

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 12383:2018

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG POLYDEXTROSE –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ ION**

Foodstuffs – Determination of polydextrose – Ion chromatographic method

HÀ NỘI – 2018

Lời nói đầu

TCVN 12383:2018 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2000.11
Polydextrose in Foods. Ion Chromotography,

TCVN 12383:2018 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 polydextrose – Phương pháp sắc ký ion

Foodstuffs – Determination of polydextrose – Ion chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký ion để xác định hàm lượng polydextrose có trong thực phẩm.

Giới hạn xác định của phương pháp này là từ 2 % đến 95 % (khối lượng).

2 Nguyên tắc

Polydextrose được chiết ra khỏi thực phẩm bằng nước nóng, sau đó ly tâm. Lọc phần nổi phía trên qua bộ siêu lọc ly tâm để loại bỏ các chất gây nhiễu có khối lượng phân tử cao. Dịch lọc được xử lý bằng hỗn hợp enzym (isoamylase, amyloglucosidase và fructanase) để loại bỏ mọi chất gây nhiễu oligosaccharide, chủ yếu là malto-oligomer và fructan. Các chất chuẩn polydextrose được xử lý theo cùng một cách. Sắc ký trao đổi anion áp suất cao có detector điện hóa (HPAEC-ED) được sử dụng để định lượng phân tử polydextrose có khối lượng phân tử cao.

3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các loại thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích.

3.1 Nước, đã loại ion (điện trở $\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$).

3.2 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), 50 %, không chứa cacbonat, tỷ trọng 1,54 kg/l.

Cho 100 ml nước (3.1) vào 100 g natri hydroxit có chứa nhỏ hơn 1 % natri cacbonat. Đậy nắp bình và khuấy cho đến khi hòa tan hết. Để yên dung dịch cho đến khi natri cacbonat lắng xuống, để cho dịch lỏng trong (khoảng 10 ngày). Đậy kín nắp bình khi không sử dụng.

TCVN 12383:2018

3.3 Dung dịch axit axetic (CH_3COOH), 0,2 M

Pha loãng 1,20 g axit axetic bằng nước đến 100 ml.

3.4 Dung dịch natri axetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 0,2 M

Hòa tan 2,72 g natri axetat ngậm ba phân tử nước trong nước và thêm nước đến 100 ml.

3.5 Dung dịch đệm axetat, pH 4,5

Trộn đều 28 ml dung dịch axit axetic (3.3) với 22 ml dung dịch natri axetat (3.4) và thêm nước đến 100 ml.

3.6 Fructanase (exo-inulinase), 667 U/ml.

Hoà tan lượng chứa trong lọ (8000 U) vào 12 ml dung dịch đệm axetat (3.5). Một đơn vị (1 U) là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μmol đường lượng đường khử fructose ra khỏi đường kestose trong 1 min ở điều kiện phân tích chuẩn (10 mM kestose ở pH 4,5 và nhiệt độ 40 °C). Fructanase chứa khoảng 1 % endo-inulinase.

3.7 Amyloglucosidase, 3 260 U/ml (tinh bột hòa tan), 200 U/ml (p-NP- β -maltoside).

Một đơn vị (tinh bột hòa tan) là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μmol glucose ra khỏi tinh bột trong 1 min ở các điều kiện chuẩn (cơ chất tinh bột, nồng độ tinh bột 10 mg/ml, ở pH 4,5 và 40 °C).

Một đơn vị (p-NP- β -maltoside) là lượng enzym cần thiết để phóng 1 μmol p-nitrophenol (pNP) ra khỏi p-nitrophenol- β -maltoside (với sự có mặt của β -glucosidase dư) trong 1 min ở điều kiện chuẩn (10 mM p-NP- β -maltoside ở pH 4,5 và 40 °C); Megazyme E-AMGDF, hoặc tương đương.

3.8 Isoamylase, 200 U/ml (Megazyme E-ISAMY hoặc tương đương)

Một đơn vị là lượng enzym cần thiết để giải phóng 1 μmol đường lượng đường khử glucose ra khỏi glycogen của con hàu trong 1 min ở các điều kiện chuẩn (hàm lượng glycogen của hàu là 10 mg/ml, ở pH 3,5 và 40 °C).

3.9 Hỗn hợp đệm enzym

Trộn 2 ml fructanase (3.6) (chứa 1324 U), 84 μl amyloglucosidase (3.7) (chứa 274 U) và 84 μl isoamylase (3.8) (chứa 16,8 U). Pha loãng trong dung dịch đệm axetat (3.5) đến 20 ml.

Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng và bảo quản ở 4 °C.

3.10 Pha động A, dung dịch natri hydroxit (NaOH), 0,15 M

Pha loãng 8,10 ml dung dịch natri hydroxit 50 % (3.2) bằng nước đã loại khí đến 1 L sau đó bảo quản trong điều kiện khí trơ.

3.11 Pha động B, dung dịch natri hydroxit (NaOH) 0,15 M và natri axetat 0,5 M

Hoà tan 68,04 g natri axetat ngậm ba phân tử nước (chứa 41,015 g natri axetat) trong 1 L dung dịch natri hydroxit 0,15 M (3.10). Loại khí pha động trước khi sử dụng sau đó bảo quản trong khí trơ.

3.12 Chất chuẩn polydextrose

3.12.1 Polydextrose, loại tinh khiết phân tích; độ ẩm được xác định bằng phương pháp Karl Fischer.

3.12.2 Dung dịch chuẩn gốc polydextrose, 5 000 mg/l

Cân 500 mg polydextrose (3.12.1), chính xác đến 10 mg, cho vào lọ có nắp vặn (4.4) đã được cân trước. Thêm khoảng 100 g nước (3.1) đã được đun nóng trước đến 80 °C, vặn chặt nắp và trộn vortex trong 30 s. Cho lọ vào nồi cách thủy ở 80 °C (4.1) trong 10 min sau đó trộn vortex trong 30 s ở phút thứ 5 và phút thứ 10 để hòa tan polydextrose. Lấy lọ ra khỏi nồi cách thủy, để nguội đến nhiệt độ phòng và cân lại.

3.12.3 Dung dịch chuẩn trung gian polydextrose, 2 500 mg/l, 2 000 mg/l, 1 500 mg/l, 1 250 mg/l, 1 000 mg/l, 750 mg/l, 500 mg/l và 250 mg/l

Pha loãng cẩn thận chuẩn gốc 5 000 mg/l (3.12.2) trong nước để thu được các dung dịch chuẩn trung gian có nồng độ tương ứng ở trên.

3.12.4 Dung dịch chuẩn làm việc polydextrose, 500 mg/l, 400 mg/l, 300 mg/l, 250 mg/l, 200 mg/l, 150 mg/l, 100 mg/l và 50 mg/l

Pha loãng dung dịch chuẩn trung gian (3.12.3) tương ứng 5 lần trong nước.

CHÚ THÍCH Các dung dịch chuẩn bền trong 1 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 Nồi cách thủy, cài đặt ở 80 °C ± 2 °C (được tăng đến nhiệt độ sôi) và 50 °C ± 2 °C.

4.2 Máy ly tâm tốc độ cao và rotor, có gia tốc ly tâm 6 000g và có thể lên đến 38 000g với các ống ly tâm dung tích 50 ml (chứa được khoảng 38 ml dịch ly tâm); gia tốc 9 200g với các ống ly tâm dung tích 1,7 ml; gia tốc 6 400g với các ống ly tâm dung tích 15 ml (ví dụ Beckman) và các rotor, ví dụ: JA-25.15 hoặc loại tương đương.

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

4.4 Lọ, có nắp vặn, dung tích 250 ml, chịu được nước nóng 80 °C.

4.5 Máy trộn vortex.

4.6 Pipet, có thể điều chỉnh được, dung tích 20 µl đến 200 µl và 200 µl đến 1000 µl.

4.7 Bộ lọc xyranh bằng PTFE, cỡ lỗ 0,2 µm, đường kính 13 mm.

4.8 Dụng cụ siêu lọc ly tâm, 100 000 NMWL (giới hạn khối lượng phân tử danh định) màng lọc polyethersulfone, dung tích 2 ml (ví dụ: Milipore hoặc loại tương đương).

4.9 Máy sắc ký trao đổi anion hiệu năng cao (HPAEC-ED), gồm có các bộ phận;

- LC có khả năng tạo khoảng 3000 psi (200 bar*)
- Bơm gradient, có khả năng xử lý dịch rửa giải natri hydroxit;
- Detector điện hóa tích hợp dạng xung (có điện cực bằng vàng), ví dụ: Dionex Corp hoặc loại tương đương.

4.10 Cột sắc ký lỏng (LC), kích thước 250 mm×4 mm (ví dụ: Dionex hoặc loại tương đương) có cột bảo vệ (ví dụ: cột Carbo Pak PA1, kích thước 23 mm×3 mm hoặc loại tương đương).

5 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể về sản phẩm thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị phần mẫu thử

Nghiền hoặc cắt nhỏ mẫu. Bảo quản mẫu trong vật chứa kín để tránh thay đổi độ ẩm. Nếu biết lượng polydextrose xấp xỉ trong mẫu thì cân lượng mẫu sao cho tạo lượng polydextrose nằm trong dải đường chuẩn. Nếu chưa biết lượng polydextrose trong mẫu thì ước tính lượng polydextrose và chọn khối lượng phần mẫu thử dựa trên ước tính đó.

* 1 bar = 10⁵ Pa.

6.2 Chiết polydextrose ra khỏi mẫu

Cân một lượng mẫu thử thích hợp, chính xác đến 10 mg, cho vào lọ có nắp vận (4.4) đã được cân trước. Thêm khoảng 100 g nước (3.1) đã được làm nóng trước đến 80 °C và vặn chặt nắp ngay. Trộn vortex trong 30 s để phân tán mẫu. Cho lọ vào nồi cách thủy ở 80 °C (4.1) trong 10 min sau đó trộn vortex trong 30 s ở phút thứ 5 và phút thứ 10 để hòa tan polydextrose. Lấy lọ ra khỏi nồi cách thủy, để nguội đến nhiệt độ phòng và cân lại. Ghi lại tổng khối lượng bằng gam và tính số gam nước.

Chuyển khoảng 25 g dịch lỏng vào ống ly tâm 35 ml (4.2). Ly tâm hỗn hợp ở 38 000g trong 10 min để tách chất rắn ra khỏi phần nổi phía trên.

6.3 Xử lý các dung dịch chuẩn polydextrose và dung dịch mẫu thử

Lấy 2 ml dung dịch chuẩn trung gian polydextrose (3.12.3) hoặc 2 ml dịch lỏng nổi phía trên (xem 6.2) (cấp đông dung dịch còn lại để có thể điều chỉnh nồng độ). Chuyển vào dụng cụ siêu lọc ly tâm (4.8). Ly tâm ở 5 000g (6 400 r/min) trong 45 min.

Cân ống ly tâm 1,7 ml (4.2), chính xác đến 0,1 mg. Lấy 0,2 ml dịch lỏng đã qua siêu lọc ly tâm, cho vào trong ống ly tâm 1,7 ml, cân và ghi lại khối lượng chính xác đến 0,1 mg. Bổ sung 0,8 ml hỗn hợp đệm enzym (3.9). Cân và ghi lại khối lượng cuối cùng, chính xác đến 0,1 mg. Tính khối lượng của 0,2 ml dịch lỏng đã qua siêu lọc ly tâm và khối lượng của 0,8 ml hỗn hợp đệm enzym.

Vặn nắp và trộn kỹ trên máy trộn vortex (4.5). Ủ ống ly tâm nêu trên ở 50 °C trong 60 min. Sau đó đặt lọ vào nồi cách thủy đun sôi trong 10 min để làm biến tính enzym. Làm lạnh trong bể nước đá hoặc tủ đá cho đến khi enzym kết tủa (khoảng 5 min trong đá lạnh).

Ly tâm ở 9 200g (10 000 r/min) trong 10 min. Sử dụng dịch nổi phía trên trong vòng 72 h chuẩn bị.

6.4 Cài đặt điện áp detector

Chương trình cài đặt điện áp detector sau đây cho thấy thích hợp:

| Thời gian s | Sự tích hợp thế năng V |
|----------------|---------------------------|
| 0,00 | 0,05 |
| 0,20 | 0,05 bắt đầu |
| 0,40 | 0,05 kết thúc |
| 0,41 | 0,75 |
| 0,60 | 0,75 |
| 0,61 | -0,15 |
| 1,00 | -0,15 |

6.5 Chương trình rửa giải gradient

Chương trình rửa giải gradient dùng cho phân tích HPAEC-PAD sau đây cho thấy thích hợp:

| Thời gian min | Pha động A (3.10) % | Pha động B (3.11) % |
|------------------|------------------------|------------------------|
| 00:00 | 70 | 30 |
| 10:00 | 0 | 100 |
| 15:00 | 70 | 30 |
| 20:00 | kết thúc | |

6.6 Dựng đường chuẩn

Dựng đường chuẩn 8 điểm từ các dung dịch chuẩn làm việc polydextrose (3.12.4). Đường chuẩn này cần cho hồi quy đa thức với hệ số tương quan $\geq 95\%$.

6.7 Xác định

Lọc phần nổi phía trên thu được từ 6.3 qua bộ lọc xyranh cỡ lỗ $0,2\ \mu\text{m}$ (4.7) vào lọ lấy mẫu tự động. Bơm 25 μl qua thiết bị HPAEC (4.9). Phân tích mỗi mẫu thử lặp lại ba lần và xác định đáp ứng detector trung bình. Tính diện tích pic đối với thành phần polydextrose có khối lượng phân tử cao ở thời gian lưu khoảng 12 min.

Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) tối đa là 5 %, nếu không thì lặp lại phép phân tích bằng HPAEC.

So sánh diện tích pic này với diện tích pic trên đường chuẩn (6.6). Nồng độ polydextrose phải nằm trong dải đường chuẩn. Nếu nồng độ polydextrose không nằm trong dải này thì thực hiện lại phép phân tích và điều chỉnh nồng độ của mẫu thử đầu tiên (6.2).

7 Tính kết quả

7.1 Nồng độ dung dịch chuẩn gốc polydextrose

Nồng độ dung dịch chuẩn gốc polydextrose (3.12.2), C_0 , biểu thị bằng microgam trên gam ($\mu\text{g/g}$), được tính bằng Công thức (1):

$$C_0 = \frac{M}{m} \times 1\ 000 \quad (1)$$

Trong đó:

M là khối lượng polydextrose đã cân (tính theo chất khô) (xem 3.12.2), tính bằng miligam (mg);

m là khối lượng nước (xem 3.12.2), tính bằng gam (g);

1 000 là hệ số chuyển đổi miligam sang microgam.

7.2 Nồng độ của các dung dịch chuẩn làm việc polydextrose đã qua xử lý

Nồng độ của các dung dịch làm việc polydextrose đã qua xử lý (xem 6.3), C , biểu thị bằng microgam trên gam ($\mu\text{g/g}$), được tính bằng Công thức (2):

$$C = \frac{A_1}{A_1 + A_2} \times C_1 \quad (2)$$

Trong đó:

A_1 là khối lượng của 0,2 ml dung dịch chuẩn trung gian đã qua siêu lọc ly tâm (xem 6.3), tính bằng gam (g);

A_2 là khối lượng của 0,8 ml hỗn hợp đệm enzym đã thêm vào ống ly tâm 1,7 ml chứa dung dịch chuẩn trung gian đã qua siêu lọc ly tâm (xem 6.3), tính bằng gam (g);

C_1 là nồng độ dung dịch chuẩn trung gian chưa qua xử lý (3.12.3), tính bằng microgam trên gam ($\mu\text{g/g}$).

7.3 Hàm lượng polydextrose

Hàm lượng polydextrose trong phần mẫu thử, X , biểu thị bằng phần trăm (%) khối lượng, được tính bằng Công thức (3):

$$X = P \times \left(\frac{A_{1s} + A_{2s}}{A_{1s}} \right) \times \left[\frac{F + W}{F} \right] \times 0,0001 \quad (3)$$

Trong đó:

P là nồng độ polydextrose xác định được theo 6.7, tính bằng microgam trên gam ($\mu\text{g/g}$);

A_{1s} là khối lượng của 0,2 ml dịch lỏng từ mẫu thử đã qua siêu lọc ly tâm (xem 6.3), tính bằng gam (g);

A_{2s} là khối lượng của 0,8 ml hỗn hợp đệm enzym đã thêm vào ống ly tâm 1,7 ml chứa dịch lỏng từ mẫu thử đã qua siêu lọc ly tâm (xem 6.3), tính bằng gam (g);

F là khối lượng phần mẫu thử (xem 6.2), tính bằng gam (g);

W là khối lượng nước đã thêm vào phần mẫu thử (xem 6.2), tính bằng gam (g);

0,0001 là hệ số chuyển đổi từ microgam trên gam ($\mu\text{g/g}$) sang phần trăm (%).

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc những điều được coi là tự chọn, và bất kỳ chi tiết nào có ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Bảng A.1 – Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

| Mẫu thử | $\bar{x}, \%$ | Số lượng phòng thử nghiệm ^{a(b)} | s_r | $RSD_r, \%$ | s_R | $RSD_R, \%$ | HORRAT | Độ thu hồi, % |
|--------------------------|---------------|---|-------|-------------|-------|-------------|--------|---------------|
| Kẹo sôcôla sữa | 19,87 | 8 | 1,10 | 5,52 | 2,01 | 10,11 | 4,0 | 99,4 |
| Trà đá | 1,86 | 8 | 0,12 | 6,37 | 0,20 | 10,70 | 2,9 | 93,0 |
| Bánh quy đường | 8,11 | 7(1) | 0,41 | 5,10 | 0,86 | 10,64 | 3,6 | 81,1 |
| Thạch nho | 5,14 | 7(1) | 0,46 | 9,04 | 0,72 | 14,06 | 4,5 | 102,8 |
| Polydextrose | 92,57 | 8 | 3,64 | 3,93 | 4,15 | 4,48 | 2,2 | 92,6 |
| Kẹo mềm | 33,14 | 8 | 2,55 | 7,71 | 3,58 | 10,81 | 4,6 | 87,2 |
| Hỗn hợp đồ uống dạng bột | 1,84 | 7(1) | 0,14 | 7,71 | 0,18 | 9,88 | 2,7 | 92,0 |

^a là số lượng phòng thử nghiệm cộng tác được giữ lại sau khi loại trừ ngoại lệ;

^b là số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ;

s_r là độ lệch chuẩn lặp lại;

s_R là độ lệch chuẩn tái lập;

RSD_r là độ lệch chuẩn tương đối lặp lại;

RSD_R là độ lệch chuẩn tương đối tái lập.