TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13803:2023
ISO 22184:2021

Xuất bản lần 1

SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ĐƯỜNG – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ TRAO ĐỔI ANION HIỆU NĂNG CAO VỚI DETECTOR ĐO XUNG AMPE (HPAEC-PAD)

Milk and milk products – Determination of the sugar contents – High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection method (HPAEC-PAD)

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13803:2023 hoàn toàn tương đương với ISO 22184:2021;

TCVN 13803:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa và sản phẩm từ sữa – Xác định hàm lượng đường – Phương pháp sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao với detector đo xung ampe (HPAEC-PAD)

Milk and milk products – Determination of the sugar contents – High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection method (HPAEC-PAD)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng để định lượng từng loại đường (galactose, glucose, fructose, sacarose, lactose và maltose) trong sữa và sản phẩm sữa, sử dụng arabinose làm chất nội chuẩn.

Phương pháp này có thể áp dụng cho nền mẫu sữa sau đây: sữa, sữa đặc có đường, sữa bột, phomat, bột whey, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh, món tráng miệng có chứa sữa và sữa chua.

Phương pháp này không áp dụng cho các sản phẩm sữa có chứa đậu nành hoặc để xác định hàm lượng lactose trong các sản phẩm sữa có hàm lượng lactose thấp ở mức dưới 1 mg/g.

Sử dụng phương pháp sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao kết hợp với phương pháp phát hiện đo xung ampe (HPAEC-PAD)[5] [3] [4]. Với phương pháp này, có thể tách được mười ba monosaccharid, disaccharid và trisaccharid khác nhau: fucose, arabinose, galactose, glucose, fructose, sacarose, lactose, lactulose, maltose, melibiose, trehalose, isomaltulose và maltotriose.

Phương pháp này có thể áp dụng để ghi nhãn cho sáu loại đường quan trọng nhất có thể có trong tự nhiên hoặc bằng cách bổ sung vào sữa và sản phẩm sữa. Phương pháp này không áp dụng cho hàm lượng đường nhỏ hơn 0,1 %.

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 thử nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Tiêu chuẩn này không đưa ra các thuật ngữ và định nghĩa.

4 Nguyên tắc

Các loại đường có trong mẫu được chiết bằng dung dịch đệm etanol trong nước để ức chế các hoạt động của các loại probiotic. Khử protein trong dịch chiết thu được bằng chất làm trong Carrez. Sau khi làm trong, dung dịch được pha loãng và các loại đường có mặt được tách và định lượng bằng HPAEC. HPAEC cho phép tách cacbohydrat ở pH cao. Để tăng độ nhạy và độ ổn định, thêm dung dịch natri hydroxit sau cột vào HPAEC-PAD. GOS (galacto-oligosaccharid) và fructan không gây nhiễu trong phép phân tích đường [5]. Arabinose được sử dụng làm chất nội chuẩn để định lượng các loại đường.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước phù hợp với TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác.

5.1 Nước, phù hợp với loại 3 và loại 1, TCVN 4851 (ISO 3696).

5.2 Natri hydroxit (NaOH) dạng viên.

5.3 Dung dịch natri hidroxit trong nước, nồng độ c = 1 mol/L.

Cho 40 g ± 1 g NaOH dạng viên (5.2) vào bình định mức 1 000 ml, hòa tan trong khoảng 500 ml nước và sau khi làm nguội, pha loãng với nước đến vạch và đồng hoá.

5.4 Dung dịch natri hydroxit, w(NaOH) = 33 % phần khối lượng trong nước.

5.5 Dung dịch natri hydroxit, w(NaOH) = 50 % phần khối lượng trong nước.

Lượng cacbonat và thủy ngân trong thuốc thử là nhỏ nhất. Không lắc hoặc khuấy dung dịch trước khi sử dụng. Cũng có thể sử dụng dung dịch natri hydroxit cacbonat phù hợp có bán sẵn.

5.6 Axit clohydric đậm đặc (HCl), từ 36 % đến 38 % phần khối lượng trong nước.

5.7 Dung dịch axit clohydric trong nước, c = 1 mol/L.

Cho 500 ml nước vào bình định mức dung tích 1 000 ml (6.2), tiếp theo thêm 83 ml HCl đậm đặc (5.6) và sau khi nguội, pha loãng bằng nước đến vạch và đồng hoá.

5.8 Axetonitril (chất lượng HPLC).

5.9 Axetonitril trong nước, 5 % phần thể tích.

Cho 50 ml axetonitril (5.8) vào bình định mức dung tích 1000 ml (6.2), pha loãng bằng nước loại 3 đến vạch và đồng hoá.

5.10 Natri axetat (CH_3COONa) (chất lượng HPLC), khan.

5.11 Chất rửa giải 1 (E1), dung dịch natri axetat trong nước (CH_3COONa), c = 1,0 mol/L

Cho khoảng 800 ml nước loại 1 đã khử khí (chất rửa giải 3, 5.13) vào bình định mức dung tích 1 000 ml (6.2), tiếp theo là 82,0 g natri axetat (5.10). Sau đó, pha loãng dung dịch với nước đã khử khí (chất rửa giải 3, 5.13) đến vạch và đồng hoá. Bảo quản chất rửa giải trong môi trường trơ.

5.12 Chất rửa giải 2 (E2), dung dịch natri hydroxit (NaOH) trong nước không chứa cacbonat, c = 0,2 mol/L

Cho khoảng 800 ml nước loại 1 đã khử khí (chất rửa giải 3, 5.13) vào bình định mức dung tích 1000 ml (6.2) và thông khí bằng heli trong 15 min. Thêm tiếp 16,0 g dung dịch natri hydroxit (5.5). Sau đó, pha loãng nhanh dung dịch bằng nước loại 1 đã khử khí (chất rửa giải 3, 5.13) đến vạch, đậy ngay nắp bình và đồng hoá. Bảo quản chất rửa giải trong môi trường trơ.

5.13 Chất rửa giải 3 (E3), nước loại 1 đã khử khí đã khử khí, được bảo quản trong môi trường trơ.

5.14 Chất rửa giải 4 (E4), dung dịch natri axetat (CH3COONa) trong nước, c = 0,025 mol/L.

Cho khoảng 800 ml nước loại 1 đã khử khí (chất rửa giải 3, 5.13) vào bình định mức dung tích 1 000 ml (6.2), tiếp theo là 2,05 g natri axetat (5.10). Sau đó, pha loãng dung dịch với nước đã khử khí (chất rửa giải 3, 5.13) đến vạch và đồng hoá. Bảo quản chất rửa giải trong môi trường trơ.

5.15 Thuốc thử sau cột, dung dịch nước natri hydroxit, c = 0,3 mol/L.

Cho khoảng 800 ml nước loại 1 đã khử khí (chất rửa giải 3, 5.13) vào bình định mức dung tích 1 000 ml (6.2). Thổi heli trong 15 min. Thêm 24,0 g dung dịch natri hydroxit (5.5) và thêm ngay nước loại 1 đã khử khí (chất rửa giải 3, 5.13) đến vạch. Đậy ngay bình và đồng hoá. Bảo quản thuốc thử sau cột trong môi trường trơ.

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Phải loại bỏ cacbon dioxit hòa tan khỏi chất rửa giải và thuốc thử sau cột trước khi sử dụng và trong khi sử dụng để tránh giảm nhanh độ nhạy của detector. Chất rửa giải và thuốc thử sau cột được duy trì trong khí trơ trong suốt quá trình sử dụng.

5.16 Hỗn hợp của etanol 95 % phần thể tích và 5 % metanol phần thể tích (với etanol 96 % phần thể tích và 4 % nước).

5.17 Kali hexacyanoferrat (II) ngậm ba phân tử nước, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$.

5.18 Kẽm axetat ngậm hai phân tử nước, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$.

5.19 Axit axetic băng.

5.20 Thuốc thử Carrez I

Cân 106 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (5.17) cho vào bình định mức dung tích 1 000 ml (6.2), hòa tan trong 800 ml nước (5.1) và pha loãng bằng nước loại 3 đến vạch. Bảo quản thuốc thử Carrez I trong tủ lạnh.

5.21 Thuốc thử Carrez II

Cân 220 g $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ (5.18) cho vào bình định mức dung tích 1 000 ml (6.2), hòa tan trong 800 ml nước, thêm 30 ml axit axetic băng (5.19) và pha loãng bằng nước loại 3 đến vạch. Bảo quản thuốc thử Carrez II trong tủ lạnh.

ĐIỀU QUAN TRỌNG – Không sử dụng thuốc thử Carrez II với kẽm sulfat.

5.22 Dung dịch đệm piperazine-N, N′-bis (axit 2-etanesulfonic) (PIPES) (c = 1,5 mol/L và pH = 6,9).

Thêm 22,5 g dung dịch đệm PIPES vào bình nón dung tích 100 ml và thêm 20 ml dung dịch natri hydroxit (5.3). Chỉnh pH đến pH = 6,9 bằng NaOH 33 % (5.4) trong nước. Chuyển hết lượng dung dịch đệm PIPES vào ống dung tích 50 ml đã hiệu chuẩn và thêm nước loại 3 đến 50 ml. Độ pH của dung dịch đệm thu được phải trong khoảng từ 6,8 đến 7,0.

5.23 Arabinose.

5.24 Galactose.

5.25 Glucose.

5.26 Fructose.

5.27 Sacarose.

5.28 Lactose.

5.29 Maltose.

5.30 Dung dịch nội chuẩn gốc arabinose.

Cân khoảng 7 g arabinose (5.23), chính xác đến mg, cho vào bình định mức dung tích 50 ml (6.2). Thêm khoảng 30 ml nước loại 3 và hòa tan arabinose. Thêm 2,5 ml axetonitril (5.8), bổ sung nước đến vạch và đồng hoá dung dịch.

5.31 Dung dịch chuẩn gốc đường

Cân khoảng 260 mg từng loại đường monosaccharid galactose (5.24), glucose (5.25) và fructose (5.26) và khoảng 400 mg các disaccharid sacarose (5.27), lactose (5.28) và maltose (5.29), chính xác đến 0,1 mg vào bình định mức dung tích 500 ml (6.2). Thêm khoảng 200 ml nước loại 3 và hòa tan đường. Thêm 25 ml axetonitril (5.8), bổ sung nước loại 3 đến vạch và đồng hoá dung dịch.

5.32 Dung dịch chuẩn hiệu chuẩn đường

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng khác nhau của chuẩn hiệu chuẩn đường như quy định trong Bảng 1. Trộn các thể tích quy định của dung dịch nội chuẩn gốc arabinose (5.30) và dung dịch chuẩn gốc đường (5.31) trong bình định mức dung tích 200 ml, bổ sung khoảng 50 ml nước loại 3 và đồng hoá. Bổ sung 10 ml axetonitril (5.8), thêm nước đến vạch và đồng hoá.

Bảng 1 – Chuẩn bị dung dịch chuẩn hiệu chuẩn đường

Dung dịch chuẩn đường	Thể tích dung dịch chuẩn gốc đường (5.31) ml	Thể tích dung dịch nội chuẩn gốc arabinose (5.30) ml
1	0,2	0,050
2	1,0	0,050
3	6,0	0,050
4	10,0	0,050
5	20,0	0,050
6	40,0	0,050
7	80,0	0,050
8	100,0	0,050

6 Thiết bị, dụng cụ

6.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến ± 0,1 mg.

6.2 Bình định mức, dung tích 50 ml, 500 ml và 1 000 ml.

6.3 Máy đo pH.

6.4 Giấy lọc dải băng đen.

6.5 Ống ly tâm.

6.6 Máy đồng hóa[1].

6.7 Máy trộn Vortex.

6.8 Ống chia vạch có nắp vặn, dung tích 50 ml.

6.9 Pipet đa kênh dịch chuyển dương.

6.10 Bộ phân phối, chịu được dung môi hữu cơ và điều chỉnh được đến 2,5 ml và 25 ml.

6.11 Lọ nhỏ (vial) HPLC.

6.12 Hệ thống sắc ký lỏng không chứa kim loại, ví dụ Thermo Dionex ICS 3000[2], áp dụng cho rửa giải gradient (có thể trộn được bốn dung môi).

6.13 Lò cột, có nhiệt độ ổn định đến ± 1 °C với dải nhiệt độ 20 °C đến 35 °C.

6.14 Cột phân tích trao đổi anion hiệu năng cao[3], đổ đầy hạt resin polystyren-divinylbenzen hoặc đổ đầy resin trao đổi anion để tách theo yêu cầu.

6.15 Cột bảo vệ trao đổi anion hiệu suất cao[4], đổ đầy hạt resin polystyrene-divinylbenzen hoặc được đổ đầy resin trao đổi anion để tách theo yêu cầu.

6.16 Detector đo xung ampe (PAD)[5] có nhiệt độ ổn định đến ± 1 °C và dải nhiệt độ 20 °C đến 35 °C.

Sử dụng detector đo xung ampe, cài đặt điện thế và dạng sóng theo khuyến cáo của nhà cung cấp thiết bị. Ví dụ về cài đặt điện thế của detector (so với chuẩn Ag/AgCl) được nêu trong Bảng 2.

6.17 Bơm thuốc thử sau cột không chứa kim loại[6].

6.18 Hệ thống tích phân dữ liệu sắc ký[7].

---

[1] Ultra turrax với đầu dò thích hợp là ví dụ về thiết bị đồng hóa thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

[2] Thermo Dionex ICS 3000 là ví dụ về bộ đồng hóa thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

[3] Cột phân tích Thermo-Dionex Carbopac PA1 (2 mm × 250 mm) là ví dụ về cột trao đổi anion hiệu năng cao thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

[4] Cột bảo vệ Dionex Carbopac PA1 (2 mm × 50 mm) là ví dụ về cột trao đổi anion hiệu năng cao thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

[5] Model PAD của Thermo-Dionex là ví dụ về PAD thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

[6] Bộ bơm Thermo Dionex Axp piston đơn là ví dụ về bộ bơm thuốc thử sau cột không chứa kim loại thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

[7] Gói phần mềm Thermo Dionex Chromeleon là ví dụ về gói phần mềm phân tích sắc ký thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

Bảng 2 – Chương trình thời gian cài đặt điện thế detector của điện cực làm việc bằng vàng

Bước	Thời gian s	Điện thế của điện cực vàng [a]	Tín hiệu detector tích hợp
1	0,00	0,10	
2	0,20	0,10	Bắt đầu
3	0,40	0,10	Kết thúc
4	0,41	−2,00	
5	0,42	−2,00	
6	0,43	0,60	
7	0,44	−0,10	
8	0,50	−0,10	

[a] Điện thế so với điện cực so sánh Ag/AgCl.

CHÚ THÍCH: Khoảng thời gian tích phân từ 0,20 s đến 0,40 s.

7 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.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Yêu cầu chung

Chuẩn bị mẫu theo quy trình lấy mẫu thích hợp. Sữa đặc có đường yêu cầu chuẩn bị mẫu riêng, xem TCVN 5536 (ISO 2911) và 8.2 của tiêu chuẩn này.

8.2 Chuẩn bị mẫu sữa đặc có đường

8.2.1 Mẫu sản phẩm mới sản xuất dự kiến không có sự phân tách đáng kể giữa các thành phần

Mở vật chứa, chuyển tất cả mẫu bám dính trên nắp vật chứa vào bên trong vật chứa và trộn kỹ bằng cách đưa thìa lên xuống, sao cho các lớp trên cùng và phần chứa ở các góc dưới được di chuyển và trộn đều. Đối với sản phẩm dạng hộp, chuyển lượng chứa trong hộp vào bình có nắp đậy kín. Đối với sản phẩm ở dạng ống gấp được, chuyển hết mẫu vào bình có nắp đậy kín, sau đó cắt đầu ống, vét hết phần bám dính trong ống cho vào bình. Trộn đều lượng chứa trong bình như mô tả ở trên.

8.2.2 Mẫu sản phẩm đã sản xuất lâu hơn và mẫu trong đó có thể có sự phân tách giữa các thành phần

Đun nóng mẫu trong nồi cách thủy ở nhiệt độ khoảng 40 °C cho đến khi mẫu gần đạt đến nhiệt độ này. Mở vật chứa và tiến hành như trong 8.2.1. Đối với sản phẩm dạng hộp hoặc dạng ống, chuyển lượng chứa vào bình, vét hết phần bám dính trên thành hộp hoặc ống (trong trường hợp ống gấp được, mở

nắp sau khi cắt đầu ống) và tiếp tục trộn cho đến khi toàn bộ khối đồng nhất, giảm cỡ của các hạt tinh thể bằng cách nghiền bằng đũa thủy tinh. Đậy kín bình. Để nguội.

9 Cách tiến hành

9.1 Chiết mẫu và làm sạch

9.1.1 Yêu cầu chung

Trong trường hợp phần mềm sắc ký tích phân có tùy chọn "chất nội chuẩn có thể thay đổi" (ví dụ: trong Chromeleon ™ [8]), áp dụng quy trình nêu trong 9.1.2. Trong trường hợp này, chỉ thực hiện một lần chiết mẫu và một quy trình làm sạch với hai độ pha loãng khác nhau. Điều chỉnh cài đặt bộ tích phân với tùy chọn chất nội chuẩn có thể thay đổi đối với độ pha loãng 50 lần.

Đối với hàm lượng đường thấp, áp dụng quy trình nêu trong 9.1.2.2. Đối với hàm lượng đường cao, áp dụng quy trình nêu trong 9.1.2.3. Các giới hạn đối với hàm lượng đường thấp và cao được nêu trong Bảng 3.

Bảng 3 – Giới hạn hàm lượng đường thấp và cao

Đường	Hàm lượng thấp g/100 g	Hàm lượng cao g/100 g
Galactose	≤12	> 12
Glucose	≤ 12	> 12
Fructose	≤ 12	> 12
Sacarose	≤18	> 18
Lactose	≤18	> 18
Maltose	≤18	> 18

Trong trường hợp phần mềm tích phân sắc ký không có tùy chọn cho "chất nội chuẩn có thể thay đổi" và không biết trước về mức đường trong mẫu sữa cần khảo sát, thì nên áp dụng quy trình nêu trong 9.1.2.2 đối với lượng đường thấp. Trong trường hợp pic đường lớn hơn pic đường tương ứng trong chất chuẩn hiệu chuẩn cao nhất, thì áp dụng quy trình nêu trong 9.1.2.3. để định lượng chính xác hàm lượng đường.

9.1.2 Chiết mẫu và làm sạch

9.1.2.1 Yêu cầu chung

Cân 1,0 g ± 0,1 g mẫu, chính xác đến 0,000 1 g cho vào ống chia vạch 50 ml (6.8) đã được hiệu chuẩn.

[8] Thông tin này đưa ra để tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

Thêm 4 ml etanol biến tính (5.16), 0,125 ml dung dịch nội chuẩn arabinose (5.30) và 0,5 ml dung dịch đệm PIPES (5.22).

Trộn đều bằng máy trộn Vortex (6.7) và để yên huyền phù trong 10 min ở nhiệt độ môi trường.

Đổ đầy ống đã hiệu chuẩn đến vạch 25 ml bằng nước loại 3 đã khử khoáng (5.1) có nhiệt độ 40 °C ± 2 °C, sau đó đồng nhất bằng máy đồng hóa (6.6) trong 1 min.

CHÚ THÍCH Các mẫu đã hòa tan tốt có thể được đồng nhất bằng cách lắc.

Kiểm tra pH của dung dịch mẫu đã đồng nhất. Độ pH phải nằm trong giá trị pH = 5,0 đến pH = 7,0. Nếu cần, điều chỉnh pH bằng dung dịch NaOH (5.3) hoặc dung dịch HCl (5.7).

Thêm 0,5 ml dung dịch thuốc thử Carrez I (5.20), trộn và sau đó thêm 0,5 ml dung dịch thuốc thử Carrez II (5.21). Thêm 2,5 ml axetonitril (5.8) và thêm nước (5.1) đến vạch 50 ml. Vặn kín nắp ống đã hiệu chuẩn và trộn đều.

Lọc huyền phù qua giấy lọc dải băng đen (6.4) và thu lấy phần dịch lọc.

Chuẩn bị từ mỗi dịch lọc hai độ pha loãng khác nhau trực tiếp trong các vial HPLC (6.11):

- Pha loãng 10 lần: trộn 100 µl dịch lọc với 900 µl nước loại 3 (5.1);
- Pha loãng 50 lần: trộn 20 µl dịch lọc với 980 µl nước loại 3 (5.1) và điều chỉnh cài đặt bộ tích phân cho các dịch lọc được pha loãng 50 lần này trong quy trình nội chuẩn có thể thay đổi được.

Bơm 5 µl dịch lọc đã pha loãng vào hệ thống sắc ký lỏng không chứa kim loại (6.12).

Trong trường hợp pic của đường đo được nằm ngoài đồ thị hiệu chuẩn trong mẫu pha loãng 10 lần, sử dụng kết quả đo trong mẫu pha loãng 50 lần sau khi điều chỉnh đúng cài đặt cho tùy chọn chất nội chuẩn có thể thay đổi được.

9.1.2.2 Chiết mẫu và làm sạch mẫu đối với lượng đường thấp (pha loãng 10 lần)

Cân 1,0 g ± 0,1 g, chính xác đến 0,000 1 g, cho vào ống chia vạch 50 ml (6.8) đã được hiệu chuẩn.

Thêm 4 ml hỗn hợp gồm etanol biến tính (5.16), 0,125 ml dung dịch nội chuẩn arabinose (5.30) và 0,5 ml dung dịch đệm PIPES (5.22).

Trộn kỹ bằng máy trộn Vortex (6.7) và để yên huyền phù mẫu trong 10 min ở nhiệt độ phòng.

Đổ đầy ống hiệu chuẩn đến vạch 25 ml bằng nước loại 3, đã khử khoáng (5.1) có nhiệt độ 40 °C ± 2 °C, sau đó đồng nhất bằng máy đồng hóa (6.6) trong 1 min.

CHÚ THÍCH: Các mẫu đã hòa tan tốt có thể được đồng nhất bằng cách lắc.

Kiểm tra pH của dung dịch mẫu đã đồng nhất. Độ pH phải nằm trong giá trị pH = 5,0 đến pH = 7,0. Nếu cần, chỉnh pH bằng dung dịch NaOH (5.3) hoặc dung dịch HCl (5.7).

Thêm 0,5 ml dung dịch thuốc thử Carrez I (5.20), lắc đều và sau đó thêm 0,5 ml dung dịch thuốc thử Carrez II (5.21). Thêm 2,5 ml axetonitril (5.8) và thêm nước (5.1) đến vạch 50 ml. Đậy ống hiệu chuẩn bằng nắp vặn và trộn kỹ.

Lọc huyền phù qua giấy lọc dải băng đen (6.4), thu lấy dịch lọc và trộn 100 µl dịch lọc với 900 µl nước loại 3 (5.1) trong lọ vial HPLC (6.11).

Bơm 5 µl dịch lọc đã pha loãng vào hệ thống sắc ký lỏng không chứa kim loại (6.12).

9.1.2.3 Chiết và làm sạch mẫu đối với lượng đường cao (pha loãng 50 lần)

Cân 1,0 g ± 0,1 g, chính xác đến 0,000 1 g cho vào ống hiệu chuẩn 50 ml (6.8).

Thêm 4 ml hỗn hợp gồm etanol biến tính (5.16), 0,625 ml dung dịch nội chuẩn arabinose (5.30) và 0,5 ml dung dịch đệm PIPES (5.22).

Lọc huyền phù qua giấy lọc dải băng đen (6.4), thu lấy dịch lọc và trộn 20 µl dịch lọc với 980 µl nước loại 3 (5.1) cho vào lọ vial HPLC (6.11).

Bơm 5 µl dịch lọc đã pha loãng vào hệ thống sắc ký lỏng không chứa kim loại (6.12).

9.2 Phân tích sắc ký

Cài đặt hệ thống sắc ký (6.12) với lò cột (6.13), cột bảo vệ trao đổi anion hiệu năng cao (6.15) và cột phân tích (6.14), bơm thuốc thử sau cột (6.17), detector (6.16) và hệ thống tích phân (6.18). Lập trình profile rửa giải gradient tuyến tính như nêu trong Bảng 4.

Để hệ thống sắc ký cân bằng trong ít nhất 15 min, sau đó bơm ba lần chất thử chuẩn để ổn định hệ thống sắc ký trong các điều kiện quy định trong Bảng 2, Bảng 3 và Bảng 4.

Hiệu chuẩn hệ thống sắc ký bằng cách bơm liên tiếp 5 µl của 8 mẫu chuẩn hiệu chuẩn đường (5.32) trong các điều kiện quy định trong Bảng 2, Bảng 3 và Bảng 4.

Phân tích phần dịch lọc đã chuẩn bị bằng cách bơm 5 µl mẫu dịch lọc (9.1) vào hệ thống sắc ký trong các điều kiện quy định trong Bảng 2, Bảng 3 và Bảng 4 (gradient rửa giải được đưa ra làm ví dụ cho việc cài đặt thiết bị cụ thể).

Bơm một dãy 4 mẫu chuẩn hiệu chuẩn đường (5.32) sau mỗi dãy 8 mẫu dịch lọc (9.1) có tính đến những thay đổi nhỏ về thời gian lưu và/hoặc độ nhạy của detector. Sử dụng luân phiên 4 mẫu hiệu chuẩn số 1, 3, 5 và 7 và 4 mẫu hiệu chuẩn số 2, 4, 6 và 8.

Bảng 4 – Ví dụ điển hình về profile rửa giải gradient thích hợp để tách đường bằng sắc ký

Thời gian min	**Phần trăm E1** CH_3COONa, c = 1 mol/L	**Phần trăm E2** NaOH, c = 0,2 mol/L	**Phần trăm E3** H_2O	**Phần trăm E4** CH_3COONa, c = 0,025 mol/L	
Khởi đầu	0	5	88	7	
0	0	5	88	7	Bơm mẫu và bắt đầu thu thập dữ liệu
10	0	5	88	7	
15	0	17	76	7	
25	0	93	0	7	
28,1	20	73	0	7	Dừng thu thập dữ liệu và bắt đầu rửa cột
32,0	20	73	0	7	Kết thúc rửa cột
32,1	0	5	88	7	Bắt đầu cân bằng cột
52	0	5	88	7	Kết thúc cân bằng cột và kết thúc chu kỳ

Profile gradient đặc trưng cho hệ thống sắc ký được áp dụng. Nên kiểm tra profile gradient. Các độ phân giải sắc ký yêu cầu được liệt kê trong Bảng 5. Trong trường hợp độ phân giải giữa glucose và sacarose và giữa sacarose và fructose nhỏ hơn yêu cầu 1,5 thì nên tăng phần trăm chất rửa giải E2 (NaOH 0,2 mol/L) một chút (từ 5 % lên 5,5 %) và giảm phần trăm chất rửa giải E3 (nước đã khử khí) với cùng một lượng.

Bảng 5 – Nhu cầu về độ phân giải sắc ký

Đường	**Độ phân giải yêu cầu tối thiểu**
Arabinose-galactose	> 1,5
Galactose-glucose	> 1,5
Glucose-sacarose	> 1,5
Sacarose-fructose	> 1,5
Fructose-melibiose	> 1,5

10 Tính và biểu thị kết quả

Nhận biết các loại đường trong dung dịch mẫu bằng cách so sánh thời gian lưu của máy với thời gian lưu của các pic tương ứng trong các mẫu hiệu chuẩn đường. Hiệu chuẩn hệ thống sắc ký bằng cách sử dụng cả dãy mẫu chuẩn hiệu chuẩn đường (5.32), được chạy trước và sau dãy 8 mẫu dịch lọc (xem 9.1).

Nồng độ khối lượng của đường trong dung dịch gốc (5.31), ρ_{st}, biểu thị bằng miligam trên mililit (mg/ml), được tính theo Công thức (1):

$$\rho_{st} = \frac{m \times P/100}{500} \quad (1)$$

trong đó

m là khối lượng chất chuẩn đường, tính bằng miligam (mg);

P là độ tinh khiết của chuẩn đường, tính bằng phần trăm (%);

100 là hệ số chuyển đổi;

500 là thể tích của dung dịch gốc, tính bằng mililit (ml).

Nồng độ khối lượng của đường trong dung dịch hiệu chuẩn (5.32), ρ_{cal}, biểu thị bằng miligam trên mililit (mg/ml), được tính theo Công thức (2):

$$\rho_{cal} = \frac{(V_{st} \times \rho_{st})}{200} \quad (2)$$

Trong đó:

V_{st} là thể tích của dung dịch gốc đường, tính bằng mililit (ml);

ρ_{st} là nồng độ khối lượng của đường trong dung dịch gốc (5.31), tính bằng mg/ml;

200 là thể tích của dung dịch chuẩn hiệu chuẩn đường, tính bằng mililit (ml).

Đối với đồ thị hiệu chuẩn, sử dụng phần mềm công cụ cho từng chất phân tích đường để vẽ đường chuẩn tám điểm của tỷ số giữa đáp ứng của thiết bị đối với chất phân tích và đáp ứng của thiết bị đối với arabinose nội chuẩn so với nồng độ của chất phân tích. Chỉnh đường cong bậc hai ($y = ax^2 + bx + c$) với dữ liệu không đi qua điểm 0, trong đó y là nồng độ đường tính bằng mg/ml trong các lần bơm 5 µl mẫu hiệu chuẩn và *x* là diện tích pic tương đối xác định được theo tỷ lệ của nồng độ đường và nồng độ chất nội chuẩn arabinose.

Tính nồng độ khối lượng đường trong 5 µl dung dịch mẫu đã chuẩn bị được bơm, ρ_{inj}, tính bằng mg/ml, sử dụng Công thức (3):

$$\rho_{inj} = ax^2 + bx + c \quad (3)$$

trong đó:

a, b, c là các giá trị thu được từ phương trình hồi quy bậc hai;

x là diện tích pic tương đối (tỷ lệ giữa nồng độ đường và nồng độ chất nội chuẩn arabinose).

Phần khối lượng của đường trong mẫu thử, w_s, biểu thị bằng mg/kg, được tính theo Công thức (4):

$$w_s = \frac{\rho_{inj}}{m} \times D \times 50 \times 1\,000 \qquad (4)$$

Trong đó:

ρ_{inj} là nồng độ khối lượng đường trong 5 µl dung dịch mẫu đã chuẩn bị được bơm vào, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml);

m là khối lượng của mẫu thử, tính bằng gam (g);

D là hệ số pha loãng của mẫu đã lọc; D = 10 áp dụng độ pha loãng 10 lần của mẫu bơm đã lọc và D = 50 áp dụng độ pha loãng 50 lần của mẫu bơm đã lọc;

50 là hệ số chuyển đổi, tính bằng mililit (ml);

1 000 là hệ số chuyển đổi từ gam (g) sang kilogam (kg).

Định lượng các loại đường trong mẫu bằng cách sử dụng các đường chuẩn.

11 Độ chụm

11.1 Yêu cầu chung

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

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ, thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện, sử dụng cùng một thiết bị trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r.

Các giá trị cho galactose, glucose, fructose, sacarose, lactose và maltose lần lượt được nêu trong Bảng 6 đến Bảng 11.

Bảng 6 – Giá trị đối với galactose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 0,70 g/100 g	r = 0,03 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 0,10 g/100 g	r = 0,02 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = 2,14 g/100 g	r = 0,07 g/100 g	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,40 g/100 g	r = 0,03 g/100 g	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,60 g/100 g	r = 0,02 g/100 g	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,24 g/100 g	r = 0,02 g/100 g	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd : không thể phát hiện được		

Bảng 7 – Giá trị đối với glucose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 0,45 g/100 g	r = 0,02 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 1,17 g/100 g	r = 0,06 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = 2,23 g/100 g	r = 0,06 g/100 g	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 1,08 g/100 g	r = 0,09 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,38 g/100 g	r = 0,02 g/100 g	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,48 g/100 g	r = 0,06 g/100 g	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = 2,00 g/100 g	r = 0,09 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd : không thể phát hiện được		

Bảng 8 – Giá trị đối với fructose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 2,16 g/100 g	r = 0,10 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 5,53 g/100 g	r = 0,98 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd : không thể phát hiện được		

Bảng 9 – Giá trị đối với sacarose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 2,29 g/100 g	r = 0,10 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 7,80 g/100 g	r =0,72 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 1,08 g/100 g	r = 0,11 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 45,1 g/100 g	r = 1,7 g/100 g	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = 27,6 g/100 g	r = 0,8 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd : không thể phát hiện được		

Bảng 10 – Giá trị đối với lactose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 2,67 g/100 g	r = 0,19 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 29,5 g/100 g	r = 0,4 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = 0,22 g/100 g	r = 0,07 g/100 g	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 21,6 g/100 g	r = 4,2 g/ 100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 2,52 g/100 g	r = 0,12 g/100 g	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 68,6 g/100 g	r = 3,2 g/ 100 g	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 1,07 g/100 g	r = 0,08 g/100 g	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 10,5 g/100 g	r = 0,7 g/100 g	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = 0,52 g/100 g	r = 0,03 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd : không thể phát hiện được		

Bảng 11 – Giá trị đối với maltose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 1,77 g/100 g	r = 0,11 g/ 100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 1,28 g/100 g	r = 0,08 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	r = nd	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = 2,43 g/100 g	r = 0,22 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd : không thể phát hiện được		

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ, thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau được báo cáo bởi hai phòng thử nghiệm, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị *R*.

Các giá trị cho galactose, glucose, fructose, sacarose, lactose và maltose lần lượt được nêu trong Bảng 12 đến Bảng 17.

Bảng 12 – Giá trị đối với galactose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 0,70 g/100 g	*R* = 0,11 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 0,10 g/100 g	*R* = 0,05 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = 2,14 g/100 g	*R* = 0,27 g/100 g	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	*R* = nd	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,40 g/100 g	*R* = 0,08 g/100 g	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,60 g/100 g	*R* = 0,09 g/100 g	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,24 g/100 g	*R* = 0,06 g/100 g	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	*R* = nd	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = nd	*R* = lid	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được		

Bảng 13 – Giá trị đối với glucose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 0,45 g/100 g	*R* = 0,07 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 1,17 g/100 g	*R* = 0,24 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = 2,23 g/100 g	*R* = 0,25 g/100 g	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 1,08 g/100 g	*R* = 0,29 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,38 g/100 g	*R* = 0,09 g/100 g	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,48 g/100 g	*R* = 0,12 g/100 g	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	*R* = nd	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	*R* = nd	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = 2,00 g/100 g	*R* = 0,28 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được		

Bảng 14 – Giá trị đối với fructose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 2,16 g/100 g	R = 0,22 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 5,53 g/100 g	R = 1,5 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được		

Bảng 15 – Giá trị đối với sacarose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 2,29 g/100 g	R = 0,23 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 7,80 g/100 g	R = 0,98 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 1,08 g/100 g	R = 0,36 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 45,1 g/100 g	R =15,6 g/100 g	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = 0,52 g/100 g	R = 3,0 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được		

Bảng 16 – Giá trị đối với lactose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = 2,67 g/100 g	R = 0,44 g/100 g	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 29,5 g/100 g	R = 8,1 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = 0,22 g/100 g	R = 0,14 g/100 g	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 21,6 g/100 g	R = 6,4 g/ 100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 2,52 g/100 g	R = 0,48 g/100 g	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 68,6 g/100 g	R = 20,5 g/100 g	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 1,07 g/100 g	R = 0,35 g/100 g	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = 0,52 g/100 g	R = 0,17 g/100 g	Sữa đặc có đường
$\bar{x}$ = 0,52 g/100 g	R = 0,17 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được		

Bảng 17 – Giá trị đối với maltose

Giá trị trung bình	Giới hạn lặp lại	Mẫu thử nghiệm
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Sữa chua uống có đường
$\bar{x}$ = 1,77 g/100 g	R = 1,4 g/100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Sữa UHT lactose thấp (mẫu chuẩn MUVA)
x = 1,28 g/100g	R = 0,42 g/10() g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Phomat cream (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Bột whey (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Phomat chế biến (mẫu chuẩn MUVA)
$\bar{x}$ = nd	R = nd	Sữa đặc có đường
x = 2,43 g/100 g	R = 0,64 g/ 100 g	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (mẫu chuẩn được chứng nhận bởi NIST)
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được		

12 Báo cáo thử nghiệm

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

a) mọi thông tin cần thiết cho việc nhận biết đầy đủ về mẫu (loại mẫu, nguồn gốc và ký hiệu của mẫu);

b) viện dẫn tiêu chuẩn này;

c) ngày và phương pháp lấy mẫu (nếu biết);

d) ngày nhận mẫu;

e) ngày thử nghiệm;

f) các kết quả thử nghiệm và các đơn vị đo thể hiện;

g) mọi thao tác không được quy định trong phương pháp hoặc được coi là tùy chọn, có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A
(tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Dữ liệu đưa ra trong Bảng A.1 đến A.6 thu được trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, được tổ chức bởi Rotating Disc b.v. và Trung tâm Eurofins Carbohydrate Competence, phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) về các quy trình nghiên cứu hợp tác nhằm xác nhận các đặc tính của phương pháp phân tích. Báo cáo về nghiên cứu liên phòng thử nghiệm cung cấp thêm thông tin về hệ thống và cài đặt sắc ký, xem https://standards.iso.org/iso/22184/ed-1/en/ và Tài liệu tham khảo [12].

Bảng A.1 – Dữ liệu về độ chụm đối với galactose trong các mẫu sữa khác nhau

Thông số	Sữa chua uống có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn	Sữa UHT MUVA	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh MUVA	Phomat cream MUVA	Bột whey MUVA	Phomat đã qua chế biến MUVA	Sữa đặc có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh NIST
Năm tiến hành thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
n = Số phòng thử nghiệm tham gia	13	11	13	13	13	13	13		
Số phòng thử nghiệm không phát hiện hoặc thiếu dữ liệu	–	2	–	2	–	–	–		
Ngoại lệ Cochran (số phòng thử nghiệm)	–	–		–	–	2	–		
Ngoại lệ Grubb (số phòng thử nghiệm)	–	–		3	–		–		
n (không bao gồm các ngoại lệ)	13	11	13	10	13	11	13		
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, g/100 g	0,70	0,10	2,14	0,08	0,40	0,60	0,24	nd	nd
s_r (% phần khối lượng)	0,01	< 0,01	0,03	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01		
$C_{V,r}$, tính bằng %	1,4	5,6	1,2	6,5	2,3	1,4	2,8		
r = [2,8 x s_r], g/100 g	0,03	0,02	0,07	0,02	0,03	0,02	0,02		
S_R (% phần khối lượng)	0,04	0,02	0,10	< 0,01	0,03	0,03	0,02		
$C_{V,R}$, tính bằng %	5,4	18,7	4,6	9,8	6,8	5,6	9,0		
R = [2,8 x S_R], g/100 g	0,11	0,05	0,27	0,02	0,08	0,09	0,06		
$HoRSD_R$ = 2 x trung bình$^{-0,15}$	4,2	5,6	3,6	5,8	4,6	4,3	4,9		
HoRat = $C_{V,R}$/$HoRSD_R$	1,27	3,31	1,29	1,70	1,47	1,30	1,82		
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được									

Bảng A.2 – Dữ liệu về độ chụm đối với glucose trong các mẫu sữa khác nhau

Thông số	Sữa chua uống có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn	Sữa UHT MUVA	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh MUVA	Phomat cream MUVA	Bột whey MUVA	Phomat đã qua chế biến MUVA	Sữa đặc có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh NIST
Năm tiến hành thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
n = Số phòng thử nghiệm tham gia	13	13	13	13	13	13			13
Số phòng thử nghiệm không phát hiện hoặc thiếu dữ liệu	1		–	–	–	1			–
Ngoại lệ Cochran (số phòng thử nghiệm)	–	–	–	–	–	–			–
Ngoại lệ Grubb (số phòng thử nghiệm)	–	–	–	–	–	–			–
n (không bao gồm các ngoại lệ)	12	13	13	13	13	12			13
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, g/100 g	0,45	1,17	2,23	1,08	0,38	0,48	nd	nd	2,00
s_r (% phần khối lượng)	0,01	0,02	0,02	0,03	< 0,01	0,02			0,03
$C_{V,r}$, tính bằng %	1,3	2,0	1,0	2,9	2,2	4,3			1,5
r = [2,8 x s_r], g/100 g	0,02	0,06	0,06	0,09	0,02	0,06			0,09
S_R (% phần khối lượng)	0,02	0,08	0,09	0,10	0,03	0,04			0.10
$C_{V,R}$, tính bằng %	5,3	7,4	4,0	9,7	8,1	8,5			5,0
R = [2,8 x S_R], g/100 g	0,07	0,24	0,25	0,29	0,09	0,12			0,28
$HoRSD_R$ = 2 x trung bình$^{-0,15}$	4,5	3,7	3,5	3,9	4,6	4,5			3,6
HoRat = $C_{V,R}/HoRSD_R$	1,18	1,90	1, 14	2,44	1,75	1,91			1,39

CHÚ DẪN
nd = không thể phát hiện được

Bảng A.3 – Dữ liệu về độ chụm đối với frutose trong các mẫu sữa khác nhau

Thông số	Sữa chua uống có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn	Sữa UHT MUVA	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh MUVA	Phomat cream MUVA	Bột whey MUVA	Phomat đã qua chế biến MUVA	Sữa đặc có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh NIST
Năm tiến hành thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
n = Số phòng thử nghiệm tham gia	13			13					
Số phòng thử nghiệm không phát hiện hoặc thiếu dữ liệu	1			–					
Ngoại lệ Cochran (số phòng thử nghiệm)	–			–					
Ngoại lệ Grubb (số phòng thử nghiệm)	–			2					
n (không bao gồm các ngoại lệ)	12			11					
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, g/100 g	2,16	nd	nd	5,53	nd	nd	nd	nd	nd
s_r (% phần khối lượng)	0,04			0,35					
$C_{V,r}$, tính bằng %	1,7			6,3					
r = [2,8 x s_r], g/100 g	0,10			0,98					
S_R (% phần khối lượng)	0,08			0,54					
$C_{V,R}$, tính bằng %	3,6			9,8					
R = [2,8 x S_R], g/100 g	0,22			1,5					
$HoRSD_R$ = 2 x trung bình$^{-0,15}$	3,6			3,1					
HoRat = $C_{V,R}/HoRSD_R$	1,02			3,2					
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được									

Bảng A.4 – Dữ liệu về độ chụm đối với sacarose trong các mẫu sữa khác nhau

Thông số	Sữa chua uống có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn	Sữa UHT MUVA	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh MUVA	Phomat cream MUVA	Bột whey MUVA	Phomat đã qua chế biến MUVA	Sữa đặc có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh NIST
Năm tiến hành thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
n = Số phòng thử nghiệm tham gia	12	13		13				13	13
Số phòng thử nghiệm không phát hiện hoặc thiếu dữ liệu	–			–				1	–
Ngoại lệ Cochran (số phòng thử nghiệm)		1		–				–	1.
Ngoại lệ Grubb (số phòng thử nghiệm)	1	1		1				–	3
n (không bao gồm các ngoại lệ)	11	11		12				12	9
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, g/100 g	2,29	7,80	nd	1,08	nd	nd	nd	45,1	27,6
s_r (% phần khối lượng)	0,04	0,26		0,04				0,6	0,3
$C_{V,r}$, tính bằng %	1,6	3,3		3,5				1,4	1,0
r = [2,8 x s_r], g/100 g	0,10	0,72		0,11				1,7	0,8
S_R (% phần khối lượng)	0,08	0,35		0,13				5,6	1,1
$C_{V,R}$, tính bằng %	3,6	4,5		11,8				12,4	3,9
R = [2,8 x S_R], g/100 g	0,23	0,98		0,36				15,6	3,0
$HoRSD_R$ = 2 x trung bình$^{-0,15}$	3,5	2,9		3,9				2,3	2,42
HoRat = $C_{V,R}/HoRSD_R$	1,0	1,5		3,0				5,5	1,6
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được									

Bảng A.5 – Dữ liệu về độ chụm đối với lactose trong các mẫu sữa khác nhau

Thông số	Sữa chua uống có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn	Sữa UHT MUVA	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh MUVA	Phomat cream MUVA	Bột whey MUVA	Phomat đã qua chế biến MUVA	Sữa đặc có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh NIST
Năm tiến hành thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
n = Số phòng thử nghiệm tham gia	13	13	12	13	13	13	13	13	13
Số phòng thử nghiệm không phát hiện hoặc thiếu dữ liệu	–	1	1	–	–	–	–	–	–
Ngoại lệ Cochran (số phòng thử nghiệm)	–	3	–	–	1	–	1	1	–
Ngoại lệ Grubb (số phòng thử nghiệm)	1	–		–	–	–	–	–	2
n (không bao gồm các ngoại lệ)	12	9	12	13	12	13	12	12	11
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, g/100 g	2,67	29,5	0,22	21,6	2,52	68,6	1,07	10,5	0,52
s_r (% phần khối lượng)	0,07	0,2	0,02	1,5	0,04	1,1	0,03	0,2	0,01
$C_{V,r}$, tính bằng %	2,6	0,5	11,1	7,0	1,7	1,6	2,7	2,3	2,4
r = [2,8 x s_r], g/100 g	0,19	0,4	0,07	4,2	0,12	3,2	0,08	0,7	0,03
S_R (% phần khối lượng)	0,16	2,9	0,05	2,3	0,17	7,3	0,13	0,9	0,06
$C_{V,R}$, tính bằng %	5,6	9,8	22,7	10,5	6,8	10,6	11,7	8,5	11,4
R = [2,8 x S_R], g/100 g	0,44	8,1	0,14	6,4	0,48	20,5	0,35	2,5	0,17
$HoRSD_R$ = 2 x trung bình$^{-0,15}$	3,4	2,4	5,0	2,5	3,5	2,1	4,0	2,8	4,4
HoRat = $C_{V,R}/HoRSD_R$	1,7	4,1	4,5	4,2	2,0	5,0	3,0	3,0	2,6
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được									

Bảng A.6 – Dữ liệu về độ chụm đối với maltose trong các mẫu sữa khác nhau

Thông số	Sữa chua uống có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có bán sẵn	Sữa UHT MUVA	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh MUVA	Phomat cream MUVA	Bột whey MUVA	Phomat đã qua chế biến MUVA	Sữa đặc có đường	Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh NIST
Năm tiến hành thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
n = Số phòng thử nghiệm tham gia		13		13					13
Số phòng thử nghiệm không phát hiện hoặc thiếu dữ liệu				–					–
Ngoại lệ Cochran (số phòng thử nghiệm)		1		2					–
Ngoại lệ Grubb (số phòng thử nghiệm)		–		–					–
n (không bao gồm các ngoại lệ)		12		11					13
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, g/100 g	nd	1,77	nd	1,28	nd	nd	nd	nd	2,43
s_r (% phần khối lượng)		0,04		0,03					0,08
$C_{V,r}$, tính bằng %		2,1		2,2					3,2
r = [2,8 x s_r], g/100 g		0,11		0,08					0,22
S_R (% phần khối lượng)		0,49		0,15					0,23
$C_{V,R}$, tính bằng %		27,6		11,7					9,4
R = [2,8 x S_R], g/100 g		1,40		0,42					0,64
$HoRSD_R$ = 2 x trung bình$^{-0,15}$		3,7		3,85					3,49
HoRat = $C_{V,R}/HoRSD_R$		7,5		3,0					2,7
CHÚ DẪN nd = không thể phát hiện được									

Phụ lục B

(tham khảo)

Dữ liệu về độ chính xác

Dữ liệu đưa ra trong Bảng B.1 đến B.6 thu được trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, được tổ chức bởi Rotating Disc b.v. và Trung tâm Eurofins Carbohydrate Competence, phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) về các quy trình nghiên cứu hợp tác để xác nhận hiệu năng của phương pháp phân tích.

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chính xác đối với đường trong sữa UHT lactose thấp, mẫu chuẩn MUVA-ML-2310 [6]

	Hàm lượng đường ± S_R tính bằng % phần khối lượng					
	galactose	**glucose**	**fructose**	**sacarose**	**lactose[a]**	**maltose**
MUVA	2,20 ± 0,06	2125 ± 0,05	nr	nr	0,364 ± 0,032 [b] 0,293 ± 0,15 [c] 0,212 ± 0,026 [d]	nr
MLT	2,14 ± 0,10	2,23 ± 0,09	nd[e]	nd	0,22 ± 0,05	nd

CHÚ DẪN:

nr: không có báo cáo

nd: không thể phát hiện được

[a] Trong giấy chứng nhận chất lượng gốc của MUVA, lactose được định lượng dưới dạng lactose monohydrat.

[b] Phân tích enzym phần galactose.

[c] Phân tích enzym phần glucose.

[d] Phân tích enzym.

Bảng B.2 – Dữ liệu về độ chính xác của các loại đường trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh, mẫu chuẩn MUVA-KI-1106 [7]

	Hàm lượng đường ± S_R tính bằng % phần khối lượng					
	galactose	**glucose**	**fructose**	**sacarose**	**lactose[a]**	**maltose**
MUVA	nr	1,15 ± 0,13	5,57 ± 0,31	1,15 ± 0,19	21,0 ± 1,3 [b]	nr
MLT	0,08 ± < 0,01	1,08 ± 0,10	5,53 ± 0,54	1,08 ± 0,13	21,62 ± 2,3	1,28 ± 0,15

CHÚ DẪN:

nr: không có báo cáo

[a] Trong giấy chứng nhận chất lượng gốc của MOVA, lactose được định lượng là 22,1 % ± 1,4 % lactose monohydrat.

[b] Phân tích enzym phần galactose.

Bảng B.3 – Dữ liệu về độ chính xác của các loại đường trong phomat cream, mẫu chuẩn MUVA-FK-1221 [8]

	Hàm lượng đường ± S_R tính bằng % phần khối lượng					
	galactose	glucose	fructose	sacarose	lactose[a]	maltose
MUVA	nr	nr	nr	nr	2,60 ± 0,10 [b]	nr
MLT	0,40 ± 0,03	0,38 ± 0,03	nd[d]	nd	2,52 ± 0,17	nd

CHÚ DẪN:

nr: không có báo cáo

nd: không thể phát hiện được

[a] Trong giấy chứng nhận chất lượng gốc của MUVA, lactose được định lượng là 2,74 % ± 0,10 % lactose monohydrat.

[b] Phân tích enzym.

Bảng B.4 – Dữ liệu về độ chính xác của các loại đường trong bột whey, mẫu chuẩn MUVA-MO-0614 [9]

	Hàm lượng đường ± S_R tính bằng % phần khối lượng					
	galactose	glucose	fructose	sacarose	lactose[a]	maltose
MUVA	nr	nr	nr	nr	67,2 ± 1,48 [1])	nr
MLT	0,60 ± 0,03	0,48 ± 0,04	nd	nd	68,6 ± 7,3	nd

CHÚ DẪN:

nr: không có báo cáo

nd: không thể phát hiện được

[a] Trong giấy chứng nhận chất lượng gốc của MUVA, lactose được định lượng là 70,76 % ± 1,56 % lactose monohydrat.

[b] Phân tích enzym.

Bảng B.5 – Dữ liệu độ chính xác của các loại đường trong phomát đã chế biến, mẫu chuẩn MUVA-SK-1503 [10]

	Hàm lượng đường ± S_R tính bằng % khối lượng					
	galactose	glucose	fructose	sacarose	lactose[a]	maltose
MUVA	nr	nr	nr	nr	1,23 ± 0,14 [b]	nr
MLT	0,24 ± 0,02	nd	nd	nd	1,07 ± 0,13	nd

CHÚ DẪN:

nr: không có báo cáo

nd: không thể phát hiện được

[a] Trong giấy chứng nhận chất lượng gốc của MIWA, lactose được định lượng là 1,29 % ± 0,15 % lactose monohydrat.

[b] Phân tích enzym.

Bảng B.6 – Dữ liệu về độ chính xác của các loại đường trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh, mẫu chuẩn được chứng nhận NIST [11]

	Hàm lượng đường ± S_R tính bằng % phần khối lượng					
	galactose	**glucose**	**fructose**	**sacarose**	**lactose**	**maltose**
MST	nr	2,00 ± 0,45	nr	27,88 ±	0,52 ± 0,12	2,64 ± 0,62
MLT	nd	2,00 ± 0,10	nd	27,6 ±	0,52 ± 0,23	2,43 ± 0,23
CHÚ DẪN: nr: không có báo cáo nd: không thể phát hiện được						

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] TCVN 5536 (ISO 2911), *Sữa đặc có đường – Xác định hàm lượng sucroza – Phương pháp đo phân cực*

[2] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*

[3] TCVN 7033 (ISO 11292), *Cà phê hoà tan – Xác định hàm lượng cacbonhydrat tự do và tổng số – Phương pháp sắc kí trao đổi ion hiệu năng cao*

[4] CEN/TS 15754, Animal feeding stuffs – Determination of sugar content – High performance anion exchange Chromatographic method (HPAEC-PAD)

[5] SANDERS P., ERNSTE-NOTA V., VISSER 1<., VAN SOEST J., BRUNT K. The Determination of Sugars in Dairy Products: Development of a new Standard Method for the International Dairy Federation and the Internal [sic] Organization for Standardization.] AOAC Int. 2017J 100(5), pp. 1577-1581

[6] MUVA-ML-2310, UHT milk (low lactose), data sheet and certificate of quality (version (1) 19.06.2018)

[7] MUVA-KI-1106, Infant formula, data sheet and certificate of quality (version (1) 19.06.2018)

[8] MUVA-FK-1221, Cream cheese (18 % f.i.d.m.), data sheet and certificate of quality (version (2) 31.10.2018)

[9] MUVA-MO-0614, Whey powder, data sheet and certificate of quality (version (1) 19.06.2017)

[10] MUVA-SK-1503, Processed cheese (45 % fat in dry matter), data sheet and certificate of quality (version (1) 24.05.2017)

[11] NIST. Certificate of analysis of standard reference material 1869, infant/adult nutritional formula II. National Institute of Standards and Technology. Certificate issue date: 16 August 2018

[12] Brunt et al. J. AOAC 2020, https://academic.oup.com/jaoac/article-abstract/doi/10.1093/jaocint/qsaa092/5874436?redirectedFrom=fulltext#supplementary-data