

TCVN 10642:2014

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG GLYCOALKALOID
(α -SOLANIN VÀ α -CHACONIN) TRONG CỦ KHOAI TÂY –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG**

*Foodstuffs – Determination of glycoalkaloids (α -solanine and α -chaconine)
in potato tubers – Liquid chromatographic method*

HÀ NỘI - 2014

Lời nói đầu

TCVN 10642:2014 được xây dựng dựa trên cơ sở AOAC 997.13 *Glycoalkaloids (α -solanine and α -chaconine) in potato tubers. Liquid chromatographic method*;

TCVN 10642:2014 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm - Xác định hàm lượng glycoalkaloid (α -solanin và α -chaconin trong củ khoai tây - Phương pháp sắc ký lỏng

Foodstuffs – Determination of glycoalkaloids (α -solanine and α -chaconine) in potato tubers – Liquid chromatographic method

CẢNH BÁO: α -solanin và α -chaconin là các chất độc, cần chú ý đến an toàn khi xử lý các hóa chất đặc biệt nguy hại này. Không được hít hoặc nuốt vào. Tránh tiếp xúc với da. Cần xử lý nitơ lỏng một cách cẩn thận. Ở nhiệt độ rất thấp (-196°C) có thể làm tổn thương da, tổn thương do đông lạnh hoặc bỏng. Mang găng tay và kính bảo hộ cùng với tấm chắn hoặc mặt nạ. Khi rót đầy vào vật chứa hoặc khi cho các chất vào nitơ lỏng luôn xảy ra sôi và bắn tung tóe, do đó cần thực hiện các thao tác này thật chậm. Bảo quản và sử dụng nitơ lỏng ở nơi thông gió tốt. Do tỷ lệ giãn nở lớn từ thể lỏng sang thể khí (từ 1 lần đến 700 lần) nên nếu nitơ lỏng được bảo quản trong vật chứa kín sẽ rất nguy hiểm.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng một số glycoalkaloid (bao gồm α -solanin và α -chaconin) trong củ khoai tây bằng sắc ký lỏng.

Giới hạn định lượng đối với α -solanin là từ 10 mg/kg đến 200 mg/kg, đối với α -chaconin là từ 20 mg/kg đến 250 mg/kg.

2 Nguyên tắc

Các glycoalkaloid được chiết ra khỏi phần mẫu thử (mô củ tươi) bằng axit axetic loãng. Dịch chiết được cô đặc và làm sạch trên cột chiết pha rắn dùng một lần. Cuối cùng tách và đo α -solanin và α -chaconin bằng phương pháp sắc ký lỏng pha đảo với detector UV ở bước sóng 202 nm.

3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích.

3.1 Axetonitril, loại dùng cho sắc ký lỏng với độ truyền qua $\geq 80\%$ ở bước sóng 200 nm.

3.2 Dung dịch chiết, nước-axit axetic-natri hydro sulfat (100 : 5 : 0,5 thể tích/thể tích/khối lượng).

Cho 1,0 lít nước với 50 ml axit axetic băng và thêm 5,0 g NaHSO_3 vào rồi trộn để hòa tan.

3.3 Dung dịch rửa SPE, axetonitril 15 %.

Trộn 150 ml axetonitril (3.1) với 850 ml nước.

3.4 Kali monohydro phosphat (K_2HPO_4), 0,1 M.

Cân chính xác 17,4 g K_2HPO_4 khan, chuyển định lượng vào bình định mức dung tích 1 lít (4.9), hòa tan trong nước và thêm nước đến vạch.

3.5 Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4), 0,1 M.

Cân chính xác 13,6 g KH_2PO_4 , chuyển định lượng vào bình định mức dung tích 1 lít (4.9), hòa tan trong nước và thêm nước đến vạch.

3.6 Dung dịch đệm kali phosphat, 0,1 M, pH 7,6.

Chuyển 100 ml dung dịch K_2HPO_4 (3.4) vào cốc có mỏ có que khuấy từ và điện cực pH. Cho dung dịch KH_2PO_4 (3.5) đến khi pH đạt $7,6 \pm 0,01$ [khoảng 19 ml dung dịch KH_2PO_4 (3.5) trên 100 ml K_2HPO_4 (3.4)]. Lọc qua màng lọc có cỡ lỗ 0,45 μm .

3.7 Pha động LC, axetonitril 60 % trong dung dịch đệm phosphat 0,01 M.

Trộn 100 ml dung dịch đệm phosphat (3.6) với 300 ml nước và thêm 600 ml axetonitril (3.1). Khử khí.

3.8 Dung dịch rửa LC, axetonitril 60 %.

Trộn 600 ml axetonitril (3.1) với 400 ml nước. Khử khí.

3.9 Dung dịch chuẩn glycoalkaloid

3.9.1 Dung dịch chuẩn gốc glycoalkaloid

Cân khoảng 25 mg α -solanin và khoảng 25 mg α -chaconin¹⁾, chính xác đến 0,05 mg. Chuyển định lượng vào bình định mức dung tích 100 ml (4.9) bằng dung dịch KH_2PO_4 (3.5). Trộn để hòa tan và pha loãng bằng dung dịch KH_2PO_4 0,1 M (3.5) đến vạch.

¹⁾ Sigma Chemical Co., PO Box 14508, St. Louis, MO 63103-2564, USA là ví dụ về nhà cung cấp sản phẩm bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

3.9.2 Dung dịch chuẩn làm việc glycoalkaloid

Pha loãng dung dịch chuẩn gốc glycoalkaloid (3.9.1) với dung dịch KH_2PO_4 (3.5) để thu được các dung dịch có nồng độ tương ứng 5,0 µg/ml; 10,0 µg/ml; 25,0 µg/ml; 50,0 µg/ml; 100 µg/ml và 150 µg/ml.

Các dung dịch chuẩn glycoalkaloid ổn định ít nhất 3 tháng khi được bảo quản ở 4 °C.

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 đồng hóa

4.1.1 Máy đồng hóa để phân hủy mô khoai tây trong nitơ lỏng: Ví dụ Ultra-Turrax²⁾ T 45 với trục 45-N (đệm Teflon) máy phát TP45/26 và kiểm soát tốc độ thích hợp. Đậy nắp Plexiglass trượt trên trục để tránh bị bắn.

4.1.2 Máy đồng hóa để chiết: Ví dụ Ultra-Turrax²⁾ TP 18-10 với trục 18-N và bộ kiểm soát tốc độ thích hợp.

4.2 Cột chiết pha rắn (SPE): Ví dụ cột chiết pha rắn Sep-Pak C₁₈³⁾ dùng một lần với 360 mg vật liệu nhồi. Kiểm tra độ thu hồi trong quá trình thực hiện phương pháp và kiểm soát chất lượng thường xuyên, đặc biệt là khi sử dụng các cột SPE khác với cột nêu trên. Sử dụng các dịch chiết đã thêm chuẩn để xác định độ thu hồi vì dung dịch chuẩn tinh khiết có thể cho độ thu hồi thấp từ cột SPE, có thể vì bazơ ancaloid hấp thụ mạnh vào pha tĩnh. Độ hấp thụ có thể được chặn bởi các hợp chất khác có mặt trong dịch chiết từ củ. Độ thu hồi dự kiến lớn hơn 90 %.

4.3 Bộ phân phối chân không, dùng cho bộ chiết pha rắn.

4.4 Hệ thống sắc ký lỏng (LC): bơm cao áp đẳng dòng sử dụng van bơm vòng, bộ ổn nhiệt cột, detector có bước sóng thay đổi, bộ tích phân điện tử và máy ghi.

CHÚ THÍCH Kiểm tra hiệu quả về tinh chọn lọc sắc ký khi bắt đầu thực hiện quy trình. Sắc ký đồ của một số giống khoai tây có các pic với thời gian lưu gần với thời gian lưu của α-solanin và α-chaconin (xem Hình A.1). Thời gian lưu của các glycoalkaloid có thể khác nhau rất nhiều khi sử dụng các vật liệu pha tĩnh khác nhau và ngay cả khi sử dụng cùng một cột, ví dụ do sự khác nhau về hiệu quả của các thiết bị ổn nhiệt cột. Phân tích khoai tây có hàm lượng alkaloid không đáng kể, thu được từ các mô của củ có kích cỡ lớn hoặc bằng cách thay đổi các thông số chiết. Nhiệt độ có ảnh hưởng đáng kể đến tinh chọn lọc giữa các pic của glycoalkaloid và pic của các chất gây nhiễu. Tăng nhiệt độ sẽ tăng thời gian lưu của glycoalkaloid, trong khi đó thời gian lưu các pic nhiễu lại giảm.

²⁾ Janke & Kunkel GmbH & Co KG, D79219 Staufen, Đức là ví dụ về sản phẩm bán sẵn trên thị trường.

³⁾ Waters Corp, 34 Maple St, Milford, MA 01.757-3.696, Mỹ là ví dụ về sản phẩm bán sẵn trên thị trường.

Các thông tin nêu trên đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

4.5 Cột sắc ký lỏng, kích thước 250 mm x 4,6 mm đường kính trong, cột bằng thép không gỉ, được nhồi Hypersil ODS⁴⁾, cỡ hạt 5 µm, pha C₁₈, hoặc tương đương.

Các điều kiện vận hành:

- tốc độ dòng: 1,5 ml/min;
- thể tích bơm: 20 µl;
- nhiệt độ cột: 40 °C;
- bước sóng cài đặt detector: 202 nm.

4.6 Máy li tâm, gia tốc 40 000 m/s² (khoảng 4000g).

4.7 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,05 g.

4.8 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,05 mg.

4.9 Bình định mức, dung tích 100 ml và 1 lít.

4.10 Cốc có mỏ, bằng thép không gỉ, dung tích 2 lít.

4.11 Hộp chứa bằng nhựa.

4.12 Máy cắt thực phẩm hoặc dao thái.

4.13 Máy đo pH.

5 Chuẩn bị mẫu thử

Cắt nhỏ khoảng 10 đến 20 củ khoai tây trong máy cắt thực phẩm (4.12). Trộn kỹ và chuyển ngay khoảng 200 g vào cốc có mỏ 2 lít (4.10) chứa đầy nitơ lỏng. Cho các miếng khoai tây cắt nhỏ còn lại vào và khuấy để tách các miếng bị dính. Trong khi ngâm trong nitơ lỏng, làm nhỏ khoai tây bằng máy đồng hóa (4.1.1). Chuyển hỗn hợp đồng nhất vào hộp chứa bằng nhựa (4.11) và đặt ở nơi lạnh để nitơ bay hơi. Trước khi mô khoai tây bắt đầu bị phá vỡ hoàn toàn, đậy kín hộp chứa và bảo quản ở - 18 °C hoặc thấp hơn. Phần mẫu thử có thể bảo quản được ít nhất 6 tháng trước khi xử lý tiếp.

⁴⁾ Shandon Southern Products Ltd., Astmoor, UK; Supelco, Inc., Bellefonte, PA 16823-0048, USA, Cat. No. Z22.634-3 là ví dụ về sản phẩm có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

CẢNH BÁO: Áp lực quá cao có thể xảy ra nếu nitor không bay hơi hết trước khi vật chứa được đóng lại.

CHÚ THÍCH: Việc đồng hóa trong nitor lỏng sẽ thu được bột có hạt mịn để dễ lấy mẫu thử và có thể dễ chiết glycoalkaloid. Nếu các quy trình chuẩn bị mẫu thử khác được ưu tiên hơn vì sự thuận tiện, ví dụ nghiền củ tươi trong máy chế biến thực phẩm hoặc làm đông khô, thì kiểm tra tính đồng nhất. Ngoài ra, cần đảm bảo không xảy ra sự phá vỡ các glycoalkaloid trong quá trình chuẩn bị.

6 Cách tiến hành

6.1 Chiết

Loại bỏ lớp trên của mẫu thử khoai tây đông lạnh, vì có thể chứa nước ngưng tụ. Cân khoảng 10 g mẫu đông lạnh, chính xác đến 0,01 g và bổ sung ngay 40 ml $\pm$ 0,1 ml dung dịch chiết (3.2). Trộn khoảng 2 min bằng máy đồng hóa (4.1.2) (kiểm soát tốc độ để tránh tạo bọt). Lọc bằng cách ly tâm 30 min ở gia tốc lớn hơn 40 000 m/s² bằng máy ly tâm (4.6). Thu lấy phần dịch lỏng phía trên. Dịch chiết ổn định ít nhất trong một tuần khi được bảo quản ở 4 °C.

6.2 Làm sạch dịch chiết

Đặt cột SPE (4.2) vào bộ phân phối chân không (4.3) và ổn định cột bằng 5,0 ml axetonitril (3.1), tiếp theo là 5,0 ml dung dịch chiết (3.2). Cho 10 ml $\pm$ 0,05 ml dịch chiết mẫu đi qua cột. Rửa cột bằng 4,0 ml dung dịch rửa SPE (3.3). Rửa giải với 4,0 ml pha động LC (3.7) (tốc độ rửa giải: 1 đến 2 giọt/s) và điều chỉnh thể tích đến 5,0 ml $\pm$ 0,05 ml bằng pha động LC (3.7). Dịch chiết mẫu có thể ổn định ít nhất một tuần khi được bảo quản ở 4 °C.

6.3 Chạy sắc ký

Cài đặt các điều kiện vận hành theo 4.5 với dung môi pha động LC (3.7) và để cho hệ thống cân bằng. Bơm các dung dịch chuẩn làm việc (3.9.2) và các dịch chiết mẫu. Thể tích bơm ít nhất bằng 2 lần thể tích của vòng bơm. Xem Hình A.1 về sắc ký đồ của dịch chiết từ củ khoai tây.

Trong các điều kiện quy định đối với LC, các pic α -solanin và α -chaconin xuất hiện trong khoảng 10 min. Có thể xuất hiện mono- và di-glycoside, nhưng không có aglycon của α -solanin và α -chaconin nếu thời gian chạy kéo dài đến khoảng 20 min. Các pic gây nhiễu từ chất nền có thể xuất hiện với một số giống khoai tây. Sự có mặt của β -chaconin có thể coi như chỉ số biến chất của nền mẫu, vì chúng được hình thành nhanh trong các mô củ khoai tây bị hư hỏng do kết quả của quá trình thủy phân α -chaconin bằng enzym. Thời gian lưu trong các điều kiện sắc ký đối với β_1 -chaconin, β_2 -chaconin và γ -chaconin là khoảng 10 min, 13 min và 18 min, tương ứng, còn với β_2 -solanin và γ -solanin là 9 min và 17 min, tương ứng.

Sau khi chạy sắc ký xong, rửa bơm và cột (4.5) ít nhất 30 min với dung dịch LC (3.8). Trước khi lấy cột ra sau một khoảng thời gian dài, rửa tiếp bằng axetonitril (3.1).

6.4 Đường chuẩn

Dựng đường chuẩn hồi quy tuyến tính của α -solanin và α -chaconin dựa vào diện tích pic (trục y) trên nồng độ chất chuẩn được biểu thị bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$) (trục x).

7 Tính kết quả

Tính hàm lượng α -solanin và α -chaconin tương ứng trong mẫu thử, X, khi dung dịch thử và dung dịch chuẩn làm việc được bơm vào với thể tích bằng nhau, bằng miligam trên kilogam (mg/kg), theo công thức sau:

$$X = \frac{P_s - \alpha}{\beta} \times F$$

Trong đó:

P_s là diện tích pic phân tích;

α là phần bị chặn của đường chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích;

β là độ dốc của đường chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích pic/ $(\mu\text{g/ml})$;

F là hệ số pha loãng, tính bằng mililit trên gam (ml/g).

Tính hệ số pha loãng, F , như sau:

$$F = \frac{[V_1 + (C_w \times w_p)] \times V_3}{V_2 \times w_p}$$

Trong đó:

w_p là khối lượng của phần mẫu thử (thường là 10 g), tính bằng gam (g);

V_1 là thể tích của dịch chiết, tính bằng mililit (trong trường hợp này $V_1 = 40 \text{ ml}$);

V_2 là thể tích của dịch chiết sử dụng trên cột SPE, tính bằng mililit (trong trường hợp này $V_2 = 10 \text{ ml}$);

V_3 là thể tích cuối cùng của dịch chiết mẫu được pha loãng từ cột SPE, tính bằng mililit (trong trường hợp này $V_3 = 5 \text{ ml}$),

C_w là hàm lượng nước của khoai tây, tính bằng mililit trên gam (giả định $C_w = 0,8$ ml/g nếu không biết trước);

$F = 2,4$ ml/g khi sử dụng 10,0 g phần thử và các điều kiện khác tiếp theo như quy định.

8 Báo cáo thử nghiệm

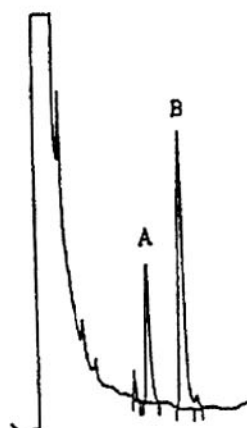
Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) kết quả thử nghiệm thu được;
- e) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(tham khảo)

Ví dụ về sắc ký đồ



CHÚ DẪN

A là pic của α -solanin (thời gian lưu là 5,9 min) tương ứng với nồng độ 22 mg/kg.

B là pic của α -chaconin (thời gian lưu là 7,3 min) tương ứng với nồng độ 46 mg/kg.

Hình A.1 – Ví dụ về sắc ký đồ của dịch chiết từ củ khoai tây

Điều kiện vận hành:

Cài đặt chế độ ghi: đơn vị hấp thụ 0,01 trên toàn thang đo.

Cột: Shandon ODS (C_{18}) Hypersil 5 μ m, 250 mm x 4,6 mm đường kính trong.

Nhiệt độ cột: 40 °C.

Pha động: 60 % axetonitril 0,01 M; pH = 7,6 đệm phosphat.

Tốc độ dòng: 1,5 ml/min.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Kết quả thử nghiệm liên phòng

Bảng A.1 – Kết quả thử nghiệm liên phòng đối với phép xác định glycoalkaloid (α -solanin và α -chaconin) trong củ khoai tây bằng phương pháp sắc ký lỏng

Giá trị trung bình, mg/kg	Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r, \%$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R, \%$	Giới hạn lặp lại, r	Giới hạn tái lập, R
α-solanin						
11,5	1,4	1,5	12,3	13,1	4,0	4,2
15,4	1,3	1,9	8,5	12,1	3,7	5,2
32,1	1,9	4,2	6,1	13,0	5,5	11,6
35,9	2,1	3,2	5,9	9,0	5,9	9,1
103,1	3,5	8,1	3,4	7,9	9,9	22,8
218,1	11,4	21,6	5,2	9,9	32,0	60,6
α-chaconin						
17,2	1,0	1,7	6,0	9,7	2,9	4,6
37,2	1,9	3,4	5,1	9,1	5,3	9,5
48,8	3,1	6,3	6,3	12,8	8,6	17,5
67,2	3,3	6,6	4,8	9,8	9,1	18,5
162,3	6,6	13,8	4,1	8,5	18,5	38,7
260,8	13,8	28,7	5,3	11,0	38,8	80,2