ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI VITAMIN B1, B6, B12 TRONG SỮA BỘT VÀ SỮA TƯƠI DIELAC GROW PLUS, DIELAC ALPHA GOLD BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Đến tòa soạn 3-12-2019

Mai Xuân Trường, Nguyễn Gia Huy
Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

SUMMARRY

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF VITAMINE B1, B6, B12 IN MILK AND FRESH MILK DIELAC GROW PLUS, DIELAC ALPHA GOLD BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

In this paper we announce the survey results of the optimum conditions to simultaneous determination of vitamine B1, vitamine B6 and vitamine B12 by high performance liquid chromatography (HPLC) method and simultaneously quantify vitamine B1, vitamine B6 and vitamine B12 in milk and fresh milk DIELAC GROW PLUS, DIELAC ALPHA GOLD by HPLC method. The results showed that the error when determining vitamine B1, vitamine B6 and vitamine B12 are less than 3% with the recovery of vitamine B1 from 91.35% to 100.81%; of vitamine B6 from 90.446% to 99.12%, of vitamine B12 from 92.38% to 100.68%.

1. MỞ ĐẦU

Vitamin B1, B6, B12 có tác dụng hỗ trợ quá trình sản xuất năng lượng trong cơ thể cũng như trao đổi chất và chuyển hóa năng lượng trong tế bào. Vitamin B1, B6, B12 là thành phần chính trong các loại sữa bột hay sữa tươi. Việc xác định chính xác hàm lượng vitamin B1, B6 và B12 được bổ sung rất có ý nghĩa trong việc đảm bảo quyền lợi và sức khỏe của người tiêu dùng. Có rất nhiều phương pháp phân tích đã được nghiên cứu và áp dụng để xác định hàm lượng vitamin B1, B6, B12 trong thực phẩm như phương pháp điện hóa, phương pháp động học huỳnh quang, phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao [1, 2]. Trong bài báo này, chúng tôi thông báo kết quả xác định đồng thời các vitamin B1, B6, B12 trong sữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị và hóa chất

Thiết bị

Máy máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC - Acquity Arc (Mỹ) kết nối máy tính, Detector DPA, cột C18 (đường kính hạt pha tĩnh là 5 µm, chiều dài cột tách 250 mm và đường kính cột 6,1 mm); máy rung siêu âm; Cân phân tích Scientech SA 210 độ chính xác 0,0001g; Máy đo pH và các dụng cụ pha chế khác.

Hóa chất

Na_2HPO_4, H_3PO_4, axetonitril, vitamin B1 chuẩn (độ tinh khiết > 97,5%), vitamin B6 chuẩn (độ tinh khiết > 98,8%), vitamin B12 chuẩn (độ tinh khiết > 98,5%) của Merk.

Sữa bột và sữa tươi do công ty Vinamilk sản xuất: Sữa bột DIELAC GROW PLUS số lô: E7, ngày sản xuất: 26/02/2019, hạn sử dụng: 26/02/2021; Sữa bột DIELAC ALPHA GOLD số lô: R3, ngày sản xuất: 26/02/2019, hạn sử

dụng: 26/02/2021; Sữa tươi DIELAC GROW PLUS số lô: 0E72GPG15, ngày sản xuất: 28/6/2019, hạn sử dụng: 27/12/2019; Sữa tươi DIELAC ALPHA GOLD số lô: 0D72GPG03, ngày sản xuất: 28/6/2019, hạn sử dụng: 27/12/2019.

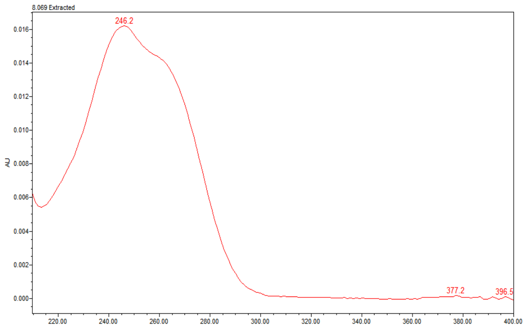
Dung môi pha mẫu: dung dịch đệm photphat (pH=3): dung dịch axetonitril tỉ lệ 80:20 về thể tích.

2.2. Quy trình phân tích

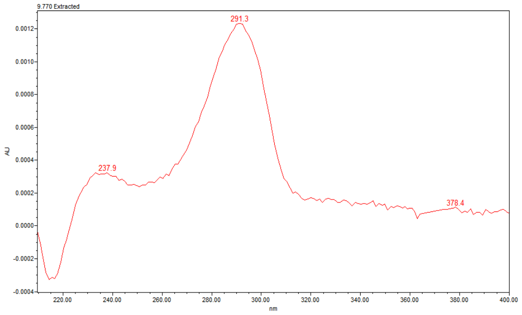
- Pha các dung dịch chuẩn vitamin B1, vitamin B6 và vitamin B12.
- Khảo sát các điều kiện tối ưu của phương phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để xác định đồng thời vitamin B1, B6, B12.
- Xác định đồng thời vitamin B1, B6, B12 trong sữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

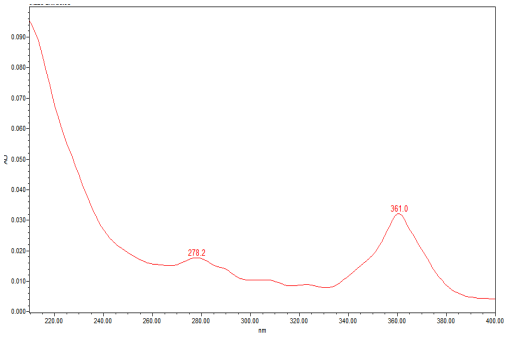
Tiến hành khảo sát cho thấy các điều kiện tối ưu cho phép đo là: Detector DPA bước sóng chọn lọc đối với vitamin: B1 (246 nm); vitamin B6 (291 nm) và vitamin B12 (361 nm); Tốc độ dòng chảy: 1,0 mL/phút; Pha động: kênh A: dung dịch đệm photphat (pH=3) + kênh B: dung dịch axetonitril tỉ lệ 80:20 về thể tích. Tiến hành quét phổ hấp thụ của dung dịch chứa các vitamin riêng rẽ B1, B6 và B12 từ bước sóng 200 nm đến 400 nm. Các điều kiện khác cố định không đổi gồm kênh A là dung dịch đệm photphat, kênh B là axetonitril với tỉ lệ 80:20 về thể tích, tốc độ dòng là 1 mL/phút. Phổ hấp thụ của viatmin B1, B6 và B12 thu được ở hình 1, 2, 3; Sắc ký đồ của hỗn hợp 3 vitamin B1, B6 và B12 ở hình 4.



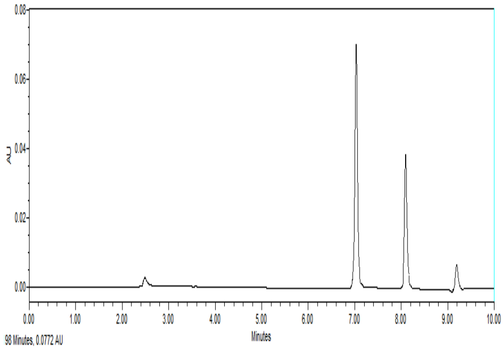
Hình 1. Phổ hấp thụ của vitamin B1



Hình 2. Phổ hấp thụ của vitamin B6



Hình 3. Phổ hấp thụ của vitamin B12



Hình 4. Sắc ký đồ của vitamin B1, B6 và B12

Khảo sát khoảng tuyến tính của vitamin B1, B16 và B12 trong khoảng nồng độ từ 0,4 (ppm)-2,8 (ppm) trong điều kiện sắc ký đã chọn ở trên. Xác định được sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic bằng phương trình hồi quy tuyến tính và hệ số tương quan R^2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của vitamin B1, B16 và B12 được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính của vitamin B1, B6 và B12

Vitamin B1		Vitamin B6		Vitamin B12	
Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (mAuxphút)	Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (mAuxphút)	Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (mAuxphút)
0,4	69936	0,4	58998	0,4	9312
0,8	95585	0,8	80251	0,8	31498
1,2	117234	1,2	105503	1,2	56114
1,4	129059	1,4	117129	1,4	67932
1,6	140884	1,6	129755	1,6	76829
2,2	176358	2,2	162364	2,2	116153
2,8	211831	2,6	198512	2,8	149576
y = 58779x+47083		y = 58276x + 35206		y = 58860x - 14962	
R^2 = 0,9998		R^2 = 0,9996		R^2 = 0,9993	

Để xác định đồng thời các vitamin B1, B6 và B12 trong sữa bột DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD tiến hành như sau:

Cân chính xác 5,0000 gam sữa bột (hoặc hút chính xác 15,0 mL sữa tươi) cho vào ống nhựa ly tâm (50mL), hòa tan thành 25 mL bằng dung môi pha mẫu. Lắc đều, rung siêu âm, sau đó ly tâm gạn lấy dung dịch sau đó đem lọc qua giấy lọc và màng lọc có kích thước 0,45 µm trước khi bơm vào hệ thống HPLC. Kết quả phân tích của 4 lần lặp lại thu được kết quả ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định vitamin B1, B6, B12 trong sữa Dielac Grow Plus và Dielac Alpha Gold

Mẫu	Dielac Grow Plus			Dielac Alpha Gold		
	HLLT	**HLXĐ**	**%RSD**	**HLLT**	**HLXĐ**	**%RSD**
Sữa bột Dielac Grow Plus và Dielac Alpha Gold						
Vitamin B1	2,200	2,247	1,25%	1,260	1,266	1,03%
Vitamin B6	2,200	2,252	1,47%	1,500	1,537	0,79%
Vitamin B12	0,004	-	-	0,003	-	-
Sữa tươi Dielac Grow Plus và Dielac Alpha Gold						
Vitamin B1	0,468	0,478	2,09%	0,668	0,677	2,07%
Vitamin B6	0,668	0,666	2,10%	1,200	1,256	2,31%
Vitamin B12	0,004	-	-	0,004	-	-

Trong đó:

HLLT: là hàm lượng lý thuyết của vitamin B1, B6 và B12 trong sữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD do nhà sản xuất công bố (ppm)

HLXĐ: làm hàm lượng của vitamin B1, B6 và B12 trong sữa bột DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD xác định được (ppm).

%RSD là độ lệch chuẩn tương đối của phép xác định.

Nhận xét: Kết quả xác định vitamin B1, B6 và B12 ở bảng 2 cho thấy hàm lượng vitamin B1, B6 trong sữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD do nhà sản xuất công bố và hàm lượng vitamin B1, B6 xác định được khác nhau không đáng kể. Kết quả trên cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (%RSD) của vitamin B1 và B6 trong sữa bột và sữa tươi đều nhỏ hơn 2,31% . Riêng với vitamin B12 trong sữa có hàm lượng rất nhỏ dưới giới hạn

phát hiện của phương pháp do đó chúng tôi sử dụng phương pháp thêm chuẩn để xác định.

Cân chính xác 5,0000 gam sữa bột (hoặc hút chính xác 15,0 mL sữa tươi) cho vào ống nhựa ly tâm (50mL); thêm lượng chất chuẩn vitamin B1 (hoặc vitamin B6 hoặc vitamin B12 như bảng 3), hòa tan thành 25 mL bằng dung môi pha mẫu. Lắc đều, rung siêu âm, sau đó ly tâm gạn lấy dung dịch sau đó đem lọc qua giấy lọc và màng lọc có kích thước 0,45 µm trước khi bơm vào hệ thống HPLC.

Bảng 3. Nồng độ vitamin B1, B6 và B12 chuẩn thêm vàosữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD

Mẫu		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nồng độ thêm chuẩn	**B1**	0,800	1,600	2,000	2,800	-	-	-	-	-	-	-	-
	B6	-	-	-	-	0,800	1,600	2,000	2,800	-	-	-	-
	B12	-	-	-	-	-	-	-	-	0,800	1,600	2,000	2,800

Tiến hành chạy sắc ký các mẫu thêm chuẩn ở điều kiện sắc ký đã chọn ở trên. Kết quả phân tích của 4 lần lặp lại thu được kết quả ở bảng 4.

Nhận xét: Kết quả xác định vitamin B1, B6 và B12 theo phương pháp thêm chuẩn ở bảng 4 cho thấy hàm lượng thêm chuẩn các vitamin B1, B6 và B12 và hàm lượng xác định được tương đối phù hợp, độ thu hồi của vitamin B1 từ 91,35% đến 100,81%, của vitamin B6 từ 90,44% đến 99,12% và của vitamin B12 từ 92,38% đến 100,68%. Điều đó chứng tỏ phương pháp nghiên cứu có đủ tin cậy để phân tích sữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD trong thực tế.

Bảng 4. Kết quả xác định độ thu hồi - Rev (%) của vitamin B1, B6 và B12 trong sữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD theo phương pháp thêm chuẩn

Mẫu		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sữa bột Dielac Grow Plus	**B1**	91,35	92,86	99,77	100,81	-	-	-	-	-	-	-	-
	B6	-	-	-	-	96,54	97,81	93,22	91,17	-	-	-	-
	B12	-	-	-	-	-	-	-	-	97,38	98,25	92,85	93,21
Sữa bột Dielac Alpha Gold	**B1**	92,50	98,75	93,50	92,14	-	-	-	-	-	-	-	-
	B6	-	-	-	-	98,82	98,36	99,12	98,74	-	-	-	-
	B12	-	-	-	-	-	-	-	-	97,75	98,06	92,75	96,50
Sữa tươi Dielac Grow Plus	**B1**	98,52	95,65	95,14	92,75	-	-	-	-	-	-	-	-
	B6	-	-	-	-	96,31	94,27	92,72	91,56	-	-	-	-
	B12	-	-	-	-	-	-	-	-	92,38	98,94	97,05	94,64
Sữa tươi Dielac Alpha Gold	**B1**	97,25	91,54	98,65	93,18	-	-	-	-	-	-	-	-
	B6	-	-	-	-	97,71	98,38	91,22	90,44	-	-	-	-
	B12	-	-	-	-	-	-	-	-	98,75	95,94	96,30	100,68

4. KẾT LUẬN

Đã khảo sát và lựa chọn được điều kiện tối ưu cho phép xác định vitamin B1, B6 và B12 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao; Các kết quả xác định đồng thời vitamin B1, B6 và B12 trong sữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD có sai số đối với vitamin B1 (<2,09%), độ thu hồi từ 91,35% đến 100,81%; sai số của phép xác định vitamin B6 (<2,31%) và độ thu hồi từ 90,44% đến 99,12%; vitamin B12 có độ thu hồi từ 92,38% đến 100,68%. Các kết quả xác định cho thấy hàm lượng vitamin B1, B6 và B12 trong sữa bột và sữa tươi DIELAC GROW PLUS và DIELAC ALPHA GOLD đáp ứng các tiêu chuẩn dược dụng Việt Nam [3, 4, 5].

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Nguyễn Phi Hải (2016), *Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng 3 hoạt chất vitamin B1, B6, B12 trong sản phẩm thuốc tiêm đông khô Neutrivit 5000 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)*, Luận văn thạc sỹ kỹ thuật hóa học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

[2]. C. K. Markopoulou, K. A. Kagkadis, J. E. Koundourelli (2002), *An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12 in multivitamin tablets by highperformance liquid chromatography*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

[3]. TCVN 5164:2008 (EN 14122:2003) Tiêu chuẩn xác định Vitamin B1 bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

[4]. TCVN 9513:2012 (EN 14663:2005) Tiêu chuẩn xác định vitamin B6 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

[5]. TCVN 9514:2012 Tiêu chuẩn xác định vitamin B12 bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).