

TCVN 10694:2015

EN 1141:1994

Xuất bản lần 1

**NƯỚC RAU, QUẢ – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PROLIN –
PHƯƠNG PHÁP ĐO PHỔ**

Fruit and vegetable juices – Spectrometric determination of proline content

HÀ NỘI – 2015

Lời nói đầu

TCVN 10694:2015 hoàn toàn tương đương EN 1141:1994;

TCVN 10694:2015 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 prolin – Phương pháp đo phổ

Fruit and vegetable juices – Spectrometric determination of proline content

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đo phổ để xác định hàm lượng prolin trong nước rau, quả và các sản phẩm liên quan.

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 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*.

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 đối với phương pháp thử chuẩn bằng phép thử liên phòng thử nghiệm).

3 Ký hiệu

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các ký hiệu sau:

c là nồng độ chất;

ρ là nồng độ khối lượng;

ω là phần khối lượng.

^{*)} ISO 5725:1986 đã hủy và được thay bằng bộ tiêu chuẩn ISO 5725 (gồm 6 phần) và đã được chấp nhận thành bộ tiêu chuẩn TCVN 6910 (ISO 5725).

4 Nguyên tắc

Prolin tạo phức chất màu với ninhydrin. Phức chất màu này được chiết bằng *n*-butyl axetat và sau đó đo độ hấp thụ ở bước sóng 509 nm bằng máy đo phổ.

5 Thuốc thử

5.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước đạt loại 3 trong TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987).

5.2 Dung dịch ninhydrin trong ete etylenglycolmonmetyl, ρ (ninhydrin) = 30 g/l.

Chuẩn bị dung dịch để sử dụng trong một tuần và bảo quản trong vật chứa tối màu, ở $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.3 *n*-butyl axetat.

5.4 Axit formic, $\omega(\text{CH}_2\text{O}_2) = 98\%$ (khối lượng) $\pm 1\%$ (khối lượng).

5.5 Natri sulfat, (dạng khan).

5.6 L-prolin.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Cuvet thủy tinh, chiều dài đường quang 10 mm và hấp thụ không đáng kể ở bước sóng 509 nm.

6.2 Máy đo phổ vạch, có đèn thủy ngân và bộ lọc để đo ở bước sóng 509 nm.

6.3 Máy đo phổ, (bước sóng thay đổi) để đo ở bước sóng 509 nm (có thể dùng thay cho 6.2).

6.4 Ống nghiệm, có nắp đậy, dung tích khoảng 25 ml. Các ống nghiệm được sử dụng phải có độ dày như nhau.

6.5 Phễu, đường kính khoảng 65 mm.

6.6 Giấy lọc, được phủ silicon không thấm nước, đường kính 110 mm.

6.7 Đồng hồ bấm giờ của phòng thử nghiệm.

6.8 Nồi cách thủy, có thể kiểm soát nhiệt độ đến $\pm 2^{\circ}\text{C}$.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Thông thường các mẫu không cần xử lý trước và phép phân tích theo phương pháp này nên dựa vào thể tích, các kết quả được biểu thị trên 1 lít mẫu. Đối với các mẫu cô đặc, có thể cũng tiến hành phân tích dựa vào thể tích, sau khi pha loãng đến tỷ trọng tương đối đã biết. Trong trường hợp này, tỷ trọng tương đối phải được nêu rõ. Dựa vào lượng mẫu đã cân và hệ số pha loãng, các kết quả có thể được biểu thị trên 1 kg mẫu. Đối với các sản phẩm có độ nhớt cao và/hoặc có chứa lượng thịt quả rất cao thì thường tiến hành phép xác định theo khối lượng mẫu thử. Mẫu có hàm lượng prolin từ 50 mg/l trở lên thì phải được pha loãng bằng nước như sau:

từ 50 mg/l đến 499 mg/l: thì pha loãng 1 phần mẫu + 9 phần nước;

từ 500 mg/l đến 1000 mg/l: thì pha loãng 1 phần mẫu + 19 phần nước.

Các sản phẩm có màu đậm với hàm lượng L-prolin nhỏ hơn 50 mg thì phải pha loãng 1 phần mẫu + 1 phần nước hoặc 1 phần mẫu + 4 phần nước theo cường độ màu của chúng.

7.2 Đo hệ số tắt

Hòa tan L-prolin trong nước để thu được dung dịch gốc, $r(\text{L-prolin}) = 100 \text{ mg/l}$. Pha loãng dung dịch gốc này để có được các dung dịch L-prolin nồng độ = 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 40 mg/l và 50 mg/l. Xử lý các lượng 1,0 ml của các dung dịch này như trong 7.3.

Dựng đồ thị các giá trị độ hấp thụ thu được dựa vào hàm lượng L-prolin (mg/l). Đồ thị này sẽ có đường thẳng đi qua gốc tọa độ. Vì độ tắt thay đổi do đó cần xác định với từng bộ mẫu như sau: Tiến hành ba phép đo độ hấp thụ riêng rẽ ở các điểm khác nhau trên đường chuẩn (ví dụ: 10 mg/l, 25 mg/l và 40 mg/l). Tính hệ số tắt (ε) theo Công thức:

$$\varepsilon = \frac{\rho_s}{A}$$

Trong đó:

ρ_s là nồng độ prolin của dung dịch chuẩn, tính bằng miligam trên lít (mg/l);

A là độ hấp thụ tương ứng ở nồng độ đó.

Hệ số tắt trung bình tính được từ ba giá trị gần giống nhau nhất.

7.3 Phản ứng ninhydrin và hiện màu

Dùng pipet lấy 1,0 ml mẫu thử ete hoặc dung dịch chuẩn (xem 7.2) cho vào ống nghiệm có nắp đậy, sau đó thêm 1 ml axit formic (5.4) và 2 ml dung dịch ninhydrin (5.2). Trộn đều sau mỗi lần thêm thuốc thử. Sau đó, đặt các ống nghiệm vào nồi cách thủy đang sôi có mức nước cao hơn mức dung dịch trong ống. Không nên thay nồi cách thủy đang sôi bằng thiết bị gia nhiệt khác [ví dụ: hệ thống làm nóng nhanh (thermoblock)]. Cần đảm bảo rằng nồi cách thủy luôn được sôi. Để các ống nghiệm trong nồi cách thủy đang sôi chính xác 15 min. Sau đó, làm nguội ống từ 5 min đến 10 min trong nước khoảng 20 °C. Thêm 10 ml *n*-butyl axetat vào từng ống nghiệm, đậy nắp và lắc mạnh để dịch chiết hiện màu trong pha hữu cơ.

Rót toàn bộ dung dịch vào giấy lọc không thấm nước gấp nếp (6.6) chứa 2 g đến 3 g natri sulfat khan và thu lấy dịch lọc. Sau đó, để yên trong khoảng 15 min rồi đo độ hấp thụ của pha hữu cơ (dịch lọc) trong cuvet 10 mm ở bước sóng 509 nm so với dung dịch trắng được chuẩn bị theo cùng một cách từ 1 ml dung dịch mẫu nhưng chỉ dùng ete etylenglycol monometyl thay cho dung dịch ninhydrin, tất cả các điều kiện khác duy trì như ở trên.

8 Tính kết quả

Tính hàm lượng prolin ρ (prolin) sử dụng hệ số tắt xác định được trong 7.2 và biểu thị bằng miligam trên lit, làm tròn đến số nguyên.

$$\rho(\text{prolin}) = \varepsilon \times A$$

Cần tính đến mọi hệ số pha loãng và mối liên hệ với khối lượng hoặc thể tích. Nếu mẫu cô đặc đã được pha loãng đến nồng độ đơn (nồng độ ban đầu) thì phải ghi lại tỷ trọng tương đối của mẫu có nồng độ đơn đó.

9 Độ chụm

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 các phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và nền mẫu khác với các dải nồng độ và nền mẫu đã nêu trong Phụ lục A.

9.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thu được khi tiến hành thử 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 lớn hơn giới hạn lặp lại r .

Các giá trị đó là:

$$\rho \leq 50 \text{ mg/l, thì } r = 2,0 \text{ mg/l;}$$

$50 \text{ mg/l} < \rho \leq 500 \text{ mg/l}$, thì $r = 11 \text{ mg/l}$;

$500 \text{ mg/l} < \rho \leq 1000 \text{ mg/l}$, thì $r = 23 \text{ mg/l}$.

Trong đó:

ρ là hàm lượng đo được, là trung bình của hai kết quả thử đơn lẻ.

9.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thu được khi tiến hành thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, do hai phòng thử nghiệm phân tích, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập R .

Các giá trị đó là:

$\rho \leq 50 \text{ mg/l}$, thì $R = 0,8 \text{ mg/l}$;

$50 \text{ mg/l} < \rho \leq 500 \text{ mg/l}$, thì $R = 5,5 \text{ mg/l}$;

$500 \text{ mg/l} < \rho \leq 1000 \text{ mg/l}$, thì $R = 3,5 \text{ mg/l}$.

Trong đó:

ρ là hàm lượng đo được, là trung bình của hai kết quả thử đơn lẻ.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu (loại mẫu, nguồn gốc mẫu, ký hiệu);
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và kiểu quy trình lấy mẫu (nếu có thể);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- kết quả thử nghiệm và các đơn vị biểu thị;
- độ lặp lại của phương pháp đã được đánh giá;
- các điểm cụ thể quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các kết quả thống kê của phép thử liên phòng thử nghiệm

Các thông số sau đây thu được trong phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725:1986 (Đối với tài liệu để đánh giá phương pháp, xem Thư mục Tài liệu tham khảo). Phép thử do Viện Max von Pettenkofer của Tổ chức Y tế liên bang, Cục hóa thực phẩm, Berlin, Đức tổ chức thực hiện.

Năm tiến hành phép thử liên phòng thử nghiệm 1977

Số lượng các phòng thử nghiệm 23

Số lượng mẫu 4

Loại mẫu:

A: nước táo;

B: nectar anh đào;

C: nước nho trắng;

D: nước cam.

Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Mẫu	A	B	C	D
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	20	21	19	17
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	3	2	4	6
Số lượng các kết quả được chấp nhận	103	108	98	88
Giá trị trung bình ($\bar{x}$) (mg/l)	6,8	66	559	717
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r) (mg/l)	0,29	1,96	10,85	13,76
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (RSD_r), %	4,26	2,97	1,94	1,91
Giới hạn lặp lại (r) (mg/l)	0,8	5,5	30	38
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R) (mg/l)	0,69	3,97	23,96	28,18
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (RSD_R), %	10,15	6,01	4,29	3,93
Giới hạn tái lập (R) (mg/l)	1,9	11,2	67	79
CHÚ THÍCH: Có mối liên hệ giữa r , R và độ pha loãng.				

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Determination of proline: No 49, 1983. - *In: Analyses*[Collection]/International Federation of Fruit Juice Producers. - Loose-leaf edition, as of 1989. - Zug: Swiss Fruit Union
 - [2] S.Wallrauch, *Flunssige Obst*, 1976, vol. 43, p 430-437 Prolinbestimmung in Fruchtsaften, Bedeutung fur die Beurteilung. (Determination of proline in fruit juices, importance in (authenticity) judgements.).
 - [3] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung des Prolingehaltes in Fruchtsaften: L31.00-7, 1980-05 [Food analysis: Determination of proline content in fruit juices: L31.00-7, 1980-05] *In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenstanden/Bundesgesundheitsamt [In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act: Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products cosmetics and commodity goods/Federal Health Office]- Loseblattausgabe; Stand 31.12.1991, Bd.I. [Loose-leaf edition, as of 1991-12-31, Vol.1.]*- Berlin, Koln: Beuth Verlag GmbH.
-