

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 11674:2016**

**Xuất bản lần 1**

**THỨC ĂN CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH -  
XÁC ĐỊNH AXIT FOLIC - PHƯƠNG PHÁP VI SINH**

*Infant formula - Determination of folic acid - Microbiological method*

**HÀ NỘI - 2016**

**Lời nói đầu**

TCVN 11674:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 992.05, *Folic acid (pteroylglutamic acid) in infant formula. Microbiological methods;*

TCVN 11674:2016 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 – Xác định axit folic – Phương pháp vi sinh

*Infant formula – Determination of folic acid – Microbiological method*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp vi sinh để xác định axit folic (axit pteroylglutamic) trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh.

Tiêu chuẩn này chỉ áp dụng để xác định axit folic dạng tự do.

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm được nêu trong Phụ lục A.

### 2 Nguyên tắc

Hàm lượng axit folic trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh được ước lượng từ độ đáp ứng axit của *Lactobacillus casei*.

### 3 Thuốc thử và môi trường 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 Etanol.

#### 3.2 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), 0,1 M.

#### 3.3 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), 0,2 M.

#### 3.4 Dung dịch natri hydroxit, 40 % (khối lượng/thể tích)

#### 3.5 Dung dịch amoniac (NH<sub>4</sub>OH), (2 + 3) (tỷ lệ thể tích).

Pha loãng hai phần thể tích dung dịch amoniac (nồng độ từ 28 % đến 30 %) với ba phần thể tích nước.

## TCVN 11674:2016

**3.6 Dung dịch axit clohydric đặc, nồng độ từ 36,5 % đến 38 %.**

**3.7 Dung dịch axit clohydric (HCl), (1 + 1) (tỷ lệ thể tích).**

Pha loãng một phần thể tích axit clohydric đặc (3.6) với một phần thể tích nước.

**3.8 Dung dịch toluen.**

**3.9 Dung dịch muối I**

Hòa tan 50 g dikali hydrophosphat ( $K_2HPO_4$ ) và 50 g kali dihydrophosphat ( $KH_2PO_4$ ) vào 500 ml nước. Thêm 10 ml toluen (3.8) và bảo quản ở 10 °C. Chuẩn bị dung dịch mới sau 3 tháng.

**3.10 Dung dịch polyoxyetylen sorbitan monooleat (polysorbat 80)**

Hòa tan 25 g polysorbat 80 vào etanol (3.1) đựng trong bình định mức 250 ml (4.1). Thêm etanol đến vạch.

**3.11 Sữa gầy đã làm trong**

Cho 10 g bột sữa gầy sấy phun vào 80 ml nước. Trộn đều. Sử dụng máy đo pH (4.10), chỉnh đến pH 4,2 bằng dung dịch axit clohydric (3.7). Ly tâm hỗn hợp trong máy ly tâm (4.5) ở 3 000 r/min trong 15 min để thu được lớp huyền phù trong. Gạn huyền phù vào cốc có mỏ 150 ml (4.2). Chỉnh đến pH 7,0 bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit. Ly tâm ở 3 000 r/min trong 15 min để thu được lớp huyền phù trong. Gạn huyền phù vào ống đong 100 ml (4.3) và pha loãng bằng nước đến 100 ml.

**3.12 Dung dịch đệm phosphat, 0,05 M**

Hòa tan 5,85 g kali dihydrophosphat ( $KH_2PO_4$ ) và 1,22 g dikali hydrophosphat ( $K_2HPO_4$ ) vào nước đựng trong bình định mức 1 l (4.1) và pha loãng bằng nước đến vạch. Chuẩn bị dung dịch mới hàng ngày.

**3.13 Dung dịch chỉ thị xanh bromthymol**

Cân 0,1 g xanh bromthymol cho vào cốc có mỏ nhỏ. Hòa tan trong vài mililit etanol (3.1) đựng trong bình định mức 250 ml (4.1), thêm 1,6 ml dung dịch natrihydroxit 0,1 M (3.2) và pha loãng bằng nước đến vạch.

**3.14 Dung dịch muối đẳng trương**

Cân 0,9 g natri clorua cho vào bình định mức 100 ml (4.1). Pha loãng bằng nước đến vạch và lắc cho đến khi muối tan. Chuyển các phần thể tích 10 ml vào ống nuôi cấy, đậy ống bằng nút bông hoặc nắp bằng thép không gỉ và tiệt trùng 20 min ở 121 °C. Chuẩn bị dung dịch mới hàng tuần.

### 3.15 Dung dịch biotin

Cân 50 mg biotin cho vào bình định mức 1 l (4.1) và pha loãng bằng 10 ml dung dịch natri hydroxit 0,2 M (3.3). Khi biotin đã tan, pha loãng bằng nước đến vạch và trộn kỹ. Bảo quản ở 10 °C. Chuẩn bị dung dịch mới sau 6 tháng.

### 3.16 Dung dịch vitamin

Hòa tan 50 mg niacin, 71,4 mg natri riboflavin-5-phosphat (tương đương với 50 mg riboflavin), 50 mg thiamin hydroclorid, 50 mg canxi pantothenat, 10 mg axit *p*-aminobenzoic và 10 ml dung dịch biotin (3.15) vào 150 ml nước đựng trong bình định mức 200 ml (4.1) và pha loãng bằng nước đến vạch. Thêm 6 ml toluen (3.8), trộn kỹ và bảo quản ở 10 °C. Chuẩn bị dung dịch mới sau 2 tháng.

### 3.17 Dung dịch pyridoxamin

Hòa tan 14,3 mg pyridoxamin dihydroclorua vào nước đựng trong bình định mức 100 ml (4.1) và pha loãng bằng nước đến vạch. Thêm 3 ml toluen (3.8), trộn đều và bảo quản ở 10 °C.

### 3.18 Chế phẩm từ tụy gà

Cân 100 mg tụy gà khô, thêm 20 ml nước và khuấy trong 15 min. Ly tâm ở 3 000 r/min trong 10 min và sử dụng huyền phù trong. Chuẩn bị dung dịch mới hàng ngày.

### 3.19 Dung dịch đệm phosphat 0,05 M-axit ascorbic

Hòa tan 50 mg axit ascorbic trong 100 ml dung dịch đệm phosphat 0,05 M (3.12). Chuẩn bị dung dịch ngay trước khi sử dụng.

### 3.20 Dung dịch chuẩn axit folic

**LƯU Ý** – Không lắc các dung dịch chuẩn được bảo quản trong toluen.

#### 3.20.1 Dung dịch chuẩn gốc, 500 µg/ml

Cân chính xác lượng chất chuẩn đối chứng axit folic tương đương với 55 mg đến 56 mg axit folic đã sấy khô đến khối lượng không đổi và được bảo quản trong bình hút ẩm (4.12) có chứa phosphopentoxit ( $P_2O_5$ ), đặt nơi tối. Dùng pipet (4.13) chuyển định lượng 50 ml nước vào bình định mức 100 ml (4.1). Thêm 2 ml dung dịch amoniac (3.5). Khi đã hòa tan hoàn toàn, pha loãng bằng nước đến vạch và dùng pipet thêm nước để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ axit folic 500 µg/ml. Trộn kỹ và bảo quản dung dịch trong chai màu đỏ hoặc tối màu ở 10 °C. Chuẩn bị dung dịch mới sau 4 tháng.

Thể tích cuối cùng của dung dịch chuẩn gốc,  $V_1$ , tính bằng mililit (ml), được tính theo công thức sau:

$$V_f = \frac{W_s \times P_s \times 1000}{100 \times 500} = \frac{W_s \times P_s}{50}$$

Trong đó:

$W_s$  là khối lượng của chất chuẩn axit folic, tính bằng miligam (mg);

$P_s$  là độ tinh khiết của chất chuẩn axit folic (lấy từ nhãn).

100 là dung tích bình định mức, tính bằng mililit (ml);

500 là nồng độ dung dịch gốc, tính bằng microgam trên mililit ( $\mu\text{g/ml}$ );

1000 là hệ số chuyển đổi từ miligam sang microgam.

### 3.20.2 Dung dịch chuẩn trung gian, 50 $\mu\text{g/ml}$

Dùng pipet (4.13) lấy chính xác 10 ml dung dịch chuẩn gốc (3.20.1) cho vào bình định mức màu đỏ hoặc tối màu 10 ml (4.1), thêm nước đến vạch và trộn đều. Bảo quản ở 10 °C. Chuẩn bị dung dịch mới sau 1 tháng.

### 3.20.3 Dung dịch chuẩn làm việc, 0,1 ng/ml

Dùng pipet (4.13) lấy 1 ml dung dịch chuẩn trung gian (3.20.2) cho vào bình định mức màu đỏ hoặc tối màu 100 ml (4.1), thêm nước đến vạch và trộn đều. Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch thứ nhất này cho vào bình định mức màu đỏ hoặc tối màu 100 ml (4.1) khác, pha loãng bằng nước đến vạch và trộn đều. Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch thứ hai này cho vào bình định mức màu đỏ hoặc tối màu 250 ml (4.1), pha loãng bằng dung dịch đệm phosphat (3.12) đến vạch và trộn đều. Ghi nhãn là dung dịch chuẩn làm việc (0,000 1  $\mu\text{g/ml}$  hoặc 0,1 ng/ml). Chuẩn bị dung dịch mới mỗi lần phân tích.

## 3.21 Dung dịch gốc dùng cho môi trường cơ bản

Bảo quản tất cả các dung dịch ở nơi tối, ở khoảng 10 °C. Bảo quản tất cả các dung dịch trừ các dung dịch có chứa ancol trong toluene. Các lượng môi trường tương ứng có thể được chuẩn bị.

### 3.21.1 Dung dịch casein thủy phân bằng axit

Trộn 400 g casein không chứa vitamin với 2 l dung dịch axit clohydric (3.7) và gia nhiệt ở nhiệt độ hồi lưu trong 8 h. Loại axit clohydric bằng cách chưng cất dưới áp suất giảm cho đến khi lớp cặn ở dạng bột nhão. Hòa tan bột nhão trong nước và chuyển vào cốc có mỏ 4 l (4.2), sử dụng tổng cộng 1 500 ml nước. Chỉnh đến pH  $3,5 \pm 0,1$  bằng khoảng 200 ml dung dịch natri hydroxit 40 % (khối lượng/thể tích) (3.4). Chuyển dung dịch vào ống đong 2 l (4.3) và pha loãng bằng nước đến vạch. Rót dung dịch vào bình nón 6 l (4.9). Thêm 2 l nước. Thêm 80 g than hoạt tính, khuấy 1 h và lọc qua giấy lọc (4.8). Lặp lại việc xử lý bằng than hoạt tính. Thêm 35 ml toluen (3.8), lắc kỹ và bảo quản ở 10 °C.

Nếu xuất hiện kết tủa trong quá trình bảo quản thì lọc trước khi sử dụng.

### 3.21.2 Dung dịch adenin-guanin-uracil

Cho 1,0 g adenin sulfat, 1,0 g guanin ngâm một phần tử axit clohydric và 1,0 g uracil vào 50 ml axit clohydric (3.7) nóng (90 °C) đựng trong cốc có mỏ 150 ml (4.2). Gia nhiệt ở 90 °C cho đến khi chất rắn hòa tan. Để nguội và dùng nước để chuyển định lượng dung dịch vào bình định mức 1 l (4.1). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn đều. Thêm 10 ml toluen (3.8), trộn kỹ, và bảo quản ở 10 °C. Chuẩn bị dung dịch mới sau 3 tháng.

### 3.21.3 Dung dịch xystin

Cân 1,25 g L-xystin, tạo huyền phù trong 40 ml nước. Thêm từng giọt axit clohydric đặc (3.6) trong khi vẫn khuấy (cần khoảng 2 ml) cho đến khi L-cystin tan. Chuyển dung dịch này vào bình định mức 50 ml (4.1) và pha loãng bằng nước đến vạch.

### 3.21.4 Dung dịch muối II

Hòa tan 10 g magie sulfat ngâm bảy phần tử nước ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 0,5 g natri clorua, 0,5 g sắt (II) sulfat ngâm bảy phần tử nước ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 1,5 g mangan sulfat ngâm một phần tử nước ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) và 1 ml axit clohydric đặc (3.6) vào 250 ml nước. Thêm 2 ml toluen (3.8) và bảo quản ở nhiệt độ 10 °C. Chuẩn bị dung dịch mới sau 3 tháng.

### 3.21.5 Dung dịch xanthin

Huyền phù 1,0 g xanthin trong 200 ml nước đựng trong cốc có mỏ 400 ml (4.2). Gia nhiệt đến 70 °C. Thêm 30 ml dung dịch amoniac (3.5) và khuấy cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Dùng nước chuyển định lượng dung dịch vào bình định mức 1 l (4.1). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn đều. Bảo quản trong toluen ở nhiệt độ 10 °C. Chuẩn bị dung dịch mới sau 3 tháng.

### 3.21.6 Dung dịch gốc môi trường cơ bản

Cho 700 ml nước vào cốc có mỏ 1 l (4.2), thêm 127 ml dung dịch casein thủy phân bằng axit (3.21.1), 20 ml dung dịch adenin-guanin-uracil (3.21.2), 16 ml dung dịch xystin (3.21.3), 10 ml dung dịch muối II (3.21.4) và 10 ml dung dịch xanthin (3.21.5). Trộn đều. Sử dụng máy đo pH (4.10), chỉnh đến pH khoảng 6,4 đến 6,5 bằng cách thêm dung dịch natri hydroxir (NaOH) 1,0 M (3.2) rồi pha loãng đến 1 l trong ống đong chia vạch (4.3). Phân phối 200 ml dung dịch vào chai polyetylen 500 ml (4.11), đậy nắp và để lạnh đông. Dung dịch đã sử dụng được bảo quản đông lạnh bền trong 2 tháng.

## 3.22 Môi trường duy trì và môi trường nuôi cấy

### 3.22.1 Môi trường duy trì

Cho 10 g trypton, 10 g dextrose khan, 2 g dikali hydrophosphat ( $K_2HPO_4$ ), 3 g canxi cacbonat ( $CaCO_3$ );

## TCVN 11674:2016

1 g NF cô đặc từ gan (ví dụ: Pharmaceutical Division, Wilson & Co, Chicago, IL, USA)<sup>1)</sup>, 5 ml dung dịch muối I (3.9), 5 ml dung dịch muối II (3.21.4) và 15 g thạch vào 990 ml nước. Đun sôi hỗn hợp và khuấy cho đến khi thạch tan hoàn toàn. Tiếp tục khuấy trong khi vẫn phân phối các phần 10 ml hỗn hợp vào các ống nuôi cấy. Đậy các ống bằng nút polyurethan hoặc nút bông và tiệt trùng 15 min ở 121 °C. Để nguội ống đến nhiệt độ phòng ở tư thế thẳng đứng. Môi trường duy trì sẽ giữ được vô thời hạn trong vật chứa kín bảo quản ở nhiệt độ 10 °C.

### 3.22.2 Môi trường nuôi cấy

Cho 9,6 g môi trường phân tích riboflavin (Ví dụ: Bacto-Riboflavin Assay Medium, Difco Laboratories)<sup>1)</sup> vào 360 ml nước sôi và khuấy đều cho đến khi tan. Để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm 40 ml sữa gầy đã làm trong (3.11) và trộn kỹ. Phân phối các phần 10 ml môi trường vào các ống nuôi cấy thủy tinh (4.7), đậy nắp và tiệt trùng 15 min ở 121 °C. Để nguội và bảo quản ở nhiệt độ 10 °C. Chuẩn bị môi trường mới sau 3 tháng.

## 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 **Bình định mức**, dung tích 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml và 1 l, màu đỏ hoặc tối màu.
- 4.2 **Cốc có mỏ**, dung tích 100 ml, 150 ml, 400 ml, 1 l và 4 l.
- 4.3 **Ống đong chia vạch**, dung tích 100 ml, 1 l và 2 l, có nắp đậy thủy tinh.
- 4.4 **Tủ ấm**, có thông gió cưỡng bức hoặc **nồi cách thủy tuần hoàn**, có thể duy trì trong khoảng nhiệt độ từ 28 °C đến 40 °C ± 5 °C.
- 4.5 **Máy ly tâm**, có thể hoạt động ở tốc độ 3 000 r/min trong ≥ 3 min, có bộ phận để đặt các ống nghiệm.
- 4.6 **Máy lắc cơ học**, có thể hoạt động 72 h với 100 dao động đến 200 dao động theo phương ngang trong 1 min, có thể chứa 100 ống nghiệm.
- 4.7 **Ống nuôi cấy**, bằng thủy tinh cứng, có nắp vặn bằng thép không gỉ, kích thước 18 mm × 150 mm.
- 4.8 **Giấy lọc**, loại gấp nếp.
- 4.9 **Bình nón**, dung tích 6 l.

<sup>1)</sup> 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 phải sử dụng các sản phẩm này.



**4.10 Máy đo pH.****4.11 Chai polyetylen**, dung tích 500 ml.**4.12 Bình hút ẩm**, chứa chất làm khô hiệu quả.**4.13 Pipet.****5 Lấy mẫu**

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này.

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 Chuẩn bị chủng gốc của sinh vật thử nghiệm**

Cấy đậm sâu ba ống môi trường duy trì (3.22.1) từ chủng gốc thuần khiết của *Lactobacillus casei* (ví dụ: American Type Culture Collection [ATCC], 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110, USA No. 7469)<sup>2)</sup>. Ủ trong 24 h ở nhiệt độ 37 °C, ghi nhãn là chủng cấy hàng tháng và bảo quản ở nhiệt độ 10 °C. Từ một chủng cấy hàng tháng, cấy bốn ống môi trường duy trì, ủ trong 24 h ở nhiệt độ 37 °C và ghi nhãn là chủng cấy hàng tuần. Mỗi tuần cấy bốn hoặc năm ống môi trường duy trì từ chủng cấy hàng tuần, ủ trong 24 h ở nhiệt độ 37 °C và ghi nhãn là chủng cấy hàng ngày. Sử dụng chủng cấy hàng ngày để chuẩn bị dịch cấy. Vào đầu các tháng tiếp theo, hàng tháng cấy ba chủng cấy mới từ các chủng cấy hàng tháng không sử dụng chủng cấy từ chủng gốc mới.

**6.2 Chuẩn bị dịch cấy**

Nuôi ống môi trường nuôi cấy (3.22.2) chứa các tế bào của chủng cấy hàng ngày (6.1) và ủ từ 16 h đến 20 h ở nhiệt độ 37 °C. Ly tâm ống môi trường nuôi cấy 10 min ở 2 000 r/min trong điều kiện vô trùng để thu được lớp nổi phía trên, loại bỏ lớp nổi phía trên và các tế bào lơ lửng bằng cách lắc trong máy lắc cơ học (4.6) hoặc xoay trong 10 ml dung dịch muối đẳng trương (3.14). Lặp lại các bước ly tâm, loại bỏ lớp nổi phía trên và các tế bào lơ lửng hai lần. Thêm 1 ml huyền phù cuối cùng vào 10 ml dung dịch muối đẳng trương, lắc đều để thu được huyền phù đồng nhất và sử dụng làm dịch cấy.

<sup>2)</sup> Đây là ví dụ về 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 phải sử dụng sản phẩm này.

### 6.3 Chuẩn bị dung dịch thử

Đối với sản phẩm dạng bột, cân chính xác mẫu thử chứa khoảng 5 µg axit folic cho vào cốc có mỏ 100 ml (4.2). Hoàn nguyên trong 25 ml đến 30 ml nước và chuyển định lượng vào bình định mức 100 ml (4.1). Pha loãng bằng nước đến vạch.

Đối với sản phẩm dạng lỏng, dùng pipet (4.13) lấy một thể tích chứa khoảng 5 µg axit folic cho vào bình định mức 100 ml (4.1). Pha loãng bằng nước đến vạch. (Dung dịch mẫu thử chứa nồng độ axit folic khoảng 0,05 µg [50 ng]/ml).

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch mẫu thử đã pha loãng và 1 ml chế phẩm từ tụy gà (3.18) cho vào ống nuôi cấy có nắp vặn (4.7) và trộn đều. Thêm 18 ml dung dịch đệm phosphat 0,05 M-axit ascorbic (3.19) và 1 ml toluen (3.8). Trộn đều.

Đối với enzym và mẫu trắng thuốc thử, dùng pipet lấy 1 ml nước và 1 ml chế phẩm tụy gà cho vào ống nuôi cấy có nắp vặn và trộn đều. Thêm 18 ml dung dịch đệm phosphat 0,05 M-axit ascorbic và 1 ml toluen. Trộn đều.

Ủ các ống mẫu thử và các ống mẫu trắng 16 h ở nhiệt độ 37 °C. Tiệt trùng 10 min ở nhiệt độ 121 °C và ly tâm 10 min ở 2 000 r/min để thu được lớp nổi phía trên trong. Pha loãng lớp nổi phía trên với dung dịch đệm phosphat 0,05 M-axit ascorbic (3.19) để thu được thể tích cuối cùng  $V_1$  của dung dịch chuẩn gốc (3.20.1). Ghi nhãn là dung dịch thử.

### 6.4 Chuẩn bị các ống nghiệm phân tích

Làm sạch kỹ các ống nghiệm và dụng cụ thủy tinh cần thiết khác bằng cách thích hợp

**CHÚ THÍCH** Sinh vật thử nghiệm rất nhạy với một lượng nhỏ các yếu tố tăng trưởng và nhiều chất tẩy rửa. Do đó, tốt nhất làm sạch các dụng cụ thủy tinh bằng cách gia nhiệt từ 1 h đến 2 h ở nhiệt độ khoảng 250 °C.

Chuẩn bị các ống nghiệm chứa dung dịch chuẩn làm việc (3.20.3), như sau: Cho (cho lặp lại hoặc cho hai lần) lần lượt 0,0 ml (đối với mẫu trắng không được cấy), 0,0 ml (đối với mẫu trắng được cấy), 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml và 4,0 ml dung dịch chuẩn làm việc vào các ống nghiệm.

Chuẩn bị các ống nghiệm chứa dung dịch thử (6.3) như sau: Cho (cho lặp lại hoặc cho hai lần) lần lượt 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, và 4,0 ml dung dịch thử vào các ống nghiệm .

Thêm dung dịch đệm phosphat (3.12) vào từng ống nghiệm chứa dung dịch chuẩn và dung dịch thử đến 5,0 ml. Thêm 1,0 ml dung dịch vitamin (3.16) và 0,8 ml dung dịch pyridoxamin (3.17) vào chai chứa 200 ml dung dịch gốc môi trường cơ bản (3.21.6) và trộn kỹ. Thêm 5,0 ml môi trường này vào từng ống mẫu thử và ống dung dịch chuẩn. Đậy các ống bằng cách thích hợp để tránh nhiễm bẩn vi khuẩn và tiệt trùng trong 10 min ở 121 °C. Làm nguội nhanh để giảm thiểu sự tạo màu. Thực hiện các

biện pháp phòng ngừa để không làm thay đổi các điều kiện tiệt trùng và làm nguội trong quá trình phân tích. Đặt các ống quá khít trong nồi hấp hoặc nồi hấp bị quá tải có thể làm thay đổi tốc độ gia nhiệt.

Cấy vô trùng 1 giọt dịch cấy vào từng ống, trừ một bộ các ống được cho lặp lại (hoặc cho hai lần) chứa 0,0 ml dung dịch chuẩn (mẫu trắng không được cấy). Ủ từ 60 h đến 72 h, ở nhiệt độ từ 28 °C đến 40 °C ± 0,5 °C. Các ống nghiệm bị nhiễm sinh vật ngoại lai bất kỳ sẽ làm mất hiệu lực của quá trình phân tích.

## 6.5 Xác định

Trước khi xác định độ đáp ứng, kiểm tra từng bộ ống nghiệm bằng mắt thường. Các mẫu trắng không được cấy phải trong; các mẫu thử và dung dịch chuẩn phải không chứa các sinh vật khác với sinh vật thử nghiệm. Chuẩn độ các lượng chứa trong từng ống bằng dung dịch natri hydroxit 0,1 M (3.2), sử dụng dung dịch chỉ thị xanh bromthymol (3.13), hoặc sử dụng máy đo pH (4.10) chỉnh đến pH 6,8. Khi xác định độ pH, đọc các giá trị pH chính xác đến 0,01 đơn vị pH, sau khi ủ. pH của dung dịch chuẩn ở mức 5,0 ml thường thấp hơn pH của mẫu trắng được cấy từ 1,0 đến 1,5 đơn vị pH. Không tính đến các kết quả phân tích nếu độ chuẩn của mẫu trắng được cấy lớn hơn 1,5 ml so với độ chuẩn của mẫu trắng không được cấy. Độ chuẩn của dung dịch chuẩn ở mức 5,0 ml thường ở khoảng từ 8 ml đến 12 ml.

Dùng đường chuẩn nồng độ dung dịch chuẩn-độ đáp ứng bằng cách vẽ các giá trị chuẩn độ, tính bằng mililit dung dịch natri hydroxit 0,1 M đối với từng mức dung dịch chuẩn đã dùng so với lượng chất chuẩn đối chứng chứa trong các ống tương ứng.

Xác định lượng axit folic đối với từng mức dung dịch thử bằng phương pháp nội suy từ đường chuẩn. Loại bỏ các kết quả của tất cả các dung dịch mẫu thử có độ chuẩn nhỏ hơn 0,5 ml hoặc lớn hơn 4,5 ml.

## 7 Tính và biểu thị kết quả

Đối với từng mức của dung dịch thử đã dùng, tính hàm lượng axit folic trong mỗi mililit dung dịch thử. Tính giá trị trung bình của các giá trị thu được từ các ống sao cho các giá trị thu được từ các ống không lớn hơn hoặc bằng 15 % giá trị trung bình này. Nếu số các giá trị chấp nhận được còn lại nhỏ hơn hai phần ba số các ống ban đầu đã dùng trong bốn mức dung dịch thử, thì dữ liệu là không đủ để tính hiệu lực của mẫu. Nếu số các giá trị chấp nhận được còn lại là lớn hơn hoặc bằng hai phần ba số ống nghiệm ban đầu, thì tính nồng độ axit folic trong phần mẫu thử từ giá trị trung bình nêu trên.

Nồng độ axit folic trong phần mẫu thử dạng lỏng để dùng ngay,  $C$ , tính bằng microgam trên 100 mililit ( $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ), được tính theo Công thức sau:

$$C = \frac{(X \times D - EB) \times 100 \times R}{1000 \times Q}$$

Trong đó:

- X* là giá trị trung bình của nồng độ axit folic trong dung dịch thử, tính bằng nanogam trên mililit (ng/ml);
  - D* là hệ số pha loãng dựa vào 1 ml mẫu thử pha loãng được ủ với chế phẩm enzym, tính bằng mililit (ml);
  - EB* là nồng độ axit folic trong mẫu trắng chứa enzym, tính bằng nanogam trên mililit (ng/ml);
  - Q* là khối lượng hoặc thể tích phần mẫu thử, tính bằng gam (g) hoặc mililit (ml);
  - R* là phần mẫu thử hoàn nguyên cần để pha loãng đến 100 ml của thức ăn công thức dạng lỏng, tính bằng khối lượng hoặc thể tích.
- 100 là hệ số chuyển đổi từ nanogam sang microgam;
- 1 000 là hệ số chuyển đổi từ gam sang microgam.

## **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;
- f) nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Phép thử liên phòng thử nghiệm**

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm chấp nhận được của phương pháp được nêu trong Bảng A.1.

**Bảng A.1 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về phép xác định axit folic  
trong sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng để dùng ngay**

Chất phân tích	Độ thu hồi trung bình $\mu\text{g/l}$	Độ lệch chuẩn lặp lại ( $s_r$ )	Hệ số biến thiên lặp lại, (RSD <sub>r</sub> ), %	Độ lệch chuẩn tái lập ( $s_R$ )	Hệ số biến thiên tái lập, (RSD <sub>R</sub> ) %
Axit folic	173,1	16,2	9,35	44,0	25,44