

TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9662:2013
ISO 18329:2004

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – XÁC ĐỊNH
HÀM LƯỢNG FUROFIN – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ
LỎNG HIỆU NĂNG CAO PHA ĐẢO CẶP ION**

*Milk and milk products – Determination of furosine content – Ion-pair
reverse-phase high-performance liquid chromatography method*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9662:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 18329:2004;

TCVN 9662:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12
Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo Lường
Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa và sản phẩm sữa - Xác định hàm lượng furosine - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo cặp ion

Milk and milk products – Determination of furosine content – Ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng furosine (ϵ -furoylmethyl-lysine) trong sữa và các sản phẩm sữa. Phương pháp này có thể áp dụng cho sữa nguyên liệu hoặc sữa đã xử lý nhiệt và phomat.

2 Tài liệu viện dẫn

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 8099-1 (ISO 8968-1), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 1: Phương pháp Kjeldahl*.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hàm lượng furosine (furosine content)

Phần khối lượng của chất xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng furosine được biểu thị bằng miligam trên 100 g protein.

4 Nguyên tắc

Sản phẩm ổn định đầu tiên tạo ra từ "Phản ứng Maillard" (MR) trong sữa và phomat là ϵ -lactulosyl-lysine, được chuyển đổi từng phần qua việc thủy phân axit thành furosine, việc xác định hàm lượng furosine

này cho phép đánh giá mức độ của phản ứng Maillard ở giai đoạn đầu. Mức độ của phản ứng Maillard có liên quan đến kiểu loại và cường độ xử lý nhiệt đã dùng cho nguyên liệu thô và trong quá trình chế biến. Phép xác định furosine được thực hiện bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao cấp ion pha đảo (IP-RP HPLC) với detector UV ở bước sóng 280 nm. Việc định lượng furosine thu được bằng cách đối chiếu với mẫu chuẩn furosine.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại phân tích và nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

5.1 Axit clohydric (HCl), đậm đặc, 37 % khối lượng.

5.2 Dung dịch axit clohydric I, $c(\text{HCl}) = 10,6 \text{ mol/l}$.

Trộn 8 thể tích axit clohydric (5.1) với 1 thể tích nước để thu được dung dịch axit clohydric I.

5.3 Dung dịch axit clohydric II, $c(\text{HCl}) = 8,0 \text{ mol/l}$.

Trộn 2 thể tích axit clohydric (5.1) với 1 thể tích nước để thu được dung dịch axit clohydric II.

5.4 Dung dịch axit clohydric III, $c(\text{HCl}) = 3,0 \text{ mol/l}$.

Trộn 1 thể tích axit clohydric (5.1) với 3 thể tích nước để thu được dung dịch axit clohydric III.

5.5 Metanol (CH_3OH).

5.6 Dung môi rửa giải dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Chuẩn bị các dung môi rửa giải dùng cho HPLC bằng cách sử dụng thuốc thử dùng cho HPLC.

5.6.1 Nước, loại dùng cho HPLC.

5.6.2 Axit axetic loãng ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$)

Pha 4 ml axit axetic băng với nước đến 1000 ml.

5.6.3 Dung dịch kali clorua, $c(\text{KCl}) = 3 \text{ g/l}$

Hòa tan 3 g kali clorua vào 1000 ml axit axetic loãng (5.6.2).

5.7 Furosine, (ví dụ Neosystem¹⁾ hoặc tương đương).

¹⁾ Furosine được cung cấp bởi Neosystem, Rue de Bologne 7, 67100 Strasbourg, Pháp. Ví dụ này là sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

5.8 Dung dịch chuẩn furosin, $c[\epsilon\text{-N-(2-furoylmethyl)-L-lysine}] = 1 \text{ nmol/ml}$ (xấp xỉ).

Hòa tan 15 mg furosin (5.7) vào 25 ml dung dịch axit clohydric III (5.4) và trộn. Pha 5 ml dung dịch này với dung dịch axit clohydric III (5.4) đến 100 ml. Trộn lại để thu được dung dịch pha loãng 1. Pha 1 ml dung dịch pha loãng 1 với dung dịch axit clohydric III (5.4) đến 100 ml để thu được dung dịch chuẩn furosin nồng độ khoảng 1 nmol/ml furosin.

Tính nồng độ chính xác của furosin trong dung dịch chuẩn furosin cuối cùng căn cứ vào hàm lượng thực được công bố cho sản phẩm thương mại đó.

Khi được bảo quản ở nhiệt độ $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, dung dịch chuẩn furosin này có thể bền trong 24 tháng.

5.9 Nitơ, loại tinh khiết dùng cho sắc ký khí.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Cột C18, hoặc cột mini (500 mg) dùng để chiết pha rắn.

6.2 Thiết bị HPLC, được trang bị hệ thống bơm gradient, bơm không làm từ kim loại với vòng bơm có dung tích từ 20 μl đến 50 μl và lò cột điều nhiệt.

6.3 Detetor UV, có khả năng hoạt động ở bước sóng 280 nm với AUFS (đơn vị hấp thụ trên toàn thang đo) tối thiểu thấp hơn hoặc bằng 0,010.

Trong các điều kiện sắc ký này và với lượng bơm 10 pmol furosin, thì tỷ lệ tín hiệu/ nhiễu phải lớn hơn 10.

6.4 Cột "Furosin chuyên dụng", đường kính 4,6 mm và dài 250 mm, cỡ hạt 5 μm (ví dụ: Alltech²⁾), hoặc cột có khả năng tương tự để chia tách pic furosin khỏi đường nền mà không bị ảnh hưởng bởi các pic khác.

6.5 Máy tích phân hoặc phần mềm xử lý dữ liệu, có khả năng đo được diện tích pic.

6.6 Cân phân tích, có khả năng cân chính xác đến 1 mg.

6.7 Tủ sấy, có khả năng duy trì nhiệt ở $110 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.8 Lọ nhỏ có nắp vụn Pyrex³⁾ hoặc loại khác chịu nhiệt có nắp đậy kín.

²⁾ Cột "Furosin chuyên dụng" được cung cấp bởi Alltech-Europe, Laarne, Đức.

³⁾ Pyrex là ví dụ về sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ảnh hưởng đến việc sử dụng chúng.

6.9 Giấy lọc, độ xốp trung bình.

6.10 Xyranh thủy tinh, dung tích 10 ml.

6.11 Thiết bị Kjeldahl, phù hợp với TCVN 8099-1 (ISO 8968-1).

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Sữa

Dùng pipet lấy 2 ml mẫu thử cho vào lọ nhỏ có nắp vặn Pyrex (6.8). Thêm 6 ml dung dịch axit clohydric I (5.2) và trộn.

8.2 Phomat

Cân phần mẫu thử tương ứng có chứa từ 40 mg đến 50 mg protein cho vào lọ nhỏ có nắp vặn (6.8). Thêm 8 ml dung dịch axit clohydric II (5.3) và trộn.

8.3 Thủy phân

8.3.1 Thổi khí nitơ (5.9) qua phần mẫu thử đã được chuẩn bị trong lọ nhỏ có nắp vặn (8.1 hoặc 8.2) trong thời gian khoảng 2 min. Đậy chặt nắp lọ và sấy 23 h trong tủ sấy (6.7) ở nhiệt độ 110 °C. Lắc nhẹ lọ sau giờ sấy đầu tiên.

8.3.2 Làm nguội và lọc dịch thủy phân thu được (8.3.1) qua giấy lọc (6.9).

Có thể bảo quản dịch thủy phân đã lọc trong 12 tháng ở nhiệt độ - 20 °C, nếu cần.

8.4 Xác định hàm lượng protein

Xác định hàm lượng nitơ trong 2 ml dịch thủy phân đã lọc (8.3.2) bằng phương pháp Kjeldahl trong TCVN 8099-1 (ISO 8968 -1). Tính hàm lượng protein bằng cách nhân hàm lượng nitơ với 6,38.

9 Cách tiến hành

9.1 Chiết pha rắn (SPE) của dịch thủy phân đã lọc

9.1.1 Lắp cột C18 (6.1) vào xyranh thủy tinh (6.10). Đầu tiên làm ướt cột bằng 5 ml metanol (5.5) sau đó là 10 ml nước cất. Không để khô cột.

9.1.2 Lấy gần 0,5 ml dịch thủy phân đã lọc (8.3.2) cho vào xyranh. Bơm từ từ dịch này vào cột, loại bỏ phần dịch thừa. Tránh tạo ra bọt khí.

9.1.3 Dùng pipet lấy 3 ml dung dịch axit clohydric III (5.4) cho vào xyranh. Rửa giải từ từ cho đến khi cột khô hoàn toàn, khi đó thu lấy phần dịch rửa giải không màu.

Khi được bảo quản ở -20°C , dịch thủy phân đã tinh sạch có thể bền được 1 tuần.

9.2 Xác định bằng HPLC

9.2.1 Điều kiện chạy sắc ký

9.2.1.1 Dung môi rửa giải

Dùng dung dịch axit axetic (5.6.2) làm dung môi rửa giải A và dung dịch kali clorua (5.6.3) làm dung môi rửa giải B.

9.2.1.2 Gradient rửa giải

Gradient rửa giải được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Gradient rửa giải

Thời gian min	Dung môi A ^a %	Dung môi B ^a %
0	100	0
12,5	100	0
19,5	50	50
22,0	50	50
24,0	100	0
32,0	100	0

^a Có thể sử dụng gradient rửa giải tương tự phù hợp với quy định của cột.

9.2.1.3 Tốc độ dòng

Cài đặt tốc độ dòng của dung môi rửa giải ở 1,2 ml/min.

9.2.1.4 Nhiệt độ cột

Nhiệt độ của cột phải được duy trì không đổi trong dải từ 30 °C đến 35 °C đối với cột "Furosin chuyên dụng", hoặc theo loại cột được sử dụng.

9.2.1.5 Cân bằng

Cân bằng hệ thống sắc ký bằng cách rửa cột trong vài phút bằng hỗn hợp dung môi A và B theo tỷ lệ 50:50 và tốc độ dòng 1,2 ml/min. Sau đó cài đặt lại điều kiện ban đầu (9.2.1.2) cho đến khi thu được đường nền ổn định.

9.2.1.6 Xác định

Thực hiện chạy mẫu trắng bằng cách bơm khoảng từ 20 µl đến 50 µl dung dịch axit clohydric III (5.4) nhằm kiểm tra độ tinh khiết của dung môi. Sau khi kết thúc công đoạn cân bằng, độ nhạy của detector phải ổn định ở giá trị ban đầu.

Cho chạy cả dịch thủy phân đã tinh sạch (9.1.3) và dung dịch chuẩn furosin (5.8) trên hệ thống sắc ký bằng cách bơm mỗi dung dịch khoảng 20 µl đến 50 µl. Pic furosin phải hiện rõ trên đường nền có thời gian lưu trong khoảng từ 20 min đến 24 min.

Xác định diện tích pic furosin của cả dịch thủy phân đã tinh sạch (9.1.3) và dung dịch chuẩn furosin (5.8) bằng phép tích phân đường nền (xem các ví dụ về sắc đồ HPLC trong Phụ lục A).

CHÚ THÍCH: Tín hiệu của furosin ở bước sóng 280 nm đã được chứng minh là tuyến tính trong dải bơm từ 1 pmol đến 1000 pmol, trong dải nồng độ nghiên cứu từ 5 pmol đến 500 pmol. Do đó, không cần thực hiện hiệu chuẩn nhiều điểm.

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Tính kết quả

Tính hàm lượng furosin của mẫu thử, w , theo công thức sau:

$$w = A_t \times \frac{c}{A_i} \times \frac{1}{V} \times \frac{d}{F} \times \frac{M}{10} \times \frac{8}{m \times 4}$$

Trong đó:

w là hàm lượng furosin của mẫu, tính bằng miligam trên 100 g protein;

A_t là diện tích pic của furosin thu được đối với mẫu thử (9.2.1.6);

c là lượng furosin chính xác trong thể tích dung dịch chuẩn (5.8) đã bơm vào cột (khoảng từ 20 μ l đến 50 μ l), tính bằng picomol.

A_f là diện tích pic furosin thu được đối với dung dịch chuẩn furosin (9.2.1.6);

V là thể tích đã bơm, tính bằng microlit, (V trong khoảng từ 20 μ l đến 50 μ l);

d là hệ số pha loãng đã dùng để chiết pha rắn ($d = 6$);

F là hệ số thu hồi của chiết pha rắn ($F = 0,95$);

M là khối lượng phân tử của furosin ($M = 254$);

m là khối lượng của hàm lượng protein trong 2 ml dịch thủy phân (8.4), tính bằng miligam (mg).

10.2 Biểu thị kết quả

Kết quả được biểu thị đến một chữ số thập phân.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

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

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 6 % giá trị trung bình của các kết quả.

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do hai người phân tích, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 15 % giá trị trung bình của các kết quả.

12 Báo cáo thử nghiệm

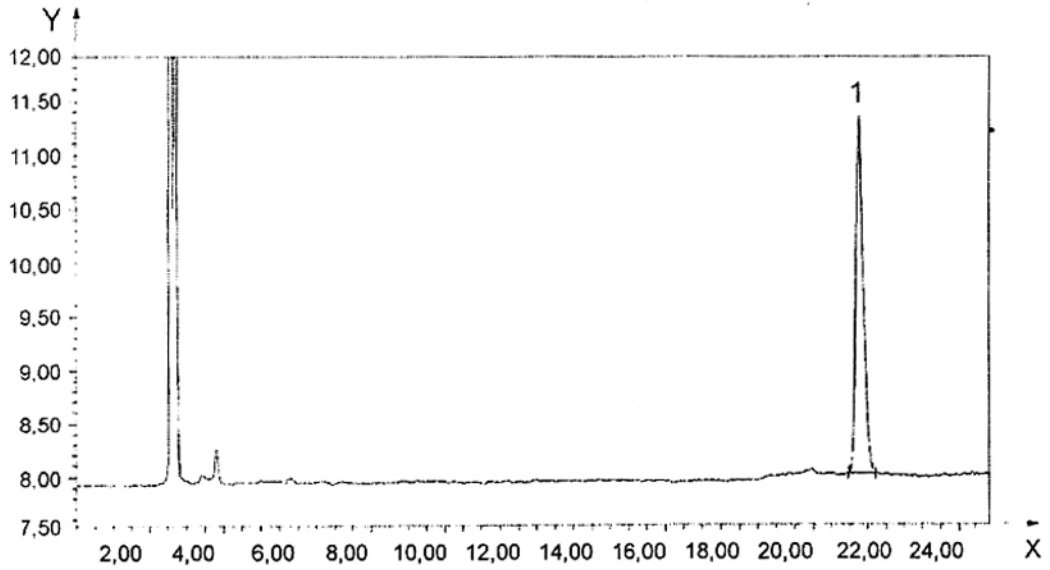
Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- e) kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì ghi kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các ví dụ về sắc đồ HPLC



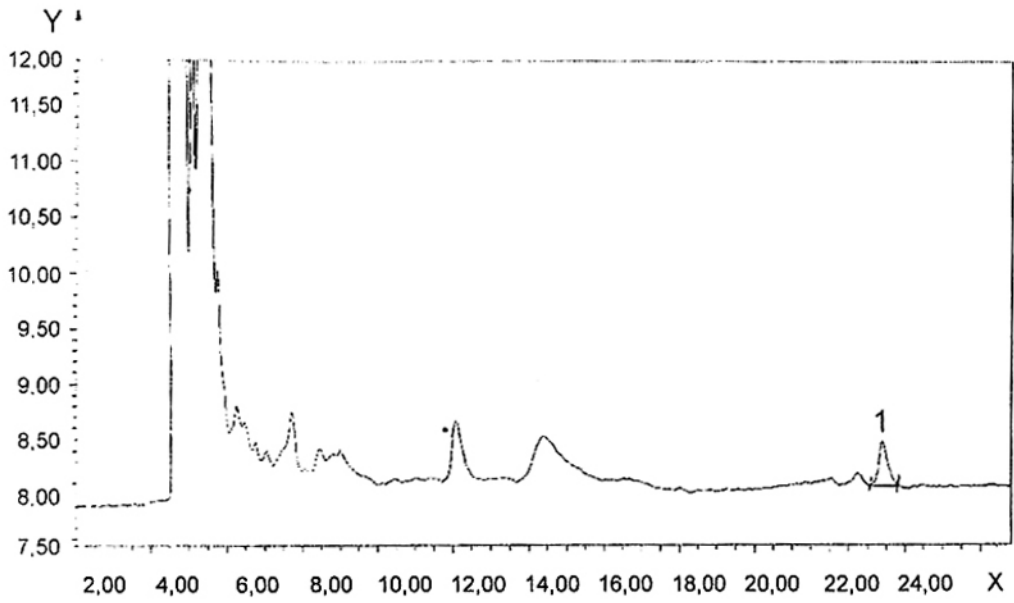
CHÚ DẪN:

X thời gian lưu, tính bằng phút

Y điện áp, tính bằng mili vôn

1 pic furosin

Hình A.1 – Mẫu sắc đồ HPLC của dung dịch chuẩn furosin (pic của furosin 53 pmol)



CHÚ DẪN: Theo chú dẫn trong Hình A.1

Hình A.2 – Mẫu sắc đồ HPLC của sữa thanh trùng dương tính với peroxidase
(pic của furosin 8 pmol)

Phụ lục B

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Các kết quả thu được đã được phân tích thống kê phù hợp với ISO 5725⁴⁾ để cho dữ liệu về độ chụm nêu trong Bảng B.1.

Phép thử cộng tác quốc tế được thực hiện với sự tham gia của 8 phòng thử nghiệm, sử dụng mẫu thử của sáu loại sữa. Phép thử liên phòng thử nghiệm này do Nhóm chuyên gia về sữa của Ủy ban EU tổ chức.

Bảng B.1 – Kết quả thử liên phòng thử nghiệm

	Sữa thanh trùng A	Sữa thanh trùng B	Sữa thanh trùng HT A	Sữa thanh trùng HT B	Sữa tiệt trùng UHT A	Sữa tiệt trùng UHT B
Số lượng phòng thử nghiệm tham gia	8	8	8	8	8	8
Giá trị trung bình ^a	8,68	9,31	11,73	19,99	46,07	80,45
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r^a	0,18	0,17	0,24	0,43	0,83	1,46
Giới hạn lặp lại, $r (= 2,8 s_r)^a$	0,51	0,48	0,66	1,21	2,33	4,08
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R^a	0,61	0,70	0,73	0,85	2,34	2,33
Giới hạn tái lập, $R (= 2,8 s_R)^a$	1,72	1,95	2,05	2,39	6,55	6,52
^a Các giá trị được biểu thị bằng miligam furosine trên 100 g protein.						

⁴⁾ ISO 5725:1986, *Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory test* dùng để thu được dữ liệu về độ chụm. Tiêu chuẩn này đã hủy và được thay bằng bộ tiêu chuẩn ISO 5725 (gồm 6 phần) và đã được chấp nhận thành bộ TCVN 6910 (ISO 5725).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
- [2] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
- [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
- [4] RESMINI, P., Pellegrino, L. and BATTELLI, G. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by direct HPLC method. *It. J. Food Sci.*, 3, 1990, pp.173-183
- [5] RESMINI, P., PELLEGRINO, L, MASOTTI, F., TIRELLI, A. and PRATI, F. Determinazione del latte in polvere ricostituito nel latte crudo ed in quello pastorizzato, mediante HPLC della furosina. *Sci. Teen. Latt-Cas.*, 43, 1992, pp. 169-186
- [6] RESMINI, P., PELLEGRINO, L. and MASOTTI, F. *Evaluation of the Maillard reaction extent for quality control of low-heat treated dairy products.* IDF Special Issue 9303, *Protein and fat globule modifications by heat-treatment, homogenisation and other technological means for high quality dairy products*, 1993, pp. 153-164.
-