

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13610:2023

Xuất bản lần 1

**ĐƯỜNG VÀ SẢN PHẨM ĐƯỜNG –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG SULFIT TRONG CÁC SẢN PHẨM
ĐƯỜNG TINH LUYỆN BẰNG PHƯƠNG PHÁP ENZYM**

*Sugar and sugar products –
Determination of sulfite content in refined sugar products
by enzymatic method*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13610:2023 được xây dựng trên cơ sở tham khảo ICUMSA Method GS2₃-35 (2011) *The Determination of Sulphite in Refined Sugar Products excepting Brown Sugars by an Enzymatic Method – Official; The Determination of Sulphite in Brown Sugars – Tentative*;

TCVN 13610:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F18 Đường, mật ong và sản phẩm tinh bột biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Đường và sản phẩm đường—Xác định hàm lượng sulfit trong các sản phẩm đường tinh luyện bằng phương pháp enzym

Sugar and sugar products – Determination of sulfite content in refined sugar products by enzymatic method

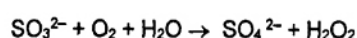
1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sử dụng enzym để xác định hàm lượng sulfit đối với các sản phẩm đường tinh luyện có chứa hàm lượng sulfit thấp.

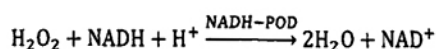
Tiêu chuẩn này có thể áp dụng đối với đường nâu và xirô có chứa hàm lượng sulfit thấp.

2 Nguyên tắc

Trong điều kiện có oxy, sulfit bị oxy hóa thành sulfat bởi enzym sulfit oxidase:



Hydro peroxit tạo thành bị khử bởi NADH-peroxidase với sự có mặt của nicotinamid-adenin dinucleotid (NADH) dạng khử:



Ở bước sóng đã chọn (334 nm hoặc 340 nm), độ hấp thụ giảm tỷ lệ với lượng NADH được sử dụng trong phản ứng thứ hai và do đó tỷ lệ với lượng sulfit trong mẫu.

3 Thuốc thử và vật liệu thử

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

TCVN 13610:2023

3.1 Amoni sulfat, xấp xỉ 3 mol/L

Hòa tan 396 g amoni sulfat trong bình định mức dung tích 1000 mL và thêm nước cất đến vạch.

3.2 Dung dịch đệm, pH 8,0

Hòa tan 5,57 g triethanolamin hydro clorua trong 40 mL nước đựng trong bình định mức dung tích 50 mL. Điều chỉnh đến pH 8,0 bằng dung dịch natri hydroxit 0,1 mol/L, sau đó thêm nước cất đến vạch.

3.3 Dung dịch NADH, 7 mmol/L

Hòa tan 25 mg NADH- Na_2 và 5 mg NaHCO_3 trong 5 mL nước.

3.4 Huyền phù của NADH-peroxidase (NADH-POD 45 000 U/L)

Pha loãng 0,1 mL huyền phù enzym với 0,2 mL trong dung dịch amoni sulfat 3,0 mol/L (3.1).

3.5 Huyền phù sulfit oxidase (SO_2 -OD chứa 5000 U/L)

Pha loãng 1 mL huyền phù với 1 mL dung dịch amoni sulfat 3,0 mol/L (3.1).

3.6 Dung dịch NADH để kiểm tra máy đo quang phổ

Khi sử dụng máy đo quang phổ mới, kiểm tra hệ số hấp thụ, ϵ , của dung dịch NADH (3.3) ở bước sóng 340 nm, giá trị của ϵ phải là $6,3 \pm 0,04$ hoặc ở bước sóng 334 nm, giá trị của ϵ phải là $6,18 \pm 0,04$.

- Dung dịch NADH (0,07 mmol/L). Pha loãng 20 μL dung dịch (3.3) với 1 980 μL nước cất,
- Dung dịch NADH (0,035 mmol/L). Pha loãng 20 μL dung dịch (3.3) với 3 980 μL nước cất.
- Dung dịch NADH (0,017 mmol/L). Pha loãng 10 μL dung dịch (3.3) với 3 990 μL nước cất.

Chỉnh bước sóng của máy đo quang phổ đến 340 nm hoặc 334 nm. Đọc độ hấp thụ, A , của ba dung dịch kiểm tra. Tính hệ số hấp thụ, ϵ , đối với NADH từ phương trình Lambert-Beer:

$$\epsilon = \frac{A}{d \cdot c} \quad (1)$$

Trong đó

- A là giá trị độ hấp thụ được ghi lại;
- c là nồng độ của dung dịch NADH, tính bằng milimol trên lít (mmol/L);
- d là chiều dài đường quang, tính bằng xentimet (cm).

Tính hệ số hấp thụ, ϵ , của NADH từ ba dung dịch và lấy giá trị trung bình.

CHÚ THÍCH Các thuốc thử có bán sẵn ở dạng kit thử:

Để xác định trong thời gian ngắn, nên sử dụng một số thuốc thử đã chuẩn bị sẵn ở dạng kit thử ví dụ từ: Boehringer Mannheim. Những bộ kit này bao gồm ba dung dịch:

dung dịch đệm pH 8,0 có chứa NADH;

huyền phù NADH-POD;

huyền phù SO_2 -OD.

Việc sử dụng các thuốc thử này cần điều chỉnh nhỏ về thể tích được sử dụng trong phép thử và phép tính cuối cùng. Những thay đổi này được nêu trong hướng dẫn sử dụng kit thử.

3.7 Chất trợ lọc, ví dụ: Clarcel Flo-TR¹⁾, sử dụng cho các loại đường dạng bột có chứa chất chống đông vón.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Máy đo quang phổ, đọc ở bước sóng 340 nm (đèn quang phổ liên tục) hoặc ở bước sóng 334 nm (đèn hơi thủy ngân).

4.2 Cuvet, chiều dài đường quang 1 cm, tốt nhất là bằng thạch anh.

4.3 Micropipet, có thể phân phối các thể tích 10, 20, 50 và 100 μL tốt nhất là pipet tự động có đầu tip tương ứng.

4.4 Đồng hồ bấm giây.

4.5 Màng lọc, cỡ lỗ 0,45 μm , đường kính 50 mm.

CHÚ THÍCH Cỡ lỗ được xác định bằng thử nghiệm "điểm bọt".

4.6 Giá đỡ và khung màng lọc, giá đỡ bộ lọc tốt nhất được gắn với bộ đỡ bằng thép không gỉ.

5 Lấy mẫu

Mẫu phòng thử nghiệm nhận được phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

¹⁾ Clarcel Flo-TR là sản phẩm của Elf Atochem UK Ltd. Thatcham, Newbury, UK. Đây là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4837^[1].

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu thử

Đối với các loại đường, sử dụng dung dịch chứa 40 g đường, hòa tan trong nước để có thể tích cuối cùng là 100 mL. Đối với dạng xirô có hàm lượng sulfit từ 15 mg/kg đến 150 mg/kg, pha loãng mẫu với nước cất theo tỷ lệ 1 : 5, ví dụ 100 g trong 500 mL. Lượng sulfit trong cuvet khi sử dụng máy đo quang phổ nằm trong khoảng từ 3 µg đến 30 µg.

CHÚ THÍCH Với đường bột có chứa chất chống vón cục, thêm 0,2 g chất trợ lọc (3.7) vào 40 g mẫu, hòa tan, thêm nước đến 100 mL và sau đó lọc trên bộ lọc màng. Sử dụng dịch lọc cho phép thử tiếp theo.

6.2 Phép xác định

Điều chỉnh thuốc thử, dung dịch đệm và nước đến nhiệt độ phòng (từ 20 °C đến 25 °C).

Dùng pipet lấy các thể tích theo Bảng 1 cho vào các cuvet 1 cm tương ứng.

Bảng 1 – Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch mẫu trắng

	Cuvet B (mẫu trắng), mL	Cuvet S (mẫu thử), mL	
		Đường	Xirô
Dung dịch đệm (3.2)	1,00	1,00	1,00
Dung dịch NADH (3.3)	0,10	0,10	0,10
NADH peroxidase (3.4)	0,01	0,01	0,01
Mẫu thử	–	2,00	0,20
Nước cất	2,00	–	1,80

Làm kín các cuvet bằng màng chất dẻo và trộn nhẹ nhàng bằng cách đảo chiều cuvet. Sau khoảng 5 min, đo độ hấp thụ ở bước sóng đã chọn (334 nm hoặc 340 nm) so với không khí (không đặt cuvet trong đường quang), thu được độ hấp thụ của mẫu trắng, A_{1B} và của mẫu thử, A_{1S} .

Thêm 0,05 mL huyền phù sulfit oxidase (3.5) vào mỗi cuvet và trộn lượng chứa trong cuvet như ở trên. Sau 30 min đọc lại độ hấp thụ: độ hấp thụ của mẫu trắng, A_{2B} và của mẫu thử, A_{2S} .

CHÚ THÍCH Đối với một số loại đường trắng, nồng độ lưu huỳnh dioxit (SO_2) nhỏ hơn nồng độ cần thiết cho phép thử (3 mg/kg). Có thể tăng độ nhạy phản ứng của phép thử bằng cách sử dụng cuvet có chiều dài đường quang 2 cm, miễn là các thể tích được sử dụng trong phép thử đều tăng theo tỷ lệ để làm đầy cuvet.

7 Tính và biểu thị kết quả

Tính chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trắng, A_B , theo Công thức (2):

$$A_B = A_{1B} - A_{2B} \quad (2)$$

trong đó:

A_{1B} là độ hấp thụ của mẫu trắng trước khi bổ sung sulfit oxidase;

A_{2B} là độ hấp thụ của mẫu trắng sau khi bổ sung sulfit oxidase.

Tính chênh lệch độ hấp thụ của mẫu thử, A_S , theo Công thức (3):

$$A_S = A_{1S} - A_{2S} \quad (3)$$

trong đó:

A_{1S} là độ hấp thụ của mẫu thử trước khi bổ sung sulfit oxidase;

A_{2S} là độ hấp thụ của mẫu thử sau khi bổ sung sulfit oxidase.

Tính chênh lệch độ hấp thụ của mẫu thử sau khi hiệu chỉnh theo mẫu trắng, A , theo Công thức (4):

$$A = A_S - A_B \quad (4)$$

Tính nồng độ sulfit của dung dịch thử, dưới dạng lưu huỳnh dioxit (SO_2), biểu thị theo miligam trên mililit (mg/mL) theo Công thức (5):

$$C = \frac{MW}{1000\varepsilon} \cdot \frac{V}{v} \cdot \frac{1}{d} \cdot A \quad (5)$$

trong đó:

V là thể tích cuối cùng trong cuvet, ở đây là 3,16 mL (đối với bộ kit thử, thể tích này có thể sẽ khác);

MW là khối lượng phân tử của lưu huỳnh dioxit, tính bằng gam (ở đây là 64,06 g);

ε là hệ số tắt phân tử ở bước sóng đã chọn, cụ thể là:

6,18 L.mmol⁻¹.cm⁻¹ ở bước sóng 334 nm;

6,30 L.mmol⁻¹.cm⁻¹ ở bước sóng 340 nm

(các giá trị này có thể được kiểm tra bằng một mẫu sulfit);

TCVN 13610:2023

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

v là thể tích mẫu thử trong cuvet, tính bằng millilit (mL), $v = 2,00$ mL đối với đường hoặc $v = 0,20$ mL đối với xirô.

Đối với mẫu đường, nồng độ sulfit của dung dịch thử được tính theo Công thức (6):

$$C = \frac{0,101}{\varepsilon} \cdot A \quad (6)$$

Đối với mẫu xirô, nồng độ sulfit của dung dịch thử được tính theo Công thức (7):

$$C = \frac{0,1012}{\varepsilon} \cdot A \quad (7)$$

Để thu được kết quả cuối cùng, nhân các kết quả trên với hệ số pha loãng được sử dụng khi chuẩn bị mẫu thử.

CHÚ THÍCH Việc sử dụng các bộ kit chuẩn bị sẵn có thể cần thay đổi thể tích và phép tính nêu trên. Các thay đổi này sẽ được quy định trong hướng dẫn sử dụng kit thử.

8 Độ chụm

Các giá trị độ chụm dưới đây được xác định từ dữ liệu phân tích liên phòng thử nghiệm đối với đường trắng chứa hàm lượng sulfit từ 4,02 mg/kg đến 23,84 mg/kg. Các giá trị độ chụm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và nền mẫu khác với dải nồng độ và nền mẫu đã sử dụng.

8.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập, đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong cùng một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại r từ 1,17 mg/kg đến 6,49 mg/kg, với độ lặp lại trung bình là 4,46 mg/kg.

8.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng một 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 thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn giá trị giới hạn tái lập R từ 1,74 mg/kg đến 14,58 mg/kg, với độ tái lập trung bình là 7,32 mg/kg.

9 Báo cáo thử nghiệm

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

- mọi thông tin cần thiết cho việc nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi điều kiện thao tác không quy 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;
- kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] TCVN 4837, Đường – Lấy mẫu
