

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13845:2023

Xuất bản lần 1

**MẬT ONG – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ĐƯỜNG –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

*Honey – Determination of the content of sugars –
High-performance liquid chromatographic (HPLC) method*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13845:2023 được xây dựng trên cơ sở tham khảo DIN 10758:1997 và Đính chính kỹ thuật 2018, *Untersuchung von Honig – Bestimmung des Gehaltes an den Sacchariden Fructose, Glucose, Saccharose, Turanose und Maltose – HPLC-Verfahren*;

TCVN 13845:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F18 Đường, mật ong và sản phẩm tinh bột 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.

Mật ong – Xác định hàm lượng đường – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

*Honey – Determination of the content of sugars –
High-performance liquid chromatographic (HPLC) method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng các loại đường fructose, glucose, saccharose, turanose và maltose trong mật ong bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để xác định hàm lượng các loại đường khác.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

2.1

Hàm lượng các loại đường fructose, glucose, saccharose, turanose và maltose (content of the saccharides fructose, glucose, saccharose, turanose and maltose)

Hàm lượng các loại đường được xác định bằng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng các loại đường nêu trên được biểu thị bằng phần khối lượng và được tính bằng gam trên 100 g mẫu thử.

3 Nguyên tắc

Đồng hóa và tạo huyền phù mẫu thử trong nước. Thu lấy dung dịch mẫu thử và lọc qua màng lọc. Sau đó xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector chỉ số khúc xạ (RI). Định tính các loại đường theo thời gian lưu và định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn sử dụng diện tích pic hoặc chiều cao pic.

4 Thuốc thử

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

4.1 Metanol, loại dùng cho HPLC.

4.2 Axetonitril, loại dùng cho HPLC.

CẢNH BÁO – Axetonitril là chất độc. Cần tuân thủ các hướng dẫn an toàn của phòng thử nghiệm đối với axetonitril.

4.3 Dung dịch rửa giải, loại dùng cho HPLC

Trộn 80 phần thể tích axetonitril (4.2) và 20 phần thể tích nước dùng cho HPLC.

Dung dịch rửa giải phải được khử khí trước khi sử dụng.

4.4 Chất chuẩn

- fructose
- glucose
- sacarose
- turanose
- maltose

Có thể sử dụng các chất chuẩn khác nếu thích hợp.

4.5 Dung dịch chuẩn

Dùng pipet (5.6) lấy 25 ml metanol cho vào bình định mức 100 ml (5.5).

Tùy thuộc vào loại đường cần xác định, dùng cân (5.1) cân lần lượt 2,000 0 g fructose, 1,500 0 g glucose, 0,250 0 g sacarose, 0,150 0 g turanose và 0,150 0 g maltose, chính xác đến 0,1 mg, rồi hòa tan trong khoảng 40 ml nước sau đó chuyển định lượng vào bình định mức 100 ml nêu trên. Thêm nước đến vạch.

Sử dụng xyranh (5.8) và bộ lọc màng (5.9) phân phối các dung dịch này vào các lọ đựng mẫu (5.3).

Khi được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4 °C, dung dịch chuẩn có thể bền trong 4 tuần và khi được bảo quản ở -18 °C, dung dịch chuẩn có thể bền trong 6 tháng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

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

5.2 Rây, bằng thép không gỉ, cỡ lỗ 0,5 mm.

5.3 Lọ đựng mẫu.

5.4 Cốc có mỏ, dung tích 100 ml.

5.5 Bình định mức, dung tích danh nghĩa 100 ml.

5.6 Pipet, dung tích danh nghĩa 25 ml.

5.7 Bộ lọc màng, có màng lọc cỡ lỗ 0,45 μm .

5.8 Xyranh.

5.9 Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao, gồm bơm, bộ bơm mẫu, detector RI có thể kiểm soát nhiệt độ ở 30 °C, hệ thống phân tích, lò cột có thể kiểm soát nhiệt độ ở 30 °C.

5.10 Cột phân tích, bằng thép không gỉ, đường kính 4,6 mm, dài 250 mm, được nhồi silica gel biến tính amin cỡ hạt từ 5 μm đến 7 μm .

5.11 Bể siêu âm.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 5261 [1].

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Sử dụng mẫu phòng thử nghiệm có khối lượng ít nhất 200 g.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

7.1.1 Mật ong không có tạp chất

Đông hóa phần mẫu thử bằng cách khuấy mạnh (ít nhất 3 min). Cần đảm bảo mẫu càng lẫn ít không khí càng tốt, đặc biệt nếu mẫu được dùng tiếp để xác định hydroxymethylfurfural (HMF).

TCVN 13845:2023

7.1.2 Mật ong có tạp chất

Sau khi loại bỏ các tạp chất thô, khuấy phần mẫu thử ở nhiệt độ phòng cho đến khi đồng nhất rồi lọc qua rây (5.2). Dùng thìa khuấy phần mẫu thử đã lọc.

7.1.3 Mật ong bánh tổ

Mở nắp vít nếu các lỗ trên bánh tổ vẫn đóng. Dùng rây (5.2), tách toàn bộ mật ong ra khỏi bánh tổ mà không cần làm nóng.

7.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Dùng cân (5.1), cân 5 g phần mẫu thử đã chuẩn bị (xem 7.1) cho vào cốc có mỏ (5.4) có chứa khoảng 40 ml nước. Hòa tan phần mẫu thử trong nước mà không cần làm nóng, khử khí bằng bể siêu âm (5.11). Chuyển định lượng các dung dịch vào bình định mức 100 ml (5.5) có chứa 25 ml metanol (4.1). Thêm nước đến vạch. Lọc dung dịch qua màng lọc (5.7) và thu dịch lọc vào các lọ đựng mẫu (5.3).

Bảo quản dung dịch mẫu thử như dung dịch chuẩn (4.5).

7.3 Phân tích bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Vận hành máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (5.9).

Khi sử dụng cột (5.10) và dung dịch rửa giải (4.3), cần cài đặt các thông số thích hợp, ví dụ như sau:

- Tốc độ dòng: 1,3 ml/min
- Pha động: hỗn hợp axetonitril/nước 80:20 (phần thể tích)
- Nhiệt độ cột: $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$
- Thể tích bơm: 20 μl

Cần bơm các thể tích dung dịch mẫu thử (7.2) và dung dịch chuẩn (4.5) bằng nhau.

Phổ HPLC của dung dịch chuẩn được nêu trong Phụ lục A là ví dụ về kết quả thu được sử dụng các điều kiện nêu trên.

CHÚ THÍCH 1: Nếu không có sẵn cột, thì phải thực hiện hiệu chuẩn bằng chất chuẩn ngoại khi tiến hành ở nhiệt độ phòng.

CHÚ THÍCH 2: Nếu không thể thực hiện phân tích ở nhiệt độ $30 ^\circ\text{C}$ và nếu detector không thể kiểm soát được nhiệt độ $30 ^\circ\text{C}$, thì thực hiện phân tích ở nhiệt độ phòng.

7.4 Phát hiện định tính và xác định định lượng

7.4.1 Phát hiện định tính

Tiến hành phát hiện định tính các loại đường bằng cách so sánh thời gian lưu tuyệt đối trong mẫu với thời gian lưu của chất chuẩn.

7.4.2 Xác định định lượng

Tiến hành xác định định lượng các loại đường bằng phương pháp ngoại chuẩn tích phân diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic, dựa trên giá trị tương ứng của chất chuẩn.

8 Tính và biểu thị kết quả

Hàm lượng từng loại đường fructose, glucose, saccharose, turanose và maltose trong mẫu thử, w , được tính bằng g trên 100 g mẫu thử, theo Công thức (1):

$$w = \frac{A_1 \cdot V_1 \cdot m_1 \cdot 100}{A_2 \cdot V_2 \cdot m_0} \quad (1)$$

Trong đó:

A_1 là diện tích pic hoặc chiều cao pic của loại đường tương ứng trong dung dịch mẫu thử;

A_2 là diện tích pic hoặc chiều cao pic của loại đường tương ứng trong dung dịch chuẩn;

V_1 là tổng thể tích của dung dịch mẫu thử, tính bằng mililit (ml);

V_2 là tổng thể tích của dung dịch chuẩn, tính bằng mililit (ml);

m_1 là khối lượng đường có trong thể tích V_2 , tính bằng gam (g);

m_0 khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g).

Kết quả được làm tròn đến một chữ số thập phân.

9 Độ chụm

Chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục B. 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 B.

9.1 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 .

9.2 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 .

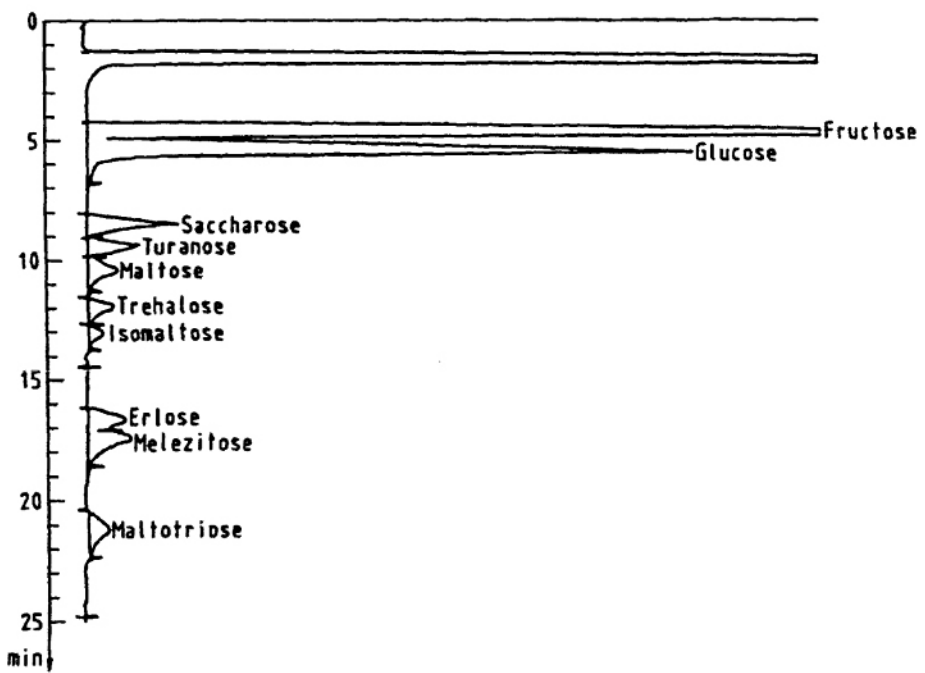
10 Báo cáo thử nghiệm

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

- mọi thông tin cần thiết để 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.

Phụ lục A
(Tham khảo)
Ví dụ về sắc ký đồ

Ví dụ về phổ HPLC của dung dịch chuẩn đường thu được trong các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này được nêu trong Hình A.1.



Hình A.1 – Phổ HPLC của dung dịch chuẩn đường

Phụ lục B

(Tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Các kết quả và dữ liệu của độ chụm về xác định hàm lượng các loại đường trong mật ong thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725:1986^{*)} được nêu trong các bảng dưới đây:

Bảng B.1 – Đường fructose

Mẫu	\bar{x}	r	s_r	R	S_R
	Tất cả các giá trị được tính bằng g trên 100 g mật ong				
Mật ong rừng	31,20	0,82	± 0,29	1,60	± 0,57
Mật ong keo	42,39	0,88	± 0,31	2,34	± 0,83
Mật ong hoa oải hương	37,88	1,03	± 0,36	1,57	± 0,56

Bảng B.2 – Đường glucose

Mẫu	\bar{x}	r	s_r	R	S_R
	Tất cả các giá trị được tính bằng g trên 100 g mật ong				
Mật ong rừng	23,04	0,88	± 0,31	2,09	± 0,74
Mật ong keo	28,54	0,80	± 0,28	1,78	± 0,63
Mật ong hoa oải hương	32,03	1,07	± 0,38	1,42	± 0,50

Bảng B.3 – Đường sacarose

Mẫu	\bar{x}	r	s_r	R	S_R
	Tất cả các giá trị được tính bằng g trên 100 g mật ong				
Mật ong rừng	-	-	-	-	-
Mật ong keo	-	-	-	-	-
Mật ong hoa oải hương	2,83	0,43	± 0,15	0,93	± 0,33

^{*)} ISO 5725:1986 hiện nay đã hủy và thay bằng bộ tiêu chuẩn ISO 5725 được chấp nhận thành bộ tiêu chuẩn TCVN 6910 (gồm 6 phần), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo*

Bảng B.4 – Đường turanose

Mẫu	\bar{x}	r	s_r	R	S_R
	Tất cả các giá trị được tính bằng g trên 100 g mật ong				
Mật ong rừng	2,12	0,42	± 0,15	0,84	± 0,30
Mật ong keo	1,66	0,27	± 0,10	0,51	± 0,18
Mật ong hoa oải hương	1,26	0,28	± 0,10	0,84	± 0,30

Bảng B.5 – Đường maltose

Mẫu	\bar{x}	r	s_r	R	S_R
	Tất cả các giá trị được tính bằng g trên 100 g mật ong				
Mật ong rừng	4,77	0,55	± 0,19	2,54	± 0,90
Mật ong keo	2,02	0,62	± 0,22	1,31	± 0,46
Mật ong hoa oải hương	2,34	0,50	± 0,18	0,74	± 0,26

Trong đó:

\bar{x} là giá trị trung bình;

r là giới hạn lặp lại;

R là giới hạn tái lập;

s_r là độ lệch chuẩn lặp lại;

s_R là độ lệch chuẩn tái lập.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 5261, *Sản phẩm ong – Phương pháp lấy mẫu*
 - [2] ISO 5725:1986, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests*
 - [3] International Honey Commission (2009), *Harmonised methods of the International Honey Commission*
-