

TCVN 7081 - 2 : 2002

~~ISO 12080 - 2 : 2000~~

SỮA BỘT GẦY – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VITAMIN A
PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG
SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Dried skimmed milk – Determination of vitamin A content
Part 2: Method using high-performance liquid chromatography

HÀ NỘI – 2002

Lời nói đầu

TCVN 7081 - 2 : 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 12080 - 2 : 2000;

TCVN 7081 - 2 : 2002 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành.

Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A

Phần 2: Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Dried skimmed milk – Determination of vitamin A content

Part 2: Method using high-performance liquid chromatography

Cảnh báo — Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các chất liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn khi sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định vitamin A trong sữa bột gầy chứa ít nhất 10 IU (đơn vị quốc tế) vitamin A trên gam.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1 Hàm lượng vitamin A của sữa bột gầy (Vitamin A content of dried skimmed milk): Phần khối lượng của các chất xác định được bằng qui trình qui định trong tiêu chuẩn này.

Chú thích — Hàm lượng vitamin A được biểu thị bằng microgam retinol trên gam hoặc bằng đơn vị quốc tế của hoạt độ của vitamin A trên gam.

3 Nguyên tắc

Mẫu thử được xà phòng hoá và được chiết. Vitamin A được tách ra khỏi tạp chất bằng phương pháp HPLC. Hàm lượng này xác định được bằng detector UV hoặc detector huỳnh quang.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích, trừ khi có qui định khác và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

4.1 Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), 95 % (thể tích), không chứa aldehyt.

4.2 Dung dịch natri ascocbat, 200 g/l

Nếu không có sẵn, thì chuẩn bị bằng cách hoà 3,5 g axit ascocbic ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) trong 20 ml dung dịch natri hydroxit (NaOH) 1 mol/l và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

4.3 Dung dịch kali hydroxit, 50 % (theo khối lượng).

Hoà tan 50 g kali hydroxit (KOH) trong 50 ml nước. Trộn và làm nguội dung dịch. Chuẩn bị dung dịch mới trước khi sử dụng.

4.4 Dung dịch nước cồn kali hydroxit, 30 g/l.

Hoà tan 3 g kali hydroxit (KOH) trong nước và thêm 10 ml etanol (4.1) vào bình định mức 100 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch 100 ml và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới trước khi sử dụng.

4.5 Dầu nhẹ, có dải sôi từ 40°C đến 60°C hoặc từ 60°C đến 80°C.

4.6 Metanol (CH_3OH), loại dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPCL).

4.7 Pha động: Hỗn hợp metanol và nước, ví dụ tỷ lệ 90 : 10 (theo thể tích), (xem chú ý trong 8.5).

4.8 Dung dịch vitamin A tiêu chuẩn

Sử dụng dung dịch vitamin A chuẩn theo tiêu chuẩn của US Pharmacopeia ¹⁾ được pha chế từ crystallin all-trans-retinyl axetat trong dầu hạt bông, tương đương với 30 mg retinol (vitamin A dạng rượu, $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$) trên gam dầu, hoặc theo công bố khi bán.

¹⁾ Dung dịch đối chứng vitamin A từ đơn vị qui ước States Pharmacopeia Convention, Inc. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Maryland 20852, USA, là một ví dụ về sản phẩm phù hợp sẵn có. Thông tin đưa ra thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

Cắt một đầu của vỏ ống chứa dung dịch vitamin A tiêu chuẩn cho dầu chảy vào bình xà phòng hoá. Cân khoảng 20 mg dung dịch tiêu chuẩn, chính xác đến 0,1 mg. Thêm 40 ml etanol (4.1), 10 ml dung dịch natri ascocbat (4.2) và 10 ml dung dịch kali hydroxit (4.3).

Xà phòng hoá và chiết như mô tả trong 8.3.2 đến 8.3.6. Chuẩn bị dung dịch đối chứng tiêu chuẩn bằng cách tiến hành như trong 8.4.

4.9 Hydroxytoluen đã butylat hoá (BHT)

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị phòng thử nghiệm thông thường và đặc biệt như sau:

5.1 Sắc ký lỏng, được gắn với detector tia cực tím

Các điều kiện thao tác điển hình:

- Detector UV loại có thể thay đổi để khống chế được độ hấp thụ ở bước sóng 325 nm, hoặc loại có bước sóng từ 300 nm đến 360 nm với độ nhạy của detector là 0,128 AUFS (đơn vị hấp thụ trên toàn thang đo);
- tốc độ rửa giải 2 ml/min (khoảng 100 atm);
- nhiệt độ môi trường xung quanh;
- thể tích bơm 20 µl;
- tốc độ vẽ đồ thị 10 mm/min.

Khi sử dụng detector huỳnh quang, thì đặt ở bước sóng 325 nm để kích thích bức xạ và đặt ở bước sóng 450 nm để phát xạ.

5.2 Cột sắc ký, bằng thép không gỉ, 250 mm x 4,6 mm, được nhồi bằng C8 hoặc C18 với cỡ hạt 10 µm, được liên kết hoá học thành các các hạt microsilica xốp hoặc cột có tính năng tương đương.

5.3 Cốc có mở hoặc bình nón, dung tích 250 ml.

5.4 Bình cầu xà phòng hoá, dung tích khoảng 200 ml, được gắn với bộ sinh hàn ngược.

5.5 Bình định mức, dung tích 100 ml và 200 ml.

5.6 Pipet một vạch, dung tích 10 ml, 25 ml và 50 ml.

5.7 Bồn hơi, bếp cách thuỷ hoặc hoặc bếp cách khí dùng điện.

5.8 Nồi cách thuỷ, có thể duy trì nhiệt độ đến 40°C.

5.9 Phễu chiết, dung tích 500 ml, thích hợp là loại có nút đậy bằng polytetrafluoroetylen (PTFE).

5.10 Bể siêu âm.

5.11 Giấy lọc, đường kính 9 cm.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 : 1998 (ISO 707) [1].

Điều quan trọng là phòng thí nghiệm nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc không bị biến đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Trộn đều mẫu thử bằng cách liên tục xoay và lật ngược vật chứa mẫu nhiều lần. Nếu cần, chuyển hết mẫu thử sang vật chứa kín có dung tích vừa đủ.

8 Cách tiến hành

8.1 Khái quát

Chú thích – Nếu cần phải kiểm tra sự thoả mãn về giới hạn độ lặp lại (10.2), thì tiến hành hai phép xác định đơn theo 8.2 đến 8.5.

Đối với tất cả các thao tác, thực hiện trong ánh sáng dịu hoặc sử dụng đồ thuỷ tinh có độ quang hoá thấp.

8.2 Dung dịch thử

Cân khoảng 20 g mẫu thử chính xác đến 0,001 g cho vào trong cốc có mỏ hoặc bình nón (5.3) và hoà tan chúng trong 50 ml nước nóng ở nhiệt độ thấp nhất là 80°C. Dùng dao trộn hoặc sử dụng bể siêu âm (5.10) để phá vỡ các cục bị vón thành tảng. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Chuyển toàn bộ lượng này sang bình định mức 100 ml (5.5). Pha loãng bằng nước đến vạch 100 ml.

8.3 Xà phòng hoá và chiết

8.3.1 Dùng pipet (5.6) chuyển 25 ml dung dịch thử đã chuẩn bị (8.2) sang bình xà phòng hoá (5.4). Thêm 20 ml dung dịch kali hydroxit (4.3) và 10 ml dung dịch natri ascobat (4.2). Thêm 50 ml etanol (4.1) và lắc đều.

8.3.2 Chung cất hồi lưu 30 phút trên bồn hơi (5.7) và thỉnh thoảng khuấy. Làm nguội nhanh dưới dòng nước chảy.

8.3.3 Chuyển dung dịch lỏng sang phễu chiết (5.9), tráng bình 2 lần mỗi lần 30 ml nước, tiếp theo hai lần mỗi lần 10 ml etanol (4.1) và hai lần mỗi lần 40 ml dầu nhẹ (4.5). Lắc mạnh trong 30 giây và để yên cho đến khi có hai lớp rõ ràng. Chuyển pha lỏng (pha dưới) sang phễu chiết thứ hai và lắc với hỗn hợp của 10 ml etanol (4.1) và 40 ml dầu nhẹ (4.5). Để cho phân lớp.

8.3.4 Chuyển pha lỏng sang phễu chiết thứ ba và dung dịch pha dầu nhẹ sang phễu chiết thứ nhất. Rửa phễu chiết thứ hai hai lần, mỗi lần dùng 10 ml dầu nhẹ (4.5). Cho dịch rửa vào phễu chiết thứ nhất.

8.3.5 Lắc pha lỏng với 40 ml dầu nhẹ (4.5) và 10 ml etanol (4.1). Cho pha dầu nhẹ vào phễu chiết thứ nhất. Rửa dịch chiết dầu nhẹ ba lần, mỗi lần dùng 40 ml dung dịch nước cồn kali hydroxit (4.4) mới chuẩn bị, lắc mạnh. Sau đó dùng mỗi lần 40 ml nước để rửa tiếp cho đến khi dịch rửa cuối cùng trung tính phenolphthalein. Tháo khô hết nước, cho qua hai tấm giấy lọc (5.11) được cắt thành dải vào phễu chiết và lắc.

8.3.6 Chuyển dịch chiết dầu nhẹ đã được làm khô như mô tả ở trên sang bình định mức 200 ml (5.4). Tráng phễu chiết và giấy lọc bằng dầu nhẹ (4.5), cho nước rửa vào bình định mức, rồi thêm từ 10 mg đến 20 mg BHT (4.10). Pha loãng bằng dầu nhẹ đến vạch 200 ml và lắc.

8.4 Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch đối chứng

Dùng pipet lấy các phần dịch chiết đã pha loãng (8.3.6) thu được từ dung dịch thử (8.2) và dung dịch vitamin A tiêu chuẩn (4.8) cho vào các bình đáy tròn riêng biệt. Cho bay hơi đến khô trong chân không bằng cách xoay bình trong nồi cách thuỷ (5.8) ở nhiệt độ không quá 40°C. Làm nguội bình dưới dòng nước chảy và hồi lại áp suất không khí, tốt nhất là bằng khí nitơ. Hoà tan ngay phần còn lại trong 10,0 ml etanol (4.6).

8.5 Xác định

Bơm 20 µl dung dịch thử và dung dịch đối chứng (8.4) lên cột và chỉnh các điều kiện thao tác của detector để cho các pic của vitamin A lớn nhất có thể trên thang đo. Đo diện tích pic của vitamin A.

Chú ý – Các chi tiết của qui trình sắc ký khác nhau phụ thuộc vào các thiết bị, chủng loại, thời gian sử dụng và nhà cung cấp cột, cách nạp dung dịch thử và dung dịch đối chứng, cỡ mẫu và detector. Tỷ lệ giữa metanol và nước sẽ thay đổi theo các yếu tố này; việc tăng hàm lượng nước của pha động sẽ làm tăng thời gian lưu.

9 Tính và biểu thị kết quả

Tính hàm lượng vitamin A, *w*, bằng microgam retinol trong một gam (hoặc hoạt độ của vitamin A, biểu thị bằng đơn vị quốc tế trên gam), theo công thức sau:

$$w = \frac{c.A_s.V_1.V_3.V_4}{A_r.V_2.V_5.m}$$

trong đó

c là nồng độ retinol, trong dung dịch đối chứng (8.4), tính bằng microgam trên mililit (hoặc hoạt độ của vitamin A tính bằng IU trên mililit);

A_s là giá trị bằng số diện tích pic của vitamin A trong dung dịch thử (8.5);

A_r là giá trị bằng số diện tích pic của vitamin A trong dung dịch đối chứng (8.5);

V₁ là tổng thể tích dịch chiết dầu nhẹ (*V₁* = 200 ml), tính bằng mililit;

V₂ là thể tích dung dịch được lấy từ *V₁* (8.4), tính bằng mililit;

V₃ là thể tích metanol dùng để hoà tan phần còn lại (*V₃* = 10 ml), tính bằng mililit;

V₄ là tổng thể tích dung dịch thử (8.2) (*V₄* = 100 ml), tính bằng mililit;

V₅ là thể tích phần dung dịch thử (8.3.1) (*V₅* = 25 ml), tính bằng mililit;

m là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của liên phòng thử nghiệm tiến hành theo TCVN 6910 : 2001 (ISO 5725) về độ chụm của phương pháp đã được xuất bản [4]. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và matrix khác với các giá trị đã nêu.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn độc lập, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau trong một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, lớn hơn 14% trung bình cộng của hai kết quả trong không quá 5% các trường hợp.

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn độc lập, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các nhà phân tích khác nhau sử dụng các thiết bị khác nhau, lớn hơn 42% trung bình cộng của hai kết quả trong không quá 5% các trường hợp.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ ra được

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thu được và nếu kiểm tra độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(tham khảo)

Hoạt độ được biểu thị bằng đơn vị quốc tế (IU)

A.1 Hoạt độ của vitamin A

Hoạt độ của vitamin A được biểu thị bằng đơn vị quốc tế. Người ta đã xác định được rằng 1 IU của vitamin A tương đương với hoạt độ 0,344 μg all-trans-retinyl axetat [5].

Hoạt độ của các hợp chất vitamin A khác được tính theo phép định lượng hoá học sao cho 1 IU tương đương với hoạt độ của 0,300 μg all-trans-retinol, 0,359 μg all-trans-retinyl propionat hoặc 0,500 μg all-trans-retinyl palmitat tương ứng.

Điều đó có nghĩa là hoạt độ của 1 g all-trans-vitamin A dạng rượu tinh khiết và este, biểu thị bằng đơn vị quốc tế, bằng:

- 3 333 000 IU Vitamin A dạng rượu (retinol);
- 2 907 000 IU Vitamin A axetat;
- 2 785 000 IU Vitamin A propionat;
- 1 818 000 IU Vitamin A palmitat.

A.2 Phân tích chất chuẩn vitamin A (vitamin A dạng este, tinh khiết hoặc hoà tan trong dầu) [5]

Cân từ 25 mg đến 100 mg vitamin A dạng este chính xác đến 0,1%, cho vào bình. Hoà tan khối lượng cân được trong 5 ml pentan và pha loãng bằng 2 – propanol để thu được nồng độ từ 10 IU/ml đến 15 IU/ml, tuỳ thuộc vào số lượng cân. Kiểm tra xem độ hấp thụ tối đa, A_m , của dung dịch đã nằm trong khoảng từ 325 nm đến 327 nm hay chưa, dùng 2-propanol làm dung dịch mẫu trắng. Đo độ hấp thụ, A_n , ở bước sóng 300 nm, 326 nm, 370 nm.

Tính tỷ lệ A_n/A_m đối với từng bước sóng nói trên. Nếu tỷ lệ này không vượt quá các giá trị 0,593 ở bước sóng 300 nm, 0,537 ở bước sóng 350 nm, hoặc 0,142 ở bước sóng 370 nm tương ứng, thì tính hàm lượng vitamin A, w , theo đơn vị quốc tế trên gam, bằng công thức:

$$w = \frac{A_m \cdot V \cdot d}{100m}$$

trong đó

A_m là giá trị số học của độ hấp thụ cực đại thu được ở bước sóng 326 nm;

V là tổng thể tích vitamin A dạng este đã pha loãng để có nồng độ từ 10 IU/ml đến 15 IU/ml;

d là hệ số chuyển đổi từ độ hấp thụ cụ thể của vitamin A dạng este thành đơn vị quốc tế trên gam ($d = 1\,900$);

m là khối lượng của vitamin A dạng este cân được, tính bằng gam.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 : 1998 (ISO 707) Sữa và sản phẩm sữa – Lấy mẫu.
 - [2] TCVN 6910 – 1 : 2001 (ISO 5725-1:1994) Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa
 - [3] TCVN 6910 – 2 : 2001 (ISO 5725-2:1994) 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] DE VRIES, E.J.et al., Bulletin of IDF, No. 285, pp. 53-64.
 - [5] European Pharmacopoeia, Monograph vitamin A.
-