

**TCVN 8903:2011**

**EN 1139:1994**

Xuất bản lần 1

**NƯỚC RAU QUẢ – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG  
AXIT D-ISOXITRIC BẰNG ENZYM –  
PHƯƠNG PHÁP ĐO PHỔ NADPH**

*Fruit and vegetable juices – Enzymatic determination of D-isocitric  
acid content – NADPH spectrometric method*

**HÀ NỘI – 2011**



## Lời nói đầu

TCVN 8903:2011 hoàn toàn tương đương với EN 1139:1994;

TCVN 8903:2011 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 axit D-isoxitric bằng enzym – Phương pháp đo phổ NADPH

*Fruit and vegetable juices – Enzymatic determination of D-isocitric acid content – NADPH spectrometric method*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp enzym để xác định hàm lượng axit D-isoxitric tổng số trong nước rau quả và các sản phẩm có liên quan, ở dạng axit tự do hoặc dạng muối của chúng, bao gồm cả các este và lacton.

## 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 của phương pháp thử bằng thử nghiệm liên phòng)*

## 3 Kí hiệu và chữ viết tắt

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các kí hiệu và chữ viết tắt sau:

ICDH Isoxitrat dehydrogenaza (EC<sup>1</sup>) 1.1.1.42);

\* ISO 5725:1986 hiện nay đã hủy, được thay bằng ISO 5725 (gồm có 6 phần) và đã được biên soạn thành bộ TCVN 6910 (gồm có 6 phần).

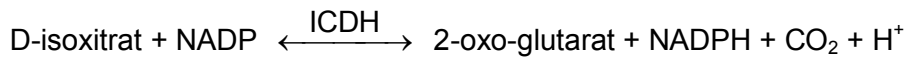
<sup>1</sup>) Ủy ban về enzym (EC): Classification System Enzyme Handbook (Sổ tay về Hệ thống phân loại enzym), Springer, Berlin 1969.

## TCVN 8903:2011

NADP	$\beta$ -Nicotinamit-adenin-dinucleotit-phosphat;
NADPH	$\beta$ -Nicotinamit-adenin-dinucleotit-phosphat, dạng khử;
IU	1 đơn vị quốc tế (IU) hoạt độ enzym xúc tác chuyển đổi được 1 $\mu$ mol cơ chất mỗi phút ở 25 °C trong điều kiện chuẩn;
<i>c</i>	nồng độ chất;
$\rho$	nồng độ khối lượng;
$\omega$	phần khối lượng.
<i>g</i>	gia tốc trọng trường trên bề mặt trái đất.

### 4 Nguyên tắc

Axit D-isoxitric được tách ra từ mẫu thử dưới dạng muối bari và được xác định bằng phương pháp enzym. Trong phương pháp này, D-isoxitrat oxi hóa decacboxyl thành 2-oxo-glutarat bằng NADP khi có mặt của enzym ICDH:



Lượng NADPH tạo thành (đo được qua việc tăng độ hấp thụ) tương đương với lượng D-isoxitrat có mặt.

### 5 Thuốc thử

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

**5.1 Than hoạt tính, Clarocarbon G<sup>® 2)</sup>.**

**5.2 Axit clohydric,  $c(\text{HCl}) =$  khoảng 4 mol/l.**

**5.3 Dung dịch natri hydroxit,  $c(\text{NaOH}) =$  khoảng 4 mol/l.**

**5.4 Dung dịch amoniac,  $\omega(\text{NH}_3) =$  25 g/100 g.**

**5.5 Axeton.**

**5.6 Dung dịch bari clorua,  $\rho(\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) =$  300 g/l**

---

<sup>2)</sup> Clarocarbon G<sup>®</sup> là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp bởi Merck, Đức. Thông tin này tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này và Tổ chức Tiêu chuẩn hoá châu Âu (CEN) không bắt buộc sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Hòa tan 30 g bari clorua ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) trong nước và pha loãng đến 100 ml.

#### 5.7 Dung dịch natri sulfat, $\rho$ ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) = 71 g/l

Hòa tan 71 g natri sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) trong nước và pha loãng đến 1 lít.

#### 5.8 Dung dịch mangan sulfat, $c$ ( $\text{MnSO}_4$ ) = 0,075 mol/l

Hòa tan 125 mg mangan sulfat ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) trong 10 ml nước. Dung dịch đã pha bền được ít nhất 6 tháng ở nhiệt độ phòng.

#### 5.9 Dung dịch đệm Tris, pH = 7,0

Hòa tan 2,42 g Tris (hydroxymetyl)-aminometan và 35 mg muối dinatri của axit etylendiamin tetra-axetic (ngậm hai phân tử nước) trong 80 ml nước, axit hoá đến pH 7,0 bằng axit clohydric (5.2) và pha loãng bằng nước đến 100 ml. Dung dịch đệm này bền được ít nhất 1 năm ở 4 °C.

#### 5.10 Dung dịch đệm Tris, pH = 7,4

Hòa tan 2,42 g Tris (hydroxymetyl)-aminometan và 35 mg muối dinatri của axit etylendiamin tetra-axetic (ngậm hai phân tử nước) trong 80 ml nước, axit hoá đến pH 7,4 bằng axit clohydric (5.2) và pha loãng bằng nước đến 100 ml. Dung dịch đệm này bền được ít nhất 1 năm ở 4 °C.

#### 5.11 Dung dịch NADP

Hòa tan 50 mg muối dinatri của  $\beta$ -nicotinamid adenin dinucleotit phosphat ( $\text{NADP-Na}_2$ ) trong 5 ml nước. Dung dịch đã pha bền được ít nhất bốn tuần ở 4 °C.

#### 5.12 Dung dịch enzym ICDH

Hòa tan isoxitrat-dehydrogenaza từ tim lợn,  $\rho$  (ICDH) = 10 mg/ml (khoảng 20 IU/ml) trong dung dịch glyxerol,  $\omega$ (glyxerol) = 50 g/100 g. Dung dịch đã pha bền được khoảng 6 tháng ở 4 °C.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

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

**6.1 Pipet dùng để thử nghiệm enzym**, có chia vạch dọc thân pipet và đầu tip phân phối dài, không chia vạch.

**6.2 Pipet**, có độ chính xác tương đương với 6.1, ví dụ có thể thay đổi dung tích của pipet.

**6.3 Cuvet**, làm bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa, có chiều dài đường quang 10 mm và có độ hấp thụ không đáng kể ở các bước sóng 334 nm, 340 nm và 365 nm.

**6.4 Máy đo quang vạch đơn**, có đèn thủy ngân và màng lọc đo được ở các bước sóng 334 nm hoặc 365 nm.

**6.5 Máy đo phổ**, (có thể thay đổi bước sóng), đo được ở các bước sóng 340 nm (thay thế cho 6.4).

**6.6 Giấy lọc gấp nếp**, cỡ lỗ 10  $\mu\text{m}$ .

**6.7 Máy li tâm**, có thể tạo gia tốc li tâm 3000g trên các ống li tâm (6.8) (g có giá trị cố định, trong phạm vi tiêu chuẩn này, bằng  $9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ ).

**6.8 Ống li tâm**, dung tích 100 ml.

## **7 Cách tiến hành**

### **7.1 Chuẩn bị mẫu thử**

Đối với các sản phẩm thông thường, không xử lý trước và việc phân tích theo phương pháp này phải thực hiện dựa vào đơn vị thể tích, kết quả được biểu thị theo lít mẫu thử. Việc phân tích các sản phẩm cô đặc có thể cũng được thực hiện dựa theo thể tích sau khi pha loãng đến tỉ trọng tương đối đã biết. Dựa trên lượng mẫu đã cân và đưa hệ số pha loãng khi phân tích vào phép tính, kết quả có thể được biểu thị theo kilogam sản phẩm. Đối với các sản phẩm có độ nhớt cao và/hoặc có hàm lượng tế bào rất cao (ví dụ thịt quả), việc xác định dựa trên lượng mẫu thử đã cân theo quy trình thông thường.

### **7.2 Tiến hành thử**

#### **7.2.1 Tách D-isoxitric từ mẫu thử**

Xử lý 10 ml mẫu thử bằng 5 ml dung dịch natri hydroxit (5.3) trong ống li tâm 100 ml (6.8) và để yên trong 10 min ở nhiệt độ phòng (khoảng 20 °C đến 25 °C).

Sau khi thêm 5 ml axit clohydric (5.2), pha loãng dung dịch đến 25 ml bằng nước. Sau đó thêm liên tiếp 2 ml dung dịch amoniac (5.4), 3 ml dung dịch bari clorua (5.6) và 20 ml axeton (5.5). Trộn kĩ bằng que thủy tinh. Để yên trong 10 min rồi li tâm bằng máy li tâm (6.7) trong khoảng 5 min.

Cẩn thận gạn bỏ dung dịch nổi phía trên và thêm 20 ml dung dịch natri sulfat (5.7) vào phần cặn trong ống li tâm và khuấy bằng que thủy tinh. Hòa tan phần cặn bị vón cục bằng cách gia nhiệt trong 10 min trong nồi cách thủy có thể đun sôi và khuấy nhanh, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng rồi chuyển từng định lượng vào bình chia vạch có dung tích 50 ml đã chứa sẵn dung dịch đệm tris (5.9) và thêm nước đến vạch.



Chuyển lượng chứa trong bình chia vạch vào bình nón có chứa 1 g than hoạt tính (5.1), để yên trong 5 min rồi lọc qua giấy lọc gấp nếp (6.6). Dịch lọc trong, không màu được sử dụng để xác định isoxitrat bằng phương pháp enzym (7.2.2).

## 7.2.2 Xác định D-isoxitrat bằng phương pháp enzym

### 7.2.2.1 Yêu cầu chung

Phép xác định phải thực hiện trong điều kiện nhiệt độ không đổi, trong khoảng từ 20 °C đến 25 °C. Có thể sử dụng nhiệt độ không đổi trong khoảng từ 25 °C đến 37 °C, miễn là thu được các kết quả tương đương.

NADH có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng 340 nm. Khi sử dụng máy đo phổ thay đổi được bước sóng, chỉ đo tại bước sóng hấp thụ cực đại. Khi sử dụng máy đo quang vạch đơn dùng đèn hơi thủy ngân, đo tại bước sóng 334 nm hoặc 365 nm.

Không sử dụng pipet một vạch để hút dung dịch. Các dung dịch enzym, coenzym và đệm có thể được lấy bằng pipet tự động thích hợp. Pipet dùng để thử nghiệm enzym (6.1) hoặc dụng cụ tương đương (6.2) phải được sử dụng để lấy dung dịch mẫu thử.

Phép xác định có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kit thử nghiệm phức hợp có bán sẵn trên thị trường.

Nếu chất cần xác định sẵn có ở dạng tinh khiết thích hợp, nên sử dụng làm dung dịch chuẩn.

### 7.2.2.2 Dung dịch mẫu trắng

Dùng pipet lấy 3,0 ml dung dịch đệm (5.10), 0,1 ml dung dịch mangan sulfat (5.8) và 0,1 ml dung dịch NADP (5.11) cho vào cuvet (6.3). Trộn và đọc độ hấp thụ  $(A_1)_{\text{Mẫu trắng}}$  của dung dịch so với không khí (không có cuvet trên đường quang) sau khoảng 3 min.

### 7.2.2.3 Dung dịch mẫu thử

Dùng pipet lấy 2,0 ml dung dịch đệm (5.10), 0,1 ml dung dịch mangan sulfat (5.8), 0,1 ml dung dịch NADP (5.11) và 1,00 ml mẫu thử (từ 7.2.2) cho vào cuvet (6.3). Trộn và đọc độ hấp thụ  $(A_1)_{\text{Mẫu}}$  của dung dịch so với không khí (không có cuvet trên đường quang) sau khoảng 3 min.

### 7.2.2.4 Phản ứng enzym và định lượng

Thực hiện phản ứng bằng cách thêm 0,01 ml dung dịch enzym ICDH (5.12) vào từng dung dịch 7.2.2.2 và 7.2.2.3. Trộn, đợi cho phản ứng kết thúc (khoảng 5 min đến 10 min) và đọc độ hấp thụ  $(A_2)$  của các dung dịch dựa vào không khí. Nếu phản ứng chưa kết thúc sau 10 min, tiếp tục đọc độ hấp thụ sau mỗi

5 min cho đến khi độ hấp thụ tăng theo tỉ lệ không đổi và dùng phép ngoại suy  $A_2$  tại thời điểm dung dịch enzym (ICDH) được thêm vào.

## 8 Tính kết quả

Tùy theo phản ứng, tính hàm lượng NADPH sử dụng (và theo đó là chênh lệch độ hấp thụ,  $\Delta A$ ) tỉ lệ tuyến tính với nồng độ axit D-isoxitric:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{Mẫu}} - (A_2 - A_1)_{\text{Mẫu trắng}}$$

Tính nồng độ của một chất trong dung dịch pha loãng bằng cách đo độ hấp thụ dựa trên định luật Beer-Lambert.

Hàm lượng axit D-isoxitric trong mẫu thử,  $\rho$ , tính bằng miligam trên lít (mg/l), được tính theo công thức sau:

$$\rho = \frac{M \times V_1 \times F}{\varepsilon \times \delta \times V_2 \times 1000} \times \Delta A$$

trong đó:

$M$  là khối lượng phân tử của axit D-isoxitric,  $M = 192,1$  g/mol;

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

$V_2$  là thể tích của dung dịch mẫu thử sử dụng để chuẩn bị dung dịch thử, tính bằng mililit (ml);

$F$  là hệ số pha loãng dung dịch mẫu thử (7.2.1);

$\delta$  là chiều dài đường quang của cuvet, tính bằng centimet (cm);

$\varepsilon$  là hệ số hấp thụ của NADH;

tại bước sóng 340 nm,  $\varepsilon = 6,3$  [ $l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ];

tại bước sóng 365 nm,  $\varepsilon = 3,5$  [ $l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ];

tại bước sóng 334 nm,  $\varepsilon = 6,18$  [ $l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ].

Nếu không thay đổi thể tích trong 7.2 thì tính nồng độ như sau:

$$\rho = 3083 \times \frac{\Delta A}{\varepsilon}$$

Khi sử dụng bộ kit thử phức hợp có bán sẵn trên thị trường, thì hệ số 3083 trong công thức nêu trên sẽ thay đổi phụ thuộc vào tổng thể tích thử nghiệm ( $V_1$ ).

Trong phần tính kết quả, cần tính đến hệ số pha loãng và mối tương quan giữa giá trị với thể tích hoặc khối lượng. Nếu sản phẩm cô đặc đã được pha loãng đến độ đồng nhất thì ghi lại tỉ trọng tương đối của mẫu đã đồng nhất.

Tính hàm lượng axit D-isoxitric theo miligam trên lít đến miligam.

## 9 Độ chụm

Chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được đưa ra trong Phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và chất nền khác với dải nồng độ và chất nền nêu trong Phụ lục A.

### 9.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị độ lặp lại  $r$ .

Giá trị độ lặp lại:

$$r = 2,5 \text{ mg/l}$$

### 9.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống thử hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giá trị độ tái lập  $R$ .

Giá trị độ tái lập:

$$R = 4,4 \text{ mg/l}$$

## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử (loại mẫu, nguồn gốc của mẫu, tên gọi);
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- ngày nhận mẫu;

## **TCVN 8903:2011**

- ngày thử nghiệm;
- kết quả thử và đơn vị biểu thị kết quả;
- độ lặp lại, nếu được kiểm tra;
- bất kỳ điểm ngoại lệ nào quan sát được trong khi thực hiện phép thử;
- mọi thao tác không qui định trong phương pháp hoặc tùy chọn mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

## Kết quả thống kê phép thử liên phòng thử nghiệm

Theo ISO 5725:1986, các thông số sau đây đã được xác định trong một phép thử liên phòng thử nghiệm (Thư mục tài liệu tham khảo). Phép thử được tiến hành bởi Viện Max von Pettenkofer (Max von Pettenkofer Institute) thuộc Cơ quan Y tế liên bang (Federal Health Office), Food Chemistry Department, Berlin, BRD.

Năm tiến hành thử nghiệm: 1982

Số lượng phòng thử nghiệm tham gia: 28 và 12

Số lượng mẫu thử: 3

Bảng A.1

Mẫu	A	B	C
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	22	21	10
Số lượng ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	6	7	2
Số lượng kết quả được chấp nhận	118	108	50
Giá trị trung bình ( $\bar{x}$ ) (mg/l)	57	82	90
Độ lệch chuẩn lặp lại ( $s_r$ ) (mg/l)	0,8657	0,9561	0,8224
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại ( $RSD_r$ ) (%)	1,52	1,16	0,86
Giới hạn lặp lại ( $r$ ) (mg/l)	2,4	2,7	2,3
Độ lệch chuẩn tái lập ( $s_R$ ) (mg/l)	1,5718	1,4406	1,7981
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập ( $RSD_R$ ) (%)	2,76	1,76	1,87
Giới hạn tái lập ( $R$ ) (mg/l)	4,4	4,0	5,0

Tên mẫu:

A – nectar nho Hy Lạp đen I,

B – nước cam,

C – nectar nho Hy Lạp đen II.

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Determination of D-isocitric acid, enzymatic method: No 54, 1984.  
- In: Analyses [Collection]/International Federation of Fruit Juice Producers.  
- Loose-leaf edition, as of 1989.- Zug: Swiss Fruit Union.
- [2] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von D-Isocitronensäure in Fruchtsäften: L31.00-9, 1984-11 [Food Analysis: Determination of D-isocitric acid in fruit juices: L31.00-9, 1984-11] – *in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Labakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/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, Köln: Beuth Verlag GmbH.
- [3] S.Wallrauch und G.Greiner Flüssiges Obst, 1977, vol. 44, p. 241-245. Bestimmung der D-Isocitronensäure in Fruchtsäften und alkoholfreien Erfrischungsgetränken. [Determination of D-isocitric acid in fruit juices and nonalcoholic soft drinks].
-