

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 9684:2013
ISO 11027:1993**

Xuất bản lần 1

**HẠT TIÊU VÀ NHỰA DẦU HẠT TIÊU –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PIPERIN –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Pepper and pepper oleoresins – Determination of piperine content –
Method using high-performance liquid chromatography*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 9684:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 11027:1993;

TCVN 9684:2013 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;

Hạt tiêu và nhựa dầu hạt tiêu - Xác định hàm lượng piperin - Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Pepper and pepper oleoresins - Determination of piperine content - Method using high-performance liquid chromatography

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng piperin của hạt tiêu (*Piper nigrum* Linnaeus), nguyên hạt hoặc dạng bột cũng như dịch chiết của chúng (nhựa dầu hạt tiêu) bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao.

Phương pháp này có thể tách và xác định được các alkaloid khác (isochavicin, isopiperin và piperitin) trong hạt tiêu, nếu cần.

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 nghiên để phân tích.*

TCVN 9683:2013 (ISO 5564:1982), *Hạt tiêu đen và hạt tiêu trắng nguyên hạt hoặc dạng bột – Xác định hàm lượng piperin – Phương pháp đo quang phổ.*

3 Nguyên tắc

3.1 Hạt tiêu dạng bột

Chiết hồi lưu mẫu bằng etanol, sau đó xác định piperin bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC), theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

TCVN 9684:2013

3.2 Hạt tiêu nguyên hạt

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

3.3 Nhựa dầu hạt tiêu

Pha loãng nhựa dầu hạt tiêu bằng etanol, sau đó xác định piperin 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 hoặc nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

4.1 Chất chuẩn

Piperin có độ tinh khiết ít nhất 98 %, xác định được bằng phương pháp đo phổ được quy định trong TCVN 9683 (ISO 5564).

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

4.2 Dung môi

4.2.1 Etanol, 96 % (thể tích).

4.2.2 Axetonitril.

CẢNH BÁO – Sản phẩm này gây chảy nước mắt, phải cẩn thận khi sử dụng.

4.2.3 Axit axetic, dung dịch 1 % (thể tích).

4.3 Dung môi rửa giải

Trộn 52 phần thể tích dung dịch axit axetic (4.2.3) với 48 phần thể tích dung dịch axetonitril (4.2.2).

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 Pipet, dung tích 2 ml, 5 ml, 10 ml.

5.2 Bình định mức, dung tích 25 ml, 50 ml và 100 ml (bằng thủy tinh phản quang hoặc được bọc trong giấy nhôm).

5.3 Màng lọc, không hấp phụ.

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 theo chương trình cài đặt 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 điều chỉnh đến bước sóng 343 nm.

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

5.6 Cột

Vật liệu:	thép không gỉ hoặc thủy tinh
Chiều cao:	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} , 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 tự.

5.8 Sàng thử nghiệm, cỡ lỗ 500 μm .

6 Phương pháp hiệu chuẩn

CẢNH BÁO – Trong suốt quá trình vận hành, không để dung dịch tiếp xúc với ánh sáng (ví dụ bọc bình bằng giấy nhôm) và sử dụng càng nhanh càng tốt vì dung dịch piperin không bền.

6.1 Dung dịch chuẩn

Chuẩn bị dung dịch gốc piperin (4.1) 1 g/l trong etanol (4.2.1) ngay trước khi sử dụng.

6.2 Đường chuẩn

Từ dung dịch chuẩn (6.1), chuẩn bị ít nhất ba dung dịch chuẩn làm việc piperin có dải nồng độ trong khoảng 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 %.

TCVN 9684:2013

Dạng đường chuẩn khối lượng piperin được 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 theo công thức:

$$K = m'/A$$

$$m' = m \times P_r$$

Trong đó:

m là khối lượng của piperin tính bằng miligam (mg);

A là diện tích pic của piperin, tính bằng đơn vị tích phân;

P_r là độ tinh khiết của piperin (4.1);

m' là khối lượng đã hiệu chỉnh của pepirin, 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)¹⁾.

8 Chuẩn bị mẫu thử

CẢNH BÁO – Các thao tác phải được thực hiện trong điều kiện tránh ánh sáng vì dung dịch piperin không bền.

8.1 Hạt tiêu bột

8.1.1 Kiểm tra để đảm bảo rằng tất cả mẫu thử đều lọt qua sàng cỡ lỗ 500 μm (5.8). Nếu không đạt yêu cầu thì nghiền bột theo TCVN 8960 (ISO 2825) cho đến khi đạt được cỡ hạt yêu cầu.

8.1.2 Từ mẫu thử đã được chuẩn bị trong 8.1.1, cân từ 0,5 g đến 1 g mẫu, chính xác đến 0,01 g và chuyển vào bình cầu đáy tròn 100 ml (5.2) được nối với bộ sinh hàn. Thêm 50 ml etanol (4.2.1) rồi đun sôi. Đun sôi hồi lưu trong 3 h.

¹⁾ TCVN 4889:1989 (ISO 948:1980), *Gia vị – Lấy mẫu*

Để nguội dung dịch. Lọc và thu lấy dịch lọc vào bình định mức một vạch 100 ml (5.2). Rửa bình chiết và màng lọc nhiều lần bằng etanol (4.2.1). Cho nước rửa vào bình định mức 100 ml và cho etanol đến vạch.

8.2 Hạt tiêu nguyên hạt

8.2.1 Nghiền mẫu thử theo TCVN 8960 (ISO 2825) cho đến khi bột nghiền thu được lọt hết qua sàng cỡ lỗ 500 μm (5.8).

8.2.2 Dùng mẫu đã nghiền trong 8.2.1, tiến hành tiếp theo quy định trong 8.1.2.

8.3 Nhựa dầu hạt tiêu

Đồng hóa kỹ mẫu thử nhựa dầu hạt tiêu.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử

9.1.1 Hạt tiêu nguyên hạt hoặc dạng bột

Dùng pipet (5.1) lấy 10 ml dịch chiết thu được trong 8.1.2 hoặc 8.2.2 và chuyển vào bình định mức một vạch 25 ml (5.2). Thêm dung môi rửa giải (4.3) đến vạch.

CHÚ THÍCH 1: Có thể thay đổi bước pha loãng này, nếu cần, tùy thuộc vào lượng piperin dự kiến của mẫu và độ nhạy của detector.

9.1.2 Nhựa dầu hạt tiêu

Cân 0,2 g nhựa dầu hạt tiêu (xem 8.3), chính xác đến 0,1 mg cho vào bình định mức một vạch 100 ml và thêm etanol (4.2.1) đến vạch.

Dùng pipet lấy 10 ml hỗn hợp này cho vào bình định mức một vạch 50 ml và thêm dung môi rửa giải (4.3) đến vạch.

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

9.2 Xác định

Dung dịch pha loãng cuối cùng phải trong. Nếu không thì lọc dung dịch pha loãng cuối cùng trên màng lọc (5.3) rồi bơm dung dịch mẫu thử vào máy sắc ký (5.4.1).

Trên sắc đồ thu được, đo pic của piperin (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

10.1 Hạt tiêu nguyên hạt hoặc dạng bột

Tính hàm lượng piperin bằng phần trăm khối lượng, theo công thức:

$$A \times K \times \frac{25}{10} \times \frac{100}{m_x} \times 100$$

Trong đó:

A là diện tích pic của piperin, tính bằng đơn vị tích phân;

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

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

CHÚ THÍCH 3: Tỷ lệ 25/10 liên quan đến dung dịch pha loãng trong 9.1.1 và cần được thay đổi cho phù hợp khi sử dụng độ pha loãng khác.

10.2 Nhựa dầu hạt tiêu

Tính hàm lượng piperin bằng phần trăm khối lượng, theo công thức:

$$A \times K \times \frac{50}{10} \times \frac{100}{m_x} \times 100$$

Trong đó A , m_x và K có ý nghĩa giống như trong 10.1.

CHÚ THÍCH 4: Tỷ lệ 50/10 liên quan đến dung dịch pha loãng trong 9.1.2 và cần được thay đổi cho phù hợp khi sử dụng độ pha loãng khác.

11 Độ lặp lại

Lấy kết quả hệ số đáp ứng K và hàm lượng piperin là giá trị trung bình của vài lần xác định (ít nhất là 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 các thông tin sau:

- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- hệ thống thiết bị;

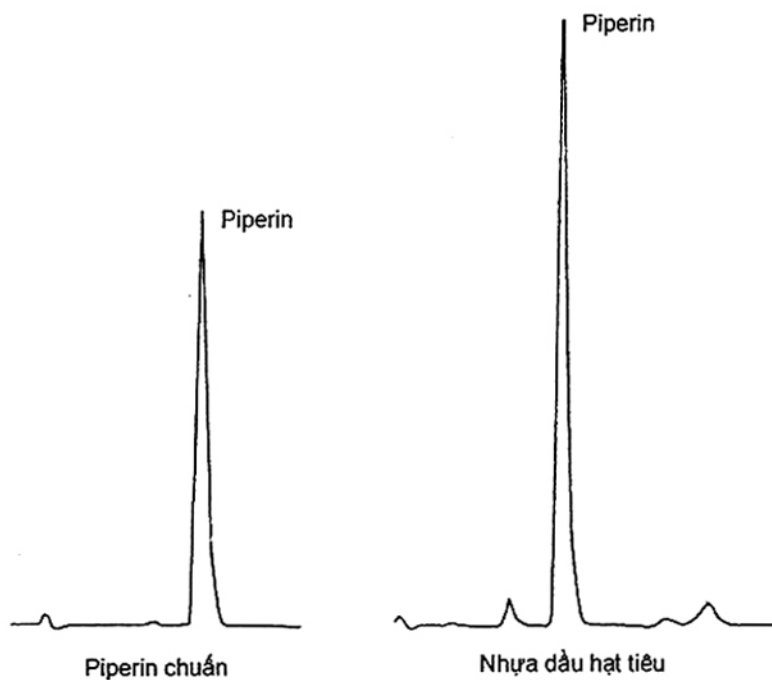
- c) đặc tính của cột (vật liệu, kích thước, cột nhồi, pha tĩnh);
- d) đặc tính của detector (tùy chọn) và các điều kiện vận hành;
- e) đặc tính của pha động (tốc độ dòng và bản chất);
- f) nhận biết mẫu thử (lượng bơm và độ pha loãng cuối cùng);
- g) kết quả thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Sắc đồ điện hình

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



Hình A.1 – Sắc đồ điện hình của piperin chuẩn và nhựa dầu hạt tiêu