

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN. 100 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 1/6
--	----------------------------	--

**ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN A ( RETYNOL) TRONG THỰC PHẨM &  
THỨC ĂN CHĂN NUÔI BẰNG SẮC KÝ LỎNG GHÉP ĐẦU DÒ TỬ  
NGOẠI – KHẢ KIẾN (HPLC /UV-Vis hoặc DAD)**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Thị Xuân Mai	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

**THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
<b>1</b>		Thay đổi format SOP	<b>04/01/2018</b>

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN. 100 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 2/6
--	----------------------------	--

## A. GIỚI THIỆU

### I. Phạm vi áp dụng

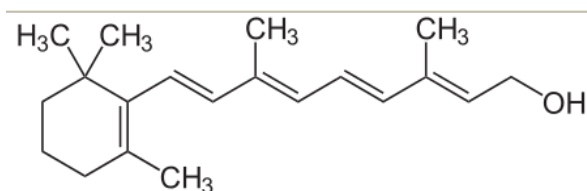
Phương pháp này dùng để xác định Vitamin A trong nền mẫu thực phẩm. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 200 IU/kg hay khoảng 0.06 ppm.

### II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: Ref **AOAC 992.06 & AOAC 2001.13 (HPLC-UV) & TCVN 8972-1:2011**

### III. Nguyên tắc

Công thức cấu tạo



CTPT:  $C_{20}H_{30}O$

$M_w$ : 286.45 g/mol

Mẫu được xà phòng hóa với etanol, acid ascorbic và KOH 50% tại 80°C trong 45 phút. Và được chiết lên pha hexan. Sau đó, cô quay loại bỏ hexan, định mức mẫu trong dung dịch MeOH và tiến hành phân tích trên HPLC-UV.

### IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.
- Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

## B. PHÂN TÍCH

### I. Thiết bị và dụng cụ phân tích

#### 1. Thiết bị và dụng cụ cơ bản

- Cân phân tích, độ chính xác 0.1 mg
- Dụng cụ thủy tinh các loại
- Kim pha chuẩn thể tích 0.5mL, 1mL
- Màng lọc Nilon 13 mm, 0,45  $\mu$ m

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN. 100 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 3/6
--	----------------------------	--

e. Bình định mức: 10mL

g. Pipet bầu: 1mL, 2mL

h. Vial 1.5 mL

## 2. Thiết bị phân tích

- Hệ thống HPLC/PDA của Thermo: gồm pump, đầu dò PDA, autosampler hoặc tương đương.
- Cột sắc ký lỏng pha đảo pha đảo C18 150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm (hoặc tương đương).

## II. Hóa chất, chất chuẩn và dung dịch thử

### 1. Hóa chất

a. Nước cất 2 lần khử ion.

b. MeOH

### 2. Dung dịch pha động:

MeOH: H<sub>2</sub>O =85:15, đánh siêu âm loại bọt khí 5 phút trước khi chạy máy.

### 3. Chất chuẩn

Retynol acetate 1574864 IU/g Hoặc Retynol Palmitate

#### 3.1 Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác khoảng 10mg (a) (HV.023.H) chuẩn Retynol acetate vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng hexan.

$$C_{\text{stock}} (\text{IU/L}) = \frac{a \times C}{V}$$

a: khối lượng chuẩn (mg)

V: thể tích bình định mức (mL)

C: Nồng độ chuẩn tính theo IU/g

### Chú ý về việc kiểm tra nồng độ chuẩn tinh khiết

- **Nếu chuẩn gốc ở dạng Retynol Palmitate:** Cân chính xác khoảng 50mg chuẩn retynol Palmitate vào trong bình định mức 500mL, hòa tan và định mức tới vạch bằng 2-propanol. Rút 10mL dung dịch trên vào bình định mức 100mL, pha loãng và định mức tới vạch bằng 2-propanol ( nồng độ cuối khoảng 10ppm).

Đo độ hấp thu cực đại của dung dịch tại bước sóng 325-328 nm trong cuvet 1cm và sử dụng dung môi 2-propanol làm blank.

Giá trị độ tinh khiết được tính như sau:

$$\text{Percent purity} = (\text{ABS} \times 5 \times 10^6) / (960 \times W)$$

Trong đó: + ABS: Giá trị hấp thu cực đại

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: HD.TN. 100 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 4/6</p>
---	-----------------------------------	--

+ 960: Độ hấp thu của Retynol palmitate tinh khiết (dung dịch 1% trong cuvet 1cm)

+ W: khối lượng chuẩn mg

Nếu cân và pha loãng theo một hệ số khác cũng được nhưng nồng độ cuối đem đo máy cũng khoảng 10ppm

- **Nếu chuẩn gốc ở dạng Retynol Acetate:** thì tiến hành thủy phân về dạng Retynol: Cân chính xác 10mg chuẩn gốc Retynol Acetate vào bình định mức 10mL, hòa tan và định mức tới vạch bằng hexan. Rút 1mL dung dịch chuẩn 1000ppm trên vào ống ly tâm 50mL và tiến hành xà phòng hóa theo mục E.2.

Sau khi cô quay loại bỏ hexan, tiến hành định mức bằng 10mL etanol. Pha loãng 5 lần và đo độ hấp thu trong cuvet thạch anh có chiều dài đường quang 1cm, ở bước sóng cực đại từ 325-326nm.

Nồng độ khối lượng của all-trans-retinol bằng microgam /mL theo công thức:

$$\rho_{all-T} = \frac{A_{all} \times 10^4}{1830} \times P$$

Trong đó:  $A_{all}$ : giá trị độ hấp thu ở bước sóng cực đại từ 325-326nm

1830: Giá trị  $E_{1cm}^{1\%}$  đối với all-trans-retinol đã hòa tan trong etanol. Giá trị này có thể thay đổi đáng kể với dung môi khác

P: là hệ số điều chỉnh về độ tinh khiết được xác định bằng HPLC và được tính bằng công thức

$P = \frac{B}{B_t}$  trong đó B là diện tích hoặc chiều cao peak của all-trans-retynol hoặc 13-cis-retinol thu được đối với dung dịch chuẩn.  $B_t$  là tổng diện tích hoặc chiều cao peak từ all-trans-retinol và 13-cis-retinol thu được với dung dịch chuẩn

3.2 Dung dịch chuẩn trung gian retynol 137331 IU/L ( quy đổi theo hệ số 286.45/328.45 theo chuẩn)

Rút 1.0 mL của dung dịch chuẩn gốc retynol 1373314 IU/L cho vào ống ly tâm 50mL, thực hiện quy trình chiết giống mẫu. Thể tích định mức cuối cùng là 10mL.

Chú ý: Hệ số quy đổi chuẩn Retynol acetate sang Retynol (286.45/328.45) thay đổi nếu chất chuẩn ở dạng Retynol palmitate.

### 3.3 Dung dịch chuẩn làm việc

- Từ dung dịch chuẩn trung gian 137331 IU/L : Rút lần lượt 2.0; 1.0; 0.5; 0.2mL vào bình định mức 10mL và định mức tới vạch bằng MeOH ta được các điểm chuẩn có nồng độ lần lượt là 27446 IU/L, 13733 IU/L, 6867 IU/L, 2747 IU/L

- Rút 2.0 mL, 1mL, 0.4mL từ chuẩn 6867 IU/L vào bình định mức 10mL và định mức đến vạch bằng MeOH được chuẩn có nồng độ, 1373 IU/L, 687 IU/L, 275 IU/L.

## E. PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

### 1. Chuẩn bị mẫu

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN. 100 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/6
--	----------------------------	--

Mẫu được bảo quản nơi thoáng mát. Mẫu phải được xay mịn trước khi tiến hành phân tích.

## 2. Xử lý mẫu

Cân chính xác khoảng 1-3g ( tùy nền mẫu) mẫu vào ống ly tâm 50mL, thêm vào 0.1g acid ascorbic, 15mL etanol 99.5%, 8mL KOH 50%. Vortex và đun ở 70-80°C trong 30phút, thỉnh thoảng lắc. Để nguội, thêm 5mL nước cất và tiến hành chiết với 15mL hexan (x3 lần). Rửa dung dịch hexan với nước cất đến khi dung dịch trung tính. Cô quay loại bỏ hexan và định mức với 2mL MeOH, vortex, lọc qua màng lọc 0.45 µm vào vial và tiến hành phân tích trên HPLC-UV. Hoặc có thể định mức với thể tích khác tùy vào hàm lượng vitamine trong mẫu sao cho khi phân tích nằm trong dãy chuẩn.

## 3. Phân tích trên HPLC-UV

- Cột sắc ký: cột  $C_{18}$  150mm x 4.6mm, kích thước hạt 5µm. (hoặc tương đương)
- Thể tích tiêm: 20 µl
- Pha động: MeOH:  $H_2O$  =85:15
- Tốc độ : 1.2 mL/phút
- Bước sóng: 328nm

Lưu ý: Với các cột sắc ký lỏng  $C_{18}$  phân cực khác nhau (chiều dài, đường kính cột, kích cỡ hạt...), tỉ lệ thành phần pha động hay tốc độ dòng có thể thay đổi.

## 4. Trình tự tiêm mẫu

Sau khi hệ thống cân bằng (khoảng 30 phút), các mẫu sẽ được phân tích theo trình tự sau:

- a. Các dung dịch chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao;
- b. Mẫu cần kiểm nghiệm.
- c. Mẫu spike
- d. Chuẩn check

Chú ý: Khi phân tích mẫu hàng loạt, tiêm xen kẽ một điểm chuẩn sau khi phân tích chuỗi 5 mẫu và kết thúc là một điểm chuẩn.

## F. YÊU CẦU VỀ ĐỘ TIN CẬY CỦA PHÉP PHÂN TÍCH

1. Đường chuẩn phải có độ tuyến tính tốt (ít nhất là 05 điểm chuẩn), hệ số tương quan hồi qui tuyến tính ( $R^2$ ) phải lớn hơn hoặc bằng 0.995.
2. Mỗi lô mẫu đều phải làm mẫu spike để kiểm soát toàn bộ quá trình.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.TN. 100 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 6/6
--	----------------------------	--

3. Độ lệch của các dung dịch chuẩn tiêm xen kẽ giữa các mẫu phân tích không vượt quá  $\pm 10$  % giá trị thật.
4. Mẫu lặp lại được thực hiện cho một lô mẫu  $\geq 5$  mẫu. Độ lệch tương đối giữa hai mẫu lặp lại không quá  $\pm 10$  %.

## G. TÍNH KẾT QUẢ

Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích thu được với nồng độ tương ứng. Kết quả chất cần phân tích trong mẫu được tính toán thông qua diện tích tương ứng so với đường chuẩn, theo công thức sau:

$$C = (C_0 \cdot V \cdot f) / m \cdot 0.3/1000$$

- C: nồng độ Vitamin A trong mẫu, mg/Kg
- $C_0$ : nồng độ Vitamin A trong dịch chiết tính theo đường chuẩn, IU/L
- V: Thể tích chiết, mL
- f: hệ số pha loãng
- m: khối lượng cân, g
- 0.3/1000 là hệ số quy đổi IU sang mg.

## H. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích BM 15.04a và BM 15.06