

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9044:2012**

**EN 15607:2009**

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH D-BIOTIN  
BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

*Foodstuffs – Determination of d-biotin by  
high performance liquid chromatography (HPLC)*

HÀ NỘI – 2012

## **Lời nói đầu**

TCVN 9044:2012 hoàn toàn tương đương với EN 15607:2009;

TCVN 9044:2012 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 d-biotin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

*Foodstuffs – Determination of d-biotin 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 d-biotin trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Phương pháp này đã được đánh giá xác nhận trong một 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, sữa bột dành cho trẻ sơ sinh, bột nghiền đậu Hà Lan với dăm bông được làm đông khô, xúp thịt gà đông khô và nước cam dinh dưỡng với các mức trong khoảng từ 16 µg/100 g đến 200 µg/100 g. Để có thêm thông tin về các dữ liệu xác nhận, xem Phụ lục B.

**CHÚ THÍCH 1:** d-biocylin cũng có thể được ước tính bằng phương pháp này. Nhưng không một mẫu nào được sử dụng cho bước xác nhận có d-biocylin. Tuy nhiên, tỷ lệ thu hồi đối với d-biotin và d-biocylin là lớn hơn 90 %, xem [2] và [3].

**CHÚ THÍCH 2:** Đối với các mẫu chứa trứng, thì phương pháp này sẽ đánh giá được lượng biotin dưới mức thực có.

## 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.

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

### 3 Nguyên tắc

D-biotin được chiết ra khỏi mẫu phân tích sau khi được xử lý bằng enzym và được định lượng bằng HPLC có phản ứng liên kết sau cột, xem [2] và [3].

Phức chất của d-biotin cùng với avidin là rất đặc trưng. Do protein này liên kết cộng hóa trị với chất đánh dấu huỳnh quang, có thể sử dụng fluorescein 5-isothiocyanate làm thuốc thử để liên kết d-biotin sau cột, xem [4] và [5].

### 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 loại 1 nêu trong TCVN 4851 (ISO 3696) hoặc nước cất hai lần, trừ khi có quy định khác.

#### 4.2 Hoá chất và các dung dịch

4.2.1 Metanol, loại dùng cho HPLC,  $w(\text{CH}_3\text{OH}) \geq 99,8 \%$  (khối lượng).

4.2.2 Dung dịch axit sulfuric, nồng độ chất  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1 \text{ mol/l}$ .

4.2.3 Dung dịch axit sulfuric,  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,5 \text{ mol/l}$ .

4.2.4 Axit xitric ngậm một phân tử nước,  $w(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}) \geq 99,7 \%$ .

4.2.5 Natri monohydro phosphat ngậm hai phân tử nước,  $w(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) \geq 99,8 \%$ .

4.2.6 Gluthation,  $w(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}) \geq 98 \%$ .

4.2.7 Muối natri ngậm hai phân tử nước EDTA,  $w(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) \geq 99 \%$ .

4.2.8 Kali monohydro phosphat,  $w(\text{K}_2\text{HPO}_4) \geq 96 \%$ .

4.2.9 Kali dihydro phosphat,  $w(\text{KH}_2\text{PO}_4) \geq 99,5 \%$ .

#### 4.2.10 Dung dịch đệm xitrat

Hòa tan 0,462 g axit xitric monohydrat (4.2.4) và 1,05 g natri monohydro phosphat ngậm hai phân tử nước (4.2.5) trong 450 ml nước cất. Chính pH của dung dịch đến 5,7 bằng dung dịch axit sulfuric (4.2.3), sau đó pha loãng bằng nước cất đến 500 ml. Dung dịch này bền được một ngày.

4.2.11 Dung dịch gluthation, nồng độ khối lượng,  $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}) = 10 \text{ g/l}$

Hòa tan 30 mg gluthation (4.2.6) trong 3 ml nước cất. Dung dịch này bền được một ngày.

**4.2.12 Dung dịch EDTA,  $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 10 \text{ g/l}$** 

Hòa tan 0,1 g EDTA (4.2.7) trong 10 ml nước cất. Dung dịch này bền được một ngày.

**4.2.13 Dung dịch kali monohydro phosphat,  $c(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$** 

Hòa tan 17,4 g kali monohydro phosphat (4.2.8) trong 1 000 ml nước cất. Dung dịch này bền được hai ngày.

**4.2.14 Dung dịch kali dihydro phosphat,  $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$** 

Hòa tan 13,6 g kali dihydro phosphat (4.2.9) trong 1 000 ml nước cất. Dung dịch này bền được hai ngày.

**4.2.15 Dung dịch đệm phosphat pH = 6,0**

Trộn các thể tích của 4.2.13 với 4.2.14 theo tỷ lệ sao cho dung dịch cuối cùng có pH bằng 6,0 (ví dụ: 30 phần thể tích 4.2.13 và 70 phần thể tích 4.2.14). Dung dịch này bền được 1 tuần ở nhiệt độ phòng.

**4.2.16 Dung dịch đệm phosphat pH = 7,0**

Trộn các dung dịch ở 4.2.13 với 4.2.14 với tỷ lệ sao cho dung dịch cuối cùng có pH bằng 7,0 (ví dụ: 40 phần thể tích 4.2.13 và 60 phần thể tích 4.2.14). Dung dịch này ổn định được trong 1 tuần ở nhiệt độ phòng.

**4.2.17 Bột papain, (CAS 9001-73-4), hoạt độ enzym là  $15 \text{ nkat/mg}^1$  với cơ chất N-benzoyl-L-arginin etyl este (BAEE) ở pH = 6,2 và nhiệt độ  $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $15 \text{ nkat/mg}$  tương ứng với  $1 \text{ U/mg}$ .**

**4.2.18 Dung dịch papain,  $\rho(\text{papain}) = 20 \text{ g/l}$** **4.2.18.1 Yêu cầu chung**

Hòa tan 1 g bột papain (4.2.17) trong 50 ml dung dịch đệm xitrat (4.2.10). Dung dịch này khi được bảo quản ở nhiệt độ  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  có thể bền được 5 ngày.

**4.2.18.2 Kiểm tra hoạt độ của papain**

Hoạt độ của papain có thể được kiểm tra bằng cách chiết lần thứ hai (xem 6.2) với một lượng enzym lớn gấp đôi. Kiểm tra để chắc chắn rằng mức d-biotin là như nhau.

CHÚ THÍCH: Đối với nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, đã sử dụng bột papain của VWR International GmbH, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt, ref. nr. 26.146.180<sup>2</sup>.

<sup>1)</sup> Katal (kí hiệu "kat") là đơn vị hoạt độ enzym trong hệ SI. Hoạt tính xúc tác của một katal sẽ làm tăng tốc độ phản ứng lên một mol/s trong hệ thống thử nghiệm xác định.

<sup>2)</sup> Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, còn tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

**4.2.19 Avidin fluorescein isothiocyanat (Avidin-FITC)**, được dán nhãn 80 % protein, từ 2 mol đến 4 mol FITC trên mol avidin.

**4.2.20 Dung dịch thuốc thử gốc dùng cho phản ứng sau cột**,  $\rho(\text{avidin-FITC}) = 50 \text{ mg/ml}$

Hòa tan 2,5 g avidin-FITC (4.2.19) trong 50 ml dung dịch đệm phosphat pH = 7,0 (4.2.16). Dung dịch này khi bảo quản ở nhiệt độ 4 °C có thể bền được 2 tuần.

**4.2.21 Thuốc thử dùng cho phản ứng liên kết sau cột**,  $\rho(\text{avidin-FITC}) = 2 \text{ mg/ml}$

Cho 600 ml dung dịch đệm phosphat có pH = 7,0 (4.2.16) vào 25 ml dung dịch gốc (4.2.20). Lọc dung dịch này qua một bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45  $\mu\text{m}$  (5.5). Dung dịch này khi bảo quản tránh ánh sáng có thể bền được 8 h.

**4.2.22 Pha động dùng cho HPLC**

Trộn 80 phần thể tích dung dịch đệm phosphat có pH = 6,0 (4.2.15) với 20 phần thể tích metanol (4.2.1). Lọc dung dịch này qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45  $\mu\text{m}$  (5.5).

**4.2.23 Taka-diaxataza từ *Aspergillus Oryzae***, hoạt độ của enzym là 1 500 nkat/mg (1 500 nkat/mg tương ứng với 100 U/mg), thích hợp cho các mẫu có hàm lượng tinh bột cao.

### 4.3 Chất chuẩn

#### 4.3.1 Yêu cầu chung

D-biotin và d-biocylin có thể thu được từ các nhà cung cấp khác nhau. Sự tách đường nền của d-biotin và d-biocylin phải được kiểm tra, vì cần d-biotin và d-biocylin để chuẩn bị dung dịch chuẩn.

Hàm lượng biotin của chất chuẩn có thể được kiểm tra xác nhận theo quy trình Dược điển Châu Âu [6].

**4.3.2 d-biotin**,  $w(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}) \geq 99 \%$ .

**4.3.3 d-biocylin**,  $w(\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}) \geq 98 \%$ .

### 4.4 Dung dịch gốc

**4.4.1 d-biotin**,  $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}) = 100 \mu\text{g/ml}$

Hòa tan khoảng 10 mg chất chuẩn d-biotin (4.3.2), được cân chính xác đến 0,1 mg, trong 100 ml nước cất. Có thể mát 4 h đến 5 h để hòa tan chất chuẩn. Dung dịch này khi được bảo quản ở - 18 °C có thể bền được 2 tháng.

**4.4.2 d-biocylin,  $\rho(C_{16}H_{28}N_4O_4S) = 100 \mu\text{g/ml}$** 

Hòa tan khoảng 10 mg chất chuẩn d-biocylin (4.3.3), được cân chính xác đến 0,1 mg, trong 100 ml nước cất. Có thể mất 4 h đến 5 h để hòa tan. Dung dịch này khi được bảo quản ở  $-18^\circ\text{C}$  có thể bền được 2 tháng.

**4.5 Dung dịch chất chuẩn****4.5.1 Dung dịch d-biotin,  $\rho(C_{10}H_{16}N_2O_3S) = 0,05 \mu\text{g/ml}$  đến  $0,30 \mu\text{g/ml}$** 

Ví dụ chuẩn bị một dung dịch chứa 1 ml dung dịch gốc (4.4.1) trong 10 ml nước cất. Sau đó chuẩn bị sáu dung dịch hiệu chuẩn (0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,5 ml và 3 ml) trong 100 ml nước cất. Dung dịch này bền được một ngày.

**4.5.2 d-biocylin,  $\rho(C_{16}H_{28}N_4O_4S) = 0,30 \mu\text{g/ml}$** 

Chuẩn bị dung dịch, ví dụ: 1 ml dung dịch gốc (4.4.2) trong 10 ml nước cất. Sau đó chuẩn bị dung dịch chuẩn 3 ml trong 100 ml nước cất. Dung dịch này bền được một ngày.

**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 Tủ sấy**

Có thể duy trì nhiệt độ ở  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

**5.3 Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

Gồm có bơm, bộ phận bơm mẫu, detector huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 490 nm, bước sóng phát xạ ở 520 nm và có hệ thống đánh giá, ví dụ: bộ tích phân.

**5.4 Cột phân tích pha đảo, ví dụ: LiChrospher® 100 RP-18<sup>3</sup>**

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

- dài 250 mm;
- đường kính trong 4,0 mm;

<sup>3</sup> LiChrospher® 100 RP-18 là một 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, còn tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

c) cỡ hạt 5 µm.

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

## 5.5 Thiết bị lọc

Dụng cụ lọc cỡ lớn và cỡ nhỏ để lọc pha động dùng cho HPLC và lọc các dung dịch mẫu tương ứng, ví dụ: cỡ lỗ 0,45 µm là thích hợp.

**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.

## 5.6 Hệ thống tạo dẫn xuất phản ứng sau cột

Gồm có một hệ thống phân phối thuốc thử thích hợp, một ống nối kiểu chữ T sau ống phản ứng mở (KOT) làm bằng ống polytetrafluoretylen (PTFE), dài 10 m, đường kính trong 0,5 mm và đường kính vòng xoắn 14 mm được chuẩn bị theo ví dụ [7] (kiểu KOT2). Ống phản ứng mở có bán sẵn trên thị trường, ví dụ của hãng Supelco<sup>4</sup> hoặc MicroSolv Tech.

## 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 cho mẫu không bị tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian dài.

### 6.2 Chiết mẫu

Cân một lượng mẫu thử thích hợp, ví dụ: khoảng từ 0,5 g đến 10 g (tương đương với từ 2 µg đến 15 µg d-biotin trong phần mẫu thử), chính xác đến 1 mg, cho vào bình nón. Cho 300 µl dung dịch glutathion (4.2.11), 300 µl dung dịch EDTA (4.2.12), 30 ml dung dịch đệm xitrat (4.2.10) và 3 ml dung dịch papain (4.2.18). Nếu mẫu có chứa hàm lượng tinh bột cao, thì thêm 100 mg taka-diastraza (4.2.23). Ủ dung dịch qua đêm ở nhiệt độ 37 °C trong tủ ấm có khuấy liên tục. Sau khi làm nguội, chuyển dung dịch sang bình định mức và pha loãng bằng nước cất đến 50 ml. Trộn dung dịch và lọc qua giấy lọc. Lọc lại qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 µm (5.5) 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.

<sup>4</sup> Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, còn tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho các kết quả tương đương.



### 6.3 Chạy sắc ký

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

Vì tính ổn định của thuốc thử liên kết (4.2.21) bị hạn chế, nên cần kiểm tra trong quá trình chạy sắc ký bằng cách thường xuyên bơm dung dịch chuẩn.

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

Pha tĩnh: LiChrospher® 100 RP-18, cỡ hạt 5 µm, kích thước 250 mm x 4,0 mm;

Pha động: 8 phần thể tích dung dịch đệm phosphat pH = 6,0 (4.2.15) và 2 phần thể tích metanol (4.2.1);

Tốc độ dòng: 0,4 ml/min

Thể tích bơm: 30 µl

Detector huỳnh quang: bước sóng kích thích 490 nm và bước sóng phát xạ 520 nm;

Tốc độ dòng thuốc thử tạo dẫn xuất sau cột: 1 ml/min.

CHÚ THÍCH: Quy trình này cũng có thể được sử dụng để đánh giá d-biocylin.

## 7 Tính kết quả

Thực hiện phép xác định bằng ngoại chuẩn, tích phân diện tích pic hoặc chiều cao pic và sử dụng đường chuẩn bậc hai.

Tính phần khối lượng,  $w$ , của d-biotin, bằng µg/100 g mẫu, theo công thức (1) sau đây:

$$w = \frac{\rho \times V_e}{m_s} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó:

$\rho$  là nồng độ của d-biotin trong dung dịch mẫu thử (6.2) tính được từ đường chuẩn bậc hai, tính bằng microgram trên mililit, (µg/ml);

$V_e$  là thể tích dung dịch mẫu thử (6.2), tính bằng mililit (ml);

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

100 là hệ số để tính hàm lượng trên 100 g;

## 8 Độ chụm

### 8.1 Yêu cầu chung

Dữ liệu về độ chụm của phương pháp HPLC này về xác định d-biotin được thiết lập năm 2000 từ phép thử cộng tác của Pháp, do CGd'UMA (Commission Générale d'Unification des Méthodes d'Analyses) tổ chức, xem [3], phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), [1]. Các đường chuẩn được tất cả các bên tham gia sử dụng được tính từ ba điểm hiệu chuẩn. Các thông tin thống kê được nêu trong 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, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại  $r$ .

Các giá trị đối với d-biotin là:

Bột ngũ cốc ăn nhanh:  $\bar{x} = 197 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $r = 25,1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

Sữa bột dành cho trẻ sơ sinh:  $\bar{x} = 16,0 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $r = 5,24 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

Nước cam có bổ sung vi chất:  $\bar{x} = 40,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $r = 2,51 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

Bột nghiền đậu Hà Lan với dăm  
bông được làm đông khô:  $\bar{x} = 88,9 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $r = 8,99 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

Xúp gà đông khô:  $\bar{x} = 168 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $r = 19,4 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

### 8.3 Độ tái lập

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

Các giá trị đối với d-biotin là:

Bột ngũ cốc ăn nhanh:  $\bar{x} = 197 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $R = 96,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

Sữa bột dành cho trẻ sơ sinh:  $\bar{x} = 16,0 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $R = 13,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

Nước cam có bổ sung vi chất:  $\bar{x} = 40,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $R = 22,8 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

Bột nghiền đậu Hà Lan với dăm  
bông được làm đông khô:  $\bar{x} = 88,9 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $R = 44,1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

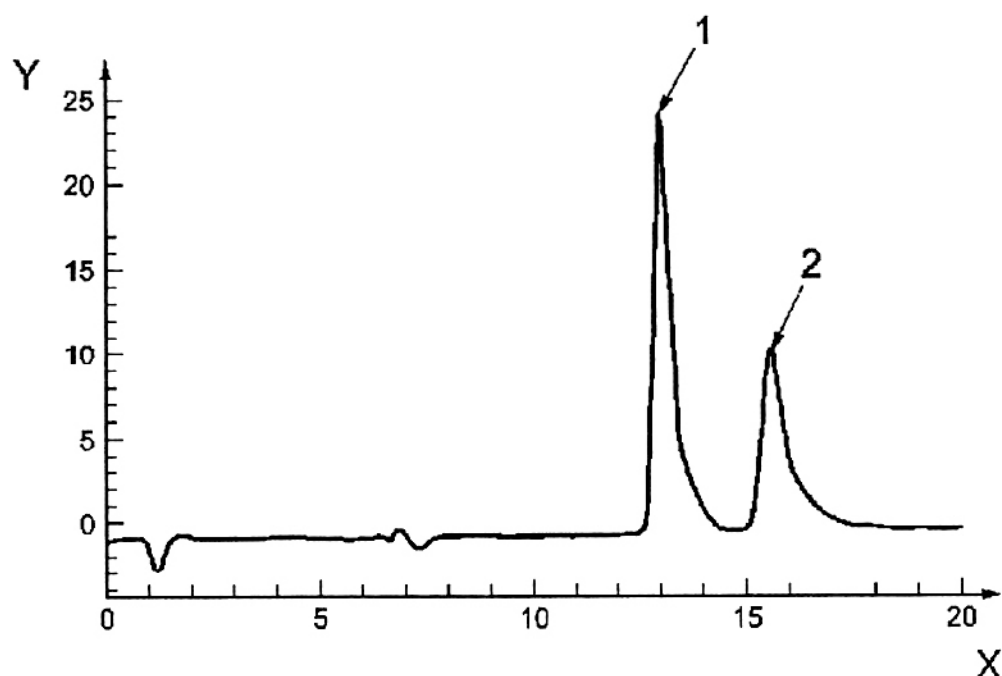
Xúp gà đông khô:  $\bar{x} = 168 \mu\text{g}/100 \text{ g}$   $R = 69,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

## 9 Báo cáo thử nghiệm

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

- 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;
- 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) mọi chi tiết đặc biệt quan sát được trong khi thử nghiệm;
- h) mọi chi tiết không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)  
**Sắc ký đồ điện hình**



**CHÚ DẪN:**

X là thời gian, tính bằng phút (min)

Y là cường độ huỳnh quang

1 d-biotin

2 d-biocylin

**Hình A.1 – Ví dụ về tách bằng HPLC đối với các chất chuẩn  
d-biotin và d-biocylin có tạo dẫn xuất sau cột**

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

Pha tĩnh: Lichrospher® 100 RP-18, cỡ hạt 5 µm, kích thước 250 mm x 4,0 mm;

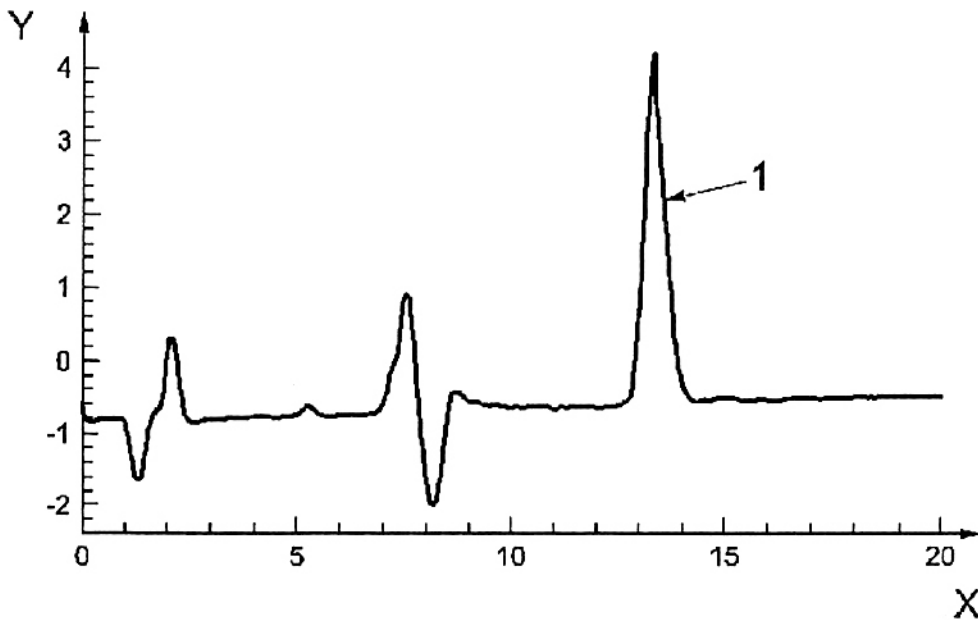
Pha động: 8 thể tích dung dịch đệm phosphat pH = 6,0 (4.2.15) và 2 thể tích metanol (4.2.1);

Tốc độ dòng: 0,4 ml/min;

Thể tích bơm: 30 µl;

Detector huỳnh quang: bước sóng kích thích 490 nm và bước sóng phát xạ 520 nm;

Tốc độ dòng thuốc thử (tạo dẫn xuất sau cột): 1 ml/min.

**CHÚ DẪN:**

X là thời gian, tính bằng phút (min)

Y là cường độ huỳnh quang

1 d-biotin

**Hình A.2 – Sắc đồ ký điện hình với tạo dẫn xuất sau cột của d-biotin trong sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh**

Các điều kiện thực nghiệm nêu trong Hình A.2 là:

- Pha tĩnh: Lichrospher® 100 RP-18, cỡ hạt 5  $\mu\text{m}$ , kích thước 250 mm x 4,0 mm;
- Pha động: 8 phần thể tích dung dịch đệm phosphat pH = 6,0 (4.2.15) và 2 phần thể tích metanol (4.2.1);
- Tốc độ dòng: 0,4 ml/min;
- Thể tích bơm: 30  $\mu\text{l}$ ;
- Detector huỳnh quang: bước sóng kích thích 490 nm và bước sóng phát xạ 520 nm;
- Tốc độ dòng thuốc thử (tạo dẫn xuất sau cột): 1 ml/min.

**Phụ lục B**  
(Tham khảo)

**Dữ liệu về độ chụm**

Các dữ liệu sau đây thu được trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm do CGd'UMA (Commission Générale d'Unification des Méthodes d'Analyses) tổ chức năm 2000, xem [3] và [8]. Phép thử này được thực hiện phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) [1]. Các đường chuẩn được tất cả các bên tham gia sử dụng được tính từ ba điểm hiệu chuẩn.

**Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm đối với bột ngũ cốc ăn nhanh, sữa bột dành cho trẻ sơ sinh, nước cam có bổ sung vi chất, hạt đậu xanh phủ muối đông khô, xúp gà đông khô**

Mẫu	Bột ngũ cốc ăn nhanh	Sữa bột dành cho trẻ sơ sinh	Nước cam có bổ sung vi chất	Bột nghiền đậu Hà Lan với dăm bông được làm đông khô	Xúp gà đông khô
Năm thử nghiệm	2000	2000	2000	2000	2000
Số lượng phòng thử nghiệm	10	10	10	10	10
Số lượng mẫu	2	2	2	2	2
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	10	9	10	10	10
Số lượng phòng ngoại lệ	0	1	0	0	0
Số lượng kết quả được chấp nhận	20	18	20	20	20
Giá trị trung bình, $\bar{x}$ ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	197	16,0	40,7	88,9	168
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	8,85	1,85	0,89	3,18	6,84
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r$ , %	4,5	11,6	2,2	3,6	4,1
Giới hạn độ lặp lại, $r$ ( $r = 2,8 \times s_r$ ) ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	25,1	5,24	2,51	8,99	19,4
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	34,2	4,76	8,05	15,6	24,6
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R$ , %	17,4	29,8	19,8	17,5	14,6
Giới hạn tái lập, $R$ ( $R = 2,8 \times s_R$ ) ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	96,7	13,5	22,8	44,1	69,5
Giá trị Horrat [8]	1,2	1,4	1,1	1,1	1,0

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] 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*
  - [2] Lahély, S., Ndaw, S., Arella, F., Hasselmann, C.: Determination of biotin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorimetric detection. *Food chem.*, 65, 253-258 (1999)
  - [3] Arella, F., Deborde, J.L., Bourguignon, J.B., Bergaentze, M., Ndaw, S., Hasselmann, C.: Liquid chromatographic determination of biotin in foods. A collaborative study. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 93, 951, 193-200 (2000).
  - [4] Hentz, N.G., Bachas, L.G.: Class-selective detection systems for liquid chromatography based on the streptavidin-biotin interaction. *Anal. Chem.*, 67, 1014-1018 (1995)
  - [5] Przyjazny, A., Hentz, N.G., Bachas, L.G.: Sensitive and selective liquid chromatographic post-column reaction detection system for biotin and biocytin using an homogeneous fluorophore-linked assay. *J. chromatogr.*, 654, 79-86 (1993).
  - [6] European Pharmacopoeia 5.0, 01/2005: 1073, page 110.
  - [7] Selavska, C.M., Jino, K.S., Krull, I.S.: Construction and comparison of open tubular reactors for post-column reaction detection in liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 59, 2221-2224 (1987)
  - [8] Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Foods and Drugs, W. Horwitz, *Anal. Chem.* 1982, 54 (1), 67A - 76A.
-