

**TCVN 11912:2017
ISO 20637:2015**

**THỨC ĂN CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH VÀ
THỰC PHẨM DINH DƯỠNG CHO NGƯỜI LỚN - XÁC ĐỊNH
MYO-INOSITOL BẰNG SẮC KÝ LỎNG VÀ ĐO AMPE XUNG**

*Infant formula and adult nutritionals - Determination of myo-inositol by liquid chromatography
and pulsed amperometry*

~

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 11912:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 20637:2015;

TCVN 11912:2017 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 myo-inositol bằng sắc ký lỏng và đo ampe xung

Infant formula and adult nutritionals - Determination of myo-inositol by liquid chromatography and pulsed amperometry

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 myo-inositol (dạng tự do hoặc dạng tự do liên kết với phosphatidylinositol) trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và thực phẩm dinh dưỡng cho người lớn bằng sắc ký lỏng và đo ampe xung có chuyển đổi cột.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Dinh dưỡng dành cho người lớn (adult nutritional)

Thực phẩm dinh dưỡng hoàn chỉnh đặc biệt ở dạng lỏng, có thể là nguồn dinh dưỡng duy nhất, 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.

2.2

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

Myo-inositol tự do và myo-inositol liên kết phosphatidyl chiết được sử dụng hai quy trình chuẩn bị mẫu khác nhau. Myo-inositol tự do được chiết ra khỏi mẫu bằng axit clohydric loãng và nước. Phosphatidylinositol được chiết ra khỏi mẫu bằng clorofom và được tách ra khỏi các chất béo khác bằng cột chiết pha rắn silica. Myo-inositol sau đó được giải phóng ra khỏi mạch chính glycerol bằng axit clohydric và axit axetic đặc ở nhiệt độ 120 °C. Phương pháp sắc ký ion sử dụng sự kết hợp của hai cột trao đổi ion khác nhau có chuyển cột và detector đo ampe xung (PAD). Nồng độ myo-inositol tính được bằng cách so sánh với nồng độ đã biết của các chất ngoại chuẩn.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

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

4.1 Hóa chất và dung môi

4.1.1 Axit axetic băng.

4.1.2 Cloroform, có độ tinh khiết cao, dùng cho phân tích HPLC.

4.1.3 Dietyl ete khan, dùng cho phân tích HPLC.

4.1.4 Drierite (chất hút ẩm), canxi sulfat khan, 8 mesh.

4.1.5 Heli, loại zero hoặc tương đương.

4.1.6 Hexan, dùng cho phân tích HPLC.

4.1.7 Axit clohydric, đặc (36 % đến 38 %).

4.1.8 Axit metaphosphoric.

4.1.9 Metanol, dùng cho phân tích HPLC.

4.1.10 Myo-inositol, chất chuẩn đầu của lô hàng chính thức, được bảo quản khô. Độ tinh khiết được ghi trên nhãn.

4.1.11 Natri clorua.

4.1.12 Natri hydroxit, 50 % (khối lượng), dạng carbonat thấp.

4.2 Chuẩn bị dung dịch thuốc thử và dung dịch chuẩn

4.2.1 Yêu cầu chung

Tất cả các dung dịch được chuẩn bị ở quy mô phù hợp với thực hành phòng thí nghiệm tốt. Các dung dịch có thể được bảo quản trong tủ lạnh hoặc ở nhiệt độ phòng, đựng trong vật chứa trơ, kín khí, trừ khi có quy định khác.

4.2.2 Dung dịch chuẩn gốc myo-inositol, khoảng 2 000 mg/l.

Cân chính xác 0,100 g myo-inositol và chuyển định lượng sang bình định mức 50 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch. Trộn kỹ. Bảo quản trong tủ lạnh, dung dịch này sử dụng được trong 3 tháng.

4.2.3 Dung dịch chuẩn trung gian myo-inositol, khoảng 200 mg/l.

Pha loãng 10,0 ml dung dịch myo-inositol gốc (4.2.2) bằng nước đến 100 ml và trộn kỹ. Loại bỏ dung dịch sau khi sử dụng.

4.2.4 Chuẩn bị các dung dịch chuẩn hiệu chuẩn

4.2.4.1 Dung dịch chuẩn hiệu chuẩn myo-inositol nồng độ cao, khoảng 4 mg/l, 2 mg/l, 1 mg/l và 0,5 mg/l.

Pha loãng các lượng: 2,0 ml, 1 ml và 0,5 ml dung dịch chuẩn trung gian myo-inositol (4.2.3) bằng nước đến 100 ml đựng trong các bình định mức riêng. Pha loãng 0,5 ml dung dịch chuẩn trung gian myo-inositol (4.2.3) bằng nước đến 200 ml. Dung dịch này sử dụng được trong 2 tuần.

4.2.4.2 Dung dịch chuẩn hiệu chuẩn myo-inositol nồng độ thấp, khoảng 0,2 mg/l và 0,05 mg/l.

Pha loãng các lượng: 4 ml và 1 ml dung dịch chuẩn hiệu chuẩn myo-inositol 0,5 mg/l bằng nước đến 10 ml đựng trong các bình định mức riêng. Dung dịch này sử dụng được trong 2 tuần.

4.2.5 Dung dịch axit clohydric, 0,5 %

Cho 1,25 ml axit clohydric đặc vào khoảng 200 ml nước đựng trong bình định mức 250 ml. Thêm nước đến vạch và trộn kỹ. Dung dịch này sử dụng được trong 6 tháng.

4.2.6 Dung dịch natri clorua, 1 mol/l

Hòa tan 5,8 g natri clorua và pha loãng bằng nước đến 100 ml. Dung dịch này sử dụng được trong 1 tháng.

4.2.7 Dung dịch natri hydroxit, 0,12 % hoặc 30 mmol (Bơm 1).

Cân nhanh 4,8 g $\pm$ 0,1 g natri hydroxit 50 % cho vào bình định mức 2 000 ml có chứa khoảng 1 900 ml nước. Điều quan trọng là natri hydroxit không hấp thụ carbon dioxit từ không khí. Xoay bình để trộn kỹ. Thêm nước đến vạch và trộn kỹ lại. Dung dịch này sử dụng được trong 1 tháng.

4.2.8 Dung dịch natri hydroxit, 4,0 % hoặc 1 mmol (Bơm 2).

Cân nhanh $160 \text{ g} \pm 3 \text{ g}$ natri hydroxit 50 % cho vào bình định mức 2 000 ml có chứa khoảng 1 900 ml nước. Điều quan trọng là natri hydroxit không hấp thụ carbon dioxit từ không khí. Xoay bình để trộn kỹ. Thêm nước đến vạch và trộn kỹ lại. Dung dịch này sử dụng được trong 1 tháng.

4.2.9 Axit metaphosphoric, 6 %

Cân 6,0 g axit metaphosphoric cho vào bình định mức 100 ml. Hòa tan và thêm nước đến vạch và trộn kỹ lại. Bảo quản trong tủ lạnh. Dung dịch này sử dụng được trong 1 tuần.

4.2.10 Dung dịch chiết phosphatidylinositol, chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

4.2.10.1 Cloroform:metanol (2:1). Trộn 60 ml cloroform với 30 ml metanol.

4.2.10.2 Hexan:dietyl ete (80:20). Trộn 80 ml hexan với 20 ml dietyl ete.

4.2.10.3 Hexan:dietyl ete (50:50). Trộn 50 ml hexan với 50 ml dietyl ete.

4.2.10.4 Metanol:cloroform:nước (75:15:10). Trộn 75 ml metanol, 15 ml cloroform và 10 ml nước.

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 Cân phân tích, có thể cân được ít nhất 0,000 1 g.

5.2 Máy ly tâm.

5.3 Bình hút ẩm.

5.4 Bộ làm bay hơi nitơ, có nồi cách thủy hoặc dụng cụ tương đương.

5.5 Tủ sấy, có thể duy trì nhiệt độ ở 120 °C.

5.6 Máy đo pH, đo được pH 4 và 7 dung dịch đệm.

5.7 Đĩa xoay, nhiều vị trí có các thanh khuấy.

5.8 Ống hút chân không.

5.9 Máy trộn vortex.

5.10 Hệ thống HPLC, có các bộ phận chống ăn mòn bao gồm bộ lấy mẫu tự động, hai bơm đẳng dòng, van chuyển đổi 6 cổng, detector đo ampe xung có điện cực bằng vàng và ống nối PEEK hoặc

polytetrafluoroetylen (PTFE) đường kính trong 0,18 mm đến 0,25 mm (0,007 in đến 0,01 in). Bộ lấy mẫu tự động có thể bơm được 20 μ l.

5.11 Cột, Dionex CarboPac¹⁾ MA1 (4 mm x 250 mm) P/N, 44066, MA1 (4 mm x 50 mm) P/N 44067 và PA1 (4 mm x 50 mm) P/N 43096 hoặc tương đương.

5.12 Cốc có mỏ, các loại dung tích khác nhau.

5.13 Ống ly tâm, dung tích 50 ml, có nắp phủ polytetrafluoroetylen (PTFE).

5.14 Bộ lọc xyranh, polyamid, cỡ lỗ 0,45 μ m và 0,2 μ m.

5.15 Giấy lọc, Whatman 2V¹⁾ hoặc tương đương.

5.16 Bình nón, dung tích 50 ml hoặc 125 ml hoặc tương đương.

5.17 Bình định mức, các loại dung tích khác nhau.

5.18 Phễu, thích hợp để sử dụng với giấy lọc.

5.19 Pipet định mức, các loại dung tích khác nhau.

5.20 Cột chiết pha rắn (SPE), 1 g silica²⁾.

5.21 Xyranh, dung tích 1 ml dùng một lần và dung tích 25 ml bằng thủy tinh kín khí có kim bằng thép không gỉ 100 mm (4 in).

6 Cách tiến hành

6.1 Myo-inositol tự do

6.1.1 Chuẩn bị mẫu thử

6.1.1.1 Yêu cầu chung

Các mẫu đã chuẩn bị được bảo quản ổn định ở nhiệt độ từ 1 °C đến 8 °C trong các vật chứa kín có thể bền đến 5 ngày. Sau 5 ngày các mẫu phải được chuẩn bị lại. Trộn kỹ các mẫu lỏng để đảm bảo độ

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.

²⁾ J.T.Baker P/N 7086-07 (www.avantormaterials.com) 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 chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.