

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 ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC)

Infant formula and adult nutritionals - Determination of vitamin B₁₂ by reversed phase high performance liquid chromatography 9RP-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 ký 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, methylcobalamin và adenosylcobalamin 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-diastase, 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.

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 $\rho = 4$ g/l

Hòa tan 0,02 g kali xyanua bằng dung dịch đệm natri axetat (4.12.2.11) (nồng độ chất $c = 0,25$ 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, $\rho = 10$ 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, $c = 0,25$ 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. Chỉnh 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, $\rho = 60$ 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, $\rho = 10\,000\ \mu\text{g/l}$

Cân chính xác các lượng thích hợp chất chuẩn vitamin B₁₂ (4.11) để có được nồng độ chất chuẩn gốc 10 000 $\mu\text{g/l}$. 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 ($\mu\text{g/l}$);

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 ($\mu\text{g/mg}$).

4.12.3.3 Dung dịch chuẩn trung gian vitamin B₁₂, $\rho = 1\,000\ \mu\text{g/l}$

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, $\rho = 2,5\ \mu\text{g/l}$ đến $25\ \mu\text{g/l}$

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.