất lỏng có màu đỏ.

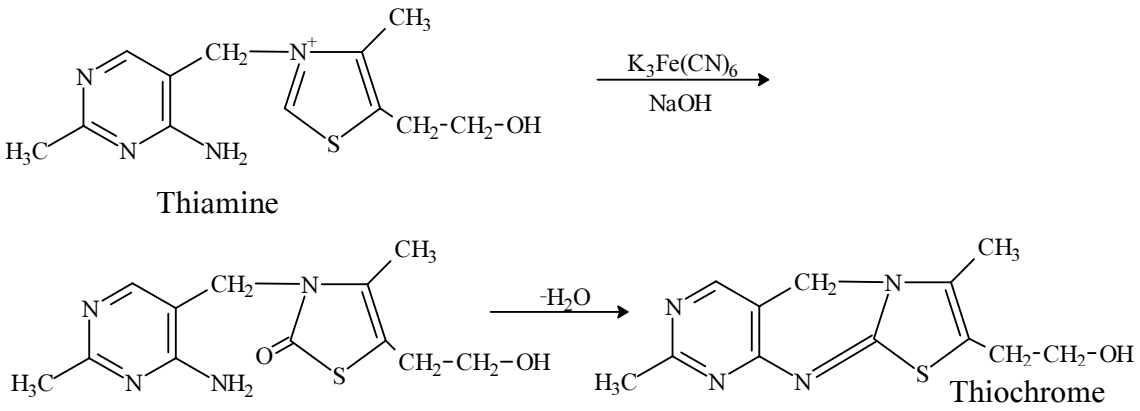
Tiến hành: Cho vào ống nghiệm dung dịch trích từ 2 viên dầu cá, thêm vào 2 mL hỗn hợp anilin : HCl đậm đặc (theo tỉ lệ thể tích 15:1). Đun sôi mẫu nửa phút trên đèn cồn. Quan sát sự chuyển đổi màu, giải thích, kết luận.

4.3. ĐỊNH TÍNH VITAMIN B1

Chuẩn bị dung dịch vitamin B1: Giã 1 viên vitamin B1, pha với 5 mL nước cất, lọc qua giấy lọc khô. Lấy dung dịch lọc tiến hành 2 thí nghiệm sau.

4.3.1. Phản ứng tạo thiocrome

Nguyên tắc: Khi oxy hóa cẩn thận trong môi trường kiềm, vitamin B1 sẽ biến đổi thành thiochrome, trong quá trình biến đổi có dạng keto của thiamine, coi như là sản phẩm trung gian.



Thiocrome được tách bằng rượu isoamyl alcohol (isoamylic, isobutylic) tạo vũng huỳnh quang màu xanh tím phát quang khi chiếu tia tử ngoại. Cường độ của huỳnh quang tỉ lệ với hàm lượng của thiocrome. Do đó phản ứng này còn được sử dụng để định lượng vitamin B1 theo phương pháp huỳnh quang.

Hóa chất

- Dung dịch NaOH 15%

- Dung dịch $K_3Fe(CN)_6$ 1%
- Isoamylic

Tiến hành

Chuẩn bị các ống nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm / *Hóa chất*	1	2
Dung dịch vitamin B1	2 mL	0
Nước cất	0	2 mL
Dung dịch NaOH 15%	1 mL	1 mL
$K_3Fe(CN)_6$	0,5 mL	0,5 mL
isoamyl alcohol	2 mL	2 mL

Để yên khoảng 5 phút rồi quan sát. Sau đó tiếp tục quan sát dưới ánh sáng mặt trời. Ghi nhận hiện tượng và kết luận.

4.3.2. Phản ứng với thuốc thử diazo

Nguyên tắc: Trong môi trường kiềm thiamine phản ứng với thuốc thử diazo (hỗn hợp acid sulfanilic và natri nitric) sẽ cho màu vàng cam hoặc đỏ. Màu là một hợp chất phức tạp hình thành giữa thiamine và thuốc thử diazo.

Hoá chất

- Dung dịch acid sulfanilic 1%
- Dung dịch natri nitric 5%
- Dung dịch natri carbonate 10%

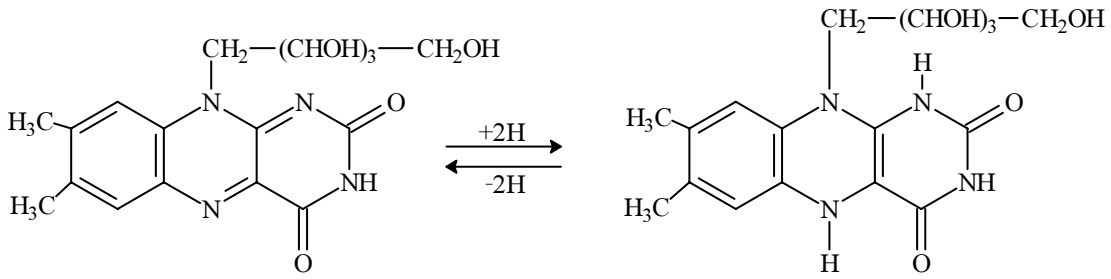
Tiến hành

Cho các hoá chất lần lượt vào ống nghiệm theo trình tự sau: 0,5 mL dung dịch vitamin B1 + 0,5 mL dung dịch acid sulfanilic 1% + 0,5 mL dung dịch natri nitric 5% + 10 giọt dung dịch natri carbonate 10%.

Lắc đều ống nghiệm, quan sát màu, giải thích và kết luận.

4.4. ĐỊNH TÍNH VITAMIN B2

Nguyên tắc: Vitamin B2 là dẫn xuất ribitol của isoalloxazine, nó có khả năng phản ứng oxy hóa khử thuận nghịch. Vitamin B2 ở dạng oxy hóa (riboflavin) có màu vàng, ở dạng khử (dihydroriboflavin) thì không màu. Người ta sử dụng phản ứng này để phát hiện vitamin B2. Phương trình phản ứng được trình bày như sau:



Riboflavin *(màu vàng)* **Dihydroriboflavin** *(không màu)*

Khi cho HCl đậm đặc (hoặc acid acetic đậm đặc) và kẽm vào dung dịch vitamin B2 thì hydro bay lên và dung dịch màu vàng sẽ mất màu.

Tiến hành

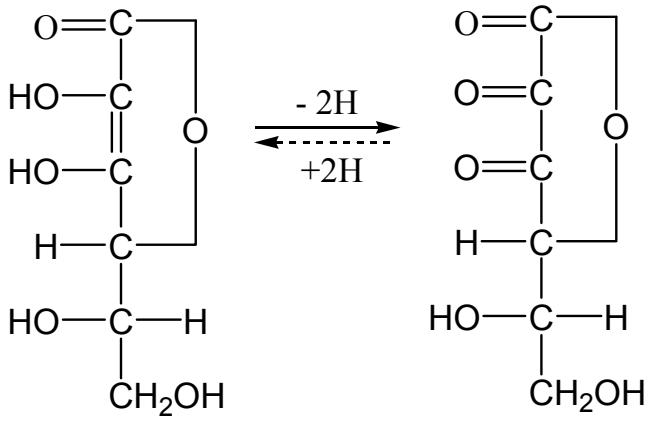
Giã một viên B2 cho vào 5 mL nước cất và lọc. Dùng 2 mL dung dịch lọc cho vào ống nghiệm, cho thêm 1 mL HCl đậm đặc và một ít bột kẽm cho đến khi dung dịch mất màu

- Viết các phương trình phản ứng xảy ra.
- Giải thích và kết luận.

4.5. ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN C

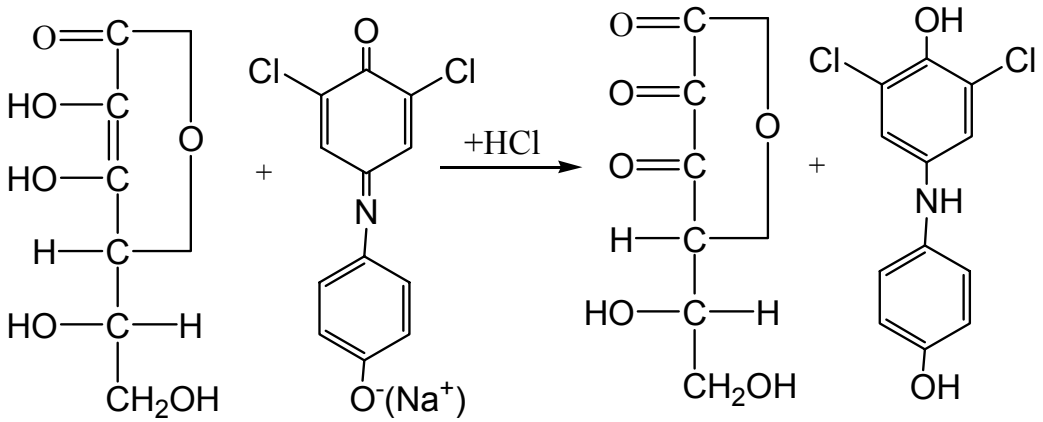
4.5.1. Định lượng vitamin C theo phương pháp Muri

Vitamin C (acid ascorbic) $C_6H_8O_6$ có 2 dạng đồng phân quang học D và L, dạng D không có hoạt tính sinh học. Bài này khảo sát về L- acid ascorbic, acid này có thể thấy ở dạng khử và oxy hóa.



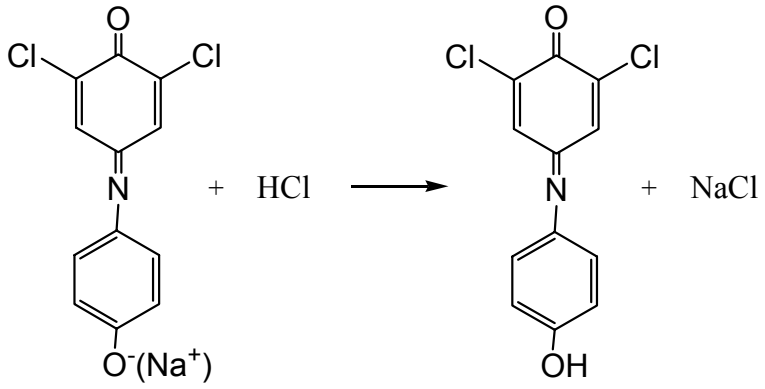
L – acid ascorbic (dạng khử) — L – acid dehydroascorbic (dạng oxy hóa)

Nguyên tắc: Định lượng vitamin C dựa trên tính khử của nó đối với thuốc thử 2,6 dichlorophenol indophenol (DIP). Dạng oxy hóa của thuốc thử DIP có màu xanh bị khử bởi acid ascorbic có trong dịch chiết của nguyên liệu thực vật thành dung dịch không màu. Ở điểm cân bằng tất cả acid ascorbic thì thuốc thử màu dư thừa không bị khử có màu hồng.



L – acid ascorbic (dạng khử) — 2,6 - dichlorophenol indophenol sodium (màu xanh) — 2,6 - dichlorophenol indophenol (không màu)

Trong môi trường acid thì thuốc thử 2,6 dichlorophenol indophenol có màu hồng.



Hoá chất

- Dung dịch DIP 0,001N
- Dung dịch acid oxalic 1%
- Dung dịch HCl 1%

Tiến hành

Cân khoảng 5g trái cây (trái cốc, bưởi...) có chứa acid ascorbic đã được thái nhỏ, chuyển sang cối sứ cùng với 20 mL HCl 1%, chắt lấy dịch ngâm giữ lại trong cốc, đem phần thịt nghiền mịn, xong chuyển sang bình định mức 100 mL cùng với dung dịch HCl 1% vừa chiết ra. Rửa cối và tráng dụng cụ ít nhất 3 lần, mỗi lần với một ít acid oxalic 1% và cũng dồn vào bình định mức. Dùng acid oxalic để đưa thể tích lên vạch 100 mL. Lắc kỹ, chuyển qua cốc khô 100 mL, để yên 15 phút rồi lọc qua giấy lọc khô.

- Tiến hành định phân mẫu đối chứng: Lấy 8 mL acid oxalic 1% 2 mL HCl 1% cho vào bình tam giác dung tích 100 mL, dùng microburet với DIP 0,001N để chuẩn độ đến lúc xuất hiện màu hồng bền sau ba mươi giây.

Lưu ý: Cần tiến hành định phân mẫu đối chứng và mẫu thật với 3 lần lặp lại để lấy kết quả trung bình.

- Chuẩn độ mẫu thật: Dùng pipet lấy 10 mL dịch lọc chứa vitamin C cho vào bình tam giác dung tích 100 mL, tiến hành chuẩn độ như mẫu đối chứng.

Tính kết quả

Số mg vitamin C trong 100g mẫu vật được tính như sau:

$$X = \frac{(a-b)x0,088xVx100}{vxm}$$

a: Số mL trung bình khi định chuẩn mẫu vật

b: Số mL trung bình khi định chuẩn mẫu đối chứng.

0,088: số mg acid ascorbic tương đương với 1 mL dung dịch chuẩn DIP 0,001N đã được định chuẩn bằng acid ascorbic chuẩn.

V: Thể tích dịch chiết ban đầu (ở đây là 100 mL)

v: Thể tích dung dịch chiết lấy để định chuẩn (10 mL)

m: Trọng lượng mẫu vật cân lúc đầu (tính bằng gam).

Lưu ý:

- Khi chuẩn bị mẫu vật, cân mẫu vật, cắt mẫu vật (bằng dao inox) và nghiền mẫu vật cần tiến hành nhanh chóng trong một cối sứ HCl 1% (hoặc với HPO_3 -

CH_3COOH). Vì vitamin C rất dễ bị oxy hóa trong không khí, nhất là khi có sự hiện diện của các ion kim loại (Fe, Cu).

- Sản phẩm có chứa Fe^{2+}, $Sn^{2+,}$ Cu^{2+} sẽ cho ta những kết quả về số lượng acid ascorbic cao hơn số lượng thật nếu ta dùng phương pháp này.

Ta có thể trắc nghiệm đơn giản để xem những ion có tính khử này có hiện diện với những số lượng đủ để làm sai kết quả thực nghiệm :

+ Thêm 2 giọt dung dịch xanh methylene 0,05% (hòa tan trong nước) vào 10 mL của hỗn hợp mới điều chế gồm một thể tích dung dịch mẫu vật (chứa acid ascorbic) và một thể tích dung dịch HCl 1% (hoặc H_2PO_3 - CH_3COOH). Lắc đều, nếu dung dịch xanh methylene bị mất màu trong 5-10 giây cho thấy có sự hiện diện của các chất có tính khử trên.

+ Sn^{2+} không cho phản ứng với trắc nghiệm này và có thể được thử nghiệm như sau: Cho 10 mL dung dịch HCl: nước theo tỷ lệ 1:3 vào 10 mL dung dịch mẫu vật. Thêm vào đó 5 giọt dung dịch carmin indigo 0,05% (pha với nước). Khuấy, nếu hỗn hợp dung dịch bị mất màu trong 5-10 giây cho thấy sự hiện diện của Sn^{2+} hay những chất có tính khử khác nói trên.

4.5.2. Định lượng vitamin C bằng enzyme peroxidase

Vitamin C có thể bị oxy hóa bởi enzyme peroxidase. Dựa trên nguyên lý này có thể phát triển một phương pháp định lượng vitamin C bằng enzyme peroxidase.

4.5.2.1. Trích vitamin C

Cân 10g trái cây hoặc rau cải ví dụ như chanh rồi cho vào trong 20 mL dung dịch đệm (pH 6,8) metaphosphoric acid 5%, sau đó nghiền mịn và lọc. Dung dịch chứa vitamin C sau đó được nâng lên đến 100 mL trong bình định mức bằng dung dịch đệm trên.

4.5.2.2. Định lượng vitamin C

- Chuẩn bị dung dịch enzyme: 0,01g enzyme peroxidase được pha trong 5 mL dung dịch đệm pH 6,8 và giữ trong nước đá.

- Chuẩn bị dung dịch vitamin C chuẩn 5mg/ 100 mL: 10 mg vitamin C (tinh khiết) được pha trong dung dịch đệm pH 6,8 và nâng lên 200 mL trong bình định mức. Sau đó được pha loãng thành 1, 2, 3, 4 mg/ 100 mL để thiết lập đường chuẩn.

Trước khi tiến hành đo mẫu chuẩn và mẫu thử thật, mẫu không sẽ được đo bằng dung dịch đệm với bước sóng 265 nm. Mẫu chuẩn được chuẩn bị từ 1, 2, 3, 4, và 5 mg/100 mL. Mẫu dịch trích có thể được pha loãng thành 10, 20 hoặc 50 lần để dễ khảo sát. Phản ứng được tiến hành theo trình tự cho các chất vào cuvette như sau:

- Tiến hành đo: Cho vào ống nghiệm 2,5 mL dung dịch đệm + 0,5 mL dung dịch vitamin C chuẩn hoặc mẫu + 0,1 mL dung dịch enzyme peroxidase và đo độ hấp thụ ở bước sóng 265 nm ta được giá trị Ai. Khi kết quả thể hiện sự ổn định trên đường biểu diễn thì thêm vào 0,1 mL H_20_2 và cho ổn định sau 1 phút, tiếp tục đo được giá trị Af. Độ hấp thụ của mẫu khi đo là:

$$\Delta A_{265} = Ai - Af$$

Hàm lượng mẫu thật sẽ được tính theo đường chuẩn và suy ra giá trị thật.

CHƯƠNG 5. ACID AMIN VÀ PROTEIN

5.1. KHÁI QUÁT VỀ ACID AMIN VÀ PROTEIN

Protein là những hợp chất cao phân tử được cấu tạo từ các acid amin liên kết nhau bằng liên kết peptide. Khi thủy phân protein, ta thu được khoảng 20 loại acid amin.

Protein có thể phân làm 2 loại:

- Protein đơn giản: trong thành phần phân tử chỉ gồm các acid amin liên kết với nhau bằng liên kết peptide

- Protein phức tạp: trong thành phần ngoài các acid amin còn có những hợp chất khác không phải acid amin .

Protein có rất đa dạng. Tùy thuộc vào các cấu trúc của chúng mà các tính chất lý hóa học, sinh học của protein sẽ khác nhau.

+ Để định tính và định lượng acid amin, protein ta dùng phản ứng màu với nynhydrin và phản ứng Biuret.

+ Để tách các acid amin khỏi hỗn hợp, ta dùng phương pháp sắc ký trên giấy, sắc ký trao đổi ion, điện di...

+ Gốc R khác nhau của acid amin sẽ cho những phản ứng màu riêng biệt của mỗi acid amin: phản ứng xanthoproteic, phản ứng millon...

+ Phản ứng Biuret xác định liên kết peptide có trong phân tử protein.

+ Khi đưa pH của dung dịch protein về điểm đẳng điện (pI) bằng dung dịch đệm thích hợp thì các protein bị trung hòa điện tích. Môi trường có pH gần bằng pI của protein thì protein sẽ bị kết tủa nhiều nhất.

+ Do kích thước phân tử lớn nên protein không đi qua được các màng bán thấm. Dựa vào tính chất này người ta dùng phương pháp thẩm tích để loại muối và những phần tử nhỏ khác khỏi dung dịch protein.

5.2. PHÂN TÍCH HỖN HỢP ACID AMIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ TRÊN GIẤY

Nguyên tắc

Trong những điều kiện thí nghiệm nhất định (dung môi, nhiệt độ, loại giấy sắc ký, độ bảo hòa của dung môi trong bình sắc ký...), tốc độ di chuyển của các acid amin khác nhau thì khác nhau và đặc trưng bởi một hệ số R_f. Nhờ tính chất này, sau khi sắc ký các acid amin trong hỗn hợp tách rời nhau. Sau đó dùng thuốc hiện màu thích hợp để nhận biết các acid amin.

Hỗn hợp dung môi sắc ký là một hỗn hợp không trộn lẫn thường gồm nước và một vài dung môi hữu cơ khác. Trong đó nước có ái lực mạnh với giấy sắc ký nhờ có liên kết cầu hydro sẽ giữ vai trò pha đứng yên, còn dung môi hữu cơ là pha di động.

Các acid amin khác nhau sẽ bị lôi cuốn bởi pha di động với vận tốc di chuyển khác nhau và sẽ tách dần khỏi hỗn hợp acid amin. Hệ số Rf được dùng để đánh giá sự di chuyển này. $R_{f:}$ là hệ số giữa khoảng cách từ điểm xuất phát tới tâm điểm của vật và được tính như sau:

Rf = a/ b

Với: a: khoảng cách từ điểm xuất phát tới tâm điểm của vật

b: khoảng cách từ điểm xuất phát tới vạch cuối của dung môi.

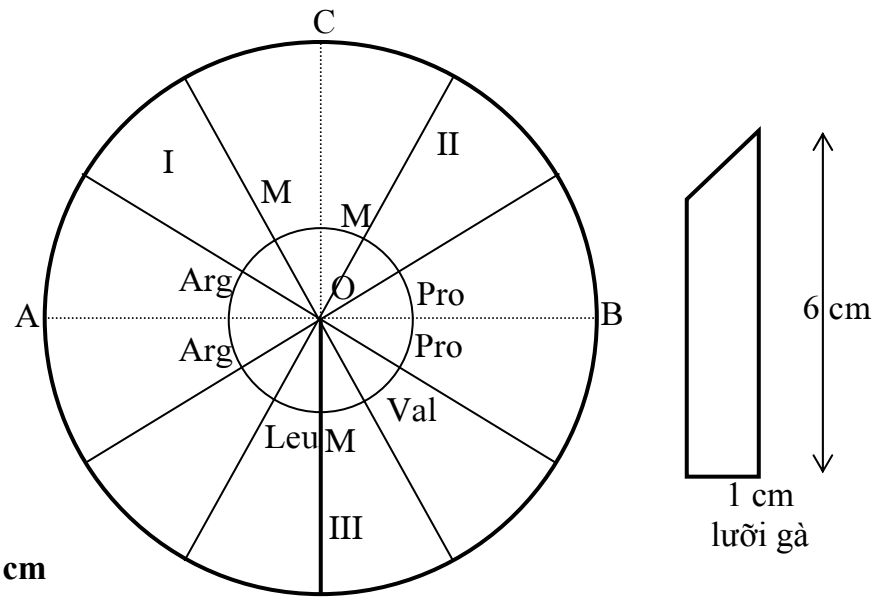
Sau khi sắc ký, các acid amin được nhận diện bằng cách làm hiện màu và so sánh R_f của nó với R_f của các acid amin chuẩn trong cùng điều kiện thí nghiệm.

Thuốc thử

- Sakaguchi I: Napthol 0,01 gam + 5 gam urea trong 1000 mL C_2H_5OH 95°
- Sakaguchi II: 2 gam brom trong 100 mL NaOH 5%
- Isatin: 100 mg isatin và 50 mL butanol có chứa 5% acid acetic đậm đặc
- Nynhydrin: 0,2% trong aceton
- Dung môi sắc ký: Butanol: nước: acid acetic theo tỷ lệ 25:15:10

Tiến hành thí nghiệm

a. Chuẩn bị giấy sắc ký như hình vẽ sau:



r = 1,5 cm
R = 7,5 cm
AOC = manh I
COB = manh II
AOB = manh III

b. Chấm dung dịch acid amin lên giấy

- Dùng micropipet chấm lần lượt một giọt nhỏ, gọn từ dung dịch acid amin chuẩn tương ứng đã ghi sẵn và hỗn hợp acid amin M trên giấy sắc ký. Mỗi lần chấm từng giọt nhỏ gọn tránh sự lan rộng tới vị trí các acid amin khác. Sau khi chấm xong một lượt các acid amin cần sấy ngay. Tiếp tục chấm acid amin lần thứ hai tương tự như lần đầu.

- Manh giấy hình chữ nhật nhỏ được gấp làm 3 và cắt xéo góc. Đó là "lưỡi gà".

- Cầm phần trên của "lưỡi gà" đã được gắn xuyên qua khe tâm của giấy sắc ký, đặt giấy sắc ký cân đối lên beaker sao cho 2/3 bề cao của lưỡi gà nhúng sâu vào hỗn hợp dung môi sắc ký trong beaker. Đậy kín bình sắc ký.

- Theo dõi giấy sắc ký trong khoảng 1 giờ 30 phút, khi dung môi cách gờ của giấy sắc ký 0,5 cm thì cẩn thận mở nắp bình lấy giấy ra, bỏ lưỡi gà, đánh dấu vạch dung môi bằng bút chì và sấy khô giấy sắc ký.

c. Làm hiện màu:

Cắt giấy sắc ký làm 3 manh nhỏ I, II, III (như hình vẽ).

+ Manh I: làm hiện màu bằng thuốc thử sakaguchi I, II:

Đầu tiên dùng bình xịt ẩm manh I bằng thuốc thử sakaguchi I, sấy thật khô. Sau lại xịt ẩm tiếp bằng thuốc thử sakaguchi II rồi sấy khô. Nhận xét màu của acid amin chuẩn và acid amin trong hỗn hợp M.

+ Manh II: Làm hiện màu bằng thuốc thử isatin.

Xịt ẩm manh II bằng dung dịch isatin. Sấy khô. Nhận xét màu của acid amin chuẩn và acid amin trong M.

+ Manh III: Làm hiện màu bằng thuốc thử nynhydrin.

Xịt ẩm manh III bằng dung dịch nynhydrin. Sấy khô. Nhận xét màu của acid amin trên manh này tương tự như hai manh I và II.

+ Tính R_f của mỗi acid amin trong hỗn hợp và mỗi acid amin chuẩn.

+ Kết luận về các acid amin trong hỗn hợp M.

Lưu ý:- Luôn giữ giấy sắc ký thật sạch.

- Bình sắc ký luôn giữ cố định tại một vị trí và phải được đậy thật kín để bảo đảm môi trường bão hòa dung môi trong suốt thời gian chạy sắc ký. Khi mở và đậy bình sắc ký: không được nhấc thẳng nắp bình sắc ký mà đẩy nhẹ nắp bình về phía trước hay về phía mình đang đứng.

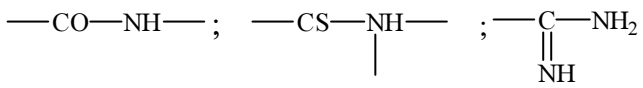
- Nhiệt độ sấy khô không quá $60^{O}C$.

5.3. CÁC PHẢN ỨNG MÀU ĐẶC TRƯNG CỦA PROTEIN

Dung dịch protein cho phản ứng màu với một số thuốc thử, các phản ứng này được áp dụng để định tính và định lượng protein.

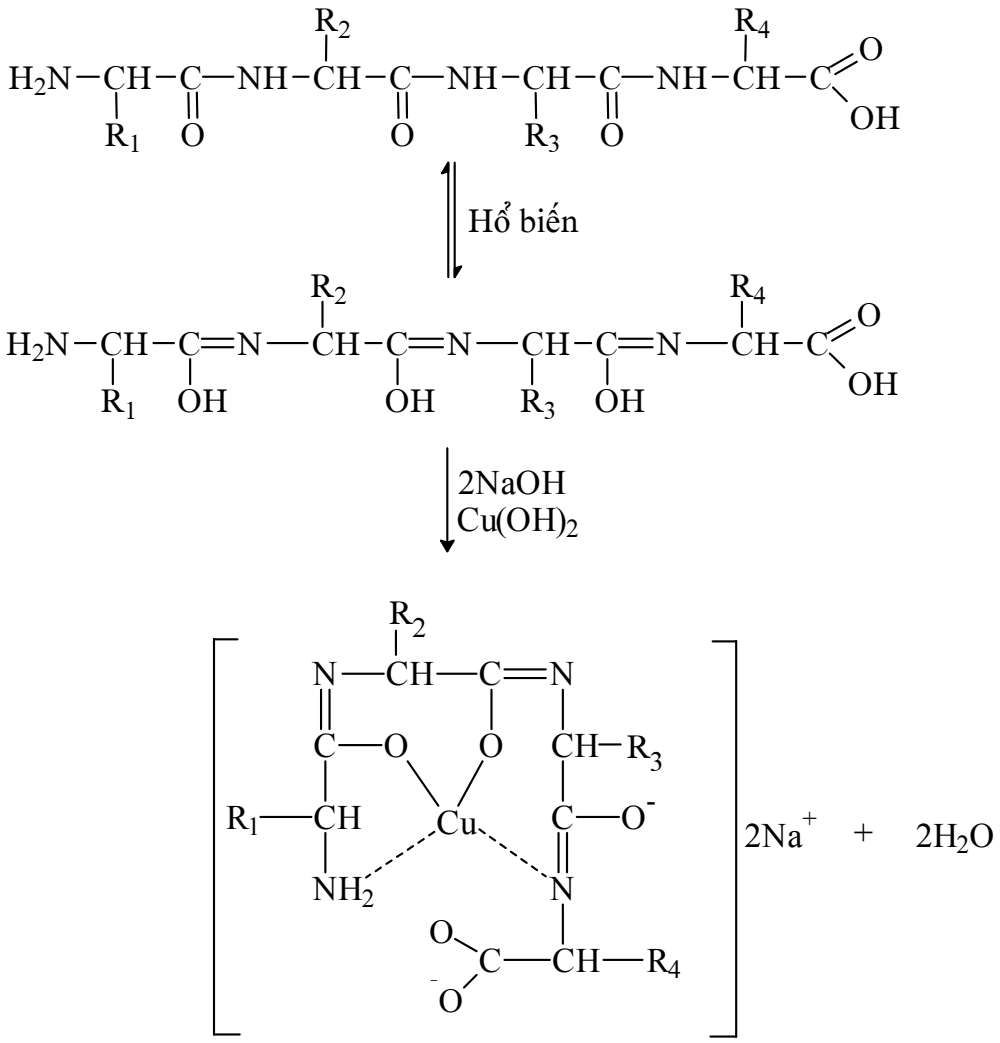
5.3.1. Phản ứng Biuret

Trong môi trường kiềm với sự có mặt của Cu^{2+} các chất có chứa các nhóm sau:



sẽ phản ứng cho hợp chất có màu tím.

Nguyên tắc: Trong phân tử protein có mặt nhóm - CO - NH - nên có thể tạo phức biure với Cu^{2+} trong môi trường kiềm. Cơ chế phản ứng có thể trình bày như sau:



Hóa chất

- Dung dịch NaOH 10%
- Dung dịch $CuSO_4$ 0,2%

Tiến hành thí nghiệm

Dùng 1 ống nghiệm cho 2 mL dung dịch lòng trắng trứng +1 mL dung dịch NaOH 10% + 2 giọt $CuSO_4$ 0,2%. Lắc kỹ - Ghi nhận kết quả.

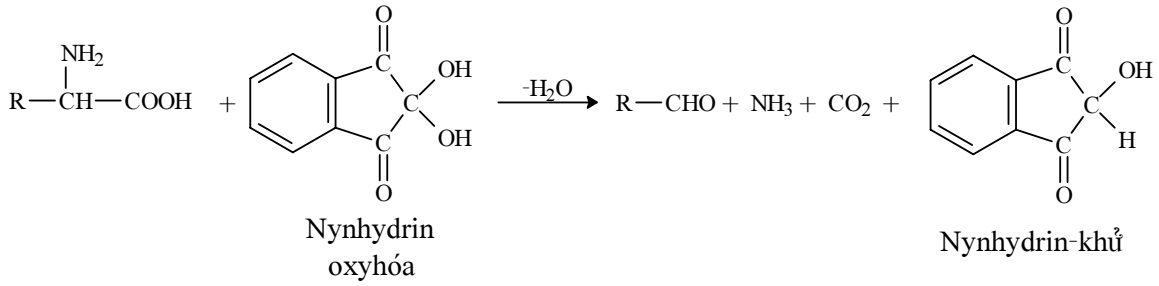
5.3.2. Phản ứng Nynhydrin

Nguyên tắc: Dung dịch protein hay acid amin khi đun nóng với dung dịch nynhydrin 2% sẽ cho màu xanh tím hoặc màu vàng (đối với acid amin prolin).

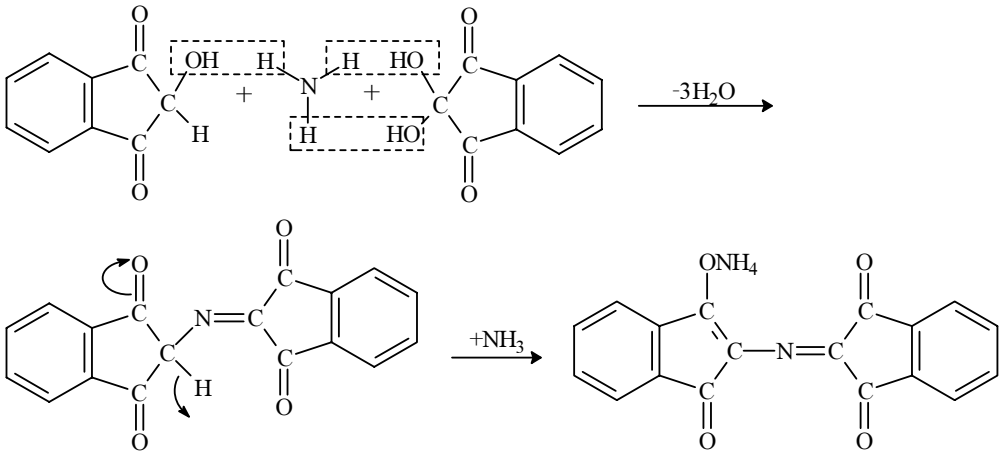
Nynhydrin là một chất oxy hóa nên có thể tạo phản ứng carbonyl hóa acid amin với nước để cuối cùng cho ra CO_2, NH_3 và aldehyde. Nynhydrin bị khử tạo thành lại tác dụng với NH_3 vừa được phóng thích ra và kết hợp với 1 phân tử nynhydrin thứ hai tạo thành sản phẩm ngưng kết màu xanh tím.

Phương trình phản ứng được trình bày như sau:

Giai đoạn khử amin hóa và khử carboxyl :



Giai đoạn tạo phức màu :



Hóa chất

- Dung dịch nynhydrin 2% trong acetone
- Dung dịch acid amin 0,1%
- Dung dịch proline 0,1%

Tiến hành thí nghiệm:

Dùng 3 ống nghiệm, cho vào mỗi ống các hóa chất theo bảng sau:

Ống nghiệm / Dung dịch	1	2	3
Lòng trắng trứng	1mL	0	0
Acid amin 0,1%	0	1mL	0
Proline 0,1%	0	0	1mL
Nynhydrin 2%	1 mL	1mL	1mL

Lắc đều các ống nghiệm, đem đun cách thủy. Ghi nhận kết quả.

5.4. SỰ KẾT TỦA PROTEIN

Nguyên tắc

Dung dịch keo protein bền vững do các tiểu phần protein mang lớp áo nước bị ngăn cách nhau và do sự tích điện cùng dấu nên chúng đẩy nhau. Nếu làm mất một trong hai yếu tố trên thì sẽ dẫn tới sự kết tủa các tiểu phần protein đó.

a. Làm mất lớp áo nước bằng cách: thêm các chất điện giải hoặc khử nước như NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, alcol, aceton...

b. Trung hòa điện tích của protein bằng cách:

- Thêm chất điện giải như NaCl, $(NH_4)_2SO_4$...

- Hoặc đưa pH của môi trường chứa protein về gần điểm đẳng điện pI của protein.

Ngoài ra khi làm biến tính protein bằng nhiệt độ cao hay dưới tác dụng của các chất như acid, kiềm mạnh hoặc muối của kim loại nặng... cũng dẫn tới kết tủa protein.

Hoá chất

- $(NH_4)_2SO_4$ tinh thể
- Dung dịch $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa
- H_2SO_4 đậm đặc
- NaOH đậm đặc
- Dung dịch acid sulfosalicilic 10%
- Dung dịch NaCl 30% bão hòa

5.4.1. Sự kết tủa thuận nghịch (Phương pháp thâu nhận protein)

Định nghĩa: Sự kết tủa thuận nghịch là sau khi kết tủa, protein kết tủa có thể lại được hòa tan trở lại trong dung môi thích hợp. Trong sự kết tủa thuận nghịch, protein vẫn giữ được các tính chất lý hóa học và sinh học.

Các chất NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, dung môi hữu cơ (ether, alcol, aceton...) có thể gây kết tủa thuận nghịch protein.

Tiến hành thí nghiệm

Dùng 1 ống nghiệm lấy 4 mL dung dịch lòng trắng trứng, thêm 4 mL dung dịch $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa. Lắc đều, lọc kết tủa qua giấy lọc.

+ Phần tủa đem hòa tan bằng dung dịch NaCl 30% bão hòa. Nhận xét. Kết luận.

+ Phần nước được thêm tiếp $(NH_4)_2SO_4$ tinh thể tới khi bão hòa (nghĩa là $(NH_4)_2SO_4$ tinh thể không tan nữa thì ngưng). Lọc bỏ phần tủa, dung dịch qua giấy lọc đem thực hiện phản ứng biuret. Nhận xét và giải thích qua lần tủa thứ 2 và kết luận.

5.4.2. Sự kết tủa bất thuận nghịch (biến tính protein)

Định nghĩa: Sự kết tủa bất thuận nghịch protein thường liên quan đến sự biến tính protein hay nói cách khác, cấu trúc không gian 2, 3, 4 của phân tử protein bị phá vỡ vĩnh viễn, không tái lập dù ở điều kiện nào. Các yếu tố gây tủa không thuận nghịch thường là acid hữu cơ (trichloroacetic, acid sulfosalycilic...), acid vô cơ đậm đặc (H_2SO_4, HCl, HNO_3...), muối kim loại nặng, nhiệt độ...

a. Kết tủa bằng nhiệt độ

Phần lớn các protein bị kết tủa khi đun nóng, tùy thuộc vào bản chất và độ bền mà nó sẽ bị kết tủa bất thuận nghịch (biến tính) ở một nhiệt độ nhất định. Thí dụ: Protein trứng bị tủa ở nhiệt độ 80 - 90°C, cấu trúc không gian bậc 2,3,4 bị phá vỡ tại nhiệt độ này.

Cho vào ống nghiệm 2 mL dung dịch lòng trắng trứng. Đun cách thủy 20 phút, thêm vào 2 mL dung dịch NaCl 30% bão hòa. Khuấy đều. Quan sát sự hòa tan của kết tủa. Nhận xét - Kết luận.

b. Kết tủa protein bằng acid hữu cơ

Cho vào ống nghiệm khô 2mL dung dịch lòng trắng trứng, thêm 5-8 giọt acid sulfosalycilic 10%. Lắc đều, sau đó lọc lấy kết tủa. Phần tủa thêm 2 mL dung dịch NaCl 30% bão hòa. Lắc đều, quan sát sự hòa tan của kết tủa. Nhận xét, kết luận.

c. Kết tủa bằng acid vô cơ mạnh

$$\text{1 ml dd trứng} \xrightarrow[\text{pH = pI}]{H_2SO_4} \text{Dung dịch có tủa} \xrightarrow[\text{pH} \neq \text{pI}]{H_2SO_4} \text{Tủa tan ra} \xrightarrow[\text{bằng NaOH}]{\text{Trung hoà}} \text{Thực hiện phản ứng Biure}$$

Cho 1mL dung dịch lòng trắng trứng vào ống nghiệm, nhỏ từ từ từng giọt H_2SO_4 đậm đặc vào cho đến khi thấy xuất hiện kết tủa. Tiếp tục cho H_2SO_4 đậm đặc đến khi tủa tan. Đem trung hòa dung dịch trên bằng NaOH đậm đặc và thử phản ứng Biuret. Quan sát hiện tượng, giải thích cách tiến hành và kết luận.

5.5. ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ

5.5.1. Khái quát

Một trong những kỹ thuật phân tích hiệu quả nhất trong sinh hóa là phương pháp phân tích so màu. Trong phương pháp này, nồng độ của hợp chất màu được xác định bằng cách đo cường độ màu của dung dịch chứa hợp chất màu đó.

Phương pháp so màu là một phần của phương pháp quang phổ hấp thụ, một trong các phương pháp quang học. Các phương pháp đo quang phổ thường được đo trong dải bước sóng từ 220- 800 nm. Dải quang phổ này được chia ra:

- Vùng tử ngoại (UV- ultra violet): 200 nm < λ < 400 nm
- Vùng khả kiến (VIS- visible): 400 nm < λ< 800 nm
- Vùng hồng ngoại (IR- infrared): λ > 800 nm

Ánh sáng có bước sóng trong vùng khả kiến (ánh sáng trắng) thường được dùng trong phương pháp so màu.

Khi cho ánh sáng trắng đi qua dung dịch màu, một số bước sóng ánh sáng sẽ bị hấp thụ (tùy theo bản chất dung dịch), trong khi những bước sóng khác thì gần như không bị hấp thụ. Màu của dung dịch mà ta quan sát được là màu của những bước sóng không bị hấp thụ. Sự liên hệ giữa màu dung dịch và ánh sáng bị hấp thụ được trình bày ở bảng 4.1 sau:

Bảng 4.1: Tính chất màu dung dịch trong vùng ánh sáng trắng

Ánh sáng trắng tới	Ánh sáng hấp thụ	Ánh sáng không hấp thụ	Màu của dung dịch
Đỏ, vàng & xanh da trời	Vàng & xanh da trời	Đỏ	Đỏ
	Xanh da trời	Đỏ vàng	Da cam
	Xanh da trời & đỏ	Vàng	Vàng
	Đỏ	Vàng & xanh da trời	Xanh lá cây
	Đỏ & vàng	Xanh da trời	Xanh da trời
	Vàng	Xanh da trời & đỏ	Tím

Cường độ màu của dung dịch có thể được xác định bằng cách đo cường độ ánh sáng hấp thụ bởi hợp chất màu có trong dung dịch.

Cường độ màu của chất hấp thụ tỉ lệ với cường độ chất đó trong dung dịch, vì thế ta có thể áp dụng phương pháp đo cường độ màu trong phương pháp phân tích định lượng.

5.5.2. Định luật Lambert- Beer

Khi chiếu một chùm tia sáng đơn sắc có bước sóng λ, cường độ I_0 qua một dung dịch có chiều dày lớp dung dịch l, nồng độ C. Ta có:

Cường độ tia ánh sáng tới bằng tổng cường độ ánh sáng bị hấp thụ, ánh sáng bị phản xạ và cường độ ánh sáng đi ra khỏi dung dịch (cường độ tia ló).

$I_0 = I_h + I_p + I$

Với:

- I_0 : Cường độ tia ánh sáng tới
- I_h: Cường độ ánh sáng bị hấp thụ
- Ip: Cường độ ánh sáng phản xạ
- I: Cường độ tia ló

Vì lượng ánh sáng phản xạ rất nhỏ, có thể bỏ qua, nên ta có:

$I_0 = I_h + I$

Định luật Lambert- Beer mô tả mối liên hệ giữa các yếu tố trên như sau:

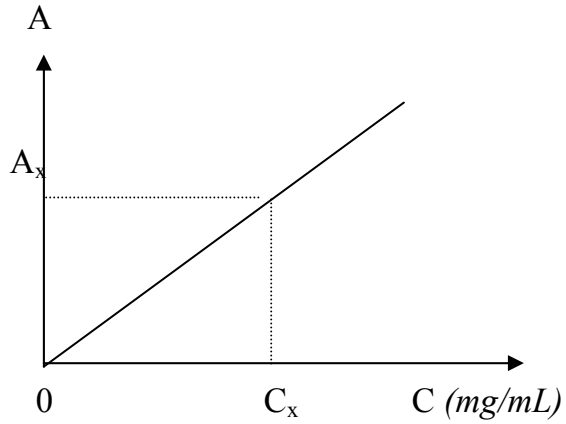
"Khi ánh sáng đơn sắc đi qua dung dịch chứa chất hấp thụ, cường độ ánh sáng bị hấp thụ sẽ phụ thuộc vào nồng độ dung dịch và chiều dài của đường truyền ánh sáng qua dung dịch".

$$\log (I_0/I) = \varepsilon \times C \times l$$

Trong đó:

- I_0 : Cường độ tia ánh sáng tới
- I: Cường độ tia ló
- ε: hệ số hấp thụ phân tử
- C: Nồng độ dung dịch
- l: chiều dài của đường truyền ánh sáng qua dung dịch (cm)

Giá trị $\log(I_0/I)$ được gọi là độ hấp thụ (A - absorbance) hay mật độ quang (OD - optical density).



Trong cùng một điều kiện, khi ε và l không đổi, thì độ hấp thụ sẽ tỉ lệ thuận với nồng độ chất màu. Vì vậy ta có thể xây dựng đường chuẩn sự phụ thuộc của độ hấp thụ vào nồng độ dung dịch chuẩn. Từ đó ta có thể xác định được nồng độ của dung dịch protein cần phân tích khi biết được độ hấp thụ của dung dịch này. Đường chuẩn được xây dựng bằng sự phụ thuộc của giá trị độ hấp thụ theo nồng độ dung dịch.

Thông thường, để có kết quả phân tích với độ chính xác cao, người ta chọn điều kiện sao cho độ hấp thụ nằm trong khoảng 0,1 – 1, tốt nhất là từ 0,2 – 0,5.

5.5.3. Phương pháp định lượng protein theo phản ứng biuret

Nguyên tắc

Trong môi trường kiềm, các hợp chất có chứa nhóm –CO-NH-, -CS-NH-, -C(NH)NH_2 sẽ có phản ứng với Cu^{2+} tạo hợp chất phức màu tím.

Trong thí nghiệm này, protein được cho phản ứng với Cu^{2+} trong môi trường kiềm để tạo phức màu tím; cường độ màu tỉ lệ với nồng độ protein trong dung dịch. Do đó ta có thể định lượng protein theo phương pháp so màu ở bước sóng 550 nm.

Vật liệu-Thuốc thử

a. Dung dịch protein chuẩn:

Dung dịch albumin huyết thanh bò (BSA – bovine serum albumin) 20 mg/mL pha trong dung dịch NaCl 0,9 %.

b. Dung dịch lòng trắng trứng (dung dịch phân tích)

Cân chính xác khoảng 4g lòng trắng trứng, cho vào bình định mức 50 mL. Dùng dd NaCl 0,9% đưa lên đến vạch.

c. Thuốc thử Biuret

- $CuSO_4.5H_2O$ 1,5g
- K, Na tartrat 6g
- NaOH 30g

(Pha trong 1lít dung dịch)

Tiến hành

a. Chuẩn bị dãy dung dịch protein chuẩn

Chuẩn bị dãy dung dịch protein chuẩn có nồng độ tăng dần từ 0 – 20 mg/mL từ dung dịch protein gốc (BSA 20 mg/mL)

Ống nghiệm	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Nồng độ dung dịch (mg/mL)	0	4	8	12	16	20
Thể tích dd protein chuẩn (μL)	0	100	200	300	400	500
Thể tích dd NaCl 0,9% (μL)	500	400	300	200	100	0
Thể tích nước cất (mL)	1	1	1	1	1	1
Thuốc thử Biuret (mL)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

b. Chuẩn bị dung dịch phân tích:

Cho vào ống nghiệm:

- 500 µL dung dịch protein trứng (dung dịch phân tích)
- 1 mL nước cất
- 3,5 mL thuốc thử biuret

Sau khi chuẩn bị các dung dịch trên, lắc đều, để yên 20 phút. Quan sát dãy dung dịch và đo độ hấp thụ ở bước sóng 550 nm.

Vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ A vào nồng độ dung dịch protein chuẩn.

Từ giá trị độ hấp thụ của dung dịch phân tích, có thể suy ra nồng độ protein trong mẫu dựa vào đường chuẩn.

Tính kết quả:

Từ kết quả đọc được trên máy, ta xác định được nồng độ protein trứng trong dung dịch phân tích: x mg/mL.

Hàm lượng protein trong lòng trắng trứng được tính theo công thức sau:

C (mg/100g) = (50 x x x 100)/a

Trong đó:

x: nồng độ protein trứng trong dung dịch phân tích đọc được trên máy (mg/mL).

a: số gam lòng trắng trứng đem phân tích.

5.5.4. Định lượng protein theo phương pháp Lowry

Nguyên tắc

Cơ sở của việc định lượng protein theo phương pháp Lowry là dựa vào phản ứng màu của protein với thuốc thử Folin tạo thành phức chất có màu xanh hấp thu cực đại ở bước sóng 750nm. Cường độ màu của dung dịch tỉ lệ thuận với nồng độ protein.

Phương pháp này có độ nhạy cao, cho phép xác định dung dịch mẫu chứa vài chục microgam protein.

Hoá chất

- Dung dịch BSA chuẩn 200µg/mL pha trong dung dịch NaCl 0,9%.
- Dung dịch A: Na_2CO_3 2% trong NaOH 0,1N
- Dung dịch B: $CuSO_4$ 0,5% trong kali natri tartrat 1%
- Dung dịch C: Pha dung dịch A và B theo tỉ lệ thể tích 49:1 trước khi dùng.
- Thuốc thử Folin 1N:

+ Natri tungstate ($Na_2WO_4.2H_2O$): 100g

+ Natri molypdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$): 25g

+ Nước cất: 700mL

Cho vào bình cầu đun cho tan rồi bổ sung thêm:

+ Acid phosphoric 85%: 50mL

+ Acid chlohydric đậm đặc: 100mL

Đun sôi hỗn hợp trong ống sinh hàn trong 10 giờ. Dung dịch trở thành màu vàng hay xanh lá cây thẫm. Tiếp tục cho thêm:

+ Liti sulphate $LiSO_4$: 150g
+ Brom: 5 giọt
+ Nước cất: 50mL

Đun sôi trong 15 phút. Dung dịch thu được có màu vàng sáng. Nếu dung dịch có màu xanh thì phải xử lý với brom lần thứ hai. Sau khi làm nguội thêm nước cất đến 1 lít.

Xác định lại nồng độ thuốc thử Folin bằng cách chuẩn độ với NaOH 1N với chỉ thị phenolphtalein. Chứa dung dịch trong chai nâu, bảo quản trong tủ lạnh.

Tiến hành

a. Chuẩn bị dãy dung dịch protein chuẩn

Chuẩn bị dãy dung dịch protein chuẩn có nồng độ tăng dần từ 0 – 200 µg/mL từ dung dịch protein gốc (BSA 200 µg/mL), sau đó cho thêm các hoá chất vào 6 ống nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6
Nồng độ dung dịch (µg/mL)	0	40	80	120	160	200
Thể tích dd protein chuẩn (µL)	0	100	200	300	400	500
Thể tích dd NaCl 0,9% (µL)	500	400	300	200	100	0
Thể tích dung dịch C (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Thuốc thử Folin (µL)	250	250	250	250	250	250

b. Chuẩn bị dung dịch phân tích:

Cho vào ống nghiệm:

- 1000 µL dd dung dịch phân tích (Tính toán sao cho nồng độ protein trong dung dịch từ 20 –200 µg/mL)
- 4 mL dung dịch C
- 0,5 mL thuốc thử Folin

Sau khi chuẩn bị các dung dịch trên, lắc đều, để yên trong 30. Quan sát dãy dung dịch và đo độ hấp thụ ở bước sóng 750 nm.

Vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ A vào nồng độ dung dịch protein chuẩn.

Từ giá trị độ hấp thụ của dung dịch phân tích, có thể suy ra nồng độ protein trong mẫu phân tích dựa vào đường chuẩn.

5.6. ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN TỔNG SỐ THEO PHƯƠNG PHÁP KJELDAHL

Nguyên tắc

Khi đun sôi lâu mẫu vật có chứa nitrogen (đạm) trong H_2SO_4 đậm đặc với sự hiện diện của chất xúc tác thích hợp thì tất cả các hợp chất hữu cơ bị oxy hóa còn NH_3 được giải phóng ra liên kết với H_2SO_4 tạo thành $(NH)_2SO_4$.

$$\xrightarrow[\text{Xúc tác, } t^O]{H_2SO_4 \text{ đđ}} (NH_4)_2SO_4$$

Hợp chất chứa N

Ta có thể xác định lượng đạm này khi cho chúng tác dụng với NaOH, chúng sẽ được lôi cuốn bằng hơi nước và được cất qua bình hứng có chứa dung dịch acid sulfuaric (H_2SO_4) hay acid boric và hỗn hợp thuốc thử.

$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH = 2\ NH_4OH + Na_2SO_4$

$$NH_4OH \xrightarrow{t^o} NH_3 + H_2O$$

$NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$

Hoặc $NH_3 + 4H_3BO_3 \rightarrow (NH_4)_2B_4O_7$

Sau đó định lượng amoni tetraborate tạo thành bằng dung dịch H_2SO_4 0,005N theo phản ứng sau :

$(NH_4)_2B_4O_7 + H_2SO_4 + 5H_2O \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + 4H_3BO_3$

Hóa chất và dụng cụ

*** Dụng cụ**

- Máy cất đạm bán tự động Gerhardt
- Hệ thống vô cơ hóa Gerhardt
- Bình Kjeldahl 250 mL
- Các dụng cụ thủy tinh thông thường trong phòng thí nghiệm

*** Hóa chất**

- Dung dịch NaOH 10%
- Dung dịch H_2SO_4 0.01 N
- Dung dịch acid boric 2%
- H_2SO_4 đậm đặc
- Dung dịch bromoncresol green và methyl đỏ trong alcol
- K_2SO_4
- $CuSO_4$
- Selenium

Tiến hành

a. Sự vô cơ hóa

Cân chính xác 1 gam mẫu vật đã nghiền nhuyễn hay 1 mL (nếu mẫu vật ở dạng dung dịch), chuyển mẫu vật đã cân vào bình Kjeldahl có thể tích 50-100mL, sau đó thêm 5 mL H_2SO_4 đậm đặc. Để rút ngắn thời gian vô cơ hóa, ta thêm vào bình một lượng chất xúc tác cần thiết là 0,5 gam. Hỗn hợp chất xúc tác này gồm K_2SO_4: $CuSO_4$: Se (100:10:1).

Sau khi cho chất xúc tác vào bình, đem đun sôi trong máy vô cơ hóa Gerhardt đã được nối với hệ thống hấp thu khí độc cho đến khi dung dịch trong bình Kjeldahl trong suốt. Để nguội, ta kiểm tra kết thúc sự vô cơ hóa bằng cách cho vào bình một lượng nhỏ nước cất (thường bằng bình tia) rồi lắc nhẹ tráng thành bình, thấy không còn những hạt mụi đen li ti là được. Nếu còn ta phải đun tiếp tục cho đến hết.

Lưu ý: Khi vô cơ hóa ta cần thực hiện với 3 bình thử thật (có mẫu vật) và 3 bình thử không (không có mẫu vật).

b. Cất đạm

Sau khi vô cơ hóa kết thúc, mẫu được đem cất đạm trong máy cất bán tự động Gerhardt.

Chuẩn bị máy: cắm điện, bật máy, màn hình sẽ hiện lên chữ "H", mở vòi nước làm lạnh, chờ đến khi màn hình hiện chữ "P", máy đã sẵn sàng làm việc.

Cho 20 mL acid boric 2% vào bình tam giác 100 mL, thêm 2 giọt thuốc thử, lắp vào vị trí hứng mẫu trên máy. Chú ý nhúng ngập ống vào dung dịch.

Lắp ống Kjeldahl chứa mẫu đã vô cơ hóa vào hệ thống.

Cài đặt chương trình cho máy như sau:

- Nhấn RESET
- Nhấn PROGRAM
- Step 1: 01 (ứng với 10 mL NaOH 40%)
- Nhấn PROGRAM
- Step 2: 05 (ứng với thời gian phản ứng là 5 giây)
- Nhấn PROGRAM
- Step 3: 300 (ứng với thời gian sục hơi nước là 5 phút)
- Nhấn PROGRAM
- Step 4: 60 (ứng với hiệu suất làm việc của máy)
- Nhấn PROGRAM để được màn hình với chữ "P".
- Cho máy chạy bằng cách nhấn nút RUN

Kết thúc một lần thí nghiệm màn hình sẽ hiện lên chữ "End", ta thay ống phản ứng mới và tiếp tục nhấn RUN.

c. Định phân

Lấy bình tam giác ra khỏi máy sau khi đã tráng nước cất để lấy hết mẫu bám trên ống. Định phân bằng dung dịch H_2SO_4 0,1N cho đến khi dung dịch chuyển từ màu xanh lá sang màu hồng nhạt. Đọc thể tích trên buret.

Cách tính kết quả:

** Mẫu rắn:*

Hàm lượng nitơ (gam) có trong 100 gam mẫu được tính theo công thức sau:

$$N\% = \frac{(a - b) \times N_{H2SO4} \times 1,4}{m}$$

Trong đó:

- a: thể tích dung dịch H_2SO_4 chuẩn dùng chuẩn độ mẫu thật (mL)
- b: thể tích dung dịch H_2SO_4 chuẩn dùng chuẩn độ mẫu đối chứng (mL)
- N_{H2SO4} : Nồng độ đương lượng của dung dịch acid chuẩn
- m: Khối lượng mẫu đem phân tích (g)

** Mẫu lỏng:*

Hàm lượng nitơ (gam) có trong 1 lít mẫu được tính theo công thức sau:

$$N\% = \frac{(a - b) \times N_{H2SO4} \times 1,4}{V}$$

Trong đó:

- a: thể tích dung dịch H_2SO_4 chuẩn dùng chuẩn độ mẫu thật (mL)
- b: thể tích dung dịch H_2SO_4 chuẩn dùng chuẩn độ mẫu đối chứng (mL)
- N_{H2SO4} : Nồng độ đương lượng của dung dịch acid chuẩn
- V: thể tích mẫu đem phân tích (mL)

CHƯƠNG 6. KHẢO SÁT ENZYME

6.1. KHÁI QUÁT

Enzyme là những chất có bản chất là protein, đóng vai trò là chất xúc tác sinh học, xúc tác cho các phản ứng sinh hóa xảy ra trong cơ thể. Enzyme có tính đặc hiệu cao và có hiệu lực xúc tác lớn.

Enzyme có trong tế bào của các cơ thể sống, nhờ sự hiện diện của enzyme mà các phản ứng sinh hóa trong cơ thể xảy ra rất nhanh, nhạy ở điều kiện sinh lý bình thường của cơ thể sống.

6.2. KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CỦA ENZYME AMYLASE TỪ MẦM LÚA

6.2.1. Hệ enzyme amylase

Amylase là hệ enzyme rất phổ biến trong thế giới sinh vật.

Các enzyme này thuộc nhóm các enzyme thủy phân (hydrolase), chuyên xúc tác sự phân giải các liên kết glycoside trong phân tử polysaccharide với sự tham gia của nước.

- Cơ chất tác dụng của amylase là tinh bột và glycogen.

- Sản phẩm của sự thủy phân do amylase xúc tác là các thành phần đơn giản hơn như dextrin, maltose, glucose.

- Enzyme amylase có từ nhiều nguồn như: trong nước bọt, trong dịch tiêu hóa của người và động vật, trong hạt nẩy mầm, nấm mốc, nấm men và vi khuẩn.

- Tùy theo tính chất và khả năng tác dụng, người ta phân biệt: α- amylase, β - amylase và γ- amylase.

α - Amylase (EC 3.2.1.1)

- Không chỉ thủy phân hồ tinh bột mà nó thủy phân cả hạt tinh bột nguyên, song với tốc độ rất chậm.

- Có khả năng phân cắt các liên kết 1-4 glycoside nằm ở phía trong phân tử cơ chất (tinh bột, glycogen) một cách ngẫu nhiên.

- Sản phẩm của sự thủy phân tinh bột nhờ α-Amylase là các dextrin có phân tử lượng thấp (không có màu với iod), một ít maltose và rất ít glucose.

- pH tối thích cho α-amylase mầm lúa là 5,3

- Nhiệt độ tối thích: 58-60°C

- α-Amylase được hoạt hóa bởi Ca^{2+}, Cl^{-} và bị ức chế bởi Cu^{2+}, Ag^{+}, Hg^{2+}.

β - Amylase (EC 3.2.1.2)

- Chỉ thủy phân mạnh mẽ hồ tinh bột, cụ thể β-amylase phân giải 100% amylose thành maltose và 54-58% amylopectin.

- Có khả năng phân cắt liên kết α-1-4 glycoside từ các đầu không khử của các nhánh ngoài cùng, sự phân cắt sẽ dừng lại ở 1 vùng gần nhánh (liên kết 1-6) trong phân tử amylopectin.

- pH tối thích 4,5

- Nhiệt độ tối thích: 50°C

- β- Amylase được kích thích bởi Na^{+}, bị ức chế bởi Cu^{2+}, Hg^{2+}, urea, iodoacetamide, iod, ozon.

γ - Amylase (EC 3.2.1.3)

- Có khả năng xúc tác thủy phân cả liên kết α-1-4 lẫn α-1-6 glycoside tuần tự từng gốc glucose.
- Sản phẩm thủy phân là glucose.
- pH tối thích là 3,5 - 5,5
- Chất kích thích γ-Amylase là Ca^{2+}, Na^{+}, Cl^{-} và chất ức chế là Cu^{2+}, Hg^{2+}.
- Kém bền dưới tác dụng của rượu ethylic, aceton.

Trong bài thí nghiệm chúng ta dùng phức hệ amylase của mầm lúa để khảo sát sự thủy phân dung dịch hồ tinh bột.

6.2.2. Sự tạo màu giữa iod với tinh bột và các chuyển hóa của tinh bột khi thủy phân bằng amylase

Phức hệ amylase của mầm lúa có khả năng thủy phân tinh bột lần lượt thành các sản phẩm sau: Tinh bột (màu xanh với iod) → Amylodextrin (màu tím với iod), Erythrodextrin (màu tím đỏ với iod) → Acrodextrin (không kết hợp với iod nên không cho màu) → Maltodextrin (không kết hợp với iod) → Maltose và glucose (không kết hợp với iod).

Dựa vào sự biến đổi màu này đến khi sản phẩm thủy phân không cho màu với iod, ta có thể kết luận phản ứng thủy phân đã kết thúc.

Hóa chất

- Hồ tinh bột 1%
- Dung dịch đệm pH từ 2-8
- Dung dịch iod 1%
- Dung dịch $CuSO_4$ 2%
- Dung dịch $CaCl_2$ 1%

6.2.3. Ly trích và khảo sát hoạt tính tương đối của amylase mầm lúa

6.2.3.1. Ly trích amylase

Dùng khoảng 100 hạt lúa nẩy mầm cho vào cối sứ, nghiền nhuyễn với 3-5mL nước cất. Tiếp tục nghiền và thêm dần đến hết 50 mL nước cất để hòa tan enzyme. Lọc dung dịch qua rây bằng giấy lọc hoặc ly tâm 5.000-10.000 vòng/phút trong 15 phút. Thu dịch lọc có chứa enzyme amylase. Giữ lại để tiến hành thí các nghiệm sau.

6.2.3.2. Khảo sát hoạt tính tương đối của dịch chiết amylase mầm lúa

Dung dịch amylase thu được thường có hoạt tính xúc tác ít ổn định. Nó thay đổi tùy theo vào điều kiện thí nghiệm và các yếu tố môi trường. Do đó ta cần phải khảo sát hoạt tính tương đối của dung dịch enzyme amylase và chọn nồng độ thích hợp cho các thí nghiệm sau.

Chuẩn bị dung dịch thí nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm / *Dung dịch cho vào*	1	2	3	4	5	6	7	8
Hồ tinh bột 1% (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Nước cất (mL)	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8
Dung dịch đệm pH 5 (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Để ổn định ở 50°C								
Thể tích dịch enzyme (mL)	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2
Thời gian kết thúc thủy phân								

Sau khi pha xong dung dịch, ổn định nhiệt độ bể nước nóng ở 50°C, sau đó cho các ống nghiệm từ 1 đến 4 vào ổn định 5 phút.

Hút 1,6 mL dịch enzyme cho vào ống 1, đồng thời ghi nhận thời điểm đó. Dùng pipet loại 1 mL khuấy nhẹ dung dịch và lấy ra 1 giọt để thử màu với iod. Khi màu của dung dịch iod không thay đổi thì sự thủy phân tinh bột được coi là kết thúc. Ghi lại thời điểm kết thúc.

Lần lượt tiến hành các ống còn lại tương tự như ống 1.

Lưu ý: Sau khi kết thúc ống nghiệm 1, lấy ra khỏi bể nước nóng ta đưa ống 5 vào ổn định tiếp tục ở 50°C.

- Ghi nhận thời gian, lập bảng kết quả, bình luận và vẽ đồ thị.

- Chọn thể tích enzyme ở ống nghiệm nào có thời gian thủy phân tinh bột trung bình không nhanh không chậm (≈ 1 phút) cho các thí nghiệm kế tiếp.

Lưu ý:

* Cần lấy dung dịch chính xác, tránh nhầm lẫn.

* Luôn giữ nhiệt độ ổn định 50°C khi tiến hành thí nghiệm.

6.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ cơ chất lên tốc độ thủy giải của amylase

Chuẩn bị dung dịch thí nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm / *Dung dịch cho vào*	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ tinh bột tương ứng (mg/mL)	2	3	4	5	6	7	8
Hồ tinh bột 1% (mL)	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6
Nước cất (mL)	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4
Dung dịch đệm pH 5 (mL)	2	2	2	2	2	2	2
Để ổn định ở 50°C							
Thể tích dịch enzyme (mL)	Thể tích đã chọn ở thí nghiệm 1						
Thời gian kết thúc thủy phân							

Tiến hành thí nghiệm tương tự như trên. Ghi nhận thời gian, lập bảng kết quả, bình luận và vẽ đồ thị.

6.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của pH lên tốc độ thủy giải của amylase

Enzyme rất nhạy với sự thay đổi của pH môi trường, mỗi enzyme chỉ hoạt động mạnh nhất ở một vùng pH xác định, gọi là pH tối thích.

Chuẩn bị dung dịch thí nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm / *Dung dịch cho vào*	1	2	3	4	5	6	7
Hồ tinh bột 1% (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Nước cất (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Giá trị đệm pH	2	3	4	5	6	7	8
Thể tích dung dịch đệm pH (mL)	2	2	2	2	2	2	2
Để ổn định ở $50^{O}C$							
Thể tích dịch enzyme (mL)	Thể tích đã chọn ở thí nghiệm 1						
Thời gian kết thúc thủy phân							

Lưu ý:

* Cần ổn định các ống nghiệm 3, 4, 5 (tương ứng với pH 4, 5, 6) trước ống 1, 2, 6, 7. Ghi nhận thời gian kết thúc phản ứng thủy phân của mỗi ống nghiệm.

* Lập bảng kết quả, vẽ đồ thị và nhận xét.

6.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của chất hoạt hóa và chất ức chế

Chất hoạt hoá là những chất có tác dụng làm cho enzyme từ trạng thái không hoạt động trở thành hoạt động, từ hoạt động yếu trở thành hoạt động mạnh hơn... Các chất hoạt hoá thường có bản chất hoá học rất khác nhau: các chất hữu cơ phức tạp, các chất có tác dụng phục hồi những nhóm chức của trung tâm hoạt động enzyme, một số cation, anion.

Chất ức chế là chất có khả năng làm yếu hoặc làm chấm dứt hoàn toàn tác dụng của enzyme. Các chất ức chế có bản chất hoá học rất khác nhau có thể là các ion kim loại, hoặc các chất hữu cơ phức tạp...

Sau đây ta sẽ khảo sát những ảnh hưởng trên với dung dịch A ($CaCl_2$) và B ($CuSO_4$) là những dung dịch có chứa sẵn một số ion có khả năng gây kích thích hoặc ức chế sự xúc tác của amylase. Cách pha dung dịch được trình bày trong bảng sau:

Ống nghiệm / *Dung dịch cho vào*	1	2	3
Hồ tinh bột 1% (mL)	1	1	1
Nước cất (mL)	1	0	0
Dung dịch đệm pH=5 (mL)	2	2	2
Chất gây ảnh hưởng A (mL)	0	1	0
Chất gây ảnh hưởng B (mL)	0	0	1
Để ổn định ở $50^{O}C$			
Thể tích dịch enzyme (mL)	Thể tích đã chọn ở thí nghiệm 1		
Thời gian kết thúc thủy phân			

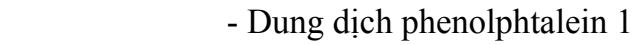
Ghi nhận thời gian, nhận xét, kết luận.

6.3. KHẢO SÁT ENZYME UREASE TRONG BỘT ĐẬU NÀNH

Nguyên tắc: Urease là enzyme có thể thủy giải urease theo phản ứng sau:

$(NH_2)_2CO + H_2O \rightarrow (NH_4)_2CO_3$

Nếu thêm formol vào môi trường, sẽ có phản ứng tạo thành hexamethylene tetramine và acid carbonic theo phản ứng sau:



$2\ (NH_4)_2CO_3 + 6\ HCHO \rightarrow (CH_2)_6N_4 + 6\ H_2O + H_2CO_3$

Acid tạo thành có thể được định phân bằng kiềm và xác định lượng urea bị thủy giải, từ đó suy ra hoạt tính của enzyme urease.

Hóa chất

- Dung dịch N/20.
- Dung dịch urea 2% (w/v).
- Formol trung hòa.
- Dung dịch urease: Khuấy 3 gam bột đậu nành trong 100 mL nước cất. Để yên trong 15 phút. Nước ở trên chứa nhiều urease. Đem lọc thu lấy dịch lọc.
- Dung dịch phenolphtalein 1% trong alcol.

Tiến hành

Chuẩn bị các ống nghiệm theo bảng sau:

Ống nghiệm	1	2
Thể tích dung dịch urea 2% (mL)	5	5
Thể tích dung dịch enzyme urease (mL)	5	0
Thể tích dd enzyme urease đã đun sôi (mL)	0	5

Ủ các ống nghiệm trên trong nước ấm ở 40°C trong 20 phút. Cho vào mỗi ống 5 mL formol đã được trung hòa, lắc đều trong vài phút. Lần lượt cho các dung dịch trong ống ra bình tam giác 100 mL, tráng ống với một ít nước cất. Định phân H_2CO_3 được giải phóng ra bằng dung dịch NaOH N/20 với phenolphtalein làm chỉ thị màu.

Kết quả

Hoạt tính enzyme urease được biểu thị bằng số mol urea bị thủy giải bởi lượng enzyme có trong 1 gam bột đậu nành trong thời gian 1 phút ở 40°C, hoạt tính được tính theo công thức sau:

$$\frac{(V_1 - V_2) \times A}{20 \times 10^3 \times 2 \times t \times a \times m} \quad \text{mol/ g/ phút}$$

Trong đó:

- V_1: Số mL NaOH N/20 dùng định phân ống 1
- V_2: Số mL NaOH N/20 dùng định phân ống 2
- a: Thể tích enzyme cho vào mỗi ống (mL)
- A: Tổng thể tích enzyme thu được từ m gam bột đậu nành (mL)
- t: Thời gian thủy phân (phút)

6.4. ENZYME HÓA NÂU

6.4.1. Khái quát về phản ứng hóa nâu

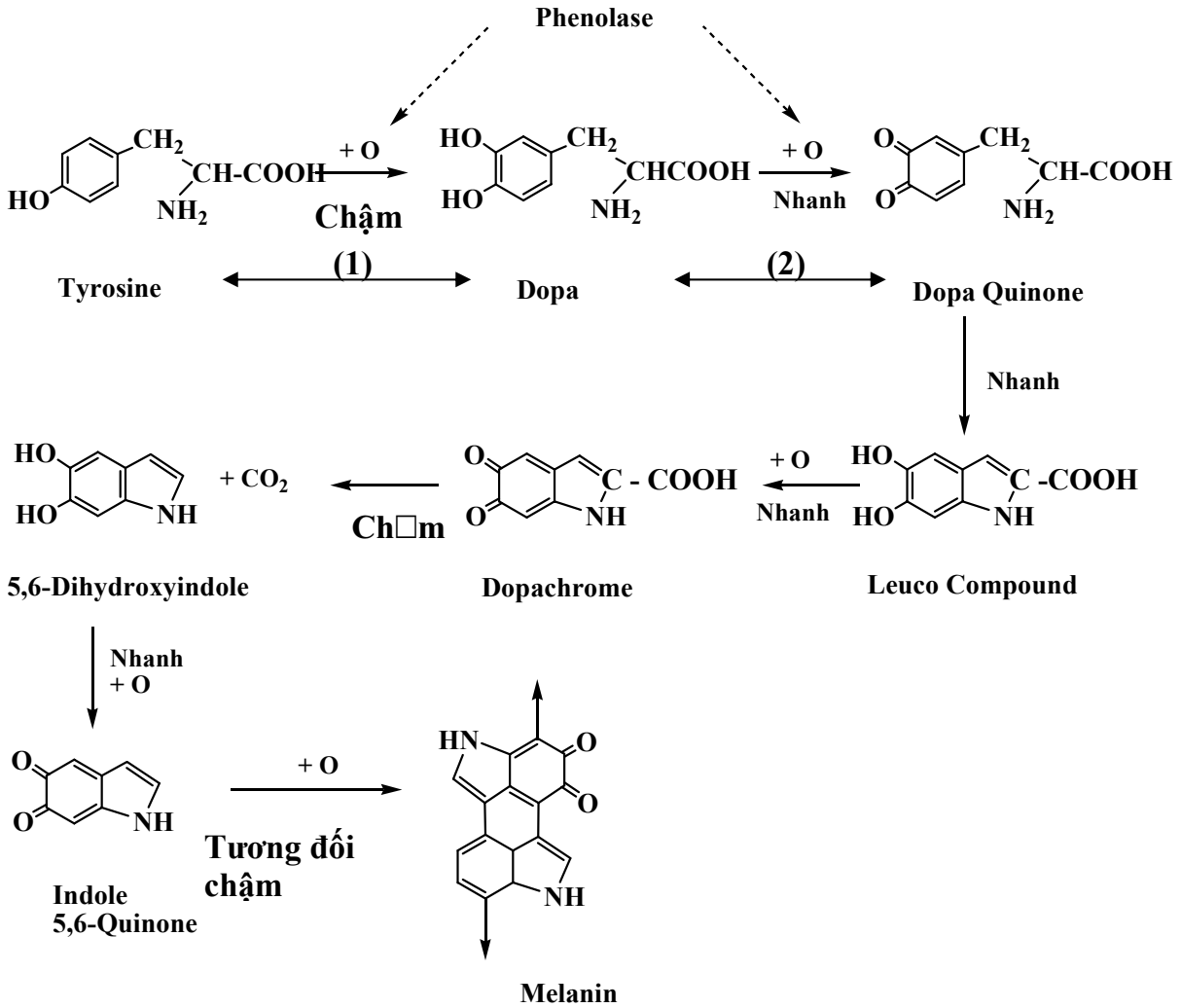
Có 4 loại phản ứng hóa nâu trong sản phẩm từ thực vật là phản ứng Maillard, sự caramel hoá, sự oxi hoá acid ascorbic và phản ứng hoá nâu do enzyme. Trong phản ứng hoá nâu do enzyme thì các hợp chất phenol thực vật thường được tạo thành sau khi thu hoạch rau quả, do thực vật bị tổn thương về vật lý hoặc do quá trình chế biến.

Thực vật chứa các enzyme oxy hóa khác nhau và chúng tạo ra sự chuyển hóa các hợp chất phenol cũng khác nhau. Ở đây đề cập đến hai enzyme quan trọng trong phản ứng hóa nâu là enzyme polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1) và enzyme peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7).

6.4.1.1. Enzyme polyphenol oxidase

Enzyme polyphenol oxidase hay phenolase tồn tại ở hai dạng tự do và liên kết rất hoạt động, trong đó chủ yếu ở dạng liên kết. Enzyme polyphenol oxidase chịu trách nhiệm khởi đầu phản ứng hóa nâu. Phản ứng được thực hiện khi có nhóm ngoại của đồng và oxygen, đồng có thể là hóa trị I trong trường hợp phenolase của nấm hay hóa trị II trong trường hợp của khoai tây. Enzyme polyphenol oxidase có khoảng hoạt động ở pH 5 - 7 và bị bất hoạt hoàn toàn khi pH thấp hơn 3.

**** Cơ chế phản ứng***



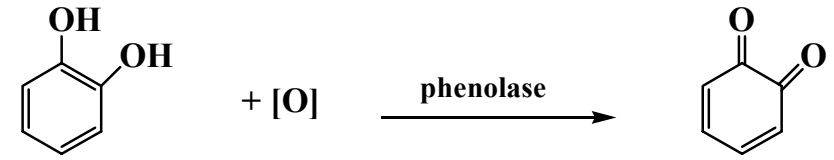
Cơ chế phản ứng hóa nâu do enzyme phenolase

Phản ứng hoá nâu do enzyme ít xảy ra ở mô còn nguyên vì cơ chất phenol và enzyme phenolase bị tách rời. Phản ứng hoá nâu xảy ra nhanh chóng ở mặt cắt ngang của trái cây và rau cải bởi sự oxy hoá phenol thành orthoquinine và sau đó chuyển thành các hợp chất màu hoặc melanin.

Hai loại phản ứng liên quan đến sự xúc tác phenolase là sự hydroxy hóa và oxy hoá. Tyrosine và acid chlorogenic là hai cơ chất chính của phenolase vì tốc độ phản ứng của chúng xảy ra tương đối nhanh, bên cạnh đó còn các cơ chất khác như catechol, acid caffeic , acid protocatechuic ...

Đối với phản ứng (1) tác chất là monophenol và đối với phản ứng (2) tác chất là diphenol. Theo sau phản ứng (2) là sự chuyển hydrogen để tạo thành dopachrome (acid 5,6-quinine indole-2-carboxylic) có màu đỏ. Dopachrome tạo thành chất melanin màu nâu bởi phản ứng polymer hóa.

Cũng như tyrosine, catechol là một ortho diphenol, dễ dàng bị tấn công bởi enzyme phenolase.

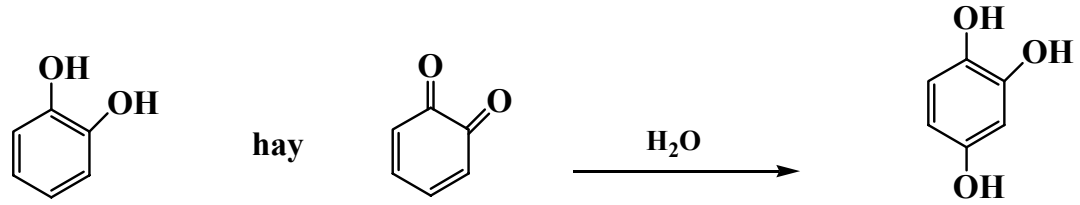


Catechol O-Benzoquinone

Sự tạo thành o-quinone do phenolase

Sự tạo thành quinon tùy thuộc vào enzyme và oxygen. Khi phản ứng này xảy ra, các phản ứng tiếp theo xảy ra không cần có sự hiện diện của phenolase hay oxygen.

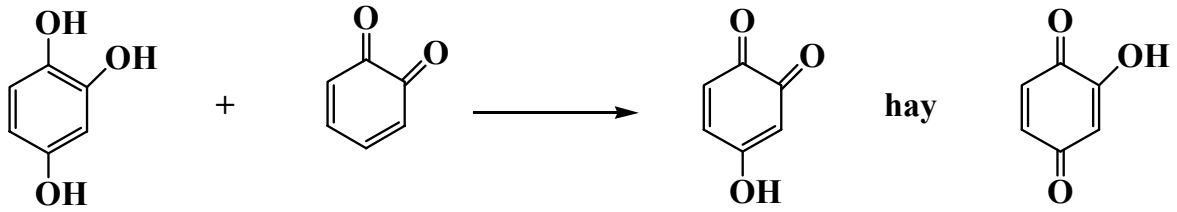
Phản ứng đầu tiên là hydroxyl hóa o-quinone hay o-diphenol.



Catechol O-Benzoquinone Trihydrobenzen

Sự hydroxyl hóa o-quinone.

Sản phẩm trihydrobenzen tiếp tục phản ứng với o-quinine để thành lập hydroxyl quinine.



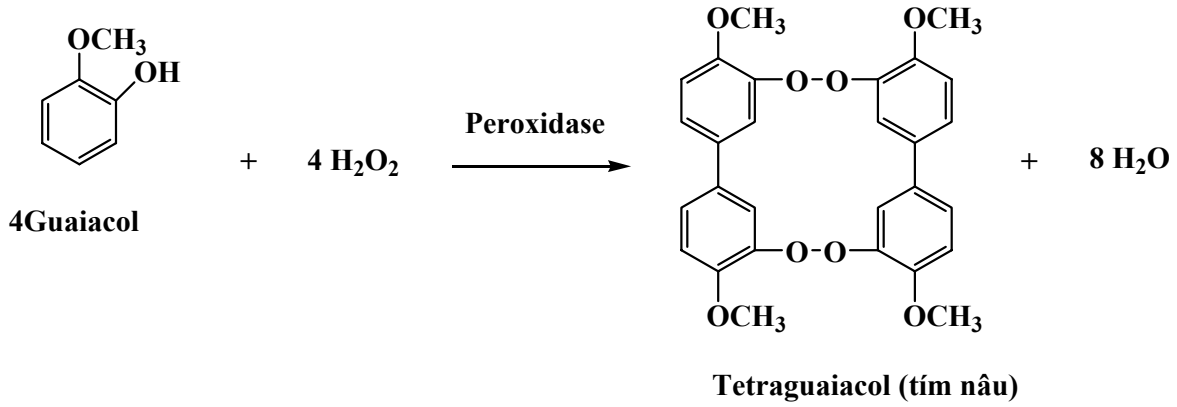
Phản ứng thành lập hydroxyquinone

Hydroxyquinone xảy ra sự đa phân hóa tạo thành hợp chất polymer màu nâu đỏ và cuối cùng xuất hiện melanin màu nâu.

6.4.1.2. Enzyme peroxidase

Enzyme peroxidase tồn tại ở hai dạng tự do và liên kết, enzyme này hiện diện trong nhiều thực vật, động vật và vi sinh vật. Hoạt tính tương đối của enzyme peroxidase trong dịch trích thô không thay đổi khoảng ít nhất là 5 tháng khi ở 4°C và giảm 2-3% trong 8 giờ phản ứng ở 25°C. Enzyme peroxidase xúc tác sự oxy hóa các hợp chất phenol thực vật nhưng không sử dụng trực tiếp được oxy phân tử của không khí mà phải dựa vào sự phân giải H_2O_2 để sử dụng oxy nguyên tử, oxy nguyên tử di chuyển đến phân tử chất nhận, chất thích hợp là phân tử hữu cơ guaiacol. Phản ứng này xảy ra nhanh khi có enzyme peroxidase. Để khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme peroxidase người ta thường dùng guaiacol. Một đơn vị guaiacol được định nghĩa như lượng enzyme oxy hóa 1 μmol của guaiacol trong 1 phút ở 25°C với pH 7. Enzyme POD xúc tác phản ứng giữa guaiacol với H_2O_2 tạo thành hợp chất tetraguaiacol có màu tím nâu. Dựa vào cường độ màu ta xác định được hoạt tính tương đối của enzyme bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 470 nm.

Phản ứng cụ thể như sau:



Phản ứng thành lập tetraguaiacol

Sản phẩm tetraguaiacol tạo thành sau phản ứng xúc tác của enzyme sẽ được khảo sát bởi sự chuyển màu của dung dịch sang màu nâu tím do sự oxy hóa guaiacol. Dưới sự xúc tác của peroxidase, guaiacol bị oxy hóa dần và màu tím nâu đậm dần theo thời gian. Nồng độ tetraguaiacol được tạo thành thể hiện qua cường độ màu của dung dịch sau phản ứng.

6.4.2. Khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme hóa nâu

6.4.2.1. Khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme polyphenol oxidase

**** Trích enzyme polyphenol oxidase***

Gọt sạch vỏ khoai tây, rửa sạch và bào mịn, sau đó cân khoảng 10 g rồi cho vào 50 mL dung dịch đệm pH 6,8 (pha 100 mL dung dịch đệm phosphate 0,1 M trong 0,4g NaF, chỉnh đến pH 6,8). Hỗn hợp sau đó được trộn đều bằng máy lắc và lọc bằng giấy lọc hoặc ly tâm lạnh để thu được dịch trích enzyme. Chú ý giữ mẫu kỹ trong nước đá lúc thao tác.

**** Đo hoạt tính tương đối của enzyme polyphenol oxidase***

Cho vào cuvette 2,5 mL dung dịch DOPA 4mM (DOPA: 3,4-dihydro-L phenylalanine trong đệm phosphate pH 6,8) (có thể dùng tyrosine) sau đó cho thêm 0,5 mL dịch trích enzyme và quan sát phản ứng hóa nâu ở 37°C bằng cách đo độ hấp thụ với máy quang phổ ở 475 nm trong 2 phút.

Chú ý: Có thể dùng các vật liệu khác để so sánh về hoạt tính của enzyme hóa nâu trích từ khoai tây, hoặc thay đổi điều kiện xử lý nhiệt hoặc pH để đánh giá hoạt tính của enzyme này.

6.4.2.2. Khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme peroxidase

**** Trích enzyme peroxidase***

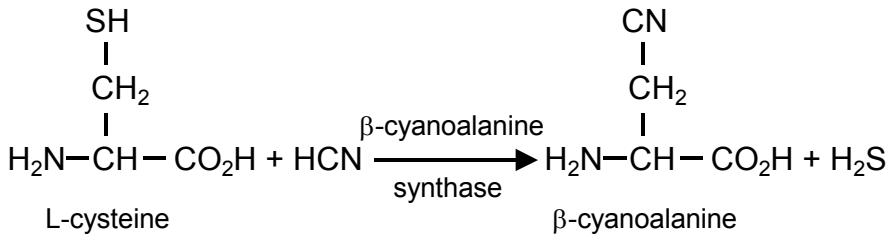
Hột sen sau khi đã bốc vỏ và lấy tâm sen sẽ được mài mịn và cân 10 g pha trong 100 mL dung dịch đệm phosphate pH 6. Hỗn hợp sau đó được trộn đều bằng máy lắc và lọc bằng giấy lọc hoặc ly tâm lạnh để thu được dịch trích enzyme.

**** Đo hoạt tính tương đối của enzyme peroxidase***

Phản ứng hóa nâu được thực hiện bằng cách cho lần lượt vào ống nghiệm 2,8 mL dung dịch đệm phosphate pH 6, sau đó cho thêm 50 µL guaiacol 27 mM và 50 µL H_2O_2 0,8%, 100 µL dịch trích enzyme được cho vào sau cùng để quan sát phản ứng hóa nâu. Hoạt tính tương đối của enzyme hóa nâu POD được tính bằng tốc độ tạo thành sản phẩm tetraguaiacol có màu nâu tím thông qua sự gia tăng độ hấp thu sau mỗi phút được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 475 nm.

6.5. KHẢO SÁT HOẠT TÍNH TƯƠNG ĐỐI CỦA ENZYME β-CYANOALANINE SYNTHASE

Năm 1963, Blumenthal–Goldschmidt và cộng tác viên đã mô tả sự xúc tác của enzyme β-cyanoalanine synthase (CAS) (EC 4.4.1.9) lên phản ứng giữa L-cysteine và HCN để tạo thành β-cyanoalanine và H_2S. Ngày nay phản ứng này đang được quan tâm như là phản ứng của quá trình chuyển hóa đạm.



6.5.1. Trích enzyme CAS

CAS có thể được trích dễ dàng từ lúa và các loài cây họ đậu. Sau khi được nghiền mịn trong nitơ lỏng, 1 g vật liệu đã nghiền sẽ được trích bằng 2,5 mL dung dịch tris buffer lạnh 0,1 M (pH 8,5). Sau khi ly tâm 10000 g/ 10 phút, dung dịch enzyme thu được có thể sẵn sàng được dùng cho sinh trắc nghiệm.

6.5.2. Khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme CAS

Để khảo sát hoạt tính tương đối của enzyme CAS, cho vào ống nghiệm 0,2 mL dịch trích enzyme, rồi thêm vào 0,8 mL dung dịch tris buffer (0,1 M, pH 8,5) chứa 25 mM sodium cyanide và 3 mM L-cysteine. Hỗn hợp được đậy kín bằng nắp cao su

mềm, ủ và lắc đều ở 35°C trong 30 phút. Hoạt tính của enzyme được quan sát bằng phản ứng hiện màu xanh methylene. Sau khi H_2S được phóng thích từ L-cysteine, 100 µL *N*, *N*-dimethyl-*p*-phenylene diamine 20 mM trong HCl 7,2 N và 100 µL $FeCl_3$ 30 mM trong 1,2 N HCl được thêm vào bằng cách bơm qua nắp ống nghiệm. Màu của xanh methylene xuất hiện do sự hiện diện của H_2S được xác định bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 650 nm, sử dụng Na_2S làm chất chuẩn.

CHƯƠNG 7. KHẢO SÁT ACID NUCLEIC

7.1. KHÁI QUÁT

Acid nucleic là các polymer của nhiều mononucleotide kết hợp với nhau bằng liên kết phosphodiester.

Acid nucleic gồm hai nhóm lớn: Acid deoxyribonucleic (ADN) và acid ribonucleic (ARN). ADN có khối lượng phân tử lớn hơn ARN, gồm hai sợi polynucleotide xoắn ngược chiều nhau nhờ các liên kết hydro giữa các base nitơ. ARN có cấu tạo 1 sợi polynucleotide.

Acid nucleic là các polyanion, dễ hòa tan trong dung dịch kiềm hoặc muối loãng, dựa vào tính chất này để chiết tách chúng ra khỏi các nguồn nguyên liệu sinh vật. Dưới tác dụng của các enzyme nuclease hoặc đun nóng acid nucleic với acid, kiềm ở nhiệt độ cao, acid nucleic bị thủy phân thành các mononucleotide. Mỗi mononucleotide được cấu tạo gồm các base nitơ, đường pentose và acid phosphoric.

Base nitơ gồm hai loại: base nitơ purine (Adenine và Guanine), base nitơ pyrimidine (Cytosine, Thymine và Uracil). Các base nitơ là dẫn xuất của các hợp chất vòng thơm, có khả năng hấp thụ ánh sáng ở vùng tử ngoại với bước sóng từ 250nm đến 280nm.

Đường pentose gồm hai loại: ribose và deoxyribose. Các phản ứng màu đặc trưng của ribose (phản ứng orcinol) và deoxyribose (phản ứng Feugel hoặc diphenylamin), là cơ sở để phát hiện ADN và ARN.

Trong tế bào acid nucleic thường được kết hợp với protein dưới phức hợp nucleoprotein, nên trước khi ly trích acid nucleic cần phải dùng các chất tẩy rửa và các chất làm biến tính protein để ADN hoặc ARN dễ dàng phóng thích ra môi trường.

7.2. PHƯƠNG PHÁP LY TRÍCH ACID NUCLEIC

7.2.1. Ly trích ADN từ tế bào vi khuẩn

Nguyên tắc

Phương pháp ly trích cơ bản gồm ba bước:

+ Phá vỡ màng tế bào và màng nhân

+ Loại bỏ protein

+ Làm kết tủa acid nucleic

Hóa chất

- Tế bào vi khuẩn *(E.Coli* hoặc *B.Subtilus*)
- Dung dịch muối-EDTA (NaCl 0,15M và EDTA 0,1M, pH = 8)
- Sodium dodecyl sulphate (SDS) 25%
- Dung dịch lysozyme 10mg/mL
- Natri perchlorate 5M
- Chloroform: isoamylic : 24:1
- Ethanol 95%
- Dung dịch đệm (NaCl 150mM và citrate 15mM, pH 7)

Tiến hành

Nghiền 2-3 gam tế bào vi khuẩn trong 25 mL dung dịch muối- EDTA, thêm vào 1 mL lysozyme và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Sau đó cho vào hỗn hợp trên 2 mL SDS 25%, lắc đều và đem đun cách thủy ở 60°C trong 10 phút.

Làm lạnh hỗn hợp đến nhiệt độ phòng, thêm vào 9 mL dung dịch natri perchlorate 5M, sau đó dẫn thêm nước sao cho đạt đến nồng độ muối 1M. Lắc đều, thêm vào 1 thể tích chloroform- isoamyl alcol 24:1 bằng với thể tích dịch chiết (khoảng 40-45mL). Lắc đều hỗn hợp trong 20-30 phút. Ly tâm dịch huyền phù trong 5 phút với tốc độ 13.000 vòng/phút. Hút cẩn thận phần nước nổi chứa ADN ở trên vào 1 ống nghiệm khác, cho vào thành ống nghiệm 2 lần thể tích ethanol 95%, ly tâm hỗn hợp 3000 vòng/phút trong 10 phút .

Lấy phần tủa, tiếp tục cho vào 10 mL dung dịch muối - EDTA để hòa tan tủa, rửa lại 1 lần nữa với chloroform- isoamyl alcol 24:1. Ly tâm lấy phần nước nổi và kết tủa 1 lần nữa với ethanol 95%. Lấy phần tủa chứa ADN hòa tan trong 10 mL dung dịch muối - citrate để dùng cho các thí nghiệm sau.

7.2.2. Ly trích ARN

Nguyên tắc

ARN không bền nên dễ bị phân hủy bởi các ARNase. Do đó khi ly trích ARN cần phải thận trọng, thao tác trong điều kiện vô trùng, đeo bao tay. Ly trích ARN gồm các bước tương tự như ly trích ADN.

Hoá chất

- Men bánh mì
- Phenol
- Ethanol tuyệt đối lạnh
- Ethanol 70% lạnh
- Kali acetate
- Nước cất vô trùng

Tiến hành

Cân khoảng 0,3 gam men bánh mì trong ống eppendorf 2 mL. Rửa sinh khối tế bào bằng cách huyền phù tế bào với 1,5mL nước cất. Trộn mẫu đều bằng máy mixer, ly tâm 5000 vòng/phút để thu nhận sinh khối.

Huyền phù hóa sinh khối trong 0,4 mL nước cất đã được làm ấm đến 37°C. Ủ ở nhiệt độ này trong 15 phút.

Thêm vào eppendorf 0,6 mL phenol. Vortex có thể nhiều lần sao cho tổng thời gian vortex khoảng 20-30 phút, ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút ở điều kiện lạnh.

Thu lấy dịch chứa ARN vào một eppendorf. Ly tâm ở tốc độ trên 7000 vòng/phút trong lạnh để tủa protein, thu lấy dịch lớp trên vào một ống eppendorf khác, thêm 10mg kali acetate, hòa tan bằng cách đảo và lắc nhẹ, thêm vào đó 1mL acetate đã ướp lạnh. Đảo ống vài lần. Để yên 1 giờ trong nước đá lạnh. Ly tâm trên 7000 vòng/phút trong 15 phút ở điều kiện lạnh. Hút bỏ dịch nổi thu nhận cặn tủa chứa ARN. Rửa tủa ARN bằng cách thêm nhẹ nhàng 0,5mL ethanol 70%. Ly tâm như trên để thu nhận ARN.

Làm khô ARN trong bồn hút chân không. Bảo quản trong tủ lạnh dưới 0°C.

7.3. ĐỊNH TÍNH ACID NUCLEIC

7.3.1.Tính tan của acid nucleic

Acid nucleic tan tốt trong môi trường kiềm, không tan trong nước và dung dịch acid acetic loãng. Trong nước acid nucleic tạo thành dung dịch keo, do đó dễ dàng bị kết tủa bởi các chất háo nước.

Hoá chất

- Dung dịch ARN 0,1% nấm men.
- Dung dịch 0,1% ADN từ vi khuẩn
- HCl 0,1N.
- NaOH 0,1N.
- Ethanol 96%
- Isopropanol

Tiến hành

Lấy hai ống nghiệm, cho lần lượt vào mỗi ống 0,5 mL ADN 0,1%; 0,5 mL ARN 0,1%, thêm vào mỗi ống 0,5 mL HCl 0,1N, kết tủa trắng của acid nucleic được tạo thành. Thêm từng giọt NaOH 0,1N kết tủa hòa tan trở lại. Giải thích kết quả.

Lấy hai ống nghiệm, cho lần lượt vào mỗi ống 1 mL dung dịch ADN 0,1%; 1 mL ARN 0,1%, thêm vào mỗi ống 2 mL ethanol 96% lạnh hay 0,6 mL isopropanol, kết tủa trắng của acid nucleic xuất hiện.

7.3.2. Các phản ứng màu của acid nucleic

a. Phản ứng với xanh methylene

Nguyên tắc: Trong môi trường acid, acid nucleic kết hợp với xanh methylene tạo kết tủa màu xanh.

Hoá chất

- Acid nucleic 0,1%
- Acid acetic 0,1N
- Dung dịch xanh methylene 0,1%

Tiến hành

Cho vào ống nghiệm 1 mL dung dịch acid nucleic 0,1%, thêm từng giọt acid acetic 0,1N vào đến khi dung dịch hơi vẫn đục. Cho khoảng 5-6 giọt dung dịch xanh methylene 0,1% tạo thành kết tủa xanh da trời.

b. Các phản ứng màu phân biệt ADN và ARN

Các phản ứng này dựa trên sự khác biệt giữa hai loại đường deoxyribose và ribose của ADN và ARN.

**** Phản ứng của ADN với diphenylamine***

Nguyên tắc: Deoxyribose có trong thành phần ADN tác dụng với diphenylamine trong môi trường acid tạo thành hợp chất màu xanh hấp thụ ở bước sóng 595nm. Phản ứng này là cơ sở của phương pháp định lượng ADN bằng phương pháp so màu.

Hoá chất:

- ADN, ARN thương mại
- Dung dịch đệm (muối NaCl 150mM và natri citrate 15mM, pH 7)

- Thuốc thử diphenylamine (1g diphenylamine trong 100 mL acid acetic đậm đặc, thêm 0,25mL acid sulfuric đậm đặc).

Tiến hành:

Hòa tan 1mg acid nucleic trong 5mL dung dịch đệm muối

Cho vào hai ống nghiệm, mỗi ống 1mL dung dịch ADN hoặc ARN, thêm vào mỗi ống 2 ml thuốc thử diphenylamine. Lắc đều, đem 2 ống nghiệm đun cách thủy đang sôi trong 10 phút. Quan sát sự hình thành màu ở hai ống nghiệm. Giải thích.

**** Phản ứng của ARN với thuốc thử orcinol***

Nguyên tắc: Đây là phản ứng của đường ribose có trong thành phần ARN sẽ tạo thành furfural khi đun nóng với acid chlohydric đậm đặc. Sau đó orcinol sẽ phản ứng với furfural với sự xúc tác của clorua sắt III tạo thành hợp chất màu xanh lục. Phản ứng này là cơ sở của phương pháp định tính và định lượng ARN.

Hoá chất

- Dung dịch ADN và ARN chuẩn bị như trên
- Thuốc thử orcinol (0,1 gam $FeCl_3.H_2O$ pha trong 100 mL HCl đậm đặc, thêm 3,5 mL orcinol 6% trong alcohol).

Tiến hành

Cho vào hai ống nghiệm, lần lượt mỗi ống 1 mL dung dịch ADN hoặc ARN, thêm vào mỗi ống 1,5 mL thuốc thử orcinol. Lắc đều, đem 2 ống nghiệm đun cách thủy đang sôi trong 20 phút. Quan sát sự hình thành màu ở hai ống nghiệm. Giải thích.

7.4. ĐỊNH LƯỢNG ACID NUCLEIC

7.4.1. Định lượng ADN

7.4.1.1. Định lượng ADN bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm

Nguyên tắc

Trong thành phần ADN chứa các base nitơ có khả năng hấp thụ ánh sáng vùng tử ngoại và hấp thụ cực đại ở bước sóng 260nm, độ hấp thụ A tỉ lệ với nồng độ ADN trong dung dịch.

Hóa chất

- Dung dịch ADN chuẩn 50µg/mL
- Dung dịch ADN vừa ly trích

Thực hành

Cho 1mL dung dịch ADN (chuẩn hoặc mẫu phân tích) vào cuvette thạch anh và đo độ hấp thụ ánh sáng ở 260nm. Mẫu đối chứng là dung dịch dùng để pha ADN.

Chú ý: nếu độ hấp thụ mẫu ADN phân tích lớn hơn 1 thì cần pha loãng dung dịch.

Từ độ hấp thụ A của mẫu ADN chuẩn và mẫu ADN cần phân tích tính ra lượng ADN có trong dung dịch cần phân tích:

Ta có: $A_x = \varepsilon C_x l$

$A_{ch} = \varepsilon C_{ch} l$

Khi l = hằng số → $\frac{A_X}{A_{ch}} = \frac{C_X}{C_{ch}} \rightarrow C_X = C_{ch}\frac{A_X}{A_{ch}}$

hay : $C_X = C_{ch} \bullet \frac{A_X}{A_{ch}} \bullet n$

trong đó :

A_x: độ hấp thụ của dung dịch ADN cần phân tích ở 260nm

A_{ch} : độ hấp thụ của dung dịch ADN chuẩn ở 260nm

C_{ch} : nồng độ dung dịch ADN chuẩn (µg/mL)

C_x: nồng độ dung dịch ADN cần phân tích (µg/mL)

n : hệ số pha loãng

Lưu ý: Phương pháp này đơn giản, nhanh, nhưng có hạn chế là độ hấp thụ A có thể bị ảnh hưởng khi trong mẫu chứa ARN và protein. Vì vậy, thực tế phương pháp này thường được sử dụng để định lượng mẫu ADN tinh khiết.

7.4.1.2. Định lượng ADN theo phương pháp Dise

Nguyên tắc: Khi đun nóng dung dịch ADN với thuốc thử diphenylamine tạo thành hợp chất có màu xanh hấp thụ ở bước sóng cực đại 595nm.

Hoá chất

- Dung dịch ADN chuẩn 500µg/mL
- Dung dịch ADN cần phân tích
- $HClO_4$ 0,5N (hoặc TCA 5%)
- Thuốc thử diphenylamine

Tiến hành

a. Xây dựng đường chuẩn ADN

Pha dãy dung dịch ADN có nồng độ từ 0 - 500 (µg/mL) từ dung dịch ADN chuẩn 500 (µg/mL). Sau đó cho các hóa chất theo bảng sau:

Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ ADN (µg/mL)	0	50	100	200	300	400	500
Thể tích dung dịch ADN gốc (µL)	0	40	80	160	240	320	400
Thể tích dd đệm (mL)	400	360	320	240	160	80	0
Thể tích dd $HClO_4$(mL)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6

Đậy kín và lắc đều các ống nghiệm, đem đun cách thủy đang sôi trong 30 phút. Sau đó làm nguội dung dịch rồi thêm vào mỗi ống nghiệm 4 mL thuốc thử diphenylamine. Tiếp tục đun cách thủy đang sôi 20 phút. Để nguội và đo độ hấp thụ ở bước sóng 595nm. Vẽ đồ thị tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ ADN.

b. Chuẩn bị mẫu

Tiến hành tương tự như các ống ADN chuẩn, nhưng thay vào đó là dung dịch ADN cần phân tích. Đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 595nm

Từ kết quả độ hấp thụ, đối chiếu với đồ thị chuẩn ADN tính ra lượng ADN trong mẫu.

7.4.2. Định lượng ARN

7.4.2.1. Định lượng ARN bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm

Nguyên tắc: tương tự như phương pháp định lượng ADN

Hóa chất

- Dung dịch ARN chuẩn 40µg/mL
- Dung dịch ARN vừa ly trích

Tiến hành

Cho 1mL dung dịch ARN (chuẩn hoặc mẫu phân tích) vào cuvette thạch anh và đo độ hấp thụ ánh sáng ở 260nm. Mẫu đối chứng là dung dịch dùng để pha ARN.

Chú ý: nếu độ hấp thụ mẫu ARN phân tích lớn hơn 1 thì cần pha lõang dung dịch.

Từ độ hấp thụ A của mẫu ARN chuẩn và mẫu ARN cần phân tích tính ra lượng ARN có trong dung dịch cần phân tích:

Ta có: $A_x = \varepsilon C_x l$

$A_{ch} = \varepsilon C_{ch} l$

Khi l = hằng số → $\frac{A_X}{A_{ch}} = \frac{C_X}{C_{ch}} \rightarrow C_X = C_{ch}\frac{A_X}{A_{ch}}$

hay : $C_X = C_{ch} \bullet \frac{A_X}{A_{ch}} \bullet n$

trong đó :

A_x: độ hấp thụ của dung dịch ARN cần phân tích ở 260nm

A_{ch} : độ hấp thụ của dung dịch ARN chuẩn ở 260nm

C_{ch} : nồng độ dung dịch ARN chuẩn (µg/mL)

C_x: nồng độ dung dịch ARN cần phân tích (µg/mL)

n : hệ số pha lõang

Phương pháp này có những ưu và nhược điểm như đối với phương pháp định lượng ADN.

7.4.2.2. Định lượng ARN theo phương pháp Meibaum

Nguyên tắc: Khi đun nóng dung dịch ARN với thuốc thử orcinol sẽ tạo thành hợp chất có màu xanh lá cây hấp thụ ở bước sóng cực đại 670nm. Cường độ màu tỉ lệ với hàm lượng ARN trong dung dịch.

Hoá chất

- Dung dịch ARN chuẩn 500µg/mL
- Dung dịch ARN cần phân tích
- Dung dịch H_2SO_4 10%
- Thuốc thử orcinol

Tiến hành

a. Xây dựng đường chuẩn ARN

Pha dãy dung dịch ARN có nồng độ từ 0 – 500 (µg/mL) từ dung dịch ARN chuẩn 500 (µg/mL). Sau đó cho các hóa chất theo bảng sau:

Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	7
Nồng độ ARN (μg/mL)	0	50	100	200	300	400	500
Thể tích dd ARN gốc (μL)	0	40	80	160	240	320	400
Thể tích dd đệm (mL)	400	360	320	240	160	80	0
DD H_2SO_4 10% (mL)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6

Đậy kín và lắc đều các ống nghiệm, đem đun cách thủy đang sôi trong 30 phút. Sau đó làm nguội dung dịch rồi thêm vào mỗi ống nghiệm 2 mL thuốc thử orcinol. Lắc đều và tiếp tục đun cách thủy đang sôi 20 phút. Để nguội và đo độ hấp thụ ở bước sóng 670nm. Vẽ đồ thị tương quan giữa độ hấp thụ và nồng độ ARN.

b. Chuẩn bị mẫu

Tiến hành tương tự như các ống ARN chuẩn, nhưng thay vào đó là dung dịch ARN cần phân tích. Đem đo độ hấp thụ ở bước sóng 670nm.

Từ kết quả độ hấp thụ đo được, đối chiếu với đồ thị chuẩn ARN tính ra lượng ARN trong mẫu.

CHƯƠNG 8. PHỤ CHƯƠNG

8.1. XÁC ĐỊNH ACID BÉO BẰNG SẮC KÝ KHÍ

Sắc ký khí là một phương pháp nhanh và chính xác dùng để định tính và định lượng nhiều hợp chất dựa trên các chất chuẩn. Sau đây xin giới thiệu một phương pháp xác định acid béo bằng sắc ký khí.

Dụng cụ và hóa chất

- Máy sắc ký khí
- Ống bơm mẫu (syringe)
- Bếp đun cách thủy
- Bình tam giác 100ml
- Bình chiết 250ml
- Phểu lọc
- Giấy lọc
- Máy cô quay chân không
- KOH 0,5N
- Boron trifluoride methanol
- Hexan
- Na_2SO_4

Tiến hành

Methyl hóa mẫu

Cân 100g dầu thực vật trong bình tam giác 100 mL có nắp đậy (ví dụ như dầu đậu phộng được trích bằng máy Soxhlet). Tiếp tục cho thêm 5 mL KOH 0,5N rồi đun cách thủy ở 80^0C trong 5 phút. Thêm vào 5ml hỗn hợp boron trifluoride methanol và tiếp tục đun cách thủy ở 80^0C trong 5 phút. Cho thêm 5 mL n-hexane và tiếp tục đun cách thủy ở 80^0C trong 1 phút. Thêm vào bình tam giác 50 mL hexane sẽ thu được một hỗn hợp phân lớp. Dùng bình chiết tách hai dung dịch trong hỗn hợp. Lớp dưới là dung dịch muối bão hòa. Lớp trên là dung dịch chứa acid béo trong hexane sẽ được dehydrate hóa bằng cách thêm vào một ít Na_2SO_4 rồi lọc bằng giấy lọc. Dung dịch lọc thu được sẽ được đem cô quay chân không rồi thêm vào 5 mL hexane để thu được dung dịch đã methyl hóa sẵn sàng dùng cho sắc ký khí.

Phân tích bằng sắc ký khí

Sắc ký khí được chuẩn bị trong điều kiện sau:

- Cột mao quản PEG-20M (kích thước 30m x 0,25mm).
- Detector: FID (Flame Ionization Detector).
- Nhiệt độ khởi đầu (initial temperature): 145^0C.
- Thời gian khởi đầu (initial time): 5 phút.
- Nhiệt độ lúc bơm mẫu (injection temperature): 210^0C.
- Chương trình gia nhiệt (program rate): 4^0C/ phút.
- Nhiệt độ của detector (detector temperature): 210^0C.
- Nhiệt độ cuối cùng (final temperature): 210^0C.
- Thời gian phân tích (final time): 40 phút.
- Khí mang (carrier gas): He.

- Các thông số cung cấp khí nạp vào máy sắc ký khí:

+ Nguồn khí He: 0,5 Mpa.

+ Không khí: 0,5 kg/ cm^2.

+ H_2: 0,6 kg/ cm^2.

+ Carrier (P1): 1 kg/ cm^2.

+ Carrier (P2): 1,8 kg/ cm^2.

- Sau khi kiểm tra các thông số trên máy hoàn chỉnh có thể bơm mẫu chuẩn vào để phân tích. Sau khi phân tích mẫu chuẩn thì bơm tiếp mẫu phân tích. Thể tích mẫu bơm vào được methyl hóa trong hexan (injection volumn) là 1µL.

So sánh thời gian lưu mẫu (retention time) của mẫu phân tích và mẫu chuẩn bởi các đỉnh (peak) của đường biểu diễn để suy ra loại acid béo tương ứng. Lượng acid béo của mẫu phân tích được xác định bằng cách so sánh diện tích các đỉnh của đường biểu diễn mẫu chuẩn với mẫu phân tích có thời gian lưu tương đương nhau được cho bởi máy sắc ký khí sau khi phân tích. Nồng độ của một acid béo Cn nào đó có thể được tính như sau:

$$Cn = \frac{Sn \times Cs}{Ss}$$

Trong đó:

- Cn là nồng độ chất cần tìm
- Sn là diện tích của đường biểu diễn mẫu phân tích n
- Cs là nồng độ của chất chuẩn
- Ss là diện tích của đường biểu diễn mẫu chuẩn

8.2. XÁC ĐỊNH VITAMIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG CAO ÁP (HPLC)

Các thiết bị phân tích ngày càng được phổ biến và thay dần các phương pháp phân tích cũ. Nội dung của phần này nhằm đưa ra cho người học các phương pháp phân tích vitamin cơ bản bằng máy sắc ký lỏng cao áp mà phòng thí nghiệm chuyên sâu có trang bị. Các phương pháp phân tích sau dựa trên điều kiện cơ bản của máy sắc ký lỏng của nhà sản xuất Shimadzu và Hitachi.

8.2.1. Phân tích vitamin A và vitamin D

Vitamin A và vitamin D là vitamin thuộc nhóm tan trong chất béo. Bài thực hành sử dụng vitamin A acetate và vitamin D_3. Dung môi dùng để pha hai vitamin này là acetonitrile và methanol theo tỉ lệ 75:25 (v/v).

- Chuẩn bị mẫu: Dùng hai ống nghiệm nhỏ có nắp cở 2 mL. Cân lần lượt 1g vitamin A và 1g vitamin D cho vào mỗi ống nghiệm. Tiếp tục cho 2 mL dung dịch acetonitril và methanol vào mỗi ống nghiệm để hòa tan vitamin, đậy nắp ống nghiệm và trộn đều bằng máy lắc. Mẫu đã sẵn sàng cho phân tích.

- Chuẩn bị máy sắc ký: Có thể dùng cột sắc ký Inertsil ODS-80A 5µM (250 x 4,6mm). Cột sắc ký được rửa bằng 70% MeOH với bơm B (pump B) tối thiểu là 1 giờ.

Dung môi cho pha di động là acetonitrile : methanol theo tỉ lệ 75:25 (v/v), tốc độ bơm 1 mL/ phút (pump A). Nhiệt độ cột sắc ký 40°C (Column oven). Detector: UV 280 nm.

- Tiến hành phân tích: Mẫu chứa vitamin sẽ được bơm vào máy với thể tích là 1μL. Vitamin A và vitamin D được phân tích trong cùng một điều kiện nêu trên với hai mẫu được phân tích riêng lẻ. Với điều kiện phân tích nêu trên thì vitamin A acetate sẽ cho thời gian lưu (retention time) khoảng 7,2 phút và vitamin D_3 sẽ cho thời gian lưu khoảng 2,4 phút.

8.2.2. Phân tích vitamin E

Vitamin E là vitamin thuộc nhóm tan trong chất béo. Vitamin E có thể được trích từ dầu thực vật như dầu đậu phộng.

- Chuẩn bị mẫu: Cân 2 g dầu đậu phộng đã được trích bằng phương pháp Soxhlet. Sau đó cho vào lần lượt 0,5 mL dung dịch muối NaCl 1%, 10 mL pyrogallol-ethanol 3% và 1 mL dung dịch KOH 60% rồi đun ở 70°C trong 30 phút sau đó làm nguội ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Tiếp tục cho 22,5 mL dung dịch muối NaCl 1%, và 15 mL dung dịch ethyl acetate-hexane rồi trộn mẫu đều bằng máy lắc trong 5 phút. Mẫu sau đó sẽ được đem ly tâm ở 2000 rpm trong 5 phút. Sau khi ly tâm sẽ thu được vitamin E trong dung môi ở phần bên trên ống nghiệm, phần bên dưới chứa nước. Rút lấy phần bên trên của ống nghiệm và tiếp tục cho vào 15 mL dung dịch ethyl acetate-hexane rồi trộn mẫu đều bằng máy lắc trong 5 phút. Mẫu sau đó sẽ được đem ly tâm ở 2000 rpm trong 5 phút. Quá trình này có thể lập lại trong 2-3 lần để thu được mẫu tốt sẵn sàng dùng cho phân tích.

- Tiến hành phân tích: Mẫu sau khi được trích sẽ được làm khô bằng khí nitơ rồi hòa tan bằng 50 mL hexane để sử dụng cho phân tích bằng HPLC. Máy sắc ký lỏng cao áp sẽ được lắp với cột sắc ký Finepak SIL 5μm (250 x 4.6 mm) và úm ở nhiệt độ 40^0C. Trước khi phân tích, cột sắc ký được rửa bằng hexane với tốc độ bơm từ 1,2 – 1,5 mL/ phút (pump A). Tiến trình phân tích được thực hiện với pha di động chứa acid acetic : 2-propanol : n-hexan (5 : 6 : 1000 v/ v/ v) với tốc độ 1,5 mL/ phút (pump B). Detector: Fluorescent detector (excitation 298 nm, emision 325 nm). Mẫu chứa vitamin E sẽ được bơm vào máy với thể tích là 1μL để phân tích. Mẫu vitamin E chuẩn cũng được tiến hành tương tự để so sánh với mẫu phân tích.

8.2.3. Phân tích vitamin K

Vitamin K là vitamin thuộc nhóm tan trong chất béo. Ở đây giới thiệu phương pháp phân tích vitamin K với mẫu chuẩn là vitamin K1.

- Chuẩn bị mẫu: Cân 1 mg vitamin K1 pha trong 2 mL CH_3CN. Hòa tan mẫu và trộn đều bằng máy lắc. Mẫu đã sẵn sàng dùng cho phân tích.

- Tiến hành phân tích: Máy sắc ký lỏng được lắp với cột nhồi COSMOSIL/ COSMOGEL 5μm (250 x 4,6mm). Cột sắc ký được rửa trước với CH_3CN. Pha di động được tiến hành với CH_3CN, tốc độ bơm 1,5 mL/ 1 phút. Cột sắc ký được úm ở nhiệt độ 40°C. Detector: UV 254 nm. Thể tích mẫu bơm là 20 μL. Quan sát và ghi nhận thời gian lưu mẫu.

8.2.4. Phân tích acid nicotinic (vitamin B3)

Acid nicotinic là vitamin thuộc nhóm B tan trong nước. Việc phân tích có thể tiến hành bằng sắc ký lỏng cao áp.

- Chuẩn bị mẫu: Cân 1g acid nicotinic rồi pha trong 2 mL methanol 70% trộn mẫu đều bằng máy lắc để dùng cho phân tích.

- Tiến hành phân tích: Máy sắc ký lỏng được lắp với cột Inertsil ODS-80A 5µM (250 x 4,6mm). Cột sắc ký được rửa trước với methnol. Pha di động được tiến hành với methanol 70%, tốc độ bơm 1 mL/ 1 phút. Cột sắc ký được úm ở nhiệt độ 40°C. Detector: UV 210 nm. Thể tích mẫu bơm là 1µL. Quan sát và ghi nhận thời gian lưu mẫu. Nếu ổn định điều kiện phân tích như trên thì thời gian lưu mẫu sẽ vào khoảng 3,7 phút.

8.3. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM

Độ ẩm là lượng nước tự do có trong thực phẩm. Đây là chỉ tiêu quan trọng trong việc phân tích xác định giá trị dinh dưỡng và chất lượng thực phẩm

Phương pháp thông dụng nhất để xác định độ ẩm thực phẩm dạng rắn là sấy khô.

Nguyên tắc: Dùng sức nóng làm bay hết hơi nước trong mẫu phân tích. Cân trọng lượng mẫu trước và sau khi sấy khô, từ đó suy ra phần trăm nước có mặt trong mẫu phân tích.

Dụng cụ thiết bị:

- Tủ sấy điều chỉnh được nhiệt độ
- Cân phân tích chính xác đến 0,0001g
- Bình hút ẩm, phía dưới để chất hút ẩm (H_2SO_4, silicagel,...)
- Cốc cân sứ hoặc đĩa nhôm

Tiến hành:

Chuẩn bị mẫu: Mẫu được nghiền với kích cỡ khỏang 0,75 mm (hoặc 2mm đối với mẫu phân tích nhạy với nhiệt.

Lấy các cốc cân hoặc đĩa nhôm và một đũa thủy tinh dẹp đầu đem sấy ở 100°C-105°C cho đến trọng lượng không đổi. Để nguội trong bình hút ẩm và cân chính xác đến 0,001g

Cho khỏang 2 gam mẫu phân tích vào cốc cân. Cân tất cả với độ chính xác như trên. Dùng que thủy tinh dàn đều thành lớp mỏng. Cho tất cả vào tủ sấy 100°C-105°C, sấy khô đến trọng lượng không đổi, thông thường khỏang 6 giờ. Trong thời gian sấy, cứ sau 1 giờ lại dùng đũa thủy tinh nghiền nhỏ các phần vón cục, sau đó dàn đều và tiếp tục sấy.

Sấy xong, đem làm nguội ở bình hút ẩm (25-30 phút) và đem cân phân tích với độ chính xác 0,0001 g

Cho lại mẫu vào tủ sấy 100°C-105°C trong 30 phút, lấy ra để nguội ở bình hút ẩm và cân như trên đến trọng lượng không đổi. Kết quả giữa 2 lần cân liên tiếp không được cách quá 0,5 mg cho mỗi gam chất thử.

Tính kết quả:

$$X = \frac{(G_1 - G_2)x100}{G_1 - G}$$

trong đó:

- G : trọng lượng của cốc cân và đũa thủy tinh

- G_1: trọng lượng của cốc cân, đũa thủy tinh và trọng lượng mẫu phân tích trước khi cân

- G_2: trọng lượng của cốc cân, đũa thủy tinh và trọng lượng mẫu phân tích sau khi sấy đến trọng lượng không đổi

Chú ý:

- Một mẫu phân tích phải được lập lại ít nhất 2 lần, kết qủa cuối cùng là trung bình cộng của kết quả hai lần xác định song song. Sai lệch giữa kết quả hai lần xác định song song không được lớn hơn 0,5%.

- Phương pháp sấy khô thường đưa đến kết quả không chính xác cho mẫu phân tích có chứa tinh dầu, cồn, acid bay hơi, urea hoặc thực phẩm có chứa nhiều đường, đạm.

8.4. PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TRO

Tro là thành phần còn lại của thực phẩm sau khi nung cháy hoàn toàn hết các chất hữu cơ. Tro thực chất là các loại muối khoáng, do đó mẫu phân tích có lẫn các chất bẩn (đất, cát) cần được loại trừ trước khi đem nung.

8.4.1. Hàm lượng tro tòan phần

Nguyên tắc: Dùng sức nóng ở 550°C-600°C nung cháy hoàn toàn các chất hữu cơ. Phần còn lại đem cân và tính ra phần trăm tro có trong mẫu phân tích.

Dụng cụ thiết bị:

- Lò nung điều chỉnh được nhiệt độ đến 550°C-600°C

- Cân phân tích chính xác đến 0,0001g

- Bình hút ẩm, phía dưới để chất hút ẩm (H_2SO_4, silicagel,...)

- Chén nung bằng sứ hoặc kim loại kền, bạch kim

- Nước oxy già (H_2O_2) 30% hoặc HNO_3 đậm đặc

Tiến hành:

Nung chén sứ đã rửa sạch ở lò nung tới 550°C-600°C đến trọng lượng không đổi. Để nguội ở bình hút ẩm và cân chính xác đến 0,0001g

Cho khoảng 2 gam mẫu phân tích vào chén sứ. Cân tất cả với độ chính xác như trên. Cho tất cả vào lò nung sấy đến 600°C. Nung cho đến khi tro trắng, nghĩa là đã hết các chất hữu cơ, thông thường khỏang 6-7 giờ tùy loại mẫu. Trường hợp tro còn đen, lấy ra để nguội, cho thêm vài giọt H_2O_2 30% hoặc HNO_3 đậm đặc và nung lại cho đến khi tro trắng.

Để nguội ở bình hút ẩm và cân đến độ chính xác như trên. Tiếp tục nung thêm ở nhiệt độ trên trong 30 phút rồi để nguội trong bình hút ẩm và cân cho tới trọng lượng không đổi. Kết quả giữa 2 lần nung liên tiếp không được cách quá 0,5 mg cho mỗi gram chất thử.

Tính kết qủa: Hàm lượng tro toàn phần:

$$X = \frac{(G_2 - G)x100}{G_1 - G}$$

trong đó:

- G: trọng lượng của chén sứ

- G_1: trọng lượng của chén sứ và trọng lượng mẫu phân tích trước khi cân

- G_2: trọng lượng của chén sứ và trọng lượng tro trắng sau khi nung đến trọng lượng không đổi

8.4.2. Xác định hàm lượng tro hòa tan và không hòa tan trong nước

Tiến hành nung mẫu phân tích như mục 9.2.1., sau đó hòa tan tro toàn phần vào nước cất sôi. Lọc qua giấy lọc không tro và hứng dịch lọc vào một chén sứ đã nung, để nguội và cân sẵn. Rửa lại phần tro không tan, giấy lọc và phễu bằng nước cất sôi nhiều lần. Dịch lọc cho hết vào chén sứ đem bốc hơi nước ở 100°C, sau đó đem nung đến tro trắng ở 550°C-600°C trong 30 phút. Để nguội trong bình hút ẩm và cân chính xác đến 0,0001g

Tính kết quả

Hàm lượng tro tan trong nước:

$$X_2 = \frac{(G_2^* - G^*)x100}{P}$$

trong đó:

- G^*: trọng lượng của chén sứ

- G_2^*: trọng lượng của chén và trọng lượng tro tan trong nước

- P: trọng lượng mẫu phân tích

Từ kết quả trên ta có thể suy ra hàm lượng tro không tan trong nước:

$X_3 = X_1 - X_2$

trong đó :

X_1 : hàm lượng tro toàn phần

X_2 : hàm lượng tro tan trong nước

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tsumura T. et al. 1993. Rapid enzymatic assay for ascorbic acid in various foods using peroxidase. Journal of Food Science. 58(3): 619-622.
- Phòng thí nghiệm hóa học thực phẩm, Trường Đại Học Nihon, Nhật bản. 2005. Phương pháp thí nghiệm sinh hóa thực phẩm (nguyên bản tiếng Nhật).
- Becker J.M., Caldwell G. A., Zachgo E.A. 1996. Biotechnology – A laboratory Course. Academic Press.
- Đỗ Đình Hồ, Đông Thị Hoài An, Nguyễn Thị Hảo, Phạm Thị Mai, Trần Thanh Lan Phương, Đỗ Thị Thanh Thủy và Lê Xuân Trường (Đại Học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh). 2003. Hóa sinh y học. Nhà Xuất Bản Y Học.
- Hames B. D. and Hooper N.M. 2000. Instant notes biochemistry (second edition). BIOS Scientific Publishers Limited.
- Nguyễn Đức Lượng. 2003. Thí nghiệm công nghệ sinh học (tập 1). NXB Đại Học Quốc Gia thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Văn Mùi. 2001. Thực hành hóa sinh học. Nhà Xuất Bản Đại Học Quốc Gia Hà Nội.
- Price Nicholas C. and Stevens Lewis. 1999. Fundamentals of enzymology (third edition). Oxford University Press.
- Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền và Phùng Gia Tường. 1997. Thực hành hoá sinh học. Nhà xuất bản giáo dục.
- Phạm Thu Cúc. 2001. Giáo trình sinh hoá phần I. Tủ sách Đại Học Cần Thơ.
- Phạm Thu Cúc. 2002. Giáo trình sinh hoá phần II. Tủ sách Đại Học Cần Thơ.
- Schopfer Mohr. 1995. Plant physiology. Springer.
- Tổ Sinh Hoá (Bộ môn Công Nghệ Thực Phẩm, Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại Học Cần Thơ). 2003. Giáo trình thực tập sinh hoá. Tài liệu lưu hành nội bộ.
- Zubai Geoffrey. 1998. Biochemistry (fourth edition). WCB McGraw-Hill.