

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11937:2017

**THỰC PHẨM BỔ SUNG VÀ NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT -
XÁC ĐỊNH ACONITUM ALKALOID - PHƯƠNG PHÁP
SẮC KÍ LỎNG VỚI DETECTOR UV (LC-UV)**

*Foodstuffs dietary supplements and raw botanical materials - Determination of aconitum
alkaloids - Liquid chromatographic method with UV detection*

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 11937:2017 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2008:11
Aconitum alkaloids in dietary supplements and raw botanical materials.
Liquid chromatographic with UV detection;

TCVN 11937:2017 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 các aconitum alkaloid – Phương pháp sắc ký lỏng với detector UV (LC-UV)

Foodstuffs dietary supplements and raw botanical materials – Determination of aconitum alkaloids – Liquid chromatographic method with UV detection

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng với detector UV để xác định các aconitum alkaloid trong thực phẩm bổ sung và nguyên liệu thực vật chứa cây ô đầu (*Aconitum* sp.).

2 Nguyên tắc

Các aconitum alkaloid được chiết từ các nền mẫu khác nhau bằng dietyl ete với sự có mặt của amoniac, chất chiết được làm sạch bằng chiết pha rắn (SPE) và các chất phân tích (aconitin, mesaconitin và hypaconitin) được định lượng bằng sắc ký lỏng với detector UV (LC/UV) ở bước sóng 235 nm. Các chất được khẳng định bằng sắc ký lỏng hai lần phổ khối lượng (LC/MS/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 Metanol, loại dùng cho LC.

3.2 Axetonitril, loại dùng cho LC.

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

3.3 Axit axetic, dung dịch 0,1 %.

3.4 Axit formic.

3.5 Dietyl ete.

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

3.6 Triethylamin.

3.7 Amoni hydroxit.

3.7.1 Amoni hydroxit, dung dịch 5 %.

3.7.2 Amoni hydroxit, dung dịch 10 %.

3.8 Amoni format.

3.9 Dung dịch rửa cột chiết pha rắn

Trộn 70 ml dung dịch amoni hydroxit 5 % (3.7.1) với 30 ml metanol (3.1).

3.10 Dung dịch rửa giải cột chiết pha rắn

Trộn 5 ml dung dịch amoni hydroxit 5 % (3.7.1) với 95 ml metanol (3.1).

3.11 Hỗn hợp axetonitril-axit axetic 0,1 % (1 + 1).

3.12 Chất chuẩn đối chứng

3.12.1 Aconitin, độ tinh khiết 95 %. Bảo quản nơi tối ở nhiệt độ từ 2 °C đến 10 °C.

3.12.2 Hypaconitin, độ tinh khiết 98 %. Bảo quản nơi tối ở nhiệt độ nhỏ hơn 25 °C.

3.12.3 Mesaconitin, độ tinh khiết 98 %. Bảo quản nơi tối ở nhiệt độ nhỏ hơn 25 °C.

3.13 Dung dịch chuẩn

3.13.1 Dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp, khoảng 1 000 mg/l

Cân chính xác khoảng 10 mg aconitin (3.12.1), hypaconitin (3.12.2) và mesaconitin (3.12.3) cho vào bình định mức dung tích 10 ml (4.13). Thêm 6 ml hỗn hợp axetonitril-axit axetic 0,1 % (3.11) vào bình và lắc để hòa tan chất rắn. Thêm dung môi đến vạch.

3.13.2 Dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp, khoảng 100 mg/l

Dùng pipet (4.11) lấy 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp (3.13.1) cho vào bình định mức dung tích 10 ml (4.13) và pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp axetonitril-axit axetic 0,1 % (3.11).

3.13.3 Dung dịch chuẩn làm việc, khoảng 0,5 mg/l đến 20 mg/l

Chuẩn bị mới ít nhất 5 dung dịch chuẩn làm việc (bao gồm cả dung dịch trắng hiệu chuẩn), nằm trong dải 0,5 mg/l đến 20 mg/l bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn trung gian hỗn hợp (3.13.2) với hỗn hợp axetonitril-axit axetic 0,1 % (3.11) như nêu trong Bảng 1. Nên sử dụng pipet (4.11) với dải thích hợp để chuyển dung dịch chuẩn. Thể tích của dung dịch chuẩn gốc đã chuẩn bị phải đủ để chuẩn bị hai dãy dung dịch chuẩn làm việc.

CHÚ THÍCH: 3 aconitum alkaloid dễ bị thủy phân trong metanol, đặc biệt là trong điều kiện kiềm. Chu kỳ bán rã của aconitin, hypaconitin và mesaconitin trong metanol với 5 % amoniac là khoảng 4 ngày đến 5 ngày. Tuy nhiên, không có dấu hiệu phân rã của alkaloid khi được bảo quản trong môi trường axetonitril hoặc môi trường axit trong thời gian 6 tháng.

Bảng 1 – Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc

Chuẩn	Thể tích chuẩn trung gian hỗn hợp ml	Thể tích cuối ml	Nồng độ gần đúng mg/l		
			Aconitin	Mesaconitin	Hypaconitin
Trắng	—	10	0,0	0,0	0,0
1	0,05	10	0,5	0,5	0,5
2	0,1	10	1	1	1
3	0,2	10	2	2	2
4	0,5	10	5	5	5
5	1	10	10	10	10
6	2	10	20	20	20

3.14 Thuốc thử dùng cho LC/UV

3.14.1 Pha động A đối với LC/UV, triethylamin 20 mM trong nước được điều chỉnh đến pH 3 bằng hỗn hợp axit phosphoric-metanol (95 + 5).

3.14.2 Pha động B đối với LC/UV, metanol.

3.14.3 Pha động đối với sắc ký lỏng ghép khối phổ (đẳng dòng).

Hỗn hợp metanol-amoni format 20 mM trong axit formic 0,1 % (45 + 55).

4 Thiết bị, dụng cụ

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

TCVN 11937:2017

4.1 Hệ thống LC/UV, có detector quang phổ tử ngoại khả kiến, bơm bốn kênh, bộ lấy mẫu tự động, bộ phận gia nhiệt cho cột, bộ thu nhận và xử lý số liệu.

4.2 Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ

Máy đo phổ khối lượng ba tứ cực có nguồn ion phun điện tử và hệ thống sắc ký lỏng.

4.3 Cột sắc ký (dùng cho hệ thống LC/UV), ví dụ: Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 μm , 4.6 \times 150 mm với cột bảo vệ.

4.4 Cột sắc ký (dùng cho hệ thống LC/MS/MS) ví dụ: Xterra MS C8, 3.5 μm , 2.1 \times 150 mm.

4.5 Bộ chiết pha rắn, ví dụ: Gilson Inc.

4.6 Cột chiết, ví dụ: Oasis MCX SPE, 3 ml, 60 mg.

4.7 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

4.8 Bể siêu âm.

4.9 Máy ly tâm, có tốc độ tối đa 5 000 r/min với bán kính của roto là 15 cm.

4.10 Ống ly tâm, dung tích 50 ml.

4.11 Pipet, có thể phân phối từ 100 μl đến 1000 μl .

4.12 Bộ lọc màng, ví dụ: Puradisc, 13 mm, kiểu xyranh lọc, cỡ lỗ 0,45 μm , làm bằng poly (vinyliden florua).

4.13 Bình định mức, dung tích 10 ml.

4.14 Máy lắc ngang, có thể đạt tốc độ đến 300 r/min.

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 thoả thuận về vấn đề này.

6 Cách tiến hành

6.1 Chiết

Dùng cân (4.7), cân chính xác khoảng 1,0 g mẫu cho vào ống ly tâm dung tích 50 ml (4.10). Thêm 1 ml dung dịch amoni hydroxit 10 % (3.7.2). Khuấy đều để làm ẩm toàn bộ mẫu. Sau đó thêm 25 ml dietyl ete (3.5) vào ống. Lắc ống trên máy lắc ngang (4.14) trong 1 h ở tốc độ 300 r/min. Ly tâm mẫu ở 4 000 r/min trong 10 min để chất rắn lắng xuống.

CẢNH BÁO: Để tránh thất thoát ete bay hơi và nguy cơ nổ, ống phải có khả năng chịu được lực và phải được đậy kín để tránh rò rỉ.

Gạn lớp dietyl ete vào một ống ly tâm khác. Lặp lại quá trình chiết mẫu hai lần, mỗi lần với 10 ml dietyl ete và lắc ống, tương ứng 30 min và 10 min. Gộp các phần chiết và để bay hơi đến khô hoàn toàn ở nhiệt độ ≤ 40 °C dưới dòng khí nitơ. Thêm 5 ml hỗn hợp axetonitril-axit axetic 0,1 % (3.11) và siêu âm trong 20 min để loại bỏ cặn. Lọc dung dịch qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 μm (4.12) sau đó làm sạch bằng chiết pha rắn. Nếu thời gian không cho phép các bước làm sạch bằng chiết pha rắn tiếp theo thì bảo quản dung dịch ở 4 °C. Tuy nhiên, các bước làm sạch phải được hoàn thành trong vòng 2 ngày đến 3 ngày.

6.2 Làm sạch cột chiết pha rắn trao đổi cation hỗn hợp

Ôn định cột chiết pha rắn với 1 ml metanol (3.1) và 1 ml nước. Sau khi nạp 4 ml dung dịch mẫu vào cột chiết pha rắn, rửa cột liên tiếp với 1 ml dung dịch axit axetic 0,1 % (3.3), 1 ml metanol (3.1), 1 ml nước và 1 ml dung dịch rửa giải cột chiết pha rắn (3.10). Làm khô cột và rửa giải các chất phân tích ra khỏi cột bằng 2 ml dung dịch rửa giải chiết pha rắn. Tốc độ dòng chảy cho việc nạp dung dịch mẫu là 0,2 ml/min, tốc độ dòng chảy cho các bước khác là 0,5 ml/min. Thu dung dịch rửa giải vào ống nghiệm của hệ thống chiết pha rắn. Làm bay hơi dung môi đến khô ở nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng 40 °C dưới dòng khí nitơ.

CHÚ THÍCH Các chất phân tích sẽ bị phân hủy dần với chu kỳ bán rã là 4 ngày đến 5 ngày khi được giữ trong dung dịch rửa giải chiết pha rắn.

Hòa tan lại lượng cặn trong 1 ml hỗn hợp axetonitril-axit axetic 0,1 % (3.11) và siêu âm trong 20 min. Dung dịch sẵn sàng để phân tích sắc ký sau khi cho qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 μm (4.12). Dùng hỗn hợp axetonitril-axit axetic 0,1 % để pha loãng thích hợp nếu các tín hiệu của các chất phân tích trong dịch chiết mẫu nằm ngoài dải hiệu chuẩn.

6.3 Xác định các aconitum alkaloid bằng LC/UV

6.3.1 Điều kiện hoạt động LC/UV

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

TCVN 11937:2017

Nhiệt độ cột: 25 °C;

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min;

Thể tích tiêm: 10 µl;

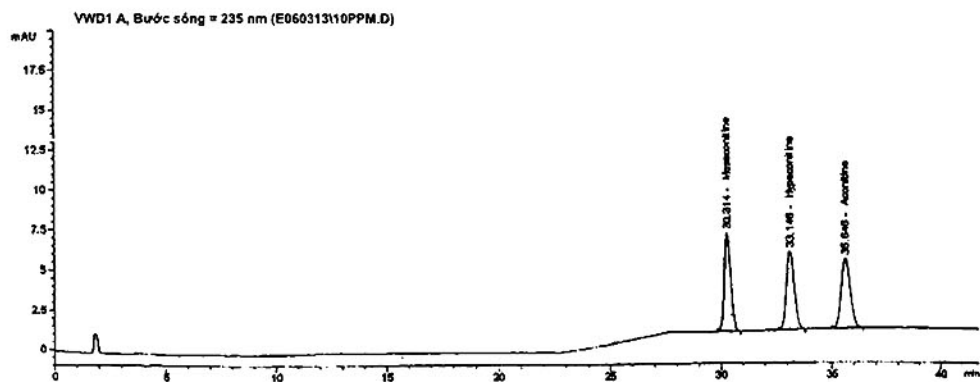
Bước sóng phát hiện: 235 nm;

Thời gian chạy: 56 min.

Chương trình gradient được nêu trong Bảng 2. Sắc ký đồ điển hình của dung dịch chuẩn được thể hiện trong Hình 1.

Bảng 2 – Chương trình gradient để xác định LC/UV

Thời gian min	Pha động A %	Pha động B %	Tốc độ dòng ml/min
0	70	30	1,0
20	70	30	1,0
25	60	40	1,0
40	60	40	1,0
50	30	70	1,0
51	70	30	1,0
60	70	30	1,0



Hình 1 – Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn hỗn hợp (10 µg/ml)

6.3.2 Dụng đường chuẩn

Dụng đường chuẩn của diện tích pic của từng chất phân tích trong dung dịch chuẩn làm việc theo nồng độ chất phân tích.

6.3.3 Phép xác định

Xác định nồng độ của từng chất phân tích trong dung dịch chiết mẫu từ đường hiệu chuẩn. Nếu nồng độ của chất phân tích trong dịch chiết mẫu vượt quá dải hiệu chuẩn, tiến hành pha loãng thích hợp và lặp lại việc xác định.

6.4 Khẳng định bằng sắc kí lỏng khối phổ

6.4.1 Khái quát

Khi một aconitum alkaloid được phát hiện ở nồng độ ≥ 1 mg/kg bằng LC/UV, đặc điểm nhận dạng của chất được khẳng định lại bằng LC/MS/MS. Để khẳng định, cường độ của tín hiệu cặp ion kiểm soát đa phản ứng tương ứng MRM phải ≥ 400 cps (Bảng 4).

Bảng 4 – Cặp ion MRM để khẳng định

Alkaloid	Ion mẹ, m/z	Ion con, m/z
Aconitin	646	586
Hypaconitin	616	556
Mesaconitin	632	572

6.4.2 Điều kiện hoạt động LC/MS/MS

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

Cài đặt MS: chế độ ion hóa: ion hóa dương phun điện tử;

Khí chẩn: 8 đơn vị;

Bộ phận tạo sol khí: 15 đơn vị;

Điện thế nguồn phun ion: 5000 V;

Nhiệt độ: 350 °C.

Tốc độ dòng chảy của pha động được đặt ở mức 200 μ l/min.

7 Tính kết quả

Tính nồng độ của mỗi chất phân tích trong mẫu thử, C , biểu thị bằng miligam trên kilogam (mg/kg), theo công thức sau:

$$C = A \times \frac{5}{4} \times \frac{V \times D}{W} \quad (1)$$

Trong đó:

A là nồng độ chất phân tích trong dung dịch thử (xem 6.3.3), tính bằng miligam trên lít (mg/l);

W là khối lượng của mẫu đã sử dụng, tính bằng gam (g);

V là thể tích cuối của dung dịch mẫu, tính bằng mililit (ml);

D là hệ số pha loãng, nếu có;

5/4 là hệ số để tính phần chất chiết lấy ra để làm sạch.

8 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 thử nghiệm liên phòng

**Bảng A.1 – Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm đối với aconitum alkaloid
trong thức ăn bổ sung**

Mẫu ^a	Trung bình mg/kg	S _r	RSD _r , %	S _R	RSD _R , %	Số phòng thử nghiệm ngoại lệ	Chi số HorRat	Số phòng thử nghiệm tham gia
Aconitin								
A	0,73	0,13	16,7	0,25	33,0	2	1,98	9
B	6,28	0,22	3,5	1,80	28,8	1	2,37	10
C	4,21	0,14	3,4	0,63	15,3	2 ^b	1,18	8
D	8,37	0,51	6,0	1,58	18,8	0	1,62	11
E	0,89	0,04	5,2	0,20	23,1	1	1,42	10
F	ND ^c	—	—	—	—	— ^d	—	9
G	ND	—	—	—	—	—	—	11
Mesaconitin								
A	3,11	0,20	6,5	0,82	26,0	1	1,93	10
B	33,2	2,05	6,2	4,44	13,4	1	1,42	10
C	4,08	0,15	3,7	0,98	24,3	2 ^b	1,88	8
D	8,64	0,42	4,9	1,16	13,4	0	1,16	11
E	0,98	0,06	6,1	0,18	18,5	1	1,15	10
F	ND	—	—	—	—	— ^d	—	9
G	ND	—	—	—	—	1	—	10

Bảng A.1 (kết thúc)

Mẫu ^a	Trung bình mg/kg	S _r	RSD _r , %	S _R	RSD _R , %	Số phòng thử nghiệm ngoại lệ	Chỉ số HorRat	Số phòng thử nghiệm tham gia
Hypaconitin								
A	1,10	0,16	13,9	0,31	27,3	2	1,74	9
B	85,2	1,64	1,9	5,57	6,5	2	0,80	9
C	4,48	0,17	3,8	0,55	12,5	3 ^b	0,97	7
D	8,85	0,21	2,4	1,20	13,2	1	1,14	10
E	0,90	0,06	6,5	0,16	17,2	1	1,06	10
F	ND	—	—	—	—	1 ^d	—	8
G	ND	—	—	—	—	—	—	11

Trong đó:

- ^a Mẫu
- A là thức ăn bổ sung;
- B là *R. aconiti* đã chế biến;
- C là thức ăn bổ sung đã thêm 5 mg/kg kiểm chứng âm;
- D là bổ sung lượng cao 10 mg/kg nguyên liệu thực vật kiểm chứng âm;
- E là bổ sung lượng thấp 1 mg/kg nguyên liệu thực vật kiểm chứng âm;
- F là nguyên liệu thực vật kiểm chứng âm;
- G là thức ăn bổ sung kiểm chứng âm.

^b Thêm một phòng thử nghiệm đã được loại bỏ vì các dữ liệu nghi ngờ bị lẫn với những mẫu khác.

^c ND là không phát hiện.

^d Hai phòng thử nghiệm đã được loại bỏ vì các dữ liệu nghi bị lẫn với những mẫu khác.

S_r Độ lệch chuẩn lặp lại

RSD_r Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại

S_R Độ lệch chuẩn tái lập

RSD_R Độ lệch chuẩn tương đối tái lập.