

10.10 ĐỊNH LƯỢNG VITAMIN A

Hoạt lực của vitamin A được tính theo đơn vị quốc tế (ký hiệu IU). 1 IU vitamin A tương đương với 0,300 µg retinol; 0,344 µg retinyl acetat; 0,359 µg retinyl propionat hoặc 0,550 µg retinyl palmitat.

Tiến hành định lượng nhanh nhất có thể trong điều kiện tránh ánh sáng, không khí và các chất oxy hóa, các chất xúc tác sự oxy hóa (như đồng, sắt), acid và tránh đun nóng (với vitamin A có nguồn gốc tự nhiên), tránh đun nóng kéo dài với retinol tổng hợp đậm đặc dạng bột và dạng dầu. Sử dụng các dung dịch mới pha.

Tùy theo đặc điểm của vitamin A trong các thuốc và nguyên liệu làm thuốc mà áp dụng 1 trong 5 phương pháp dưới đây để định lượng.

Phương pháp 1

(*Phương pháp đo quang trực tiếp*)

Có thể áp dụng đối với nguyên liệu là các ester của retinol đậm đặc dạng dầu với hàm lượng lớn (≥ 5000 IU/g).

Cân chính xác đến 0,1 % (so với lượng cân) khoảng từ 25 mg đến 100 mg chế phẩm và đem hòa tan trong 5 ml pentan (TT), pha loãng bằng 2-propanol (TT₁) để được dung dịch chứa chính xác khoảng 10 IU đến 15 IU vitamin A trong 1 ml.

Xác định độ hấp thụ cực đại của dung dịch đo, nếu cực đại hấp thụ nằm trong khoảng bước sóng từ 325 nm đến 327 nm thì đo độ hấp thụ của dung dịch tại các bước sóng 300 nm, 326 nm, 350 nm và 370 nm trong cốc đo dày 1 cm, dùng 2-propanol (TT₁) làm mẫu trắng, đo 2 lần lấy giá trị trung bình làm kết quả đo. Tính tỷ lệ độ hấp thụ tại mỗi bước sóng so với độ hấp thụ tại bước sóng 326 nm (A_λ/A_{326}).

Nếu tỷ lệ A_λ/A_{326} không lớn hơn các giá trị ghi dưới đây:

0,60 ở $\lambda = 300$ nm

0,54 ở $\lambda = 350$ nm

0,14 ở $\lambda = 370$ nm

thì tính kết quả hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) theo công thức:

$$\frac{A_{326} \times V \times 1900}{100 \times m}$$

Trong đó:

A_{326} là độ hấp thụ tại bước sóng 326 nm;

m là lượng chế phẩm đem thử (g);

V là lượng thể tích dung dịch thu được sau khi pha loãng đến nồng độ 10 IU/ml đến 15 IU/ml để đem đo (ml);

1900 là hệ số chuyển đổi độ hấp thụ riêng của ester retinol thành IU/g.

Nếu cực đại hấp thụ nằm ngoài dải sóng từ 325 nm đến 327 nm hoặc có một giá trị A_λ/A_{326} lớn hơn giá trị quy định thì kết quả không có giá trị, tiến hành định lượng theo phương pháp 4.

Phương pháp 2

(*Phương pháp đo quang sau khi chiết tách vitamin A*)

Có thể áp dụng cho các nguyên liệu vitamin A có nguồn gốc tự nhiên và đa số các dạng thuốc chứa vitamin A: Thuốc nang, viên nén, thuốc bột, thuốc mỡ, dầu gan cá...

Lấy một lượng chế phẩm chứa khoảng 50.000 IU vitamin A vào bình nút mài, thêm 3 ml dung dịch kali hydroxyd (TT) 50 % mới pha, 30 ml ethanol (TT), đun sôi 30 min trên cách thủy có lắp ống sinh hàn hồi lưu, dưới dòng khí nitrogen không có oxygen. Làm nguội nhanh rồi dùng 30 ml nước cất chuyển hết hỗn hợp sang bình gạn. Chiết 4 lần mỗi lần với 50 ml ether (TT) và bỏ lớp dưới khi tách lớp hoàn toàn. Tập trung dịch chiết lại rồi rửa dịch chiết 4 lần, mỗi lần 50 ml nước cất, (chú ý lắc rất nhẹ nhàng ở 2 lần đầu để tránh tạo thành nhũ tương). Làm bay hơi dịch chiết ether trên cách thủy dưới dòng khí nitrogen không có oxygen hoặc cất quay chân không ở nhiệt độ không quá 30 °C đến hết dung môi. Hòa tan cặn trong một lượng 2-propanol (TT) vừa đủ để thu được dung dịch chứa 10 IU đến 15 IU vitamin A trong 1 ml. Đo độ hấp thụ của dung dịch thu được ở các bước sóng 300 nm, 310 nm, 325 nm, và 334 nm trong cốc dày 1 cm với mẫu trắng là 2-propanol (TT), sau đó xác định bước sóng có hấp thụ cực đại.

Nếu cực đại hấp thụ nằm trong khoảng 323 nm đến 327 nm và tỷ lệ $A_{300}/A_{325} \leq 0,73$ thì kết quả được tính như sau:

Tính độ hấp thụ hiệu chỉnh $A_{325(K)}$:

$$A_{325(K)} = 6,815A_{325} - 2,555A_{310} - 4,260A_{334}$$

Nếu $A_{325(K)}/A_{325} \geq 0,970$ thì tính kết quả hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) theo công thức sau:

$$A_{325} \times \frac{1830}{100m} \times V$$

Nếu $A_{325(K)}/A_{325} < 0,970$ thì tính kết quả hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) theo công thức sau:

$$A_{325(K)} \times \frac{1830}{100m} \times V$$

Trong đó:

A_{325} là độ hấp thụ quang tại bước sóng 325nm;

m là lượng chế phẩm đem thử (g);

V là lượng thể tích dung dịch thu được sau khi hòa tan cặn đến nồng độ 10 IU đến 15 IU vitamin A để đem đo (ml); 1830 là hệ số chuyển đổi độ hấp thụ riêng của ester retinol thành IU.

Nếu cực đại hấp thụ nằm ngoài khoảng 323 nm đến 327 nm hoặc tỷ lệ $A_{300}/A_{325} > 0,73$ thì phải tiến hành theo phương pháp 5.

Chú ý

Trong cách tiến hành của phương pháp 2 nếu chế phẩm ở dạng thuốc nang, viên nén hoặc dạng bào chế thể rắn khác, sau khi đã bỏ vỏ, nghiền thành bột mà vẫn không xà phòng hóa được (do ở dạng vi nang) thì phải xử lý trước bằng

cách đun nóng với 10 ml nước cất trên cách thủy 5 min, dùng đũa thủy tinh nghiền nhỏ các chất rắn còn lại và giữ nóng 5 min nữa.

Khi tiến hành xà phòng hóa, nếu không có khí nitrogen có thể thay thế bằng cách cho chất chống oxy hóa vào bình phản ứng như 3 ml dung dịch hydroquinon 1 % trong ethanol, hoặc 30 mg BHT [butyl hydroxytoluen (TT)].

Để chiết vitamin A có thể thay ether (TT) bằng ether dầu hỏa (TT) hoặc n-hexan (TT).

Phương pháp 3

(Phương pháp sắc ký lỏng trực tiếp)

Có thể áp dụng đối với các nguyên liệu vitamin A tổng hợp, các thành phẩm chứa vitamin A tổng hợp mà trong thành phần chỉ chứa vitamin A ở một dạng ester đồng nhất hoặc dạng retinol.

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - ethyl acetat - nước (90 : 7 : 3).

Dung dịch thử: Lấy chính xác một lượng chế phẩm có chứa khoảng 4000 IU vitamin A cho vào bình định mức dung tích 100 ml, thêm ethanol (TT), lắc kỹ rồi thêm ethanol (TT) đến định mức, lắc đều, lọc.

Dung dịch chuẩn: Pha chất chuẩn vitamin A (dạng giống với dung dịch thử: retinol, retinyl acetat, retinyl palmitat,...) trong ethanol (TT) để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ vitamin A chính xác khoảng 40 IU/ml.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 μm đến 10 μm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 325 nm.

Tốc độ dòng: 1,5 ml/min đến 2,0 ml/min.

Thể tích tiêm: 20 μl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống sắc ký: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của diện tích pic thu được trên sắc ký đồ của 6 lần tiêm lặp lại mẫu chuẩn không được lớn hơn 2,0 %.

Tiến hành sắc ký lần lượt với dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

Cách tính kết quả:

Hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) được tính theo công thức:

$$\frac{S_T \times C \times 100}{S_C \times m_T} \text{ (IU/g)}$$

Trong đó:

S_T và S_C là diện tích của pic vitamin A trên sắc ký đồ của thử và chuẩn;

m_T là lượng cân mẫu thử (g);

C là nồng độ vitamin A trong dung dịch chuẩn (IU/ml).

Chú ý

Trong việc chuẩn bị dung dịch thử, nếu chế phẩm ở dạng thuốc nang, viên nén hoặc dạng bào chế thể rắn khác, sau khi bỏ vỏ, nghiền thành bột, mà vitamin A vẫn không hòa tan được trong ethanol (do ở dạng vi nang) thì phải xử lý

trước bằng cách đun nóng với 10 ml nước cất trên cách thủy 5 min, dùng đũa thủy tinh nghiền nhỏ các khối rắn còn lại và giữ nóng thêm 5 min nữa rồi mới cho ethanol vào để hòa tan.

Nếu mẫu thử có nhiều tá dược dạng dầu thì nên thêm 2 ml ethyl acetat (TT) hoặc 2 ml n-hexan (TT) và lắc kỹ trước khi cho ethanol vào để hòa tan.

Nếu trên sắc đồ thu được ngoài pic của dạng vitamin A cần đo còn có pic của dạng vitamin A khác thì phải tiến hành theo phương pháp 2 hoặc 5.

Phương pháp 4

(Phương pháp sắc ký lỏng sau khi thủy phân)

Có thể áp dụng đối với nguyên liệu vitamin A tổng hợp dạng bột, dạng dầu và dạng nhũ tương.

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - nước (95 : 5).

Dung dịch thử (1):

Đối với nguyên liệu dạng bột: Cân 0,200 g chế phẩm vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 20 mg đến 30 mg bromelain (TT), 5,0 ml nước và 0,15 ml 2-propanol (TT).

Đun trong cách thủy ở 60 °C đến 65 °C trong 5 min và thỉnh thoảng khuấy. Thêm 40 ml dung dịch tetrabutylamoni hydroxyd 0,1 M trong 2-propanol (TT). Khuấy nhẹ và để thủy phân trong cách thủy ở 60 °C đến 65 °C trong 10 min, thỉnh thoảng khuấy.

Đảm bảo chế phẩm được làm ướt hoàn toàn. Để nguội đến nhiệt độ phòng rồi pha loãng thành 100,0 ml bằng 2-propanol (TT) có chứa 0,1 % butyl hydroxytoluen (TT). Lắc đều cẩn thận tránh tạo bọt khí.

Dung dịch có thể vẫn đục.

Đối với nguyên liệu dạng dầu hoặc nhũ tương: Cân 0,100 g chế phẩm vào bình định mức 100 ml. Hòa tan ngay trong 5 ml pentan (TT). Thêm 40 ml dung dịch tetrabutylamoni hydroxyd 0,1 M trong 2-propanol. Khuấy nhẹ và để thủy phân trong cách thủy ở 60 °C đến 65 °C trong 10 min, thỉnh thoảng khuấy nhẹ.

Để nguội đến nhiệt độ phòng, rồi pha loãng thành 100,0 ml bằng 2-propanol (TT) có chứa 0,1 % butyl hydroxytoluen (TT). Lắc cẩn thận tránh tạo bọt khí.

Dung dịch thử (2): Pha loãng dung dịch thử (1) bằng 2-propanol (TT) để thu được dung dịch có nồng độ 100 IU/ml.

Lọc trước khi tiêm đối với dung dịch thử được chuẩn bị từ nguyên liệu dạng bột.

Dung dịch chuẩn (1): Cân chính xác 0,100 g retinyl acetat chuẩn (hàm lượng khoảng 1.000.000 IU/g) vào bình định mức 100 ml và tiến hành như dung dịch thử (1) đối với nguyên liệu dạng dầu hoặc nhũ tương.

Dung dịch chuẩn (2): Pha loãng 5,0 ml dung dịch chuẩn (1) thành 50,0 ml bằng 2-propanol (TT). Lắc cẩn thận tránh tạo bọt khí.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (12,5 cm × 4 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 μm).

Cột kích thước (12,5 cm × 4 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 μm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 325 nm.

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Thể tích tiêm: 10 µl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký dung dịch thử (2) và dung dịch chuẩn (2) với thời gian gấp 1,5 lần thời gian lưu của retinol.

Thời gian lưu của retinol khoảng 3 min.

Cách tính kết quả:

Hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) được tính theo công thức:

$$\frac{S_T \times C \times m_C \times F}{S_C \times m_T \times 1000}$$

Trong đó:

S_T, S_C là diện tích pic của retinol trên sắc đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn;

m_C, m_T là lượng cân mẫu chuẩn, thử (mg);

C là hàm lượng retinyl acetat chuẩn được xác định theo phương pháp 1 (IU/g);

F là độ pha loãng của dung dịch thử.

Phương pháp 5

(Phương pháp sắc ký lỏng sau khi chiết tách vitamin A)

Có thể áp dụng đối với các chế phẩm phức tạp và có chứa vitamin A với hàm lượng thấp không thực hiện được 1 trong 4 phương pháp trên.

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3).

Pha động: Methanol - nước (97 : 3).

Dung dịch thử: Lấy một lượng chế phẩm chứa khoảng 2000 IU vitamin A vào bình cầu nút mài, thêm 5 ml dung dịch acid ascorbic (TT) 10 % mới pha và 10 ml dung dịch kali hydroxyd (TT) 80 % mới pha, 100 ml ethanol 96 % (TT), đun sôi 15 min trên cách thủy có lắp ống sinh hàn hồi lưu, thêm 100 ml dung dịch natri clorid (TT) 1 % và để nguội. Chuyển dung dịch vào bình chiết dung tích 500 ml, tráng rửa bình nút mài bằng 75 ml dung dịch natri clorid (TT) 1 % và rửa tiếp với 150 ml dung dịch đồng thể tích ether dầu hòa (40 °C đến 60 °C) và ether (TT), chuyển hết dịch tráng rửa vào bình chiết ở trên. Lắc 1 min, khi tách lớp hoàn toàn, bỏ lớp dưới, rửa lớp trên lần đầu với 50 ml dung dịch kali hydroxyd (TT) 3 % trong dung dịch 10 % (t/t) ethanol 96 % (TT), sau đó rửa 3 lần, mỗi lần với 50 ml dung dịch natri clorid (TT) 1 %. Lọc nhanh lớp trên qua giấy lọc có chứa 5 g natri sulfat khan (TT) vào bình cầu 250 ml thích hợp để lắp vào dụng cụ cất quay. Rửa bình chiết bằng 10 ml hỗn hợp dung môi dùng để chiết mới pha [dung dịch đồng thể tích ether dầu hòa (40 °C đến 60 °C) và ether (TT)], lọc và gộp các dịch lọc lại. Cất quay ở nhiệt độ không quá 30 °C dưới áp suất giảm (đuổi nước) và đóng đầy với khí nitrogen khi bay hơi xong. Hoặc có thể bay hơi dung môi dưới luồng khí nitrogen ở nhiệt độ không quá 30 °C. Hòa tan cần trong 2-propanol (TT) và chuyển vào bình định mức 25 ml, pha loãng thành 25 ml với cùng dung môi, đun nóng nhẹ hay siêu âm nếu cần.

Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan retinyl acetat chuẩn trong 2-propanol (TT₁) để thu được dung dịch có nồng độ khoảng 1000 IU vitamin A trong 1 ml. Nồng độ chính xác của dung dịch chuẩn gốc được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (Phụ lục 4.1). Pha loãng dung dịch chuẩn gốc bằng 2-propanol (TT₁) tới nồng độ 10 đến 15 IU trong 1 ml rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 326 nm trong cốc đo dày 1 cm, dùng 2-propanol (TT₁) làm mẫu trắng.

Tính nồng độ vitamin A trong dung dịch chuẩn gốc (IU/ml) tính theo retinyl acetat theo công thức:

$$A_{326} \times \frac{1900 \times V_2}{100 \times V_1}$$

Trong đó:

A₃₂₆ là độ hấp thụ quang của dung dịch ở 326 nm;

V₁ là thể tích dung dịch chuẩn gốc đem pha loãng (ml);

V₂ là thể tích dung dịch loãng đã pha (ml);

1900 là hệ số chuyển đổi độ hấp thụ riêng của ester retinol thành IU.

Dung dịch chuẩn: Lấy chính xác 2 ml dung dịch chuẩn gốc đem xử lý hoàn toàn như mẫu thử. Xác định nồng độ chính xác của dung dịch chuẩn bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến (Phụ lục 4.1). Pha loãng dung dịch chuẩn bằng 2-propanol (TT₁) tới nồng độ 10 IU đến 15 IU trong 1 ml rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 325 nm trong cốc đo dày 1 cm, dùng 2-propanol (TT₁) làm mẫu trắng.

Tính nồng độ all-trans-retinol trong dung dịch chuẩn (IU/ml) theo công thức:

$$A_{325} \times \frac{1830 \times V_4}{100 \times V_3}$$

Trong đó:

A₃₂₅ là độ hấp thụ của dung dịch ở 325 nm;

V₃ là thể tích dung dịch chuẩn đem pha loãng (ml);

V₄ là thể tích dung dịch đã pha loãng (ml);

1830 là hệ số chuyển đổi độ hấp thụ riêng của all-trans-retinol thành IU.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4 mm) được nhồi pha tinh C (5 đến 10 µm).

Tốc độ dòng: 1 ml/min.

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 325 nm.

Thể tích tiêm: 10 µl.

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký 3 lần với mỗi dung dịch thử và dung dịch chuẩn.

Thời gian lưu của all-trans-retinol khoảng (5 ± 1) min.

Kết quả được chấp nhận nếu đáp ứng các yêu cầu sau:

Trên sắc ký đồ của dung dịch thử có pic tương ứng với pic của all-trans-retinol trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

Khi dùng phương pháp thêm chuẩn vào dung dịch thử thì phần trăm thu hồi retinol acetat chuẩn phải lớn hơn 95 % và phần trăm thu hồi all-trans-retinol trong dung dịch

chuẩn được xác định bằng phương pháp đo quang phải lớn hơn 95 % so với nồng độ tính từ dung dịch chuẩn gốc.

Tính kết quả:

Hàm lượng vitamin A trong mẫu thử (IU/g) được tính theo công thức:

$$S_1 \times \frac{C \times V}{S_2} \times \frac{1}{m}$$

Trong đó:

S₁ là diện tích pic của all-*trans*-retinol trên sắc đồ của dung dịch thử;

S₂ là diện tích pic của all-*trans*-retinol trên sắc đồ của dung dịch chuẩn;

C là nồng độ retinyl acetat trong dung dịch chuẩn gốc (IU/ml);

m là lượng chế phẩm đem xử lý thành dung dịch thử (g);

V là thể tích dung dịch chuẩn gốc đã đem xử lý (ml).

10.11 PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ACID AMIN

Phương pháp phân tích acid amin là phương pháp xác định thành phần và hàm lượng các acid amin trong các protein và peptid, cũng như trong các chế phẩm thuốc. Phương pháp phân tích acid amin được áp dụng để định tính và định lượng các protein và peptid dựa trên các cấu tử acid amin tạo ra chúng, để giúp việc xác định cấu trúc của các protein và peptid cũng như việc xác định cách phân đoạn của chúng nhằm thiết lập giản đồ peptid và để phát hiện các acid amin không điển hình có thể có mặt trong một protein hoặc peptid.

Trước khi phân tích acid amin trong protein hoặc peptid, cần thiết phải thủy phân protein hoặc peptid thành các acid amin. Sau đó tiến hành phân tách các acid amin thu được giống như khi ta phân tách các acid amin tự do có trong các chế phẩm thuốc. Điều quan trọng là chúng phải được biến đổi thành các dẫn chất thích hợp cho việc phân tách và phát hiện.

Thiết bị

Các phương pháp để phân tích acid amin thường dựa trên việc tách các acid amin có trong mẫu thử bằng phương pháp sắc ký. Các thiết bị sắc ký tự động thường chiếm lợi thế. Thiết bị phân tích acid amin điển hình là một máy sắc ký lỏng áp suất thấp hoặc áp suất cao, có khả năng thực hiện chương trình dung môi để tách các acid amin khi qua cột sắc ký. Máy cần có thêm thiết bị tạo dẫn chất acid amin sau cột, trừ khi mẫu thử được tạo thành dẫn chất trước cột. Để phát hiện kết quả, thường dùng detector hấp thụ tử ngoại - khả kiến hoặc detector huỳnh quang, tùy thuộc vào cách tạo dẫn chất đã áp dụng. Một thiết bị tích phân cho phép chuyển đổi tín hiệu tương tự đi từ detector ra và cho phép định lượng.

Thường sử dụng các máy chuyên dụng để phân tích acid amin.

Chú ý

Nhiều đường nền luôn là mối quan tâm của người tiến hành phân tích acid amin. Để khắc phục, phải dùng các

thuốc thử có độ tinh khiết cao (ví dụ acid hydrocloric có độ tinh khiết thấp có thể gây nhiễm glycin). Thông thường cách một vài tuần lại phải thay mới các thuốc thử. Chỉ dùng các dung môi dùng cho sắc ký lỏng. Lọc lại các dung môi trước khi dùng để giảm thiểu sự nhiễm khuẩn và các tạp chất. Đậy kín các bình đựng dung môi. Không để các thiết bị phân tích acid amin tiếp xúc trực tiếp với tia sáng mặt trời.

Chất lượng thực hành phòng thí nghiệm có thể quyết định chất lượng phân tích acid amin. Giữ phòng thí nghiệm sạch sẽ. Đặt thiết bị phân tích trong phòng thí nghiệm tại chỗ riêng biệt, ít bị ảnh hưởng của các hoạt động khác. Định kỳ rửa sạch và chuẩn hóa lại các pipet. Bảo quản đầu pipet trong hộp đậy kín. Không được cầm đầu pipet bằng tay trần, phải mang găng tay bằng cao su không xoa bột talc hoặc loại khác có chất lượng tương đương. Hạn chế số lần mở và đóng bình đựng mẫu thử vì bụi có thể làm gia tăng kết quả về hàm lượng các chất glycin, serin và alanin. Cần bảo dưỡng tốt thiết bị phân tích acid amin để có kết quả chấp nhận được. Nếu thiết bị được dùng thường ngày thì hàng ngày phải kiểm tra độ rò rỉ dung môi của thiết bị, độ ổn định của đèn và detector, độ phân giải của cột.

Định kỳ làm sạch hoặc thay thế các kính lọc của thiết bị và các linh phụ kiện cần bảo dưỡng khác.

Các chất đối chiếu

Trên thị trường có sẵn các acid amin chuẩn để dùng trong phân tích acid amin; chúng thường là dung dịch hỗn hợp các acid amin chuẩn trong nước. Khi cần xác định thành phần acid amin trong một mẫu thử, các protein hoặc peptid chuẩn phải được phân tích song song với mẫu thử để kiểm tra sự toàn vẹn của thử nghiệm. Trong trường hợp này, chuẩn protein được sử dụng là albumin huyết thanh bò tinh khiết cao.

Chuẩn hóa thiết bị

Việc chuẩn hóa thiết bị phân tích acid amin được thực hiện bằng cách phân tích một chuẩn acid amin, gồm hỗn hợp các acid amin chuẩn đã biết trước hàm lượng của từng chất, để xác định hệ số đáp ứng và khoảng tuyến tính ứng với mỗi một acid amin chuẩn đã thử.

Pha loãng mẫu chuẩn acid amin thành nhiều dung dịch có nồng độ khác nhau, nằm trong khoảng tuyến tính dự đoán trước của các acid amin có trong mẫu chuẩn. Tiến hành phân tích nhiều lần với mỗi nồng độ. Biểu thị kết quả thu được trên biểu đồ thể hiện tương quan giữa diện tích pic thu được ứng với mỗi nồng độ của acid amin đã thử. Nhờ biểu đồ này, có thể xác định được khoảng tuyến tính của mỗi acid amin, tại đó, các diện tích pic thu được có tương quan xấp xỉ tuyến tính với các nồng độ của các acid amin đã thử. Khi phân tích acid amin, để có kết quả đúng và lặp lại, điều quan trọng là phải pha và thử nghiệm trên các mẫu thử có nồng độ nằm trong khoảng tuyến tính tương ứng với kỹ thuật phân tích đang áp dụng.

Để xác định hệ số đáp ứng cho mỗi acid amin, ta phân tích từ 4 nồng độ đến 6 nồng độ của acid amin chuẩn tương