

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11669:2016

ISO 20639:2015

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH VÀ
SẢN PHẨM DINH DƯỠNG DÀNH CHO NGƯỜI LỚN -
XÁC ĐỊNH AXIT PANTOTHENIC BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LỎNG SIÊU HIỆU NĂNG-PHỔ KHỐI LƯỢNG
HAI LẦN (UHPLC-MS/MS)**

Infant formula and adult nutritionals - Determination of pantothenic acid by ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry method (UHPLC-MS/MS)

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11669:2016 hoàn toàn tương đương với ISO 20639:2015;

TCVN 11669:2016 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.

Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và sản phẩm dinh dưỡng dành cho người lớn - Xác định axit pantothenic bằng phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng-phổ khối lượng hai lần (UHPLC-MS/MS)

Infant formula and adult nutritionals – Determination of pantothenic acid by ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry method (UHPLC-MS/MS)

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 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 định lượng axit pantothenic bao gồm cả các dạng liên kết, trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và sản phẩm dinh dưỡng dành cho người lớn (ví dụ: dạng bột) sử dụng sắc ký lỏng siêu hiệu năng-phổ khối lượng hai lần (UHPLC-MS/MS).

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây.

2.1

Sản phẩm dinh dưỡng dành cho người lớn (adult nutritional)

Thức ăn hoàn chỉnh về dinh dưỡng, thức ăn công thức đặc biệt được tiêu thụ ở dạng lỏng, có thể là nguồn dinh dưỡng duy nhất, được tạo thành từ hỗn hợp của sữa, đậu nành, gạo, whey, protein thủy phân, tinh bột và các axit amin, có và không có protein nguyên vẹn.

2.2

Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh (infant formula)

Sản phẩm có thể dùng để thay thế sữa mẹ được chế biến đặc biệt đáp ứng được các nhu cầu về dinh dưỡng của trẻ trong những tháng đầu sau khi sinh đến giai đoạn ăn thức ăn bổ sung thích hợp.

[Nguồn: TCVN 7108:2008 (CODEX STAN 72-1981)]

3 Nguyên tắc

Chiết axit pantothenic bằng dung dịch đệm amoni axetat 0,4 mol/l. Sau khi lọc, dung dịch cuối cùng được dùng để phân tích sắc ký lỏng siêu hiệu năng-phổ khối lượng hai lần (UHPLC-MS/MS).

4 Thuốc thử và vật liệu thử

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

4.1 Các chất chuẩn

4.1.1 Canxi D-pantothenat, loại Sigma¹⁾ hoặc CAS 137-08-6.

4.1.2 Canxi pantothenat-[¹³C₆, ¹⁵N₂], ISOSicences¹⁾ hoặc CAS 356786-94-2.

4.2 α -Amylase, loại Sigma A3176¹⁾, từ tụy bò, khoảng 25 U/mg hoặc tương đương.

4.3 Dung môi

4.3.1 Axetonitril, loại dùng cho LC hoặc tương đương.

4.4 Amoni axetat, loại tinh khiết, có độ tinh khiết > 98 % (Fluka 9690)¹⁾.

4.5 Axit axetic, loại tinh khiết.

4.6 Axit fomic, loại tinh khiết.

4.7 Dung dịch axit formic 1 % trong nước, loại tinh khiết.

4.8 Chuẩn bị dung dịch chuẩn

4.8.1 Dung dịch gốc axit pantothenic (PA), $\rho = 250 \mu\text{g/ml}$

Cân 54,5 mg canxi pantothenat (4.1.1) (có tính đến độ ẩm nêu trong giấy chứng nhận của nhà cung cấp hoặc sấy đến khối lượng không đổi ở 105 °C) cho vào bình định mức 200 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ -20 °C.

¹⁾ Đây là ví dụ về sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho các kết quả tương đương.

4.8.2 Dung dịch trung gian axit pantothenic, $\rho = 10 \mu\text{g/ml}$

Chuyển 1 ml dung dịch gốc PA (4.8.1) vào bình định mức 25 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ -20°C .

4.8.3 Canxi pantothenat- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$] dung dịch gốc [IS (nội chuẩn)], $\rho = 20 \mu\text{g/ml}$

Cân 5,0 mg canxi pantothenat- $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$] (4.1.2) cho vào bình định mức 250 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ -20°C .

4.8.4 Các dung dịch có năm mức nồng độ dùng để dựng đường chuẩn

Chuyển các lượng thích hợp dung dịch trung gian PA ($10 \mu\text{g/ml}$) (4.8.2) vào các bình định mức 10 ml để thu được năm nồng độ PA khác nhau ($0,08 \mu\text{g/ml}$; $0,16 \mu\text{g/ml}$; $0,32 \mu\text{g/ml}$; $0,64 \mu\text{g/ml}$ và $1,2 \mu\text{g/ml}$). Thêm 500 μl dung dịch gốc nội chuẩn ($20 \mu\text{g/ml}$) (4.8.3) và pha loãng bằng nước đến vạch. Nồng độ của chất nội chuẩn (IS) trong từng dung dịch chuẩn là $1 \mu\text{g/ml}$. Bảo quản các dung dịch này ở nhiệt độ -20°C không quá 1 tháng trước khi sử dụng.

4.8.5 Dung dịch amoni axetat, $c = 400 \text{ mmol/l}$, $\text{pH} = 3,8$ (dùng để chiết mẫu)

Cho ($30,8 \pm 0,10$) g amoni axetat vào cốc có mỏ dung tích 500 ml. Thêm khoảng 300 ml nước và khuấy bằng bộ khuấy từ để hòa tan. Chính $\text{pH} = 3,8 \pm 0,1$, thêm từ từ axit axetic băng (khoảng 150 ml, nếu cần). Chuyển vào bình định mức 1 000 ml và thêm nước đến vạch. Dung dịch này có thể bền trong 1 tháng khi bảo quản ở 4°C .

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Cân phân tích, có thể cân được 210 g, đọc đến 0,1 mg; có thể cân được 4 100 g, đọc đến 0,1 g.

5.2 Máy đo pH, có thể đọc đến 0,01 đơn vị pH.

5.3 Máy đồng hóa²⁾.

5.4 Đĩa khuấy có bộ khuấy từ.

5.5 Bộ lọc xyranh, có màng lọc cỡ lỗ $0,22 \mu\text{m}$, đường kính trong 33 mm, Millex-GV PVDF (Millipore)³⁾; màng lọc cỡ lỗ $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore)³⁾ hoặc tương đương.

²⁾ Polytron PT3000 (đơn vị dẫn động), Aggregate PT-DA 3012 (Kinematics, Lucerne, Thụy Sĩ) là ví dụ về các sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu chúng cho các kết quả tương đương.

³⁾ Đây là ví dụ về các sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu chúng cho các kết quả tương đương.

5.6 Hệ thống UHPLC-MS/MS, cột UPLC, ví dụ cột ACQUITY UPLC^{®3}) ghép với detector khối phổ ba tứ cực được gắn với nguồn ion hóa tia điện (ESI) và cột T3 (cỡ hạt 1,8 µm, kích thước 100 mm, đường kính trong 2,1 mm; Waters Crop)³) hoặc tương tự.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu

6.1.1 Yêu cầu chung

Nếu mẫu chứa tinh bột, thì thêm 50 mg α-amylase vào huyền phù mẫu và ủ 15 min ở 40 °C để làm giảm độ sánh và dễ xử lý. Trộn kỹ mẫu dạng lỏng để đảm bảo mẫu đồng nhất và để chiết trực tiếp. Nếu mẫu dạng bột chưa biết độ đồng nhất thì giả định là không đồng nhất và thực hiện theo 6.1.2.

6.1.2 Mẫu dạng bột được trộn khô

Đối với mẫu dạng bột được trộn khô/không đồng nhất, cân chính xác khoảng 25,0 g (m_1). Thêm 200,0 g (m_2) nước ở 40 °C trước khi trộn cho đến khi thu được huyền phù đồng nhất. Sử dụng máy đồng hóa (5.3), nếu cần. Cân chính xác khoảng 15,0 g (m_3) huyền phù mẫu đã đồng nhất cho vào bình định mức 50 ml. Tính khối lượng mẫu thử (m_s là khối lượng mẫu dạng bột tương ứng), sử dụng Công thức (1):

$$m_s = \frac{m_1 \times m_3}{m_1 + m_2} \quad (1)$$

Trong đó

m_1 là khối lượng mẫu đã cân, tính bằng gam (g);

m_2 là khối lượng nước đã thêm vào trước khi trộn, tính bằng gam (g);

m_3 là khối lượng huyền phù mẫu đã đồng nhất, tính bằng gam (g).

6.1.3 Mẫu dạng bột được trộn ướt

Đối với hỗn hợp mẫu dạng bột đồng nhất được trộn ướt, cân chính xác khoảng 2,0 g mẫu (m_s) cho vào bình định mức 50 ml. Thêm 14 g nước ở 40 °C. Trộn cho đến khi thu được huyền phù đồng nhất.

6.1.4 Mẫu dạng lỏng

Đối với mẫu dạng lỏng, cân chính xác khoảng 20,0 g (m_s) cho vào bình định mức 50 ml.

6.2 Chiết

Thêm 25 ml dung dịch amoni axetat 0,4 mol/l, pH = 3,8 vào mẫu đã chuẩn bị (6.1). Pha loãng dịch chiết mẫu bằng nước đến vạch. Cho que khuấy vào và khuấy trong 10 min. Lọc 20 ml phần mẫu thử qua giấy lọc gấp nếp (Loại 597½). Tiến hành phân tích sắc ký.

6.3 Phân tích

6.3.1 Phân tích sắc ký

Chuyển 1,0 ml dịch lọc thu được trong 6.2 vào ống polypropylen 15 ml có chứa 500 µl dung dịch gốc nội chuẩn (IS) (4.8.3). Điều quan trọng là sử dụng cùng một dung dịch nội chuẩn giống như dung dịch đã được sử dụng để dựng đường chuẩn (4.8.4). Pha loãng dung dịch đến 10 ml bằng nước, đậy nắp và trộn. Lọc qua bộ lọc xyranh cỡ lỗ 0,22 µm (5.5). Bơm lên hệ thống UHPLC-MS/MS.

Các ví dụ về sắc ký đồ điển hình được nêu trong Phụ lục A.

6.3.2 Các điều kiện UHPLC

| | |
|---------------|--|
| Thể tích bơm: | 2 µl |
| Nhiệt độ cột: | 30 °C |
| Tốc độ dòng: | 0,45 ml/min |
| Pha động A: | dung dịch axit fomic 0,1 % (thể tích) trong nước |
| Pha động B: | axetonitril |

Chương trình gradient đối với cột được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Chương trình gradient đối với cột

| Thời gian min | Pha động A % | Pha động B % |
|------------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 92 | 8 |
| 2,2 | 80 | 20 |
| 2,4 | 50 | 50 |
| 4,0 | 50 | 50 |
| 4,1 | 92 | 8 |
| 7,0 | 92 | 8 |

Đặt dòng sắc ký lỏng vào detector khối phổ chỉ từ 0 min đến 2 min để tránh làm nguồn bị tắc nghẽn.

6.3.3 Điều kiện khối phổ/khối phổ

- Nguồn ion hóa: ESI (+);
- Điện thế mao quản: 2,2 kV;
- Điện thế cone: 25 V;
- Điện thế bộ chiết: 3,0 V;
- Nhiệt độ nguồn: 140 °C;
- Nhiệt độ tách dung môi: 350 °C;
- Tốc độ dòng khí cone: 40 l/h;
- Tốc độ dòng khí tách dung môi: 700 l/h.

Cài đặt năng lượng va chạm ở 14 V và thời gian dừng đối với mỗi lần chuyển khối có kiểm tra là 0,1 s. Các giá trị này là đặc thù và cần được tối ưu đối với từng thiết bị sử dụng. Chọn việc chuyển khối từ 220,2 m/z → 90,1 m/z đối với PA và từ 224,2 m/z → 94,1 m/z đối với dung dịch nội chuẩn (IS) đã được ghi nhãn đồng vị từ 0 min đến 2,1 min.

6.3.4 Nhận biết

Nhận biết khối phổ trong phương thức kiểm tra một phản ứng bao gồm việc phát hiện đồng thời các ion phân tử tương ứng với PA và PA đã được ghi nhãn đồng vị. Việc chuyển khối khối lượng được lựa chọn tương ứng là từ 220,2 m/z → 90,1 m/z và từ 224,2 m/z → 94,1 m/z.

7 Tính kết quả

Tính tỉ lệ diện tích giữa PA và IS đối với từng chất chuẩn. Dùng đường chuẩn năm điểm (trong dải từ 0,16 ng đến 2,4 ng trên cột) theo tỷ lệ diện tích pic (trục y) so với nồng độ PA (trục x). Tính hồi quy tuyến tính. Nên sử dụng đường chuẩn hồi quy tuyến tính đã cân (1/x).

Tính độ dốc (*S*) và giao điểm (*I*) của đường chuẩn.

Tính phần khối lượng PA, *w*, biểu thị bằng miligam/100 g (mg/100 g), sử dụng Công thức (2):

$$w = \frac{(A - I) \times V_1 \times V_3 \times 100}{S \times m \times V_2 \times 1000} \quad (2)$$

Trong đó:

A là tỷ lệ diện tích pic PA/IS trong dung dịch thử;

l là giao điểm của đường chuẩn;

S là độ dốc của đường chuẩn;

V_1 là thể tích của dịch chiết mẫu, tính bằng mililit (Ở đây $V_1 = 50$ ml);

V_2 là thể tích của dịch lọc, tính bằng mililit (Ở đây $V_2 = 1$ ml);

V_3 là thể tích cuối cùng của dung dịch thử, tính bằng mililit (Ở đây $V_3 = 10$ ml);

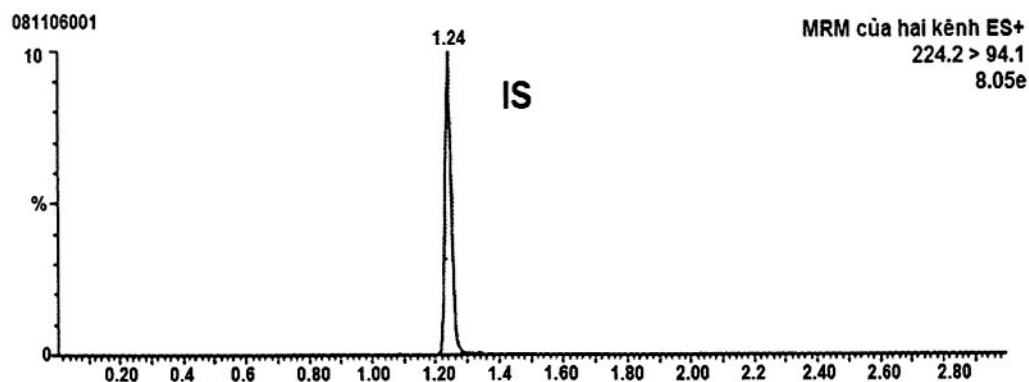
m là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

100 là hệ số chuyển đổi thành 100 g;

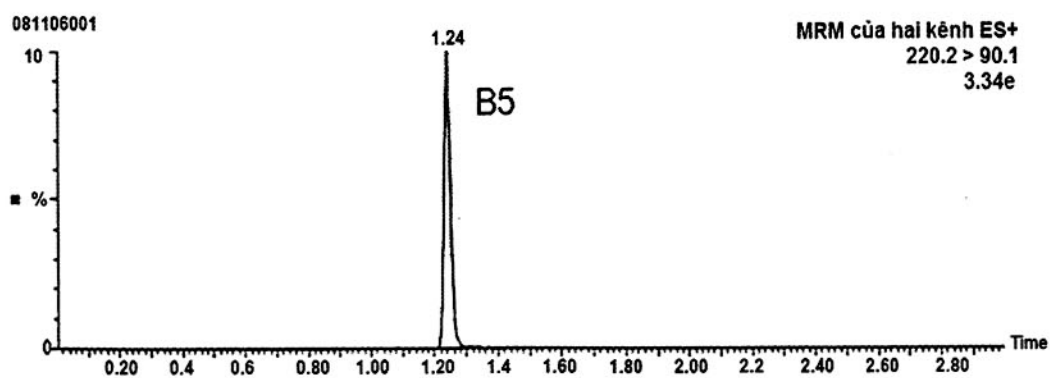
1000 là hệ số chuyển đổi từ microgam (μg) thành miligam (mg).

Phụ lục A
(tham khảo)

Ví dụ về sắc ký đồ điển hình



**Hình A.1 – Sắc ký đồ của chất nội chuẩn (IS) canxi pantothenat-[¹²C₆, ¹⁵N₂]
xác định được bằng phương pháp UHPLC-MS/MS**



**Hình A.2 – Sắc ký đồ của axit pantothenic trong mẫu thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh
xác định được bằng phương pháp UHPLC-MS/MS**

Phụ lục B
(tham khảo)

Dữ liệu độ chụm

Dữ liệu nêu trong Bảng 1 thu được trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, được công bố năm 2015 [1] phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) và quy định của AOAC-IUPAC về quy trình nghiên cứu cộng tác quốc tế để đánh giá các đặc tính về độ chụm của phương pháp phân tích. [3] Nghiên cứu được thực hiện dựa trên các yêu cầu nêu trong Tài liệu tham khảo [4].

Bảng B.1 – Dữ liệu độ chụm đối với axit pantothenic

| Mẫu | 1 ^a | 2 ^b | 3 ^c | 4 ^d | 5 ^e | 6 ^f | 7 ^g | 8 ^h | 9 ⁱ | 10 ^j |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Năm thử nghiệm liên phòng | 2014 | 2014 | 2014 | 2014 | 2014 | 2014 | 2014 | 2014 | 2014 | 2014 |
| Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi loại trừ ngoại lệ | 13 | 14 | 14 | 13 | 13 | 14 | 13 | 14 | 14 | 13 |
| Giá trị trung bình, \bar{x} , mg/100 g | 2,59 | 3,85 | 6,96 | 8,07 | 5,04 | 5,91 | 0,549 | 6,65 | 2,07 | 1,57 |
| Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , mg/100g | 0,05 | 0,05 | 0,14 | 0,13 | 0,14 | 0,17 | 0,008 | 0,22 | 0,06 | 0,03 |
| Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , mg/100 g | 0,13 | 0,20 | 0,35 | 0,33 | 0,23 | 0,29 | 0,022 | 0,36 | 0,14 | 0,09 |
| Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{V,r}$, % | 1,9 | 1,3 | 2,0 | 1,6 | 2,8 | 2,8 | 1,5 | 3,3 | 2,9 | 1,7 |
| Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$, % | 5,0 | 5,3 | 5,1 | 4,1 | 4,7 | 4,9 | 4,1 | 5,4 | 7,0 | 5,5 |
| Giới hạn lặp lại r , [$r = 2,8 \times s_r$], mg/100 g | 0,14 | 0,14 | 0,39 | 0,36 | 0,39 | 0,48 | 0,022 | 0,62 | 0,17 | 0,08 |
| Giới hạn tái lập R , [$R = 2,8 \times s_R$], mg/100 g | 0,36 | 0,56 | 0,98 | 0,92 | 0,64 | 0,81 | 0,061 | 1,01 | 0,39 | 0,25 |
| Giá trị Horat, theo Tài liệu tham khảo [5] | 0,51 | 0,57 | 0,60 | 0,50 | 0,53 | 0,57 | 0,33 | 0,63 | 0,69 | 0,52 |

^a Sản phẩm dinh dưỡng từ protein sữa, dạng bột dành cho người lớn, ^b Thức ăn công thức từ đậu nành đã thủy phân một phần, dạng bột dành cho trẻ sơ sinh, ^c SRM 1849a, ^d Sản phẩm dinh dưỡng có hàm lượng chất béo thấp, dạng bột dành cho người lớn, ^e Thức ăn công thức từ đậu nành, dạng bột dành cho trẻ sơ sinh, ^f Thức ăn công thức dạng bột dành cho trẻ nhỏ, ^g Sữa công thức để dùng ngay dành cho trẻ sơ sinh, ^h Thức ăn bổ sung dạng bột dành cho trẻ sơ sinh, ⁱ Sản phẩm dinh dưỡng có hàm lượng chất béo cao, để dùng ngay dành cho người lớn, ^j Sản phẩm dinh dưỡng có hàm lượng protein cao, để dùng ngay dành cho người lớn.

RTF là thực phẩm để dùng ngay.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] OMA 2012.16, *Pantothenic Acid (Vitamin B5) in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula. Ultra High Pressure Liquid Chromatography -Tandem Mass Spectrometry Method: Collaborative study*
 - [2] 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*
 - [3] AOAC INTERNATIONAL AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development, Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies, 1995, pp. 23–51.
 - [4] AOAC SMPR 2012.009, Standard Method Performance Requirements for Pantothenic Acid in infant formula and Adult/Pediatric Nutritional formula
 - [5] THOMPSON M. Recent Trends in Inter-Laboratory Precision at ppb and sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing. *Analyst (Lond.)*. 2000, **125** pp. 385–386
-