

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 5716-1:2017

ISO 6647-1:2015

Xuất bản lần 2

**GẠO - XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AMYLOSE -
PHẦN 1: PHƯƠNG PHÁP CHUẨN**

Rice - Determination of amylose content - Part 1: Reference method

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 5716-1:2017 thay thế TCVN 5716-1:2008;

TCVN 5716-1:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 6647-1:2015;

TCVN 5716-1:2017 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F1 Ngũ cốc và đậu đỗ biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 5716:2017 (ISO 6647:2015) *Gạo – Xác định hàm lượng amylose* gồm các phần sau:

- TCVN 5716-1:2017 (ISO 6647-1:2015) *Phần 1: Phương pháp chuẩn;*
- TCVN 5716-2:2017 (ISO 6647-2:2015) *Phần 2: Phương pháp thông dụng.*

Gạo – Xác định hàm lượng amylose – Phần 1: Phương pháp chuẩn

*Rice – Determination of amylose content –
Part 1: Reference method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuẩn để xác định các giá trị hiệu chuẩn đối với các chất chuẩn được sử dụng trong việc dựng đường chuẩn để xác định hàm lượng amylose trong gạo trắng không đồ có dải hàm lượng amylose từ 0 % đến 30 %.

2 Tài liệu viện dẫn

Trong tiêu chuẩn này không sử dụng các tài liệu viện dẫn.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Amylose (amylose)

Các phân tử gồm có các chuỗi mạch thẳng chứa nhiều hơn 200 đơn vị glucose liên kết.

3.2

Amylopectin (amylopectin)

Các phân tử gồm có các chuỗi mạch nhánh chứa từ 6 đến 100 đơn vị glucose liên kết.

3.3

Gạo nếp (waxy rice)

Gạo dẻo không chứa các chuỗi mạch có độ dài phù hợp với amylose.

4 Nguyên tắc

Các chuỗi mạch thẳng của tinh bột được tách dựa vào thể tích thủy động và khối lượng phân tử bằng sắc ký rây phân tử^[2]. Bột được hồ hóa trong dung dịch natri hydroxit và các phân tử tinh bột trong dung dịch được cắt nhánh bằng isoamylase^{[1][2]}. Các chuỗi mạch thẳng được tách bằng sắc ký rây phân tử (SEC) và tỷ lệ của các chuỗi amylose được tính bằng diện tích pic amylose được đo bằng tín hiệu detector.

5 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử được sử dụng phải thuộc loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

5.1 Etanol, dung dịch 95 % thể tích.

5.2 Natri hydroxit, dung dịch 0,25 mol/l.

5.3 Axit axetic băng.

5.4 Dung dịch đệm natri axetat, 0,2 mol/l, đưa về pH 4 bằng axit axetic băng. Trộn 10 ml đệm với 360 µl axit axetic băng.

5.5 Isoamylase.

5.6 Resin trao đổi ion hỗn hợp, ví dụ AG 501-X8 và Bio-Rex MSZ 501 (D)¹⁾

5.7 Chất rửa giải amoni axetat, dung dịch 0,05 mol/l, pH 4,75.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Máy và que khuấy từ.

6.2 Bếp điện.

6.3 Máy ly tâm nhỏ.

6.4 Ống ly tâm nhỏ, dung tích 2,0 ml.

¹⁾ AG 501-X8 và Bio-Rex MSZ 501 (D) là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán, sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

- 6.5 Lọ nhấp nháy (scintillation vials), dung tích 20 ml.
- 6.6 Máy trộn Vortex.
- 6.7 Nồi cách thủy, có thể giữ được ở 50 °C và đạt được đến điểm sôi
- 6.8 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,0001 g.
- 6.9 Pipet và micropipet, dung tích 0,2 ml, 1 ml, 5 ml và 10 ml.
- 6.10 Xyranh, có thể phân phối được 25 µl.
- 6.11 Sắc ký rây phân tử (SEC) có detector chỉ số khúc xạ (RI).
- 6.12 Cột SEC, thích hợp để phân tách các nhóm có khối lượng phân tử < 1 620 000.
- 6.13 Máy nghiền, có thể nghiền gạo trắng chưa nấu thành bột qua sàng có cỡ lỗ 150 µm đến 180 µm (100 mesh đến 80 mesh). Nên dùng máy nghiền xyclone có cỡ lỗ 0,5 mm.
- 6.14 Sàng, cỡ lỗ 150 µm đến 180 µm (100 mesh đến 80 mesh).

7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị suy giảm chất lượng hoặc bị thay đổi trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 9027 (ISO 24333).

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị mẫu thử

Thực hiện hiệu chuẩn sử dụng 300 g bột của mỗi bộ 5 chất chuẩn từ các giống cụ thể²⁾, mỗi chuẩn thực hiện với một trong năm alen tương ứng của gen *Waxy*, gen chịu trách nhiệm tổng hợp amylose.

Dùng máy nghiền (6.13), nghiền ít nhất 10 g gạo trắng của từng mẫu thành bột mịn lọt qua sàng (6.14).

8.2 Phần mẫu thử và chuẩn bị dung dịch thử

Cân 3 lần lặp lại các lượng 50 mg ± 0,5 mg mẫu thử cho vào lọ nhấp nháy thủy tinh (6.5) đã biết khối lượng. Carefully đặt que khuấy từ nhỏ (6.1), dùng pipet (6.9) thêm 0,5 ml etanol (5.1), để rửa hết phần

²⁾ Bột gạo chuẩn có sẵn để dùng được cung cấp từ Viện nghiên cứu gạo quốc tế, DAPO 777, Metro Manila, Philippines. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 5716-1:2017

mẫu thử bám vào thành của lọ. Lắc nhẹ để làm ướt mẫu thử. Dùng pipet thêm 2,0 ml dung dịch natri hydroxit (5.2) và trộn. Phân tán hoàn toàn tinh bột bằng cách gia nhiệt hỗn hợp đến sôi nhẹ trên bếp điện (6.2) trong khoảng 10 min, đảm bảo hỗn hợp không sôi quá mạnh. Khi dung dịch trở nên trong (sôi nhẹ khoảng 10 min), lấy dung dịch ra khỏi bếp điện. Cân từng lọ và điều chỉnh khối lượng đến 4 g bằng nước đã được gia nhiệt đến khoảng từ 60 °C đến 70 °C.

8.3 Cắt nhánh để thu được chuỗi mạch thẳng của tinh bột

Chuyển 800 µl từng dung dịch đã hòa vào ống ly tâm nhỏ (6.4) sử dụng pipet thích hợp (6.9). Thêm 200 µl đệm natri axetat (5.4). Dùng xyranh (6.10) thêm 2,5 đơn vị hoạt độ (U) isoamylase. Trộn kỹ bằng máy trộn Vortex (6.6). Ủ ấm 2 h trong nồi cách thủy (6.7) ở 50 °C, cứ nửa giờ khuấy trộn một lần, sau đó đun sôi 5 min để làm biến tính isoamylase. Chuyển phần mẫu phía trên vào ống ly tâm nhỏ sạch và thêm khoảng 0,1 g nhựa trao đổi ion (5.6). Ủ ấm ở 50 °C trong 30 min, sau đó ly tâm. Chuyển cẩn thận phần nổi phía trên vào ống ly tâm nhỏ sạch, thu được dung dịch mẫu để bơm vào SEC (6.11) và nên bơm dung dịch này trong ngày chuẩn bị.

8.4 Phép thử trắng

Thực hiện phép thử trắng song song với phép xác định, sử dụng cùng quy trình, cùng các lượng thuốc thử như trong 8.2 và 8.3, nhưng sử dụng 800 µl dung dịch natri hydroxit (5.2) không chứa tinh bột đã hòa.

8.5 Điều kiện hoạt động của SEC

Sắc ký rây phân tử (SEC) (6.11) bao gồm bộ phân tách, detector chỉ số khúc xạ, phần mềm và cột thích hợp (6.12). Nếu sử dụng dụng cụ lấy mẫu tự động thì cần có bộ phận gia nhiệt mẫu để duy trì mẫu tinh bột đã cắt nhánh ở 40 °C. Đảm bảo hệ thống SEC và đầu kim đã hoạt động, bộ bơm mẫu đã được rửa sạch, đảm bảo hệ thống SEC đã được rửa và cột đã cân bằng theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Để phân tích tinh bột, dịch rửa giải (5.7) cần chảy ở tốc độ 0,5 ml/min qua cột rây phân tử (6.12). Cột (6.12) được duy trì ở 60 °C. Khi cột được cân bằng lại và đường nền của chỉ số khúc xạ (RI) (6.11) ổn định, thì có thể bơm mẫu. Cho từng mẫu thử và mẫu trắng chạy trong 40 min.

8.6 Tính giá trị amylose

Khi SEC kết thúc, xác định pic của các chuỗi amylose dựa trên khuyết pic từ mẫu là gạo nếp không chứa amylose. Sau khi cố định đường nền và chuẩn hóa tín hiệu detector, tính diện tích từng pic kết hợp với tinh bột và sau đó là diện tích pic kết hợp với chuỗi amylose. Phần trăm amylose tính theo công thức sau:

$$A = \frac{S_a}{S_t} \times 100\% \quad (1)$$

Trong đó:

A là phần trăm amylose;

S_a là diện tích pic amylose;

S_t là tổng diện tích của các pic tinh bột.

9 Biểu thị kết quả

Pic amylose được nhận biết bằng cách so sánh với sắc ký đồ SEC của giống gạo nếp vì các giống này không chứa amylose. Hàm lượng amylose được tính 3 lần lặp lại đối với 5 mẫu bằng cách tính trung bình của ba lần lặp lại là giá trị amylose. Bất kỳ lần lặp lại nào chênh lệch đáng kể với lần lặp lại khác thì thực hiện lặp lại hoàn toàn từ 8.1.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

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

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong một phòng thử nghiệm, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại r (r được suy ra từ các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm).

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, 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 % các trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập R (R được suy ra từ các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm).

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm ít nhất phải bao gồm các thông tin sau:

- a) mọi thông tin cần thiết để 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) tất cả các điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy ý, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thu được hoặc nếu đáp ứng được các yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

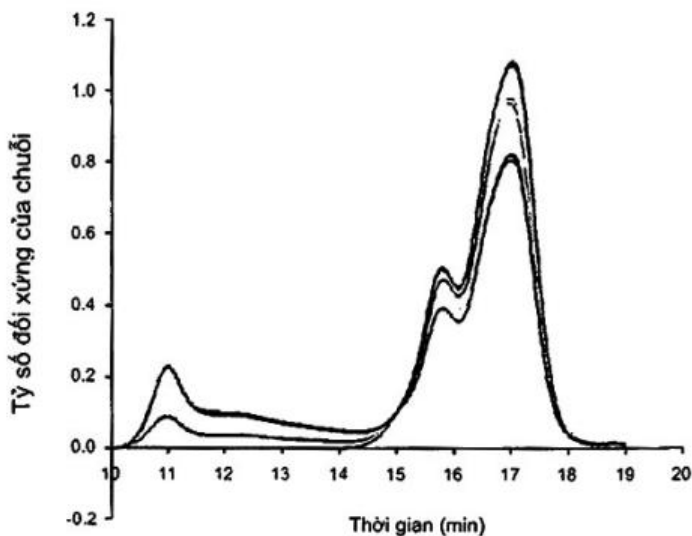
Phụ lục A
(tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử nghiệm liên phòng với sự tham gia của 7 phòng thử nghiệm đã được thực hiện trên 5 mẫu tại Viện Nghiên cứu gạo quốc tế (IRRI) (Los Baños, Philippines). Phép thử được Hệ thống quốc tế về chất lượng gạo (International Network for Quality Rice) tổ chức. Mỗi phòng thử nghiệm xác định hàm lượng amylose bằng SEC và chuyển dữ liệu SEC đến IRRI. Các kết quả được phân tích phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) đưa ra dữ liệu độ chụm nêu trong Bảng A.1 và Hình A.1.

Bảng A.1 – Dữ liệu về độ chụm

Thông số	Mẫu				
	A	B	C	D	E
Số lượng phòng thử nghiệm sau khi loại trừ ngoại lệ	6	7	7	7	7
Hàm lượng amylose trung bình, % khối lượng	0,00	4,29	11,81	18,23	24,53
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_R , %	0,00	0,18	0,24	0,16	0,13
Giới hạn lặp lại, r ($r = 2,77 \times s_R$), %	0,00	0,53	0,91	1,77	0,39
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , %	0,00	0,70	0,86	0,61	1,23
Giới hạn tái lập, R ($R = 2,77 \times s_R$), %	0,00	1,94	2,38	1,69	2,22



Hình A.1 – Ví dụ về các sắc ký đồ SEC

TCVN 5716-1:2017

Hình A.1: Sắc ký đồ SEC của năm chất chuẩn cho thấy pic amylose kết thúc ở 14,5 min và pic amylopectin tiếp sau đến 19 min. Gạo nếp không có amylose và có hàm lượng amylopectin cao nhất.

Hình A.1 cho thấy ví dụ của từng sắc ký đồ đối với năm chất chuẩn từ một phòng thử nghiệm. Từng chất chuẩn được chạy lặp lại ba lần. Chuỗi amylose là các pic đầu tiên và sau đó các pic thứ hai chứa các chuỗi dài từ amylopectin và pic thứ ba chứa chuỗi amylopectin ngắn. Gạo nếp cũng được biết như là gạo dẻo không có chuỗi amylose. Thời gian để rửa giải chuỗi tinh bột từ mẫu gạo nếp được lựa chọn ở phân nhánh giữa chuỗi amylose và amylopectin. Chênh lệch có thể thấy trong vùng pic amylose và là amylose giảm và amylopectin tăng.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] I.L. Batey, B.M. Curtin Measurement of amylose/amylopectin ratio by high-performance liquid chromatography. *Starch-Starke*. 1996, 48 (9) pp. 338–344
 - [2] R.M. Ward Improved methods for the structural analysis of the amylose-rich fraction from rice flour. *Biomacromolecules*. 2006, 7 (3) pp. 866–876
 - [3] 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.*
 - [4] 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.*
 - [5] TCVN 5716-2 (ISO 6647-2), *Gạo – Xác định hàm lượng amylose – Phần 2: Phương pháp thông dụng*
 - [6] ISO 7301, *Rice – Specification*
 - [7] TCVN 6661-1 (ISO 8466-1), *Chất lượng nước - Hiệu chuẩn và đánh giá các phương pháp phân tích và ước lượng các đặc trưng thống kê - Phần 1: Đánh giá thống kê các hàm chuẩn tuyến tính.*
 - [8] TCVN 9027 (ISO 24333), *Ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc – Lấy mẫu.*
-