

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 11675:2016**

**Xuất bản lần 1**

**SỮA CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH -  
XÁC ĐỊNH VITAMIN D3 (CHOLECALCIFEROL) -  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG**

*Milk-based infant formula -  
Determination of cobalamin (vitamin B12 activity) - Turbidimetric method*

**HÀ NỘI - 2016**

## Lời nói đầu

TCVN 11675:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 992.26,  
*Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) in ready-to-feed milk-based infant formula.*  
*Liquid chromatographic method;*

TCVN 11675:2016 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13  
*Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn*  
*Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.*

**Sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh -****Xác định vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) - Phương pháp sắc ký lỏng**

*Milk-based infant formula - Determination of vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) -*

*Liquid chromatographic method*

**1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng để xác định hàm lượng vitamin D<sub>3</sub> trong sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh.

**2 Nguyên tắc**

Phần mẫu thử được xà phòng hóa và được chiết bằng ete. Bơm dịch chiết lên cột sắc ký lỏng (LC) silica để làm sạch. Dịch rửa giải chứa vitamin D<sub>3</sub> được định lượng bằng sắc ký lỏng trên cột silica có detector UV ở bước sóng 254 nm.

**3 Thuốc thử và vật liệu thử**

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

**3.1 Dung môi**

3.1.1 **Thuốc thử ancol**, có chứa 2-propanol 5 % và etanol 95 % đã biến tính đặc biệt.

3.1.2 **Etyl ete khan**, độ tinh khiết tối thiểu 98 %.

3.1.3 **Ete dầu mờ**.

3.1.4 **n-Pentanol**, độ tinh khiết tối thiểu 99 %.

3.1.5 **n-Hexan**, loại dùng cho LC, độ tinh khiết từ 85 % đến 100 %.

3.1.6 **Axeton**, loại dùng cho LC.

### 3.2 Kali hydroxit (KOH).

### 3.3 Axit ascorbic.

### 3.4 Dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub>

Tránh để dung dịch vitamin D<sub>3</sub> tiếp xúc với ánh sáng trăng, bọc bình bằng màng nhôm và bảo quản ở nhiệt độ 4 °C. Chuẩn bị các dung dịch mới sau 7 ngày.

#### 3.4.1 Dung dịch chuẩn gốc

Cân các lượng 10 mg chất chuẩn vitamin D<sub>3</sub>, chính xác đến 0,1 mg cho vào ba bình định mức 50 ml (4.9) đã được dán nhãn. Hòa tan và pha loãng bằng *n*-Hexan (3.1.5) đến vạch. Trộn kỹ. Ghi nhãn là dung dịch chuẩn gốc 1, 2 và 3.

#### 3.4.2 Dung dịch chuẩn trung gian

Dùng pipet (4.10) lấy 1,00 ml từ dung dịch chuẩn gốc (3.4.1) cho vào ba bình định mức 200 ml (4.9) riêng rẽ. Pha loãng bằng *n*-Hexan (3.1.5) đến vạch. Trộn kỹ. Ghi nhãn là dung dịch chuẩn trung gian 1, 2 và 3.

#### 3.4.3 Dung dịch chuẩn làm việc

Dùng pipet (4.10) lấy 25,0 ml, 15,0 ml và 7,0 ml dung dịch chuẩn trung gian 1, 2 và 3 (3.4.2), tương ứng, cho vào ba bình định mức 100 ml (4.9) riêng rẽ, được ghi nhãn lần lượt là I, II và III, chứa tương ứng khoảng 10 IU/ml, 6 IU/ml, 3 IU/ml. Pha loãng bằng *n*-Hexan (3.1.5) đến vạch và trộn kỹ.

### 3.5 Khí nitơ nén (N<sub>2</sub>).

### 3.6 Pha động 1, hỗn hợp *n*-Hexan + *n*-Pentanol (tỷ lệ thể tích 99,2 + 0,8).

### 3.7 Pha động 2, hỗn hợp *n*-Hexan + *n*-Pentanol (tỷ lệ thể tích 99,85 + 0,15).

## 4 Thiết bị, dụng cụ

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

#### 4.1 Hệ thống LC dùng để làm sạch, bao gồm:

##### 4.1.1 Bơm, có thể tạo áp lực 20 685 kPa (3 000 psi) và duy trì tốc độ dòng rửa giải 2 ml/min.

##### 4.1.2 Cột bảo vệ, dài 30 mm, đường kính trong 4,6 mm, được nhồi amin.

##### 4.1.3 Cột làm sạch pha thường, dài 250 mm, đường kính trong 4,6 mm, được nhồi silica.

4.1.4 **Detector UV**, độ nhạy 0,1 đơn vị đo độ hấp thụ trên toàn thang đo (AUFS), có bộ lọc bước sóng 254 nm.

4.1.5 **Bộ bơm mẫu**, thể tích vòng bơm từ 320  $\mu\text{l}$  đến 370  $\mu\text{l}$ .

4.1.6 **Bộ ghi dữ liệu**.

## 4.2 Hệ thống LC dùng để định lượng

4.2.1 **Bơm pittông kép**, có thể tạo áp lực 20 685 kPa và duy trì tốc độ rửa giải 3 ml/min.

4.2.2 **Cột phân tích pha thường**, dài 150 mm, đường kính trong 4,6 mm, được nhồi silica cỡ hạt 3  $\mu\text{m}$ .

4.2.3 **Detector UV**, độ nhạy khoảng 0,003 AUFS, có bộ lọc bước sóng 254 nm.

4.2.4 **Bơm van**, có thể tích vòng bơm 250  $\mu\text{l}$ .

4.2.5 **Bộ ghi dữ liệu**.

4.3 **Dụng cụ bấm giờ**, dùng để đếm thời gian thu các phần dịch rửa giải từ hệ thống làm sạch LC.

4.4 **Nồi cách thủy**, có thể duy trì nhiệt độ ở  $75^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

4.5 **Bình đun sôi**, bằng thủy tinh, đáy phẳng, dung tích 500 ml, có khớp nối thủy tinh mài cỡ 20/40.

4.6 **Phễu chiết**, dung tích 500 ml, có nắp đậy teflon.

4.7 **Bộ cô quay chân không**, dung tích tối thiểu 500 ml.

4.8 **Màng lọc dùng một lần**, bằng cellulose, cỡ lỗ 0,45  $\mu\text{m}$ .

4.9 **Bình định mức**, dung tích 50 ml, 100 ml, 200 ml.

4.10 **Pipet**.

4.11 **Máy trộn Vortex**.

4.12 **Xyranh**, bằng thủy tinh, dung tích 1 ml.

4.13 **Óng ly tâm**.

4.14 **Máy ly tâm**.

## 5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707) <sup>[1]</sup>.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

## 6 Cách tiến hành

### 6.1 Xà phòng hóa và chiết phần mẫu thử

Làm nóng nồi cách thủy (4.4) đến 75 °C. Cân một lượng mẫu thử có chứa khoảng 12 IU vitamin D<sub>3</sub>, chính xác đến miligam và chuyển phần mẫu thử vào ống ly tâm (4.13). Thêm 15 ml thuốc thử ancol (3.1.1) và khoảng 400 mg axit ascorbic (3.3) vào từng ống. Đậy nắp ống và lắc mạnh 5 s. Thêm 7,5 g kali hydroxit dạng viên (3.2) vào từng ống, đậy nắp và lắc mạnh 20 s để hòa tan. Nói lòng nắp để xả áp và đặt các ống vào nồi cách thủy. Sau 30 min lấy các ống ra khỏi nồi cách thủy và làm nguội nhanh đến nhiệt độ phòng dưới vòi nước lạnh.

Chuyển lượng chứa trong ống vào phễu chiết 500 ml (4.6), tráng ống một lần bằng 5 ml thuốc thử ancol và cho nước tráng vào phễu. Thêm 130 ml etyl ete (3.1.2) vào phễu, đậy kín và lắc mạnh trong 30 s. Thêm 130 ml ete dầu mỏ (3.1.3), đậy kín và lắc mạnh trong 30 s. Để tách lớp trên 2 min. Gạn và loại bỏ khoảng 1 ml lớp nước màu nâu. Để lại lớp nhũ tương trong phễu. Thêm 50 ml nước vào phễu, đậy kín và lắc mạnh trong 15 s. Xả áp, để tách lớp và tháo khoảng 1 ml lớp nước, để lại lớp nhũ tương trong phễu. Rửa dịch chiết ete bằng 50 ml nước khác và gạn bỏ như trên. Thêm 15 ml thuốc thử ancol và 50 ml nước rồi lắc mạnh trong 15 s. Gạn tất cả các phần nước cùng với khoảng 1 ml lớp ete. Loại bỏ tất cả lớp nước. Chuyển lớp ete vào bình đun sôi 500 ml (4.5) đã dán nhãn. Đậy nắp ngay sau khi tất cả các lớp ete đã được gạn để tránh nước bám trên thành phễu khi chuyển sang bình đun sôi.

Nối bình đun sôi vào bộ cô quay (4.7) và cho bay hơi lượng chứa trong bình (nhiệt độ tối đa 50 °C) đến khô. Lấy bình ra, thêm 50 ml axeton (3.1.6) và cho bay hơi lượng chứa trong bình đến khô. Lấy bình ra, hòa tan dịch chiết đã khô bằng cách lắc với 10 ml etyl ete (3.1.2) và cẩn thận chuyển dịch chiết đã hoàn nguyên vào ống ly tâm sạch. Tráng bình đun sôi hai lần, mỗi lần dùng 10 ml ete và cho dịch tráng vào ống. Ngâm ống ly tâm trong nồi cách thủy (4.4) ấm (nhiệt độ tối đa 50 °C) và cho bay hơi đến khô dưới dòng khí nitơ (3.5). Nếu vẫn còn các giọt nước trong ống, thêm vài mililit axeton (3.1.6) và cho bay hơi tiếp đến khô dưới dòng khí nitơ. Đậy kín ống có chứa phần dịch chiết đã khô.

### 6.2 Kiểm tra sự phù hợp của hệ thống sắc ký làm sạch

Cân bằng hệ thống làm sạch LC (4.1) bằng pha động 1 (3.6) ở tốc độ dòng 2 ml/min cho đến khi thu được đường nền ổn định. Sử dụng bơm (4.1.3) bơm dung dịch chuẩn trung gian (3.4.2) vào hệ thống LC để thu được thời gian lưu ổn định ( $\pm 15$  s) đối với pic vitamin D<sub>3</sub>, rửa giải từ 14 min đến 18 min. Dựa vào pic vitamin D, hiệu quả của cột bảo vệ (4.1.2) và cột làm sạch (4.1.3) thường từ 5 000 đến 7 000 đĩa lý thuyết, tối thiểu là 4 000 đĩa lý thuyết. Bơm lại dung dịch chuẩn trung gian (3.4.2) sau bốn lần bơm dung dịch thử để điều chỉnh thời gian lưu của vitamin D<sub>3</sub>.

### 6.3 Làm sạch dung dịch thử bằng sắc ký lỏng

Dựa vào sắc ký đồ của dung dịch chuẩn trung gian (3.4.2), xác định thời gian lưu pic vitamin D<sub>3</sub> đạt đến giới hạn phát hiện của detector UV (4.1.4) và cài đặt dụng cụ bấm giờ (4.3) để thu được các pic trong khoảng thời gian 30 s trước và 30 s sau khi đạt đến giới hạn phát hiện.

Dùng pipet (4.10) lấy 1,00 ml *n*-Hexan (3.1.5) cho vào ống chứa dịch chiết khô (xem 5.1), đậy nắp ống và trộn đều trong 5 s trên máy trộn Vortex (4.11). Sử dụng xyranh (4.12) sạch, khô để lấy dung dịch *n*-hexan ra khỏi ống, lật ngược xyranh và đuổi khí. Nếu dung dịch vẫn đục hoặc có kết tủa, thì làm trong dung dịch bằng màng lọc dùng một lần (4.8).

Sử dụng bộ bơm mẫu (4.1.5) bơm một vòng đầy mẫu thử và khởi động dụng cụ bấm giờ (4.3), thu lấy phần dung dịch chứa vitamin D<sub>3</sub> vào lọ. Đậy ngay nắp lọ.

Tráng xyranh bằng axeton (3.1.6) và làm khô hoàn toàn trước khi bơm dung dịch thử tiếp theo. Sau khi thu được phần dung dịch và trước lần bơm tiếp theo, rửa giải các pic còn lại ở tốc độ dòng 4 ml/min. Khi đường nền ổn định, chỉnh tốc độ dòng đến 2 ml/min và chờ cho đến khi đường nền ổn định lại trước khi bơm tiếp.

Làm bay hơi từng phần dung dịch thu được đến khô dưới dòng khí nitơ trên nồi cách thủy (4.4) (nhiệt độ tối đa 50 °C) như trên. Làm bay hơi lại lượng *n*-Pentanol còn lại trong phần dung dịch có thể dẫn đến pic vitamin D<sub>3</sub> quá rộng trong suốt quá trình định lượng LC. Đậy ngay nắp lọ và thực hiện ngay phép phân tích định lượng. Các lọ có thể được bảo quản trong 24 h, ở 4 °C, tránh ánh sáng trăng. Đèn nguội lọ đến nhiệt độ phòng trước khi mở.

### 6.4 Sự phù hợp của hệ thống định lượng LC

Cân bằng hệ thống định lượng LC (4.2) bằng pha động 2 (3.7) ở tốc độ dòng 3 ml/min cho đến khi thu được đường nền ổn định. Tín hiệu nhiễu ngắn phải ít hơn 1 % trên toàn thang đo. Sử dụng bơm (4.2.1) bơm dung dịch chuẩn làm việc I (3.4.3) vào hệ thống định lượng LC cho đến khi chiều cao pic lặp lại với dung sai ± 2 %. Chỉnh thể tích bơm và/hoặc độ nhạy của detector (4.2.3) cho đến khi chiều cao pic dung dịch chuẩn I (3.4.3) từ 50 % đến 80 % trên toàn thang đo. Thời gian lưu của vitamin D<sub>3</sub> cần trong khoảng từ 14 min đến 18 min.

### 6.5 Định lượng bằng LC

Hoàn nguyên lại dịch chiết đã khô trong 1,00 ml *n*-Hexan (3.1.5) như mô tả trong 6.3. Bơm các dung dịch chuẩn làm việc I, II, và III (3.4.3) trước mỗi lần bơm tám dung dịch thử.

## 7 Tính và biểu thị kết quả

Tính nồng độ vitamin D<sub>3</sub>,  $C_{std}$  trong các dung dịch chuẩn làm việc I, II, và III (3.4.3), được biểu thị bằng đơn vị quốc tế trên mililit (IU/ml) theo Công thức (1):

$$C_{std} = \frac{W_{std} \times K \times D}{10\ 000} \quad (1)$$

Trong đó

- $W_{std}$  là khối lượng vitamin D<sub>3</sub> đã dùng cho dung dịch chuẩn gốc (3.4.1), tính bằng miligam (mg);
- $K$  là hệ số chuyển đổi khối lượng đối với vitamin D<sub>3</sub>, tính bằng đơn vị quốc tế trên miligam (IU/mg) (Ở đây  $K = 40\ 000$  IU/mg);
- $D$  là hệ số pha loãng đối với dung dịch chuẩn làm việc (3.4.3) (25/100 đối với dung dịch chuẩn I, 15/100 đối với dung dịch chuẩn II và 7/100 đối với dung dịch chuẩn III);
- 10 000 là hệ số pha loãng của hỗn hợp dung dịch chuẩn gốc vitamin D khô ( $W_{std}$  thành 50 ml) và dung dịch chuẩn trung gian (3.4.2) (1 ml thành 200 ml).

Tính hồi quy bình phương nhỏ nhất của chiều cao pic so với nồng độ đối với các lần bơm dung dịch chuẩn làm việc, trước khi bơm từng nhóm dung dịch thử (tối đa tám dung dịch thử) trong 6.5. Hệ số tương quan,  $r$ , để phân tích hồi quy thường lớn hơn hoặc bằng 0,995.

Tính nồng độ vitamin D<sub>3</sub>,  $C$ , trong dung dịch thử từ chiều cao pic và đường hồi quy, được biểu thị bằng đơn vị đo lường quốc tế trên lít (IU/lít) theo Công thức 2 như sau:

$$C = \frac{C_{sln} \times 1,00 \times 0,97 \times 1\ 000}{V_L \times 0,86 \times V_p} \quad (2a)$$

$$C = \frac{C_{sln} \times 1\ 130}{V_L \times V_p} \quad (2b)$$

Trong đó

- $C_{sln}$  là nồng độ vitamin D<sub>3</sub> trong dung dịch thử đã bơm, tính bằng IU trên mililit (IU/ml);
- 1,00 là thể tích dung dịch thử được hoàn nguyên trước khi định lượng bằng LC, tính bằng mililit (ml);
- 0,97 là thể tích dịch chiết được hoàn nguyên đã hiệu chỉnh đổi với quá trình bay hơi 50 ml dung dịch trong ống, tính bằng mililit (ml);
- 1 000 là hệ số chuyển đổi mililit sang lít.
- $V_L$  là thể tích vòng bơm làm sạch, đo bằng khối lượng vòng bơm được làm đầy bằng nước đã biết tỷ trọng, tính bằng mililit (ml);
- 0,86 là phần vitamin D<sub>3</sub> không chuyển thành tiền vitamin D trong quá trình xà phòng hóa;
- $V_p$  là thể tích sản phẩm đã xà phòng hóa, tính bằng mililit (ml).

## 8 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- e) kết quả thử thu được.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 6400:2010 (ISO 707:2008) *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*.
  - [2] TCVN 8973:2011 (EN 12821:2009) *Thực phẩm – Xác định vitamin D bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Xác định cholecalciferol ( $D_3$ ) hoặc ergocalciferol ( $D_2$ )*.
-