

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 8476:2010**

**Xuất bản lần 1**

**SỮA BỘT VÀ THỨC ĂN DẠNG BỘT  
THEO CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG TAURINE  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG**

*Powdered milk and powdered infant formula –  
Determination of taurine content by the liquid chromatographic method*

**HÀ NỘI – 2010**

**Lời nói đầu**

TCVN 8476:2010 được xây dựng dựa trên cơ sở AOAC 997.05  
*Taurine in Powdered Milk and Powdered Infant Formulae. Liquid  
Chromatographic Method*;

TCVN 8476:2010 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn,  
Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định,  
Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## **Sữa bột và thức ăn dạng bột theo công thức dành cho trẻ sơ sinh – Xác định hàm lượng taurine bằng phương pháp sắc kí lỏng**

*Powdered milk and powdered infant formula –*

*Determination of taurine content by the liquid chromatographic method*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng taurine (nội sinh và bổ sung) trong sữa bột và thức ăn dạng bột theo công thức dành cho trẻ sơ sinh có chứa từ 5 mg/100 g đến 100 mg/100 g chất khô.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho các nguyên liệu thủy phân protein.

### **2 Nguyên tắc**

Sản phẩm được hoàn nguyên trong nước, protein và chất béo được loại ra bằng cách làm kết tủa. Một lượng dịch lọc xử lý với dansyl clorua để tạo thành dẫn xuất taurine, dẫn xuất này được tách ra và được xác định bằng sắc kí lỏng có detector tử ngoại (UV) hoặc detector huỳnh quang.

### **3 Thuốc thử**

**3.1 Nước**, được tinh sạch có điện trở > 18 MΩ.

**3.2 Axetonitril**, loại dùng cho sắc kí lỏng.

**3.3 Axit axetic băng**, loại tinh khiết phân tích.

**3.4 Dung dịch đệm natri axetat**, 10 mM, pH 4,2.

Cho 0,820 g natri axetat vào bình định mức 1000 ml (4.4.2) và hòa tan trong 800 ml nước. Chỉnh pH đến 4,2 bằng axit axetic băng và pha loãng bằng nước đến vạch.

## TCVN 8476:2010

Dung dịch đệm natri axetat có thể bền trong 3 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

### 3.5 Pha động, hỗn hợp của dung dịch đệm natri axetat-axetonitril (84 + 16 phần thể tích)

Trộn 840 ml dung dịch đệm natri axetat với 160 ml axetonitril và lọc qua bộ lọc màng (4.3). Chuẩn bị pha động này ngay trong ngày sử dụng.

### 3.6 Pha làm sạch cột, axetonitril, được lọc trong ngày sử dụng.

### 3.7 Dung dịch đệm natri cacbonat, 80 mM, pH 9,5.

Cân 0,424 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (dạng khan) cho vào bình định mức 50 ml (4.4.2) và hòa tan trong nước với một lượng nhỏ. Chính pH đến 9,5 bằng HCl 1 M (8,3 ml HCl đã pha loãng bằng nước đến 100 ml) và thêm nước đến vạch.

Dung dịch đệm natri cacbonat có thể bền trong 3 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

### 3.8 Thuốc thử Carrez I

Cân 15,0 g kali hexaxyanoferrat (II) ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) cho vào bình định mức 100 ml (4.4.2) và hòa tan trong nước. Thêm nước đến vạch.

Thuốc thử Carrez I có thể bền trong 3 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

### 3.9 Thuốc thử Carrez II

Cân 30,0 g kẽm axetat ngậm hai mol nước [ $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] cho vào bình định mức 100 ml (4.4.2) và hòa tan trong nước. Thêm nước đến vạch.

Thuốc thử Carrez II có thể bền trong 3 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

### 3.10 Thuốc thử dansyl clorua, 1,5 mg/ml

Hòa tan 15 mg 5-dimetylaminonaphthalene-1-sulphonyl clorua (dansyl clorua) trong 10 ml axetonitril. Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng. Dansyl clorua là chất ăn mòn và nhạy với độ ẩm và ánh sáng.

### 3.11 Dung dịch metylamin hydro clorua, 20 mg/ml

Hòa tan 2,0 g metylamin hydro clorua trong 100 ml nước. Cách khác, pha loãng 2,0 ml dung dịch metylamin hydro clorua 25 % đến 25 ml.

Dung dịch metylamin hydro clorua bền trong 3 tháng khi được bảo quản ở 4 °C.

### 3.12 Dung dịch chuẩn taurine.

#### 3.12.1 Dung dịch chuẩn gốc taurine, 0,1 mg/ml

Cân khoảng 10 mg taurine và hòa tan trong 100 ml nước.

Dung dịch gốc này có thể bền trong 1 tuần khi được bảo quản ở 4 °C.

#### 3.12.2 Dung dịch chuẩn hiệu chuẩn taurine

Pha loãng dung dịch chuẩn gốc taurine trong nước để có được các dung dịch chứa taurine: 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml và 20 µg/ml. Chuẩn bị trong ngày sử dụng. Sử dụng nước làm dung dịch hiệu chuẩn zero.

## 4 Thiết bị, dụng cụ

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

### 4.1 Thiết bị sắc kí lỏng (LC)

Thiết bị đẳng dòng hoặc có gradient, với detector tử ngoại (UV) cài đặt ở bước sóng 254 nm và/hoặc detector huỳnh quang (bước sóng kích thích 330 nm; bước sóng phát xạ 530 nm). Hệ thống có thể điều khiển bằng tay hoặc tự động với bộ tích phân điện tử hoặc xử lý dữ liệu tự động trên máy tính. Tốc độ dòng từ 1 ml/min đến 2 ml/min; thời gian rửa giải của dansyl-aurine là 10 min đến 15 min (hàm lượng axetonitril của pha động có thể được thay đổi chút ít để chỉnh thời gian lưu, tùy thuộc vào đặc tính của cột LC được sử dụng).

### 4.2 Cột LC

Khuyến cáo sử dụng cột pha đảo C18 được nhồi bằng silica loại hạt hình cầu cỡ 5 µm, chứa hàm lượng carbon lớn hơn 10 %. Cột có thể được bịt ở đầu cuối hoặc không và có thể được làm bằng thép không gỉ, được nén tròn hoặc dạng hộp. Kết hợp với cột bảo vệ có chứa vật liệu nhồi tương tự.

4.3 Bộ lọc màng thấm nước, cỡ lỗ 0,45 µm và giấy lọc loại trung bình (Whatman số 2 hoặc loại tương đương).

### 4.4 Dụng cụ thủy tinh

4.4.1 Pipet hoặc bộ phân phối tự động.

4.4.2 Bình định mức, dung tích 50 ml, 100 ml và 1 000 ml.

4.4.3 Ống đong chia độ.

4.4.4 Lọ thủy tinh phản ứng, 5 ml.

4.5 Máy đo pH, loại kỹ thuật số, đo chính xác đến 0,01 đơn vị pH.

4.6 Máy trộn Vortex.

## 5 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc 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)<sup>[2]</sup>.

## 6 Cách tiến hành

### 6.1 Chuẩn bị dung dịch thử

#### 6.1.1 Chiết và phân tách

Cân chính xác 3,0 g phần mẫu thử dạng bột cho vào bình định mức 100 ml (4.4.2) hoặc ống đong chia độ (4.4.3). Cũng chuẩn bị đồng thời một mẫu trắng thuốc thử. Thêm khoảng 80 ml nước (3.1) và hòa tan mẫu ở nhiệt độ 50 °C đến 60 °C có khuấy trong 10 min. Làm nguội đến nhiệt độ môi trường. Thêm 1,0 ml thuốc thử Carrez I (3.8), xoay mạnh bình và thêm 1,0 ml thuốc thử Carrez II (3.9). Trộn và để yên 20 min, thỉnh thoảng lắc đảo bình. Pha loãng bằng nước đến vạch. Trộn kỹ và lọc qua giấy lọc trung bình (4.3), loại bỏ khoảng 3 ml đến 5 ml dịch lọc đầu tiên và thu lấy 5 ml đến 10 ml vào lọ thủy tinh (4.4.4). Dịch chiết có thể được bảo quản ở 4 °C đến 24 h ở nơi tối trước khi tạo dẫn xuất.

Đối với sữa dạng lỏng hoặc sữa pha chế sẵn để uống, cân khoảng 25 g và pha loãng bằng nước đến khoảng 80 ml. Sau đó thực hiện tiếp như trên bắt đầu đoạn "Thêm 1,0 ml thuốc thử Carrez I ...".

#### 6.1.2 Tạo dẫn xuất

Dùng pipet (4.4.1) lấy các phần 1,0 ml của dung dịch chuẩn hiệu chuẩn taurine (3.12.2), dịch chiết của dung dịch thử và mẫu trắng trong 6.1.1 cho vào các lọ thủy tinh phản ứng 5 ml (4.4.4) riêng rẽ đã được dán nhãn. Thêm 1,0 ml dung dịch đệm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3.7), sau đó thêm 1,0 ml dansyl clorua (3.10). Đậy nắp lọ và trộn bằng cách đảo chiều. Để yên các lọ này 2 h ở nơi tối ở  $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ , sau 1 h thì lắc trộn thêm (màu vàng vẫn tiếp tục bị nhạt đi do thuốc thử).

Thêm 0,1 ml metylamin hydro clorua (3.11) để kết thúc phản ứng. Trộn trên máy Vortex (4.6) và để yên nơi tối cho đến khi kết tủa (cách khác, lọc qua bộ lọc màng 0,45  $\mu\text{m}$  (4.3)). Chuyển đủ một lượng của phần dịch trong nổi phía trên sang lọ thủy tinh. Dẫn xuất này có thể được bảo quản nơi tối ở 4 °C đến 48 h trước khi tách pha.