

TCVN 9682-2:2013
ISO 7543-2:1993

Xuất bản lần 1

ỚT CHILLI VÀ NHỰA DẦU ỚT CHILLI –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CAPSAICINOID TỔNG SỐ –
PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Chillies and chilli oleoresins – Determination of total capsaicinoid content -

Part 2: Method using high-performance liquid chromatography

Lời nói đầu

TCVN 9682-2:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 7543-2:1993;

TCVN 9682-2:2013 do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F4 Gia vị và phụ gia thực phẩm biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo Lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 9682 (ISO 7543), *Ớt chilli và nhựa dầu ớt chilli - Xác định hàm lượng capsaicinoid tổng số*, gồm các phần sau đây:

- TCVN 9682-1:2013 (ISO 7543-1:1994), *Phần 1: Phương pháp đo phổ*;
- TCVN 9682-2:2013 (ISO 7543-2:1993), *Phần 2: Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao*.

**Ớt chilli và nhựa dầu ớt chilli –
Xác định hàm lượng capsaicinoid tổng số –
Phần 2: Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao**

*Chillies and chilli oleoresins – Determination of total capsaicinoid content –
Part 2: Method using high-performance liquid chromatography*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng capsaicinoid tổng số trong ớt chilli nguyên quả hoặc dạng bột (thường là *Capsicum frutescens* L.) và chất chiết của chúng (nhựa dầu) bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao. Hàm lượng này được tính từ tổng của capsaicin, nordihydrocapsaicin và dihydrocapsaicin và được biểu thị theo nonyl axit vanilylamid được chọn làm chất chuẩn.

Phương pháp này có thể tách được capsaicin và nonyl axit vanilylamid.

CHÚ THÍCH 1: Phương pháp đo phổ được quy định trong TCVN 9682-1 (ISO 7543-1)¹⁾.

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 8960:2011 (ISO 2825:1981), *Gia vị – Chuẩn bị mẫu nghiền để phân tích*.

3 Nguyên tắc

3.1 Ớt chilli dạng bột

Mẫu được chiết bằng tetrahydrofuran, dùng thiết bị chiết liên tục kiểu Soxhlet, rồi xác định capsaicinoid

¹⁾ TCVN 9682-1:2013 (ISO 7543-1:1993), *Ớt chilli và nhựa dầu ớt chilli – Xác định hàm lượng capsaicinoid tổng số – Phần 1: Phương pháp đo phổ*.

bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC), theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

3.2 Ớt chilli nguyên quả

Chuẩn bị mẫu bằng cách nghiền nhỏ, sau đó chiết bột thu được, rồi xác định capsaicinoid bằng HPLC theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

3.3 Nhựa dầu ớt chilli

Pha loãng nhựa dầu ớt chilli bằng dung dịch tetrahydrofuran/metanol, rồi xác định capsaicinod bằng HPLC, theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng phân tích và nước cất, nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

4.1 Chất chuẩn

Nonyl axít vanillylamid (capsaicin tổng hợp) có độ tinh khiết ít nhất 95 %, được xác định bằng sắc kí theo các điều kiện thử nghiệm nêu trong tiêu chuẩn này.

CẢNH BÁO – Sản phẩm này gây kích ứng da mạnh, phải cẩn thận khi sử dụng.

4.2 Dung môi

4.2.1 Tetrahydrofuran

4.2.2 Metanol

4.2.3 Bạc nitrat, dung dịch nước 0,1 mol/l.

CẢNH BÁO – Sản phẩm này sẽ gây ra các vết đen khi tiếp xúc với da, phải cẩn thận khi sử dụng.

4.2.4 Dung dịch tetrahydrofuran/metanol, 50/50 (thể tích).

4.3 Dung môi rửa giải

Trộn 70 thể tích metanol (4.2.2) và 30 thể tích bạc nitrat (4.2.3).

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Pipet, dung tích 5 ml.

5.2 Bình định mức, dung tích 25 ml và 100 ml.

5.3 Màng lọc, bằng xenluloza axetat, đường kính 25 mm và cỡ lỗ 0,45 μm .

5.4 Hệ thống tách

5.4.1 Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao.

5.4.2 Hệ thống bơm, có thể tạo và duy trì tốc độ dòng không đổi hoặc được cài đặt chương trình ở áp lực cao.

5.4.3 Hệ thống khử khí, dùng cho dung môi.

5.4.4 Hệ thống detector thích hợp, có thể chỉnh đến bước sóng 280 nm.

5.5 Máy ghi hoặc máy tích phân, hoạt động tương thích với toàn bộ các thiết bị.

5.6 Cột

Vật liệu: thép không gỉ

Chiều dài: từ 10 cm đến 25 cm

Đường kính trong: từ 0,4 cm đến 0,5 cm

Pha tĩnh: cột nhồi silica với nhóm chức octadecyl, C_{18} , và cỡ hạt tối đa 5 μm .

5.7 Hệ thống bơm

Van bơm có vòng bơm 10 μl hoặc hệ thống bơm khác có độ chính xác tương đương.

5.8 Thiết bị chiết liên tục, kiểu Soxhlet.

5.9 Sàng thử nghiệm, cỡ lỗ 500 μm .

6 Phương pháp hiệu chuẩn

6.1 Dung dịch chuẩn

Chuẩn bị dung dịch gốc nonyl axit vanilylamid (4.1) 1 g/l trong dung dịch tetrahydrofuran/metanol (4.2.4).

6.2 Đường chuẩn

Từ dung dịch chuẩn (6.1), chuẩn bị ít nhất ba dung dịch chuẩn làm việc nonyl axit vanilylamid có nồng độ từ 0,05 g/l đến 0,2 g/l. Bơm từng dung dịch vào máy sắc kí (5.4.1). Lặp lại phép xác định ít nhất một lần. Đo diện tích pic và lặp lại phép thử nếu các kết quả chênh lệch quá 5 %.

Dùng đường chuẩn khối lượng nonyl axit vanilylamid đã bơm theo diện tích pic.

Xác định độ dốc trung bình của đường chuẩn.

6.3 Tính hệ số đáp ứng, K

Tính hệ số đáp ứng K , dùng công thức sau đây:

$$K = m'/A$$

$$m' = m \times P_r$$

Trong đó

m là khối lượng của nonyl axit vanilylamid, tính bằng miligam (mg);

A là diện tích pic của nonyl axit vanilylamid;

P_r là độ tinh khiết của nonyl axit vanilylamid (4.1);

m' là khối lượng đã được hiệu chỉnh của nonyl axit vanilylamid, tính bằng miligam (mg).

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4889 (ISO 948)²⁾.

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Ớt chilli dạng bột

8.1.1 Kiểm tra để chắc chắn rằng toàn bộ mẫu thử lọt qua sàng cỡ lỗ 500 μm (5.9). Nếu không đạt yêu cầu thì nghiền bột ớt theo TCVN 8960 (ISO 2825) cho đến khi thu được cỡ hạt yêu cầu.

8.1.2 Từ mẫu thử đã được chuẩn bị trong 8.1.1, cân từ 10 g đến 15 g, chính xác đến 0,1 g. Chiết 8 h trong thiết bị chiết liên tục (5.8), dùng 100 ml tetrahydrofuran (4.2.1).

Cô đặc một phần dung môi.

Chuyển định lượng dịch chiết này vào bình định mức một vạch 100 ml (5.2). Thêm dung dịch tetrahydrofuran/metanol (4.2.4) đến vạch.

²⁾ TCVN 4889:1989 (ISO 948:1980), *Gia vị – Lấy mẫu*.

8.2 Ớt chilli nguyên quả

8.2.1 Nghiền mẫu thử theo TCVN 8960 (ISO 2825) cho đến khi bột thu được lọt hết qua sàng cỡ lỗ 500 μm (5.9).

8.2.2 Dùng mẫu thử đã được chuẩn bị trong 8.2.1, tiến hành theo quy định trong 8.1.2.

8.3 Nhựa dầu ớt chilli

Đồng hóa kỹ mẫu thử của nhựa dầu ớt.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử

9.1.1 Ớt chilli nguyên quả hoặc dạng bột

Dùng pipet (5.1) lấy 5 ml dịch chiết đã được chuẩn bị trong 8.1.2 hoặc 8.2.2 và chuyển vào bình định mức một vạch 25 ml (5.2). Thêm dung dịch tetrahydrofuran/metanol (4.2.4) đến vạch.

CHÚ THÍCH 2: Có thể thay đổi bước pha loãng này, nếu cần, tùy thuộc vào lượng capsaicinoid tổng số dự kiến của mẫu và độ nhạy của detector.

9.1.2 Nhựa dầu ớt chilli

Cân 1 g nhựa dầu ớt (xem 8.3), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức một vạch 100 ml và làm đầy đến vạch bằng dung dịch tetrahydrofuran/metanol (4.2.4).

Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch này cho vào bình định mức một vạch 25 ml và thêm dung môi rửa giải (4.3) đến vạch.

CHÚ THÍCH 3: Có thể thay đổi bước pha loãng này, nếu cần, tùy thuộc vào lượng capsaicinoid tổng số dự kiến của mẫu và độ nhạy của detector.

9.2 Xác định

Dung dịch thử phải trong, nếu không, lọc dung dịch qua màng lọc (5.3). Bơm dung dịch thử vào máy sắc kí (5.4.1).

Trên sắc đồ thu được, đo diện tích pic của capsaicin (C_1), nordihydrocapsaicin (C_2) và dihydrocapsaicin (C_3) (xem sắc đồ điển hình trong Phụ lục A).

Tiến hành hai phép thử và lặp lại việc xác định, nếu các kết quả chênh lệch quá 5 %.

10 Tính kết quả

Tính hàm lượng capsaicinoid tổng số, w_T , bằng phần trăm khối lượng, theo công thức sau:

$$w_T = \frac{(A_{C1} + A_{C2} + A_{C3})K}{m_x} \times 500 \times 100$$

Trong đó

A_{C1} là diện tích pic của capsaicin;

A_{C2} là diện tích pic của nordihydrocapsaicin;

A_{C3} là diện tích pic của dihydrocapsaicin;

m_x là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng miligam (mg);

K là hệ số đáp ứng xác định được đối với chất chuẩn.

CHÚ THÍCH 4: Hệ số pha loãng 500 trong công thức này có thể được điều chỉnh tùy thuộc vào hàm lượng capsaicinoid của mẫu cần thử nghiệm.

11 Độ lặp lại

Lấy kết quả hệ số đáp ứng K và hàm lượng hợp chất cần xác định là giá trị trung bình của vài lần xác định (ít nhất ba lần) được tiến hành trên cùng một mẫu thử. Chênh lệch của các giá trị này không được vượt quá 5 % giá trị trung bình.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

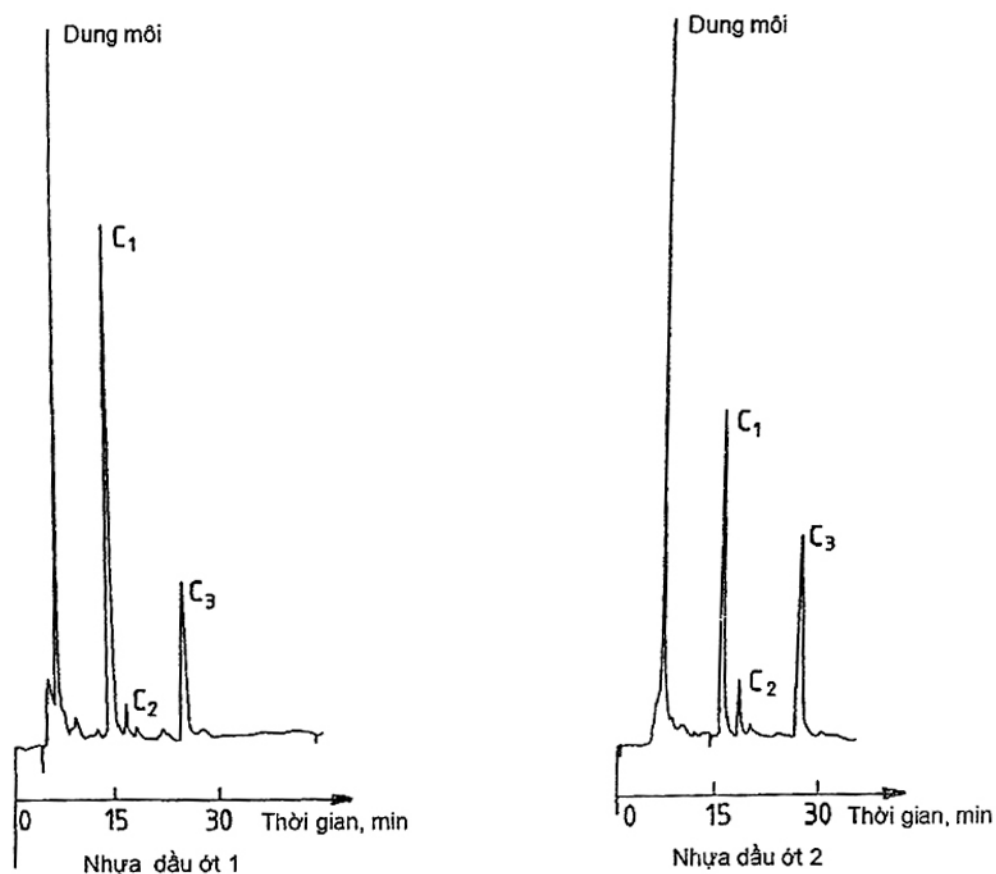
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- hệ thống thiết bị;
- đặc tính của cột (vật liệu, kích thước, bao gói, pha tĩnh...);
- đặc tính của detector (tùy chọn) và các điều kiện vận hành;
- đặc tính của pha động (tốc độ dòng, bản chất);
- nhận biết mẫu thử (lượng bơm và độ pha loãng cuối cùng);
- kết quả thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Sắc đồ điện hình

Hình A.1 đưa ra hai ví dụ về sắc đồ điện hình, được thực hiện theo các điều kiện thao tác quy định trong tiêu chuẩn này.



Nhận biết các pic

- C₁ Capsaicin
- C₂ Nordihydrocapsaicin
- C₃ Dihydrocapsaicin

Hình A.1 – Sắc đồ điện hình của nhựa dầu ớt chilli