

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 11494:2016**

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM CHỨC NĂNG -  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG LYCOPEN -  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Dietary supplements -  
Determination of lycopene - High-performance liquid chromatography method*

**HÀ NỘI - 2016**

## Lời nói đầu

TCVN 11494:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2009.04 *Lycopene in dietary supplements and raw materials. High-performance liquid chromatography*;

TCVN 11494 :2016 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn*, 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 lycopene - Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

*Dietary supplements - Determination of lycopene - High-performance  
liquid chromatography method*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao để xác định all-*trans*-lycopen và lycopen tổng số trong thực phẩm chức năng.

Giới hạn định lượng đối với all-*trans*-lycopen và các đồng phân *cis* trong thực phẩm chức năng dạng viên nén, viên nang tối thiểu 0,1 mg và lycopen dạng nguyên liệu phân tán trong nước hoặc trong dầu khi có mặt các carotenoid khác như  $\beta$ -caroten,  $\alpha$ -caroten và xanthophyll lớn hơn 0,2 %.

### 2 Thuật ngữ, định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

#### 2.1

##### Lycopen tổng số (total lycopene)

Bao gồm all-*trans*-lycopen và các đồng phân *cis* chính là 5 *cis*-lycopen, 9 *cis*-lycopen, 13 *cis*-lycopen và 15 *cis*-lycopen.

### 3 Nguyên tắc

Các dạng phân tán trong nước như: bột, dạng nhũ hóa, viên nén hoặc viên nang được phân hủy bằng protease, sau đó được chiết với diclometan và etanol ra khỏi pha nước không có đệm hoặc dung dịch đệm phosphat kiềm tính. Các huyền phù trong dầu được hòa tan trực tiếp trong diclometan và etanol. Dịch chiết được chạy sắc ký trên cột HPLC, alkylamid C16 hình cầu, cỡ hạt 5  $\mu$ m, đẳng dòng, cột sẽ tách riêng các đồng phân hình học của lycopene và tách khỏi các carotenoid khác như  $\alpha$ -caroten,  $\beta$ -caroten, cryptoxanthin, lutein và zeaxanthin.

#### 4 Thuốc thử

Trong suốt quá trình phân tích, chỉ sử dụng các loại thuốc thử đạt chất lượng phân tích và chỉ sử dụng nước ít nhất là loại 3 TCVN 4851:1999 (ISO 3696:1987) *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*, trừ khi có quy định khác.

- 4.1 *n*-Hexan, độ tinh khiết tối thiểu 99 %, dùng cho sắc ký lỏng.
- 4.2 Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), độ tinh khiết tối thiểu 99,5 %, dùng cho sắc ký lỏng.
- 4.3 Metanol (CH<sub>3</sub>OH), độ tinh khiết tối thiểu 99,8 %, dùng cho sắc ký lỏng.
- 4.4 Diclometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), độ tinh khiết tối thiểu 99,5 %, dùng cho sắc ký lỏng. Dung dịch bền trong vòng 1 tháng.
- 4.5 Axetonitril, độ tinh khiết tối thiểu 99,9 %, dùng cho sắc ký lỏng
- 4.6 *N*-ethylisopropylamin, độ tinh khiết tối thiểu 98 %.
- 4.7 2-Propanol, độ tinh khiết tối thiểu 98 %.
- 4.8 Protex 6L, chế phẩm enzym protease kiềm tính có nguồn gốc từ vi khuẩn, hòa tan được trong nước.
- 4.9 Amoni axetat, độ tinh khiết tối thiểu 98 %.
- 4.10 Butylat hydroxytoluen (BHT), 2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol, độ tinh khiết tối thiểu 99 %.
- 4.11 Kali dihydrophosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), độ tinh khiết tối thiểu 99 %.
- 4.12 Natri hydroxit (NaOH), độ tinh khiết tối thiểu 98 %.
- 4.13 Axit dinatri ethylendiaminetetraaxetic (EDTA) ngậm hai phân tử nước, độ tinh khiết tối thiểu 99 %.
- 4.14 Natri dodecyl sulfat, độ tinh khiết tối thiểu 99 %.
- 4.15 Dung dịch amoni axetat, 0,2 %.

Hòa tan 0,5 g amoni axetat (4.9) trong 250 ml nước. Dung dịch bền trong vòng 1 tháng khi được bảo quản ở 5 °C.

- 4.16 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), 4 M.

Hòa tan 16 g natri hydroxit (4.12) trong 100 ml nước.

#### 4.17 Pha động

Hòa tan 50 mg BHT (4.10) trong 20 ml 2-propanol (4.7) đựng trong bình định mức 1 lít (5.10) và thêm 0,2 ml *N*-ethyl-diisopropylamin (4.6), 25 ml dung dịch amoni axetat 0,2 % (4.15), 455 ml axetonitril (4.5) và khoảng 450 ml metanol (4.3). Để hỗn hợp nguội đến thể tích không đổi. Làm ấm đến nhiệt độ phòng và thêm metanol (4.3) đến vạch. Dung dịch bền trong 2 ngày.

#### 4.18 Dung dịch chiết beadlet từ alginat

Hòa tan 68 g kali dihydrophosphat (4.11) và 10 g dinatri EDTA (4.13) ngâm hai phần tử nước đựng trong bình nón trong khoảng 900 ml nước. Thêm khoảng 18 g natri hydroxit (4.12) và siêu âm dung dịch trong 20 min cho đến khi natri hydroxit hòa tan hết. Chính pH của dung dịch đến  $8,7 \pm 0,3$  bằng natri hydroxit 4 M (4.16) và thêm nước đến 1 lít. Thêm 0,25 g natri dodecyl sulfat (4.14) và siêu âm trong 20 min (natri dodecyl sulfat không hòa tan hoàn toàn).

**4.19 Chuẩn chính (reference standard) all-*trans*-lycopen**, độ tinh khiết  $\geq 95$  %, dùng cho HPLC. Bảo quản trong nitơ ở 5 °C, nơi tối (trong tủ lạnh).

**4.20 Dung dịch chuẩn hiệu chuẩn, all-*trans*-lycopen.**

**4.20.1 Dung dịch chuẩn gốc, 60 µg/ml.**

Cân khoảng 6 mg chuẩn chính all-*trans*-lycopen (4.19), chính xác đến 0,01 mg cho vào bình định mức 100 ml (5.10). Hòa tan trong 20 ml diclometan (4.4) bằng cách xử lý 30 min trong bể siêu âm (5.3). Pha loãng đến vạch bằng diclometan (4.4).

**4.20.2 Dung dịch chuẩn làm việc, 3 µg/ml.**

Từ dung dịch chuẩn gốc (4.20.1), dùng pipet lấy 5 ml cho vào bình định mức 100 ml (5.10). Thêm *n*-hexan (4.1) đến vạch [dung dịch chuẩn làm việc all-*trans*-lycopen 3 µg/ml trong *n*-hexan-diclometan (95:5 phần thể tích)].

Bảo quản dung dịch ở 5 °C, nơi tối (tủ lạnh) và sử dụng trong ngày.

**4.21 Dung dịch kiểm soát dùng cho LC**

Hòa tan 3 mg chuẩn chính all-*trans*-lycopen (4.19) và 1 g BHT (4.10) trong 10 ml diclometan (4.4) đựng trong bình cầu đáy tròn 500 ml rồi thêm 200 ml *n*-hexan (4.1). Cho hồi lưu dung dịch 1 h ở 80 °C trong nồi cách thủy. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, chuyển dung dịch vào bình định mức 500 ml (5.10) và thêm *n*-hexan (4.1) đến vạch. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng, nơi tối, để qua đêm và phân phối vào trong các lọ dùng cho HPLC. Hàn kín lọ cẩn thận sau khi đổ đầy teflon/silycon septa và bảo quản nơi tối ở 5 °C.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

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

**5.1 Cân phân tích**, có thể đọc đến 0,01 mg, độ chính xác (SD) bằng  $\pm 0,015$  mg và có thể đọc đến 0,01 g, SD bằng  $\pm 0,005$  g.

**5.2 Máy đo quang phổ**, có thể đo trên dải bước sóng từ 190 nm đến 900 nm, chiều rộng dải phổ cố định 1,5 nm, độ chính xác của chiều dài bước sóng là 0,07 nm (ở bước sóng 541,92 nm), độ tái lập của chiều dài bước sóng là 0,01 nm.

**5.3 Bể siêu âm**, công suất 150 W, tần số 35 kHz, dung tích 4 lít.

**5.4 Máy đo pH.**

**5.5 Máy đồng hóa**, công suất 750 W.

**5.6 Xyranh**, dùng một lần, dung tích 2 ml.

**5.7 Bộ lọc**, dùng một lần, cỡ lỗ 0,45  $\mu\text{m}$ , đường kính 25 mm, dùng cho dung môi hữu cơ.

**5.8 Hệ thống HPLC gồm có:** bộ bơm bốn kênh, bộ khử khí, bộ bơm mẫu tự động có bộ phận điều chỉnh nhiệt, lò cột có bộ phận điều chỉnh nhiệt, detector mảng điốt 190 nm đến 900 nm và bộ tích phân.

**5.9 Cột HPLC**, alkylamid cỡ hạt 5  $\mu\text{m}$ , dài 250 mm, đường kính trong 4,6 mm.

**5.10 Bình định mức**, có các dung tích thích hợp.

## 6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan nên thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

Việc chuẩn bị mẫu thử phụ thuộc vào dạng vật lý của mẫu, hàm lượng lycopene được công bố và khối lượng mẫu.

**a) Khối lượng trung bình trên đơn vị mẫu**

Cân 20 viên nén hoặc viên nang và tính khối lượng trung bình,  $W_D$ . Sử dụng khối lượng trung bình để tính hàm lượng lycopene của mẫu thử, biểu thị bằng miligam trên đơn vị mẫu.

**b) Số lượng viên nén hoặc viên nang cho một phép phân tích**

Để đánh giá cỡ mẫu của ba đơn vị mẫu (viên nén hoặc viên nang) được khuyến cáo đại diện cho mẫu, tiến hành đồng thời ba phép phân tích, sử dụng tương ứng ba đơn vị mẫu và sáu đơn vị mẫu. Ghi lại các kết quả đơn lẻ. Để xác định hàm lượng lycopene tổng số trung bình, lấy hàm lượng tương đương ba viên nén hoặc ba viên nang cho mỗi phép phân tích và thực hiện đồng thời hai phép phân tích. Ghi lại kết quả trung bình của hai phép phân tích.

**c) Tiến hành chuẩn bị mẫu thử**

Đồng hóa mẫu dạng huyền phù hoặc dạng nhũ hóa bằng cách khuấy, ví dụ bằng que thủy tinh.

Nghiền nhỏ viên nén thành bột bằng cách đặt chúng trong hai tờ giấy được gấp lại rồi dùng chày để nghiền. Bóc vỏ viên nang chứa bột và chiết bột cùng với vỏ. Tiến hành tương tự đối với mẫu beadlet và viên nang chứa dịch lỏng. Mẫu beadlet được cân mà không khuấy hoặc lắc trước để tránh bị phân tách.

**8 Cách tiến hành****8.1 Độ tinh khiết****8.1.1 Độ tinh khiết của chất chuẩn khi đo quang phổ (SP)**

Đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn (4.20) so với *n*-hexan ở bước sóng khoảng 471 nm. *SP* của chất chuẩn lycopene được tính bằng Công thức (1):

$$SP = \frac{A_{std} \times 20000}{3450 \times W} \quad (1)$$

Trong đó

$A_{std}$  là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn (4.20) ở bước sóng khoảng 471 nm;

20 000 là hệ số pha loãng;

3450 là  $E_{100}^{1cm}$  của all-*trans*-lycopene tinh khiết trong hexan;

$W$  là khối lượng của chuẩn chính (4.19) được sử dụng cho dung dịch chuẩn gốc, tính bằng miligam (mg).

### 8.1.2 Độ tinh khiết của chất chuẩn khi đo sắc phổ (CP)

Bơm ít nhất bốn lần, mỗi lần 20 µl dung dịch chuẩn (4.20.2) ngay sau khi chuẩn bị vào hệ thống HPLC. CP của chất chuẩn lycopene được tính bằng Công thức (2):

$$CP = \frac{S_1}{S} \quad (2)$$

Trong đó

$S_1$  là diện tích của pic *all-trans*-lycopene;

$S$  là tổng các diện tích của tất cả các pic có liên quan.

Các pic có liên quan là tất cả các pic trên sắc đồ sắc ký lỏng hiệu năng cao ngoại trừ các pic từ dung môi.

### 8.1.3 Độ tinh khiết của chất chuẩn

a) Tính độ tinh khiết tổng thể của hàm lượng *all-trans*-lycopene của chất chuẩn bao gồm các sản phẩm phân hủy không hấp thụ ở vùng bước sóng 471 nm [được đo bằng phổ nhìn thấy (Vis-spectroscopy)] và các hợp chất không phải *all-trans*-lycopene có thể nhìn thấy được (qua màu sắc) (được phát hiện bằng HPLC, CP). Độ tinh khiết của chất chuẩn,  $P$ , tính bằng phần trăm, được tính bằng công thức (3):

$$P = SP \times CP \times 100 \quad (3)$$

Trong đó

$SP$  là độ tinh khiết của chất chuẩn khi đo quang phổ (8.1.1);

$CP$  là độ tinh khiết của chất chuẩn khi đo máy sắc ký (8.1.2);

100 là hệ số thang đo để biểu thị độ tinh khiết tính bằng phần trăm.

Độ tinh khiết của chất chuẩn tính được tối thiểu là 90 %.

b) Nồng độ của *all-trans*-lycopene trong chất chuẩn,  $C_{\text{all-trans-lycopene}}$ , tính bằng miligam trên lít (mg/l), được tính bằng Công thức (4):

$$C_{\text{all-trans-lycopene}} = W \times \frac{P}{200} \quad (4)$$

Trong đó

$W$  là khối lượng của chất chuẩn, tính bằng miligam (mg);

$P$  là độ tinh khiết, tính bằng phần trăm (%);

200 là hệ số pha loãng và chuyển đổi.



## 8.2 Tính hệ số đáp ứng (RF)

Hệ số đáp ứng của *all-trans*-lycopen từ diện tích pic trung bình,  $RF_{all-trans-lycopen}$ , tính bằng đơn vị hấp thụ nhân lít trên miligam, được tính bằng Công thức (5):

$$RF_{all-trans-lycopen} = \frac{A_{all-trans-lycopen}}{C_{all-trans-lycopen}} \quad (5)$$

Trong đó

$A_{all-trans-lycopen}$  là diện tích pic trung bình của pic *all-trans*-lycopen trong chất chuẩn và các sắc đồ (đơn vị diện tích, AU);

$C_{all-trans-lycopen}$  là nồng độ tính được của *all-trans*-lycopen trong dung dịch chuẩn, tính bằng miligam trên lít (mg/l).

## 8.3 Độ đáp ứng LC của dung dịch kiểm soát

Dung dịch kiểm soát là các dung dịch *all-trans*-lycopen đã được đồng phân hóa bởi nhiệt, bền khoảng 3 tháng khi được bảo quản 5 °C ở nơi tối. Không cần hiệu chuẩn lại hệ thống HPLC nếu RF đã được xác định trước cho thấy có giá trị khi sử dụng các dung dịch kiểm soát.

### 8.3.1 Sử dụng dung dịch kiểm soát HPLC

Đo hàm lượng lycopen tổng số ban đầu ngay sau khi chuẩn bị dung dịch kiểm soát trong quá trình hiệu chuẩn hệ thống HPLC. Bơm dung dịch kiểm soát song song với dung dịch chuẩn ít nhất 6 lần, mỗi lần 20 µl vào hệ thống HPLC. Tính hàm lượng lycopen trung bình của dung dịch kiểm soát từ sắc ký đồ, sử dụng RF tương đối đã tính được trước đó. Sau đó bơm dung dịch kiểm soát cùng với từng dãy mẫu. RF được coi là không đổi trong thời gian dài khi hàm lượng lycopen tổng số đo được của các dung dịch kiểm soát sai khác trong phạm vi + 2 % so với giá trị ban đầu; nếu không, hệ thống HPLC cần hiệu chuẩn lại. Các vấn đề về dung dịch kiểm soát cần được nêu rõ nếu mức kiểm soát nằm ngoài phạm vi, nhưng RF sau khi hiệu chuẩn lại không thay đổi. Cần chuẩn bị dung dịch kiểm soát mới.

### 8.3.2 Độ tuyến tính của độ đáp ứng LC

Dựng đường chuẩn từ các dung dịch lycopen 0,05 µg/l đến 100 µg/l trước đó có đồng phân hóa nhiệt và không đồng phân hóa nhiệt. Đối với dung dịch đồng phân hóa nhiệt, hòa tan 10 mg *all-trans*-lycopen và 100 mg BHT (4.10) vào 10 ml diclometan (4.4) đựng trong bình định mức 100 ml (5.10). Thêm 50 ml diclometan (4.4) và cho hồi lưu 2 h ở 80 °C trong nồi cách thủy. Thêm khoảng 30 ml diclometan (4.4), đưa về nhiệt độ phòng và thêm diclometan (4.4) đến vạch. Hòa tan 10 mg chất chuẩn lycopen trong diclometan đựng trong bình định mức thứ hai dung tích 100 ml. Pha loãng dung dịch này với hỗn hợp dung môi (tỉ lệ etanol:diclometan là 1:1, tính theo thể tích) theo Bảng A.1, để thu được dung dịch hiệu chuẩn tương ứng.

Bơm dung dịch vào hệ thống LC và tính hàm lượng lycopene tổng số theo Công thức (6). Đối với nồng độ *all-trans*-lycopene từ 0,1 µg/ml đến 50 µg/ml có hệ số xác định  $R^2 > 0,995$  thì độ đáp ứng phải tuyến tính và nồng độ được tính ngược lại trong phạm vi đích  $\pm 10\%$  theo lý thuyết để đường hồi quy đi qua gốc tọa độ.

#### **8.4 Chiết**

Bảo vệ chất chiết và dung dịch khỏi ánh nắng trực tiếp hoặc ánh sáng cực tím (UV).

##### **8.4.1 Dung dịch huyền phù trong dầu**

Chuẩn bị mẫu như trong Điều 7. Cân chính xác phần mẫu thử chứa khoảng 20 mg lycopene, thêm 250 mg BHT (4.10), dùng 120 ml diclometan (4.4) tráng vào bình định mức 250 ml (5.10). Thêm 100 ml etanol (4.2) và lắc. Để hỗn hợp nguội đến thể tích không đổi. Để yên nơi tối cho đến khi đạt được nhiệt độ phòng (khoảng 2 h), thêm diclometan (4.4) đến vạch và lắc mạnh. Pha loãng dịch lỏng với etanol:diclometan (1:1, tính theo thể tích) đựng trong bình định mức theo tỷ lệ 1 + 9, ví dụ từ 5 ml thành 50 ml và bơm 20 µl vào hệ thống HPLC.

##### **8.4.2 Beadlet từ gelatin và các beadlet phân tán trong nước khác hoặc các chất dạng nhũ hóa**

Chuẩn bị mẫu như trong Điều 7. Cân chính xác phần mẫu thử chứa khoảng 10 mg lycopene vào bình định mức 250 ml (5.10). Thêm 250 mg BHT (4.10), 0,5 ml Protex 6L (4.8) và 15 ml nước. Xoay bình để làm ướt lượng chứa trong bình và đặt vào bể siêu âm (5.3) ở khoảng 50 °C trong 30 min, sau khoảng 15 min, xoay bình. Thêm 100 ml etanol (4.2) vào huyền phù ẩm và lắc mạnh. Thêm 135 ml diclometan (4.4) và lắc lại. Để hỗn hợp nguội đến thể tích không đổi. Đậy nắp bình và để yên ở nơi tối cho đến khi đạt được nhiệt độ phòng (khoảng 2 h), thêm diclometan (4.4) đến vạch và lắc mạnh. Pha loãng dịch lỏng với etanol:diclometan (1:1, tính theo thể tích) trong bình định mức theo tỷ lệ 1 + 9, ví dụ từ 5 ml thành 50 ml. Lọc dung dịch qua bộ lọc (5.7), nếu cần. Bơm 20 µl vào hệ thống HPLC (5.8).

##### **8.4.3 Viên nén và viên nang chứa beadlet từ gelatin và beadlet phân tán trong nước khác có khối lượng phần mẫu thử nhỏ hơn 5 g**

Cân chính xác khối lượng phần mẫu thử của ba viên nén hoặc viên nang, được chuẩn bị như trong Điều 7, vào bình định mức 250 ml (5.10). Thêm 250 mg BHT (4.10), 0,5 ml Protex 6 L (4.8) và 15 ml nước. Xoay bình để làm ướt lượng chứa bên trong và đặt vào bể siêu âm (5.3) ở khoảng 50 °C trong 30 min, khuấy khoảng 15 min. Thêm 100 ml etanol (4.2) vào huyền phù ẩm và lắc mạnh. Thêm 120 ml diclometan (4.4) và lắc lại. Nếu vón cục, thì đồng nhất bằng máy đồng hóa (5.5), tráng với 15 ml diclometan (4.4), phối trộn dịch tráng với lượng chứa trong bình định mức. Để hỗn hợp nguội đến thể tích không đổi. Đậy nắp bình và để yên ở nơi tối cho đến khi đạt nhiệt độ phòng (khoảng 2 h), pha loãng bằng diclometan (4.4) đến vạch, lắc mạnh và để yên. Tiến hành như sau:

- Nếu hàm lượng lycopene của phần mẫu thử tối đa là 10 mg, thì sử dụng huyền phù mà không cần pha loãng.
- Nếu hàm lượng lycopene của phần mẫu thử lớn hơn 10 mg, thì pha loãng huyền phù với diclometan:etanol (1:1, tính theo thể tích) sao cho hàm lượng lycopene của dung dịch cuối cùng từ 1 µg/ml đến 10 µg/ml. Lọc dung dịch qua bộ lọc màng (5.7), nếu cần và bơm 20 µl vào hệ thống HPLC (5.8).

#### **8.4.4 Viên nén và viên nang chứa beadlet từ gelatin và các beadlet phân tán trong nước khác có khối lượng phần mẫu thử lớn hơn 5 g**

Cân chính xác phần mẫu thử của ba viên nén hoặc viên nang, chuẩn bị như trong Điều 7, vào bình định mức 250 ml (5.10) đã được cân trước. Thêm 0,5 ml Protex 6 L (4.8) và 120 ml nước. Xoay bình để làm ướt lượng chứa bên trong và đặt vào bể siêu âm (5.3) khoảng 50 °C trong 30 min, khuấy khoảng 15 min. Thêm 125 ml etanol (4.2) vào huyền phù ấm, để nguội đến nhiệt độ phòng và thêm nước đến vạch. Cân bình và lượng chứa bên trong rồi lắc mạnh. Dùng phễu rót ngay 10 g ± 2 g huyền phù cho vào bình định mức 250 ml đã cân cả bì. Cân dịch lỏng của huyền phù đã được chuyển. Thêm 100 ml etanol (4.2), 250 mg BHT (4.10) và lắc. Thêm 120 ml diclometan (4.4) và lắc lại. Nếu vón cục, thì đồng nhất bằng máy đồng hóa (5.5), tráng với 15 ml diclometan (4.4) và phối trộn dịch tráng với lượng chứa trong bình. Để hỗn hợp nguội đến thể tích không đổi. Đậy nắp và để yên nơi tối cho đến khi đạt nhiệt độ phòng (khoảng 2 h), pha loãng bằng diclometan (4.4) đến vạch, lắc mạnh, để yên cho chất rắn lắng xuống. Tiến hành như sau:

- Nếu hàm lượng lycopene của phần mẫu thử tối đa là 25 mg, thì sử dụng huyền phù mà không cần pha loãng.
- Nếu hàm lượng lycopene của phần mẫu thử lớn hơn 25 mg, thì pha loãng huyền phù với etanol:diclometan (1:1, tính theo thể tích) sao cho hàm lượng lycopene của dung dịch cuối cùng là 1 µg/ml đến 10 µg/ml. Lọc dung dịch qua bộ lọc (5.7) nếu cần và bơm 20 µl vào hệ thống HPLC (5.8).

#### **8.4.5 Beadlet từ alginat, viên nén hoặc viên nang**

Cân chính xác phần mẫu thử của beadlet tương đương với 10 mg, hoặc ba viên nén hoặc viên nang, được chuẩn bị như trong Điều 7, vào bình định mức 100 ml (5.10) đã được cân trước. Thêm 1 ml Protex 6 L (4.8) và 50 ml dung dịch đệm chiết không chứa gelatin (4.18). Xoay bình để làm ướt lượng chứa trong và đặt vào bể siêu âm (5.3) ở khoảng 50 °C trong 30 min, khuấy khoảng 15 min. Thêm 40 ml nước (4.3) vào huyền phù ấm, để nguội đến nhiệt độ phòng và thêm nước đến vạch. Cân bình, lượng chứa bên trong và lắc mạnh. Dùng phễu rót ngay 10 g ± 2 g huyền phù cho vào bình định mức 200 ml (5.10). Cân dịch lỏng của huyền phù đã chuyển. Thêm 100 ml diclometan (4.4), 200 mg BHT (4.10) và lắc. Thêm 70 ml etanol (4.2) và lắc lại. Nếu vón cục thì đồng nhất bằng máy đồng hóa (5.5), tráng với 15 ml diclometan (4.4), trộn dịch tráng với lượng chứa trong bình. Để hỗn hợp nguội đến thể tích không đổi. Đậy nắp và để yên nơi tối cho đến khi đạt nhiệt độ phòng (khoảng 2 h), pha loãng bằng diclometan (4.4) đến vạch, lắc mạnh và để yên. Tiến hành như sau:

## TCVN 11494:2016

- Nếu hàm lượng lycopene của phần mẫu thử tối đa là 10 mg, thì sử dụng huyền phù mà không cần pha loãng.
- Nếu hàm lượng lycopene của phần mẫu thử lớn hơn 10 mg, thì pha loãng huyền phù với diclometan-ethanol (1:1, tính theo thể tích) sao cho hàm lượng lycopene của dung dịch cuối cùng từ 1 µg/ml đến 10 µg/ml. Lọc dung dịch qua bộ lọc màng (5.7) và bơm 20 µl vào hệ thống HPLC (5.8), nếu cần.

### 8.5 Xác định bằng HPLC

#### 8.5.1 Các điều kiện vận hành HPLC

Các điều kiện vận hành sau đây cho thấy thích hợp:

- Cột:
  - + Suplex PKB-100, cỡ hạt 5 µm, dài 250 mm đường kính trong 4,6 mm;
  - + nhiệt độ cột: 30 °C; pha động (xem 4.17);
  - + tốc độ dòng 0,8 ml/min;
  - + áp suất: khoảng 33 bar;
  - + thể tích bơm: 20 µl;
  - + nhiệt độ bơm mẫu tự động: 15 °C
  - + bước sóng detector: 448 nm;
  - + thời gian chạy: 40 min.

#### 8.5.2 Thời gian lưu

All-*trans*-lycopen: khoảng 15 min đến 20 min. Thời gian lưu xấp xỉ của all-*trans*-lycopen: all-*trans*-lutein: 0,45, all-*trans*-zeaxanthin: 0,47; all-*trans*-β-cryptoxanthin: 0,86; all-*trans*-lycopen: 1; đồng rủa giải 5-*cis* và 9-*cis*-lycopen: 1,03; 15-*cis*-lycopen không xác định được: 1,07; 13-*cis*-lycopen: 1,12; 15-*cis*-lycopen: 1,18; all-*trans*-α-caroten: 1,39; all-*trans*-β-caroten: 1,49; 9-*cis*-β-caroten: 1,60; 13-*cis*-β-caroten: 1,75; 15-*cis*-β-caroten: 1,81.

## 9 Tính kết quả

### 9.1 Hàm lượng lycopene tổng số

- Hàm lượng lycopene tổng số trong mẫu thử,  $C_{tot}$  tính bằng miligam trên gam (mg/g), được tính bằng

Công thức (6):

$$C_{tot} = \frac{[(A_{all-trans} + A_{5-cis/9-cis} + A_{x-cis} + A_{13-cis} \times 1,3 + A_{15-cis} \times 1,4) \times V]}{RF_{trans} \times m} \quad (6)$$

– Hàm lượng lycopene tổng số,  $C_{tot}$ , tính bằng milligam trên đơn vị mẫu (mg/unit), được tính bằng Công thức (7):

$$C_{tot} = \frac{[(A_{all-trans} + A_{5-cis/9-cis} + A_{x-cis} + A_{13-cis} \times 1,3 + A_{15-cis} \times 1,4) \times V \times W_D]}{RF_{trans} \times m} \quad (7)$$

Trong đó

$A_{all-trans}$  là diện tích pic của all-*trans*-lycopen (AU);

$A_{5-cis/9-cis}$  là diện tích pic của dịch cùng nửa giải 5-*cis*-lycopen và 9-*cis*-lycopen (AU);

$A_{x-cis}$  là diện tích pic của các đồng phân *cis* lycopen chưa xác định được (AU);

$A_{13-cis}$  và  $A_{15-cis}$  là diện tích pic của 13 *cis*-lycopen và 15-*cis*-lycopen (AU);

$RF_{trans}$  là hệ số đáp ứng của all-*trans*-lycopen (AU×L/mg);

$m$  là khối lượng phần mẫu thử tính bằng gam (g).

$W_D$  là khối lượng trung bình của đơn vị mẫu (viên nén hoặc viên nang), tính bằng gam (g);

$V$  là thể tích lý thuyết để hòa tan phần mẫu thử, tính được từ Công thức (8), tính bằng lít (l)

$$V = \left[ \frac{V_1 \times V_3}{V_2} \right] \times \left( \frac{W_1}{W_2} \right) \quad (8)$$

Trong đó

$V_1$  là thể tích của bình thứ nhất đựng phần mẫu thử đã chiết, tính bằng lít (l);

$V_2$  là thể tích của phần dịch lỏng đã pha loãng, tính bằng lít (l);

$V_3$  là thể tích phần dịch lỏng  $V_2$  đã pha loãng, tính bằng lít (l);

$W_1$  là khối lượng của etanol (8.4.4) hoặc huyền phù (8.4.5) trong bình định mức đầu tiên, tính bằng gam (g);

$W_2$  là khối lượng huyền phù chuyển vào bình định mức thứ hai, tính bằng gam (g).

## 9.2 Hàm lượng all-trans-lycopen

– Hàm lượng all-trans-lycopen,  $C_{trans}$ , tính bằng miligam trên gam (mg/g), được tính bằng Công thức (8):

$$C_{trans} = \frac{(A_{all-trans} \times V)}{RF_{trans} \times m} \quad (8)$$

– Hàm lượng all-trans-lycopen,  $C_{trans}$ , tính bằng miligam trên đơn vị mẫu, (mg/unit), được tính bằng Công thức (9):

$$C_{trans} = \frac{(A_{all-trans} \times V \times W_D)}{RF_{trans} \times m} \quad (9)$$

Xem giải thích trong 9.1.

## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc những điều được coi là tự chọn, và bất kỳ chi tiết nào có ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

## Kết quả nghiên cứu

Bảng A.1 – Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm <sup>a)</sup>

Số mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Nền mẫu	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn lặp lại ( $s_r$ )	Độ lệch chuẩn tái lập ( $s_R$ )	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại ( $RSD_r$ ) %	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập ( $RSD_R$ ) %	Độ lặp lại ( $r$ )	Độ tái lập ( $R$ )	Chỉ số HorRat
3,8	9	Huyền phù trong dầu	96,7	4,97	8,93	5,13	9,21	13,9	25,0	3,24
4,11	9	Beadlet từ gelatin	51,4	0,77	1,97	1,49	3,84	2,14	5,53	1,23
16,19	9	Beadlet từ alginat	222	6,19	13,6	2,79	6,15	1,73	38,2	2,45
1,9	8	Lycopen dạng viên nang	23,1	0,29	1,50	1,26	6,53	2,12	4,81	1,85
5,12	8	Multivitamin dạng viên nang	0,299	0,016	0,020	5,32	6,76	0,045	0,057	1,00
6,13	9	Lycopen dạng viên nang	2,11	0,065	0,22	3,11	10,4	0,18	0,62	2,06
7,21	8	Lycopen dạng viên mềm (softgel)	1,21	0,15	0,15	12,2	12,3	0,41	0,42	2,23
14,20	10	Lycopen dạng viên nang	1,28	0,048	0,052	3,72	4,05	0,13	0,15	0,74
15,18	9	Mẫu kiểm soát dương cao	2,46	0,25	0,42	10,2	16,9	0,70	1,16	3,42
10,17	9	Mẫu kiểm soát dương thấp	0,653	0,052	0,25	7,88	38,0	0,14	0,69	6,30
2	10	Mẫu kiểm soát âm	<0,01	NA <sup>b)</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA

<sup>a)</sup> Các kết quả được biểu thị bằng milligram trên gam (mg/g).

<sup>b)</sup> NA: Không áp dụng

Bảng A.2 – Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm để xác định lycopene tổng số<sup>a)</sup>

Số mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Nền mẫu	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn lặp lại ( $s_r$ )	Độ lệch chuẩn tái lập ( $s_R$ )	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại ( $RSD_r$ ) %	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập ( $RSD_R$ ) %	Độ lặp lại ( $r$ )	Độ tái lập ( $R$ )	Chỉ số HorRat
1,9	8	Lycopene dạng viên nang, tính bằng miligam trên viên	26,1	0,34	1,50	1,31	5,74	0,957	4,20	1,63
5,12	8	Multivitamin dạng viên nang, tính bằng miligam trên viên	0,447	0,021	0,029	4,62	6,43	0,058	0,080	0,95
6,13	9	Lycopene dạng viên nang, tính bằng miligam trên viên	3,97	0,13	0,42	3,30	10,5	0,367	1,17	2,07
7,21	8	Lycopene dạng viên mềm (softgel), tính bằng miligam trên viên	1,06	0,034	0,052	3,19	4,87	0,095	0,145	0,89
14,20	10	Lycopene dạng viên nang, tính bằng miligam trên viên	1,75	0,063	0,075	3,59	4,28	0,176	0,210	0,79

<sup>a)</sup> Các kết quả được tính bằng đơn vị liệu.



Bảng A.3 – Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm để xác định all-trans-lycopen<sup>a)</sup>

Số mẫu	Số lượng phòng thử nghiệm	Nền mẫu	Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn lặp lại ( $s_r$ )	Độ lệch chuẩn tái lập ( $s_R$ )	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại ( $RSD_r$ ) %	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập ( $RSD_R$ ) %	Độ lặp lại ( $r$ )	Độ tái lập ( $R$ )	Chỉ số HorRat
3,8	8	Huyền phù trong dầu	87,7	3,81	8,87	4,34	10,1	10,7	24,8	3,51
4,11	9	Beadlet từ gelatin	45,4	0,84	5,83	1,84	12,8	2,34	16,3	4,03
16,19	9	Beadlet từ alginat	215	6,72	12,8	3,13	5,96	18,8	35,8	2,36
1,9	10	Lycopen dạng viên nén	19,1	0,90	4,00	4,75	21,0	2,53	11,2	5,78
5,12	9	Vitamin tổng hợp dạng viên nén	0,238	0,025	0,044	10,6	18,5	0,071	0,123	2,64
6,13	9	Lycopen dạng viên nén	1,83	0,049	0,28	2,67	15,1	0,136	0,773	2,92
7,21	8	Lycopen dạng viên mềm (softgel)	1,05	0,087	0,14	8,23	13,4	0,24	0,40	2,39
14,20	10	Lycopen dạng viên nén	1,09	0,10	0,13	9,17	11,5	0,28	0,35	2,06
15,18	9	Mẫu kiểm soát dương cao	2,05	0,26	0,48	12,7	23,5	0,73	1,35	4,6
10,17	9	Mẫu kiểm soát dương thấp	0,543	0,051	0,22	9,41	40,5	0,14	0,62	6,54
2	10	Mẫu kiểm soát âm	<0,01	NA <sup>b)</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA

<sup>a)</sup> Các kết quả được biểu thị bằng miligam trên gam (mg/g).

<sup>b)</sup> NA: Không áp dụng