

TCVN 11940:2017

**THỰC PHẨM BỔ SUNG VÀ NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT -
XÁC ĐỊNH AXIT ARISTOLOCHIC-1 - PHƯƠNG PHÁP SẮC
KÝ LỎNG VỚI DETECTOR UV (LC-UV) VÀ KHẲNG ĐỊNH
BẰNG SẮC KÝ LỎNG PHỔ KHỐI LƯỢNG**

*Foodstuffs dietary supplements and raw botanical materials - Determination of aristolochic acid
I-Liquid chromatographic method with UV detection (LC-UV) and confirmation by LC/MS*

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 11940:2017 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2007.05

Aristolochic acid I in botanicals and dietary supplements potentially contaminated with aristolochic acid I – LC-UV with confirmation by LC/MS;

TCVN 11940:2017 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F6

Dinh dưỡng và thức ăn kiêng biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường

Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm bổ sung và nguyên liệu thực vật – Xác định axit aristolochic-1 – Phương pháp sắc ký lỏng với detector UV (LC-UV) và khẳng định bằng sắc ký lỏng phổ khối lượng

Foodstuffs dietary supplements and raw botanical materials – Determination of aristolochic acid I – Liquid chromatographic method with UV detection (LC-UV) and confirmation by LC/MS

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định axit aristolochic-1 trong thực phẩm bổ sung và nguyên liệu thực vật bằng sắc ký lỏng với detector UV (LC-UV) và khẳng định bằng sắc ký lỏng-phổ khối lượng.

2 Nguyên tắc

Axit aristolochic-1 được chiết bằng axetonitril ra khỏi các nền mẫu khác nhau. Lượng axit aristolochic-1 được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng (LC) sử dụng detector độ hấp thụ UV và khẳng định bằng sắc ký lỏng-phổ khối lượng (LC/MS).

3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước đã khử ion hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Axetonitril, loại dùng cho HPLC.

CẢNH BÁO: Axetonitril là dung môi dễ cháy; cần tránh xa nguồn nhiệt hoặc ngọn lửa và có thông gió phù hợp.

3.2 Axit trifluoroacetic, có độ tinh khiết 99,8 %.

CẢNH BÁO: Axit trifluoroacetic là chất ăn mòn, chất kích thích dạng lỏng, có thể gây bỏng nặng.

3.3 Etanol, 100 % (thể tích), loại dùng cho đo phổ/HPLC.

3.4 Metanol, loại dùng cho HPLC.

3.5 Axit formic, 88 %.

3.6 Amoni axetat, loại dùng cho HPLC.

CHÚ THÍCH Các thuốc thử chất lượng tương đương có thể được sử dụng.

3.7 Chất chuẩn axit aristolochic-1, cũng được gọi là **axit aristolochic A**, có độ tinh khiết $\geq 94\%$.

CẢNH BÁO: Axit aristolochic-1 là chất độc, chất kích thích dạng rắn.

3.8 Thuốc thử dùng cho sắc ký

3.8.1 Pha động A đối với HPLC-UV, 0,1 % dung dịch axit trifluoroaxetic (thể tích) trong nước.

3.8.2 Pha động B đối với HPLC-UV, 0,1 % dung dịch axit trifluoroaxetic (thể tích) trong axetonitril.

3.8.3 Dung môi chiết, hỗn hợp của axetonitril – nước (thể tích 50 + 50).

3.8.4 Pha động A cho sắc ký lỏng khối phổ đầu dò 3 tứ cực, hỗn hợp của metanol 5 %, axit formic 0,1 % và amoni axetat 10 mM trong nước.

3.8.5 Pha động B cho sắc ký lỏng khối phổ đầu dò 3 tứ cực, hỗn hợp của axetonitril-metanol (1 + 1) chứa axit formic 0,1 % (thể tích) và amoni axetat 10 mM trong nước.

3.8.6 Pha động A cho sắc ký lỏng khối phổ bẫy ion, hỗn hợp của axit formic 0,1 % (thể tích) và amoni axetat 0,1 % (khối lượng/thể tích) trong nước đã khử ion.

3.8.7 Pha động B cho sắc ký lỏng khối phổ bẫy ion, hỗn hợp của axit formic 0,1 % (thể tích) và amoni axetat 0,1 % (khối lượng/thể tích) trong metanol.

3.9 Chuẩn bị dung dịch chuẩn

3.9.1 Dung dịch chuẩn gốc, khoảng 200 µg/ml

Dùng cân (4.1) cân khoảng 0,002 g axit aristolochic-1 (3.7), chính xác đến 0,00001 g và chuyển vào bình định mức dung tích 10 ml (4.12). Hòa tan axit aristolochic-1 (3.7) và pha loãng bằng axetonitril (3.1) đến vạch. Nồng độ dung dịch chuẩn gốc, C_0 , biểu thị bằng microgam trên mililit (µg/ml), tính bằng Công thức (1):

$$C_0 = \frac{m}{V_0} \times 10^6 \times P \quad (1)$$

Trong đó:

m là khối lượng của axit aristolochic-1, tính bằng gam (g);

V_0 là dung tích bình định mức, tính bằng mililit (ở đây $V_0 = 10$ ml);

P là độ tinh khiết của axit aristolochic-1;

10^6 là hệ số chuyển đổi từ gam sang microgam.

Để khẳng định lại nồng độ chuẩn, tiêm dung dịch chuẩn gốc đã chuẩn bị vào hệ thống HPLC (4.8) để thu được phần tinh khiết, sau đó lấy 1 ml pha loãng bằng etanol (3.3) đến 5 ml và đọc độ hấp thụ trên máy quang phổ (4.7) ở bước sóng 390 nm. Nồng độ đúng của chất chuẩn, biểu thị bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$), được tính bằng Công thức (2):

$$X_2 = \frac{A_1}{6500} \times \frac{341,29}{1000} \times 5 \times 10^6 \times f \quad (2)$$

Trong đó:

A_1 là độ hấp thụ đo được ở bước sóng 390 nm;

6500 là hệ số tắt phân tử (ϵ) đối với axit aristolochic-1 (nồng độ tính theo g.mol/l);

341,29 là khối lượng mol của axit aristolochic-1, tính bằng gam trên mol (g/mol);

f là độ tinh khiết của dung dịch chuẩn gốc sau khi qua hệ thống HPLC;

5 là độ pha loãng (từ 1 ml thành 5 ml).

Dung dịch ổn định trong vòng 30 ngày khi được bảo quản tránh ánh sáng và trong tủ lạnh ở nhiệt độ $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

LƯU Ý: Nồng độ được khẳng định lại trước khi pha các chuẩn làm việc.

3.9.2 Dung dịch chuẩn làm việc

Pha loãng các dung dịch chuẩn ở 6 mức nồng độ từ khoảng 0,040 $\mu\text{g/ml}$ đến 0,64 $\mu\text{g/ml}$ trong hỗn hợp axetonitril – nước (50 + 50) theo Bảng 1. Các dung dịch này bền trong 14 ngày khi bảo quản tránh ánh sáng và trong tủ lạnh duy trì ở nhiệt độ $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

Bảng 1 – Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc

Chuẩn	Nồng độ gốc µg/ml	Thể tích dung dịch gốc sử dụng ml	Thể tích cuối cùng ml	Nồng độ µg/ml
Dung dịch chuẩn gốc làm việc	200	0,800	10	16,0
1	16,0	0,0625	25	0,0400
2	16,0	0,190	25	0,122
3	16,0	0,250	25	0,160
4	16,0	0,500	25	0,320
5	16,0	0,750	25	0,480
6	16,0	1,00	25	0,640

3.9.3 Đánh giá sự phù hợp của hệ thống

Sau khi chuẩn bị các dung dịch chuẩn gốc và dung dịch chuẩn làm việc, hiệu năng của hệ thống HPLC (4.8) được xác định như sau: Tiêm dung dịch chuẩn làm việc khoảng 0,320 µg/ml ít nhất 5 lần liên tục. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của đáp ứng ở ít nhất 5 lần tiêm không quá 2 %. Ngoài ra, tiêm dung dịch chuẩn làm việc khoảng 0,0400 µg/ml ít nhất 3 lần và tính tỷ số tín hiệu trên nhiễu (S/N). Tỷ số tín hiệu trên nhiễu phải > 10. Thời gian lưu của axit aristolochic-1 trong khoảng 21 min ± 3 min. Tốc độ dòng chảy có thể được điều chỉnh để đạt được thời gian lưu mong muốn.

Các điều kiện HPLC có thể cần được thay đổi để có được hệ thống phù hợp mong muốn.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,00001 g.

4.2 Máy nghiền loại nhỏ, loại dùng để nghiền cafe hoặc gia vị.

4.3 Máy lắc.

4.4 Cột sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC).

4.4.1 Với đầu dò UV, ví dụ Zorbax SB-C18, 5 µm, kích thước 25 cm × đường kính trong 3,0 mm.

4.4.2 Với đầu dò sắc kí lỏng khối phổ bẫy ion, ví dụ Zorbax SB-C18, 5 μm , kích thước 15 cm $\times$ đường kính trong 3,0 mm.

4.4.3 Với sắc kí lỏng khối phổ đầu dò 3 tứ cực, ví dụ Zorbax SB-C18, 5 μm , kích thước 5 cm $\times$ đường kính trong 2,1 mm.

4.5 Sàng, cỡ lỗ 400 μm .

4.6 Hệ thống sắc kí lỏng khối phổ, bẫy ion hoặc ba tứ cực

4.7 Máy quang phổ tử ngoại-khả kiến (UV-VIS), đo độ hấp thụ ở bước sóng 390 nm.

4.8 Hệ thống HPLC, có trang bị detector tử ngoại khả kiến (UV-VIS).

4.9 Bộ lọc xyranh, 13 mm với màng lọc PTFE cỡ lỗ 0,45 μm .

4.10 Hệ thống dữ liệu cho HPLC.

4.11 Hệ thống dữ liệu cho sắc ký lỏng khối phổ khối lượng.

4.12 Bình định mức, dung tích 10 ml.

CHÚ THÍCH Các thiết bị tương đương có thể được sử dụng. Tất cả các dụng cụ thủy tinh phải phù hợp loại A⁽¹⁾.

5 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình bảo quản và vận chuyển.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể nào liên quan đến sản phẩm cần phân tích thì các bên tự thảo luận về vấn đề này.

6. Cách tiến hành

Cho vật liệu nghiền qua sàng cỡ lỗ 400 μm (4.5), nếu cần và trộn kỹ. Cân khoảng 2 g mẫu thử cho vào bình có nắp đậy. Thêm 100 ml dung môi chiết (3.1). Lắc tối thiểu 30 min trên máy lắc (4.3) đặt ở chế độ lắc cố định. Pha loãng dung dịch thử với dung môi chiết cho thích hợp với đường chuẩn, nếu cần. Dung dịch thử có thể được bảo quản lạnh không quá 2 ngày. Lọc dung dịch thử bằng bộ lọc xyranh có màng lọc cỡ lỗ 0,45 μm (4.9) rồi tiến hành phân tích HPLC và định lượng. Sử dụng các thông số nêu trong Bảng 2. Tiêm từng dung dịch chuẩn làm việc (3.9.2), một bộ ở thời điểm bắt đầu và một bộ ở thời điểm kết thúc chạy. Tiêm dung dịch chuẩn sau mỗi 4 dung dịch thử, bắt đầu ở mức thấp nhất, tiếp đến 4 dung dịch thử tiếp theo, sau đó là dung dịch chuẩn cao nhất v.v... Sử dụng tất cả các giá trị đo được của dung dịch chuẩn để dựng đường chuẩn.

Bảng 2 – Thông số HPLC-UV

Cột HPLC	Zorbax SB-C18, 5 μ m, đường kính 3,0 mm $\times$ 25 cm, Agilent		
Pha động A	0,1% (thể tích) axit trifluoroacetic – nước		
Pha động B	0,1% (thể tích) axit trifluoroacetic - axetonitril		
Chương trình tiêm			
Thời gian, min	% A	% B	Đường gradient
0	80	20	Không áp dụng
25	30	70	1 ^b
30	0	100	1
31	80	20	1
40	80	20	Không áp dụng
Detector	detector hấp thụ UV (bước sóng 390 nm)		
Nhiệt độ cột, °C	40		
Tốc độ dòng	Khoảng 0.5 ml/min; tốc độ dòng phải điều chỉnh được sao cho có thể thu được thời gian lưu mong muốn		
Thể tích tiêm, μ l	25		
Thời gian tiêm, min	40		
^b đường gradient cho thấy sự chuyển đổi tuyến tính.			

7 Khẳng định bằng sắc kí lỏng khối phổ

Khi xác định bằng LC-UV, axit aristolochic-1 xác định được ở nồng độ $> 2 \mu\text{g/g}$, được khẳng định bằng LC/MS/MS. Phổ của chất chuẩn được sử dụng để khẳng định sự có mặt của axit aristolochic-1 so với phổ của mẫu ở thời gian lưu tương tự. Mỗi diện tích pic được phát hiện của chuẩn hoặc mẫu với các ion con được chia bằng diện tích pic của một ion con với diện tích pic lớn nhất. Nếu nhiều mẫu và chuẩn được tiêm vào thì tính trung bình tất cả các tỷ lệ tương ứng. Để khẳng định, tỷ lệ mẫu nên bằng $\pm 10 \%$ tỷ lệ chuẩn trung bình (chênh lệch số học). Ví dụ, tỷ lệ trung bình của chuẩn là 50 %, thì tỷ lệ mẫu là từ 40 % đến 60 %.

Các điều kiện sắc kí và ion hóa được kiểm soát đối với ba từ cực nêu trong Bảng 3 và đối với bảy ion nêu trong Bảng 4.

Bảng 3 – Các điều kiện sắc ký đối với sắc ký lỏng khối phổ ba tứ cực

Cột HPLC	Zorbax SB-C18, 5 μ m, đường kính 2,1 mm $\times$ 50 mm, Agilent			
Pha động A	Metanol 5,0 %, axit formic 0,1 %, và amoni axetat 10 mM trong nước đã khử ion			
Pha động B	Axetonitril-metanol (1 + 1) chứa axit formic 0,1 % (thể tích) và amoni axetat 10 mM trong nước đã khử ion			
Chương trình tiêm				
Thời gian, min	A %	B %	Gradient	
0	70	30	Không áp dụng	
13	30	70	1 ^a	
15	0	100	1	
16	70	30	1	
20	70	30	Không áp dụng	
Nhiệt độ cột, °C	40			
Tốc độ dòng, ml/min	0.2			
Thể tích tiêm, μ l	25			
Đưa mẫu	Phun điện tử dương (ES+)			
Chế độ				
Dải khối lượng	Quét các ion con đặc trưng, dwell = 0,25 s			
Nhiệt độ nguồn, °C	150			
Nhiệt độ hóa hơi, °C	350			
Tốc độ khí hóa hơi, l/h	600			
Lưu lượng khí cone, l/h	60			
Các ion được kiểm soát trong phép khẳng định khối phổ LC/MS				
Hợp chất	Ion mẹ (m/z)	Ion con (m/z)	Cone, V	Năng lượng bắn phá, eV
[axit aristolochic-1 + NH_4] ⁺	359,1	265, 281, 296	18	40, 40, 30

Bảng 4 – Các điều kiện sắc ký đối với sắc ký lỏng khối phổ bẫy ion

Cột HPLC	Zorbax SB-C18, đường kính 3 mm × 150 mm, Agilent			
Pha động A	axit formic 0,1 % (thể tích) và amoni axetat 0,1 % (khối lượng/thể tích) trong nước đã khử ion			
Pha động B	axit formic 0,1 % (thể tích) và amoni axetat 0,1 % (khối lượng/thể tích) trong metanol			
Chương trình tiêm				
Thời gian, min	% A	% B	gradient	
0	80	20	Không áp dụng	
20	0	100	1 ^a	
21	80	20	1	
25	80	20	Không áp dụng	
Nhiệt độ cột, °C	40			
Tốc độ dòng, mL/min	0.5			
Thể tích tiêm, µL	30			
Dựa mẫu	Bẫy ion			
Chế độ				
Scan dải nồng độ	m/z 80 to 370			
Dòng phóng điện, µA	5			
Nhiệt độ mao quản đã gia nhiệt, °C	150			
Nhiệt độ hóa hơi, °C	450			
Cài đặt khí bay hơi	70			
Cài đặt khí hỗ trợ	20			
Các ion được kiểm soát trong phép khẳng định khối phổ bẫy ion				
Hợp chất	Ion mẹ (m/z)	Ion	Độ rộng phân tách (m/z)	Năng lượng va chạm tương đối, %
Axit aristolochic-1	359	298	2	30
Axit aristolochic-1	298,0 (từ ion con ở trên)	251, 252, 268	2	35

8 Tính kết quả

Đường chuẩn thu được từ hồi quy tuyến tính của tất cả diện tích pic và nồng độ của chuẩn làm việc. Hệ số tương đối (r) phải $\geq 0,99500$. Xác định nồng độ axit aristolochic-1 của mẫu đã tiêm từ phân tích hồi quy.

Hàm lượng chất phân tích trong mẫu thử, X , được tính bằng microgam trên gam ($\mu\text{g/g}$), theo Công thức (3):

$$X = \frac{C \times V \times D}{W} \quad (3)$$

Trong đó:

C là nồng độ chất phân tích từ đường hồi quy, tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$);

V là thể tích dung môi chiết, tính bằng mililit (ml);

D là hệ số pha loãng, nếu có;

W là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g).

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ít nhất bao gồm các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết cho việc nhận biết đầy đủ về mẫu;
- phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi điều kiện 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;
- kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(tham khảo)

Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm đối với axit aristolochic-1

Bảng A.1 – Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm đối với axit aristolochic-1

Tên mẫu	Trung bình, µg/g	S _r ^a	RSD _r ^b , %	S _R ^c	RSD _R ^d , %	Số PTN ngoại lệ	Chỉ số HorRat	Số PTI sử dụng
<i>Aristolochia manshuriensis</i> , thân	2610	44,9	1,72	222	8,51	2	1,7	8
<i>Clematis armandii</i> , thân	6,94	0,654	9,42	0,850	12,3	1	1,0	9
Viên nén bổ sung liều cao, rễ <i>Aristolochia</i> spp. 20 µg/g	12,8	2,08	16,3	2,53	19,8	0	1,8	10
<i>Aristolochia</i> spp., rễ	1290	23,8	1,85	69,7	5,42	0	1,0	10
<i>Clematis armandii</i> , thân, bổ sung liều thấp <i>Aristolochia</i> spp. 10 µg/g, rễ	206	0,754	7,31	0,875	8,48	0	0,8	10
<i>Stephania tetrandra</i> , rễ, bổ sung liều thấp <i>Aristolochia</i> spp. 10 µg/g, rễ	10,0	1,18	11,8	1,82	18,2	0	1,6	10
<i>Akebia trifoliata</i> , thân, bổ sung ít <i>Aristolochia</i> spp. 10 µg/g, rễ	7,83	0,518	6,61	0,807	10,3	0	0,9	10
Viên nén bổ sung liều thấp <i>Aristolochia</i> spp. 10 µg/g, rễ	6,58	0,875	13,3	0,875	13,3	2	1,1	8
<i>Stephania tetrandra</i> , rễ, bổ sung liều cao <i>Aristolochia</i> spp. 20 µg/g, rễ	16,7	0,844	5,04	1,16	6,92	3	0,7	7
<i>Akebia trifoliata</i> , thân, bổ sung liều cao <i>Aristolochia</i> spp. 20 µg/g, rễ	15,0	0,790	5,25	2,05	13,7	0	1,3	10
<i>Clematis armandii</i> , thân, bổ sung liều cao <i>Aristolochia</i> spp. 20 µg/g, rễ	20,5	0,849	4,14	1,68	8,18	0	0,8	10
<i>Akebia trifoliata</i> , thân	< 2,00	NA ^e	NA	NA	NA	1	NA	9
<i>Stephania tetrandra</i> , rễ	< 2,00	NA	NA	NA	NA	0	NA	10

^a S_r là độ lệch chuẩn lặp lại.

^b RSD_r là độ lệch chuẩn tương đối lặp lại.

^c S_R là độ lệch chuẩn tái lập.

^d RSD_R độ lệch chuẩn tương đối tái lập.

^e NA là không áp dụng.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức.*
-