

PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH HOÁ-LÝ THỰC PHẨM

1) Hãy nêu các loại mẫu cần được phân tích trong công nghệ thực phẩm. Mục đích lấy các loại mẫu này để làm gì ?

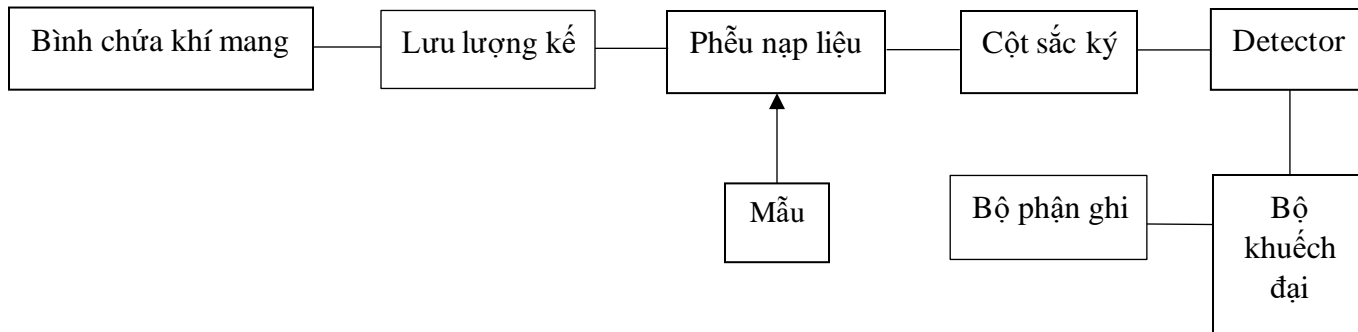
Các loại mẫu	Mục đích
Nguyên vật liệu	- Xác định chất lượng, thành phần và tính ổn định của nguyên vật liệu
Mẫu trong quá trình chế biến	- Xác định trong quy trình chế biến có ảnh hưởng như thế nào đối với sản phẩm
Thành phần	- Kiểm tra chất lượng sản phẩm có đạt yêu cầu không
Mẫu của đối thủ cạnh tranh	- Để phát triển sản phẩm mới
Mẫu sản phẩm bị khiếu nại	- So sánh với mẫu đạt chuẩn

2) Hãy nêu các bước cần tiến hành trong phân tích thực phẩm.

Bước tiến hành	Giải thích
Thiết lập một phương pháp phân tích chuẩn	- Phương pháp này cần rõ ràng, chính xác, được kiểm định bởi các nhà phân tích và khi cần thiết có thể được lặp lại bởi các nhà phân tích khác
Lấy mẫu	- Là quá trình chuẩn bị một đại diện cho toàn bộ thực phẩm cần phân tích
Chuẩn bị mẫu để trích ly	- Thực hiện các quá trình cần thiết để chuẩn bị mẫu nguyên bản cho giai đoạn trích ly, thường là mẫu rắn
Trích ly hợp chất cần phân tích	- Là quá trình trích ly các hợp chất cần phân tích ra khỏi mẫu thô ban đầu
Phân loại và loại bỏ	- Loại những chất khác gây ảnh hưởng đến kết quả phân tích, thường dùng phương pháp sắc ký, tách các hợp chất
Phát hiện, nhận dạng hợp chất cần phân tích	- Nhận dạng trực tiếp bằng thiết bị cảm biến (detector)
Xác định và định lượng hợp chất cần phân tích	- Thông qua các tín hiệu được ghi khi một thành phần của mẫu được phát hiện trên đường chuẩn, nội dung của tín hiệu được chuyển hoá thành thông tin định tính hoặc định lượng
Lưu trữ thông tin	- Ghi chép và lưu trữ kết quả phân tích

⇒ *Tuỳ đặc tính mẫu và yêu cầu để chọn và hiệu chỉnh các bước phân tích phù hợp*

3) Vẽ sơ đồ và trình bày sơ lược các bộ phận chính của thiết bị sắc ký khí (GC).



- **Bình chứa khí mang:** là dòng khí chọn làm pha động để tải chất phân tích ở thể khí qua cột sắc ký

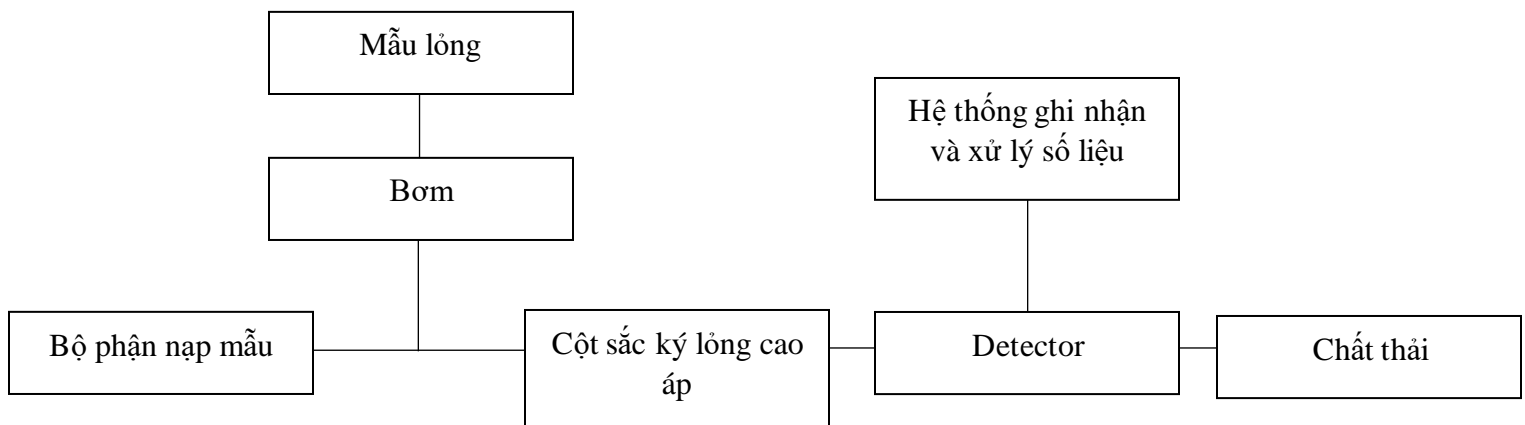
- **Phễu nạp liệu:** nơi để nạp mẫu vào, chứa mẫu

- **Cột sắc ký:** là nơi xảy ra quá trình tách các cấu tử

- **Detector:** ghi nhận sự thay đổi liên tục của nồng độ hay các tham số khác trong dòng khí thoát ra khỏi cột sắc ký

- Tín hiệu ở **Detector** được khuếch đại nhờ **Bộ khuếch đại** và chuyển qua **Bộ phận ghi** thành tín hiệu mà ta đọc được

4) Vẽ sơ đồ và trình bày sơ lược các bộ phận chính của thiết bị sắc ký lỏng cao áp (HPLC).



- Bơm:

- + Đưa pha lỏng vào cột
- + Điều khiển áp suất, tốc độ dòng (thường 1 ml/phút)
- + Bơm và các ống nối làm bằng thép không gỉ ANSI 316 có khả năng chống mòn và chịu áp cao
- + Bơm nhạy cảm với các chất bẩn dạng hạt nên mẫu cần phải được lọc (0.45 hoặc 0.22 μm)

- Bộ phận nạp mẫu:

- + Đưa thể tích mẫu nhất định (10 – 100 μL) vào cột
- + Sử dụng kim bơm mẫu vào ống nạp mẫu
- + Khi chuyển **load** sang **inject** thì pha động ở áp cao sẽ đưa mẫu từ **loop** vào cột
- + Có thể sử dụng máy nạp mẫu tự động

- Cột sắc ký:

- + Làm bằng thép không gỉ, có 2 đầu có thể nối vào **injector** và **detector**
- + Cột có thể làm bằng thủy tinh, titanium, silica và resin PEEK
- + Cột chuẩn có $d = 4.6 \text{ mm}$, $l = 10\text{-}25 \text{ cm}$
- + Ngoài ra còn có cột bảo vệ và các loại cột có kích cỡ khác
- + Vật liệu nhồi cột bằng chất rắn mang

- Đầu dò (detector): chuyển dữ liệu nồng độ thành tín hiệu điện, gồm các đầu dò:

- + Đầu dò tử ngoại – khả kiến
- + Đầu dò huỳnh quang
- + Đầu dò chỉ số khúc xạ
- + Đầu dò độ dẫn
- + Đầu dò khối phổ

- Hệ thống ghi và xử lý số liệu: gồm phần cứng và phần mềm để chuyển các tín hiệu điện thành tín hiệu số, xử lý và biểu diễn kết quả đo

5) Tại sao hệ số chuyển đổi N trong phân tích Kjeldahl thành Protein thay đổi tùy theo loại thực phẩm, và làm thế nào ta có được hệ số 6.25?

- Tùy loại thực phẩm khác nhau mà hàm lượng **protein** sẽ khác nhau. **Protein** cấu tạo từ các **aa** khác nhau, **hàm lượng N** thay đổi tùy theo **aa** nên thành phần **%N** trong các thực phẩm khác nhau, vì vậy hệ số sẽ khác với từng loại thực phẩm.

- Phần lớn **protein** chứa **16%N** \Rightarrow **hệ số N** = $\frac{100}{16} = 6.25$

6) Người ta cần so sánh các mẫu có chứa lipid. Đối với từng tính chất dưới đây, hãy chỉ ra tên một phép kiểm tra có thể dùng để lấy được thông tin.

Tính chất	Phép kiểm tra
Mức độ chưa bão hoà	- Chỉ số Iod, quang phổ tử ngoại
Dự báo tính nhạy cảm với oxy hoá	- Schaal Oven Test, phương pháp xác định oxy hoạt hoá – AOM
Xác định tình trạng ôi thiu do bị oxy hoá	- Chỉ số Peroxide
Khối lượng phân tử dầu trung bình	- Chỉ số xà phòng hoá

7) Việc phân tích mẫu dầu cho các kết quả sau. Trong từng trường hợp, kết quả cho chúng ta biết điều gì về tính chất của mẫu? Hãy mô tả một cách ngắn gọn nguyên tắc đo của từng phương pháp.

Kết quả	Tính chất
Chỉ số xà phòng cao/thấp	⇒ Acid béo nhiều/ít ⇒ Chuỗi ngắn/dài ⇒ Khối lượng phân tử trung bình lớn/nhỏ - Cho 1g chất béo + Phenolphthalein + m gam KOH . KOH dư là n gam. Chuẩn độ KOH dư bằng Acid ⇒ Tìm được n gam ⇒ Lượng KOH phản ứng là (m-n) gam ⇒ Tính được chỉ số xà phòng
Chỉ số Iod thấp	⇒ Nối đôi ít ⇒ Mức độ không bão hoà thấp - Dựa vào khả năng của Acid béo không bão hoà có thể kết hợp 2 nguyên tử halogen vào mỗi nối đôi. Cho chất béo tác dụng một lượng thừa halogen và ta xác định lượng ấy ⇒ Tính được chỉ số Iod
Chỉ số TBA cao	⇒ Mức độ oxy hoá cao - Đo Malonaldehyde , Malonaldehyde phản ứng với TBA để tạo ra hợp chất có màu
Chỉ số Acid thấp	⇒ Ít Acid béo tự do - Dùng KOH để trung hoà acid béo tự do trong 1 g chất béo , phenolphthalein đổi màu đỏ hồng và bền
Thời gian đo của phương pháp oxy hoạt hoá dài	⇒ Chỉ số AOM càng cao ⇒ Sản phẩm càng bền về mùi vị và ít bị oxy hoá - Xác định thời gian cần thiết đạt chỉ số peroxide xác định (thường là 100) trong điều kiện thí nghiệm 98°C, thời oxy vào mẫu

8) Phân biệt các phương pháp sau, dựa vào nền tảng hoá học nào mà các kỹ thuật phân tích đó có thể sử dụng để định lượng Protein?

Phương pháp	Nguyên tắc	Ưu điểm	Nhược điểm
Kjeldahl	(1) Chuyển N thành NH_4^+ + H_2SO_4 đậm đặc + Xúc tác (Copper Sulfate) (2) Trung hoà NH_4^+ bằng NaOH , thu được NH_3 (3) Chưng cất NH_3 và thu giữ bằng H_3BO_3 (4) Chuẩn độ ion borate với HCl	<ul style="list-style-type: none"> • Ứng dụng cho các loại thực phẩm • Đơn giản • Chi phí thấp • Chính xác, phương pháp chuẩn để phân tích hàm lượng Protein thô • Phương pháp Kjeldahl “cải tiến” có thể phân tích được ở mức độ μg Protein 	- Không phải tất cả N là Protein như: + Purine + Pyrimidine DNA, RNA + Urea + Nhiều tế bào thực vật có >50%N phi Protein + Melamine
Biuret	- Biuret và peptide phản ứng với Cu^{2+} tạo thành một phức hợp có màu tím hấp thụ ánh sáng bước sóng 540nm (Biuret là một hợp chất ngưng tụ của urea sau khi bị đốt nóng) - Amino Acid đơn và dipeptide không phản ứng - Vùng nồng độ đo tuyến tính là 1-5 mg/ml - Sử dụng đường chuẩn độ với BSA (bovine serum albumin)	<ul style="list-style-type: none"> • Ít tốn kém hơn Kjeldahl • Nhanh (~30 phút), đơn giản • Màu sắc ít biến đổi hơn so với các pp Lowry, UV • Có ít hợp chất phi Protein gây ảnh hưởng đến phản ứng Biuret • Không phát hiện N từ nguồn không phải peptide hoặc protein 	<ul style="list-style-type: none"> • Không nhạy bằng Lowry • Cần 2-4 mg Protein cho 1 lần đo • Các muối amoni nồng độ cao có thể gây ảnh hưởng • Màu có thể thay đổi tùy loại Protein, Gelatin cho màu hồng-tím
Lowry	- Cu^{2+} trong môi trường kiềm sẽ tạo phức hợp với Protein . Cu^{2+} xúc tác oxy hoá nhóm phenol trong tyrosine và tryptophan bằng thuốc thử Folin tạo màu xanh 750nm	<ul style="list-style-type: none"> • Tính chuyên biệt cao, nhanh, đơn giản • Rất nhạy: 20-100 μg 	<ul style="list-style-type: none"> • Rất nhạy cảm với thay đổi pH • Màu dễ bị biến đổi bởi các loại protein khác nhau (nhiều hơn so với Biuret) • Có nhiều hợp chất gây ảnh hưởng: sucrose, lipid, đường khử, ...

Bicinchoninic Acid	- Protein khử Cu^{2+} thành Cu^+ trong môi trường kiềm. Cu^+ tạo phức hợp với BCA có màu tím đo được ở 562nm	<ul style="list-style-type: none"> • Độ nhạy tương đương Lowry • Phương pháp micro-BCA có thể nâng độ nhạy cao hơn (0.5-10 mg) • Đơn giản, chỉ 1 bước trộn hh • Thuốc thử BCA bền hơn Lowry • Các chất tẩy rửa, muối đệm không ảnh hưởng phản ứng 	<ul style="list-style-type: none"> • Màu không bền theo thời gian nên cần kiểm soát tốt thời gian phân tích để đo A • Đường khử ảnh hưởng kết quả nhiều hơn so với Lowry • Nồng độ ammonium sulfate cao gây ảnh hưởng • Mật độ quang không tỷ lệ tuyến tính với nồng độ Protein
Ultraviolet	- Protein hấp thụ UV tại 280nm chủ yếu nhờ vào các aa có chứa nhân thơm (liên hợp) như là tryptophan và tyrosine	<ul style="list-style-type: none"> • Nhanh và nhạy (gấp nhiều lần so với Biuret) • Cần 100µg Protein • Không ảnh hưởng bởi ammonium sulfate và các muối đệm khác • Phương pháp này không phá hủy mẫu, tích hợp ứng dụng trong detector của sắc ký 	<ul style="list-style-type: none"> • Ảnh hưởng bởi các hợp chất hấp thụ UV: Nucleid acid cũng hấp thụ bước sóng 280nm • Các aa nhân thơm thực tế có hàm lượng biến đổi trong thực phẩm • Dung dịch cần sạch, trong, không màu
Bradford	- Trong môi trường acid , protein mang điện tích và gắn với Coomassie Brilliant Blue G-250 , từ màu đỏ lợt (465nm) \Rightarrow xanh lợt (595nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Nhanh (~2 phút) • Tính lặp lại cao • Độ nhạy cao (gấp nhiều lần so với Lowry) • Không bị ảnh hưởng bởi ion dương: K^+, N^+, ... • Không bị ảnh hưởng bởi polyphenol và carbohydrate • Đo được protein hay peptide với phân tử lượng >4000 	<ul style="list-style-type: none"> • Các chất tẩy rửa và dung môi hữu cơ gây ảnh hưởng màu • Phức hợp Protein-thuốc nhuộm có thể gắn kết vào cuvette thạch anh • Màu biến đổi theo Protein nên phải chọn Protein chuẩn độ cẩn thận

Ninhydrin	- Các aa khi bị đun nóng ở trong dung dịch đệm pH 5.5 sẽ phản ứng với Ninhydrin tạo phức xanh tím đo ở 570nm	<ul style="list-style-type: none"> Nhanh hơn so với Kjeldahl 	<ul style="list-style-type: none"> Sự hiện diện 1 phần nhỏ aa, peptide, amine và ammonia có thể đánh giá sai thành phần protein Độ đúng thấp Đường chuẩn độ phải chuẩn bị riêng cho từng trường hợp
Phương pháp nhuộm màu ion âm	- Mẫu Protein được trộn với 1 lượng dư chất nhuộm biết trước. pH thấp , các nhóm base của Protein mang điện (+) và gắn kết tuyến tính với điện (-) của chất nhuộm tạo kết tủa . Phần dư chất nhuộm đo màu ở 470nm	<ul style="list-style-type: none"> Đơn giản, nhanh 	<ul style="list-style-type: none"> Ảnh hưởng bởi các yếu tố: nhiệt, thành phần phi Protein, hệ thống đệm, chất lượng Protein, ...

9) Hãy cho biết các dạng mẫu thường lấy để kiểm tra. Nêu một cách ngắn gọn các điểm cần lưu ý về các dạng mẫu này?

- Tùy theo vị trí lấy mẫu:

Dạng mẫu	Điểm lưu ý
Từ lô	- Mẫu trong kho nguyên liệu hoặc kho bán thành phẩm. Đánh giá tỷ lệ khuyết tật
Từ dây chuyền sản xuất	- Mẫu nguyên liệu, thành phẩm, bán thành phẩm. Kiểm tra quy trình sản xuất có ổn định không

- Tùy theo mặt hàng:

Dạng mẫu	Điểm lưu ý
Sản phẩm đóng chai, đóng hộp	- Đơn vị mẫu là chai hay hộp
Sản phẩm rời	<ul style="list-style-type: none"> - Trứng, trái cây, bánh kẹo thì đơn vị là quả, thùng hay đơn vị khối lượng - Sản phẩm quả nhỏ như nho thì đơn vị là chùm hoặc kg

- Các dạng mẫu lấy kiểm tra:

Dạng mẫu	Điểm lưu ý
Sản phẩm có bao gói	- Lấy mẫu đều đặn, từ vị trí khác nhau của bao gói ở độ dày khác nhau của lô
Sản phẩm lỏng, sệt, bột nhào	- Cần khuấy trộn đều sản phẩm, nếu sản phẩm phân lớp thì lấy mẫu ở mỗi lớp theo tỷ lệ, tránh lấy mẫu ở những vị trí đặc biệt
Mẫu khí	- Dạng động: lấy mẫu giữa dòng - Dạng tĩnh: lấy mẫu tại điểm bất kỳ - Trạng thái nửa tĩnh: lấy nơi trộn kỹ, tránh lấy ở miệng
Sản phẩm dạng rời, không bao gói	- Cần tạo sự đồng đều. Trong sản xuất nên lấy sản phẩm ở dạng động

10) Bạn đang xem xét sử dụng một phương pháp để phân tích định lượng cấu tử X trong sản phẩm thực phẩm của công ty. Hãy liệt kê các yếu tố bạn cần xem xét trước khi quyết định áp dụng phương pháp đó.

- Kích thước mẫu và hàm lượng chất cần phân tích trong mẫu

- Tính đúng đắn của **pppt**: là khả năng cho kết quả phân tích **gần giá trị thực** của mẫu. Đồng thời **đáp ứng các yếu tố**: giá thành, thời gian hoàn thành, tính đơn giản của quá trình phân tích và trang thiết bị phòng thí nghiệm

- Giới hạn xác định: chỉ lượng chất nhỏ nhất có thể xác định được

- Độ nhạy, chọn lọc: trong mẫu phân tích **có nhiều tạp chất** cản trở việc phân tích nên chọn phương pháp sao cho ít tạp chất cho phép xác định, tức có tốc độ chọn lọc và độ nhạy tốt nhất

- Tốc độ phân tích: phân tích **đủ nhanh** và **đủ chính xác**

- **Độ an toàn** và **tính độc hại** của chất thải

11) So sánh phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC), sắc ký khí (GC) và sắc ký lỏng cao áp (HPLC)

Phương pháp	Pha tĩnh	Pha động	Đặc điểm	Hoạt động	Ứng dụng
Sắc ký bản mỏng (TLC)	- Bán rắn (nhựa hoặc kim loại)	- Chất lỏng	- Hiệu quả kinh tế , sử dụng kết hợp các dụng cụ đo có thể cho phép định lượng tốt hơn, tự động hoá có độ lặp cao, hiệu quả với lượng mẫu nhỏ, có thể sử dụng nhiều loại dung môi làm pha động	- Gồm bảng kim loại, dung môi và bình chứa - Bản chất là hệ sắc ký lỏng-rắn mà pha tĩnh được trải thành lớp mỏng trên bảng kính nhựa hoặc kim loại - Cơ chế: dung dịch mẫu được nhỏ trên đường xuất phát, riêng bảng được nhúng vào một dung môi thích hợp dưới tác dụng của lực mao dẫn, dung môi sẽ di động dọc theo lớp hấp thụ và chuyển động các cấu tử của hỗn hợp với các vận tốc khác nhau, dẫn tới việc tách các cấu tử . Sự khuếch tán các cấu tử trong lớp hấp thụ vừa theo chiều dọc vừa theo chiều ngang	- Phân tích các hợp chất vô cơ và hữu cơ
Sắc ký khí (GC)	- Rắn hoặc lỏng	- Khí	- Nhiệt độ ảnh hưởng đến quá trình tách cột sắc ký phải được ổn nhiệt (có trường hợp ổn nhiệt ở 0°C hoặc cao hơn nhiệt độ phòng). Chỉ dùng cho cấu tử có độ bay hơi cao	- Gồm cột, detector, bộ phận nạp mẫu, bình chứa khí mang - Cơ chế: nhờ có khí mang chứa trong bình, mẫu nghiên cứu được dẫn vào cột tách sắc ký (được ổn định nhiệt độ theo yêu cầu của phép phân tích nhờ vùng điều nhiệt). Quá trình tách sẽ xảy ra trên cột sắc ký, sau khi các cấu tử ra khỏi cột sắc ký tại các thời điểm khác nhau sẽ đi vào detector . Tại đó, chúng được chuyển thành tín hiệu điện , sẽ được khuếch đại ở bộ phận khuếch đại , xử lý và đưa ra số liệu cần thiết	- Tách và phân tích hỗn hợp khí, xác định thành phần thực phẩm, phân tích sản phẩm dầu mỏ, khí mỏ, thuốc trừ sâu, thuốc diệt trùng. Phân tích hỗn hợp chất lỏng

Sắc ký lỏng cao áp (HPLC)	- Lỏng hoặc rắn	- Lỏng (dung môi)	- Tốc độ nhanh, độ phân giải cao (nhiều loại pha tĩnh), độ nhạy cao (kết hợp nhiều loại detector), tái sử dụng cột, phân tích cấu tử có phân tử có phân tử lượng lớn hoặc bị ion hoá , mẫu đễ thu hồi	- Gồm cột, detector, bộ phận nạp mẫu, bơm, dung môi - Cơ chế: dung môi (pha động) được bơm qua cột, trong cột đã nhồi chất rắn (pha tĩnh), bộ phận nạp mẫu (chứa chất A+B) cho phép lấy chính xác lượng mẫu đưa vào cột sắc ký. Tùy vào ái lực của các chất trong mẫu đối với pha động, pha tĩnh mà A hay B ra trước. Người ta dùng detector để phát hiện sự thay đổi thành phần các chất thoát ra khỏi cột, chỉ số detector được chuyển thành tín hiệu điện và được ghi bằng các máy chỉ thị thích hợp	- Phân tích hầu hết các hợp chất hữu cơ
----------------------------------	-----------------	-------------------	---	--	--

12) Các yếu tố cần xem xét khi lựa chọn pppt protein

- **Phân tích**: hàm lượng protein tổng, hàm lượng một loại protein đặc biệt nào đó, thành phần N trong protein, thành phần aa, ...
- **Yêu cầu**: đơn giản, nhanh chóng, tiết kiệm thời gian, chi phí cho phép phân tích
- Phương pháp có **độ nhạy, độ chọn lọc cao, chính xác**
- Chọn phương pháp **tối ưu nhất** cho từng mục đích và có **sai số thấp nhất**

13) Liệt kê các bước chính trong phương pháp Kjeldahl, mô tả ngắn gọn điều gì diễn ra trong từng bước. Giải thích vì sao ml HCl có thể được sử dụng để tính được hàm lượng protein trong mẫu?

- Chuyển N thành dạng NH_4^+ (dùng H_2SO_4 đậm đặc, xúc tác Copper sulfate)
- Trung hoà NH_4^+ bằng NaOH , thu được NH_3
- chưng cất NH_3 và thu giữ bằng H_3BO_3
- Chuẩn độ ion borate với HCl

⇒ Giải thích: do protein thông qua hàm lượng N trong mẫu, ta chuyển $\text{N} \Rightarrow \text{NH}_4^+ \Rightarrow \text{NH}_3$ và được chưng cất thu giữ bằng H_3BO_3 . Ta chuẩn độ H_3BO_3 bằng ml HCl ⇒ đương lượng HCl sẽ tương ứng với đương lượng NH_3 ta cần xác định ⇒ tương đương với đương lượng N ⇒ xác định hàm lượng protein

14) Trong phương pháp nhuộm màu ion âm, mẫu với hàm lượng protein cao sẽ có kết quả đo mật độ quang cao hay thấp. Giải thích.

- Kết quả đo mật độ quang sẽ thấp vì protein càng nhiều sẽ liên kết càng nhiều với thuốc nhuộm và tạo ra nhiều kết tủa. Phần thuốc nhuộm thừa sẽ càng ít, màu sẽ càng nhạt và do đó, kết quả đo mật độ quang sẽ thấp

15) Hãy kể tên những pppt có thể được sử dụng nhằm xác định ảnh hưởng của các loại chất chống oxi hoá cho một mẫu dầu ăn?

- Đo chỉ số peroxide trong mẫu dầu khi có và không có chất chống oxi hoá
- Đo TBA, nối đôi nối ba liên hợp
- Xác định hợp chất hữu cơ bay hơi

16) Chỉ số peroxide, chỉ số TBA và giá trị đo các nối đôi và nối ba liên hợp có thể cho biết tính chất của mẫu lipid. Các kết quả đó cho ta biết điều gì về mẫu lipid. Phân biệt 3 phương pháp kiểm tra này dựa vào nền tảng hoá học các phép đo được sử dụng.

- Chỉ số peroxide: xác định **mức độ oxy hoá trong dầu mỡ**. Chỉ số peroxide **càng cao** \Rightarrow quá trình **oxy hoá cao** \Rightarrow **mẫu dễ bị oxy hoá**

- **TBA, nối đôi và nối ba liên hợp**: xác định **mức độ oxy hoá của sản phẩm thịt, cá**

Chỉ số peroxide	Nối đôi và nối ba liên hợp	TBA
<ul style="list-style-type: none"> - Là số gam Iod được giải phóng bởi peroxide có trong 100g mẫu - Trong không khí, acid béo trong chất béo đặc biệt là acid béo không bão hoà dễ bị oxy hoá một phần \Rightarrow tạo peroxide gây hiện tượng ôi thiu - Lượng Iod giải phóng được chuẩn độ bằng dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 	<ul style="list-style-type: none"> - Đo ở giai đoạn đầu quá trình oxy hoá - Nối đôi liên hợp (đo ở 233nm) - Nối ba liên hợp (đo ở 268nm) - Đo trong vùng quang phổ tử ngoại thu được dữ kiện quang phổ \Rightarrow tương quan giữa A và bước sóng - A càng lớn \Rightarrow nối đôi, nối ba liên hợp càng nhiều 	<ul style="list-style-type: none"> - Đo malonaldehyde (càng nhiều \Rightarrow quá trình oxy hoá càng cao) - Malonaldehyde phản ứng với TBA tạo hợp chất có màu đo bằng quang phổ tử ngoại khả kiến - A càng lớn \Rightarrow sản phẩm bị oxy hoá nhiều

17) Giải thích những điểm giống nhau và khác biệt giữa các phương pháp sau đây về mặt nguyên lý đo.

- **Giống**: là nguyên lý đo để **định lượng đường khử**

- **Khác**:

Tên phương pháp	Đặc điểm
DNS	<ul style="list-style-type: none"> - Đường + thuốc thử DNA \Rightarrow hợp chất có màu đo ở 540 nm - Lập đường chuẩn glucose với các nồng độ khác nhau
Ferricyanur	<ul style="list-style-type: none"> - Đường khử sẽ khử $\text{Fe}^{3+} \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$ có màu xanh dương - Đo ở 690nm
Schaffer-Harmann	<ul style="list-style-type: none"> - Đường khử $\text{Cu}^{2+} \Rightarrow \text{Cu}^+$ - $\text{Cu}^+ + \text{I}^- \Rightarrow \text{CuI} \downarrow$. Đường khử nhiều \Rightarrow Cu^+ nhiều \Rightarrow CuI kết tủa nhiều \Rightarrow I^- thừa ít
Somogyi-Nelson	<ul style="list-style-type: none"> - Đường khử khử $\text{Cu}^{2+} \Rightarrow \text{Cu}^+$ - Cu^+ khử arsenomolybdate \Rightarrow tạo phức hợp màu xanh dương - Đo ở 520nm
Bertrand	<ul style="list-style-type: none"> - Đường khử $\text{Cu}^{2+} \Rightarrow \text{Cu}^+ (\text{Cu}_2\text{O})$ - $\text{Cu}^+ + \text{Fe}^{3+} \Rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$ - $\text{Fe}^{2+} + \text{KMnO}_4 \Rightarrow \text{Fe}^{3+} \Rightarrow \text{V(ml) KMnO}_4$ khử ($\text{Fe}^{2+} \Rightarrow \text{Fe}^{3+}$) \Rightarrow định lượng Cu^+ \Rightarrow định lượng Cu^{2+} \Rightarrow định lượng đường khử

18) Năng lượng phân tử khác biệt ra sao so với năng lượng nguyên tử?

- Năng lượng nguyên tử = năng lượng điện tử (electron): phụ thuộc vào sự phân bố electron.
Biến thiên số hạng này gắn liền với sự chuyển đổi electron từ **orbitan phân tử** này đến **orbitan phân tử** kia

- Năng lượng phân tử = năng lượng điện tử + năng lượng quay + năng lượng dao động.

19) Hấp thụ phân tử ở vùng tử ngoại và khả kiến (UV-Vis) liên quan đến sự chuyển hoá loại mức năng lượng nào?

- Năng lượng điện tử

20) Hấp thụ phân tử ở vùng hồng ngoại (IR) liên quan đến sự chuyển hoá loại mức năng lượng nào?

- Năng lượng dao động

21) Trong quang phổ huỳnh quang, tại sao bước sóng của tia phát xạ dài hơn so với bước sóng của tia sử dụng để kích thích mẫu phân tích?

- Bước sóng tia phát xạ lớn hơn bước sóng tia kích thích. Vì khi phân tử hấp thụ năng lượng sẽ bị kích thích và chuyển lên mức năng lượng cao hơn. Khi trên đường trở về, các bước sóng có mức năng lượng thấp hơn thì phân tử phát xạ ratio huỳnh quang và mọi lượng nhiệt độ đó, năng lượng hấp thụ lớn hơn năng lượng phát quang $E = \frac{hc}{\lambda} \Rightarrow$ bước sóng hấp thụ < bước sóng huỳnh quang

22) Tại sao người ta thường đo và sử dụng giá trị của mật độ quang hơn độ truyền suốt để định lượng các cấu tử trong phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis)?

- Vì khi tính toán theo T đòi hỏi rất tỉ mỉ, chi tiết nhưng kết quả phân tích rất dễ sai lệch. Còn khi dùng mật độ quang thì đơn giản hơn, thuận tiện hơn và sai số thấp hơn rất nhiều. $T = I/I_0 = 10^{-abc}$

- Đại lượng T không thuận tiện cho việc biểu diễn qua đường cong C (vì ở dạng lũy thừa), và T không tỷ lệ tuyến tính với nồng độ C. Để tiện cho việc tính toán, trong phân tích người ta chuyển thành $\lg T = -abc \Rightarrow -\lg T = abc = A$

- Với A: mật độ quang, đo độ hấp thụ của cấu tử khi chùm ánh sáng đơn sắc chiếu qua, tỷ lệ tuyến tính với nồng độ C

- Sử dụng giá trị A tiện để định lượng cấu tử trong mẫu hơn

23) Hãy cho biết các tiêu chuẩn để lựa chọn một bước sóng thích hợp mà tại đó có thể đo mật độ quang của mẫu. Tại sao lựa chọn đó có vai trò quan trọng?

- Cầu tử: chọn bước sóng mà cầu tử hấp thụ tối ưu nhất, khi đó tín hiệu hấp thụ được cao nhất, kết quả chính xác nhất
- Dung môi: bước sóng đó không bị dung môi hấp thụ, khi bị dung môi hấp thụ thì tín hiệu sẽ nhiễu, dẫn đến sai lệch kết quả mật độ quang A
- Cuvette: bước sóng đó không bị cuvette hấp thụ

24) Khi người ta chỉnh bước sóng nào đó để đo mẫu trên máy đo quang phổ thì bộ phận nào bên trong máy trên thực tế được hiệu chỉnh. Bộ phận đó hoạt động thế nào và tại sao khi chỉnh bước sóng như vậy người ta có thể sử dụng kết quả đo mật độ quang được trên máy để xác định nồng độ của mẫu?

- Bộ phận được hiệu chỉnh: bộ phận tách sóng (vĩ nhiễu xạ)
- Vĩ nhiễu xạ là miếng thủy tinh có khắc nhiều vạch liền nhau, số lượng vạch phụ thuộc từng bước xạ. Tùy khoảng cách mà các ánh sáng tán sắc khác nhau nên khi ta chỉnh bước sóng thích hợp qua khe hẹp thì sẽ chọn lựa được bước sóng tối ưu nhất, nên cầu tử sẽ hấp thụ nhiều nhất, tốt nhất. Do đó ta đo được mật độ quang chính xác. Từ đó ta có thể định lượng được mẫu

25) Ưu điểm của máy đo hồng ngoại FTIR so với máy đo hồng ngoại tán sắc.

- Dùng giao thoa kế làm rộng khe sáng, lượng ánh sáng thấy được trên giao thoa kế sẽ lớn hơn
- Không phải xử lý hoặc phá mẫu trước và sau khi phân tích
- Giảm nhiễu, tăng tín hiệu
- Sử dụng máy tính nên đo phổ tự động hoá ở mức độ cao
- Phổ có thể được lưu trữ và đối chiếu với phổ các chất trong thư viện của máy

26) Hãy cho biết sai số mắc phải trong pppt dưới đây phụ thuộc vào loại sai số gì. Dự đoán kết quả của pppt này về độ đúng và độ chính xác.

*** Sử dụng một pipet luôn hút được một lượng 0.96ml thay vì 1ml**

- Sai số hệ thống. Kết quả luôn khác biệt với giá trị thực một khoảng 0.04ml

⇒ Chính xác nhưng không đúng

*** Thuốc thử không được cho vào một ống nghiệm trước khi đo A trong phân tích protein**

- Sai số thô (sai động tác kỹ thuật phân tích). Kết quả phân tích sai số thường bị phân tán và không gần với giá trị mong đợi

⇒ Không chính xác và không đúng

*** Cơ chất không được cho vào một ống nghiệm trong pp đánh giá enzyme**

- Sai số thô, khi cơ chất không được cho vào (do người thực hiện vô tình không thêm vào) thì enzyme sẽ không có cơ chất để tác động

⇒ Không quan sát được thí nghiệm, đánh giá sai

27) Hãy cho biết những điểm giống và khác về mặt thiết bị và nguyên lý giữa máy đo quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis) và quang phổ huỳnh quang.

Ưu điểm của quang phổ huỳnh quang so với UV-Vis

Máy đo quang phổ		UV-Vis	Huỳnh quang
Thiết bị	Giống	- Gồm các bộ phận: nguồn sáng, nguồn điện, bộ phận tách sóng, mẫu, detector, bộ phận truy xuất	
	Khác	- Không có	- Có thêm bộ phận tách sóng nối giữa detector và mẫu: chọn ra bước sóng lớn nhất để đo vì phổ phát xạ khá rộng
Nguyên lý	Giống	- Ánh sáng đa sắc khi qua bộ phận tách sóng phân thành ánh sáng đơn sắc, sau đó qua khe hẹp chọn ra được bước sóng thích hợp chiếu qua mẫu	
	Khác	- Ở mẫu sẽ hấp thụ bước sóng tương thích ghi thành tín hiệu dạng phổ, qua detector để xử lý và truy xuất ra ngoài	- Các phân tử chất cần phân tích sẽ hấp thụ năng lượng bức xạ điện từ, bị kích thích sẽ chuyển lên các mức năng lượng cao. Khi trở về mức năng lượng thấp sẽ phát xạ phổ huỳnh quang nguyên tử đặc trưng cho nguyên tố cần xác định. Bộ phận tách sóng chọn bước sóng huỳnh quang thích hợp, bức xạ huỳnh quang chuyển tới detector và đi vào bộ phận ghi phổ huỳnh quang nguyên tử

*** Ưu điểm:**

- Có chọn lọc bước sóng hơn UV-Vis. Chỉ một số bước sóng thích hợp khi nhận bước sóng kích thích mới phát ra phát xạ
- Độ nhạy, độ chọn lọc cao, khoảng nồng độ cho sự phụ thuộc tuyến tính ($I_p = f(C)$ rất rộng), cho phép xác định nhiều nguyên tố với độ phát hiện rất thấp, nhanh
- Độ nhạy cao do kết hợp hai ưu điểm: đo trực tiếp cường độ phát huỳnh quang nguyên tử và dùng thêm nguồn kích thích phụ
- Xác định đồng thời nhiều nguyên tố trong mẫu phân tích

28) Mô tả các thành phần thiết yếu của máy đo quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) và chức năng của chúng. So sánh hoạt động của FTIR với máy đo hồng ngoại tán sắc

*** Thành phần thiết yếu và chức năng của các bộ phận trong máy đo quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier**

- Nguồn sáng: tạo ra tia hồng ngoại
- Giao thoa kế: gồm 1 gương cố định, 1 gương sáng di động và bộ phận phân chia chùm sáng. Nhiệm vụ là phân tách thành ánh sáng đơn sắc chiếu qua mẫu

*** So sánh:**

FTIR	Tán sắc
- Bức xạ hồng ngoại ra khỏi giao thoa kế sẽ đi qua mẫu và đến detector. Detector sẽ ghi nhận sự biến đổi cường độ bức xạ theo quãng đường mà gương di động thực hiện được rồi chuyển về tín hiệu dưới dạng điện thế theo quãng đường. Xây dựng hàm cường độ bức xạ nghịch đảo với quãng đường	- Ánh sáng từ nguồn sáng – là một chùm sáng đa sắc, được phân tách thành ánh sáng đơn sắc (bằng hệ thống phân tách gồm các lăng kính, cầu tử khe vào và ra) đi tới mẫu, mẫu hấp thụ 1 phần, 1 phần tới bộ phận tín hiệu detector. Tại detector, tín hiệu ánh sáng bị biến đổi thành tín hiệu điện, sau đó ghi hình và vẽ hình