

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP TIÊU CHUẨN CƠ SỞ ĐỂ PHÂN TÍCH KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG PHỤ GIA THỰC PHẨM CHITOSAN

Lê Lan Anh, Phạm Gia Môn, Vũ Đức Lợi, Ngô Thị Vân và CCS
Viện Hoá học - Viện KH&CN Việt Nam

Tóm tắt:

Để thay thế hàn the, hiện nay một số cơ sở sản xuất thực phẩm đã dùng phụ gia đi từ Chitosan. Bài báo này trình bày một số phương pháp phân tích để kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản của sản phẩm đi từ Chitosan có tên PDP. Phương pháp xây dựng dưới dạng Tiêu chuẩn Cơ sở đã được áp dụng tại viện Hoá cũng như một số phòng thí nghiệm tham gia chương trình KC 10. 20 đều cho các kết quả tốt. Đây là những phương pháp thông dụng, dễ thực hiện không đòi hỏi những thiết bị quá tinh vi, đắt tiền. Đặc biệt trong báo cáo này còn đưa ra một phương pháp mới để xác định độ deacetyl hoá (DD) nói cách khác là phép định lượng Chitosan bằng quang phổ tử ngoại UV. Độ deacetyl hoá của Chitosan được xác định bằng đạo hàm bậc 1 phổ UV của chitosan trong axit axêtic. So với những phương pháp đã áp dụng từ trước đến nay như IR, NMR thì phương pháp này thời gian phân tích nhanh hơn và độ chính xác tương đương như NMR.

Summary:

In order to replace borax, recently some food processing manufacturers have been using additives derived from Chitosan. This paper represents different methods to analyze principal parameters of the Chitosan derivative additives named PDP. The methods constructed as "standards of laboratory" have been successfully employed at the institute of chemistry and other laboratories participating in the KC 10. 20 program. They are well-known methods that do not require sophisticated and expensive equipment. Especially, this paper also reports a new method to determine degree of deacetylation (DD) of Chitosan or in other words qualitative determination by UV spectrometers. The deacetyl degree of Chitosan was determined by first derivative of UV spectral in acetic acid medium. Compared with other methods using IR or NMR, this analytical method gives similar results but requires little time.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vì sức khoẻ cộng đồng, vấn đề An toàn Vệ sinh thực phẩm (ATVSTP) được nêu lên thành khẩu hiệu cho mỗi người dân, mỗi cơ quan chức năng phải có trách nhiệm tích cực thực hiện. Để tránh dùng những phụ gia thực phẩm là những sản phẩm đi từ các quá trình tổng hợp, các nhà khoa học từ nhiều chuyên ngành khác nhau (hoá thực phẩm, hoá hợp chất tự nhiên, polyme dược phẩm v.v) nghiên cứu tách chiết các sản phẩm tự nhiên để thay thế. Những sản phẩm loại này có hai ưu việt: rẻ tiền và an toàn.

Đối với những phụ gia thực phẩm đã trở thành thương phẩm quen thuộc đều đã có những phương pháp tiêu chuẩn để kiểm tra chất lượng, nhưng những sản phẩm mới có

nguồn gốc thiên nhiên đòi hỏi phải xây dựng mới hoặc cải tiến những phương pháp tiêu chuẩn đã có sẵn để có cơ sở pháp lý kiểm tra chất lượng những sản phẩm đó.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tham khảo các phương pháp tiêu chuẩn quốc tế:

Những chất phụ gia thực phẩm là một trong các danh mục có sẵn trong các phương pháp phân tích chính thức của Tổ chức AOAC [1] Quốc tế (Hiệp hội Chính thống của các nhà Hoá Phân tích), đó là mục 47. Food additives: Direct, 48. Food additives: Indirect trong tập II xuất bản lần thứ 17 năm 2000.

Trên nguyên tắc những chất phụ gia thực phẩm thì đều có những chức năng nhất định và giống nhau không tính đến đó là nguồn gốc thiên nhiên hay tổng hợp bằng con đường hoá học, vì vậy các chỉ tiêu để kiểm tra về tiêu chuẩn ATVS thực phẩm là không đổi. Cũng chính vì vậy chúng tôi vẫn bám sát vào các phương pháp của AOAC tìm cách cải tiến tìm điều kiện thích hợp để ứng dụng tại các phòng thí nghiệm Việt nam. Một mục đích quan trọng nữa là muốn tìm được tiếng nói chung với các tổ chức phân tích của quốc tế để một khi sản phẩm của Việt nam được công nhận và có thể xuất khẩu ra thị trường Quốc tế thì chúng ta có thể áp dụng ngay các phương pháp đó một cách dễ dàng.

Sản phẩm PDP (đi từ Chitosan) mục đích là để dùng như một phụ gia tạo đông, làm giòn dai sản phẩm. Người ta có thể pha vào thạch quả, bánh ngọt, giò, chả thay cho hàn the do vậy chúng tôi đã áp dụng và cải tiến từ các phương pháp kiểm tra Gélatin và bột thực phẩm.

Mặt khác, do Chitosan làm từ vỏ tôm nên các chỉ tiêu về kim loại nặng rất cần kiểm tra để đảm bảo vệ sinh ATTP, vì vậy chúng tôi còn kết hợp với các phương pháp của khối Cộng đồng Châu Âu. Tiêu Chuẩn châu Âu (CEN, November 2000, PrEN 14084:2000) [2]

Tham khảo các phương pháp tiêu chuẩn Việt Nam:

- TCVN 6468:1998 - Phụ gia thực phẩm: Phương pháp xác định các thành phần vô cơ [3].

- Bộ Y tế số 837/1998/QĐ-BYT v/v Ban hành "Danh mục tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực, thực phẩm"[4].

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Trong số các phương pháp TCCS đã xây dựng, bài báo này chỉ nêu chi tiết về phương pháp "xác định độ DD của Chitosan" còn các phương pháp khác, chủ yếu dựa vào nguyên tắc chung của các phương pháp phân tích định lượng thông thường.

*** Các phương pháp tiêu chuẩn cơ sở của Chitosan**

Công thức hoá học : $C_6H_{11}O_4N$

a. Phương pháp định tính:

Theo phép thử định tính của Chitosan, đó là thử nghiệm Van Wisseligh cho màu đặc trưng tím đỏ với dung dịch Lugol [5].

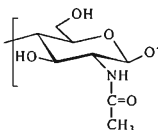
b. Các tiêu chuẩn cơ sở về vệ sinh an toàn thực phẩm

| TT | Chỉ tiêu | Phương pháp tiến hành | Yêu cầu | Tiêu chuẩn |
|----|--|-----------------------|----------|------------|
| 1 | pH | dung dịch 1% | 6,5 +7,5 | TCCS |
| 2 | Độ ẩm | 100-105°C | < 5% | TCCS |
| 3 | Độ tro toàn phần | 550°C | < 0,5% | TCCS |
| 4 | Cặn KT trong axit | HCl 10 % | < 0,1 % | TCCS |
| 5 | Hàm lượng sunphát | Trọng lượng | < 0,1% | TCCS |
| 6 | Hàm lượng clorua | Chuẩn độ | < 0,05% | TCCS |
| 7 | Hàm lượng As | Hấp thụ nguyên tử | < 3 ppm | TCCS |
| 8 | Hàm lượng Cd | Hấp thụ Nguyên tử | < 1 ppm | TCCS |
| 9 | Hàm lượng kim loại nặng (tính theo Pb) | Hấp thụ nguyên tử | < 10 ppm | TCCS |
| 10 | Hàm lượng % Nitơ toàn phần | Phương pháp Kjeldahl | > 8,0% | TCCS |
| 11 | Hàm lượng Chitosan | - ni- | ≥ 94,0% | TCCS |

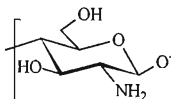
c. Phương pháp xác định độ deacetyl hoá của Chitosan

Trong bảng tiêu chuẩn ở trên cho ta thấy yêu cầu về chất lượng sản phẩm đặt ra là rất cao, nhưng thực tế để đạt được hàm lượng Chitosan ≥ 94,0% là rất khó. Điều cơ bản là phải chuyển đổi được Chitin sang Chitosan, tức là NHCOCH_3 phải chuyển hoá hết thành nhóm NH_2 , nói cách khác là độ Deacetyl hoá cao. Để có được cái nhìn cụ thể, ta phải xem lại công thức cấu tạo của Chitin và Chitosan như hình 1, 2, 3 dưới đây.

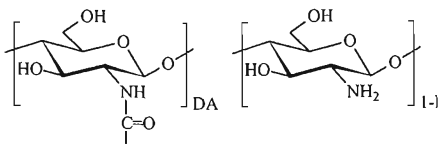
CÔNG THỨC CẤU TẠO CỦA CHITIN VÀ CHITOSAN



Hình 1. Chitin thuần nhất (chưa bị deacetyl hoá).



Hình 2. Chitosan thuần nhất (tất cả các mắt xích của chitin đã bị deacetyl hoá hoàn toàn).



Hình 3. DA : Độ axetyl hoá (degree of acetylation) trung bình

Thông thường chitin/chitosan tồn tại ở dạng hỗn hợp (một số mắt xích đã deacetyl hoá xen kẽ với các mắt xích chưa bị deacetyl hoá).

Nhìn vào công thức cấu tạo của Chitosan ta có thể dựa vào nguyên tố Nitơ để tìm cách tính toán là hợp lý nhất. Vì cấu tạo của Chitin và chitosan đều có các nguyên tử cấu thành giống hệt nhau, đó là: C, H, O và N, nhưng định lượng O, C và H thì cần phải có máy phân tích nguyên tố. Trong khi định lượng Nitơ tổng số bằng phương pháp Kjeldahl đã được tiêu chuẩn hoá quốc tế từ lâu.

Bảng 1. Tỷ lệ phân tử gam của Nitơ trong một mạch Chitin và Chitosan

| Chitin, một mạch N-acetyl-D-glucosamin | | | | Chitosan, một mạch D-Glucosamin | | | |
|--|-------|-------------|--------------|---------------------------------|-------|-------------|---------------|
| Nguyên tố | Số NT | Ph/tử gam | Tỷ lệ%N | Nguyên tố | Số NT | Ph/tử gam | Tỷ lệ%N |
| C | 8 | 8 x 12 = 96 | a = 6,89% | C | 6 | 6 x 12 = 72 | b = 8,69 % |
| H | 13 | 13 x 1 = 13 | | H | 11 | 11 x 1 = 11 | |
| O | 5 | 5 x 16 = 80 | | O | 4 | 4 x 16 = 64 | |
| N | 1 | 1 x 14 = 14 | | N | 1 | 1 x 14 = 14 | |
| | | Cộng | 203 | | | Cộng | 161 |

Rõ ràng nếu xác định chính xác hàm lượng của Nitơ tổng số lớn hơn 6,89%, ta có thể sơ bộ kết luận đó là Chitosan. Vấn đề ở đây là cần đánh giá có bao nhiêu Nitơ nằm ở liên kết với acetyl chuyển sang NH₂, đó chính là độ deacetyl.

Cho đến nay độ deacetyl hoá của chitosan vẫn là một vấn đề khó giải quyết vì chưa có một phương pháp tiêu chuẩn nào để có thể làm trọng tài. Vấn đề đặt ra là làm sao có thể tách rạch rời các nitơ trong polysaccharite Nitơ nào còn thuộc chitin (N-acetyl-D-glucosamin) và Nitơ nào đã chuyển thành chitosan (D-glucosamin). Hơn nữa sản phẩm Chitosan là đi từ phế thải của các hải sản như tôm, mực, cua, ghẹ v.v... do vậy còn những Nitơ trong protein chưa phân huỷ hết nó cũng có liên kết amin. Đây cũng là khó khăn khi dùng phương pháp IR hoặc MNR.

* Một số phương pháp xác định độ deacetyl hoá

1. Xác định độ DD bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (H¹-NMR)

Dựa vào giá trị giải tích phân phổ H¹-NMR ở các tín hiệu pic của nhóm CH₂ và H ở vị trí 2, 3, 4, 5, 6 và 6' người ta có thể xác định được độ deacetyl hoá Chitin/Chitosan [6].

2. Xác định độ DD dựa vào phổ Hồng ngoại (IR) [7]

Xác định diện tích hấp thụ ở bước sóng 1655 - A_{1655} (amit I) và A_{2867} (CH) theo phổ IR của chitin/chitosan. Tính tỷ lệ A_{1655}/A_{2867} và theo đồ thị tương quan chuẩn để xác định độ DD ở mẫu chitin/chitosan [8]. Có thể xác định độ DD dựa trên giải hấp thụ ở 1550 cm^{-1} (amit II) với chitin/chitosan có DD thấp. A. Baxter và các cộng sự đã cải tiến phương pháp xác định độ DA đề xuất tính theo tỷ lệ A_{1655}/A_{3450} , phương pháp này cho phép đo được chitosan có DD từ 45% - 100% (DA từ 0 - 55%) [9].

3. Xác định DD bằng phương pháp nhiệt phân-sắc ký khí với sự có mặt axit oxalic [10].

4. Phương pháp chưng cất chitin/chitosan với axit H_3PO_4

Dùng H_3PO_4 ở nhiệt độ cao để tách gốc axetyl trong chitin/chitosan ra dưới dạng axit acetic và định lượng bằng chuẩn độ với NaOH [11].

IV. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phương pháp dựa vào nitơ tổng số:

Để xác định DD đơn thuần hoá học là chỉ dựa vào hàm lượng của N tổng số trong mẫu và kết hợp với công thức tính độ deacetyl hoá của tác giả Nguyễn Hoàng Hà [12].

$$D = \frac{\Sigma N - 6,89}{1,8} \times 100$$

Trong công thức trên 1,8 là hiệu số giữa tỷ lệ N trong Chitosan và tỷ lệ N trong Chitin.

Tuy nhiên, đây là một cách đơn giản nhất có thể giúp ta có kết quả, nhưng rõ ràng độ chính xác không thoả mãn khi so sánh với những phương pháp phân tích phổ cấu trúc như Hồng ngoại (IR), Cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).

Bảng 2. Kết quả tính toán độ Deacetyl hoá của một số mẫu Chitosan theo phương pháp hoá học kết hợp tính toán.

| STT | Tên sản phẩm | Nitơ tổng số (N) % | Độ deacetyl (DD) % |
|-----|--------------|--------------------|--------------------|
| 1 | Mẫu PDP | 8,31 | 79% |
| 2 | Mẫu HQ | 7,75 | 48% |
| 3 | Mẫu NB | 8,36 | 81,67% |
| 4 | Mẫu PDP 7a | 6,98 | 5% |
| 5 | Mẫu PDP 7b | 6,56 | 0% |
| 6 | Mẫu PDP 12 | 6,92 | 2% |

Kết quả trong bảng 2 cho thấy không thể áp dụng đối với các sản phẩm Chitosan có hàm lượng tổng Nitơ thấp dưới <8,0 % vì kết quả sẽ không đúng. Khi so sánh kết quả với phương pháp đo phổ hồng ngoại dưới đây có thể chứng minh một cách rõ ràng cho kết luận trên.

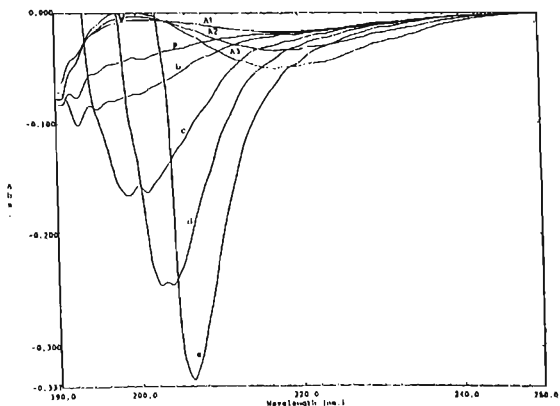
Bảng 3. Kết quả xác định DD bằng quang phổ hồng ngoại (IR)

| STT | Ký hiệu mẫu | HH-TT | IR | RD |
|-----|-------------|--------|-----|-----|
| 1 | Mẫu PDP | 79% | 85% | 7% |
| 2 | Mẫu HQ | 48% | 77% | 38% |
| 3 | Mẫu NB | 81,67% | 90% | 9% |
| 4 | Mẫu PDP 12 | 2% | 66% | 96% |

2. Phương pháp đo đạo hàm bậc nhất phổ UV [14]

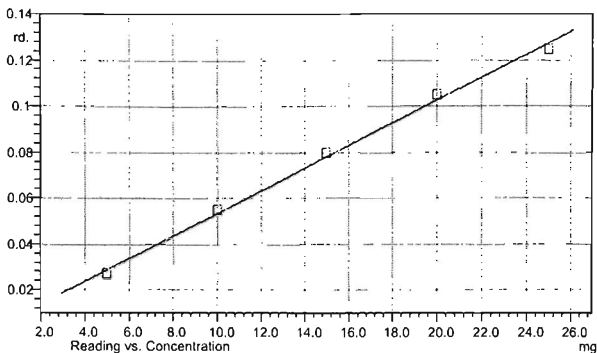
Theo các tác giả Su Ching Tan và CCS [13], thì phương pháp đạo hàm bậc nhất phổ tử ngoại (1DUVS) của Chitosan có thể áp dụng như một phương pháp tiêu chuẩn để xác định chính xác độ DD của Chitosan tương đương với kết quả đo bằng Cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Phương pháp đo đạo hàm bậc nhất phổ UV có những ưu điểm so với các phương pháp khác ở chỗ: cần lượng mẫu phân tích rất nhỏ, các hoá chất, thuốc thử và thiết bị đơn giản. Hơn nữa, kết quả thu được không bị ảnh hưởng bởi hàm lượng protein còn tồn dư trong mẫu. Ba bước cơ bản phải thực hiện trong phương pháp UV:

- Xác định điểm cắt zero (ZCP) bằng cách chồng các phổ đạo hàm bậc nhất của axit axêtic 0,010; 0,020 và 0,030 M tại bước sóng 203 nm (hình 4).



Hình 4. Đạo hàm bậc nhất phổ UV của các dung dịch Chitosan : A1, A2 và A3: 0,01M; 0,02M; 0,03M axit acetic và các phổ a, b, c, d, e của các dung dịch Chitosan sau: 0,05 mg; 0,10 mg; 0,25 mg; 0,50mg; 1,0mg/0,01 M axit acetic.

- Lập đường chuẩn từ N- acetyl - D - glucosamine tinh khiết trong axit acetic (hình 5).



Hình 5. Đường chuẩn để xác định độ DD của chitosan, trục tung là giá trị H (mm) và trục hoành là nồng độ N-acetyl D-glucosamin (GlcNAc).

- Xác định độ DD của chitosan, cân mẫu chitosan khoảng 0,010g hoà trong 10 ml axit acetic 0,10 M và định mức với nước cất đến thể tích 100ml. Giá trị H thu được áp vào đường chuẩn để tìm ra GlcNAc. Độ DD sẽ được xác định theo công thức:

$$DD = 100 - \left(\frac{A}{(W-204A)/161+A} \right) \times 100$$

Ở đây, A là lượng GlcNAc xác định/204 và W là lượng cân của mẫu chitosan đem phân tích.

Dưới đây là những kết quả của chúng tôi đã thu được khi áp dụng phương pháp UV.

| STT | Nguồn gốc mẫu | DD% | DD % (cho trước) |
|-----|------------------------------|-------|------------------|
| 1 | Mẫu Wako | 84% | min. 80.0 |
| 2 | Mẫu Katakura Chikka Rin Ltd. | 83,5% | 83% |
| 3 | PDP 03 | 60% | 86% (IR) |
| 4 | PDP 04 | 45% | 60% (IR) |

V. KẾT LUẬN

Phương pháp tiêu chuẩn cơ sở để kiểm tra chất lượng của phụ gia thực phẩm thay thế hàn the có nguồn gốc Chitosan tự nhiên đã được xây dựng và kiểm nghiệm qua các sản phẩm thực tế của đế tài trong chương trình KC 10 – 20 cho thấy khả năng áp dụng tốt. Mặt khác, hiện nay trên thị trường đã có rất nhiều sản phẩm có nguồn gốc chitosan như các loại thuốc bổ dưỡng, chống béo phì vv. Vì vậy việc xây dựng phương pháp tiêu chuẩn để kiểm tra chất lượng các sản phẩm là rất cần thiết. Riêng quy trình xác định độ DD chỉ mới được nghiên cứu và áp dụng tại phòng KH&KT Phân tích của viện Hoá học, các tác giả mong muốn thông qua Hội nghị Đo lường Việt Nam sẽ được hỗ trợ kinh phí và pháp lý để tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện phương pháp phổ UV trở thành phương pháp tiêu chuẩn xác định độ DD của Chitosan.

VI. LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn chương trình KC 10 –20 và hội đồng Khoa học Tự nhiên đã cung cấp mẫu, hỗ trợ kinh phí để thực hiện được những nghiên cứu trong bài báo này.

Tài liệu tham khảo:

1. Dr. William Horwitz, Editor.
2. *Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Edition.*
3. CEN, November 2000, PrEN 14084:2000.
4. TCVN 6468:1998 - Phụ gia thực phẩm: Phương pháp xác định các thành phần vô cơ.
5. Bộ Y tế số 837/1998/QĐ-BYT v/v Ban hành "Danh mục tiêu chuẩn vệ sinh đối với lương thực, thực phẩm".
6. Dược điển Việt Nam tập II.
7. Hiral A. , Odan H. and Nakajima A. (1991), polymer Bull. 26, 87-94.
8. Tanveer A. K. Kok Khiang Peh et al. (2002); J. Pharm Pharmaceut. Sci. 5(3), 205-212.
9. Miya M. Iwamoto R. and Mima S. (1980); Int. J. Biol. Macromol, Vol. 2, october, 323-324.
10. Baxter A., Dillon M., Anthony Taylor et al. Int. J. Biol. Macromol. June vol. 14, 166-169.
11. Knapczyk J., Knowczynski L. et al. (1989) Els. Appl. Sci. 657-662.
12. Curotto E. Aros F. (1993), C.A. vol. 119, Nr7, 66995 K.
13. Nguyễn Hoàng Hà - Tạp chí Dược học số 9/1996 [14], trang 24-25.
14. Su Ching Tan, Eugene Khor et al. Talanta 45 (1998) 713-719.
15. Vũ Đức Lợi, Lê Lan Anh và CCS, Tạp chí Hoá học (English – in press).