

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 12084:2017

Xuất bản lần 1

**RƯỢU VANG - XÁC ĐỊNH GLUCOSE VÀ FRUCTOSE -
PHƯƠNG PHÁP ENZYM**

Wine - Determination of glucose and fructose content - Enzymatic method

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 12084:2017 được xây dựng trên cơ sở tham khảo tiêu chuẩn của Tổ chức Rượu vang quốc tế OIV-MA-AS311-02 (2009) *Glucose and fructose*;

TCVN 12084:2017 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F9 Đồ uống biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Rượu vang – Xác định hàm lượng glucose và fructose – Phương pháp enzym

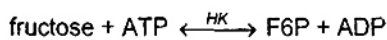
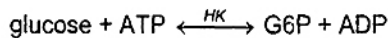
Wine – Determination of glucose and fructose content – Enzymatic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp enzym để xác định hàm lượng glucose và fructose trong rượu vang.

2 Nguyên tắc

Glucose và fructose được phosphoryl hoá bởi adenosine triphosphat (ATP) trong quá trình phản ứng enzym xúc tác bởi hexokinase (HK), tạo thành glucose-6-phosphat (G6P) và fructose-6-phosphat (F6P):

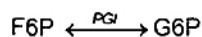


G6P được oxy hóa thành gluconat-6-phosphat bởi nicotinamit adenin dinucleotit phosphat (NADP) với sự có mặt của enzym glucose-6-phosphat dehydrogenase (G6PDH). Lượng nicotinamit adenin dinucleotit phosphat dạng khử (NADPH) được tạo thành tương ứng với lượng G6P và lượng glucose.



NADPH được xác định từ độ hấp thụ ở bước sóng 340 nm.

Ở cuối phản ứng này, F6P được chuyển thành G6P bởi enzym phosphoglucose isomerase (PGI):



G6P lại phản ứng với NADP tạo thành gluconat-6-phosphat và NADPH, đo phổ để xác định NADPH.

3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích, nước được sử dụng là nước cất hai lần hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Dung dịch đệm trietanolamin, 0,3 M, pH 7,6, có nồng độ Mg^{2+} là 0,004 M

Hòa tan 11,2 g trietanolamin hydrochlorua ($(CH_2CH_2OH)_3N.HCl$) và 0,2 g magiê sulfat ($MgSO_4.7H_2O$), trong 150 ml nước, thêm khoảng 4 ml dung dịch natri hydroxit (NaOH) 5 M để thu được độ pH 7,6. Thêm nước đến 200 ml.

Dung dịch đệm này có thể bền trong bốn tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ khoảng +4 °C.

3.2 Dung dịch nicotinamit adenin dinucleotit phosphat, khoảng 0,0115 M

Hòa tan 50 mg dinatri nicotinamit adenin dinucleotit phosphat trong 5 ml nước.

Dung dịch này bền trong bốn tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ khoảng +4 °C.

3.3 Dung dịch adenosine-5'-triphosphat, khoảng 0,081 M

Hòa tan 250 mg dinatri adenosin-5'-triphosphat và 250 mg natri hydro cacbonat ($NaHCO_3$) trong 5 ml nước.

Dung dịch này bền trong bốn tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ khoảng +4 °C.

3.4 Huyền phù hexokinase/glucose-6-phosphat-dehydrogenase

Trộn đều 0,5 ml hexokinase (2 mg protein/ml hoặc 280 U/ml) với 0,5 ml glucose-6-phosphat-dehydrogenase (1 mg protein/ml).

Hỗn hợp này có thể bền trong một năm khi được bảo quản ở nhiệt độ khoảng +4 °C.

3.5 Huyền phù phosphoglucose-isomerase, 2 mg protein/ml hoặc 700 U/ml.

Sử dụng huyền phù mà không cần pha loãng. Dung dịch này có thể bền trong một năm khi được bảo quản ở nhiệt độ khoảng +4 °C.

CHÚ THÍCH Tất cả các dung dịch được sử dụng ở trên đều có bán sẵn trên thị trường.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Máy đo quang phổ, có thể đo được ở bước sóng 340 nm hoặc nếu không có sẵn, có thể sử dụng máy đo quang phổ sử dụng nguồn có phổ không gián đoạn cho phép đo được ở bước sóng 334 nm hoặc 365 nm.

4.2 Cuvet thủy tinh hoặc cuvet dùng một lần, có chiều dài đường quang 1 cm.

4.3 Pipet, có thể phân phối các thể tích thích hợp.

4.4 Pipet dùng cho dung dịch enzym, có thể phân phối thể tích 0,02 ml.

5 Cách tiến hành

5.1 Chuẩn bị mẫu

Tùy thuộc vào hàm lượng glucose và fructose ước tính có trong một lít (g/l), pha loãng mẫu như sau:

Bảng 1 – Hướng dẫn pha loãng mẫu

Hàm lượng glucose và fructose ước tính, g/l		Pha loãng bằng nước	Hệ số pha loãng, <i>F</i>
Phép đo ở bước sóng 340 nm và 334 nm	Phép đo ở bước sóng 365 nm		
đến 0,4	đến 0,8	-	-
đến 4,0	đến 8,0	1 + 9	10
đến 10,0	đến 20,0	1 + 24	25
đến 20,0	đến 40,0	1 + 49	50
đến 40,0	đến 80,0	1 + 99	100
trên 40,0	trên 80,0	1 + 999	1000

5.2 Xác định

Dùng máy đo quang phổ (4.1) chỉnh đến bước sóng 340 nm, thực hiện các phép đo sử dụng không khí (không có cuvet trong đường quang) hoặc dùng nước để so sánh.

Cài đặt nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C.

Cho vào hai cuvet có chiều dài đường quang 1 cm (4.2) các dung dịch sau:

Bảng 2 – Thể tích dung dịch cho vào hai cuvet

Dung dịch	Thể tích cho vào cuvet so sánh (mẫu trắng), ml	Thể tích cho vào cuvet mẫu thử, ml
Dung dịch đệm trietanolamin ở 20 °C (3.1)	2,50	2,50
Dung dịch nicotinamid adenin dinucleotit phosphat (3.2)	0,10	0,10
Dung dịch adenosine-5'-triphosphat (3.3)	0,10	0,10
Mẫu thử đã chuẩn bị (xem 5.1)	-	0,20
Nước	-	0,20
Trộn đều, sau 3 min đọc độ hấp thụ của dung dịch (A_1). Bắt đầu cho phản ứng bằng cách bổ sung:		
Dung dịch hexokinase/glucose-6-phosphat-dehydrogenase (3.4)	0,02	0,02
Trộn đều, sau 15 min đọc độ hấp thụ (A_2) và sau mỗi 2 min tiếp theo kiểm tra xem phản ứng đã dừng hay chưa. Khi phản ứng dừng, bổ sung ngay:		
Dung dịch phosphoglucose-isomerase (3.5)	0,02 ml	0,02 ml
Trộn đều, sau 10 min đọc độ hấp thụ (A_3) và sau mỗi 2 min tiếp theo kiểm tra xem phản ứng đã dừng hay chưa.		

CHÚ THÍCH Thời gian cần thiết để kết thúc quá trình hoạt động của enzym có thể thay đổi giữa các mẻ. Giá trị trên đưa ra chỉ để hướng dẫn và được khuyến cáo khi xác định cho mỗi mẻ.

6 Tính kết quả

Hàm lượng glucose và fructose của mẫu thử, C , tính bằng gam trên lít (g/l) được tính theo Công thức (1):

$$C = \frac{V_1 \times M \times F}{\epsilon \times d \times V_2 \times 1000} \times \Lambda A \quad (1)$$

Trong đó

V_1 là thể tích của dung dịch thử trong cuvet (xem Bảng 2), tính bằng millilit

đối với phép xác định glucose: $V = 2,92$ ml

đối với phép xác định fructose: $V = 2,94$ ml;

V_2 là thể tích của dung dịch mẫu bổ sung vào cuvet, tính bằng mililit ($V_2 = 0,02$ ml);

M là khối lượng phân tử glucose hoặc fructose, tính bằng gam trên mol ($M = 180,16$ g/mol);

F là hệ số pha loãng mẫu (xem Bảng 1);

ε là hệ số hấp thụ NADPH ở bước sóng 340 nm ($\varepsilon = 6,3$ mmol⁻¹ × l × cm⁻¹).

ở bước sóng 340 nm: $\varepsilon = 6,3$ mmol⁻¹ × l × cm⁻¹

ở bước sóng 365 nm: $\varepsilon = 3,5$ mmol⁻¹ × l × cm⁻¹

ở bước sóng 334 nm: $\varepsilon = 6,18$ mmol⁻¹ × l × cm⁻¹;

d là chiều dài đường quang của cuvet, tính bằng xentimet ($d = 1$ cm);

ΔA là chênh lệch độ hấp thụ (5.2)

đối với phép xác định glucose: $\Delta A_{\text{glucose}} = (A_2 - A_1)_{\text{mẫu}} - (A_2 - A_1)_{\text{mẫu trắng}}$

đối với phép xác định fructose: $\Delta A_{\text{fructose}} = (A_3 - A_2)_{\text{mẫu}} - (A_3 - A_2)_{\text{mẫu trắng}}$.

7 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc những điều được coi là tự chọn, và bất kỳ chi tiết nào có ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

A.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong một phòng thử nghiệm, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại (r) sau đây:

$$r = 0,056 \times x_i$$

Trong đó: x_i là nồng độ của glucose hoặc fructose, tính bằng gam trên lít (g/l).

A.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên vật liệu thử giống hệt nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập (R) sau đây:

$$R = 0,12 + 0,076 \times x_i$$

Trong đó: x_i là nồng độ của glucose hoặc fructose, tính bằng gam trên lít (g/l).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 10693:2015 (EN 1140:1994), *Nước rau, quả – Xác định hàm lượng D-glucose và D-fructose sử dụng enzym – Phương pháp đo phổ NADPH*
-