

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 13287:2021**

**Xuất bản lần 1**

**TINH BỘT VÀ NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TINH BỘT BỀN BẰNG  
PHƯƠNG PHÁP THUỶ PHÂN BỞI ENZYM**

***Starch and plant materials – Determination of resistant starch content  
by enzymatic digestion***

**HÀ NỘI – 2021**

## **Lời nói đầu**

TCVN 13287:2021 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2002.02  
*Resistant starch in starch and plant materials. Enzymatic digestion;*

TCVN 13287:2021 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Tinh bột và nguyên liệu thực vật – Xác định hàm lượng tinh bột bền bằng phương pháp thủy phân bởi enzym

*Starch and plant materials – Determination of resistant starch content by enzymatic digestion*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp thủy phân bởi enzym để xác định hàm lượng tinh bột bền trong tinh bột và nguyên liệu thực vật.

Giới hạn định lượng của phương pháp là từ 2,0 % đến 64 %.

Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được nêu trong Phụ lục A.

### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 2.1

**Đơn vị hoạt độ amyloglucosidase** (unit of amyloglucosidase activity)

Lượng amyloglucosidase xúc tác để giải phóng 1  $\mu\text{mol}$  glucose trong thời gian 1 min từ tinh bột tan ở nhiệt độ 40 °C, pH 4,5.

#### 2.2

**Tinh bột bền** (resistant starch)

Loại tinh bột có khả năng kháng quá trình tiêu hoá bởi ruột non của con người.

### 3 Nguyên tắc

Phần tinh bột không phải là tinh bột bền (tinh bột hoà tan) được hoà tan và thủy phân thành glucose dưới tác dụng của hỗn hợp  $\alpha$ -amylase tụy và amyloglucosidase (AMG) trong thời gian 16 h ở nhiệt độ 37 °C. Dừng phản ứng bằng cách thêm ethanol hoặc cồn công nghiệp đã metyl hóa, tinh bột bền được thu hồi bằng cách ly tâm. Tinh bột bền trong phần chất rắn sau ly tâm được hoà tan trong dung dịch kali hydroxit 2 M bằng cách khuấy mạnh trong bể nước đá. Dung dịch này được trung hoà bằng dung dịch đệm axetat và tinh bột được thủy phân hoàn toàn thành glucose bằng AMG. Glucose được xác định bằng thuốc thử glucose oxidase-peroxidase (GOPOD), qua đó xác định hàm lượng tinh bột bền. Phần tinh bột hoà tan được xác định từ hàm lượng glucose có trong dịch trong và dịch rửa, sử dụng thuốc thử GOPOD.

## 4 Thuốc thử

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

### 4.1 Dung dịch đệm natri maleat, 100 mM, pH 6,0

Hòa tan 23,2 g axit maleic trong 1 600 mL nước và chỉnh pH đến 6,0 bằng dung dịch natri hydroxit 4 M (4.11) (160 g/L). Thêm 0,6 g canxi clorua ngậm hai phân tử nước ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) và 0,4 g natri azid. Chuyển dung dịch vào bình định mức 2 l (5.17) và thêm nước đến vạch.

Dung dịch đệm bảo quản ở 4 °C có thể bền đến 12 tháng.

### 4.2 Dung dịch đệm natri axetat, 1,2 M, pH 3,8

Thêm 70 mL axit axetic băng vào 800 mL nước, chỉnh đến pH 3,8 bằng dung dịch natri hydroxit 4 M (4.11). Chuyển dung dịch vào bình định mức 1 L (5.17) và thêm nước đến vạch.

Dung dịch bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 12 tháng.

### 4.3 Dung dịch đệm natri axetat, 100 mM, pH 4,5

Thêm 5,8 mL axit axetic băng vào 900 mL nước, chỉnh đến pH 4,5 bằng dung dịch natri hydroxit 4 M (4.11). Chuyển dung dịch vào bình định mức 1 L (5.17) và thêm nước đến vạch.

Dung dịch đệm bảo quản ở 4 °C có thể bền đến 2 tháng.

### 4.4 Dung dịch kali hydroxit, 2 M

Cân 11,2 g kali hydroxit, cho vào 150 mL nước và khuấy đều để hoà tan. Thêm nước đến 200 mL.

Dung dịch bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 12 tháng.

### 4.5 Dung dịch etanol hoặc cồn công nghiệp đã metyl hóa (IMS)

4.5.1 Dung dịch etanol, 95 % đến 99 % thể tích hoặc dung dịch IMS, khoảng 95 % etanol và 5 % metanol.

4.5.2 Dung dịch etanol hoặc cồn công nghiệp đã metyl hóa (IMS), khoảng 50 % thể tích

Pha loãng 500 mL etanol (95 % đến 99 % thể tích) hoặc IMS (khoảng 95 % etanol và 5 % metanol) (4.5.1) bằng nước đến 1 L.

Dung dịch bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền đến 12 tháng.

**4.6 Dung dịch amyloglucosidase (AMG), 3300 U/mL glycerol 50 %<sup>1)</sup>**

Có thể sử dụng trực tiếp mà không cần pha loãng. Dung dịch có độ nhớt cao, cần sử dụng bộ phân phối dung môi.

Dung dịch được bảo quản ở 4 °C có thể bền đến 5 năm.

Không sử dụng dung dịch này để phát hiện glucose tự do.

**4.7 Dung dịch amyloglucosidase (AMG), 300 U/mL**

Pha loãng 2 mL dung dịch amyloglucosidase (4.6) thành 22 mL bằng dung dịch đệm natri maleat pH 6,0 (4.1). Chia dung dịch đã chuẩn bị thành các phần 5 mL và bảo quản đông lạnh trong các ống polypropylen (5.20) trước khi sử dụng.

Dung dịch bảo quản ở - 20 °C có thể bền trên 5 năm khi lặp lại chu kỳ cấp đông/rã đông.

**4.8 Huyền phù  $\alpha$ -amylase tụy, 10 mg/mL (30 U/mL), chứa amyloglucosidase, 3 U/mL<sup>1)</sup>**

Ngay trước khi sử dụng, phân tán 1 g  $\alpha$ -amylase tụy trong 100 mL dung dịch đệm natri maleat (4.1) và lắc đều trong 5 min. Thêm 1 mL dung dịch amyloglucosidase 300 U/mL (4.7) và trộn đều. Ly tâm trong 10 min ở gia tốc lớn hơn 1500 g và cẩn thận gạn lấy phần dịch nổi phía trên.

Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

**4.9 Dung dịch đệm glucose oxidase - peroxidase - aminoantipyrine<sup>1)</sup>****4.9.1 Dung dịch đệm đậm đặc**

Hòa tan 136 g kali dihydro phosphat, 42 g natri hydroxit và 30 g axit 4-hydroxybenzoic trong 900 mL nước. Chỉnh đến pH 7,4 bằng dung dịch axit clohydric 2 M (4.13) hoặc dung dịch natri hydroxit 2 M (4.12). Pha loãng dung dịch đến 1 L, thêm 1 g natri azid và trộn kỹ để hòa tan.

Dung dịch này khi được bảo quản ở 4 °C có thể bền đến 3 năm.

**4.9.2 Dung dịch đệm glucose oxidase - peroxidase - aminoantipyrine, hỗn hợp glucose oxidase > 12000 U/L, peroxidase > 650 U/L và 4-aminoantipyrine 0,4 mM**

Pha loãng 50 ml dung dịch đệm đậm đặc (4.9.1) đến 1,0 L. Sử dụng một phần dung dịch đệm pha loãng để hòa tan hoàn toàn hỗn hợp đồng khô glucose oxidase - peroxidase đựng trong lọ nhỏ.

<sup>1)</sup> Đây là ví dụ về các sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm nêu trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự của các nhà cung cấp khác nếu cho kết quả tương đương. Các thuốc thử nêu trong 4.6, 4.8, 4.9, 4.10 được cung cấp bởi bộ kit định lượng tinh bột bền của hãng Megazyme.

## TCVN 13287:2021

Chuyển dịch thu được vào bình định mức 1 L (5.17) chứa dung dịch đệm pha loãng và thêm dung dịch đệm đến vạch.

Dung dịch này khi được bảo quản ở 4 °C có thể bền trong 2 tháng đến 3 tháng và khi được bảo quản ở - 20 °C có thể bền trong 2 năm đến 3 năm.

Kiểm tra sự hiện màu và độ ổn định của dung dịch đã chuẩn bị bằng cách ủ trong tủ ấm (lặp lại) 3,0 mL dung dịch đệm glucose oxidase-peroxidase-aminoantipyrine với dung dịch chứa chuẩn glucose (100 µg tinh thể glucose khô trong 0,2 mL dung dịch natri benzoat 0,2 %). Sau 15 min, 20 min, 30 min và 60 min, xác định độ hấp thụ tại bước sóng 510 nm. Sự hiện màu tối đa cần đạt được trong vòng 20 min và màu sắc phải bền trong ít nhất 60 min sau khi đạt độ hấp thụ tối đa tại 50 °C.

### 4.10 Dung dịch chuẩn glucose, 1 mg/mL

Hòa tan 1,00 g glucose khan tinh khiết phân tích (99,5 %) trong 900 mL dung dịch axit benzoic 0,2 % trong nước. Chuyển sang bình định mức 1 L và định mức đến vạch. Tính nồng độ chính xác của dung dịch chuẩn gốc dựa trên độ tinh khiết và lượng cân thực tế.

Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng có thể bền hơn 5 năm.

### 4.11 Dung dịch natri hydroxit, 4 M.

### 4.12 Dung dịch natri hydroxit, 2 M.

### 4.13 Dung dịch axit clohydric, 2 M.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

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

**5.1 Máy nghiền, kiểu ly tâm, sử dụng rotor 12 răng và sàng cỡ lỗ 1,0 mm, hoặc thiết bị có tính năng tương tự.**

**5.2 Máy ly tâm, có thể hoạt động ở gia tốc 1500 g.**

**5.3 Nồi cách thủy có lắc, có thể tạo chuyển động thẳng với tốc độ 100 r/min (tương đương với 200 hành trình/min), chiều dài của hành trình là 35 mm, có thể ổn định nhiệt độ 37 °C <sup>2)</sup>.**

**5.4 Nồi cách thủy, có thể ổn định nhiệt độ 50 °C ± 0,1 °C.**

### 5.5 Máy trộn Vortex.

---

<sup>2)</sup> Grant OLS 200 [Grant Instruments (Cambridge) Ltd., Royston Hertfordshire SG8 6GB, UK] là ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm nêu trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

- 5.6 Máy khuấy từ, sử dụng các thanh khuấy từ kích thước 5 mm x 15 mm.
- 5.7 Máy đo pH.
- 5.8 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.
- 5.9 Máy đo quang phổ, có thể đo ở bước sóng 510 nm, sử dụng cuvet 10 mm.
- 5.10 Pipet tự động, có thể phân phối thể tích 100 µL.
- 5.11 Ống nghiệm, bằng thủy tinh, kích thước 16 mm x 100 mm, dung tích 14 ml.
- 5.12 Ống nghiệm, loại có nắp đậy bằng thủy tinh, kích thước 16 mm x 125 mm.
- 5.16 Nhiệt kế, có thể đo ở 37 °C ± 0,1 °C và 50 °C ± 0,1 °C.
- 5.17 Bình định mức, dung tích 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1 L và 2 L.
- 5.18 Đồng hồ bấm giờ.
- 5.19 Bình nhựa.
- 5.20 Ống polypropylen.
- 5.21 Bể nước đá.

## 6 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Tham khảo các tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm. Trong trường hợp chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm, việc lấy mẫu theo thỏa thuận giữa các bên liên quan.

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

## 7 Cách tiến hành

### 7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Nghiền 50 g mẫu thử bằng máy nghiền (5.1) có sàng cỡ lỗ 1,0 mm. Chuyển toàn bộ lượng mẫu sang bình (5.19) và trộn đều bằng cách lắc và đảo.

Không cần nghiền đối với mẫu thử là chế phẩm tinh bột ở dạng bột mịn.

## TCVN 13287:2021

### 7.2 Thuỷ phân tinh bột hòa tan

Cân chính xác khoảng 100 mg  $\pm$  5 mg mẫu thử, cho trực tiếp vào từng ống nghiệm có nắp đậy (5.12). Gõ nhẹ ống nghiệm để đảm bảo rằng tất cả mẫu thử đều rơi xuống dưới đáy của ống. Thêm 4,0 mL  $\alpha$ -amylase tụy chứa amyloglucosidase (4.8) vào mỗi ống. Vặn chặt nắp, trộn đều trên máy trộn Vortex (5.5) và đặt thẳng đứng các ống nghiệm vào nồi cách thủy (5.3) trong khi vẫn lắc liên tục. Ủ ở 37 °C trong 16 h.

Lấy ống nghiệm ra khỏi nồi cách thủy có lắc (5.3), dùng khăn giấy thấm nước còn dư trên ống, mở nắp và thêm 4,0 mL etanol (95 % đến 99 % thể tích) hoặc IMS (99 % thể tích) (4.5.1). Trộn đều trên máy trộn Vortex (5.5). Ly tâm với gia tốc 1500 g trong 10 min. Cẩn thận gạn bỏ dịch trong phía trên, phân tán phần chất rắn trong 2 mL IMS 50 % (4.5.2) và trộn đều trên máy trộn Vortex (5.5). Thêm 6 mL IMS 50 % (4.5.2), trộn đều và ly tâm với gia tốc 1500 g trong 10 min. Lặp lại quy trình này một lần nữa. Cẩn thận gạn bỏ phần dịch nổi phía trên và lật ngược ống đặt trên giấy thấm để thấm phần dịch trong còn lại.

### 7.3 Xác định hàm lượng tinh bột bền

Cho thanh khuấy từ (5.6) và 2 mL dung dịch kali hydroxit 2 M (4.4) vào mỗi ống để hoà tan phần chất rắn. Hoà tan phần tinh bột bền trong khoảng 20 min trong bể nước đá (5.21) đặt trên máy khuấy từ (5.6) (không sử dụng máy trộn Vortex vì có thể hình thành nhũ tương). Ở bước này, đảm bảo lượng chứa trong ống nghiệm được khuấy đều khi dung dịch kali hydroxit 2 M (4.4) được thêm vào để tránh tinh bột vón cục, gây khó khăn cho quá trình hoà tan.

Thêm 8 mL dung dịch đệm natri axetat 1,2 M (4.2) vào mỗi ống và khuấy mạnh trên máy khuấy từ (5.6). Thêm ngay 0,1 mL dung dịch AMG 3 300 U/mL (4.6), trộn đều trên máy khuấy từ (5.6) và ủ trong nồi cách thủy (5.4) ở 50 °C trong 30 min.

Đối với mẫu thử có hàm lượng tinh bột bền > 10 %, chuyển toàn bộ lượng chứa trong ống nghiệm vào bình định mức 100 mL (5.17) và dùng nước để tráng ống. Sử dụng nam châm ngoài để giữ thanh khuấy từ khi tiến hành tráng ống. Thêm nước đến 100 mL. Ly tâm với gia tốc 1500 g trong 10 min để thu lấy dịch trong.

Đối với mẫu thử có hàm lượng tinh bột bền < 10 %, ly tâm ngay mà không phải pha loãng. Trong trường hợp này, thể tích cuối trong ống là 10,3 mL  $\pm$  0,05 mL.

Chuyển 0,1 mL dịch nổi đã pha loãng vào ống nghiệm thuỷ tinh (5.11), lặp lại hai lần, thêm 3,0 mL thuốc thử GOPOD (4.9.2) và trộn đều trên máy trộn Vortex (5.5), ủ ở 50 °C trong 20 min rồi để nguội đến nhiệt độ phòng.

Chuẩn bị mẫu trắng bằng cách trộn 0,1 mL dung dịch đệm natri axetat 0,1 M, pH 4,5 (4.3) và 3,0 mL thuốc thử GOPOD.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn glucose (tiến hành lặp lại 4 lần) bằng cách trộn 0,1 mL dung dịch glucose (4.10) và 3,0 mL thuốc thử GOPOD (4.9.2). Ủ ở 50 °C trong 20 min và để nguội ở nhiệt độ phòng.

Chỉnh thiết bị đo quang phổ về 0 bằng mẫu trắng. Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch ở bước sóng 510 nm so với mẫu trắng. Tính giá trị trung bình của giá trị độ hấp thụ lặp lại 2 lần. Sự tạo màu của GOPOD với glucose phải tuyến tính trong khoảng độ hấp thụ từ 0,0 đơn vị đến 1,5 đơn vị.

## 8 Tính kết quả

a) Đối với mẫu thử có chứa > 10 % hàm lượng tinh bột bền:

Hàm lượng tinh bột bền có trong mẫu thử,  $X$ , biểu thị theo % khối lượng, được tính theo Công thức (1):

$$X = \Delta A \times F \times \frac{100}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta A \times \frac{F}{W} \times 90 \quad (1)$$

b) Đối với mẫu thử có chứa < 10 % hàm lượng tinh bột bền:

Hàm lượng tinh bột bền có trong mẫu thử,  $X$ , biểu thị theo % khối lượng, được tính theo Công thức (2):

$$X = \Delta A \times F \times \frac{10,3}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta A \times \frac{F}{W} \times 9,27 \quad (2)$$

Trong đó:

$\Delta A$  là độ hấp thụ trung bình của dung dịch thử so với mẫu trắng;

$F$  là hệ số chuyển đổi từ giá trị độ hấp thụ sang microgam ( $\mu g$ ) [độ hấp thụ thu được từ 100  $\mu g$  glucose trong phản ứng GOPOD và  $F = 100$  ( $\mu g$  glucose) chia cho độ hấp thụ của GOPOD đối với 100  $\mu g$  glucose này];

100/0,1 là hệ số điều chỉnh thể tích, tức là lấy 0,1 mL từ 100 mL;

10,3/0,1 là hệ số điều chỉnh thể tích, tức là lấy 0,1 mL từ 10,3 mL;

1/1000 là hệ số chuyển đổi đơn vị từ  $\mu g$  sang mg;

100/ $W$  là hệ số chuyển đổi sang 100 mg mẫu thử;

162/180 là hệ số chuyển đổi từ glucose tự do xác định được sang glucose khan có trong tinh bột.

## 9 Báo cáo thử nghiệm

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

**TCVN 13287:2021**

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
  - b) phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
  - c) phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
  - d) 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;
  - e) kết quả thử nghiệm thu được.
-