

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
KHOA CÔNG NGHỆ HÓA HỌC VÀ THỰC PHẨM



THỰC HÀNH
HÓA PHÂN TÍCH DỤNG CỤ

Ngành: CÔNG NGHỆ KỸ THUẬT HÓA HỌC

Tổng hợp và biên soạn: TS. Lê Hồng Phượng

Thành phố Hồ Chí Minh

5/2025

PHÂN TÍCH TỔNG HÀM LƯỢNG POLYPHENOLS VÀ ANTHOCYANINS BẰNG QUANG PHỔ HẤP THU PHÂN TỬ

Lê Hồng Phụng

Hỗ trợ: Hồ Thị Thùy Linh (18139081)

Lê Thị Hồng Đào (18139019)

Thái Thị Ngọc Yến (18139233)

Võ Hồng Diệp (18139025)

I. Lý thuyết

Quang phổ đo quang là phương pháp phân tích định lượng dựa vào hiệu ứng hấp thụ xảy ra khi phân tử vật chất tương tác với bức xạ điện từ. Vùng bức xạ được sử dụng trong phương pháp này là vùng tử ngoại gần hay khả kiến ứng với bước sóng khoảng từ 200 đến 800nm.

Khi chiếu một chùm sáng có bước sóng phù hợp đi qua một dung dịch chất màu, các phân tử hấp thụ sẽ hấp thụ một phần năng lượng chùm sáng, một phần ánh sáng truyền qua dung dịch. Xác định cường độ chùm ánh sáng truyền qua đó ta có thể xác định được nồng độ của dung dịch. Sự hấp thụ ánh sáng của dung dịch tuân theo định luật Bouguer – Lambert – Beer: $A = -\lg T = \lg(I_0/I_t) = \epsilon l C$ với $T = I_t/I_0$.

II. Thực hành

A. Phân tích anthocyanins bằng phương pháp 2 bước sóng

A.1 Nguyên lý

Anthocyanins là sắc tố đặc trưng của thực vật bậc cao, bảo vệ thực vật khỏi ánh sáng quá độ và sự chiếu xạ của tia cực tím. Chúng là các chất chuyển hóa thứ cấp nằm trong không bào thực vật, chịu trách nhiệm tạo ra các màu đỏ, tím và xanh lam của lá cây, tăng cường khả năng chống đông và ngăn cản quá trình ức chế quang hợp diễn ra trong lục lạp. Lá đỏ chứa Anthocyanins trong không bào, thành tế bào của tế bào biểu bì, nơi chúng có hiệu quả nhất như màn che ánh sáng và sửa đổi cấu trúc quang hợp bằng cách hạn chế sự hấp thụ ánh sáng của lục lạp. Anthocyanins tham gia vào quá trình hấp thụ ánh sáng trong các dải cụ thể, và có thể được đánh giá bằng sự hấp thụ và quang phổ phản xạ.



Hình 1. Công thức cấu tạo tổng quát của anthocyanin

Đã có hơn 400 loại anthocyanin được tìm thấy. Chúng khác nhau về các nhóm chức R1 đến R7 trong phân tử. Các nhóm chức này có thể là nguyên tử hydro (-H), nhóm hydroxyl (-OH), metoxy (-OCH₃) hay là các phân tử đường gắn với khung aglycone bởi liên kết glycoside. Tuy nhiên, chỉ có 6 loại anthocyanidin thường tìm thấy trong thực vật là cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin và petunidin. Các glycosid của 3 loại anthocyanidin không bị methyl hóa (gồm cyanidin, delphinidin và pelargonidin) là phổ biến nhất trong tự nhiên, chúng chiếm 80% sắc tố có trong lá, 69% sắc tố trong quả và 50% sắc tố trong hoa.

A.2 Thực hành

a) Dụng cụ, nguyên liệu và hóa chất

Dụng cụ	Nguyên liệu - Hóa chất
Cuvet nhựa	Lá cẩm
Pipet 5 ml	Methanol
Cốc thủy tinh 100ml	Acetone
Ống falcon nhựa 15ml	HCl
Quả bóp cao su	Ethanol
Micropipet 100-1000 μ l	

b) Cách tiến hành

Nguyên liệu được nghiền nhỏ sau đó được ngâm trong dung môi với tỷ lệ 1:15, 1:20 và 1:25 (w/v) để yên tại nhiệt độ 4°C trong 30 phút, 1 giờ và 1 giờ 30 phút. Sau đó dung dịch được ly tâm (4000 rpm trong 5 phút).

DM 1: Ethanol 75%

DM 2: Methanol 75%

DM 3: H₂O

Hút phần dịch trích ly vào cuvet. Đo độ hấp thụ của mẫu ở 2 bước sóng 530 nm và 657 nm và ghi lại kết quả. Hàm lượng Anthocyanin được tính toán theo công thức:

$$\text{Anthocyanin (mg)} = (A_{530} - 0,33 \times A_{657}) \times V \times a$$

Trong đó A₅₃₀ và A₆₅₇ lần lượt là độ hấp thụ ở bước sóng 530 nm và 657 nm.

V: là thể tích dung môi.

a: hệ số pha loãng

B. Phân tích tổng hàm lượng polyphenol

B.1. Nguyên lý

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định bằng phương pháp UV-VIS với thuốc thử Folin-Ciocalteu. Phương pháp này dựa trên khả năng phản ứng với các hợp chất polyphenol của thuốc thử Folin-Ciocalteu. Đây là hỗn hợp muối phức molybdostungtate rất nhạy đối với chất khử, nên khi có mặt hợp chất polyphenol trong môi trường kiềm nhẹ sẽ bị khử thành hợp chất có màu xanh có độ hấp thụ mạnh nhất ở bước sóng 734 nm. Dùng acid gallic là đồ thị chuẩn để tính hàm lượng polyphenol tổng có trong mẫu phân tích với đơn vị tính là mgGAE/g mẫu được sử dụng để thu nhận dịch trích.

B.2 Thực hành

a) Dụng cụ, nguyên liệu và hóa chất

Dụng cụ	Nguyên liệu - Hóa chất
Cuvet nhựa	Lá cẩm
Pipet 5 ml	Methanol
Cốc thủy tinh 100ml	Na ₂ CO ₃ 7.5%
Ống falcon nhựa 15ml	Thuốc thử Folin-Ciocalteu
Quả bóp cao su	
Micropipet 100-1000μl	

b) Cách tiến hành

Bố trí thí nghiệm để khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi:nguyên liệu và thời gian trích ly đến tổng hàm lượng polyphenols trong mẫu.

- Cho 1 mL dịch chiết trộn với 0,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu (pha loãng 10 lần bằng nước cất) và để phản ứng trong 6 phút.
- Thêm tiếp vào 1,5 mL dung dịch Na_2CO_3 20%.
- Các hỗn hợp được giữ ở các điều kiện khác nhau (sáng/tối) trong các khoảng thời gian khác nhau (30 phút, 60 phút, 90 phút và 120 phút) ở nhiệt độ phòng.
- Đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 734 nm.
- Xây dựng đường chuẩn acid gallic với y là độ hấp thụ của mẫu, x là nồng độ acid gallic (ppm).
- Từ đồ thị đường chuẩn, xác định được hàm lượng polyphenol tổng có trong mẫu phân tích.

$$P = \frac{C_x \times n \times V \times 100}{m \times (100 - X)} \times 10^{-3}$$

- Trong đó:

P: Hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g CK).

C_x : Nồng độ axit gallic xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/ml}$).

n: Độ pha loãng từ dịch chiết gốc.

X: Độ ẩm mẫu (%).

V: Thể tích dịch chiết gốc (ml).

m: Khối lượng mẫu (g).

III. Báo cáo kết quả

- Quan sát, ghi nhận bằng hình ảnh và giải thích các biến đổi xảy ra trong quá trình tiến hành thí nghiệm
- Tính toán kết quả, phân tích số liệu và kết luận.

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA POLYPHENOLS

Lê Hồng Phụng
Hỗ trợ: Hồ Thị Thùy Linh (18139081)
Lê Thị Hồng Đào (18139019)

I. Lý thuyết

Nguyên tắc

Cation $ABTS^+$ [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] là một gốc tự do bền. Đây là một chất phát quang màu xanh, khi cho chất chống oxy hóa vào dung dịch chứa $ABTS^+$, các chất chống oxy hóa sẽ khử ion này thành ABTS làm cho dung dịch này mất màu xanh.

II. Tiến hành thí nghiệm

a) Dụng cụ, nguyên liệu và hóa chất

Dụng cụ	Nguyên liệu - Hóa chất
Cuvet nhựa	Dịch trích polyphenol
Pipet 5 ml	Methanol
Cốc thủy tinh 100ml	ABTS
Ống falcon nhựa 15ml	kali persulfat
Quả bóp cao su	
Micropipet 100-1000 μ l	

b) Cách tiến hành

- Dung dịch gốc $ABTS^+$ được chuẩn bị bằng cách cho dung dịch ABTS 7,0 mM vào dung dịch kali persulfat 2,45 mM (1: 1 v/v, ủ dung dịch ở bóng tối trong 12 – 16 giờ ở nhiệt độ phòng).
- Dung dịch làm việc $ABTS^+$ được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch gốc $ABTS^+$ với methanol 90% rồi điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734 nm đến $0,7 \pm 0,02$.
- Cho 20 μ l mẫu phản ứng với 1 mL dung dịch $ABTS^+$ làm việc và ủ tối trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Đo hấp thụ ở bước sóng 734 nm.

c) Tính toán kết quả

- Cách 1: Trolox được dùng làm chất chuẩn và kết quả được biểu thị bằng miligam đương lượng trolox (TE) trên 100 ml dung dịch (mg TE/100 mL dung dịch) hoặc trong 1 đơn vị chất khô.

$$P = \frac{C_x \times n \times V \times 100}{m \times (100 - X)} \times 10^{-3}$$

- Trong đó:

P: Hoạt tính chống oxy hóa của mẫu phân tích (mg TE/g CK hoặc mg TE/100 mL dung dịch).

C_x: Nồng độ Trolox xác định từ đường chuẩn (µg/ml).

n: Độ pha loãng từ dịch chiết gốc.

X: Độ ẩm mẫu (%).

V: Thể tích dịch chiết gốc (ml).

m: Khối lượng mẫu (g).

- Cách 2:

Khả năng bắt gốc tự do ABTS được xác định bằng công thức sau:

-

$$\% \text{ ABTS} = [A_0 - (A - A_n)] / A_0 \times 100$$

Trong đó:

%ABTS: khả năng bắt gốc tự do (%).

A₀: độ hấp thụ quang của dung môi và thuốc thử ABTS.

A: độ hấp thụ quang của mẫu phân tích.

A_n: độ hấp thụ quang của dung môi.

III. Báo cáo kết quả

- Quan sát, ghi nhận bằng hình ảnh và giải thích các biến đổi xảy ra trong quá trình tiến hành thí nghiệm
- Tính toán kết quả, phân tích số liệu và kết luận.

PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG GAMMA AMINOBUTYRIC ACID TRONG HẠT NẤY MÀM

Lê Hồng Phụng

Hỗ trợ: Phan Thị Mộng Kha (19139060)

I/ Lý thuyết

GABA (Gamma aminobutyric acid) có công thức phân tử là $C_4H_9NO_2$, GABA là chất dẫn truyền thần kinh có tác dụng ức chế hệ thần kinh, đảm bảo duy trì sự hoạt động bình thường của não bộ đặc biệt là các neuron thần kinh.

Có nhiều phương pháp để xác định hàm lượng GABA trong mẫu phân tích như HPLC, UV-VIS. Thông thường, UV-VIS là phương pháp được sử dụng phổ biến để định lượng GABA.

Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-VIS (Ultra violet - Visible) là phương pháp phân tích hiện đại được áp dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm và hoá học. Phương pháp cho kết quả phân tích nhanh với độ chính xác cao. Phổ hấp thụ phân tử UV-VIS tuân theo định luật Bouguer – Lambert – Beer.

II/ Thực hành:

Mục đích: Xác định thời gian nảy mầm tới khả năng sinh GABA, đồng thời đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân tích GABA

1/ Dụng cụ và hóa chất

Dụng cụ	Nguyên liệu và hóa chất
Cốc thủy tinh 50ml	Đậu xanh
Bình định mức 50ml	Nước cất
Ống thủy tinh 10ml	Etanol 75%
Đũa thủy tinh	Natri hypoclorit ($NaClO$) 7,5%
Phễu thủy tinh	Phenol 6%
Micro pipet (100-1000ppm)	DD đệm Borate pH=9
Pipet, cuvet, giấy bạc	

2. Cách tiến hành

2.1 Chuẩn bị mẫu thí nghiệm

Cân 40g hạt, rửa bằng nước máy, loại bỏ những hạt sâu, bị nứt, sau đó ngâm hạt giống trong 8h bằng nước. Sau khi ngâm xong cho nảy mầm ở 48h, 54h và 72h ở nhiệt độ phòng, trong bóng tối và hai lớp khăn ẩm (Yuanxin Guo và ctv, 2011). Kết thúc quá trình nảy mầm, đậu được rửa lại bằng nước, thấm khô bằng vải mùng, sau đó sẽ được phân tích và đánh giá để chọn thời gian nảy mầm có hàm lượng GABA cao nhất.

2.2 Quy trình phân tích

Bố trí thí nghiệm để khảo sát ảnh hưởng của thời gian nảy mầm, loại dung môi trích ly và tỷ lệ dung môi:nguyên liệu đến hàm lượng GABA trong mẫu.

Lấy 0,5g đậu xanh nảy mầm để phân tích. Cho 5 ml dung môi vào mẫu và tiến hành ngâm rung trong 60 phút, sau đó đem đi ly tâm bằng máy ly tâm 4000 vòng/10 phút. Lọc lấy lớp trên. Lấy khoảng 0,6 ml dịch trích vừa ly tâm và cho vào dịch trích 0,4ml dd đệm Borate (pH=9) và 2 ml phenol (6%), sau đó ta đem đi phối trộn 1 phút và làm lạnh trong 5 phút. Tiếp đến ta cho 2 ml NaClO 10% vào hỗn hợp và lắc bằng máy Vortex trong 1 phút, sau đó làm lạnh trong 5 phút. Sau khi làm lạnh xong ta tiến hành đun nóng trong 10 phút ở 100°C. Sau 10 phút ta để nguội tầm 2 phút và làm lạnh 5 phút. Sau đó, ta tiến hành đo mẫu ở bức sóng 630nm.

III. Báo cáo kết quả

1. Quan sát, ghi nhận bằng hình ảnh và giải thích các biến đổi xảy ra trong quá trình tiến hành thí nghiệm

2. Xử lý kết quả:

Xây dựng đường chuẩn GABA $Y = a(x) + b$ với trục tung (Y) là mật độ quang, trục hoành (X) là hàm lượng GABA. Đồ thị theo hệ tọa độ A – C (mật độ quang - nồng độ) phải là đường thẳng đi qua gốc tọa độ. Để lập đồ thị A – C ta chọn dung dịch chất có nồng độ chính xác C1, C2, C3,... Cn, xác lập các điều kiện để tạo các hợp chất có hiệu ứng hấp thụ bức xạ điện từ ở λ_{max} chọn trước. Đo mật độ quang tương ứng A1, A2, A3,... An.

Trục x	Nồng độ (ppm)	C1	C2	C3	Cn
Trục y	Mật độ quang (abs)	A1	A2	A3	An

Dựa vào đường chuẩn, tính nồng độ X GABA trong dung dịch mẫu.

Công thức tính tổng hàm lượng GABA

$$\sum \text{GABA} = \frac{C \times V \times d_f}{m \times W} (\mu\text{g})$$

Với C: hàm lượng GABA đo được ($\mu\text{g/g}$)

V: thể tích đem đo GABA (ml)

d_f : hệ số pha loãng

m: khối lượng mẫu đem phân tích (g)

W: hàm lượng chất khô

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PROTEIN TỔNG CỦA NƯỚC HÀM THỊT BẰNG PHƯƠNG PHÁP LOWRY

Lê Hồng Phụng

Hỗ trợ: Nguyễn Thị Nhẹ (21139274)

Trương Thảo Nguyên (21139368)

I/ Nguyên tắc

Phương pháp Lowry dựa trên cơ sở phức chất đồng protein khử hỗn hợp phosphomolipden – phosphowolframte (thuốc thử Folin – Ciocalteu) tạo phức chất màu xanh có độ hấp thụ ở bước sóng 660nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ protein. Dựa vào đồ thị protein chuẩn (thông thường dùng albumin huyết thanh bò), ta có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

II/ Tiến hành thí nghiệm

1. Hóa chất, dụng cụ

Hóa chất:

Dung dịch albumin 1 mg/ml: Cân chính xác 0,1 g albumin và hòa tan với nước cất để tạo thành 100 ml.

Dung dịch A: Cân chính xác 2 g Na_2CO_3 và hòa tan trong dung dịch NaOH 0,1N để tạo thành 100 ml.

Dung dịch B: Cân chính xác 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ và hòa tan trong dung dịch natri citrate 1% để tạo thành 100 ml.

Dung dịch C: Hỗn hợp của dung dịch A và dung dịch B theo tỷ lệ 49:1.

Thuốc thử Folin pha loãng 10 lần.

Dụng cụ, thiết bị: cốc thủy tinh, bình định mức, ống nghiệm thủy tinh, ống ly tâm, giấy lọc, cân, micropipette, thiết bị ly tâm, cuvet, thiết bị UV – Vis,

2. Cách tiến hành

Xử lý mẫu: Nước hầm thịt được ly tâm 4000 vòng/phút trong 15 phút, sau đó lọc lại với giấy lọc để thu được dịch trong ít bã nhất có thể.

Xây dựng đường chuẩn:

Bảng 1. Pha loãng các nồng độ albumin khác nhau.

Ống nghiệm	1	2	3	4	5
Dung dịch albumin 1 mg/ml (ml)	0	0,5	1	2	3
Nước cất (ml)	10	9,5	9	8	7
Nồng độ albumin (µg/ml)	0	50	100	200	300

Hút 0,4 ml từ các dung dịch albumin có nồng độ khác nhau từ 1 đến 5 (được pha trong các ống nghiệm trước đó) vào 5 ống nghiệm khác nhau. Sau đó, thêm 2 ml dung dịch C vào từng ống. Lắc đều và để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Tiếp theo, thêm 0,4 ml thuốc thử Folin vào từng ống, lắc đều và để yên trong 20 phút. Đo mật độ quang ở bước sóng 660 nm để thu được độ hấp thụ (lặp lại 3 lần để lấy giá trị trung bình). Sau đó, vẽ đồ thị để biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ dung dịch albumin và giá trị OD tương ứng.

Xác định hàm lượng protein trong mẫu:

Hút 0.4 ml dung dịch nước hầm thịt cho vào ống nghiệm. Thêm vào đó 2 ml dung dịch C. Lắc đều và để yên ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó thêm vào 0.4 ml thuốc thử Folin, lắc đều và để yên trong 20 phút. Đo mật độ quang ở bước sóng 660 nm (thực hiện 3 ống nghiệm để lấy mẫu trung bình).

III. Báo cáo kết quả

1. Quan sát, ghi nhận bằng hình ảnh và giải thích các biến đổi xảy ra trong quá trình tiến hành thí nghiệm

2. Xử lý kết quả:

Xây dựng đường chuẩn albumin, phương trình đường chuẩn có dạng $y = ax + b$, trong đó y là mật độ quang (OD). Thay OD vào phương trình ta được:

$$OD = ax + b \Rightarrow \text{giá trị } x \text{ (mg/ml)}$$

Vậy hàm lượng protein có trong mẫu là x (mg/ml).

Kết quả phương trình đường chuẩn

Bảng 2. Kết quả xây dựng đường chuẩn albumin.

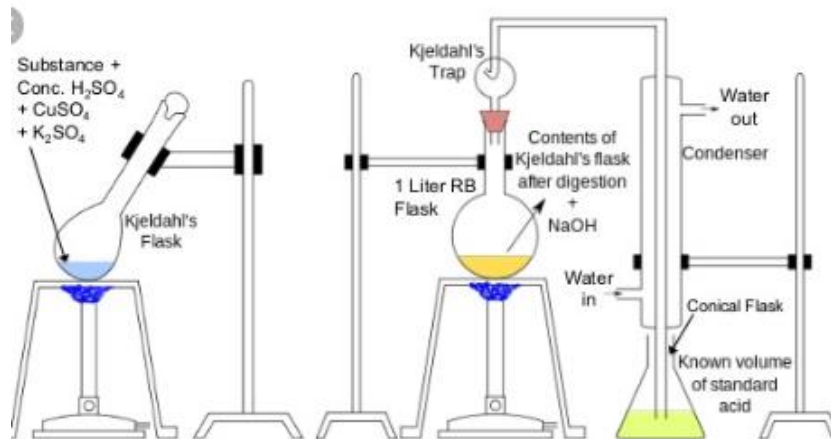
Ống nghiệm	1	2	3	4	5
Nồng độ albumin (µg/ml)	0	50	100	200	300
OD ₁	0.023	0.073	0.167	0.375	0.361
OD ₂	0.022	0.071	0.169	0.282	0.348
OD ₃	0.019	0.069	0.156	0.273	0.352

PHÂN TÍCH TỔNG HÀM LƯỢNG NITO BẰNG KJELDAHL

I. Lý thuyết

Protein (hay còn gọi là chất đạm) là thành phần quan trọng của mọi sự sống trên trái đất. Có nhiều phương pháp giúp phân tích nồng độ protein như phương pháp Dumas, sử dụng tia UV, phương pháp Biuret...

Phương pháp Kjeldahl giúp xác định tổng hàm lượng nito trong các hợp chất vô cơ và hữu cơ.



Hình 2. Sơ đồ phá mẫu và chưng cất Kjeldahl

- Dùng H_2SO_4 đậm đặc để vô cơ hóa mẫu phân tích, chuyển N hữu cơ thành $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Dùng NaOH và nhiệt để giải phóng NH_3
- Ngậm NH_3 vào dung dịch boric acid
- Dùng HCl để chuẩn độ lượng N, và chuyển thành lượng protein theo công thức
- Công thức tính lượng nito tổng:

$$\% \text{N} = \left(\frac{(V - V_b) \times 14 \times N}{V_s \times 1000} \right) \times 100$$

- Công thức tính lượng protein thô:

$$\% \text{ protein} = \% \text{N} \times k$$

- Trong đó:

V là thể tích HCl chuẩn độ mẫu (ml)

V_b là thể tích HCl chuẩn độ mẫu trắng (ml)

V_s khối lượng mẫu

N là nồng độ dung dịch chuẩn HCl

14 là khối lượng của phân tử nito (g/mol)

K là hệ số chuyển đổi nito sang protein tương ứng.

II. Thực hành

a) Dụng cụ, nguyên liệu và hóa chất

Dụng cụ	Nguyên liệu - Hóa chất
Bình tam giác 250 ml	Nguyên liệu hoặc muối $(NH_4)_2SO_4$
Bình định mức 1000 ml	H_2SO_4
Cốc thủy tinh 1000 ml	Viên Kjeldahl hoặc $CuSO_4$ và K_2SO_4
Cốc thủy tinh 500 ml	Phenolphthalein 1%
Ống đong 50 ml	Tashiro (0.2g methyl đỏ + 0.1g methyl xanh pha trong 100ml cồn tuyệt đối)
Buret chuẩn độ 25 ml	Boric acid 0.16M
	NaOH 32%
	HCl 0.1N

b) Cách tiến hành

Phá mẫu

Cân một lượng mẫu xác định cho vào ống, thêm 20 mL H_2SO_4 đậm đặc và 1 viên Kjeldahl. Lắp các ống phá mẫu vào bộ phá mẫu và điều chỉnh nhiệt độ đến khoảng 350-400 °C. Thời gian phá mẫu tùy thuộc bản chất của nguyên liệu. Quá trình phá mẫu kết thúc khi dung dịch trong mẫu chuyển từ đen sang không màu hoặc xanh nhạt. Để các ống phá mẫu nguội tự nhiên về nhiệt độ phòng trước khi chưng cất

Chuẩn bị máy chung cất

- Gắn các dây dẫn dung môi vào các bình tương ứng (dây màu trắng cho NaOH, dây màu đen cho nước)
- Mở van nước làm mát
- Bật máy chung cất

Chung cất

- Cho 50 ml nước cất, 3 giọt phenolphthalein 1% vào ống mẫu và lắp vào máy.
- Cho 50 mL dung dịch acid boric, 4 giọt chỉ thị Tashiro vào erlen và gắn vào bên bộ phận thu dịch ngưng tụ (dây dẫn dịch ngưng tụ ra phải ngập dưới acid boric để tránh mất mẫu).
- Bấm và giữ đồng thời nút NaOH và dấu “+” để bơm NaOH, lượng NaOH cho vào tầm vài chục mL hoặc khi chất lỏng trong ống chuyển sang trắng đục (nếu mẫu là muối ammonium) hoặc xanh đen (nếu mẫu là nguyên liệu hữu cơ). Khi lượng NaOH thêm vào đã đủ thì thả tay để dừng bơm.
- Bấm chọn ‘Start’ để bắt đầu chung cất. Thời gian chung cất khoảng 5 phút.
- Khi máy chung cất xong, dùng bao tay cách nhiệt hoặc kẹp gấp lấy ống mẫu ra ngoài (chú ý là ống rất nóng).
- Lấy bình thu dịch ngưng tụ ra và chuẩn độ với HCl 0.1N đến khi màu chuyển lại màu ban đầu, ghi nhận thể tích HCl dùng.
- Mẫu trắng: cho 0.1 mL nước cất vào ống mẫu và chung cất rồi chuẩn độ như mẫu thường (mẫu trắng khi chung cất không làm đổi màu chỉ thị, hoặc nếu có thì chuẩn độ với < 1 giọt HCl đã thay đổi lại màu chỉ thị).

III. Báo cáo kết quả.

- Quan sát, ghi nhận bằng hình ảnh và giải thích các biến đổi xảy ra trong quá trình tiến hành thí nghiệm
- Tính toán kết quả, phân tích số liệu và kết luận.

XÁC ĐỊNH KÍCH THƯỚC HẠT BẰNG KÍNH HIỂN VI

I. Lý thuyết

Nhiều sản phẩm thực phẩm tồn tại ở dạng hạt rất khác nhau, từ bột đến nhũ tương, huyền phù và viên nén. Sự phân bố kích thước của các hạt có thể ảnh hưởng đến hương vị, hình thức, độ ổn định khả năng chế biến và chức năng của sản phẩm cuối cùng. Phân tích kích thước hạt có vai trò rất quan trọng trong một số ngành, giúp các nhà sản xuất đánh giá, quản lý chất lượng của sản phẩm.

Kính hiển vi quang học (optical microscope) là nhóm kính hiển vi sử dụng ánh sáng khả kiến rọi lên vật cần quan sát, và các thấu kính thủy tinh để phóng đại thông qua nguyên lý khúc xạ của ánh sáng. Kính hiển vi quang học cổ điển phải sử dụng mắt để nhìn trực tiếp hình ảnh được phóng đại. Các kính hiển vi quang học ngày nay có thể được gắn thêm các bộ phận chụp ảnh hoặc các camera để ghi hình ảnh hoặc video.



Hình 3. Kính hiển vi quang học

Cấu tạo của kính hiển vi gồm:

- Nguồn sáng;
- Hệ hội tụ và tạo chùm sáng song song;
- Giá mẫu vật;
- Vật kính (có thể là một thấu kính hoặc một hệ thấu kính) là bộ phận chính tạo nên sự phóng đại;
- Hệ lật ảnh (lăng kính, thấu kính);
- Thị kính là thấu kính tạo ảnh quan sát cuối cùng;
- Hệ ghi ảnh.

Kính hiển vi quang học được sử dụng để phân tích kích thước hạt trong các sản phẩm dạng huyền phù, bột khô và nhũ tương, có kích thước trong khoảng $0.5 - 150 \mu\text{m}$. Kính hiển vi điện tử dùng để phân tích các hạt có kích thước trong khoảng $0.001 - 10 \mu\text{m}$, phù hợp để xác định kích thước hạt trong hệ keo.

Số hạt tương đối được xác định sẽ đại diện sự phân bố kích thước hạt. Để kết quả có độ tin cậy thì khoảng 300-500 hạt cần được xác định kích thước.

II. Thực hành

a) Dụng cụ, nguyên liệu và hóa chất

Dụng cụ	Nguyên liệu - Hóa chất
Kính hiển vi	Sữa chua hoặc nguyên liệu cần xác định kích thước

b) Cách tiến hành

Cho mẫu trên bề mặt lam kính và quan sát dưới kính hiển vi.

III. Báo cáo kết quả

- Quan sát và ghi nhận bằng hình ảnh
- Xác định phân bố kích thước hạt dựa trên phần mềm ImageJ

<https://www.youtube.com/watch?v=FiFwxoxOmNo&t=4s>.

<https://www.youtube.com/watch?v=JQAZ--c9YfI>

ĐÁNH GIÁ TƯƠNG TÁC CỦA PROTEIN VÀ POLYPHENOL

BẰNG QUANG PHỔ HUỖNH QUANG

I. Lý thuyết

Quang phổ huỳnh quang (spectro-fluorometry) là một loại quang phổ điện từ phân tích huỳnh quang của một mẫu. Nó bao gồm việc sử dụng một chùm sáng, thường là ánh sáng cực tím, kích thích các electron trong các phân tử của một số hợp chất nhất định và khiến chúng phát ra ánh sáng.

Ở trạng thái cơ bản S_0 , phân tử hấp thụ năng lượng từ môi trường bên ngoài và chuyển thành năng lượng của các electron, nhận năng lượng các electron này sẽ chuyển lên mức năng lượng cao hơn, gọi là trạng thái kích thích S^* , đây là một trạng thái không bền, do đó electron sẽ mau chóng nhường năng lượng dưới dạng nhiệt để về trạng thái kích thích nhưng năng lượng thấp hơn S^*_0 , thời gian tồn tại của electron giữa mức năng lượng $S^* \rightarrow S^*_0$ vào khoảng 10^{-9} đến 10^{-12} giây, sau khi về trạng thái kích thích S^*_0 , electron lại một lần nữa phát năng lượng dưới dạng photon để về mức thấp hơn, hiện tượng này gọi là huỳnh quang phân tử.

Dựa vào sự phát huỳnh quang của phân tử, quang phổ huỳnh quang được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực:

Định tính

+ Dựa vào λ kích thích và λ phát xạ để định tính các chất

+ Dùng phát hiện vết trên bản mỏng TLC

- Định lượng

+ Huỳnh quang phân tử:

- Đo phổ trực tiếp: Với các hợp chất hữu cơ và hóa sinh: Ứng dụng trong phân tích thực phẩm, thuốc chữa bệnh, mẫu bệnh phẩm... nhờ độ nhạy và chọn lọc của phương pháp.
- Làm detector HPLC: do tính đặc hiệu và độ nhạy cao.

+ Huỳnh quang nguyên tử: Định lượng các kim loại có vạch cộng hưởng có cường độ đủ mạnh hoặc gián tiếp một số chất hữu cơ có tham gia tạo phức như S, P, các Halogen...

- Các phương pháp định lượng bằng quang phổ huỳnh quang
- + Trực tiếp: Lượng chất cần phân tích tỷ lệ thuận với cường độ huỳnh quang.
 - Chất cần phân tích phát huỳnh quang: Đo trực tiếp.
 - Chất phân tích phát huỳnh quang yếu: tác nhân tạo phức, Phức có huỳnh quang
- + Gián tiếp: Dựa trên sự tắt huỳnh quang khi phản ứng của thuốc thử huỳnh quang với chất cần phân tích (do sự phản ứng của nó với chất phân tích), Phát hiện ra các anion và cation.

II. Thực hành

a) Dụng cụ và hóa chất:

Dụng cụ	Nguyên liệu và hóa chất
Cốc thủy tinh 50ml	Soy protein isolate
Bình định mức 100ml	Serum bovine albumin
Ống thủy tinh 10ml	Gallic acid
Đũa thủy tinh	Nước cất
Phễu thủy tinh	

b) Cách tiến hành:

Pha loãng Soy protein isolate (SPI) hoặc Bovine serum albumin (1.0×10^{-4} mol/L) trong nước cất, khuấy đều. Siêu âm 5 phút.

Gallic acid: Hòa tan trong nước với các nồng độ từ $1 - 8 \times 10^{-7}$ mol/L

Khuấy đều hỗn hợp, đem đo quang phổ huỳnh quang ở 25 °C với bước sóng kích thích 280 nm và bước sóng phát xạ từ 300 đến 450 nm.

III. Báo cáo kết quả

Ghi nhận cường độ phát quang của SPI với gallic acid ở các nồng độ khác nhau, từ đó đánh giá tương tác của protein với polyphenol.