



TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8906:2011

EN 12630:1999

Xuất bản lần 1

**NƯỚC RAU QUẢ – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
GLUCOZA, FRUCTOZA, SORBITOL VÀ SACAROZA –
PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Fruit and vegetable juices –
Determination of glucose, fructose, sorbitol and sucrose contents –
Method using high-performance liquid chromatography*

HÀ NỘI – 2011

Lời nói đầu

TCVN 8906:2011 hoàn toàn tương đương với EN 12630:1999;

TCVN 8906:2011 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F10 *Rau quả và sản phẩm rau quả* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Nước rau quả – Xác định hàm lượng glucoza, fructoza, sorbitol và sacaroza – Phương pháp sử dụng sắc kí lỏng hiệu năng cao

Fruit and vegetable juices – Determination of glucose, fructose, sorbitol and sucrose contents – Method using high-performance liquid chromatography

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng glucoza, fructoza, sorbitol và sacaroza trong nước rau quả và các sản phẩm có liên quan bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao.

Tiêu chuẩn này không cho phép xác định hàm lượng sacaroza khi có mặt maltoza vì sẽ bị trùng các pic.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*.

3 Ký hiệu và các từ viết tắt

3.1 Ký hiệu

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các ký hiệu sau đây:

c là nồng độ chất;

ρ là nồng độ khối lượng;

g là gia tốc do trọng lực tại bề mặt trái đất ($9,81 \text{ m/s}^2$).

3.2 Viết tắt

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các từ viết tắt sau đây:

HPCL sắc kí lỏng hiệu năng cao;

EDTA axit etylendiamintetraaxetic.

4 Nguyên tắc

Các loại đường và sorbitol được tách trên cột resin trao đổi cation (chất đồng trùng hợp copolymer polystyren-divinylbenzen đã sulfonat hóa ở dạng Ca^{2+}) bằng rửa giải isocratic, sử dụng dung dịch canxi dinatri-EDTA làm pha động. Các loại đường và sorbitol được phát hiện bằng detector đo chênh lệch chỉ số khúc xạ và định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn.

5 Thuốc thử

5.1 Yêu cầu chung

Sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước loại 3 nêu trong TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có qui định khác.

5.2 Dung dịch canxi dinatri-EDTA, $c(\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{CaNa}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mmol/l}$ trong 1 lít nước loại dùng cho HPLC (5.1).

5.3 Dung dịch chuẩn

Chuẩn bị dung dịch chuẩn của glucoza, fructoza, sorbitol và sacaroza trong nước (5.1) ở nồng độ 10 g/l.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Thiết bị HPLC, gồm có bơm HPLC, cột HPLC (6.2), detector chỉ số khúc xạ vi phân và bộ phận gia nhiệt cho cột.

6.2 Cột HPLC, cột trao đổi cation polystyren-divinylbenzen đã sulfonat hóa ở dạng canxi, cỡ hạt 10 μm , dài 30 cm, đường kính trong 6,5 mm. Có thể sử dụng các cột có kích thước khác nếu cho các kết quả tương tự.

6.3 Bộ lọc dạng syranh

Bộ lọc syranh có thể thấm nước, không tiệt trùng, có cỡ lỗ 0,45 μm .

6.4 Máy ly tâm

Máy ly tâm có thể tạo gia tốc ly tâm ở 1 400g

CHÚ THÍCH: Tốc độ quay cần thiết để tạo được gia tốc ly tâm đúng có thể tính được theo công thức sau:

$$a = 11,18 \times r \times \left(\frac{n}{1000} \right)^2 \quad (1)$$

Trong đó

a là gia tốc ly tâm;

r là bán kính ly tâm đo được từ điểm giữa (trục ly tâm) đến đáy ống ly tâm khi quay hướng ra ngoài, tính bằng centimet (cm);

n là tần số ly tâm trên phút.

6.5 Ống ly tâm

7 Cách tiến hành

7.1 Yêu cầu chung

Phân tích bằng phương pháp này dựa theo thể tích, do đó, kết quả phải được biểu thị theo lít mẫu thử. Việc phân tích các sản phẩm cô đặc có thể được tiến hành dựa theo thể tích sau khi được pha loãng đến tỷ trọng tương đối đã biết. Trong trường hợp này, phải đưa ra được tỷ trọng tương đối. Khi phép phân tích tính dựa theo khối lượng mẫu thử thì phải tính đến hệ số pha loãng, kết quả có thể được tính trên kilogam sản phẩm. Đối với các sản phẩm có độ nhớt cao và/hoặc có hàm lượng tế bào cao (ví dụ: thịt quả) thì thường sử dụng phép xác định dựa theo khối lượng của mẫu thử.

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

Trộn kỹ các mẫu trước khi pha loãng. Nước ép có nồng độ đơn phải được pha loãng theo tỷ lệ một phần thể tích nước ép với bốn phần thể tích nước và cho ly tâm ở gia tốc 1400g trong 15 min. Sau đó mẫu được lọc qua bộ lọc bằng syranh (6.3) rồi được phân tích bằng HPLC.

7.3 Điều kiện chạy HPLC

Dung môi pha động: dung dịch canxi dinatri-EDTA (5.2)

Tốc độ dòng: 0,5 ml/min.

Nhiệt độ cột: 90 °C (hoặc do nhà sản xuất cột qui định).

Thể tích bơm: 10 µl (thường dùng).

CHÚ THÍCH: Nên giữ detector chỉ số khúc xạ vi phân ở nhiệt độ môi trường không đổi (25 °C đến 35 °C).

7.4 Phân tích bằng HPLC

Sau khi cân bằng hệ thống HPLC và cột, xác định thời gian lưu của các loại đường và sorbitol bằng cách bơm các dung dịch của từng hợp chất. Cần thiết phải có bước này để khẳng định không có sự nghịch chuyển sacaroza trên cột dưới các điều kiện đã chọn. Sau đó tiến hành phân tích sử dụng chuẩn hỗn hợp. Các dung dịch chuẩn được bơm định kỳ giữa các mẫu thử (ví dụ: thường là sau lần bơm thứ năm hoặc thứ bảy).

Sắc đồ điển hình đối với chuẩn hỗn hợp của các loại đường và sorbitol được nêu trong Phụ lục B.

8 Tính kết quả

Nồng độ các loại đường và sorbitol được xác định bằng phương pháp chuẩn ngoại, sử dụng diện tích pic hoặc chiều cao pic. Trong phần tính kết quả, cần tính đến hệ số pha loãng và mối tương quan giữa giá trị với thể tích hoặc khối lượng. Nếu sản phẩm cô đặc được pha loãng đến độ đồng nhất, thì ghi lại tỷ trọng tương đối của mẫu đã đồng nhất. Tính nồng độ của các loại đường và sorbitol, ρ , theo công thức sau:

$$\rho = \frac{P}{RF} \times F \quad (2)$$

Trong đó

P là diện tích pic hoặc chiều cao pic của các loại đường hoặc sorbitol cần xác định, tùy thuộc vào phương pháp được chọn;

F là hệ số pha loãng (5 đối với nước ép; đối với các dạng nước cô đặc đã được pha loãng thì hệ số này phải được tính);

RF là hệ số đáp ứng thích hợp của từng loại đường hoặc sorbitol cụ thể, tính theo công thức sau:

$$RF = \frac{P_s}{\rho_s} \quad (3)$$

Trong đó

P_s là diện tích pic hoặc chiều cao pic của loại đường hoặc sorbitol cụ thể trong sắc đồ chuẩn;

ρ_s là nồng độ khối lượng của loại đường hoặc sorbitol cụ thể trong dung dịch chuẩn.

Báo cáo nồng độ của glucoza, fructoza, sorbitol và sacaroza bằng gam trên lít đến một chữ số thập phân.

CHÚ THÍCH 1: Các hệ số đáp ứng riêng rẽ cần được xác định đối với glucoza, fructoza, sorbitol và sacaroza sử dụng công thức trên đây và các dữ liệu thích hợp.

CHÚ THÍCH 2: Khi phương pháp này được đánh giá trong phép thử liên phòng thử nghiệm, thì các nồng độ của các loại đường đã được đánh giá bằng qui trình sử dụng enzym. Thực tế cho thấy rằng các phương pháp enzym cho độ tái lập tốt hơn đối với glucoza và fructoza, còn phương pháp HPLC thì cho độ tái lập tốt hơn đối với sacaroza.

9 Độ chụm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng này có thể không áp dụng để phân tích các dải nồng độ và các chất nền mẫu khác với các dải nồng độ và các chất nền nêu trong Phụ lục A.

9.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người phân tích, sử dụng cùng một thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị độ lặp lại r .

Các giá trị này được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1

Mẫu	Glucoza g/l	Fructoza g/l	Sacaroza g/l	Sorbitol g/l
Nước táo	1,3	1,6	0,9	0,3
Nước cam	1,1	1,1	1,4	nm ¹⁾
Nectar anh đào	1,4	1,2	2,4	0,5
Nước nho	2,0	1,7	nm ¹⁾	nm ¹⁾
¹⁾ nm = không đo được, vì không có mặt trong nước quả này.				

9.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ thu được khi tiến hành thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, thực hiện trong hai phòng thử nghiệm khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị độ tái lập R .

Các giá trị này được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2

Mẫu	Glucoza g/l	Fructoza g/l	Sacaroza g/l	Sorbitol g/l
Nước táo	2,9	6,1	3,0	0,9
Nước cam	3,1	3,1	2,5	nm ¹⁾
Nectar anh đào	6,2	6,5	8,3	1,7
Nước nho	5,1	9,0	nm ¹⁾	nm ¹⁾

¹⁾ nm = không đo, vì không có mặt trong loại nước quả này.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- thông tin cần thiết nhận biết đầy đủ về mẫu thử (loại mẫu, nguồn gốc mẫu thử, tên gọi);
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày lấy mẫu và qui trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- các kết quả thu được và đơn vị biểu thị;
- kiểm tra độ lặp lại của phương pháp;
- bất kỳ điểm ngoại lệ nào quan sát được trong khi thực hiện phép thử;
- mọi thao tác không qui định trong phương pháp hoặc tùy chọn mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả thống kê của phép thử liên phòng thử nghiệm

Các thông số sau đây đã xác định được trong phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725:1986*. (xem Thư mục tài liệu tham khảo). Phép thử này do Viện nghiên cứu Max von Pettenkofer của Tổ chức Y tế liên bang, Cục thực phẩm, Berlin, Đức tổ chức thực hiện.

- năm thực hiện phép thử liên phòng thử nghiệm: 1993
- số lượng phòng thử nghiệm: 11
- số lượng mẫu: 4

Bảng A.1 – Glucoza

	Mẫu			
	A	B	C	D
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	9	10	9	9
Số lượng ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	2	1	2	2
Số lượng kết quả được chấp nhận	29	32	29	29
Giá trị trung bình, $\bar{x}$ (g/l)	25,2	24,9	31,6	77,0
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (g/l)	0,46	0,39	0,49	0,71
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r (%)	1,8	1,6	1,6	0,9
Giới hạn lặp lại, r (g/l)	1,3	1,1	1,4	2,0
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (g/l)	1,01	1,09	2,18	1,79
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R (%)	4,0	4,4	6,9	2,3
Giới hạn tái lập, R (g/l)	2,9	3,1	6,2	5,1
Tên mẫu: A Nước táo B Nước cam C Nectar anh đào D Nước nho				

Bảng A.2 – Fructoza

	Mẫu			
	A	B	C	D
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	10	11	11	10
Số lượng ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	1	0	0	1
Số lượng kết quả được chấp nhận	31	34	34	31
Giá trị trung bình, $\bar{x}$ (g/l)	62,3	27,7	27,3	78,7
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (g/l)	0,56	0,38	0,41	0,60
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r (%)	0,9	1,4	1,5	0,8
Giới hạn lặp lại, r (g/l)	1,6	1,1	1,2	1,7
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (g/l)	2,16	1,11	2,29	3,17
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R (%)	3,5	4,0	8,4	4,0
Giới hạn tái lập, R (g/l)	6,1	3,1	6,5	9,0
Tên mẫu: A Nước táo B Nước cam C Nectar anh đào D Nước nho				

Bảng A.3 – Sucroza

	Mẫu		
	A	B	C
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	10	9	11
Số lượng ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	1	2	0
Số lượng kết quả được chấp nhận	31	29	34
Giá trị trung bình, $\bar{x}$ (g/l)	18,0	35,8	56,3
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (g/l)	0,31	0,48	0,84
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r (%)	1,72	1,34	1,49
Giới hạn lặp lại, r (g/l)	0,9	1,4	2,4
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (g/l)	1,06	0,87	2,93
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R (%)	5,89	2,43	5,20
Giới hạn tái lập, R (g/l)	3,0	2,5	8,3
Tên mẫu: A Nước táo B Nước cam C Nectar anh đào			

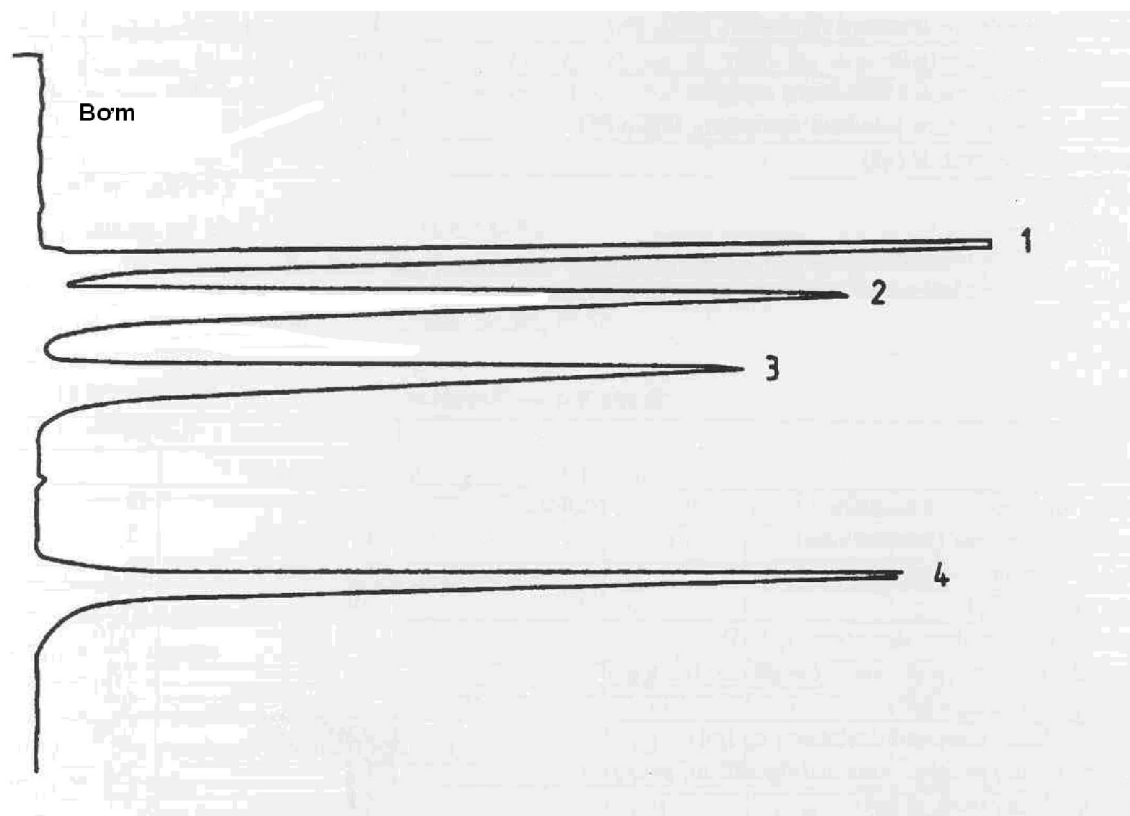
* ISO 5725:1986 hiện nay đã hủy, được thay bằng ISO 5725 (gồm có 6 phần) và đã được biên soạn thành bộ TCVN 6910 (gồm có 6 phần).

Bảng A.4 – Sorbitol

	Mẫu	
	A	C
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	10	10
Số lượng ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	1	1
Số lượng kết quả được chấp nhận	32	32
Giá trị trung bình, $\bar{x}$ (g/l)	5,0	11,3
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (g/l)	0,12	0,16
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r (%)	2,4	1,4
Giới hạn lặp lại, r (g/l)	0,3	0,5
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (g/l)	0,31	0,59
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R (%)	6,2	5,2
Giới hạn tái lập, R (g/l)	0,9	1,7
Tên mẫu: A Nước táo C Nectar anh đào		

Phụ lục B

(Tham khảo)

Ví dụ về sắc đồ của phép xác định hàm lượng đường và sorbitol bằng HPLC**Hình B.1 – Ví dụ về sắc đồ của phép xác định hàm lượng đường và sorbitol bằng HPLC**Cột: BensonTM SS-100 Ca⁺⁺ cacbohydrat (6.2).

Dịch rửa giải: Canxi dinatri-EDTA (5.2) trong nước (5.1)

Tốc độ dòng: 0,5 ml/min

Detector: RI (6.1)

Thể tích bơm: 10 µl

Chất chuẩn: Khoảng 10 mg/ml mỗi chất trong nước (5.1).

Bảng B.1

Pic	Hợp chất	Thời gian lưu, min
1	Sucroza	7,26
2	Glucoza	8,86
3	Fructoza	11,40
4	Sorbitol	18,53

Thư mục tài liệu tham khảo

ISO 5725:1986 *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests* (Độ chụm của phương pháp thử – Xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp thử bằng thử nghiệm liên phòng)

Determination of lucose, fructose, sucrose and sorbitol by HPLC: No. 67, 1995. In: Analyses.

Collection/International Federation of Fruit Juice Procedures. Loose-leaf edition, as of 1995. Zug: Swiss Fruit Union.
