

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9931:2013**

**ISO 11215:1998**

Xuất bản lần 1

**TINH BỘT BIẾN TÍNH – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG  
AXIT ADIPIC CỦA DI-STARCH ADIPAT  
ĐÃ AXETYL HÓA – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ KHÍ**

*Modified starch – Determination of adipic acid content  
of acetylated di-starch adipates – Gas chromatographic method*

HÀ NỘI - 2013

## Lời nói đầu

TCVN 9931:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 11215:1998;

TCVN 9931:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F18 Đường, mật ong và sản phẩm tinh bột biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Tinh bột biến tính - Xác định hàm lượng axit adipic của di-starch adipat đã axetyl hóa - Phương pháp sắc ký khí

*Modified starch – Determination of adipic acid content of acetylated di-starch adipates – Gas chromatographic method*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp sắc ký khí để xác định hàm lượng axit adipic tổng số và hàm lượng axit adipic tự do của di-starch adipat đã axetyl hóa.

### 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 9934:2013 (ISO 1666:1996), *Tinh bột – Xác định độ ẩm – Phương pháp dùng tủ sấy*

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

### 3 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được phân tán trong dung dịch natri hydroxit có nồng độ trung bình, để thủy phân hoàn toàn adipat ra khỏi tinh bột. Sau khi axit hóa, axit adipic tự do được chiết bằng etyl axetat. Etyl axetat được loại ra và cặn khô được silyl hóa. Một phần của dung dịch này được bơm vào máy sắc ký khí có cột mao quản. Axit pimelic được dùng làm chất chuẩn nội.

Axit adipic tự do được chiết bằng cách rửa tinh bột với nước, axit hóa dịch chiết và chiết axit tự do bằng etyl axetat.

## TCVN 9931:2013

Tiến hành silyl hóa và chạy sắc ký khí như mô tả ở trên.

### 4 Thuốc thử

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

4.1 Nước, phù hợp với loại 3 của TCVN 4851 (ISO 3696).

4.2 Tinh bột ngô nếp, loại thương mại.

CHÚ THÍCH Tinh bột ngô nếp được chọn làm vật liệu nền, vì trên thị trường có rất nhiều tinh bột adipat. Có thể sử dụng tinh bột tự nhiên khác, nếu thích hợp.

4.3 Dung dịch axit adipic,  $\rho(C_6H_{10}O_4) = 50,0$  mg/l.

4.4 Dung dịch axit pimelic,  $\rho(C_7H_{12}O_4) = 50,0$  mg/l.

4.5 Dung dịch natri hydroxit,  $c(NaOH) = 4$  mol/l.

4.6 Axit clohydric, đậm đặc,  $c(HCl) = 12$  mol/l.

4.7 Etyl axetat ( $C_4H_8O_2$ ).

4.8 Khí nitơ, độ tinh khiết 99 %.

4.9 Axetonitril.

4.10 Thuốc thử silyl hóa: bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) chứa 1 % trimethylchlorosilan (TMCS).

4.11 Khí heli, độ tinh khiết 99,9999 % (ví dụ loại N60).

4.12 Khí hydro, độ tinh khiết 99,99 % (ví dụ loại N400 hoặc loại tốt hơn).

4.13 Không khí, độ tinh khiết 99,999 % (ví dụ loại S).

### 5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Ống phản ứng bằng thủy tinh, kích thước 100 mm x 16 mm, có nắp vặn được gắn với vòng đệm cao su phủ polytetrafluoroetylen (PTFE) bền với axit clohydric đậm đặc (4.6).

5.2 Pipet, có thể chỉnh được dung tích 1,00 ml và 5,00 ml, độ chính xác đến 0,01 ml.

CHÚ THÍCH Pipet phải được kiểm tra để chắc chắn phù hợp với dung sai của nhà sản xuất. Có thể cần phải hiệu chuẩn.

**5.3 Máy lắc quay.**

**5.4 Pipet Pasteur.**

**5.5 Dụng cụ gia nhiệt, có thể duy trì được ở  $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .**

**5.6 Dụng cụ làm bay hơi, để loại bỏ dung môi bằng khí nitơ (ví dụ, Pierce Reacti-Vap III)<sup>1)</sup>.**

**5.7 Bể siêu âm, công suất 120 W.**

**5.8 Máy sắc ký khí, có các cột mao quản, được gắn với detector ion hóa ngọn lửa, bộ bơm lên cột và máy tích phân. Xem Phụ lục A về các điều kiện sắc ký điển hình.**

**5.9 Rây, có cỡ lỗ 800  $\mu\text{m}$ .**

**5.10 Máy nghiền có lưỡi dao.**

**5.11 Máy li tâm phòng thử nghiệm, có thể vận hành ở gia tốc quay 1 100  $g_n$ .**

## **6 Lấy mẫu**

Phòng thử nghiệm phải nhận đúng mẫu đại diện và mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này.

## **7 Chuẩn bị mẫu thử**

Rây mẫu qua rây cỡ lỗ 800  $\mu\text{m}$  (5.9). Nếu mẫu không lọt qua rây thì nghiền mẫu bằng máy nghiền có lưỡi dao (5.10) sao cho mẫu lọt hết qua rây cỡ lỗ 800  $\mu\text{m}$ . Đồng hóa mẫu.

## **8 Cách tiến hành**

### **8.1 Hiệu chuẩn hàm lượng axit adipic tổng số**

**8.1.1** Cho vào bốn ống phản ứng bằng thủy tinh (5.1), mỗi ống khoảng 50 mg tinh bột ngô nếp (4.2), được cân chính xác đến 0,1 mg.

**8.1.2** Dùng pipet (5.2) cho vào một ống 1,00 ml dung dịch axit adipic (4.3) và cho dung dịch axit adipic (4.3) vào ba ống còn lại tương ứng là: 0,75 ml, 0,50 ml và 0,25 ml.

---

<sup>1)</sup> Pierce Reacti-VAP III là ví dụ về thiết bị phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng và tiêu chuẩn không ấn định phải sử dụng thiết bị này.

## **TCVN 9931:2013**

**8.1.3** Chỉnh thể tích trong mỗi ống đến 1,5 ml bằng nước (4.1) rồi thêm 1,00 ml dung dịch axit pimelic (4.4) vào mỗi ống. Mỗi ống chứa 50 µg axit pimelic và 50,0 µg, 37,5 µg, 25,0 µg và 12,5 µg axit adipic tương ứng.

**CHÚ THÍCH** Có thể là axit pimelic chứa một số axit adipic. Nếu có chứa thì ống thứ năm phải được chuẩn bị trong điều kiện tương tự nhưng không bổ sung dung dịch axit adipic (4.3).

**8.1.4** Lắc các ống bằng tay để tinh bột phân tán đều. Thêm 2,5 ml dung dịch natri hydroxit (4.5).

**8.1.5** Đậy kín ống rồi đặt vào máy lắc quay (5.3) trong 5 min.

**8.1.6** Lấy ống ra, để nguội rồi thêm 1,0 ml axit clohydric (4.6). Trộn đều.

**8.1.7** Thêm 5 ml etyl axetat (4.7). Đậy kín ống rồi lắc mạnh trong 1 min.

**8.1.8** Để yên ống cho đến khi tách pha tốt. Dùng pipet Pasteur (5.4) chuyển lớp phía trên (etyl axetat) vào ống sạch có nắp vặn.

Đảm bảo rằng không có lớp nước đi cùng lớp hữu cơ.

**8.1.9** Đặt các ống vào trong dụng cụ gia nhiệt (5.5) ở 30 °C rồi cho bay hơi hoàn toàn etyl axetat dưới dòng khí nitơ (4.8) bằng dụng cụ làm bay hơi (5.6).

**8.1.10** Lặp lại các bước 8.1.7 đến 8.1.9 thêm ba lần, thu lấy cặn khô vào cùng một ống nghiệm.

**8.1.11** Hòa tan toàn bộ cặn trong 0,6 ml axetonitril (4.9) và đặt ống đã đậy nắp vào bể siêu âm (5.7) để siêu âm trong 2 min.

**8.1.12** Thêm 0,3 ml thuốc thử silyl hóa (4.10). Đậy ống và đồng hóa trong bể siêu âm 2 min.

**8.1.13** Đặt ống vào dụng cụ gia nhiệt (5.5) ở 30 °C trong 30 min để tạo dẫn xuất hoàn toàn.

**8.1.14** Bơm 0,5 µl dung dịch vào máy sắc ký khí. Xem Phụ lục A về các điều kiện sắc ký điển hình.

## **8.2 Hàm lượng axit adipic tổng số**

**8.2.1** Cân khoảng 50 mg mẫu thử đã được chuẩn bị trước, chính xác đến 0,1 mg, vào ống phản ứng bằng thủy tinh (5.1).

**8.2.2** Thêm 1,5 ml nước (4.1) và 1,00 ml dung dịch axit pimelic (4.4) rồi lắc kỹ để phân tán hoàn toàn mẫu thử.

**8.2.3** Tiến hành theo 8.1.4 đến hết 8.1.14.

## **8.3 Hiệu chuẩn hàm lượng axit adipic tự do**

**8.3.1** Cho vào bốn ống phản ứng bằng thủy tinh (5.1), mỗi ống khoảng 500 mg tinh bột ngô nếp (4.2), được cân chính xác đến 0,1 mg.

**8.3.2** Dùng pipet (5.2) cho vào một ống 1,00 ml dung dịch axit adipic (4.3) rồi thêm dung dịch axit adipic (4.3) vào ba ống còn lại tương ứng là: 0,75 ml, 0,50 ml và 0,25 ml.

**8.3.3** Chỉnh thể tích trong mỗi ống đến 4,0 ml bằng nước (4.1) rồi thêm 1,00 ml dung dịch axit pimelic (4.4) vào mỗi ống. Mỗi ống chứa 50 µg axit pimelic và 50,0 µg, 37,5 µg và 25,0 µg và 12,5 µg axit adipic tương ứng.

**CHÚ THÍCH** Có thể axit pimelic chứa một số axit adipic. Nếu có chứa thì ống thử năm phải được chuẩn bị trong điều kiện tương tự nhưng không bổ sung dung dịch axit adipic (4.3).

**8.3.4** Đậy kín ống rồi khuấy trộn 16 h trong máy lắc.

**8.3.5** Lấy ống ra khỏi máy lắc và ly tâm 5 min ở gia tốc quay 1 100  $g_n$  trong máy ly tâm (5.11).

**8.3.6** Chuyển phần chất lỏng phía trên vào ống phản ứng bằng thủy tinh sạch (5.1). Thêm 50 µl axit clohydric (4.6) và 5 ml etyl axetat (4.7).

**8.3.7** Đậy kín các ống và lắc mạnh trong 1 min.

**8.3.8** Tiến hành theo 8.1.8 đến hết 8.1.14.

#### **8.4 Hàm lượng axit adipic tự do**

**8.4.1** Cân khoảng 500 mg mẫu thử đã chuẩn bị, chính xác đến 0,1 mg cho vào ống phản ứng bằng thủy tinh (5.1).

**8.4.2** Thêm 4,0 ml nước (4.1) và 1,00 ml dung dịch axit pimelic (4.4) rồi lắc đều để phân tán hoàn toàn phần mẫu thử.

**8.4.3** Tiến hành theo 8.3.4 đến hết 8.3.8.

#### **8.5 Độ ẩm**

Xác định độ ẩm của mẫu thử theo TCVN 9934 (ISO 1666).

### **9 Biểu thị kết quả**

#### **9.1 Đường chuẩn**

Thiết lập thời gian lưu cho axit pimelic và adipic và xác định diện tích pic của các dung dịch hiệu chuẩn đã chuẩn bị (8.1.3). Xem sắc ký đồ điển hình ở Phụ lục B.

Dựng đường chuẩn với các khối lượng khác nhau (tính bằng microgam) của axit adipic được bổ sung vào tinh bột ngô nếp trên trục x và các tỉ lệ của diện tích pic axit adipic với pic axit pimelic tương ứng trên trục y. Sử dụng hồi quy tuyến tính, suy ra đường chuẩn phù hợp nhất.

## TCVN 9931:2013

Đối với mỗi mẫu, tính tỉ lệ diện tích pic của axit adipic với diện tích pic axit pimelic, suy ra khối lượng axit adipic tương ứng từ đường chuẩn.

### 9.2 Tính hàm lượng axit adipic tự do và tổng số

Tính hàm lượng axit adipic tự do và hàm lượng axit adipic tổng số của mẫu thử khô bằng công thức sau đây:

$$w_a = \frac{m_a}{m} \times \frac{100\%}{100\% - w_m}$$

Trong đó:

$w_a$  là hàm lượng axit adipic của mẫu thử khô, tính bằng miligam trên kilogram (mg/kg);

$m_a$  là khối lượng axit adipic thu được từ đường chuẩn (9.1), tính bằng microgam ( $\mu\text{g}$ );

$m$  là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

$w_m$  là độ ẩm của mẫu thử (xem 8.5), tính bằng phần trăm khối lượng (%);

Làm tròn kết quả chính xác đến 1 mg/kg.

### 9.3 Tính hàm lượng axit adipic liên kết

Tính hàm lượng axit adipic liên kết bằng cách lấy hàm lượng axit adipic tổng số trừ đi hàm lượng axit adipic tự do.

## 10 Độ chụm

### 10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

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

### 10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập, đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm do cùng một người phân tích, sử dụng cùng một thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại  $r$  nêu trong Bảng 1.



### 10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu thử giống 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 % trường hợp vượt quá giá trị giới hạn tái lập ( $R$ ) nêu trong Bảng 1.

**Bảng 1 - Giới hạn lặp lại ( $r$ ) và giới hạn tái lập ( $R$ )**

Hàm lượng axit adipic tổng số trung bình (mg/kg)	$r$ (mg/kg)	$R$ (mg/kg)
90	5	33
386	21	91
405	7	114
430	22	142
659	36	175

### 11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả thử nghiệm cuối cùng thu được;
- mọi chi tiết thao tác không qui 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 thử nghiệm.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Các điều kiện sắc ký điển hình**

**A.1 Cột**

Silica nóng chảy WCOT, đường kính trong 0,32 mm, dài 10 m, phủ một lớp CP-SIL 5 CB, dày 0,12  $\mu\text{m}$ .

**A.2 Điều kiện vận hành**

Khí mang heli (4.11): 25 kPa (0,25 bar)

Hydro (4.12): 50 kPa (0,5 bar)

Không khí (4.13): 100 kPa (1,0 bar)

**A.3 Điều kiện sắc ký**

Detector: 300 °C.

**A.4 Chương trình nhiệt độ - thời gian**

Nhiệt độ ban đầu: 100 °C

Thời gian giữ: 1 min

Tốc độ tăng: 25 °C/min

Nhiệt độ cuối cùng: 290 °C

Thời gian giữ: 5 min

Nhiệt độ nguội: 100 °C

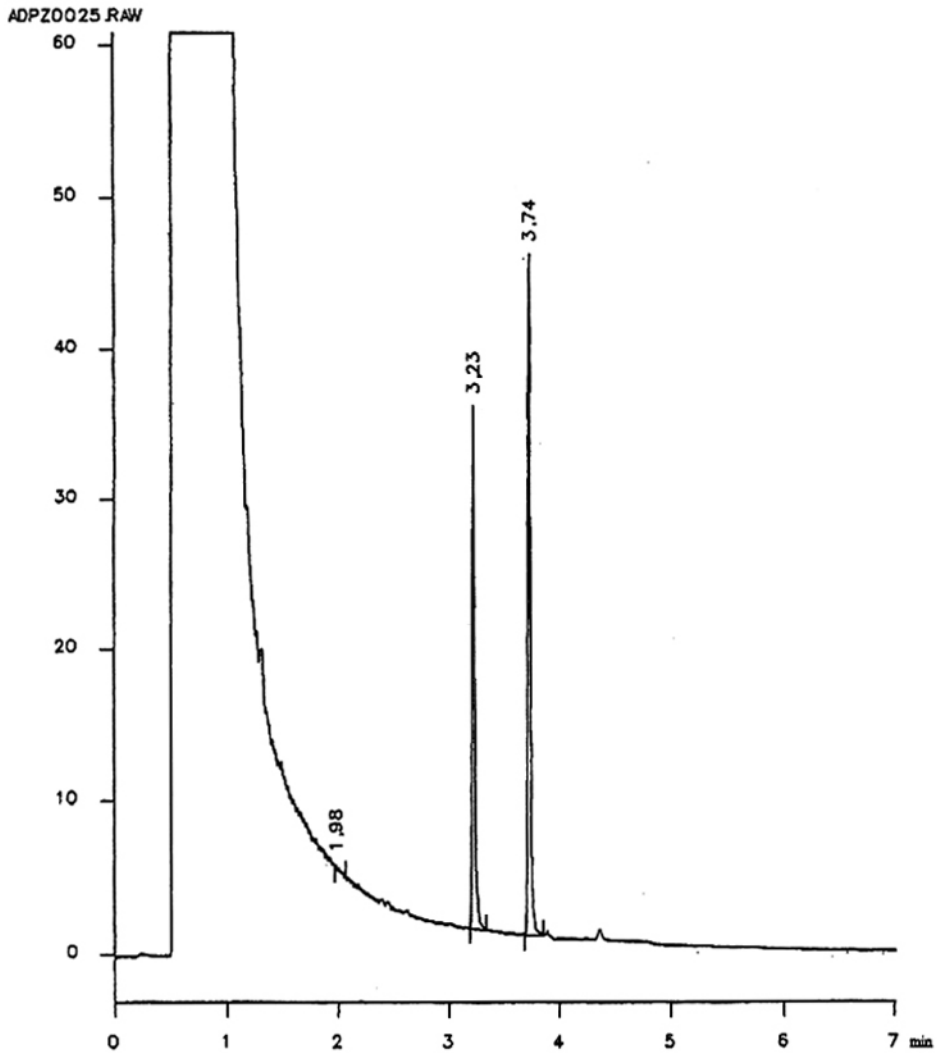
**CHÚ THÍCH** Các điều kiện trên được sử dụng đã thành công đối với phép phân tích. Cột có yêu cầu kỹ thuật khác, sử dụng cùng một pha lỏng cũng hòa tan được các axit đã silat hóa, nhưng tốt nhất nên với các điều kiện được cải tiến từ các điều kiện trên.

**Phụ lục B**

(Tham khảo)

**Sắc ký đồ điển hình**

Hình B.1 đưa ra sắc ký đồ điển hình của mẫu tinh bột ngô liên kết ngang adipyl đã axetyl hóa. Thời gian lưu của dẫn xuất axit adipic là 3,2 min và của axit pimelic là 3,7 min.



Hình B.1 – Sắc ký đồ điển hình của mẫu tinh bột ngô liên kết ngang adipyl đã axetyl hóa

**Phụ lục C**  
(Tham khảo)

**Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm**

Một phép thử cộng tác gồm 9 phòng thử nghiệm được tiến hành trên 5 mẫu khác nhau của di-stacrch apidat đã axetyl hóa với tinh bột ngô là vật liệu nền.

Các kết quả thu được đã được phân tích thống kê theo ISO 5725 [1] cho dữ liệu về độ chụm nêu trong Bảng C.1 và C.2.

**Bảng C.1 – Các kết quả thống kê đối với hàm lượng axit adipic tổng số**

Thông số	Mẫu <sup>1)</sup>				
	1	2	3	4	5
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	9	9	9	8	8
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0	0	1	1
Số lượng các kết quả được chấp nhận	18	18	18	16	16
Hàm lượng axit adipic tổng số trung bình, mg/kg	430	386	659	90	405
Độ lệch chuẩn lặp lại, ( $s_r$ ), mg/kg	22	21	36	5	7
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	5,1	5,3	5,5	5,4	1,7
Giới hạn lặp lại, $r [r=2,8 \times s_r]$ , mg/kg	61	58	102	14	19
Độ lệch chuẩn tái lập, ( $s_R$ ), mg/kg	50	32	62	12	40
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	11,7	8,4	9,4	13,0	10,0
Giới hạn tái lập ( $R$ ) [ $R=2,8 \times s_R$ ], mg/kg	142	91	175	33	114
1) Tất cả các mẫu di-stacrch apidat đã axetyl hóa với tinh bột ngô là vật liệu nền.					
CHÚ THÍCH Tài liệu tham khảo [2] cho thấy, trong các trường hợp nhất định, sử dụng phương pháp này có thể thu được độ chụm tốt hơn.					

Bảng C.2 – Các kết quả thống kê đối với hàm lượng axit adipic tự do

Thông số	Mẫu <sup>1)</sup>				
	1	2	3	4	5
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	9	9	9	9	8
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0	0	0	1
Số lượng các kết quả được chấp nhận	18	18	18	18	16
Hàm lượng axit adipic tổng số trung bình, mg/kg	33	110	17,8	14,6	100
Độ lệch chuẩn lặp lại, ( $s_r$ ), mg/kg	3,4	6,1	2,0	2,3	2,5
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	10,3	5,5	11,3	16,1	2,5
Giới hạn lặp lại, ( $r$ ) [ $r=2,8 \times s_r$ ], mg/kg	9,6	17,1	5,7	6,6	7,0
Độ lệch chuẩn tái lập, ( $s_R$ ), mg/kg	11,4	29,3	6,0	6,0	31,2
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	35,0	26,7	33,7	41,0	31,2
Giới hạn tái lập ( $R$ ) [ $R=2,8 \times s_R$ ], mg/kg	32,4	82,8	17,0	17,0	88,3
1) Tất cả các mẫu di-starch apidat đã axetyl hóa với tinh bột ngô là nguyên liệu chính.					

**Thư mục tài liệu tham khảo**

[1] ISO 5725:1986, *Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests* (đến nay đã hủy) được sử dụng để thu lấy dữ liệu về độ chụm.

[2] Sander, P. and Brunt, K., Improved method for the determination of the total adipyl content in acetylated and cross-linked starches, *Starch/Starke*, 46 (1994) No. 7m pp. 255-259.

[3] Sander, P. and Brunt, K., Gas chromatographic determination of free adipic acid and adipyl cross-linked starches, *Starch/Starke*, 48 (1996) No. 11/12, pp. 448-452.

