

13.11 ĐỊNH LƯỢNG HOẠT TÍNH VITAMIN B₁₂ BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH VẬT

Dung dịch đậm

Hòa tan 1,29 g *dinatri hydrophosphat (TT)*, 1,10 g *acid citric khan (TT)*, 1,00 g *natri metabisulfit (TT)* trong 100 ml *nước để pha tiêm*.

Môi trường định lượng

Thành phần

L-Cystin	0,1 g
L-Tryptophan	0,05 g
Dung dịch acid hydrochloric 1N	10 ml
Dung dịch adenin - guanin - uracil	5 ml
Dung dịch Xanthin	5 ml
Dung dịch vitamin I	10 ml
Dung dịch vitamin II	10 ml
Dung dịch muối A	5 ml
Dung dịch muối B	5 ml
Dung dịch asparagin	5 ml
Dung dịch thủy phân casein bằng acid	25 ml
Dextrose khan	10 g
Natri acetat khan	5 g
Acid ascorbic	1 g
Dung dịch polysorbat 80	5 ml

Chuẩn bị các dung dịch

Dung dịch thủy phân casein bằng acid: Cho 100 g *casein* không chứa vitamin vào 500 ml *dung dịch acid hydrochloric 6 N*, đun hồi lưu từ 8 h đến 12 h. Loại bỏ acid hydrochloric trong hỗn hợp bằng cất chân không đến khi thu được khối bột nhão. Hòa tan cẩn thận bằng *nước để pha tiêm*, điều chỉnh pH dung dịch về $3,5 \pm 0,1$ bằng *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)*. Thêm *nước để pha tiêm* vừa đủ 1000 ml. Thêm 20 g *than hoạt*, khuấy để hấp phụ trong 1 h, lọc lấy dịch trong. Tiếp tục lặp lại bước thêm than hoạt trên đến khi thu được dung dịch trong suốt. Bảo quản dung dịch trong toluen, trong tủ lạnh ở nhiệt độ không dưới 10 °C.

Dung dịch Asparagin: Hòa tan 2,0 g *L-asparagin* trong vừa đủ 200 ml *nước để pha tiêm*. Bảo quản dung dịch trong toluen, trong tủ lạnh.

Dung dịch adenin - guanin - uracil: Hòa tan 200 mg mỗi loại *adenin sulfat*, *guanin hydrochlorid* và *uracil* trong 10 ml *dung dịch acid hydrochloric 4 N*, làm nóng nếu cần đến khi tan hết, làm lạnh, thêm *nước để pha tiêm* vừa đủ 200 ml. Bảo quản dung dịch trong toluen, trong tủ lạnh.

Dung dịch xanthin: Hòa 0,2 g *xanthin* vào khoảng 30 ml đến 40 ml *nước để pha tiêm*, đun nóng đến khoảng 70 °C, thêm 6 ml *dung dịch amoni hydroxyd 6 N*, khuấy đều đến khi tan hoàn toàn. Làm lạnh đến nhiệt độ phòng, thêm *nước để pha tiêm* vừa đủ 200 ml. Bảo quản dung dịch trong toluen, trong tủ lạnh.

Dung dịch muối A: Hòa tan 10 g *kali dihydrophosphat (TT)* và 10 g *dikali hydrophosphat (TT)* trong vừa đủ 200 ml *nước để pha tiêm*. Thêm 2 giọt *acid hydrochloric (TT)*, bảo quản trong toluen.

Dung dịch muối B: Hòa tan 4,0 g *magnesi sulfat (TT)*, 0,20 g *natri clorid (TT)*, 0,20 g *sắt (II) sulfat (TT)* và 0,20 g *mangan sulfat (TT)* trong vừa đủ 200 ml *nước để pha tiêm*. Thêm 2 giọt *acid hydrochloric (TT)*, bảo quản trong toluen.

Dung dịch polysorbat 80: Hòa tan 20 g *polysorbat 80* vào 200 ml *alcol*. Bảo quản trong tủ lạnh.

Dung dịch vitamin I: Hòa tan 10 mg *riboflavin*, 10 mg *thiamin hydrochlorid*, 100 µg *biotin* và 20 mg *niacin* trong vừa đủ 400 ml *dung dịch acid acetic 0,02 N*. Bảo quản trong toluen, tránh ánh sáng, trong tủ lạnh.

Dung dịch vitamin II: Hòa tan 20 mg *acid para-aminobenzoic*, 10 mg *calci pantothenat*, 40 mg *pyridoxal hydrochlorid*, 40 mg *pyridoxin hydrochlorid*, 8 mg *pyridoxamin dihydrochlorid* và 2 mg *acid folic* trong vừa đủ 400 ml *dung dịch ethanol trung tính loãng (1 trong 4)*. Bảo quản tránh ánh sáng, trong tủ lạnh.

Pha chế môi trường

Hòa tan hoàn toàn cystin và tryptophan vào 10 ml *dung dịch acid hydrochloric 1 N (TT)*, thêm 8 dung dịch đã chuẩn bị ở trên (trừ dung dịch polysorbat 80) trộn đều, tiếp tục thêm 100 ml *nước để pha tiêm*, hòa tan dextrose, natri acetat, acid ascorbic vào dung dịch này. Lọc nếu cần. Thêm dung dịch polysorbat 80, khuấy đều, điều chỉnh pH môi trường từ 5,5 đến 6,0 bằng *dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT)*, thêm *nước để pha tiêm* vừa đủ 250 ml.

Có thể sử dụng môi trường ở dạng bột khô có thành phần như trên. Chế tạo môi trường theo hướng dẫn ghi trên nhãn.

Môi trường pha loãng

Pha loãng Môi trường định lượng bằng một lượng *nước để pha tiêm* tương đương sẽ thu được Môi trường pha loãng. Đong vào mỗi ống thủy tinh 10 ml môi trường vừa pha, hấp tiệt khuẩn. Làm lạnh ngay sau khi hấp.

Nước ép cà chua

Ly tâm nước ép cà chua để loại bỏ hết phần thịt quả, lấy phần dung dịch. Hòa 5 g chất trợ lọc vào 1 L dung dịch trên thu được hỗn dịch. Lọc dưới áp suất giảm đến khi thu được dung dịch có màu nâu tây trong suốt. Bảo quản trong toluen, trong tủ lạnh.

Môi trường nuôi cấy chủng

Thành phần:

Cao nấm men tan trong <i>nước để pha tiêm</i>	0,75 g
Pepton khô	0,75 g
Dextrose khan	1,0 g
Kali dihydrophosphat	0,2 g
Nước ép cà chua	10 ml
Polysorbat 80	1 ml

Cách tiến hành: Hòa tan cao nấm men, pepton, dextrose khan, kali dihydrophosphat trong 60 ml đến 70 ml nước để pha tiêm, tiếp tục thêm 10 ml nước ép cà chua và 1 ml polysorbat 80, điều chỉnh pH dung dịch về 6,8 bằng dung dịch natri hydroxyd 1 N (TT). Thêm nước để pha tiêm vừa đủ 100 ml. Đóng vào ống nghiệm mỗi ống 10 ml môi trường. Hấp tiệt trùng ở 121 °C trong 15 min. Làm lạnh ngay sau khi hấp.

Có thể sử dụng môi trường có thành phần như trên ở dạng bột đông khô. Chế tạo môi trường theo hướng dẫn ghi trên nhãn.

Chủng gốc

Thêm 1,0 g đến 1,5 g thạch vào 100 ml môi trường nuôi cấy chủng, trộn đều, đun trong cách thủy đến khi thạch tan hoàn toàn, đóng vào mỗi ống nghiệm thủy tinh 10 ml môi trường. Hấp ở 121 °C trong 15 min. Để nguội. Lấy ít nhất 3 ống môi trường, cấy vào mỗi ống một quai cấy hỗn dịch *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 gốc thuần chủng. Ủ ở một nhiệt độ xác định trong khoảng từ 30 °C đến 40 °C, trong 16 h đến 24 h, duy trì nhiệt độ ổn định trong khoảng nhiệt độ lựa chọn ± 0,5 °C. Bảo quản trong tủ lạnh. Chủng sử dụng trong phép thử định lượng phải được cấy truyền không dưới 10 lần trong vòng 2 tuần.

Cấy truyền chủng ít nhất 3 lần một tuần, không sử dụng chủng đã quá 4 ngày tuổi. Hoạt tính của chủng sẽ được tăng lên khi cấy truyền hàng ngày hoặc 2 ngày 1 lần đến khi có thể quan sát sự phát triển của chủng làm đục môi trường sau 2 h đến 4 h nuôi cấy. Chủng vi sinh vật chậm phát triển khó có thể tạo ra một đường chuẩn đáp ứng thích hợp và do đó có thể dẫn đến kết quả bất thường.

Hỗn dịch chủng làm việc

Chuẩn bị 2 ống chứa 10 ml môi trường nuôi cấy chủng đã chuẩn bị ở trên, cấy một quai cấy hỗn dịch chủng *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 gốc vào mỗi ống. Ủ ở một nhiệt độ xác định trong khoảng từ 30 °C đến 40 °C, trong 16 h đến 24 h, duy trì nhiệt độ ổn định trong khoảng nhiệt độ lựa chọn ± 0,5 °C. Trong điều kiện vô trùng, ly tâm, lấy cần vi khuẩn, loại bỏ dịch nổi. Hòa cần vào 5 ml môi trường pha loãng, gộp hỗn dịch từ 2 ống thu được hỗn dịch chủng gốc, pha loãng hỗn dịch chủng gốc bằng môi trường pha loãng sao cho khi pha loãng hỗn dịch này với tỷ lệ 1 : 20 bằng nước muối sinh lý vô khuẩn để thu được hỗn dịch có độ truyền qua 70 % khi đo quang ở 530 nm, cuvet 10 mm, mẫu trắng là nước muối sinh lý vô khuẩn. Pha loãng hỗn dịch chủng gốc bằng môi trường định lượng tỷ lệ 1 : 400 thu được hỗn dịch chủng làm việc. **Chú ý:** Độ đục của hỗn dịch chủng làm việc có thể thay đổi nhằm tạo được sự đáp ứng mong muốn.

Hỗn dịch chủng đông lạnh *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 có thể thay thế cho chủng gốc *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830.

Cách tiến hành

Dụng cụ thử nghiệm được rửa sạch bằng các chất tẩy rửa và phương pháp thích hợp. Sấy ở 250 °C trong 2 h để phân hủy dư lượng vitamin B₁₂.

Dung dịch thử: Lấy một lượng thích hợp số đơn vị đóng gói, làm đồng nhất mẫu với mỗi g hoặc ml. Cân chính xác một lượng chế phẩm thích hợp vào bình nón, thêm 25 ml dung dịch đệm, lắc đều. Hấp hỗn dịch trên trong nồi hấp ở 121 °C trong 10 min. Lấy ra, để nguội, chuyển toàn bộ dịch hấp sang bình định mức dung tích 200 ml, thêm nước để pha tiêm vừa đủ đến vạch. Ly tâm hoặc lọc, thu được dịch lọc trong. Tiếp tục pha loãng dịch lọc với nước để pha tiêm để được dung dịch thử làm việc có nồng độ tương tự dung dịch chuẩn.

Dung dịch chuẩn cyanocobalamin gốc: Hòa tan cyanocobalamin chuẩn trong alcol 25 % để được dung dịch có nồng độ 1 µg/ml. Bảo quản trong tủ lạnh.

Dung dịch chuẩn cyanocobalamin làm việc: Lấy chính xác một lượng thích hợp dung dịch chuẩn cyanocobalamin gốc, pha loãng bằng nước để pha tiêm để thu được dung dịch chuẩn cyanocobalamin làm việc có nồng độ 0,01 ng đến 0,04 ng/ml.

Cách tiến hành:

Cho vào mỗi ống nghiệm 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 5,0 ml dung dịch chuẩn cyanocobalamin làm việc. Thêm nước để pha tiêm vừa đủ 5,0 ml. Thêm vào mỗi ống nghiệm 5,0 ml môi trường định lượng. Mỗi nồng độ làm lặp lại 2 ống.

Cho vào mỗi ống nghiệm khác 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dung dịch thử làm việc. Thêm nước để pha tiêm vừa đủ 5,0 ml. Thêm vào mỗi ống nghiệm 5,0 ml môi trường định lượng. Mỗi nồng độ làm lặp lại hai ống.

Cho vào 4 ống trắng, mỗi ống 5,0 ml nước để pha tiêm và 5,0 ml môi trường định lượng.

Đậy nắp ống nghiệm để tránh nhiễm khuẩn. Hấp tiệt trùng các ống nghiệm trên ở 121 °C trong 5 min, có thể hấp thời gian dài hơn tuy nhiên không được quá 10 min, sau khi hấp xong làm lạnh ngay.

Trong điều kiện vô trùng, cấy vào mỗi ống 500 µl hỗn dịch chủng làm việc trừ hai ống trắng “không cấy chủng”. Ủ ở một nhiệt độ xác định trong khoảng từ 30 °C đến 40 °C, trong 16 h đến 24 h, duy trì nhiệt độ ổn định trong khoảng nhiệt độ lựa chọn ± 0,5 °C. Sau thời gian nuôi cấy, làm ngừng sự phát triển của vi khuẩn bằng cách nhúng các ống nghiệm trong nước để pha tiêm nóng không dưới 80 °C trong 5 min. Để nguội đến nhiệt độ phòng.

Lắc đều ống thử nghiệm. Để yên hỗn dịch thử nghiệm trong một khoảng thời gian nhất định đến khi giá trị độ truyền qua dao động ít nhất. Đo độ truyền qua của ống trắng “cây chủng” với mẫu trắng là ống trắng “không cấy chủng” ở bước sóng 530 nm, cuvet 10 mm. Nếu độ truyền qua của hai ống trắng này khác nhau quá 5 % hoặc có dấu hiệu chủng bị nhiễm thì phải loại bỏ phép thử. Tiếp tục đo

độ truyền qua của các ống nghiệm chứa dung dịch chuẩn và dung dịch thử với mẫu trắng là ống trắng “không cấy chủng”. Chú ý thời gian đo độ truyền qua của các hỗn dịch thử nghiệm phải như nhau.

Tính kết quả

Xây dựng đường đáp ứng của dung dịch chuẩn theo quy trình dưới đây:

Kiểm tra các giá trị độ truyền qua và loại bỏ những giá trị sai số thô.

Đối với mỗi mức liều của chuẩn, tính tổng các giá trị độ truyền qua của hai ống lặp lại (Σ), giá trị y được tính như sau: $y = 2,00 - \Sigma$.

Thiết lập đồ thị với trục tung là giá trị y , trục hoành là logarit số ml của dung dịch cyanocobalamin chuẩn. Có thể sử dụng trục hoành theo thang số học hay logarit để thu được đường đáp ứng phù hợp. Vẽ đường chuẩn tương đối phù hợp nhất với các điểm trên đồ thị.

Tính $y = 2,00 - \Sigma$ đối với mẫu thử tương tự như cách tính y đối với mẫu chuẩn. Từ đồ thị đọc giá trị logarit của thể tích dung dịch chuẩn tương ứng với mỗi giá trị y , loại bỏ các giá trị y nằm ngoài khoảng xác định của giá trị chuẩn (khoảng từ giá trị nhỏ nhất đến giá trị lớn nhất của chuẩn). Đối với mỗi mức liều, giá trị x là hiệu của giá trị logarit vừa đọc được và giá trị logarit số ml của dung dịch chuẩn tương ứng. Tính trung bình ít nhất ba giá trị x trở lên thu được $x_{tb} = M'$.

Xác định giá trị M bằng công thức:

$$M = M' + \lg R$$

Tính hoạt lực cyanocobalamin của mẫu thử bằng công thức:

$$\text{antilog } M = \text{antilog } (M' + \lg R)$$

Trong đó:

R là hoạt lực giá định của cyanocobalamin trong mẫu thử ban đầu.

Tiến hành lặp lại phép thử ít nhất một lần, sử dụng dung dịch thử độc lập. Nếu giá trị M giữa hai lần thử sai khác nhau không quá 0,08 thì giá trị trung bình M_{tb} chính là hàm lượng của cyanocobalamin trong mẫu thử. Nếu giá trị M giữa hai lần thử sai khác nhau quá 0,08, tiến hành thêm một hoặc nhiều phép thử nữa. Tính giá trị trung bình M_{tb} từ các giá trị M khác nhau không quá 0,15 là hoạt lực của cyanocobalamin trong mẫu thử.