

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 9929:2013
ISO 11213:1995**

Xuất bản lần 1

**TINH BỘT BIẾN TÍNH –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AXETYL –
PHƯƠNG PHÁP ENZYM**

Modified starch – Determination of acetyl content – Enzymatic method

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9929:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 11213:1995;

TCVN 9929:2013 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 axetyl - Phương pháp enzym

Modified starch – Determination of acetyl content – Enzymatic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp enzym để xác định hàm lượng axetyl trong tinh bột biến tính, ở dạng hạt và dạng tan trong nước lạnh. Từ việc xác định hàm lượng axetyl tự do và tổng số, tính được hàm lượng axetyl liên kết.

Phương pháp này thích hợp để xác định hàm lượng axetyl đến 2 % (khối lượng).

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 1666:1973 ¹⁾, *Starch – Determination of moisture content – Oven-drying methods (Tinh bột – Xác định độ ẩm – Phương pháp dùng tủ sấy)*

3 Nguyên tắc

Hàm lượng axetyl tổng số được xác định bằng cách đun mẫu với axit clohydric loãng để thủy phân phần axetyl và hòa tan tinh bột. Với sự có mặt của enzym axetyl-CoA synthetase (ACS), cùng với

¹⁾ Tiêu chuẩn này đã hủy và được thay thế bằng ISO 1666:1990 và đã được chấp nhận thành TCVN 9934:2013

TCVN 9929:2013

adenosine-5-triphosphat (ATP) và coenzym A (CoA), axetat được chuyển hóa thành axetyl-Co-A. Axetyl-Co-A phản ứng với oxaloaxetat tạo thành xitrat với sự có mặt của xitrat synthase (CS).

Oxaloaxetat cần cho phản ứng được tạo thành từ malat và nicotinamid adenin dinucleotit (NAD) với sự có mặt của malat-dehydrogenase (MDH). Trong phản ứng này, NAD được khử về NADH và việc hình thành NADH có thể được xác định bằng cách đo sự tăng của độ hấp thụ ở bước sóng cụ thể. (Xem tài liệu tham khảo [1]).

Hàm lượng axetyl tự do, được xác định bằng cách tạo huyền phù tinh bột biến tính trong nước, lọc rồi xác định hàm lượng axetyl trong dịch lọc như trên. Hàm lượng axetyl liên kết được tính bằng cách lấy hàm lượng axetyl tổng số trừ đi hàm lượng axetyl tự do.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

Các thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, trừ khi có các qui định khác. Nước sử dụng phải là nước loại 2 của TCVN 4851 (ISO 3696). Các enzym được sử dụng phải có chất lượng tương đương với các enzym có liên quan, ví dụ của hãng Boehringer Mannheim¹⁾.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng các bộ kit thử thích hợp có bán sẵn.

4.1 Dung dịch axit clohydric, 1 mol/l.

4.2 Dung dịch natri hydroxit, 5 mol/l.

4.3 Dung dịch đệm

Hòa tan các thuốc thử dưới đây trong khoảng 70 ml nước :

7,5 g trietanolamin;

420 mg axit L-malic;

210 mg magie clorua ngậm sáu phân tử nước ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$).

Chỉnh pH đến 8,4 bằng cách thêm dung dịch kali hydroxit 5 mol/l, cần khoảng 8 ml.

Các dung dịch này khi được bảo quản ở + 4 °C có thể bền được 1 năm.

4.4 Dung dịch ATP-CoA-NAD

Hòa tan các thuốc thử như sau trong 20 ml nước:

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng và tiêu chuẩn không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

500 mg muối dinatri ngậm ba phân tử nước dạng tinh thể của adenosine-5'-triphosphat [ATP- $\text{Na}_2\text{H}_2.3\text{H}_2\text{O}$; 98 % (khối lượng)];

500 mg natri hydro cacbonat khan;

50 mg muối trilitium của coenzym A ở dạng đông khô [khoảng 85 % (khối lượng) CoA];

250 mg nicotinamid adenin dinucleotid ngậm một phân tử nước không chứa axit dạng đông khô [$\beta\text{-NAD.H}_2\text{O}$ > 98 % (khối lượng)].

Dung dịch này khi được bảo quản ở + 4 °C có thể bền được 1 tuần.

4.5 Huyền phù MDH-CS

Chuyển khoảng 1 100 U (đơn vị quốc tế) malat-dehydrogenase (MDH từ tim lợn; EC 1.1.1.37) và khoảng 270 U xitrat synthase (CS từ tim lợn; EC 4.1.37) vào 0,4 ml dung dịch amoni sulfat, $c[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 3,2 \text{ mol/l}$.

Dung dịch này khi được bảo quản ở + 4 °C có thể bền được 1 năm.

CHÚ THÍCH 2 Một đơn vị quốc tế (1 U) gây xúc tác 1 $\mu\text{mol/min}$ ở 25 °C từ cơ chất có liên quan.

4.6 Dung dịch ACS.

Hoà tan 20 mg chất đông khô chứa 5 mg axetyl-coenzym A synthetase (ACS từ nấm men; EC 6.2.1.1 $\approx 16 \text{ U}$) trong 0,4 ml nước.

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

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 Bình nón, dung tích 250 ml, có nắp vặn.

5.2 Nồi cách thủy đun sôi, được trang bị máy lắc.

5.3 Bình định mức, dung tích 200 ml.

5.4 Micropipet hoặc xyranh.

5.5 Máy đo phổ hấp thụ phân tử, thích hợp để vận hành ở bước sóng 340 nm.

5.6 Cuvet, bằng thạch anh hoặc bằng các vật liệu khác, truyền qua ở bước sóng 340 nm, dày 10 mm $\pm 0,1 \text{ mm}$.

TCVN 9929:2013

5.7 Rây, cỡ lỗ 800 µm.

5.8 Máy nghiền có lưới dao.

5.9 Nồi cách thủy, có thể kiểm soát nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C.

6 Chuẩn bị mẫu

Rây mẫu qua rây cỡ lỗ 800 µm (5.7). Nếu mẫu không lọt qua rây thì nghiền mẫu bằng máy nghiền có lưới dao (5.8) sao cho mẫu lọt hết qua rây cỡ lỗ 800 µm. Đồng hóa mẫu.

7 Cách tiến hành

7.1 Thủy phân các nhóm axetyl

7.1.1 Phân tán tinh bột dạng hạt

Cân khoảng 1 g mẫu đã chuẩn bị, chính xác đến 1 mg, rồi cho vào bình nón (5.1).

Thêm 50 ml axit clohydric (4.1) trong khi khuấy để đảm bảo phân tán tốt. Tiếp tục như qui định trong 7.1.3.

7.1.2 Phân tán tinh bột đã hồ hóa sơ bộ

Cho 50 ml axit clohydric (4.1) vào bình nón (5.1). Đặt lên máy khuấy từ và bắt đầu khuấy. Thêm từ từ và cẩn thận khoảng 1 g mẫu đã chuẩn bị. Đảm bảo phân tán tốt và không bị vón cục. Xác định khối lượng phần mẫu thử bằng cách cân, chênh lệch giữa các lần cân, lấy chính xác đến 1 mg.

7.1.3 Thủy phân và lọc

Đậy kín bình nón bằng nắp vặn và đặt vào nồi cách thủy đang sôi (5.2) có máy lắc và lắc trong 30 min.

Lấy bình ra và để nguội đến khoảng 20 °C ± 5 °C bằng cách ngâm trong bể đá lạnh. Mở bình khi lượng chứa trong bình nguội hẳn, thêm 10 ml dung dịch natri hydroxit (4.2), trộn đều rồi chuyển định lượng sang bình định mức 200 ml (5.3). Đặt bình định mức vào trong nồi cách thủy (5.9) để cân bằng nhiệt độ đến khoảng từ 20 °C đến 25 °C. Kiểm tra nhiệt độ và thêm nước cất đến vạch. Lọc qua giấy lọc thích hợp. Loại bỏ 20 ml đến 30 ml dịch lọc đầu tiên và sử dụng trực tiếp dung dịch còn lại làm dung dịch thử trong phép xác định enzym như qui định trong 7.4.

7.2 Axetat tự do

7.2.1 Phân tán tinh bột dạng hạt

Phân tán 10 g mẫu đã chuẩn bị vào 100 ml nước cất đựng trong bình nón (5.1) trong khi vẫn khuấy liên tục.

Tiếp tục như qui định trong 7.2.3.

7.2.2 Phân tán tinh bột đã hồ hóa sơ bộ

Cho khoảng 100 ml nước cất vào bình nón (5.1). Cho máy khuấy từ vào và bắt đầu khuấy. Thêm từ từ và cẩn thận khoảng 2 g mẫu đã chuẩn bị. Đảm bảo mẫu phân tán tốt và không bị vón cục. Xác định khối lượng phần mẫu thử bằng cách cân, lấy chênh lệch giữa các lần cân chính xác đến 1 mg.

7.2.3 Hòa tan và lọc

Đậy kín bình nón và khuấy trong 30 min.

Chuyển định lượng lượng chứa trong bình nón vào bình định mức 200 ml (5.3). Đặt bình định mức vào nồi cách thủy (5.9) để nhiệt độ cân bằng đến khoảng từ 20 °C đến 25 °C. Kiểm tra nhiệt độ và thêm nước cất đến vạch. Lọc qua giấy lọc thích hợp. Loại bỏ 20 ml đến 30 ml dịch lọc đầu tiên và sử dụng trực tiếp dung dịch còn lại làm dung dịch thử trong phép xác định bằng enzym, như qui định trong 7.4.

7.3 Phép thử kiểm tra

Để kiểm tra phương pháp, có thể thực hiện phân tích trên chất chuẩn như natri axetat khan, tinh khiết [hàm lượng axetyl = 52,4 % (khối lượng)]. Để thực hiện, cân khoảng 100 mg natri axetat, chính xác đến 0,1 mg. Sau đó chuyển vào bình định mức 1 000 ml. Đặt bình định mức vào nồi cách thủy (5.9) để nhiệt độ cân bằng đến khoảng từ 20 °C đến 25 °C. Kiểm soát nhiệt độ và thêm nước cất đến vạch. Tiếp tục như qui định trong 7.4.

7.4 Xác định axit axetic bằng phương pháp enzym

Tiến hành xác định axit axetic bằng phương pháp enzym theo cách bố trí và các điều kiện sau đây:

- bước sóng: 340 nm;
- nhiệt độ: 20 °C đến 25 °C

Đọc độ hấp thụ so với cuvet (5.6) chứa đầy nước.

CHÚ THÍCH 3 Có thể thực hiện các phép đo ở các bước sóng sau đây với các hệ số hấp thụ phân tử (ϵ) tương ứng được sử dụng trong phép tính:

- Hg, 365 nm: $\epsilon = 3,4 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$;
- Hg, 334 nm: $\epsilon = 6,18 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$;

Dùng pipet lấy các thể tích thuốc thử được nêu trong dải phân tích trong Bảng 1 cho vào cuvet (5.6).

Bảng 1 – Bố trí phân tích đối với phép xác định axit axetic bằng enzym

Thuốc thử và phản ứng	Mẫu trắng	Dung dịch mẫu
Dung dịch đệm (4.3)	1,00 ml	1,00 ml
Dung dịch ATP-CoA-NAD (4.4)	0,20 ml	0,20 ml
Nước cất hai lần	2,00 ml	1,50 ml
Dung dịch thử	-	0,50 ml
Trộn lượng chứa trong mỗi cuvet và đọc độ hấp thụ (A_0). Thêm vào mỗi cuvet như sau:		
Huyền phù MDH-CS (4.5)	0,01 ml	0,01 ml
Trộn lượng chứa trong mỗi cuvet và đọc độ hấp thụ (A_1) sau khoảng 3 min.		
Bắt đầu phản ứng bằng cách thêm vào mỗi cuvet như sau:		
Dung dịch ACS (4.6)	0,02 ml	0,02 ml
Trộn lượng chứa trong mỗi cuvet, chờ cho đến khi phản ứng dừng (khoảng 10 min đến 15 min) rồi đọc độ hấp thụ (A_2). Nếu phản ứng không dừng sau khoảng 15 min thì tiếp tục đọc độ hấp thụ ở các khoảng 2 min cho đến khi độ hấp thụ tăng ổn định trong 2 min.		
CHÚ THÍCH: Thể tích của dung dịch chứa mẫu có thể thay đổi để phù hợp với các mức axetat rất cao hoặc rất thấp; tổng thể tích cuối cùng phải luôn là 3,23 ml.		

8 Biểu thị kết quả

8.1 Chênh lệch độ hấp thụ

Tính chênh lệch độ hấp thụ, dùng công thức sau đây:

$$\Delta A = \left[(A_2 - A_0)_s - \frac{(A_1 - A_0)_s^2}{(A_2 - A_0)_s} \right] - \left[(A_2 - A_0)_b - \frac{(A_1 - A_0)_b^2}{(A_2 - A_0)_b} \right]$$

Trong đó:

ΔA là chênh lệch độ hấp thụ;

A_0 , A_1 và A_2 là các độ hấp thụ đo được theo bố trí phân tích nêu trong Bảng 1;

s là ký hiệu về dung dịch có mẫu;

b là ký hiệu về mẫu trắng.

8.2 Hàm lượng axetyl tổng số

Tính hàm lượng axetyl tổng số, sử dụng công thức sau đây:

$$w_a = \frac{5,56 \times \Delta A}{\kappa \times m_1} \times \frac{100}{100 - w_m}$$

Trong đó:

- w_a là hàm lượng axetyl tổng số của mẫu thử, tính bằng phần trăm khối lượng (%);
- ΔA là chênh lệch độ hấp thụ được tính theo 8.1;
- κ là hệ số hấp thụ phân tử của NADH ở 340 nm ($\kappa = 6,30 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), tính bằng lit trên milimol xentimet;
- m_1 là khối lượng phần mẫu thử, (xem 7.1.1 hoặc 7.1.2), tính bằng gam (g);
- w_m là độ ẩm của mẫu, tính bằng phần trăm khối lượng (%) (xác định được theo ISO 1666).

Nếu lấy phần thể tích dung dịch mẫu khác với 0,50 ml trong Bảng 1 thì công thức có thể được chỉnh tương ứng. Khi phép thử kiểm tra (7.3) bị ảnh hưởng thì phải tính đến hệ số pha loãng là 5 vì dung dịch thử là 1 000 ml thay vì 200 ml như trong quy trình đối với mẫu thử (xem 7.1 và 7.2).

CHÚ THÍCH 4 Giải thích đầy đủ về sai lệch trong công thức ở Phụ lục A.

8.3 Hàm lượng axetyl tự do

Tính hàm lượng axetyl tự do, sử dụng công thức sau đây:

$$w_f = \frac{5,56 \times \Delta A}{\kappa \times m_2} \times \frac{100}{100 - w_m}$$

Trong đó:

- w_f là hàm lượng axetyl tự do của mẫu thử, tính bằng phần trăm khối lượng;
- ΔA , κ và w_m có cùng ý nghĩa như trong 8.2;
- m_2 là khối lượng phần mẫu thử (xem 7.2.1 hoặc 7.2.2), tính bằng gam (g);

8.4 Hàm lượng axetyl liên kết

Tính hàm lượng axetyl liên kết, dùng công thức sau đây:

$$w_{ba} = w_a - w_f$$

TCVN 9929:2013

Trong đó:

- w_{ba} là hàm lượng axetyl liên kết của mẫu thử, tính bằng phần trăm khối lượng ((%);
- w_a là hàm lượng axetyl tổng số của mẫu thử, tính bằng phần trăm khối lượng (%);
- w_f là hàm lượng axetyl tự do của mẫu thử, tính bằng phần trăm khối lượng (%).

9 Độ chụm

Độ chụm của phương pháp được thiết lập bởi phép thử liên phòng thử nghiệm do nhóm công tác ISO/TC 93/WG, Công thức hóa học, tổ chức vào năm 1990 và được tiến hành phù hợp với ISO 5725 (Tài liệu tham khảo [2]). Trong phép thử này có 11 phòng thử nghiệm đã tham gia: các mẫu tinh bột ngô biến tính, tinh bột khoai tây biến tính và tinh bột mì biến tính đã được kiểm tra đánh giá. Xem Phụ lục B về các kết quả thống kê của phép thử này. Độ lặp lại và độ tái lập thu được ở mức xác suất 95 %.

9.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập 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 lớn hơn 5 % của kết quả cao hơn trong số hai kết quả.

9.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập 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 lớn hơn 8 % của kết quả cao hơn trong số hai kết quả.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng;
- 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.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Nguồn gốc công thức tính hàm lượng axetyl

Nồng độ axetyl tổng số trong dung dịch thử tính được theo công thức sau đây:

$$\rho_{at} = \frac{M_r \times V_2 \times \Delta A}{1000 \times V_1 \times d \times \kappa}$$

Trong đó:

- ρ_{at} là nồng độ axetyl tổng số trong dung dịch thử, tính bằng gam trên lít (g/l);
- M_r là khối lượng phân tử tương đối của axetyl ($M_r = 43$);
- V_1 là thể tích dung dịch thử ($V_1 = 0,50$ ml), tính bằng mililit (ml);
- V_2 là thể tích cuối cùng của dung dịch chứa mẫu ($V_2 = 3,23$ ml), tính bằng mililit (ml);
- ΔA là chênh lệch độ hấp thụ được tính theo 8.1;
- d là bề dày của cuvet ($d = 1$ cm), tính bằng xentimet ;
- κ là hệ số hấp thụ phân tử của NADH ở 340 nm ($\kappa = 6,30 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), tính bằng lit trên milimol xentimet;

Hàm lượng axetyl của mẫu thử ẩm tính được theo công thức sau đây:

$$w_{ah} = \frac{\rho_{at} \times V_3}{10 \times m_1}$$

Trong đó

- w_{ah} là hàm lượng axetyl tổng số của mẫu thử ẩm, tính bằng phần trăm khối lượng (%);
- ρ_{at} là nồng độ axetyl tổng số trong dung dịch thử, tính bằng gam trên lít (g/l);
- V_3 là thể tích dung dịch thử trước khi lọc ($V_3 = 200$ ml), tính bằng mililit (ml).
- m_1 là khối lượng phần mẫu thử (xem 7.1.1 hoặc 7.1.2), tính bằng gam (g).

Vi vậy:

$$\begin{aligned}
 w_{ah} &= \frac{M_r \times V_2 \times \Delta A}{1000 \times V_1 \times d \times \kappa} \times \frac{V_3}{10 \times m_1} \\
 &= \frac{43 \times 3,23 \times 200 \times \Delta A}{1000 \times 0,50 \times 1 \times 10 \times \kappa \times m_1} \\
 &= \frac{5,56 \times \Delta A}{\kappa \times m_1}
 \end{aligned}$$

Hàm lượng axetyl tổng số của mẫu thử tính theo hàm lượng chất khô, được tính bằng công thức sau:

$$w_a = w_{oh} \frac{100}{100 - w_m} = \frac{5,56 \times \Delta A}{\kappa \times m_1} \times \frac{100}{100 - w_m}$$

Trong đó w_m là độ ẩm của mẫu, tính bằng phần trăm khối lượng (%).

Phụ lục B
(Tham khảo)

Các kết quả thống kê của phép thử liên phòng thử nghiệm

Thông số	Mẫu ¹⁾				
	WL	ML	MH	PL	PH
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	10	10	10	11	11
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	1	1	0	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	20	20	20	22	22
Hàm lượng axetyl trung bình [% (khối lượng)]	1,00	0,70	1,19	0,61	1,92
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r [% (khối lượng)]	0,006	0,013	0,013	0,007	0,050
Hệ số biến thiên lặp lại, VC, %	0,6	1,9	1,08	1,20	2,61
Giới hạn lặp lại, $r = 2,8 \times s_r$ [% (khối lượng)]	0,017	0,037	0,036	0,021	0,142
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R [% (khối lượng)]	0,009	0,015	0,020	0,024	0,088
Hệ số biến thiên tái lập, VC _R , %	0,95	2,16	1,69	3,97	4,60
Giới hạn tái lập, $R = 2,8 \times s_R$ [% (khối lượng)]	0,027	0,042	0,057	0,069	0,250
¹⁾ H hàm lượng cao L hàm lượng thấp M tinh bột ngô biến tính P tinh bột khoai tây biến tính W tinh bột lúa mì biến tính					

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] BERGMEYER, H.U. (1974) in Methoden der enzymatischen analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg) 3. Aufl. Bd.1,9. pp. 119-125; *Verlag Chemie*, Weinheim, and (1974) in method of enzymatic analysis (Bergmeyer, H.U.ed.) 2nd ed. Vol. 1, pp. 112-117, *Verlag chemie*, Weinheim, Academic Press Inc., New York and London.
- [2] ISO 5725:1986. *Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.* (Tiêu chuẩn này hiện nay đã hủy).
-