TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9045: 2012

EN 15652:2009

Xuất bản lần 1

THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH NIACIN BẰNG SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Foodstuffs - Determination of niacin by high performance liquid chromatography (HPLC)

HÀ NỘI - 2012

Lời nói đầu

TCVN 9045:2012 hoàn toàn tương đương với EN 15652:2009;

TCVN 9045:2012 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Xác định niacin bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Foodstuffs – Determination of niacin by high-performance liquid chromatography (HPLC)

CẢNH BÁO – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể cần phải sử dụng các vật liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn khi sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định phần khối lượng niacin trong thực phẩm bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) với ba cách thủy phân khác nhau: thủy phân bằng axit (A), thủy phân bằng enzym (B) hoặc thủy phân bằng axit/kiềm (C).

Phương pháp này đã được đánh giá xác nhận trong các phép thử liên phòng thử nghiệm trên các mẫu không bổ sung và các mẫu có bổ sung vi chất như: bột ngũ cốc ăn nhanh, ngũ cốc có socola, thịt dăm bông chín, đậu Hà Lan, đậu Hà Lan đông khô với dăm bông, xúp đông khô, nước cam dinh dưỡng, sữa bột và bột mì, với các mức bổ sung từ 0,5 mg/100 g đến 24 mg/100 g. Để có thêm thông tin về các dữ liệu đã được đánh giá xác nhận ở trên, xem Phụ lục B.

Các phương án tùy chọn A và B cho các kết quả tương tự về niacin. Trong các phương án A và B, niacin được tính theo tổng của nicotinamid và axit nicotinic và được biểu thị theo axit nicotinic [1]. Phương án C cho kết quả cao hơn so với các phương án A và B về niacin trong ngũ cốc không bổ sung vi chất, nhưng cho các kết quả tương tự đối với các sản phẩm khác. Trong phương án C, niacin được tính và được biểu thị theo axit nicotinic sau khi chuyển nicotinamid thành axit nicotinic [2].

Phương án A thực hiện nhanh hơn và rẻ hơn phương án B và C.

Sử dụng phương án B nếu cần định lượng chính xác về axit nicotinic và nicotinamid. Điều này không thể thực hiện được bằng phương án A, vì có một lượng nhỏ nicotinamid được chuyển thành axit nicotinic trong quá trình thủy phân bằng axit.

Phương án C định lượng niacin tổng số. Thủy phân bằng kiềm có thể giải phóng các dạng khác cho các kết quả niacin cao hơn, các dạng này không tồn tại ở dạng sinh học thông thường trong một số thực phẩm như ngô và ngũ cốc, xem [3], [4] và [5].

Thông tin so sánh giữa ba cách thủy phân khác nhau được nêu trong Phụ lục C.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi (nếu có).

TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Nguyên tắc

Các dạng của niacin (niacin vitamer) được chiết ra khỏi thực phẩm bằng cách xử lí với axit (phương án A), enzym (phương án B) hoặc axit/kiềm (phương án C) và được định lượng bằng HPLC với detector huỳnh quang sau khi tạo dẫn xuất sau cột với bức xạ UV, xem [1] và [2]. Đối với phương án A và B, niacin được xác định theo tổng của nicotinamid và axit nicotinic. Niacin được biểu thị theo axit nicotinic sau khi hiệu chỉnh khối lượng phân tử. Đối với phương án C, niacin được xác định và tính theo axit nicotinic. Toàn bộ nicotinamid được chuyển thành axit nicotinic bằng cách xử lí với kiềm.

4 Thuốc thử

4.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước ít nhất là loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác.

4.2 Hoá chất và dung dịch

4.2.1 Natri axetat, phần khối lượng $w(C_2H_3NaO_2) \geq 99$ %.

4.2.2 Kali monohydro phosphat, $w(K_2HPO_4) \geq 99,5$ %.

4.2.3 Kali dihydro phosphat, $w(KH_2PO_4) \geq 99,5$ %.

4.2.4 Dung dịch hydro peroxit không ổn định, $w(H_2O_2) = 30$ %.

4.2.5 Đồng sulfat, $w(Cu(II)SO_4.5H_2O) \geq 99$ %.

4.2.6 Axit axetic, $w(CH_3COOH) \geq 99,8$ %.

4.2.7 Dung dịch axit clohydric đậm đặc (phương án A và B), $w(HCl) = 37,0$ %.

4.2.8 NADaza từ *Neurospora crassa* (phương án B), có hoạt độ enzym đối với protein là 0,55 U/mg

Bảo quản dưới 0 °C.

CHÚ THÍCH: Đối với nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, đã sử dụng NADaza từ *Neurospora crassa* của hãng Sigma Chemicals có số tham chiếu 9629, dạng bột đông khô, 0,5 U/mg đến 3,0 U/mg protein[1)].

4.2.9 Dung dịch axit axetic, nồng độ cơ chất $c(CH_3COOH) = 5$ mol/l.

4.2.10 Dung dịch natri axetat, $c(C_2H_3NaO_2) = 2,5$ mol/l.

4.2.11 Dung dịch đồng sulfat, $c(Cu(II)SO_4.5H_2O) = 0,005$ mol/l.

4.2.12 Dung dịch natri axetat (phương án B), $c(C_2H_3NaO_2) = 0,05$ mol/l, pH = 4,5

Hòa tan 4,10 g natri axetat (4.2.1) trong 900 ml nước. Chỉnh pH của dung dịch này đến 4,5 bằng axit axetic (4.2.6) và pha loãng bằng nước đến 1 000 ml.

4.2.13 Dung dịch đệm phosphat (phương án B), $c(K_2HPO_4) = 0,05$ mol/l và $c(KH_2PO_4) = 0,05$ mol/l, pH = 6,8

Trộn một phần thể tích dung dịch K_2HPO_4 (0,1 mol/l) và một phần thể tích dung dịch KH_2PO_4 (0,1 mol/l). Chỉnh pH đến 6,8 bằng dung dịch natri axetat (4.2.10), nếu cần.

4.2.14 Dung dịch NADaza (phương án B)

Hòa tan 2,9 mg NADaza (4.2.8) trong 5 ml đệm phosphat (4.2.13). Dung dịch này khi được bảo quản ở −18 °C có thể bền được 1 tuần.

4.2.15 Dung dịch axit clohydric (phương án A và C), $c(HCl) = 0,1$ mol/l.

4.2.16 Pha động dùng cho HPLC

Hòa 4,77 g kali hydro phosphat (4.2.3) trong 400 ml nước. Thêm 3,8 ml dung dịch hydro peroxit (4.2.4) và 0,5 ml dung dịch đồng sulfat (4.2.11). Pha loãng đến 500 ml. pH của dung dịch này khoảng 4,5. Lọc qua bộ lọc màng (5.7). Dung dịch này bền được một ngày.

4.2.17 Natri hydroxit (phương án C), $w(NaOH) \geq 99$ %.

[1)] Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu cho các kết quả tương tự.

4.2.18 Dung dịch natri hydroxit (phương án C), $c(NaOH) = 5$ mol/l

Hòa tan 20 g natri hydroxit (4.2.17) trong 80 ml nước. Sau khi nguội, pha loãng bằng nước đến 100 ml.

4.2.19 Dung dịch axit clohydric (phương án C), $w(HCl) = 3,7$ %

Pha loãng 5 ml dung dịch axit clohydric đậm đặc (4.2.7) bằng nước đến 50 ml.

4.3 Chất chuẩn

4.3.1 Yêu cầu chung

Axit nicotinic và nicotinamid có thể thu được từ các nhà cung cấp khác nhau. Độ tinh khiết có thể thay đổi, do đó cần xác định nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn bằng phép đo phổ (xem 4.4.3).

4.3.2 Axit nicotinic, $w(C_6H_5NO_2) \geq 99,5$ %.

4.3.3 Nicotinamid (phương án A và B), $w(C_6H_6N_2O) \geq 99,5$ %.

4.4 Dung dịch gốc

4.4.1 Dung dịch gốc axit nicotinic, nồng độ khối lượng $\rho(C_6H_5NO_2) = 1$ mg/ml

Hòa tan một lượng chất chuẩn axit nicotinic (4.3.2), ví dụ: khoảng 100 mg được cân chính xác đến 1 mg, trong 100 ml nước. Dung dịch này khi được bảo quản ở –18 °C có thể bền được 1 tuần.

4.4.2 Dung dịch gốc nicotinamid (phương án A và B), $\rho(C_6H_6N_2O) = 1$ mg/ml

Hòa tan một lượng chất chuẩn nicotinamid (4.3.3), ví dụ: khoảng 100 mg được cân chính xác đến 1 mg, trong 100 ml nước. Dung dịch này khi được bảo quản ở –18 °C có thể bền được 1 tuần.

4.4.3 Phép kiểm tra nồng độ

4.4.3.1 Dung dịch axit nicotinic, $\rho(C_6H_5NO_2) = 1$ mg/ml

Pha loãng 1 ml dung dịch gốc axit nicotinic (4.4.1) trong 100 ml dung dịch axit clohydric (4.2.15) và dùng máy đo phổ UV (5.2) để đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm trong cuvet 1 cm so với dung dịch axit clohydric (4.2.15). Tính nồng độ khối lượng của dung dịch gốc, ρ, bằng miligam trên mililit, theo Công thức (1):

$$\rho = \frac{A_{260} \times 1000}{420} \qquad (1)$$

Trong đó:

A_{260} là giá trị độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 260 nm;

420 là giá trị $E_{1cm}^{1\%}$ của axit nicotinic trong HCl 0,1 mol/l, xem [6].

4.4.3.2 Dung dịch nicotinamid, $\rho(C_6H_6N_2O)$ = 1 mg/ml

Pha loãng 1 ml dung dịch gốc nicotinamid (4.4.2) trong 100 ml dung dịch axit clohydric (4.2.15) và dùng máy đo phổ UV (5.2) để đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm trong cuvet 1 cm so với dung dịch axit clohydric (4.2.15). Tính nồng độ khối lượng của dung dịch gốc, ρ, bằng miligam trên mililit, theo Công thức (2):

$$\rho = \frac{A_{260} \times 1000}{410} \qquad (2)$$

Trong đó:

A_{260} là giá trị độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 260 nm;

410 là giá trị $E_{1cm}^{1\%}$ của axit nicotinamid trong HCl 0,1 mol/l, xem [6]

4.5 Các dung dịch chuẩn axit nicotinic và nicotinamid, $\rho(C_6H_5N_2O)$ = 0,05 µg/ml đến 5 µg/ml

Chuẩn bị, ví dụ: dung dịch thứ nhất từ 1 ml mỗi dung dịch gốc (4.4.1) hoặc (4.4.2) trong 100 ml nước. Từ dung dịch này, chuẩn bị bốn dung dịch chuẩn (0,5 ml, 2,5 ml, 10 ml và 50 ml) trong 100 ml nước. Các dung dịch này bền được một ngày khi bảo quản ở nhiệt độ phòng.

5 Thiết bị, dụng cụ

5.1 Yêu cầu chung

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

5.2 Máy đo phổ UV

Máy đo phổ UV có thể đo được độ hấp thụ tại các bước sóng xác định.

5.3 Tủ sấy, có thể duy trì nhiệt độ ở 37 °C.

5.4 Nồi hấp áp lực, có thể duy trì nhiệt độ ở 120 °C.

5.5 Hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Gồm có bơm, bộ phận bơm mẫu, detector huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 322 nm và bước sóng phát xạ ở 380 nm và có hệ thống đánh giá như bộ tích phân.

5.6 Cột phân tích pha đảo, ví dụ: LiChrospher® 60 RP-18 Select B [2)]

Cột phải đảm bảo độ phân giải đường nền của các chất phân tích có liên quan, với các đặc tính sau:

a) dài 25 cm;

b) đường kính trong 4,0 mm;

c) cỡ hạt 5 µm.

Có thể sử dụng các kích thước cột hoặc cỡ hạt khác với quy định trong tiêu chuẩn này. Các thông số tách phải phù hợp với vật liệu sử dụng để đảm bảo các kết quả tương đương.

5.7 Thiết bị lọc

Bộ lọc màng, ví dụ cỡ lỗ 0,45 µm là thích hợp.

5.8 Ống tạo dẫn xuất phản ứng sau cột và đèn UV

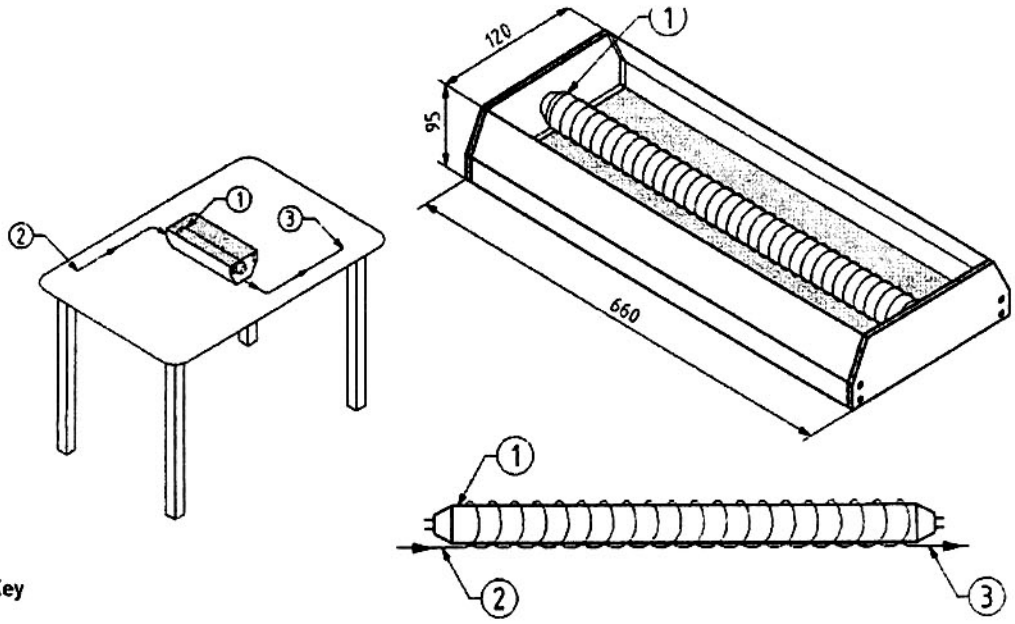
Ống polytetrafloetylen (PTFE) (dài 5 m, đường kính trong 0,5 mm và đường kính ngoài 1,6 mm) xung quanh có đèn ống UV ánh sáng màu xanh đen (BLB) có áp suất thấp (VL-120 BLB, 20 W, 365 nm, cường độ 55 µW/cm^2 hãng Vilber Lourmat) [2)], xem Hình 1, Hình 2 và [7].

CẢNH BÁO 1: Ánh sáng UV có hại vì có thể xuyên qua hộp kim loại đựng đèn.

CẢNH BÁO 2: Nếu việc tạo thành bong bóng xảy ra trong ống do quá nóng thì ống cần được làm mát hiệu quả bằng lưu thông không khí, ví dụ bằng cách nhấc hộp lên.

[2)] LiChrospher® 60 RP-18 Select B và VL-120 BLB là các ví dụ về sản phẩm có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu cho các kết quả tương tự.

Kích thước tính bằng milimet



Key

CHÚ DẪN:

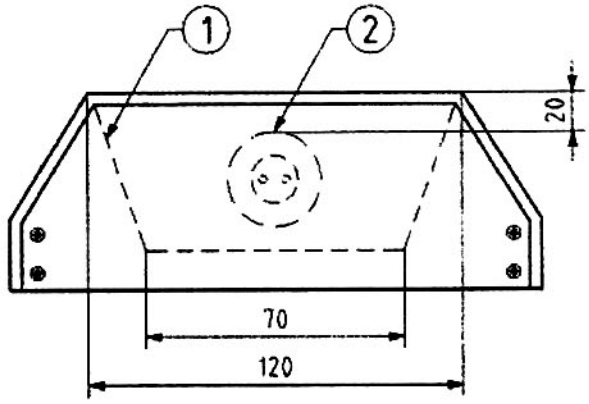
1 đèn ống

2 từ cột ra

3 đến detector

Hình 1 – Sơ đồ thể hiện và kích thước (mm) của đèn, vỏ bọc đèn (trong vị trí lộn ngược xuống) và vị trí của vỏ bọc đèn ở trên băng (trong vị trí làm việc)

Kích thước tính bằng milimet



CHÚ DẪN

1 gương phản xạ

2 đèn ống

Hình 2 – Mặt cắt ngang của vỏ bọc đèn (vị trí lộn ngược) với đèn ống và kích thước

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hoá mẫu thử. Nghiền thô nguyên liệu trong máy nghiền thích hợp và trộn lại. Cần làm lạnh sơ bộ để tránh mẫu bị tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian dài.

6.2 Chiết mẫu

6.2.1 Phương án chiết A, thủy phân bằng axit

Phương án A cho các kết quả tương tự như phương án B đối với niacin, nhưng có một lượng nhỏ nicotinamid chuyển thành axit nicotinic trong quá trình thủy phân.

Cân một lượng mẫu thử thích hợp, ví dụ: khoảng từ 1 g đến 5 g, chính xác đến 1 mg, cho vào bình nón. Thêm 50 ml dung dịch axit clohydric (4.2.15). Để bình nón trong nồi cách thủy đun sôi trong 1 h. Sau khi nguội, thêm dung dịch natri axetat (4.2.10) để pH đạt được 4,5. Sau đó chuyển sang bình định mức. Pha loãng bằng nước đến 100 ml. Lắc dung dịch và lọc qua giấy lọc. Lọc lại qua bộ lọc màng (5.7) trước khi bơm.

CHÚ THÍCH: Lọc pha động cũng như lọc dung dịch mẫu thử qua bộ lọc màng, trước khi sử dụng hoặc trước khi bơm sẽ kéo dài tuổi thọ của cột.

6.2.2 Phương án chiết B, thủy phân bằng enzym

Phương án B cho các kết quả tương tự như phương án A đối với niacin. Phương án B cho phép định lượng chính xác nicotinamid và axit nicotinic.

Cân một lượng mẫu thử thích hợp, ví dụ: khoảng từ 1 g đến 5 g, chính xác đến 1 mg, cho vào bình nón. Thêm 50 ml dung dịch natri axetat (4.2.12). Thêm 200 µl dung dịch NADaza (4.2.14). Để bình nón trong tủ (5.3) ở nhiệt độ 37 °C trong thời gian 18 h, trong khi vẫn khuấy liên tục. Sau khi nguội, chuyển sang bình định mức. Pha loãng bằng nước đến 100 ml. Lắc dung dịch và lọc qua giấy lọc. Lọc lại qua bộ lọc màng (5.7) trước khi bơm.

6.2.3 Phương án chiết C, thủy phân bằng axit và kiềm

Đối với các sản phẩm ngũ cốc không bổ sung vi chất, phương án C cho kết quả cao hơn so với phương án A và B. Các mẫu thực phẩm khác cũng cho kết quả tương tự. Phương án C cho phép định lượng niacin tổng số theo axit nicotinic sau khi chuyển nicotinamid thành axit nicotinic bằng kiềm hóa.

Cân một lượng mẫu thử thích hợp, ví dụ: khoảng từ 1 g đến 5 g, chính xác đến 1 mg, cho vào bình nón. Thêm 70 ml dung dịch axit clohydric (4.2.15). Để bình nón trong nồi cách thủy đun sôi trong 1 h. Sau khi nguội, thêm từ 1 ml đến 2 ml dung dịch natri hydroxit (4.2.18) để pH của dung dịch đạt 4,5.

Chuyển dung dịch sang bình định mức. Thêm nước đến 100 ml. Lọc dung dịch qua giấy lọc. Chuyển 50 ml dịch lọc sang bình nón. Thêm 10 ml dung dịch natri hydroxit (4.2.18). Hấp áp lực ở nhiệt độ 120 °C trong 1 h. Sau khi nguội, chỉnh pH đến 4,5 bằng axit clohydric. Bắt đầu với dung dịch axit clohydric đậm đặc (4.2.7) và tiếp theo với axit clohydric loãng (4.2.19). Chuyển sang bình định mức. Pha loãng bằng nước đến 100 ml. Lọc lại qua bộ lọc màng (5.7) trước khi bơm.

6.3 Chạy sắc kí

Bơm các thể tích bằng nhau của các dung dịch chuẩn và các dung dịch mẫu thử vào hệ thống HPLC. Nhận biết chất phân tích bằng cách so sánh thời gian lưu của các pic đơn lẻ trong sắc kí đồ thu được từ dung dịch mẫu thử và pic thu được từ dung dịch chuẩn. Có thể nhận biết pic bằng việc thêm chất chuẩn vào dung dịch mẫu thử.

Sự tách và định lượng đã được chứng minh phù hợp nếu tuân thủ các điều kiện thử nghiệm sau đây:

Pha tĩnh: LiChrospher® 60 RP Select B, cỡ hạt 5 µm, kích thước 250 mm x 4,0 mm;

Pha động: đệm phosphat (c = 0,07 mol/l), hydro peroxit (c = 0,075 mol/l), đồng sulfat ($c = 5 \times 10^{-6}$ mol/l) (xem 4.2.16);

Tốc độ dòng: 1 ml/min;

Thể tích bơm: 30 µl;

Detector: huỳnh quang, bước sóng kích thích 322 nm và phát xạ 380 nm;

7 Tính kết quả

7.1 Yêu cầu chung

Thực hiện phép xác định bằng ngoại chuẩn, sử dụng đường chuẩn hoặc tích phân diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic và so sánh các kết quả thu được với các giá trị tương ứng của dung dịch chuẩn có diện tích và chiều cao pic gần giống nhất. Kiểm tra độ tuyến tính của đường chuẩn.

7.2 Tính kết quả đối với phương án A hoặc B

Tính phần khối lượng của axit nicotinic, w, bằng mg/100 g mẫu, theo Công thức (3) sau đây:

$$w = \frac{A_{TS} \times \rho \times V_e}{A_{ST} \times 10 \times m_S} \qquad (3)$$

Trong đó:

A_{TS} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của dẫn xuất thu được bằng dung dịch mẫu thử, tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;

ρ là nồng độ khối lượng của axit nicotinic trong dung dịch chuẩn (4.5), tính bằng microgram trên mililit (µg/ml);

V_e là thể tích dung dịch mẫu thử (6.2.1 hoặc 6.2.2), tính bằng mililit (ml);

A_{ST} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của dẫn xuất thu được bằng dung dịch chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;

m_S là khối lượng mẫu, tính bằng gam (g);

Tính phần khối lượng của nicotinamid, w', bằng mg/100 g mẫu, theo Công thức (4) sau đây:

$$w' = \frac{A'_{TS} \times \rho' \times V_e}{A'_{ST} \times 10 \times m_S} \qquad (4)$$

Trong đó:

A'_{TS} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của dẫn xuất thu được bằng dung dịch mẫu thử, tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;

ρ' là nồng độ khối lượng của axit nicotinic trong dung dịch chuẩn (4.5), tính bằng microgram trên mililit (µg/ml);

V_e là thể tích dung dịch mẫu thử (6.2.1 hoặc 6.2.2), tính bằng mililit (ml);

A'_{ST} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của dẫn xuất thu được bằng dung dịch chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;

m_S là khối lượng mẫu, tính bằng gam (g).

Báo cáo kết quả đối với niacin bằng (w + 1,008 w') biểu thị theo axit nicotinic, tính bằng mg/100 g.

7.3 Tính kết quả đối với phương án C

Tính phần khối lượng của axit nicotinic, w, bằng mg/100 g mẫu, theo Công thức (5) sau đây:

$$w = \frac{A_{TS} \times \rho \times V_e \times 2}{A_{ST} \times 10 \times m_S} \qquad (5)$$

Trong đó:

A_{TS} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của dẫn xuất thu được bằng dung dịch mẫu thử, tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;

ρ là nồng độ khối lượng của axit nicotinic trong dung dịch chuẩn (4.5), tính bằng microgram trên mililit (µg/ml);

V_e là thể tích dung dịch mẫu thử (6.2.3), tính bằng mililit (ml);

A_{ST} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của dẫn xuất thu được bằng dung dịch chuẩn, tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;

m_S là khối lượng mẫu, tính bằng gam (g).

8 Độ chụm

8.1 Yêu cầu chung

Dữ liệu về độ chụm của phương pháp HPLC này đối với phép xác định niacin bằng phương án A và B được thiết lập năm 2002 phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) [10] từ phép thử cộng tác do AéRIAL (CRT: Centre de Ressources technologiques) và CGd'UMA (Commission Générale d'Unification des Méthodes d'Analyses) tổ chức, xem [1]. Nghiên cứu này đưa ra thông tin thống kê nêu trong Bảng B.1 và Bảng B.2 của Phụ lục B.

Dữ liệu về độ chụm đối với phép xác định niacin bằng phương án C được thiết lập năm 1999 phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) [10] từ phép thử cộng tác của Pháp, do CGd'UMA tổ chức, xem [2]. Nghiên cứu này đưa ra thông tin thống kê nêu trong Bảng B.3 của Phụ lục B.

8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn như nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r.

Các giá trị đối với niacin dùng phương án A, thủy phân bằng axit là:

Sữa bột	$\bar{x}$ = 16,66 mg/100 g	r = 1,31 mg/100 g
Ngũ cốc có socola	$\bar{x}$ = 21,03 mg/100 g	r = 0,68 mg/100 g
Dăm bông	$\bar{x}$ = 16,91 mg/100 g	r = 0,53 mg/100 g
Bột mì	$\bar{x}$ = 0,72 mg/100 g	r = 0,079 mg/100 g
Đậu Hà Lan	$\bar{x}$ = 5,91 mg/100 g	r = 0,93 mg/100 g

Các giá trị đối với niacin dùng phương án B, thủy phân bằng enzym là:

Sữa bột	$\bar{x}$ = 17,08 mg/100 g	r = 1,39 mg/100 g
Ngũ cốc có socola	$\bar{x}$ = 21,24 mg/100 g	r = 1,75 mg/100 g
Dăm bông	$\bar{x}$ = 17,29 mg/100 g	r = 0,70 mg/100 g
Bột mì	$\bar{x}$ = 0,54 mg/100 g	r = 0,040 mg/100 g
Đậu Hà Lan	$\bar{x}$ = 5,79 mg/100 g	r = 0,33 mg/100 g

Các giá trị đối với niacin dùng phương án C, thủy phân bằng axit và kiềm là:

Ngũ cốc ăn liền	$\bar{x}$ = 23,92 mg/100 g	r = 2,29 mg/100 g
Ngũ cốc có socola	$\bar{x}$ = 16,98 mg/100 g	r = 2,24 mg/100 g
Sữa bột	$\bar{x}$ = 5,66 mg/100 g	r = 0,92 mg/100 g
Nước quả	$\bar{x}$ = 4,31 mg/100 g	r = 0,49 mg/100 g
Đậu Hà Lan đông khô với dăm bông	$\bar{x}$ = 12,89 mg/100 g	r = 1,78 mg/100 g
Xúp đông khô	$\bar{x}$ = 11,06 mg/100 g	r = 0,53 mg/100 g

8.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được bởi hai phòng thử nghiệm khi tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R.

Các giá trị đối với niacin dùng phương án A, thủy phân bằng axit là:

Sữa bột	$\bar{x}$ = 16,66 mg/100 g	R = 2,04 mg/100 g
Ngũ cốc có socola	$\bar{x}$ = 21,03 mg/100 g	R = 2,55 mg/100 g
Dăm bông	$\bar{x}$ = 16,91 mg/100 g	R = 1,75 mg/100 g
Bột mì	$\bar{x}$ = 0,72 mg/100 g	R = 0,59 mg/100 g
Đậu Hà Lan	$\bar{x}$ = 5,91 mg/100 g	R = 3,68 mg/100 g

Các giá trị đối với niacin dùng phương án B, thủy phân bằng enzym là:

Sữa bột	$\bar{x}$ = 17,08 mg/100 g	R = 2,07 mg/100 g
Ngũ cốc có socola	$\bar{x}$ = 21,24 mg/100 g	R = 3,08 mg/100 g
Dăm bông	$\bar{x}$ = 17,29 mg/100 g	R = 3,76 mg/100 g
Bột mì	$\bar{x}$ = 0,54 mg/100 g	R = 0,91 mg/100 g
Đậu Hà Lan	$\bar{x}$ = 5,79 mg/100 g	R = 1,96 mg/100 g

Các giá trị đối với niacin dùng phương án C, thủy phân bằng axit và kiềm là:

Ngũ cốc ăn liền	$\bar{x}$ = 23,92 mg/100 g	R = 11,65 mg/100 g
Ngũ cốc có socola	$\bar{x}$ = 16,98 mg/100 g	R = 7,02 mg/100 g
Sữa bột	$\bar{x}$ = 5,66 mg/100 g	R = 2,82 mg/100 g
Nước quả	$\bar{x}$ = 4,31 mg/100 g	R = 0,54 mg/100 g
Đậu Hà Lan đông khô với dăm bông	$\bar{x}$ = 12,89 mg/100 g	R = 6,61 mg/100 g
Xúp đông khô	$\bar{x}$ = 11,06 mg/100 g	R = 3,51 mg/100 g

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ các thông tin sau:

a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử (loại mẫu, nguồn gốc xuất xứ, tên gọi);

b) viện dẫn tiêu chuẩn này và phương án chiết được chọn;

c) ngày và phương pháp lấy mẫu đã sử dụng (nếu biết);

d) ngày nhận mẫu;

e) ngày thử nghiệm;

f) kết quả thu được và đơn vị biểu thị;

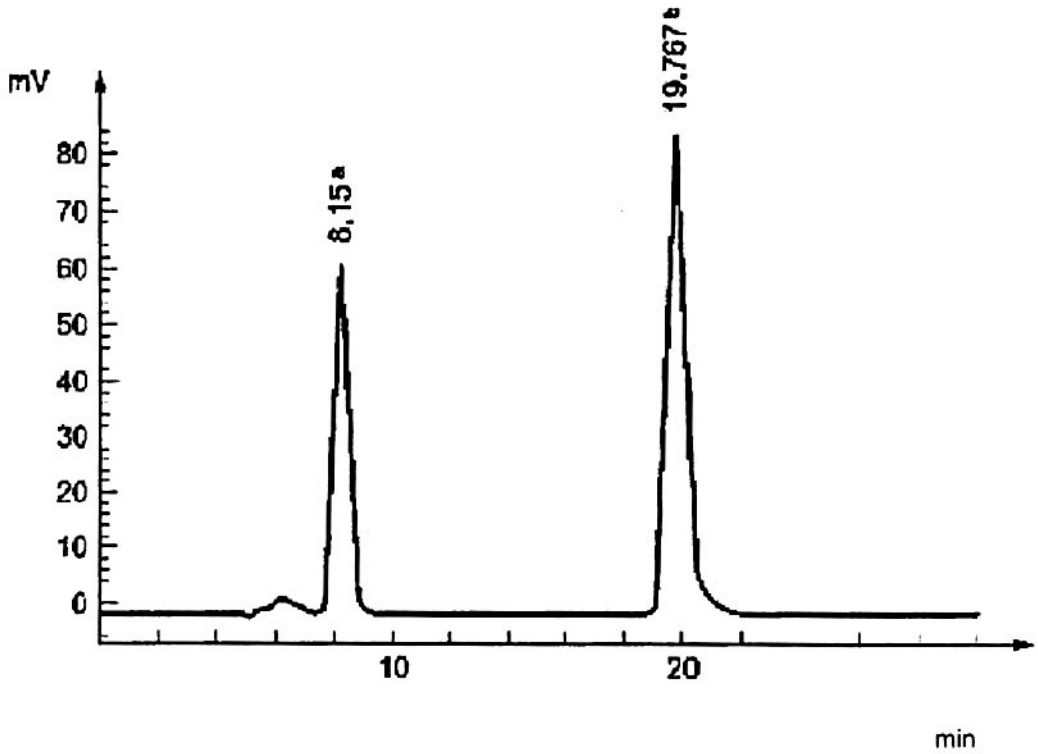
g) chi tiết quan sát được trong khi thử nghiệm;

h) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tuỳ ý lựa chọn cùng với các có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Sắc kí đồ điển hình



CHÚ DẪN:

a axit nicotinic

b nicotinamid

Hình A.1 – Ví dụ về tách bằng HPLC đối với các chất chuẩn nicotinamid và axit nicotinic có tạo dẫn xuất sau cột

Các điều kiện thực nghiệm nêu trong Hình A.1 là:

Pha tĩnh: LiChrospher® 60 RP Select B, cỡ hạt 5 µm, kích thước 250 mm x 4,0 mm;

Pha động: đệm phosphat (c = 0,07 mol/l), hydro peroxit (c = 0,075 mol/l), đồng sulfat ($c = 5 \times 10^{-6}$ mol/l);

Tốc độ dòng: 1 ml/min

Thể tích bơm: 30 µl

Detector: huỳnh quang, bước sóng kích thích 322 nm và bước sóng phát xạ 380 nm;

Phụ lục B

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm đối với các phương án thủy phân bằng axit, enzym và axit/kiềm

Dữ liệu về độ chụm đối với phép xác định niacin thủy phân bằng axit (phương án lựa chọn A) và thủy phân bằng enzym (phương án lựa chọn B) được thiết lập năm 2002 phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) [10] từ phép thử cộng tác do AéRIAL (CRT: Centre de Ressources technologiques) và CGd'UMA (Commission Générale d'Unification des Méthodes d'Analyses) tổ chức, xem [1], được nêu trong Bảng B.1 và B.2.

Dữ liệu về độ chụm đối với phép xác định niacin bằng phương án lựa chọn C được thiết lập năm 1999 phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) [10] từ phép thử cộng tác của Pháp, do CGd'UMA tổ chức, xem [2]. Nghiên cứu này đưa ra thông tin thống kê nêu trong Bảng B.3.

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm khi thủy phân bằng axit

Mẫu	Sữa bột (bổ sung vi chất)	Ngũ cốc có socola (bổ sung vi chất)	Dăm bông (không bổ sung vi chất)	Bột mì (không bổ sung vi chất)	Đậu Hà Lan (không bổ sung vi chất)
Năm thử nghiệm	2002	2002	2002	2002	2002
Số phòng thử nghiệm	12	12	12	12	12
Số lượng mẫu (lặp lại hai lần)	2	2	2	2	2
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ các ngoại lệ	11	10	10	12	12
Số phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	2	2	0	0
Số kết quả được chấp nhận	22	20	20	24	24
Giá trị trung bình $\overline{x}$ (mg/100 g)	16,66	21,03	16,91	0,72	5,91
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r(mg/100g)	0,46	0,24	0,19	0,028	0,33
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r %	2,8	1,1	1,1	3,9	5,6
Giới hạn lặp lại, r (r = 2,8 x s_r) (mg/100 g)	1,31	0,68	0,53	0,079	0,93
Độ lệch chuẩn tái lập s_R (mg/100 g)	0,72	0,90	0,62	0,21	1,30
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R , %	4,3	4,3	3,7	29,2	22,0
Giới hạn tái lập, R (R = 2,8 x s_R) (µg/100 g)	2,04	2,55	1.75	0,59	3,68
Giá trị Horrat [8]	0,6	0,6	0,5	2,5	2,5

Bảng B.2 – Dữ liệu về độ chụm khi thủy phân bằng enzym

Mẫu	Sữa bột (bổ sung vi chất)	Ngũ cốc có socola (bổ sung vi chất)	Dăm bông (không bổ sung vi chất)	Bột mì (không bổ sung vi chất)	Đậu Hà Lan (không bổ sung vi chất)
Năm thử nghiệm	2002	2002	2002	2002	2002
Số phòng thử nghiệm	12	12	12	12	12
Số lượng mẫu (lặp lại hai lần)	2	2	2	2	2
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ các ngoại lệ	11	10	11	12	12
Số phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	2	1	0	0
Số kết quả được chấp nhận	22	20	22	24	24
Giá trị trung bình $\bar{x}$ (mg/100 g)	17,08	21,24	17,29	0,54	5,79
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r(mg/100g)	0,49	0,62	0,25	0,014	0,12
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r %	2,9	2,9	1,4	2,6	2,0
Giới hạn lặp lại, r ($r = 2,8 \times s_r$) (mg/100 g)	1,39	1,75	0,70	0,040	0,33
Độ lệch chuẩn tái lập s_R (mg/100 g)	0,73	1,09	1,33	0,32	0,69
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R , %	4,3	5,1	7,7	59,2	11,9
Giới hạn tái lập, R ($R = 2,8 \times s_R$) (µg/100 g)	2,07	3,08	3,76	0,91	1,96
Giá trị Horrat [8]	0,6	0,7	1,0	4,8	1,4

Bảng B.3 – Dữ liệu về độ chụm khi thủy phân bằng axit/kiềm

Mẫu	Bột ngũ cốc ăn liền (bổ sung vi chất)	Ngũ cốc có socola (không bổ sung vi chất)	Sữa bột (không bổ sung vi chất)	Nước quả (bổ sung vi chất)	Đậu Hà Lan đông khô với dăm bông (không bổ sung vi chất)	Xúp đông khô (không bổ sung vi chất)
Năm thử nghiệm	1999	1999	1999	1999	1999	1999
Số phòng thử nghiệm	11	11	11	10	10	10
Số lượng mẫu (lặp lại hai lần)	2	2	2	2	2	2
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ các ngoại lệ	10	11	9	8	10	10
Số phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	0	2	3	0	0
Số kết quả được chấp nhận	20	22	18	16	20	20
Giá trị trung bình $\bar{x}$ (mg/100 g)	23,92	16,98	5,66	4,31	12,89	11,06
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r(mg/100g)	0,81	0,79	0,32	0,17	0,63	0,19
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r %	3,4	4,7	5,7	4,0	4,9	1,7
Giới hạn lặp lại, r (r = 2,8 x s_r) (mg/100 g)	2,29	2,24	0,92	0,49	1,78	0,53
Độ lệch chuẩn tái lập s_R (mg/100 g)	4,11	2,48	0,99	0,19	2,34	1,24
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R , %	17,2	14,6	17,6	4,5	18,1	11,2
Giới hạn tái lập, R (R = 2,8 x s_R) (µg/100 g)	11,65	7,02	2,82	0,54	6,61	3,51
Giá trị Horrat [8]	2,5	2,0	2,0	0,5	2,4	1,4

Phụ lục C

(Tham khảo)

So sánh giữa ba phương án thủy phân khác nhau

Trong Bảng C.1 đưa ra việc so sánh về niacin tổng số thu được trong các mẫu khác nhau sau khi thủy phân bằng ba phương án khác nhau: thủy phân bằng axit (phương án A); thủy phân bằng enzym (phương án B) và thủy phân bằng axit/kiềm (phương án C). Thông tin thêm về sự so sánh này được nêu trong [9].

Bảng C.1 – So sánh về niacin tổng số thu được thủy phân theo ba phương án khác nhau

Mẫu	A (mg/100 g)	B (mg/100 g)	C (mg/100 g)
Thực phẩm không bổ sung vi chất			
Gan bò	51,6	57,8	43,0
Dăm bông	16,9	17,1	
Bột lòng đỏ trứng	0,05	0,05	0,26
Đậu Hà Lan 1	7,2	6,4	8,7
Đậu Hà Lan 2	5,9	5,7	
Bột mì 1	0,8	0,5	2,4
Bột mì 2	0,7	0,5	
Nấm men bia khô	13,9	13,4	17,7
Gạo 1	1,3	1,3	3,6
Gạo 2	0,4	0,3	3,2
Mẫu chứa hàm lượng xơ cao	1,1	1,1	3,7
Thực phẩm bổ sung vi chất			
Bột socola 1	2,1	2,7	1,2
Bột socola 2	0,4	0,8	0,7
Sữa bột 1	8,2	7,9	9,3
Sữa bột 2	16,7	17,1	
Sữa bột 3	4,2	4,3	3,5
Nước quả	0,3	0,3	0,3

Bảng C.1 *(kết thúc)*

Mẫu	A (mg/100 g)	B (mg/100 g)	C (mg/100 g)
Ngũ cốc ăn liền 1	20,0	19,6	19,0
Ngũ cốc ăn liền 2	21,0	21,2	
Ngũ cốc ăn liền 3	21,9	20,7	19,9
Ngũ cốc ăn liền 4	12,5	12,3	12,0
Ngũ cốc ăn liền 5	16,1	18,1	16,5
Ngũ cốc ăn liền 6	15,4	15,6	15,2
Bột dành cho trẻ sơ sinh	4,0	4,3	4,7
Bánh dạng thanh ăn kiêng	15,4	16,4	15,4
Bột chứa hàm lượng protein cao 1	9,4	11,4	9,7
Bột chứa hàm lượng protein cao 2	10,7	10,3	9,0
Bột chứa hàm lượng protein cao 3	10,5	10,0	10,8
Bột thay thế	15,7	15,4	13,5
Thực phẩm bổ sung 1	2 004	2 197	2 203
Thực phẩm bổ sung 2	487	505	493
Thực phẩm bổ sung 3	2 236	2 498	2 199
Thực phẩm bổ sung 4	1 044	1 201	1 112
Thực phẩm bổ sung 5	47,5	47,4	45,7

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] To be published: Bergantzlé M., *Validation study on the determination of niacin by HPLC in several matrices*

[2] Lahély S., Bergantzlé M., Hasselmann, C.: *Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization*, Food chem., 65, 129-133 (1999)

[3] Carter E.G.A. & Carpenter K.J.: *The available niacin values of foods for rats and their relation to analytical values*. Journal of Nutrition, 112, 2091-2103 (1982)

[4] Carter E.G.A. & Carpenter K.J.: *The bioavailability for humans of bound niacin from wheat bran*. American Journal of Clinical Nutrition, 36, 855-861 (1982)

[5] Van Niekerk P.J., Smit C.C.S., Strydom, S.P., and Armbruster, G.: *Comparison of a high-erformance liquid chromatographic and microbiological method for the determination of niacin in foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32, 304-307 (1984)

[6] *UV and IR specktren wichtiger pharmazeutisher Wirkstoffe*, Hans Werner Dibbern, Edition Cantor Aulendorg, 1978

[7] Mawatari, K., Iinuma, F., Watanabe, M.: *Determination of nicotinic acid and nicotinamide in human serum by high-performance liquid chromatography with post-column ultraviolet irradiation and fluorescence detection*, Anal. Sci., 7, 733-736 (1991)

[8] Horwitz, W.: *Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Foods and Drugs*, Anal. Chem.1982, 54 (1), 67A–76A

[9] http://www.minefi.gouv.fr/dgccrf/01_presentation/activites/labos/2003/vitab3.htm

[10] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*