TCVN **TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

TCVN 7081-2:2010
ISO 12080-2:2009

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

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

HÀ NỘI - 2010

Lời nói đầu

TCVN 7081-2:2010 thay thế TCVN 7081-2:2002;

TCVN 7081-2:2010 hoàn toàn tương đương với ISO 12080-1:2009/IDF 142-2:2009;

TCVN 7081-2:2010 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia 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 công bố.

Bộ TCVN 7081 (ISO 12080) *Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A* bao gồm các phần sau:

- TCVN 7081-1:2010 (ISO 12080-1:2009), *Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A – Phương pháp so màu;*

- TCVN 7081-2:2010 (ISO 12080-2:2009), *Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A – Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao.*

Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A – Phần 2: Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

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

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn và sức khoẻ thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí 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 sử 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 quy trình quy 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 vitamin A trên gam.

3 Nguyên tắc

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

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Etanol (CH_3CH_2OH), 95 % phần thể tích, không chứa aldehyt.

4.2 Dung dịch natri ascorbat, 200 g/l. Nếu không có dung dịch pha chế sẵn, thì chuẩn bị bằng cách hoà tan 3,5 g axit ascorbic ($C_6H_8O_6$) trong 20 ml dung dịch natri hydroxit (NaOH) 1 mol/l và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới này trong ngày sử dụng.

4.3 Dung dịch kali hydroxit (KOH), 50 % phần khối lượng. Hoà tan 50 g kali hydroxit trong 50 ml nước. Trộn và làm nguội dung dịch. Chuẩn bị dung dịch ngay trước khi sử dụng.

4.4 Dung dịch cồn nước 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 một vạch 100 ml. Thêm nước đến vạch và trộn. Chuẩn bị dung dịch này ngay 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 kí lỏng hiệu năng cao (HPLC).

4.7 Pha động: Hỗn hợp metanol (4.6) và nước, ví dụ: 90 + 10 (phần thể tích), (xem Chú ý trong 8.5).

4.8 Dung dịch chuẩn vitamin A. Sử dụng dung dịch chuẩn đối chứng vitamin A của US Pharmacopeia [1)] được pha chế từ crystalin all-*trans*-retinyl axetat trong dầu hạt bông, tương đương với 30 mg retinol (vitamin A dạng rượu, $C_{20}H_{30}O$) trên gam dầu, hoặc theo công bố khi sản phẩm được bán.

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

Tiến hành xà phòng hoá và chiết như quy định trong 8.3.2 đến 8.3.6. Chuẩn bị dung dịch chuẩn đối chứng theo quy định trong 8.4.

4.9 Butylat hydroxytoluen (BHT).

5 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:

[1)] Sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

5.1 Sắc kí lỏng, có detector UV

Các điều kiện vận hành điển hình:

- detector UV có thể đo được độ hấp thụ ở bước sóng 325 nm, hoặc detector cố định bước sóng trong khoảng 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 dòng rửa giải 2 ml/min (khoảng 10 MPa);
- nhiệt độ môi trường;
- thể tích bơm 20 µl;
- tốc độ vẽ đồ thị 10 mm/min.

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

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

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

5.4 Bình xà phòng hoá, dung tích khoảng 200 ml, được gắn với bộ ngưng hồi lưu.

5.5 Bình định mức một vạch, dung tích 100 ml và 200 ml, phù hợp với loại A quy định trong TCVN 7153 (ISO 1042)[3].

5.6 Pipet một vạch, dung tích 10 ml, 25 ml và 50 ml, phù hợp với loại A quy định trong TCVN 7151 (ISO 648)[1].

5.7 Nồi hơi, nồi cách thuỷ có thể đun đến sôi hoặc **bếp 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 Thiết bị siêu âm.

5.11 Giấy lọc, đường kính 90 mm.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)[2].

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.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Trộn kỹ mẫu thử bằng cách xoay và đảo chiều hộp đựng mẫu nhiều lần. Nếu cần, chuyển hết mẫu thử sang vật chứa kín khí có dung tích vừa đủ.

8 Cách tiến hành

8.1 Yêu cầu chung

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

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

8.2 Dung dịch thử

Cân khoảng 20 g sữa bột, chính xác đến 0,001 g, cho vào 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 thiết bị siêu âm (5.10) để phá vỡ các cục bị vón thành mảng. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Chuyển toàn bộ lượng này sang bình định mức một vạch 100 ml (5.5). Thêm nước đến vạch.

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 ascorbat (4.2). Thêm 50 ml etanol (4.1) và lắc đều.

8.3.2 Chưng cất hồi lưu 30 min trên nồi hơi (5.7) và thỉnh thoảng xoay bình. Làm nguội nhanh dưới dòng nước chảy.

8.3.3 Chuyển dung dịch lỏng sang phễu chiết (5.9), tráng bình hai lần, mỗi lần dùng 30 ml nước, 10 ml etanol (4.1) và 40 ml dầu nhẹ (4.5). Lắc mạnh trong 30 s và để yên cho đến khi tách thành hai pha rõ ràng.

Chuyển pha nước (phía 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 tách pha.

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

8.3.5 Lắc pha nước 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 rửa tiếp, mỗi lần dùng 40 ml nước cho đến khi nước rửa cuối cùng trung tính với phenolphtalein. Loại bỏ hết nước, cho hai tấm giấy lọc (5.11) được cắt thành dải vào phễu chiết và lắc đều.

8.3.6 Chuyển dịch chiết dầu nhẹ đã loại nước (8.3.5) sang bình định mức một vạch 200 ml (5.5). Tráng phễu chiết và giấy lọc bằng dầu nhẹ (4.5), cho nước rửa vào bình định mức, rồi thêm khoảng từ 10 mg đến 20 mg BHT (4.9). Thêm dầu nhẹ đến vạch.

8.4 Chuẩn bị các 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 chuẩn vitamin A (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 nitơ. Hoà tan ngay phần cặn trong 10.0 ml metanol (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 quy trình sắc kí khác nhau phụ thuộc vào các thiết bị, kiểu 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 trên gam (hoặc hoạt độ của vitamin A, biểu thị bằng đơn vị quốc tế trên gam), theo công thức sau:

$$w = \frac{\rho \times A_s \times V_1 \times V_3 \times V_4}{A_r \times V_2 \times V_5 \times m}$$

trong đó:

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

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

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

V_1 là tổng thể tích dịch chiết dầu nhẹ (V_1 = 200 ml), tính bằng mililit (ml);

V_2 là thể tích dung dịch được lấy từ V_1 (8.4), tính bằng mililit (ml);

V_3 là thể tích metanol dùng để hoà tan phần cặn (V_3 = 10 ml), tính bằng mililit (ml);

V_4 là tổng thể tích dung dịch thử (8.2) (V_4 = 100 ml), tính bằng mililit (ml);

V_5 là thể tích phần dung dịch thử (8.3.1) (V_5 = 25 ml), tính bằng mililit (ml);

m là khối lượng của phần mẫu thử (8.2), tính bằng gam (g).

10 Độ chụm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm đã tiến hành theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)[4] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)[5] về độ chụm của phương pháp đã được công bố (Tài liệu tham khảo [6]). Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các dải nồng độ và các chất nền đã nêu.

10.1 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ 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, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 14 % trung bình cộng của hai kết quả.

10.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống thử hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 42 % trung bình cộng của các kết quả.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;

b) phương pháp lấy mẫu đã dùng, nếu biết;

c) phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;

d) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tuỳ ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;

e) kết quả thu được hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại, nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Biểu thị hoạt độ bằng đơn vị quốc tế (IU)

A.1 Hoạt độ vitamin A

Hoạt độ của vitamin A được biểu thị bằng đơn vị quốc tế. 1 IU của vitamin A được xác định là tương đương với hoạt độ 0,344 µg all-*trans*-retinyl axetat (xem Tài liệu tham khảo [7]).

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, sẽ bằng:

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

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

Xem Tài liệu tham khảo [7].

Cân từ 25 mg đến 100 mg vitamin A dạng este, chính xác đến 0,1 %, cho vào bình cầu. Hoà tan lượng cân được này trong 5 ml pentan, phụ thuộc vào lượng cân, và pha loãng bằng 2-propanol để thu được nồng độ từ 10 IU/ml đến 15 IU/ml.

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 chất lỏng bù (dung dịch trắng). Đo độ hấp thụ, A_n, ở bước sóng 300 nm, 326 nm, 370 nm.

Tính tỷ số A_n/A_m đối với từng bước sóng nói trên. Nếu tỷ số này không vượt quá 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:

$$w = \frac{A_m \times V \times f}{100 \times m}$$

trong đó:

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

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

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

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

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] TCVN 7151 (ISO 648), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet một mức.*

[2] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Lấy mẫu.*

[3] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức một vạch.*

[4] 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.*

[5] 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.*

[6] DE VRIES, E.J.et al. Dried skimmed milk - Determination of viatmin A - Colorimetric and liquid chromatographic methods, pp. 53-64. In: *Reference materials and interlaboratory collaborative studies (third series). [Bull.IDF* 1993, (285)].

[7] Vitamin A monograph. In: *European Pharmacopoeia.*