

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13284:2021

Xuất bản lần 1

**NGUYÊN LIỆU VÀ THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE
CHỨA LÔ HỘI (ALOE VERA) – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
ALOIN VÀ ALOE-EMODIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÝ LÒNG HIỆU NĂNG CAO**

*Raw materials and health supplements containing Aloe vera –
Determination of aloins and aloin-emodin contents
by high-performance liquid chromatographic method*

HÀ NỘI – 2021

Lời nói đầu

TCVN 13284:2021 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2016.09
*Quantitative analysis of aloins and aloin-emodin in aloe vera raw
material and finished product. High-performance liquid chromatography;*

TCVN 13284:2021 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm
quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng hàm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Nguyên liệu và thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa lô hội (*Aloe vera*) – Xác định hàm lượng aloin và aloe-emodin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

*Raw materials and health supplements containing Aloe vera –
Determination of aloins and aloin-emodin contents by high-performance
liquid chromatographic method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng aloin A, B và aloe-emodin trong nguyên liệu và thực phẩm bảo vệ sức khỏe chứa lô hội (*Aloe vera*) bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng detector UV hai bước sóng hoặc detector mảng diot (PDA).

2 Nguyên tắc

Các chất cần phân tích (aloin A, B và aloe-emodin) được chiết ra khỏi mẫu thử bằng hỗn hợp etyl axetat:metanol. Phần dịch chiết được tinh sạch bằng chiết phân đoạn lỏng-lỏng và cho bay hơi. Phần cặn được hòa tan trong dung dịch metanol:nước, sau đó được tách bằng HPLC. Hàm lượng các chất cần phân tích được xác định bằng detector UV hoặc detector mảng diot (PDA) ở bước sóng 380 nm đối với aloin A và B, bước sóng 430 nm đối với aloe-emodin.

3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, sử dụng nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Alcol, ví dụ: Spectrum (Cat. No. A1040) ¹⁾.

3.2 Axetonitril (CH_3CN), loại dùng cho HPLC.

3.3 Metanol (CH_3OH), loại dùng cho HPLC.

¹⁾ Đây là các ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này nhằm tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 13284:2021

3.4 Axit axetic băng (CH_3COOH).

3.5 Natri clorua (NaCl), dạng tinh thể, ví dụ: Spectrum (Cat. No. S1240) ²⁾.

3.6 Etyl axetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), loại dùng cho HPLC, ví dụ: Spectrum (Cat. No. HP602) ²⁾.

3.7 Dung dịch natri clorua bão hòa

Hòa tan 50 g natri clorua (3.5) trong 100 mL nước.

3.8 Dung dịch etyl axetat-metanol với tỷ lệ 90 + 10 (phần thể tích)

Cho 900 mL etyl axetat (3.6) vào 100 mL metanol (3.3) và trộn đều.

3.9 Dung dịch metanol-nước với tỷ lệ 60 + 40 (phần thể tích)

Cho 600 mL metanol (3.3) vào 400 mL nước và trộn đều.

3.10 Pha động

3.10.1 Pha động A: axit axetic 0,1 % trong nước

Cho 1 mL axit axetic (3.4) vào bình định mức 1 L có chứa khoảng 900 mL nước và lắc đều, thêm nước đến vạch. Rung trong bể siêu âm (4.5) để loại khí.

3.10.2 Pha động B: axit axetic 0,1 % trong axetonitril

Cho 1 mL axit axetic (3.4) vào bình định mức 1 L có chứa khoảng 900 mL axetonitril (3.2) và lắc đều, thêm axetonitril đến vạch. Rung trong bể siêu âm (4.5) để loại khí.

3.11 Chất chuẩn

3.11.1 Chất chuẩn aloin A, ví dụ: Chromadex (Cat. No. 00001625) ²⁾, được bảo quản trong tủ lạnh.

3.11.2 Chất chuẩn aloin B, ví dụ: Chromadex (Cat. No. 00001626) ²⁾, được bảo quản trong tủ đông.

3.11.3 Chất chuẩn đối chứng aloe-emodin, ví dụ: Sigma (Cat. No. A7687) ²⁾, được bảo quản trong tủ lạnh.

3.12 Dung dịch chuẩn

3.12.1 Dung dịch chuẩn gốc

3.12.1.1 Dung dịch chuẩn gốc aloin A và B, xấp xỉ 100 mg/L

Dùng cân (4.1) cân khoảng 5 mg từng chất chuẩn aloin A (3.11.1) và B (3.11.1) cho vào cùng một bình định mức 50 mL (4.8). Hòa tan và pha loãng bằng metanol (3.2) đến vạch. Bảo quản dung dịch trong tủ lạnh ở 2 °C đến 8 °C. Nồng độ thực tế được tính lại theo độ tinh khiết và lượng cân chuẩn.

²⁾ Đây là các ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này nhằm tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

3.12.1.2 Dung dịch chuẩn gốc aloe-emodin, xấp xỉ 100 mg/L

Dùng cân (4.1) cân khoảng 5 mg chất chuẩn đối chứng aloe-emodin (3.11.3) cho vào bình định mức 50 mL (4.8). Hòa tan và pha loãng bằng metanol đến vạch. Bảo quản dung dịch trong tủ lạnh ở 2 °C đến 8 °C. Nồng độ thực tế được tính lại theo độ tinh khiết và lượng cân chuẩn.

3.12.2 Dung dịch chuẩn trung gian**3.12.2.1 Dung dịch chuẩn trung gian aloin A và B, xấp xỉ 1 mg/L**

Dùng pipet (4.7) lấy 100 µL dung dịch chuẩn gốc aloin A và B (3.12.1.1) cho vào bình định mức 10 mL (4.8). Pha loãng đến vạch bằng dung dịch metanol-nước (3.9) và trộn đều.

3.12.2.2 Dung dịch chuẩn trung gian aloe-emodin, xấp xỉ 1 mg/L

Dùng pipet (4.7) lấy 100 µL dung dịch chuẩn gốc aloe-emodin (3.12.1.2) cho vào bình định mức 10 mL (4.8). Pha loãng bằng dung dịch metanol-nước (3.9) đến vạch và trộn đều.

3.12.3 Dung dịch chuẩn làm việc**3.12.3.1 Dung dịch chuẩn làm việc 300 µg/L**

Dùng pipet (4.7) lấy 3 mL dung dịch chuẩn trung gian (3.12.2) cho vào bình định mức 10 mL (4.8). Pha loãng bằng dung dịch metanol-nước (3.9) đến vạch và trộn đều.

3.12.3.2 Dung dịch chuẩn làm việc 80 µg/L

Dùng pipet (4.7) lấy 2 mL dung dịch chuẩn trung gian (3.12.2) cho vào bình định mức 25 mL (4.8). Pha loãng bằng dung dịch metanol-nước (3.9) đến vạch và trộn đều.

3.12.3.3 Dung dịch chuẩn làm việc 20 µg/L

Dùng pipet (4.7) lấy 0,2 mL dung dịch chuẩn trung gian cho vào bình định mức 10 mL (4.8). Pha loãng bằng dung dịch metanol-nước (3.9) đến vạch và trộn đều.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến $\pm 0,01$ mg.**4.2 Bộ lọc xyranh dùng một lần, bằng polyvinylidene (PVDF), cỡ lỗ 0,2 µm và đường kính 17 mm, ví dụ: Thermo Scientific (Cat. No. 42213-PV) ³⁾.**

³⁾ Đây là các ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này nhằm tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không bắt buộc phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

TCVN 13284:2021

4.3 Máy trộn Vortex, ví dụ: Fisher Scientific (Part No. 1978331) ⁴⁾.

4.4 Máy ly tâm, ví dụ: Thermo Scientific Sorvall ST 16R ⁴⁾.

4.5 Bể rung siêu âm, ví dụ: Model FS60H (Fisher Scientific) ⁴⁾.

4.6 Bộ bay hơi bằng nitơ, có nổi cách thủy duy trì được nhiệt độ ở $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, ví dụ: Organomation Associates, Inc. ⁴⁾.

4.7 Pipet tự động, dung tích từ 100 μL đến 1000 μL và từ 0,5 mL đến 5 mL, ví dụ: Eppendorf Research plus ⁴⁾.

4.8 Bình định mức, dung tích 10 mL, 25 mL, 50 mL.

4.9 Hệ thống HPLC gồm có:

4.9.1 Máy sắc ký lỏng, có bơm và bộ lấy mẫu tự động, ví dụ: Waters 2695 Alliance Separations Module (Milford, MA, USA) ⁴⁾

4.9.2 Cột HPLC, ví dụ: cột Phenomenex Synergi Hydro-RP, kích thước 250 mm $\times$ 4,6 mm (Part No. 00G-4375-E0) ⁴⁾.

4.9.3 Cột bảo vệ: Cột C₁₈, kích thước 4 mm $\times$ 3,0 mm, ví dụ: Phenomenex (Cat.No.AJO-4287) ⁴⁾.

CHÚ THÍCH: Chiều dài và đường kính của cột có thể được thay đổi theo kỹ thuật sử dụng.

4.9.4 Detector PDA hoặc detector UV có bước sóng biến thiên, ví dụ: Waters Corp ⁴⁾.

4.10 Ống nghiệm thủy tinh, dung tích 15 mL, có nắp vặn.

5 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Tham khảo các tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm. Trong trường hợp chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm, việc lấy mẫu theo thỏa thuận giữa các bên liên quan.

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

⁴⁾ Đây là các ví dụ về sản phẩm thương mại sẵn có và thích hợp. Thông tin này nhằm tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Đối với mẫu dạng bột: cân khoảng 0,1 g mẫu nguyên liệu hoặc 0,5 g mẫu sản phẩm cho vào ống nghiệm (4.10), thêm 1 mL nước và trộn đều trên máy trộn Vortex (4.3) để hòa tan.

Đối với mẫu dạng lỏng: cân khoảng 1 g mẫu cho vào ống nghiệm (4.10).

6.2 Chiết

Thêm 1 mL alcol (3.1 và 2 mL dung dịch natri clorua (3.7). Trộn đều trên máy trộn Vortex (4.3).

Thêm 4 mL dung dịch etyl axetat-metanol (3.8) sau đó đậy nắp ống và trộn trên máy trộn Vortex ở tốc độ cao nhất trong khoảng 60 s. Nếu cần, ly tâm mẫu trong máy ly tâm (4.4) ở tốc độ 2 000 r/min trong 5 min để tách lớp. Chuyển lớp dung môi phía trên sang ống nghiệm thứ hai.

Chiết lặp lại mẫu thử bằng 4 mL dung dịch etyl axetat-metanol với thời gian trộn trong khoảng 30 s và gộp dịch chiết vào ống nghiệm thứ hai.

Cho bay hơi dịch chiết đã gộp bằng khí nitơ ở nhiệt độ 50 °C trên nồi cách thủy của bộ bay hơi (4.6).

Phản còn lại được hòa tan lại bằng 0,5 mL dung dịch metanol-nước (3.9.3) và trộn đều trong 15 s.

Lọc dung dịch qua bộ lọc (4.2) và thu lấy dịch lọc vào lọ đựng mẫu dùng cho HPLC (4.9.1).

6.3 Phân tích HPLC

6.3.1 Các điều kiện vận hành HPLC

Các điều kiện vận hành sau đây được cho là thích hợp:

- Tốc độ dòng: 1 mL/min;
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ môi trường từ 20 °C đến 25 °C;
- Thể tích bơm mẫu: 100 µL;
- Bước sóng phát hiện: 380 nm đối với aloin A và B; 430 nm đối với aloe-emodin;
- Thời gian phân tích: 40 min.
- Chương trình gradient:

Thời gian (min)	Tốc độ dòng (ml/min)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
0	1	80	20
13	1	65	35
30	1	0	100
31	1	80	20
40	1	80	20

6.3.2 Sự phù hợp của hệ thống

- a) Trong sắc ký đồ, hệ số tương quan (*R*) của đường chuẩn aloin A và B (và aloe-emodin, nếu cần) không được nhỏ hơn 0,998.
- b) Phân tích lặp lại dung dịch chuẩn kiểm tra [dung dịch 80 ppb (3.12.3.2)] sau mỗi 6 lần bơm và kết thúc lượt phân tích. Diện tích pic của dung dịch chuẩn kiểm tra phải đạt trong khoảng từ 90 % đến 110 % diện tích pic của dung dịch chuẩn làm việc, tính từ đường chuẩn.
- c) Số đĩa lý thuyết không nhỏ hơn 10 000 đối với aloin A và B, aloe-emodin (nếu cần).
- d) Hệ số kéo đuôi nhỏ hơn 2,0 đối với aloin A và B, aloe-emodin (nếu cần).

6.4 Xác định các chất phân tích trên sắc ký đồ

Trên sắc ký đồ, thời gian lưu đối với aloin khoảng 11,3 min, đối với aloin B khoảng 10,4 min và đối với aloe-emodin khoảng 23,2 min;

6.5 Dựng đường chuẩn

Dựng đường chuẩn các nồng độ của aloin A và B (và aloe-emodin, nếu cần) so với diện tích pic của aloin A và B (và aloe-emodin, nếu cần).

7 Tính kết quả

Hàm lượng của aloin/aloe-emodin trong mẫu thử, *X*, biểu thị bằng microgam trên gam (µg/g), được tính theo Công thức (1):

$$X = \frac{C \times D}{W}$$

(1)

Trong đó:

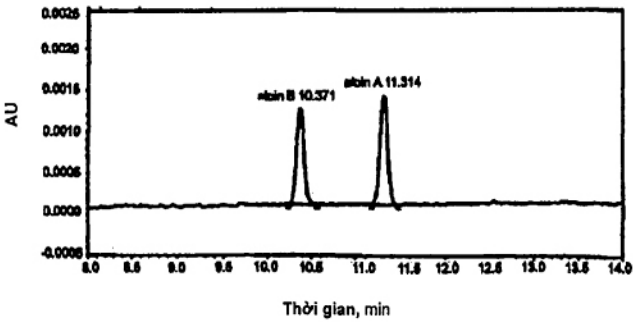
- C là nồng độ của aloin A/ aloin B/ aloë-emodin trong dung dịch mẫu thử, xác định được từ đường chuẩn, tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/mL}$);
- D là hệ số pha loãng đối với mẫu thử, tính bằng mililit (mL);
- W là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g).

8 Báo cáo thử nghiệm

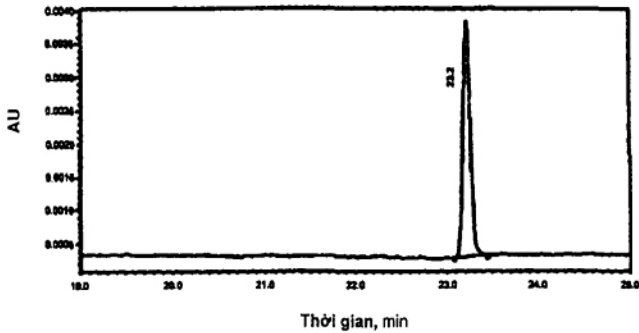
Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- c) phương pháp thử, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) 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;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)
Ví dụ về sắc ký đồ



Hình A.1 – Sắc ký đồ của aloin A và B đo được ở bước sóng 380 nm



Hình A.2 – Sắc ký đồ của alce-emodin đo được ở bước sóng 430 nm ..