

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11065:2016

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM CHỨC NĂNG –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG EPHEDRIN VÀ PSEUDOEPHEDRIN
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Dietary supplements – Determination of ephedrine and pseudoephedrine content
by high performance liquid chromatographic method*

HÀ NỘI – 2016

Lời nói đầu

TCVN 11065:2016 được xây dựng trên cơ sở AOAC 2003.13
Ephedrine and pseudoephedrine in botanicals and dietary supplements.
High-performance liquid chromatography-UV;

TCVN 11065:2016 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm chức năng – Xác định hàm lượng ephedrin và pseudoephedrin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Dietary supplements – Determination of ephedrine and pseudoephedrine content by high performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV để xác định hàm lượng ephedrin (EP) và pseudoephedrin (PS) trong các dạng nguyên liệu thô, dịch chiết từ cây ma hoàng (*Ephedra sinica*) và các sản phẩm thực phẩm chức năng chứa hàm lượng thấp các alkaloid: norphedrin (NE), norpseudoephedrin (NP), metylephedrin (ME) và metylpseudoephedrin (MP).

2 Nguyên tắc

Các alkaloid ephedrin trong mẫu thử được chiết bằng hỗn hợp metanol và dung dịch kalidihydrophosphat 50 mM. Dịch chiết được làm sạch bằng chiết pha rắn (SPE) sử dụng cột trao đổi cation mạnh (SCX). Các alkaloid được rửa giải khỏi cột SPE bằng hỗn hợp metanol-amoni hydroxid. Sau khi được pha loãng và trung hòa, các alkaloid được tách bằng HPLC sử dụng cột sắc ký ete phenyl, chế độ rửa giải đẳng dòng, phát hiện và định lượng bằng detector UV ở bước sóng 210 nm.

3 Thuốc thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc có chất lượng tương đương. Nước sử dụng phải là nước đã khử ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

CẢNH BÁO: Các chất chuẩn alkaloid và mẫu thử có thể gây độc hại nếu hít phải hay hấp thụ qua da gây ngộ độc cấp tính tới tim mạch và hệ thần kinh trung ương. Vì vậy cần tránh tiếp xúc với da, mắt và quần áo. Bảo quản trong lọ kín, tránh xa lửa và các nguồn nhiệt.

3.1 Metanol.

TCVN 11065:2016

3.2 Dung dịch đệm pha động, 50 mM

Hòa tan 13,6 g kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) trong 1 lít nước. Pha mới hàng tuần.

3.3 Pha động

Trộn 30 ml metanol (3.1) với 970 ml dung dịch đệm pha động (3.2). Lọc qua màng lọc nylon 0,45 μm và loại khí bằng áp suất giảm. Dung dịch đã chuẩn bị chỉ sử dụng trong vòng 1 tuần.

3.4. Dung môi chiết

Trộn 30 ml metanol (3.1) và 970 ml nước, thêm 1,3 g kali dihydro phosphat, khuấy cho tan hết, loại khí dưới áp suất giảm. Dung dịch đã chuẩn bị chỉ sử dụng trong vòng 1 tuần.

3.5 Dung dịch axit phosphoric, 500 mM

Hút khoảng 3,5 ml dung dịch axit phosphoric (H_3PO_4) 85 % vào 100 ml nước, trộn đều. Pha mới sau 2 tuần.

3.6 Dung dịch axit phosphoric, 50 mM

Hút 345 μl dung dịch axit phosphoric 85 % cho vào 100 ml nước, trộn đều. Pha mới sau 2 tuần.

3.7 Dung dịch rửa giải SPE

Trộn 5 ml amoni hydroxid với 95 ml metanol. Pha mới sau 2 tuần.

3.8 Chất chuẩn ephedrine hydroclorua ($\text{EP}\cdot\text{HCl}$) và pseudoephedrine hydroclorua ($\text{PS}\cdot\text{HCl}$), tinh khiết ($\geq 99\%$).

3.9 Dung dịch chuẩn

3.9.1 Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác $62,5\text{ mg} \pm 2\text{ mg}$ $\text{EP}\cdot\text{HCl}$ (3.8) (tương đương 51 mg EP dạng bazơ tự do) và $7,5\text{ mg} \pm 0,2\text{ mg}$ $\text{PS}\cdot\text{HCl}$ (3.8) (tương đương 6,1 mg PS dạng bazơ tự do) vào cùng bình định mức 25 ml (4.8). Thêm vào khoảng 20 ml dung môi chiết (3.4), rung siêu âm để hòa tan (khoảng 5 min), thêm dung môi chiết (3.4) đến vạch, trộn đều. Dung dịch chuẩn gốc này chứa khoảng 2,1 mg/ml EP dạng bazơ tự do và 0,25 mg/ml PS dạng bazơ tự do

3.9.2 Dung dịch chuẩn làm việc

Dùng pipet (4.7) lấy chính xác dung dịch chuẩn gốc (3.9.1) theo như Bảng 1 cho vào bình định mức 50 ml (4.8). Pha loãng bằng dung môi chiết đến vạch. Dây dung dịch chuẩn này có thể bền được 2 tuần ở các điều kiện phòng thử nghiệm.

Bảng 1 – Chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm việc

Dung dịch chuẩn làm việc	Thể tích dung dịch chuẩn gốc, ml	Thể tích định mức, ml	Nồng độ các alkaloid tự do, µg/ml	
			EP	PS
Trắng	0	50	0	0
1	0,5	50	20,5	2,5
2	1,0	50	41,0	4,9
3	1,5	50	61,4	7,4
4	2,5	50	102,4	12,3
5	3,5	50	143,4	17,5
6	5,0	50	204,8	24,6

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao, detector UV-Vis.

4.2 Cột phân tích HPLC Phenomenex Synergi Polar RP (4,6 x 150 mm; cỡ hạt 4 µm) hoặc tương đương.

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

4.3 Cân, có thể cân chính xác đến 0,01 mg.

4.4 Bộ lọc dung môi, sử dụng màng lọc nylon 0,45 µm.

4.5 Bể rung siêu âm.

4.6 Bộ chiết pha rắn SPE, có bộ lọc hút chân không, bình rửa giải, cột trao đổi cation mạnh (Phenomenex hoặc tương đương) chứa 500mg hạt nhồi.

4.7 Pipet tự động, có thể phân phối các thể tích từ 200 µl đến 1000 µl.

4.8 Bình định mức, dung tích 10, 25, 50 và 100 ml.

4.9 Máy ly tâm, có thể đạt tốc độ 2 000 r/min.

4.10 Máy lắc.

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không được quy định trong tiêu chuẩn này.

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

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị dung dịch thử

6.1.1 Mẫu nguyên liệu thô

Cân $2,0 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ mẫu thử đã nghiền, chính xác đến $0,01 \text{ mg}$, cho vào bình định mức 100 ml (4.8). Thêm 50 ml dung môi chiết (3.4), lắc bằng máy lắc (4.10) trong 15 min , rung siêu âm bình trong 45 min mà không cần kiểm soát nhiệt độ. Để yên đến nhiệt độ phòng, thêm dung môi chiết (3.4) đến vạch, trộn đều.

6.1.2 Mẫu dịch chiết từ cây ma hoàng

Cân $280 \text{ mg} \pm 30 \text{ mg}$ mẫu thử, chính xác đến $0,01 \text{ mg}$, cho vào bình định mức 100 ml (4.8). Thêm 50 ml dung môi chiết (3.4), lắc bằng máy lắc (4.10) trong 15 min , rung siêu âm bình trong 10 min mà không cần kiểm soát nhiệt độ. Để yên đến nhiệt độ phòng, thêm dung môi chiết (3.4) đến vạch, trộn đều.

6.1.3 Mẫu viên nang, viên nén chứa nguyên liệu thô

Cân 20 viên , chính xác đến $0,01 \text{ mg}$. Đối với viên nang cứng, lấy toàn bộ phần mẫu bên trong nang vào bình chứa, cân lại khối lượng vỏ. Đối với viên nén, nghiền đến bột mịn trong một máy nghiền cafe hoặc tương đương.

Cân phần bột mẫu có hàm lượng tương đương với $2,0 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ nguyên liệu thô, chính xác đến $0,01 \text{ mg}$ và chuyển vào bình định mức 100 ml (4.8). Thêm 50 ml dung môi chiết (3.4), lắc bằng máy lắc (4.10) trong 15 min , rung siêu âm bình trong 10 min mà không cần kiểm soát nhiệt độ. Để yên đến nhiệt độ phòng, định thêm dung môi chiết (3.4) đến vạch, trộn đều.

6.1.4 Mẫu viên nang và viên nén chứa dịch chiết từ cây ma hoàng

Cân 20 viên , chính xác đến $0,01 \text{ mg}$. Đối với viên nang cứng, lấy toàn bộ phần mẫu bên trong nang vào bình chứa, cân lại khối lượng vỏ. Đối với viên nén, nghiền đến bột mịn trong một máy nghiền cafe hoặc tương đương.

Cân phần bột mẫu tương đương với $285 \text{ mg} \pm 30 \text{ mg}$ dịch chiết từ cây ma hoàng, chính xác đến $0,01 \text{ mg}$ và chuyển vào bình định mức 100 ml (4.8). Thêm 50 ml dung môi chiết (3.4), lắc bằng máy lắc (4.10) trong 15 min , rung siêu âm bình trong 10 min mà không cần kiểm soát nhiệt độ. Để yên đến nhiệt độ phòng, thêm dung môi chiết (3.4) đến vạch, trộn đều.

6.2 Tinh sạch

6.2.1 Hoạt hóa cột SPE

Đặt cột SPE vào hệ chiết pha rắn (4.6). Cho lần lượt 2 ml metanol (3.1), 1 ml dung dịch axit phosphoric 50 mM (3.6) qua cột, không để khô cột. Sử dụng áp suất chân không khoảng 12,7 cm thủy ngân (16,9 kPa) để cho các dung dịch trên qua cột với tốc độ phù hợp, tùy thuộc vào kích cỡ hạt nhồi và khối lượng các hạt trong dung dịch.

6.2.2 Nạp các dung dịch chuẩn làm việc

Hút 10 ml mỗi dung dịch chuẩn làm việc (3.9.2) và dung dịch trắng cho vào các cột SPE đã hoạt hóa (6.2.1). Cho các dung dịch này qua cột với tốc độ không quá 2 ml/min tới khô.

6.2.3 Nạp dung dịch thử

Làm sạch các dung dịch thử bằng cách: ly tâm 10 ml dung dịch thử (6.1) tại tốc độ xấp xỉ 2000 r/min trong 10 min hoặc để yên dung dịch ít nhất 1 h.

Hút 5 ml dung dịch vào cột SPE đã hoạt hóa (6.2.1). Cho các dung dịch này qua cột với tốc độ không quá 2 ml/min tới khô. Loại bỏ dịch rửa giải.

Đổi với mỗi lô mẫu, thực hiện mẫu trắng bằng cách cho 5 ml metanol (3.1) đi qua cột.

6.2.4 Rửa cột

Rửa cột SPE với 1 ml dung dịch axit phosphoric 50 mM (3.6), hút khô để loại bỏ dịch đi qua cột.

Rửa lại cột bằng 2 ml metanol (3.1), hút khô, loại bỏ dịch qua cột.

6.2.5 Rửa giải các alkaloid

Hứng bình định mức 10 ml bên dưới mỗi cột SPE.

Rửa giải ba lần, mỗi lần hút 1 ml dung dịch rửa giải SPE (3.7) lên mỗi cột SPE và rửa giải vào trong bình định mức.

Thêm khoảng 5 ml axit phosphoric 500 mM (3.5) vào bình định mức, để yên đến nhiệt độ phòng. Thêm dung dịch axit phosphoric 500 mM (3.5) đến vạch, trộn đều. Chuyển một phần dung dịch này vào lọ bơm mẫu tự động cho HPLC. Đây là dung dịch thử làm việc.

Các dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử sau khi được xử lý qua cột SPE có thể bền được ít nhất 1 tháng khi bảo quản ở nhiệt độ phòng.

6.3 Xác định

6.3.1 Điều kiện vận hành HPLC

Cột sắc ký	4.2
Pha động	3.5
Tốc độ dòng	1,5 ml/min
Thể tích bơm	20 μ l
Detector	210 nm
Dung môi rửa kim bơm mẫu	Nước
Nhiệt độ cột	20 $^{\circ}$ C
Thời gian chạy	20 min

CHÚ THÍCH 1: Các thông số về tỷ lệ pha động, thể tích mẫu bơm, tốc độ dòng, nhiệt độ buồng cột có thể được điều chỉnh tùy thuộc vào điều kiện thực tế của thiết bị HPLC được sử dụng.

CHÚ THÍCH 2: Với các mẫu có chứa cafein cần rửa cột sắc ký 10 min với hỗn hợp acetonitril : nước : dung dịch axit phosphoric (50 : 50 : 0,1) sau khoảng 4 lần bơm mẫu. Cân bằng cột sắc ký với pha động trong 10 min sau mỗi lần rửa cột.

6.3.2 Thời gian lưu tương đối so với ephedrin

Bảng 2 – Thời gian lưu tương đối của các alkaloid so với ephedrin

Alkaloid	Thời gian lưu, min	Thời gian lưu tương đối
Norephedrin	4,9	0,61
Norpseudoephedrin	5,4	0,68
Ephedrin	8,0	1,0
Pseudoephedrin	9,4	1,2
Metylephedrin	12,8	1,6
Metypseudoephedrin	13,2	1,7

6.3.3 Kiểm tra độ ổn định của hệ thống

a) Độ lặp lại

Bơm ít nhất 5 lần dung dịch chuẩn số 4 (Bảng 1), tính RSD của diện tích pic EP và PS, $RSD_{EP} \leq 2,0 \%$ và $RSD_{PS} \leq 3,0 \%$.

b) Độ phân giải: Tính độ phân giải của các pic EP và PS theo Công thức (1):

$$R = 2 \times \frac{T_2 - T_1}{W_1 + W_2} \quad (1)$$

Trong đó:

T_1, T_2 lần lượt là thời gian lưu của EP và PS;

W_1, W_2 là độ rộng đáy pic.

Độ phân giải của EP và PS tại dung dịch chuẩn số 4 phải $\geq 2,0$.

c) Hệ số kéo đuôi: Tính hệ số kéo đuôi pic theo Công thức (2):

$$F = \frac{L + R}{2L} \quad (2)$$

Trong đó:

L là độ rộng tính từ điểm bắt đầu pic tới điểm vuông góc hạ từ vị trí 5 % chiều cao pic xuống;

R là độ rộng tính từ điểm vuông góc hạ từ vị trí 5 % chiều cao pic xuống đến điểm kết thúc pic.

Hệ số kéo đuôi pic phải $\leq 1,5$ cho tất cả các pic alkaloid trong các sắc đồ bơm các dung dịch chuẩn làm việc (3.9.2).

d) Xác định hệ số tương quan: hệ số tương quan tuyến tính r^2 của diện tích pic và nồng độ mỗi alkaloid cần phải $\geq 95 \%$, sau khi đã hiệu chỉnh nồng độ mỗi chuẩn theo độ tinh khiết của nó.

6.3.4 Dựng đường chuẩn

Sau khi thiết bị đã ổn định, tiến hành bơm lần lượt các dung dịch chuẩn làm việc đã được xử lý qua SPE (6.2) vào hệ thống HPLC.

Xác định diện tích pic của các chuẩn trên sắc đồ, dựng đường chuẩn dựa vào diện tích hoặc chiều cao pic của mỗi alkaloid với nồng độ chuẩn làm việc tương ứng.

6.4 Phân tích mẫu thử

Bơm mẫu thử với cùng điều kiện như bơm dung dịch chuẩn hỗn hợp, xác định diện tích hoặc chiều cao pic.

Dựa vào đường chuẩn, xác định hàm lượng ephedrine, pseudoephedrine có trong mẫu thử.

Nếu diện tích pic hoặc chiều cao pic của mẫu lớn hơn diện tích pic hoặc chiều cao pic của chuẩn cao nhất thì phải tiến hành pha loãng mẫu và bơm lại.

TCVN 11065:2016

7 Tính kết quả

Tính hàm lượng các alkaloid·HCl có trong mẫu, X , được biểu thị 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 alkaloid trong mẫu thử, tính được từ đường chuẩn;

V là thể tích chiết mẫu (ở đây $V = 100 \text{ ml}$);

D là hệ số pha loãng (ở đây $D = 10/5 = 2$);

w là khối lượng mẫu (g).

Tính hàm lượng các alkaloid dạng base có trong mẫu, X_1 , được biểu thị bằng microgam trên gam ($\mu\text{g/g}$), theo Công thức (4):

$$X_1 = X \cdot 0,8192 \quad (4)$$

Trong đó 0,8192 là hệ số quy đổi từ alkaloid·HCl sang alkaloid dạng base.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả thử liên phòng thử nghiệm

Bảng A.1 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Sản phẩm	Số phòng thử nghiệm ^{a)}	Hàm lượng trung bình, µg/g	RSD _n , %	RSD _R , %	Chỉ số HorRat
Ephedrin					
Thực vật	10(2)	6180	0,98	3,98	0,92
Viên nang Ephedra	10 (0)	7050	1,8	6,59	1,56
Dịch chiết thông thường	10(2)	64400	0,64	2,13	0,70
Viên nang công thức	10(1)	21900	2,56	3,47	0,98
Thêm mức thấp	10(2)	5790	3,03	3,50	0,81
Thêm mức cao	10(2)	58100	1,98	6,60	2,15
Pseudoephedrin					
Thực vật	10 (0)	1270	4,08	9,64	1,77
Viên nang Ephedra	10 (0)	2270	2,01	11,2	2,23
Dịch chiết thông thường	10 (0)	9410	2,58	9,0	2,23
Viên nang công thức	10 (0)	1960	2,58	11,3	2,21
Thêm mức thấp	10 (0)	783	9,63	10,6	1,81
Thêm mức cao	10 (2)	8683	4,70	11,4	2,78
Tổng (Ephedrin + pseudoephedrin)					
Thực vật	10 (0)	7450	3,03	4,38	1,05
Viên nang Ephedra	10 (0)	9320	1,83	7,46	1,84
Dịch chiết thông thường	10 (2)	74900	0,85	2,03	0,69
Viên nang công thức	10 (1)	23900	2,38	3,60	1,03
Thêm mức thấp	10 (1)	6570	2,76	3,50	0,82
Thêm mức cao	10 (1)	65200	2,57	10,1	3,34
CHÚ THÍCH:					
^{a)} Trong ngoặc đơn là số phòng thử nghiệm ngoại lệ;					
RSD _n và RSD _R tương ứng là độ lệch chuẩn tương đối lặp lại và độ lệch chuẩn tương đối tái lập.					