

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 9514:2017
ISO 20634:2015**

**THỨC ĂN CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH VÀ
THỰC PHẨM DINH DƯỠNG CHO NGƯỜI LỚN -
XÁC ĐỊNH VITAMIN B12 BẰNG SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG
CAO PHA ĐẢO (RP-HPLC)**

Infant formula and adult nutritionals - Determination of vitamin B12 by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 9514:2017 thay thế TCVN 9514:2012;

TCVN 9514:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 20634:2015;

TCVN 9514:2017 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.

Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và thực phẩm dinh dưỡng cho người lớn - Xác định vitamin B₁₂ bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC)

Infant formula and adult nutritionals - Determination of vitamin B₁₂ by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

CẢNH BÁO – Khi 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 thích hợp và xác định khả năng áp dụng hoặc các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng vitamin B₁₂ trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và thực phẩm dinh dưỡng dành cho người lớn (dạng bột, dạng lỏng ăn liền và dạng đặc) bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao pha đảo.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Vitamin B₁₂ (Vitamin B₁₂)

Cyanocobalamin và các corrinoid chứa coban khác có hoạt tính sinh học như vitamin B₁₂, bao gồm aquocobalamin, hydroxycobalamin, metylcobalamin và adensylcobalamin được chuyển hóa thành cyanocobalamin.

2.2

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

Thực phẩm công thức đặc biệt hoàn chỉnh về mặt dinh dưỡng. Có thể sử dụng như nguồn dinh dưỡng duy nhất, dạng lỏng được chế biến từ sự kết hợp của sữa, đậu nành, gạo, whey, protein thủy phân, tinh bột và các axit amin, có và không có protein nguyên vẹn.

2.3

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

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

[Nguồn TCVN 7218:2008 (Codex Stan 72-1981)]

3 Nguyên tắc

Cyanocobalamin và các corrinoid chứa coban khác được chiết ra khỏi mẫu thử bằng dung dịch đệm natri axetat (pH = 4,5) và sau đó được chuyển thành cyanocobalamin sử dụng kali xyanua ở 105 °C. Dịch chiết được tinh sạch và cô đặc bằng cột chiết pha rắn (SPE) C8 hoặc C18, sau đó được phân tích bằng sắc kí rây phân tử và sắc kí pha đảo. Vitamin B₁₂ được xác định bằng sắc kí lỏng quan sát ở bước sóng 550 nm.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

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

4.1 Axit axetic băng.

4.2 Axetonitril, loại dùng cho HPLC.

4.3 Chất hút ẩm drierite, canxi sulfat khan, cỡ hạt 8 mesh.

4.4 Etanol, biến tính.

4.5 Axit formic, độ tinh khiết 88 %.

4.6 Kali xyanua, độ tinh khiết 97 %.

4.7 Riboflavin, độ tinh khiết từ 98 % đến 102 %.

4.8 Natri axetat khan hoặc natri axetat ngậm ba phân tử nước.

4.9 Taka-díastase, của hãng Accurate Chemical Co¹⁾ hoặc tương đương.

4.10 Trietylamin, loại dùng cho HPLC.

¹⁾ 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 chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

4.11 Chất chuẩn gốc vitamin B₁₂ (cyanocobalamin), ví dụ: chất chuẩn USP 1152009 (xấp xỉ 10 µg/mg), lô hàng chính thức¹⁾. Bảo quản chất chuẩn này trong bình hút ẩm, tránh ánh sáng trắng.

4.12 Chuẩn bị các dung dịch và các dung dịch chuẩn

4.12.1 Yêu cầu chung

Tất cả các dung dịch có thể được pha theo tỷ lệ tăng hoặc giảm tùy thuộc vào thực hành tốt của phòng thử nghiệm cần tuân thủ. Các dung dịch này có thể được bảo quản lạnh hoặc bảo quản ở nhiệt độ môi trường đựng trong vật chứa trơ kín khí, trừ khi có quy định khác.

4.12.2 Chuẩn bị các dung dịch

4.12.2.1 Pha động A dùng cho HPLC

Pha loãng 4,0 ml triethylamin với 1000 ml nước. Chỉnh pH từ 5 đến 7 sử dụng khoảng 1,25 ml axit formic đặc (4.5). Dung dịch này được sử dụng trong 1 tuần.

4.12.2.2 Pha động B dùng cho HPLC

Trộn 4,0 ml triethylamin và 250 ml axetonitril với 750 ml nước. Chỉnh pH từ 5 đến 7 sử dụng khoảng 1,25 ml axit formic đặc. Dung dịch này được sử dụng trong 1 tuần khi được bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín.

4.12.2.3 Pha động C dùng cho HPLC

Trộn 4,0 ml triethylamin và 750 ml axetonitril với 250 ml nước. Chỉnh pH đến khoảng từ 5 đến 7 sử dụng khoảng 1,25 ml axit formic đặc (4.5). Dung dịch này được sử dụng trong 1 tuần khi được bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín.

4.12.2.4 Pha động D dùng cho HPLC

Pha loãng 50 ml axetonitril bằng nước đến 2 000 ml. Dung dịch này được sử dụng trong 1 tuần khi được bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín.

4.12.2.5 Hỗn hợp của axetonitril và nước, 10 % thể tích

Pha loãng 150 ml axetonitril bằng nước đến 1 500 ml. Dung dịch này được sử dụng trong 1 tháng khi được bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín.

4.12.2.6 Hỗn hợp của axetonitril và nước, dung môi rửa giải SPE, 30 % thể tích

Pha loãng 30 ml axetonitril bằng nước đến 100 ml. Dung dịch này được sử dụng trong 1 tháng khi được bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín.

TCVN 9514:2017

4.12.2.7 Hỗn hợp của axetonitril và nước, dung dịch làm sạch cột và bảo quản cột, 50 % thể tích

Pha loãng 500 ml axetonitril bằng nước đến 1 000 ml trong bình định mức. Dung dịch này được sử dụng trong 6 tháng.

4.12.2.8 Hỗn hợp của etanol và nước, 25 % thể tích

Pha loãng 50 ml etanol bằng nước đến 200 ml. Dung dịch này được sử dụng trong 1 năm khi được bảo quản trong vật chứa có nắp đậy kín.

4.12.2.9 Dung dịch kali xyanua, nồng độ khối lượng $\rho = 4 \text{ g/l}$

Hòa tan 0,02 g kali xyanua bằng dung dịch đệm natri axetat (4.12.2.11) (nồng độ chất $c = 0,25 \text{ mol/l}$) và thêm dung dịch này đến 5 ml. Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng.

4.12.2.10 Dung dịch kali xyanua, $\rho = 10 \text{ g/l}$

Hòa tan 0,25 g kali xyanua trong nước và thêm nước đến 25 ml. Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng.

4.12.2.11 Dung dịch đệm natri axetat, $c = 0,25 \text{ mol/l}$

Hòa tan 41,0 g natri axetat khan hoặc 68,0 g natri axetat ngậm ba phân tử nước trong khoảng 1 800 ml nước. Chính pH đến 4,5 bằng axit axetic đặc (khoảng 40 ml). Pha loãng bằng nước đến 2 000 ml. Dung dịch này được sử dụng trong 3 tháng.

4.12.2.12 Dung dịch kiểm tra độ phân giải

Cân khoảng 0,005 g riboflavin cho lên giấy cân. Chuyển sang bình định mức 100 ml và thêm dung dịch axetonitril 10 % đến vạch. Khuấy để hòa tan. Trộn các thể tích bằng nhau của dung dịch này với dung dịch chuẩn làm việc vitamin B₁₂ có nồng độ cao nhất. Dung dịch này được sử dụng trong 1 tuần.

4.12.2.13 Dung dịch Taka-diastase, $\rho = 60 \text{ g/l}$

Hòa tan 0,6 g Taka-diastase trong 10 ml nước. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày trước khi sử dụng.

4.12.3 Chuẩn bị các dung dịch chuẩn

4.12.3.1 Yêu cầu chung

Chuẩn bị tất cả các dung dịch chuẩn dưới ánh sáng huỳnh quang chắn UV và bảo quản trong các bình định mức có nắp đậy kín ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

4.12.3.2 Dung dịch chuẩn gốc vitamin B₁₂, ρ = 10 000 µg/l

Cân chính xác các lượng thích hợp chất chuẩn vitamin B₁₂ (4.11) để có được nồng độ chất chuẩn gốc 10 000 µg/l. Hòa tan và pha loãng đến 100 ml bằng etanol 25 % (4.12.2.8). Dung dịch này được sử dụng trong 6 tháng.

Tính lượng chất chuẩn vitamin B₁₂ cần lấy, m_w , tính bằng miligam, theo Công thức (1) sau đây:

$$m_w = 10\,000 \times 0,1 \times \frac{1}{P} \quad (1)$$

Trong đó:

10 000 là nồng độ cần đạt của dung dịch chuẩn gốc, tính bằng microgam trên lít (µg/l);

0,1 là thể tích pha loãng, tính bằng lít (l);

P là độ tinh khiết của chất chuẩn vitamin B₁₂ (4.11), biểu thị theo số microgam cyanocobalamin trên miligam chất chuẩn (µg/mg).

4.12.3.3 Dung dịch chuẩn trung gian vitamin B₁₂, ρ = 1 000 µg/l

Pha loãng 10 ml dung dịch chuẩn gốc vitamin B₁₂ (4.12.3.2) bằng nước đến 100 ml. Dung dịch này được sử dụng trong 1 tuần.

4.12.3.4 Dung dịch chuẩn hiệu chuẩn vitamin B₁₂, ρ = 2,5 µg/l đến 25 µg/l

Cho vào các bình định mức riêng rẽ các lượng: 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml; 4 ml và 5 ml dung dịch chuẩn trung gian vitamin B₁₂ (4.12.3.3) và pha loãng bằng axetonitril 10 % (4.12.2.5) đến 200 ml. Dung dịch này được sử dụng trong 1 tháng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Hệ thống HPLC

Gồm có bơm gradient, cột van đổi chiều và bơm đẳng dòng, detector UV-VIS được trang bị đèn wolfram, có thể kiểm soát ở bước sóng 550 nm và có bộ lấy mẫu tự động có thể bơm từ 900 µl đến 2 000 µl mẫu.

TCVN 9514:2017

5.2 Cột HPLC, kích cỡ phân tích trừ cột:

- Cỡ hạt 4 μm , kích thước 250 mm \times 9,4 mm (ví dụ: sản phẩm Zorbax GF-250²⁾, P/N 884973-901);
- Cỡ hạt 5 μm , kích thước 300 mm \times 8 mm (ví dụ: sản phẩm Shodex Protein[®] KW-802.5²⁾, P/N F6989000) hoặc tương đương.

5.3 Cột HPLC, cột C18 phân tích:

- Cỡ hạt 3 μm , kích thước 100 mm \times 4,6 mm (ví dụ: sản phẩm Thermo Scientific Aquasil ^{TM2)} P/N 77503-104630) có cột bảo vệ C18 cỡ hạt 3 μm , kích thước 10 mm \times 4,6 mm (ví dụ: sản phẩm Thermo Scientific Aquasil ^{TM2)} P/N 77503-014001);
- Epic Phenyl Hexyl, cỡ hạt 3 μm , 120 Å, kích thước 100 mm \times 4,6 mm (sản phẩm ES Industries 125191-EPHX)²⁾ có cột bảo vệ thích hợp hoặc cột pha đảo tương đương có 100 % dung dịch pha động).

5.4 Tủ sấy, có thể duy trì nhiệt độ ở 95 °C \pm 5 °C và 105 °C \pm 5 °C.

5.5 Dụng cụ đo pH, có đệm hiệu chuẩn.

5.6 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,000 01 g.

5.7 Cốc thủy tinh có mỏ, có các dung tích thích hợp.

5.8 Bộ phân phối trên đỉnh cột, có thể phân phối 30 ml hoặc loại tương đương.

5.9 Ống đồng bằng thủy tinh, được chia vạch, có các dung tích thích hợp.

5.10 Bình hút ẩm.

5.11 Bình nón, dung tích 125 ml hoặc loại tương đương.

5.12 Giấy lọc, Whatman 2V²⁾ hoặc loại tương đương.

5.13 Phễu lọc, bằng chất dẻo, thích hợp để sử dụng cùng giấy lọc.

5.14 Găng tay, dùng một lần.

5.15 Pipet, có dung tích thích hợp từ 100 μl đến 1 000 μl .

²⁾ 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 chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

5.16 Tấm chắn ánh sáng phòng thử nghiệm, tấm chắn trong suốt hoặc màu vàng có ngưỡng phổ ít nhất 385 nm.

5.17 Cột chiết pha rắn SPE

Cột C8, 900 mg (ví dụ: Alltech/Grace Davidson P/N 20966²⁾); C18, 900 mg (ví dụ: Alltech/Grace Davidson P/N 20942²⁾) hoặc loại tương đương. Ví dụ về cột SPE được nêu trong Phụ lục C.

5.18 Xyranh, dùng một lần, có dung tích thích hợp.

5.19 Xyranh có đầu lọc, bằng nylon, cỡ lỗ 0,45 µm.

5.20 Bộ chân không, 24 cổng, có van khóa hoặc loại tương đương.

5.21 Pipet định mức, có dung tích thích hợp.

5.22 Bình định mức, có dung tích thích hợp.

6 Lấy mẫu

6.1 Yêu cầu chung

Chuẩn bị tất cả các mẫu trong ánh sáng huỳnh quang chắn UV. Các mẫu thử đã chuẩn bị nếu được bảo quản trong bình định mức đậy kín ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C có thể bền đến 14 ngày. Tất cả các mẫu thử càng đồng nhất càng tốt và phải là mẫu đại diện. Do đó, trước khi lấy mẫu, cần khuấy trộn đều mẫu.

6.2 Chuẩn bị mẫu thử

6.2.1 Yêu cầu chung

Đối với tất cả các mẫu có chứa tinh bột, thêm 1 ml dung dịch Taka-diestase (4.12.2.13). Cho Taka-diestase phản ứng với các mẫu ít nhất 30 min trước khi tiếp tục chiết.

6.2.1.1 Mẫu dạng lỏng

Đối với các mẫu dạng lỏng ăn liền, trộn kỹ để đảm bảo đồng nhất và cân chính xác khoảng 20,0 g mẫu thực phẩm dinh dưỡng dành cho người lớn hoặc 25,0 g mẫu thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh cho vào bình định mức 100 ml. Tiếp tục quá trình chiết.

6.2.1.2 Mẫu dạng bột

Nếu chưa biết được độ đồng nhất của mẫu dạng bột, thì giả định rằng mẫu không đồng nhất và thực hiện đối với mẫu dạng bột không đồng nhất/trộn khô (6.2.1.3).

TCVN 9514:2017

6.2.1.3 Mẫu dạng bột được trộn khô

Đối với các mẫu dạng bột không đồng nhất/trộn khô, cân chính xác khoảng 25,0 g, bổ sung 200,0 g nước ở nhiệt độ 40 °C trước khi trộn, cho đến khi thu được huyền phù đồng nhất. Có thể sử dụng bộ đồng hóa, nếu cần. Cân chính xác khoảng 20,0 g mẫu thực phẩm dinh dưỡng dành cho người lớn hoặc 25,0 g mẫu thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh cho vào bình định mức 100 ml.

6.2.1.4 Mẫu dạng bột được trộn ướt

Đối với mẫu dạng bột đồng nhất trộn ướt, cân chính xác khoảng 3,0 g cho vào bình định mức 100 ml. Thêm 25 ml nước và trộn cho đến khi hòa tan hoàn toàn.

6.2.1.5 Mẫu chứa các axit amin tự do và protein không nguyên vẹn (elemental formulas)

Đối với các sản phẩm chứa các axit amin tự do và protein không nguyên vẹn, thêm 0,5 g canxi caseinat hoặc sữa bột không béo vào 3,0 g mẫu dạng bột đồng nhất đã trộn ướt đã được pha loãng với 25 ml nước hoặc 20 g đến 25 g mẫu dạng lỏng hoặc mẫu dạng bột không đồng nhất trộn khô đã hoàn nguyên. Trộn kỹ để hòa tan protein. Thêm ngay 30 ml dung dịch đệm natri axetat (4.12.2.11) và 1 ml dung dịch kali xyanua 1 %. Pha loãng bằng nước đến vạch, lọc, làm sạch và cô đặc dịch lọc đến 60 ml để đưa vào cột C8 hoặc C18 900 mg đã được ổn định trước. Không gia nhiệt mẫu trong tủ sấy 105 °C.

6.2.2 Chiết mẫu

Thêm 30 ml dung dịch đệm natri axetat (4.12.2.11) vào mỗi phần mẫu thử và lắc bình để trộn. Đặt bình vào tủ hút, thêm 1 ml dung dịch kali xyanua 1 % (4.12.2.10) mới chuẩn bị vào mỗi bình và lắc bình để trộn. Gia nhiệt mẫu trong tủ ở nhiệt độ 105 °C ít nhất 60 min và không quá 120 min. Nhiệt độ của tủ sẽ giảm khi cửa tủ mở. Bắt đầu tính thời gian khi nhiệt độ tủ đạt trở lại 105 °C.

Sau đó, lấy mẫu ra khỏi lò và làm nguội ngay trong bể nước đá. Pha loãng mẫu bằng nước đến vạch. Trộn kỹ. Lọc mẫu qua giấy lọc (5.12) vào bình nón 125 ml hoặc dụng cụ thủy tinh tương tự. Có thể thay giấy lọc, nếu bị tắc. Nếu mẫu đã chuẩn bị đục và có chứa một lượng rất nhỏ các hạt không hòa tan, thì ly tâm mẫu và chuyển lớp chất lỏng sang phễu có lót giấy lọc. Không gia nhiệt mẫu đã bổ sung canxi caseinat, xem 6.2.1.5.

6.2.3 Cô đặc mẫu

Để tinh sạch và cô đặc mẫu, lắp cột SPE 900 mg (5.17) vào van khóa của bộ chân không và lắp xyranh 30 ml dùng một lần vào đỉnh từng cột. Ổn định từng cột với ít nhất 20 ml axetonitril (rửa giải bằng trọng lực) và tráng rửa từng cột bằng ít nhất 10 ml nước. Dùng pipet định mức, chuyển dịch lọc mẫu vào cột theo hướng dẫn trong Bảng 1. Nếu chưa biết nồng độ vitamin B₁₂, thì sử dụng hướng dẫn đối với các

sản phẩm RTF chứa từ 1 µg/l đến 10 µg/l. Nếu cần, hút chân không đủ để mẫu chảy ổn định qua cột. Tốc độ rửa giải qua cột không quá 120 giọt/min. Loại bỏ chất rửa giải.

Bảng 1 – Hướng dẫn đưa dịch lọc mẫu lên cột SPE

Vitamin B ₁₂ trong sản phẩm RTF, µg/l	Lượng dịch lọc được đưa lên cột SPE, ml	Thể tích pha loãng cuối cùng, ml
Nhỏ hơn 1	80	5
Từ 1 đến 10	Từ 70 đến 80	10
Từ 11 đến 20	Từ 50 đến 60	10
Từ 21 đến 50	Từ 20 đến 40	10

CHÚ THÍCH: Không đưa quá 60 ml mẫu thực phẩm dinh dưỡng cho người lớn lên cột Alltech C8 hoặc C18.

Sau khi toàn bộ dịch lọc mẫu chảy qua cột SPE, tráng từng cột bằng 5 ml nước và gạt bỏ dịch rửa giải. Làm khô các cột bằng cách hút chân không cho đến khi không còn thấy dịch rửa giải chảy ra. Khóa van.

Sử dụng hướng dẫn trong Bảng 1, đặt bình định mức 5 ml hoặc 10 ml phía dưới mỗi cột. Thêm 4,4 ml hỗn hợp 30 % axetonitril và nước (4.12.2.6) vào các cột SPE 900 mg. Mở từng van khóa và rửa giải vitamin B₁₂ vào các bình định mức có hút chân không. Tốc độ rửa giải qua cột không quá 120 giọt/min.

Để chuẩn bị dung dịch pha loãng cuối cùng, đối với dịch lọc mẫu đựng trong bình định mức 10 ml, pha loãng bằng nước đến vạch.

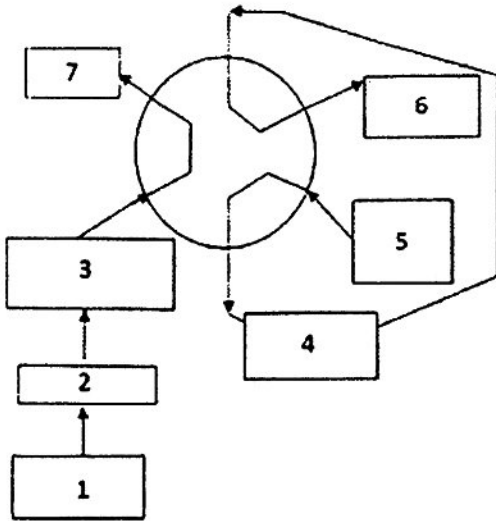
Đối với dịch lọc mẫu đựng trong bình định mức 5 ml, đưa bình vào tủ hút và thêm 0,1 ml dung dịch kali xyanua 0,4 % (4.12.2.9) mới chuẩn bị vào từng bình định mức. Đặt các mẫu vừa chuẩn bị vào tủ ở nhiệt độ 95 °C trong ít nhất 1,5 h nhưng không quá 4 h. Sau đó lấy bình đựng mẫu ra khỏi tủ sấy và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Pha loãng bằng nước đến vạch.

Lọc một lượng của các dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử qua bộ lọc xyranh (5.19) vào lọ lấy mẫu tự động.

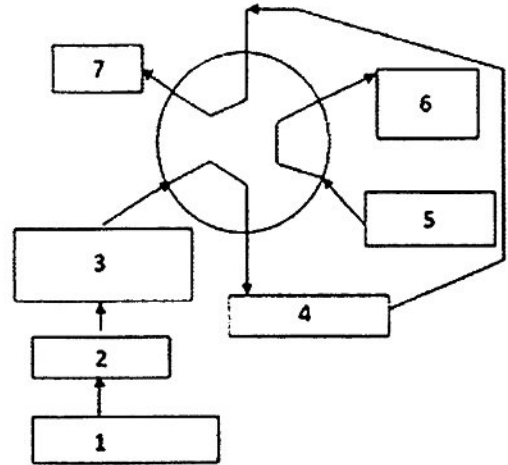
6.3 Phân tích bằng HPLC

6.3.1 Cấu hình và cài đặt hệ thống

Cấu hình và cài đặt hệ thống theo Hình 1.



a) Cấu hình 1



b) Cấu hình 2

CHÚ DẪN

- | | |
|----------------------|-------------------|
| 1 Bơm đẳng dòng | 5 Bơm gradient |
| 2 Bộ lấy mẫu tự động | 6 Detector UV/VIS |
| 3 Cột rây phân tử | 7 Chất thải |
| 4 Cột phân tích C18 | |

Hình 1 – Cấu hình và cài đặt hệ thống HPLC

6.3.2 Điều kiện vận hành thiết bị

- Thời gian chạy: 30 min đến 35 min;
- Thể tích bơm: 0,9 ml đến 2,0 ml;
- Cấu hình của hệ thống: xem Bảng 2.

Bảng 2 – Cấu hình của hệ thống

Thời gian, min	Cấu hình của van (xem Hình 1)
Từ 0 đến 10,5	1
Từ 10,5 đến 14,5	2
Từ 14,5 đến 30,0 đến 35,0	1

- Bơm đẳng dòng

- pha động D (4.12.2.4);
- điều chỉnh tốc độ dòng sao cho dịch rửa giải vitamin B₁₂ chảy từ cột rây phân tử trong thời gian từ 10,5 min đến 14,5 min. Tốc độ dòng điển hình từ 1,1 ml/min đến 1,2 ml/min

Để xác định tốc độ dòng thích hợp, nối trực tiếp cột rây phân tử với detector UV-VIS và bơm dung dịch chuẩn đi qua. Chỉnh tốc độ dòng sao cho dịch rửa giải vitamin B₁₂ trong khoảng thời gian từ 10,5 min đến 14,5 min.

– Bơm gradient

- Pha động A (4.12.2.1), pha động B (4.12.2.2) và pha động C (4.12.2.3)
- Gradient để rửa giải vitamin B₁₂ trong 24 min đến 30 min được nêu trong Bảng 3.

Bảng 3 – Gradient của cột (xem 5.3)

Thời gian, min	Pha động A, %	Pha động B, %	Pha động C, %
0,00	90	10	0
14,5	90	10	0
14,6	40 đến 60 ^a	từ 60 đến 40 ^a	0
27,0 đến 30,0	40 đến 60 ^a	từ 60 đến 40 ^a	0
27,1 đến 30,1	0	10	90
29,9 đến 33,0	0	10	90

^a Các điều kiện gradient thích hợp phải được thiết lập cho từng cột để tách được hết vitamin B₁₂ và riboflavin và để rửa giải vitamin B₁₂ trong khoảng thời gian từ 24 min đến 30 min. Thiết lập các điều kiện gradient thích hợp với cột mới, cài đặt thành phần gradient ở 14,6 min và 27,0 min đến 30,0 min đến điểm giữa của dải cho phép trong Bảng này. Bơm dung dịch mẫu thử phân giải (4.12.2.12) và tính độ phân giải (R) giữa các pic vitamin B₁₂ và riboflavin. Chỉnh thành phần pha động ở 14,6 min và 27,0 min đến 30,0 min cho đến khi R > 1,5. Sau khi vitamin B₁₂ rửa giải khỏi cột C18 hoặc cột phenyl, tráng cột bằng 90 % pha động C ít nhất 2,8 min.

– Tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

– Cài đặt detector: bước sóng phát hiện 550 nm và băng thông 10 nm.

Sau khi hệ thống đã cân bằng, bơm các chất chuẩn hiệu chuẩn và dãy mẫu. Sau khi bơm dung dịch mẫu cuối cùng, phân tích ít nhất một dung dịch chất chuẩn để khẳng định tính ổn định của hệ thống.

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

7 Tính kết quả

7.1 Yêu cầu chung

Các nồng độ vitamin B₁₂ trong mẫu thử được tính bằng cách so sánh các diện tích pic của các mẫu đã biết khối lượng với các diện tích pic của các chất chuẩn có nồng độ đã biết.

Quan sát kỹ sắc ký đồ của từng chất chuẩn với sắc ký đồ của mẫu và kiểm tra chắc chắn rằng pic vitamin B₁₂ được tách ra khỏi tất cả các pic khác trong sắc ký đồ.

Các diện tích pic được đo bằng hệ thống dữ liệu. Trước khi tính nồng độ vitamin B₁₂ của mẫu, so sánh diện tích pic vitamin B₁₂ của chất chuẩn với diện tích pic vitamin B₁₂ của mẫu và kiểm tra diện tích pic vitamin B₁₂ của mẫu nằm trong dải của các diện tích pic vitamin B₁₂ của chất chuẩn.

7.2 Tính nồng độ dung dịch chuẩn

Tính nồng độ khối lượng, ρ_{ws} , bằng microgam trên lít, của dung dịch chuẩn hiệu chuẩn vitamin B₁₂ (4.12.3.4), theo Công thức (2):

$$\rho_{ws} = S_w \times P \times \frac{A}{200} \quad (2)$$

Trong đó:

S_w là lượng chất chuẩn vitamin B₁₂ đã biết khối lượng, tính bằng miligam (mg);

P là độ tinh khiết của chất chuẩn vitamin B₁₂ (xem 4.11), tính bằng microgam cyanocobalamin (vitamin B₁₂) trên miligam chất chuẩn ($\mu\text{g}/\text{mg}$);

A là lượng dung dịch chuẩn trung gian vitamin B₁₂ (4.12.3.3) đã sử dụng, tính bằng mililit (ml) (ở đây A là: 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml hoặc 5,0 ml);

200 là thể tích pha loãng cuối cùng, tính bằng mililit (ml).

7.3 Dụng cụ chuẩn

Với mỗi nồng độ chất chuẩn, tính giá trị trung bình của diện tích pic của chất chuẩn được bơm trước dãy mẫu với diện tích pic của chất chuẩn được bơm sau mỗi dãy mẫu. Dụng cụ chuẩn tuyến tính bằng phương pháp bình phương nhỏ nhất (hồi quy) của nồng độ chất chuẩn theo diện tích pic của các dung dịch chuẩn làm việc.

7.4 Tính nồng độ vitamin B₁₂ trong các dung dịch mẫu

Nồng độ vitamin B₁₂ trong mỗi mẫu borm được ngoại suy từ đường chuẩn vitamin B₁₂ chuẩn bị trong 7.3.

Tính phần khối lượng, w_p , của vitamin B₁₂ trong từng sản phẩm, bằng microgam trên 100 g, theo Công thức (3):

$$w_p = \rho_i \times \frac{V_1}{m_s} \times \frac{V_2}{V_f} \times \frac{m_{pr}}{m_{rp}} \times \frac{1}{10} \quad (3)$$

Trong đó:

ρ_i là nồng độ khối lượng vitamin B₁₂ của mẫu thử được ngoại suy từ đường chuẩn, tính bằng microgam trên lít ($\mu\text{g/l}$);

V_1 là thể tích của dung dịch pha loãng đầu tiên, tính bằng mililit (ml) (trong trường hợp này $V_1 = 100$ ml);

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

V_2 là thể tích dung dịch pha loãng thứ hai (dung dịch cuối cùng), tính bằng mililit (ml);

V_f là thể tích dung dịch lọc đưa lên cột, tính bằng mililit (ml);

m_{pr} là tổng khối lượng mẫu thử dạng bột dùng để hoàn nguyên, tính bằng gam (g) (nếu áp dụng);

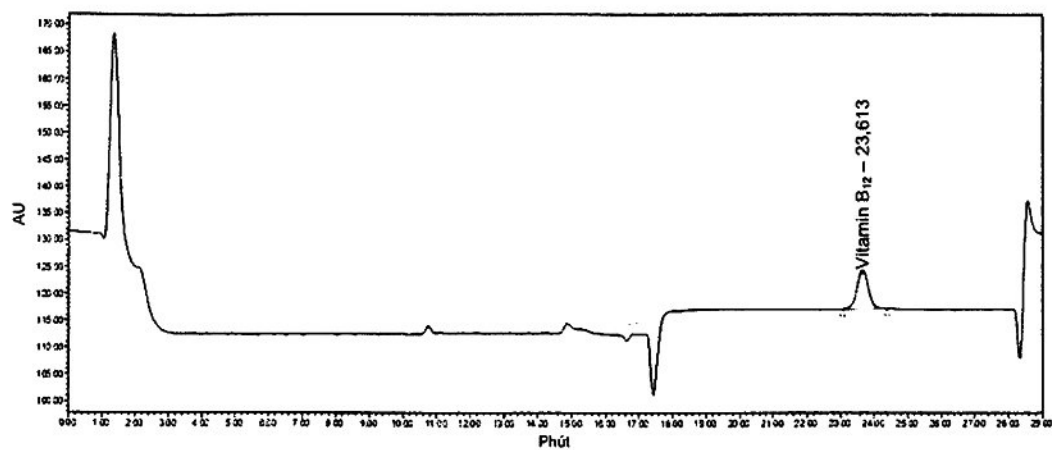
m_{rp} là khối lượng mẫu thử dạng bột đã hoàn nguyên, tính bằng gam (g) (nếu áp dụng).

CHÚ THÍCH: m_{pr} và m_{rp} bằng 1 đối với mẫu dạng lỏng và mẫu dạng bột được cân trực tiếp.

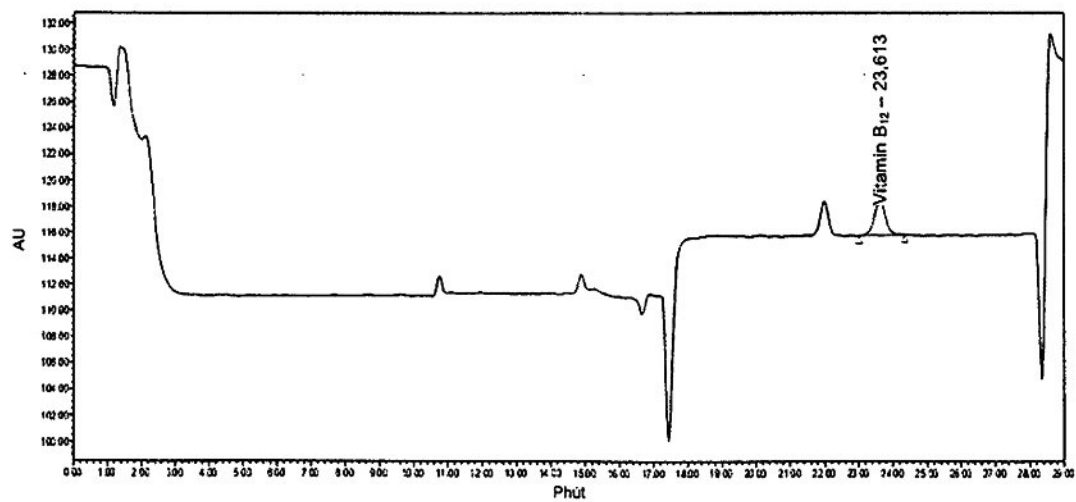
Phụ lục A

(Tham khảo)

Sắc ký đồ điện hình



Hình A.1 – Sắc ký đồ điện hình của chuẩn



Hình A.2 – Sắc ký đồ điện hình của mẫu

Phụ lục B

(Tham khảo)

Dữ liệu độ chụm

Dữ liệu thu được từ nghiên cứu liên phòng thử nghiệm về kết quả đánh giá độ chụm của phương pháp^[3] được nêu trong Bảng B.1 phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[2] và đã được công bố năm 2015^[1], thực hiện theo nguyên tắc hài hòa AOAC-IUPAC về quy trình nghiên cứu liên phòng. Nghiên cứu này đã được thực hiện theo các yêu cầu nêu trong Tài liệu tham khảo ^[4].

Thông tin chi tiết hơn về đánh giá xác nhận phương pháp có thể tham khảo tại <http://standards.iso.org/iso/20634>.

Bảng B.1 – Dữ liệu độ chụm đối với vitamin B₁₂

Mẫu	NIST SRM 1849a	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e	6 ^f	7 ^g	8 ^h	9 ⁱ	10 ^j	11 ^k
Năm tiến hành thử liên phòng	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Số lượng phòng thử nghiệm	11	9	10	11	10	10	10	10	11	10	9	10
Số lượng phòng thử nghiệm không tham gia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	10	9	10	11	9	10	10	9	10	9	8	10
Số phòng ngoại lệ	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
Số lượng kết quả chấp nhận được	20	18	20	22	18	20	20	14	20	18	16	20
Giá trị trung bình, \bar{x} , µg/100 g	43,7 ^l	0,272	0,300	0,373	0,543	0,250	0,636	1,48	0,428	0,227	0,967	1,08
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , µg/100 g	3,01 ^l	0,0257	0,0270	0,0200	0,0169	0,0244	0,0348	0,122	0,0208	0,0111	0,0289	0,0730
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{V,r}$, %	6,90	9,46	8,99	5,35	3,11	9,77	5,47	8,23	4,85	4,90	2,98	6,74
Giới hạn lặp lại r [$r = 2,8 \times s_r$], µg/100g	8,43 ^l	0,0720	0,0756	0,0560	0,0473	0,0683	0,0974	0,342	0,0582	0,0311	0,0809	0,204
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , µg/100 g	3,86 ^l	0,0427	0,0416	0,0694	0,0603	0,0487	0,0587	0,171	0,0305	0,0202	0,0342	0,190
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$, %	8,84	15,7	13,8	18,6	11,1	19,5	9,23	11,5	7,13	8,90	3,54	17,5
Giới hạn tái lập R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/100 g	10,8 ^l	0,120	0,116	0,194	0,169	0,136	0,164	0,479	0,0854	0,0566	0,0958	0,532
Trị số HorRat, theo Tài liệu tham khảo ^[5]	0,34	0,40	0,36	0,50	0,32	0,50	0,27	0,38	0,20	0,22	0,11	0,55

^a Sữa công thức RTF dành cho trẻ sơ sinh, ^b Sữa bột dinh dưỡng dành cho người lớn, ^c Sữa dành cho trẻ sơ sinh dạng bột đã thủy phân một phần, ^d thức ăn dạng bột dành cho trẻ sơ sinh, ^e thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng bột từ đậu nành đã thủy phân từng phần, ^f Bột dinh dưỡng dành cho người lớn có hàm lượng chất béo thấp, ^g RTF dinh dưỡng có hàm lượng chất béo cao dành cho người lớn (các phép xác định riêng rẽ trong 4 phòng thử nghiệm vì hộp đựng sản phẩm dán nhãn sai), ^h bột đậu công thức dành cho trẻ sơ sinh, ⁱ sữa bột công thức dành cho trẻ sơ sinh, ^j thức ăn công thức dạng bột dành cho trẻ nhỏ, ^k RTF dinh dưỡng có hàm lượng protein cao dành cho người lớn, ^l kết quả tính bằng µg/kg bột.

Phụ lục C
(Tham khảo)

Ví dụ về quy trình chuẩn hóa cột SPE

Để thiết lập tính tương đương của cột SPE hoặc để kiểm tra tính ổn định của lô cột mới, có thể thực hiện quy trình sau đây:

Chuẩn bị dung dịch chứa vitamin B₁₂ 160 µg/l trong nước.

Chuẩn bị ba mẫu từ một sản phẩm đại diện có chứa lượng protein cao nhất của sản phẩm bất kỳ cần phân tích bằng phương pháp này, sử dụng quy trình chiết nêu trong 6.2.1 và 6.2.2.

Gộp tất cả các dịch lọc mẫu chiết được. Thêm 1 ml dung dịch chứa vitamin B₁₂ 160 µg/l trong nước vào 80 ml hoặc 100 ml dịch lọc mẫu (mẫu thêm chuẩn) và thêm 1 ml nước vào 80 ml hoặc 100 ml dịch lọc mẫu (mẫu không thêm chuẩn).

Tiếp tục chuẩn bị mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn sử dụng quy trình cô đặc mẫu và pha loãng mẫu cuối cùng như trong 6.2.3.

Phân tích sắc ký hai mẫu này. Tính nồng độ vitamin B₁₂ của mẫu thêm chuẩn và mẫu không thêm chuẩn và tính độ thu hồi thêm chuẩn.

Để xem xét chấp nhận cột, độ thu hồi thêm chuẩn phải bằng hoặc lớn hơn 90 %.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] 2011.10, Determination of Vitamin B12 in Infant, Adult, and Pediatric Formulas by HPLC-UV and Column Switching: Collaborative Study
 - [2] 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.*
 - [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 2011.005, Standard Method Performance Requirements for Vitamin B₁₂ in infant formula and Adult/Pediatric Nutritional formula
 - [5] M. Thompson 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
-