



**Mục lục****Trang**

• TCVN 8970 : 2011	Thực phẩm – Xác định iot-131, bari-140 và ccsi-137 bằng phương pháp đo phổ gamma.	5
• TCVN 8971 : 2011	Thực phẩm – Xác định ccsi-134 và ccsi-137 bằng phương pháp đo phổ gamma.	13
• TCVN 8972 -1 : 2011 EN 12823-1 : 2000	Thực phẩm – Xác định vitamin A bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Phần 1 : Xác định 13-cis-retinol và tất cả các đồng phân trans-retinol.	21
• TCVN 8972-2 : 2011 EN 1283-2 : 2000	Thực phẩm – Xác định vitamin A bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Phần 2 : Xác định $\beta$ -caroten.	37
• TCVN 8973 : 2011 EN 12821 : 2009	Thực phẩm – Xác định vitamin D bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Xác định cholecalciferol (D3) hoặc ergocalciferol(D2).	51
• TCVN 8974 : 2011 EN 14148 : 2003	Thực phẩm – Xác định vi ta min K <sub>1</sub> bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).	75
• TCVN 8975 : 2011 EN 14152 : 2003	Thực phẩm – Xác định vitamin B <sub>2</sub> bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).	91
• TCVN 8976 : 2011 EN 14166: 2009	Thực phẩm – Xác định vitamin B <sub>6</sub> bằng phép thử vi sinh.	105
• TCVN 8977 : 2011 EN 14130 : 2003	Thực phẩm – Xác định vitamin C bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).	121
• TCVN 8978 : 2011 EN 14131 : 2003	Thực phẩm – Xác định folat bằng phép thử vi sinh.	133

## **Lời nói đầu**

TCVN 8970 : 2011 Được xây dựng dựa trên AOAC 973.67 Iodine-131, Barium-140 and Cesium-137 in milk and other foods. Gamma-ray spectroscopic method;

TCVN 8971 : 2011 Được xây dựng dựa trên AOAC 996.05 Cesium-134 and Cesium-137 in foods.  $\gamma$ -Ray spectrometric method;

TCVN 8972-1 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 12823-1 : 2000;

TCVN 8972-2 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 12823-2 : 2000;

TCVN 8973 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 12821 : 2009;

TCVN 8974 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14148 : 2003 và đính chính kỹ thuật 2005;

TCVN 8975 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14152 : 2003;

TCVN 8976 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14166 : 2009;

TCVN 8977 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14130 : 2003;

TCVN 8978 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14131 : 2003;

TCVN 8970 : 2011; TCVN 8971 : 2011; TCVN 8972-1 : 2011; TCVN 8972-2 : 2011; TCVN 8973 : 2011 ÷ TCVN 8978 : 2011 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 đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Thực phẩm – Xác định vitamin D bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Xác định cholecalciferol (D<sub>3</sub>) hoặc ergocalciferol (D<sub>2</sub>)

*Foodstuffs – Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography –  
Measurement of cholecalciferol (D<sub>3</sub>) or ergocalciferol (D<sub>2</sub>)*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) hoặc vitamin D<sub>2</sub> (ergocalciferol) trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Vitamin D<sub>3</sub> có chủ yếu trong thực phẩm từ nguồn gốc động vật, còn vitamin D<sub>2</sub> có chủ yếu từ nấm tự nhiên. Cả vitamin D<sub>3</sub> và vitamin D<sub>2</sub> có thể có mặt trong các loại thực phẩm bổ sung vi chất. Tiêu chuẩn này không áp dụng để xác định cả hàm lượng D<sub>3</sub> lẫn vitamin D<sub>2</sub>.

Tách vitamin D<sub>3</sub> và vitamin D<sub>2</sub> ra khỏi vitamin D dạng ban đầu, các chất chuyển hóa tương ứng 25-hydroxy vitamin D và 1,25-dihydroxy vitamin D cũng tham gia vào hoạt tính của vitamin D. Tiêu chuẩn này chỉ xác định vitamin D<sub>3</sub> hoặc vitamin D<sub>2</sub>.

Tiêu chuẩn này dùng làm cơ sở cho các phép phân tích. Tiêu chuẩn này được dùng làm khung để người phân tích xác định công việc phân tích theo quy trình chuẩn.

Phương pháp này đã được đánh giá qua phép thử liên phòng thử nghiệm trên các mẫu có bổ sung vi chất và không bổ sung vi chất như margarin, sữa, bột sữa, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng, thức ăn theo công thức dành cho trẻ sơ sinh, dầu ăn và dầu cá ở các mức từ 0,4 µg/100 g đến 14 µg/100 g. Thông tin thêm về dữ liệu đánh giá được nêu trong Phụ lục D.

### 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. 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, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

### 3 Nguyên tắc

Vitamin D<sub>3</sub> và vitamin D<sub>2</sub> có trong mẫu thực phẩm được xà phòng hóa bằng dung dịch kali hydroxit trong ancol và được chiết bằng dung môi thích hợp. Việc xác định vitamin D<sub>3</sub> hoặc vitamin D<sub>2</sub> trong dung dịch chiết mẫu thích hợp được tiến hành bằng HPLC bán điều chế dùng pha thường sau đó được phân tích tiếp bằng HPLC pha đảo.

Nếu cần xác định vitamin D<sub>3</sub> thì vitamin D<sub>2</sub> được dùng làm chất nội chuẩn. Nếu cần xác định vitamin D<sub>2</sub> thì dùng vitamin D<sub>3</sub> làm chất nội chuẩn.

Vitamin D được phát hiện bằng đo phổ tử ngoại (UV) và các pic được nhận biết dựa vào thời gian lưu và sắc phổ nếu sử dụng detector mảng diot (DAD). Phép xác định được tiến hành bằng quy trình nội chuẩn, sử dụng diện tích pic hoặc chiều cao pic, xem [1] đến [8].

### 4 Thuốc thử

#### 4.1 Yêu cầu chung

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

#### 4.2 Metanol

4.3 Etanol,  $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 100\%$  thể tích.

4.4 Etanol,  $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 96\%$ .

4.5 Natri sulfat, khan.

4.6 Dung dịch KOH để xà phòng hóa, có các nồng độ thích hợp, ví dụ có nồng độ khối lượng  $\rho(\text{KOH}) = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$  hoặc  $\rho(\text{KOH}) = 60 \text{ g}/100 \text{ ml}$ , hoặc các dung dịch trong ancol, ví dụ 28 g KOH trong 100 ml hỗn hợp etanol và nước (etanol 90 % thể tích).

4.7 Chất chống oxi hóa, như axit ascorbic (AA), natri ascobat, pyrogallol, natri sulfit ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) hoặc hydroxytoluen đã butyl hóa (BHT).

4.8 Dung môi và dung môi chiết, như dietyl ete (không chứa peroxit), diclorometan, dầu nhẹ, *n*-hexan, etylaxetat hoặc các hỗn hợp của chúng.

#### 4.9 Pha động dùng cho HPLC

##### 4.9.1 Ví dụ về hỗn hợp dung môi dùng cho HPLC bán điều chế dùng pha thường.

Các ví dụ về hỗn hợp dung môi thích hợp (tính theo thể tích) dùng cho HPLC bán điều chế dùng pha

thường, bao gồm:

- *n*-hexan và 2-propanol (98 + 2), (99 + 1) hoặc (95 + 5);
- *n*-hexan và isoamyl ancol (99 + 1);
- *n*-hexan, 2-propanol và tetrahydrofuran (98 + 1 + 1);
- *iso*-octan và *iso*-butanol (99 + 1);
- *n*-heptan và 2-propanol (97 + 3).

#### 4.9.2 Ví dụ về dung môi và hỗn hợp dung môi dùng cho HPLC phân tích pha đảo

Các ví dụ về dung môi và hỗn hợp dung môi (tính theo thể tích) dùng cho HPLC phân tích pha đảo, bao gồm:

- metanol;
- metanol và nước (95 + 5) hoặc (93 + 7);
- axetonitril và metanol (80 + 20), (90 + 10) hoặc (70 + 30);
- axetonitril, cloroform và metanol (93 + 4 + 3).

### 4.10 Chất chuẩn

#### 4.10.1 Chất chuẩn ergocalciferol (vitamin D<sub>2</sub>), $M(C_{28}H_{44}O) = 396,7$ g/mol

Chất chuẩn vitamin D<sub>2</sub> có độ tinh khiết cao nhất (lớn hơn 98 % khối lượng) và được bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất (tránh ánh sáng, ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C).

#### 4.10.2 Chất chuẩn cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>), $M(C_{27}H_{44}O) = 384,6$ g/mol

Chất chuẩn vitamin D<sub>3</sub> có độ tinh khiết cao nhất (lớn hơn 98 % khối lượng) và phải được bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất (tránh ánh sáng, ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C).

### 4.11 Dung dịch gốc

#### 4.11.1 Dung dịch gốc vitamin D<sub>2</sub>

Cân khoảng 100 mg vitamin D<sub>2</sub> (4.10.1) chính xác đến miligam, cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml, hòa tan trong etanol (4.4) và thêm etanol này đến vạch. Dung dịch này chứa khoảng 1 mg/ml vitamin D<sub>2</sub>. Bảo quản dung dịch này ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C và tránh ánh sáng.

## TCVN 8973:2011

Tính nồng độ khối lượng của dung dịch gốc và phần khối lượng của chất chuẩn vitamin D<sub>2</sub> bằng quy trình mô tả trong 4.12.1.

Dung dịch này có thể bền đến 6 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ -18 °C.

### 4.11.2 Dung dịch gốc vitamin D<sub>3</sub>

Cân khoảng 100 mg vitamin D<sub>3</sub> (4.10.2) chính xác đến miligam, cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml, hòa tan trong etanol (4.4) và thêm etanol đến vạch. Dung dịch này chứa khoảng 1 mg/ml vitamin D<sub>3</sub>. Bảo quản dung dịch này ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C và tránh ánh sáng.

Tính nồng độ khối lượng của dung dịch gốc và phần khối lượng của chất chuẩn vitamin D<sub>3</sub> bằng quy trình mô tả trong 4.12.2.

Dung dịch này có thể bền đến 6 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ -18 °C.

## 4.12 Dung dịch chuẩn

### 4.12.1 Dung dịch chuẩn vitamin D<sub>2</sub>

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch gốc vitamin D<sub>2</sub> (4.11.1) cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml và pha loãng đến vạch bằng etanol (4.4). Dung dịch này chứa khoảng 10 µg/ml vitamin D<sub>2</sub>. Chuẩn bị dung dịch này trong ngày sử dụng.

CHÚ THÍCH Nồng độ khối lượng của dung dịch chuẩn có thể được điều chỉnh để phù hợp với yêu cầu phân tích, nếu cần.

Đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn vitamin D<sub>2</sub> trong cuvet thạch anh 1 cm ở bước sóng 265 nm, dùng etanol trong cuvet đối chứng. Tính nồng độ khối lượng của vitamin D<sub>2</sub>, ρ<sub>D<sub>2</sub></sub>, tính bằng microgam trên mililit dung dịch chuẩn, theo Công thức (1):

$$\rho_{D_2} = \frac{A_{265} \times M_{D_2} \times 1000}{\epsilon \times b} \quad (1)$$

Trong đó

$A_{265}$  là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn vitamin D<sub>2</sub> ở bước sóng 265 nm;

$M_{D_2}$  là khối lượng phân tử của vitamin D<sub>2</sub> ( $M_{D_2} = 396.7$  g/mol);

$\epsilon$  là hệ số hấp thụ phân tử của vitamin D<sub>2</sub> (ở đây:  $\epsilon = 18\,843$  m<sup>2</sup>/mol, được tính từ giá trị  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ , xem [9]);

$b$  là chiều dài đường quang của cuvet thạch anh, tính bằng centimet (cm).

#### 4.12.2 Dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub>

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch gốc vitamin D<sub>3</sub> (4.11.2) cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml và pha loãng đến vạch bằng etanol (4.4). Dung dịch này chứa khoảng 10 µg/ml vitamin D<sub>3</sub>. Chuẩn bị dung dịch này trong ngày sử dụng.

CHÚ THÍCH Nồng độ khối lượng của dung dịch chuẩn có thể được điều chỉnh để phù hợp với yêu cầu phân tích, nếu cần.

Đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub> trong cuvet thạch anh 1 cm ở bước sóng 265 nm, dùng etanol (4.4) trong cuvet đối chứng. Tính nồng độ khối lượng của vitamin D<sub>3</sub>, ρ<sub>D<sub>3</sub></sub>, tính bằng microgam trên mililit dung dịch chuẩn, theo Công thức (2):

$$\rho_{D_3} = \frac{A_{265} \times M_{D_3} \times 1000}{\epsilon \times b} \quad (2)$$

Trong đó

$A_{265}$  là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub> ở bước sóng 265 nm;

$M_{D_3}$  là khối lượng phân tử của vitamin D<sub>3</sub> ( $M_{D_3} = 384,6$  g/mol);

$\epsilon$  là hệ số hấp thụ phân tử của vitamin D<sub>3</sub> (trong đó:  $\epsilon = 18\,461$  m<sup>2</sup>/mol, được tính từ giá trị  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ , xem [9]);

$b$  là chiều dài đường quang của cuvet thạch anh, tính bằng centimet (cm).

#### 4.13 Dung dịch nội chuẩn

##### 4.13.1 Dung dịch nội chuẩn vitamin D<sub>2</sub>

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch chuẩn vitamin D<sub>2</sub> (4.12.1) cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml và pha loãng đến vạch bằng etanol (4.4). Chuẩn bị dung dịch này trong ngày sử dụng.

##### 4.13.2 Dung dịch nội chuẩn vitamin D<sub>3</sub>

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub> (4.12.2) cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml và pha loãng đến vạch bằng etanol (4.4). Chuẩn bị dung dịch này trong ngày sử dụng.

CHÚ THÍCH Nếu cần xác định vitamin D<sub>3</sub> thì dùng vitamin D<sub>2</sub> làm chất nội chuẩn. Nếu cần xác định vitamin D<sub>2</sub> thì dùng vitamin D<sub>3</sub> làm chất nội chuẩn.

#### 4.14 Dung dịch chuẩn bán điều chế vitamin D<sub>2</sub> và vitamin D<sub>3</sub>

Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch chuẩn vitamin D<sub>2</sub> (4.12.1) và 5 ml dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub> (4.12.2) cho vào bình cô quay và cẩn thận loại bỏ dung môi (ở không quá 40 °C). Hòa lại cặn trong 100 ml pha động dùng cho HPLC bán điều chế (4.9.1).



## **TCVN 8973:2011**

Nồng độ của chất chuẩn bán điều chế có thể được điều chỉnh để phù hợp với hệ thống HPLC sử dụng (5.4 hoặc 5.5), nếu cần.

### **4.15 Dung dịch chuẩn phân tích vitamin D<sub>2</sub> và vitamin D<sub>3</sub>**

Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch chuẩn vitamin D<sub>2</sub> (4.12.1) và 5 ml dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub> (4.12.2) cho vào bình cô quay và cẩn thận loại bỏ dung môi (ở nhiệt độ không quá 40 °C). Hòa lại cặn trong 50 ml pha động dùng cho phân tích HPLC (4.9.2).

## **5 Thiết bị, dụng cụ**

### **5.1 Yêu cầu chung**

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

**5.2 Máy đo phổ UV**, có thể đo ở bước sóng 265 nm.

**5.3 Máy cô quay**, có nồi cách thủy và bộ phận hút chân không.

CHÚ THÍCH Nên dùng nitơ để tạo chân không.

**5.4 Hệ thống HPLC bán điều chế**, gồm có bơm, bộ bơm mẫu, detector UV, bộ phận thu nhận phần dịch lỏng xác định chất rửa giải, máy ghi hoặc máy tích phân.

**5.5 Hệ thống phân tích HPLC**, gồm có bơm, bộ bơm mẫu, detector UV, máy ghi/máy tích phân hoặc dụng cụ phân tích dữ liệu tương tự.

### **5.6 Cột HPLC**

**5.6.1 Cột pha thường bán điều chế**, ví dụ cột silica hoặc được gắn cyano-amino, cỡ hạt 5 µm, đường kính từ 4,0 mm đến 8,0 mm, dài 250 mm đến 300 mm. Xem thêm thông tin trong Phụ lục A.

**5.6.2 Cột phân tích pha đảo**, ví dụ pha đảo C<sub>18</sub>, cỡ hạt 5 µm, đường kính từ 4,0 mm đến 4,6 mm, dài 250 mm. Xem thêm thông tin trong Phụ lục A.

#### **5.6.3 Vật liệu nhồi**

Có thể sử dụng cỡ hạt và kích thước cột khác với quy định trong tiêu chuẩn này, nhưng người phân tích phải đảm bảo rằng cột này tách được hết các vitamin D ra khỏi các chất nhiễu nền, nếu thu được các kết quả tương đương.

## 5.7 Dụng cụ lọc

Bộ lọc loại nhỏ và lớn để lọc pha động dùng cho HPLC và các dung dịch mẫu tương ứng, ví dụ: cỡ lỗ 0,45  $\mu\text{m}$  hoặc loại tương tự là thích hợp.

CHÚ THÍCH Lọc pha động cũng như dung dịch mẫu thử qua màng lọc trước khi dùng hoặc trước khi bơm thường làm tăng thời gian sử dụng của cột.

## 6 Cách tiến hành

### 6.1 Yêu cầu chung

Vitamin D<sub>2</sub> và vitamin D<sub>3</sub> rất nhạy với bức xạ UV và các chất oxi hóa (ví dụ: oxi của không khí). Vì vậy cần ngăn ánh sáng UV bằng cách sử dụng dụng cụ thủy tinh màu hổ phách, lá nhôm hoặc các vật liệu hấp thụ UV. Các chất chống oxi hóa cần được bổ sung vào các dung dịch chứa vitamin đã chiết và thổi nitơ. Các dung môi phải được làm bay hơi dưới áp suất giảm, dùng máy cô quay ở nhiệt độ không lớn hơn 40 °C.

### 6.2 Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hóa mẫu thử. Nghiền kỹ mẫu thô và đồng hóa trong máy nghiền trộn thực phẩm hoặc máy hóa lỏng. Chú ý, làm lạnh sơ bộ để mẫu không tiếp xúc với nhiệt độ cao. Sau khi chuẩn bị, mẫu thử phải được phân tích ngay. Bảo vệ mẫu tránh ánh sáng.

### 6.3 Chuẩn bị dung dịch thử

#### 6.3.1 Xà phòng hóa

Xà phòng hóa từ 10 g đến 30 g mẫu bằng cách cho đối lưu, tốt nhất là dưới dòng nitơ, dùng các lượng thích hợp etanol (4.4), nước, chất chống oxi hóa (4.7) như axit ascorbic, natri ascorbat hoặc pyrogallol và một dung dịch kali hydroxit (4.6). Thêm các chất chống oxi hóa vào mẫu trước khi bổ sung kali hydroxit. Có thể bổ sung natri sulfite (4.7) để tránh ảnh hưởng bởi lượng vết của các ion kim loại.

Nếu cần xác định vitamin D<sub>3</sub> thì dùng pipet lấy một lượng thích hợp dung dịch nội chuẩn vitamin D<sub>2</sub> (4.13.1) cho vào bình xà phòng hóa. Lượng dung dịch nội chuẩn vitamin D<sub>2</sub> được bổ sung phải bằng lượng vitamin D<sub>3</sub> được dự kiến trong mẫu. Nếu cần xác định vitamin D<sub>2</sub> thì cần bổ sung dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub> (4.13.2) làm chất nội chuẩn.

Mẫu không chứa chất nội chuẩn phải được thực hiện cùng quá trình phân tích để đảm bảo không có chất gây nhiễu nền cho mẫu tại thời gian lưu của chất nội chuẩn.

Các ví dụ về tỷ lệ phù hợp của các thuốc thử được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Các ví dụ về tỷ lệ phù hợp của các thuốc thử

Mẫu	Etanol	Pyrogallol	Axit ascorbic/ Natri ascorbat	Kali hydroxit
từ 10 g đến 30 g	100 ml	từ 0,5 g đến 1 g	từ 1,0 g đến 2,5 g	50 ml dung dịch 50 g/100 ml

Khoảng thời gian thông thường của quá trình xà phòng hóa là từ 20 min đến 45 min có nhiệt độ từ 70 °C đến 100 °C. Quá trình xà phòng hóa cũng có thể được thực hiện qua đêm ở nhiệt độ phòng (khoảng 16 h).

Nếu sau khi xà phòng hóa và làm nguội, có chất béo hoặc dầu thực vật nổi trên bề mặt hỗn hợp xà phòng hóa thì cần bổ sung kali hydroxit trong etanol và kéo dài thời gian xà phòng hóa.

CHÚ THÍCH Các điều kiện phù hợp để xà phòng hóa margarin và bột sữa được nêu trong Phụ lục B.

### 6.3.2 Chiết

Để tránh tạo nhũ, cần bổ sung một lượng nước vào dung dịch mẫu đã xà phòng hóa sao cho tỷ lệ của ancol với nước trong dung dịch là 1:1.

Chiết vitamin D<sub>2</sub> và D<sub>3</sub> ra khỏi hỗn hợp xà phòng hóa đã nguội bằng dung môi thích hợp, hoặc bằng hỗn hợp dung môi (4.8) và lặp lại quy trình này từ hai đến bốn lần, mỗi lần dùng từ 100 ml đến 200 ml. Rửa hỗn hợp của các dịch chiết được bằng nước (thông thường 5 lần, mỗi lần từ 50 ml đến 100 ml) cho đến khi pH trung tính.

CHÚ THÍCH Một số phương pháp quy định rửa đến trung tính bằng kali hydroxit 3 % hoặc 5 % trong dung dịch đệm natri clorua 0,9 % trong natri axetat 2,6 mol/l (pH = 7), hoặc các hỗn hợp tương tự. Phụ lục B đưa ra các điều kiện chiết thích hợp đối với margarin và sữa bột.

### 6.3.3 Cô đặc

Làm bay hơi các dịch chiết mẫu, bằng máy cô quay (5.3) dưới áp suất giảm và ở nhiệt độ không quá 40 °C. Trước khi làm bay hơi, nên bổ sung chất chống oxi hóa (ví dụ: 2 ml BHT 1 mg/ml trong *n*-hexan) vào dịch chiết mẫu.

Etanol tuyệt đối (4.3) hoặc natri sulfat khan (4.5) cần được bổ sung vào dịch chiết mẫu đã cô đặc để giúp loại bỏ các vết nước (chưng cất đồng sôi).

Ở giai đoạn này trong quá trình phân tích, có thể cần làm sạch thêm dịch chiết mẫu để loại bỏ các chất gây nhiễu tiềm tàng. Nếu bổ sung quy trình làm sạch thì quy trình phải được kiểm tra xác nhận đầy đủ.

CHÚ THÍCH Phụ lục E đưa ra ba bước làm sạch bổ sung khác nhau. Bước làm sạch dùng cột sắc ký (E.2) và có sử dụng SPE (E.3) cho thấy có lợi đối với thực phẩm, ví dụ margarin và cầu ăn. Bước làm sạch bằng cách dùng TLC điều chế (E.1) là tốt nhất đối với thức ăn chăn nuôi và các loại thực phẩm bổ sung như viên hoặc viên nang. Đối với các loại bổ sung có thể được kết hợp với E.3, nếu cần.

#### 6.3.4 Pha loãng

Hòa lại cặn trong một lượng nhỏ đã biết của dung môi phù hợp với hệ thống HPLC bán điều chế. Việc bổ sung một lượng nhỏ natri sulfat khan sẽ loại bỏ các vết nước còn sót lại.

#### 6.4 Hiệu chuẩn

Sử dụng các dung dịch chuẩn vitamin D<sub>2</sub> (4.12.1) và vitamin D<sub>3</sub> (4.12.2) để hiệu chuẩn các hệ thống bán điều chế (5.6.1), các hệ thống phân tích HPLC (5.6.2) và đánh giá sự phù hợp.

#### 6.5 Sự phù hợp của hệ thống HPLC

Cho chạy hỗn hợp vitamin D<sub>2</sub> và chất chuẩn vitamin D<sub>3</sub> bán điều chế (4.14) trên hệ thống HPLC bán điều chế (5.6.1) cho đến khi pic của từng vitamin D được phân tách với thời gian lưu ổn định. Khi đã đạt được thì thu lấy phân đoạn của từng vitamin D từ dịch chiết mẫu.

Các điều kiện sắc ký của HPLC bán điều chế phải được điều chỉnh để tách tối ưu vitamin D ra khỏi các tocopherol và các chất gây nhiễu đến chất nền thực phẩm khác. Ví dụ về sắc đồ, xem Phụ lục C.

Cho chạy sắc ký hỗn hợp của vitamin D<sub>2</sub> và dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub> (4.15) trên hệ thống phân tích HPLC và chỉnh các điều kiện sắc ký cho đến khi tách được ít nhất 98 % vitamin D<sub>2</sub> ra khỏi vitamin D<sub>3</sub> (nghĩa là hệ số phân giải phải lớn hơn 1,0) và các vitamin được tách ra khỏi các chất gây nhiễu nền mẫu thực phẩm.

#### 6.6 Xác định

##### 6.6.1 HPLC bán điều chế

Bơm phần dịch lỏng của dịch chiết mẫu đã cô đặc lên hệ thống HPLC bán điều chế (5.6.1) và thu lấy phân đoạn vitamin D. Khoảng thời gian để thu lấy phân đoạn này phải được xác định trước, dùng chất chuẩn vitamin D (6.5). Thời gian thu được phân đoạn phải đủ dài để thu được tất cả các vitamin D, nhưng không quá dài để giảm khả năng lẫn các tocopherol hoặc các hợp chất gây nhiễu khác.

Sắc đồ bán điều chế điển hình nêu trong Phụ lục C.

##### 6.6.2 Phân tích HPLC

Làm bay hơi phân đoạn thu được từ HPLC bán điều chế đến khô và hòa lại trong dung môi phù hợp với pha động dùng cho HPLC.

Bơm các phần dịch lỏng của dịch chiết mẫu lên hệ thống phân tích HPLC và nhận biết các pic vitamin D<sub>2</sub> và D<sub>3</sub> (6.6.3). Các pic vitamin D<sub>2</sub> và D<sub>3</sub> phải tách ra khỏi chất gây nhiễu nền mẫu.

Sắc đồ phân tích HPLC điển hình được nêu trong Phụ lục C.

### 6.6.3 Nhận biết

Nhận biết các vitamin D<sub>2</sub> và D<sub>3</sub> bằng cách so sánh các thời gian lưu từ các sắc đồ của mẫu thu được với thời gian lưu của các chất chuẩn dưới cùng điều kiện sắc ký (6.5). Việc sử dụng detector mảng diot để thu được sắc đồ UV của các pic vitamin D cần được xác định kỹ và cần đánh giá độ nét của pic. Cho chạy lại sắc ký các dịch chiết mẫu được, dùng các bước sóng khác nhau của detector UV để đánh giá độ nét của pic vitamin D và khẳng định việc nhận biết pic.

### 6.6.4 Số lần xác định

Tiến hành ít nhất hai lần xác định độc lập.

### 6.7 Quy trình nội chuẩn và hệ số đáp ứng

Tính hệ số đáp ứng của vitamin D<sub>3</sub> so với vitamin D<sub>2</sub>, R<sub>f</sub>, bằng quy trình nội chuẩn, sử dụng chất chuẩn đã biết nồng độ (4.13), theo Công thức (3):

$$R_f = \frac{A_{STD3} \times \rho_{STD2}}{A_{STD2} \times \rho_{STD3}} \quad (3)$$

Trong đó

A<sub>STD3</sub> là diện tích pic hoặc chiều cao pic đối với dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub>;

A<sub>STD2</sub> là diện tích pic hoặc chiều cao pic đối với dung dịch chuẩn vitamin D<sub>2</sub>;

ρ<sub>STD2</sub> là nồng độ khối lượng của vitamin D<sub>2</sub> trong dung dịch chuẩn, tính bằng microgam trên mililit (μg/ml);

ρ<sub>STD3</sub> là nồng độ khối lượng của vitamin D<sub>3</sub> trong dung dịch chuẩn, tính bằng microgam trên mililit (μg/ml).

## 7 Tính kết quả

Tính phần khối lượng của vitamin D<sub>3</sub>, w<sub>D3</sub>, bằng microgam trên 100 g (μg/100 g), theo Công thức (4):

$$w_{D3} = \frac{A_{SD3} \times I_s \times 100}{A_{SD2} \times R_f \times m} \quad (4)$$

Trong đó

I<sub>s</sub> là khối lượng của chất nội chuẩn của vitamin D<sub>2</sub> trong phần mẫu thử, tính bằng microgam (μg);

m là khối lượng của mẫu lấy để xà phòng hóa, tính bằng gam (g);

$R_t$  xem Công thức (3);

$A_{SD3}$  là diện tích pic hoặc chiều cao pic đối với vitamin D<sub>3</sub> trong dung dịch mẫu;

$A_{SD2}$  là diện tích pic hoặc chiều cao pic đối với vitamin D<sub>2</sub> trong dung dịch mẫu.

## 8 Độ chụm

### 8.1 Tóm tắt thống kê

Dữ liệu về độ chụm của các phương pháp HPLC khác nhau về xác định vitamin D<sub>3</sub> được thiết lập năm 1994 bởi một nghiên cứu so sánh quốc tế do chương trình Tiêu chuẩn, Đo lường và Thử nghiệm của Ủy ban Châu Âu thực hiện trên mẫu margarin [vật liệu chuẩn đã được chứng nhận (CRM 122)] và sữa bột (CRM 421) và cho thông tin thống kê nêu trong Phụ lục D.

Dữ liệu về độ chụm trên mẫu cháo đặc và sữa bột được thiết lập trong phép thử liên phòng thử nghiệm về phương pháp sử dụng cách tính dựa trên chất chuẩn ngoại, phù hợp với ISO 5725:1986<sup>1)</sup>. Xem Phụ lục D.

Dữ liệu về độ chụm trên sữa, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng, dầu ăn, margarin, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và dầu cá đã được thiết lập trong một phép thử liên phòng thử nghiệm theo hướng dẫn của AOAC về quy trình nghiên cứu cộng tác để đánh giá các đặc tính của phương pháp phân tích, xem Phụ lục D.

Dữ liệu thu được từ các nghiên cứu so sánh này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ chất phân tích và các chất nền khác với các dải nồng độ chất phân tích và các chất nền đã nêu trong Phụ lục D.

### 8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại  $r$ .

Các giá trị này như sau:

Margarin:	$\bar{x} = 12,3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 2,32 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Sữa bột:	$\bar{x} = 14,3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 2,09 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Sữa:	$\bar{x} = 0,418 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 0,054 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng:	$\bar{x} = 1,38 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 0,23 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

<sup>1)</sup> ISO 5725:1986 đã được hủy bỏ. Hiện nay có bộ tiêu chuẩn TCVN 6910 (ISO 5725), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo* gồm có 6 phần.

## TCVN 8973:2011

Dầu ăn:	$\bar{x} = 4,61 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 0,96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Margarin:	$\bar{x} = 8,39 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 1,52 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh:	$\bar{x} = 10,1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 0,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Dầu cá:	$\bar{x} = 11,6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 0,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

### 8.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ, thu được khi tiến hành thử trên vật liệu giống nhau, do hai phòng thử nghiệm thực hiện không quá 5 % các trường hợp lớn giới hạn tái lập  $R$ .

Các giá trị này như sau:

Margarin:	$\bar{x} = 12,3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 2,66 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Sữa bột:	$\bar{x} = 14,3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 2,21 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Sữa:	$\bar{x} = 0,418 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 0,106 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng:	$\bar{x} = 1,38 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 0,47 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Dầu ăn:	$\bar{x} = 4,61 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 3,11 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Margarin:	$\bar{x} = 8,39 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 1,60 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh:	$\bar{x} = 10,1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 2,0 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Dầu cá:	$\bar{x} = 11,6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 5,8 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

## 9 Báo cáo thử nghiệm

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

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp thử đã sử dụng;
- các kết quả và các đơn vị biểu thị kết quả;
- ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong khi tiến hành thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

**Phụ lục A**  
(tham khảo)

**Các ví dụ về hệ thống HPLC phù hợp**

**Bảng A.1 – Các ví dụ về hệ thống HPLC bán điều chế được dùng để làm sạch dung dịch mẫu thử trong nghiên cứu chứng nhận của EU Mat trên vitamin D [8]**

Cột	Kích thước, mm	Pha động, (V + V)	Detector, λ
Polygosil® 60, 5 μm	250 x 8	<i>iso</i> -octan + <i>iso</i> -butanol (99 + 1)	265 nm
LiChrospher® Si 60, 5 μm	250 x 4	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (99 + 1)	265 nm
LiChrospher® Si 100, 5 μm	250 x 8	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (98 + 2)	265 nm
μ Porasil® silica	300 x 3,9	<i>n</i> -hexan + THF + 2-propanol (98 + 1 + 1)	265 nm
Partisil® PAC, 5 μm	250 x 4,6	<i>n</i> -hexan + isoamylalcohol (99 + 1)	265 nm
LiChrosorb® Si 60	250 x 4	<i>n</i> -hexan + 2-propanol + THF (98 + 1 + 1)	265 nm
LiChrosorb® Si 60	250 x 4	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (95 + 5)	265 nm
LiChrosorb® Si 60	250 x 4	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (97 + 3)	265 nm

Tất cả các tên thương mại này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

**Bảng A.2 – Các ví dụ về hệ thống HPLC phân tích được dùng để xác định vitamin D trong dung dịch mẫu thử trong nghiên cứu chứng nhận của EU MAT, xem [8]**

Cột	Kích thước, mm	Pha động, (V + V)	Detector, λ
Hypersil® ODS, 5 μm	250 x 4,6	metanol	265 nm
LiChrospher® 100 RP 18, 5 μm	250 x 4	metanol + nước (95 + 5)	264 nm
Vydac® 201TP54	250 x 4,6	metanol + nước (93 + 7)	265 nm
Vydac® 201TP54	250 x 4,6	axetonitril + metanol (80 + 20)	265 nm
Spherisorb® ODS 2, 5 μm	250 x 4,6	axetonitril + diclometan + metanol (93 + 4 + 3)	màng diot
Nucleosil® C <sub>18</sub> , 5 μm	250 x 4	axetonitril + metanol (70 + 30)	265 nm
Zorbax® ODS	250 x 4,6	axetonitril + metanol (95 + 5)	265 nm

Tất cả các tên thương mại này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.



**Phụ lục B**

(tham khảo)

**Các ví dụ về các điều kiện chiết và xà phòng hóa thích hợp**

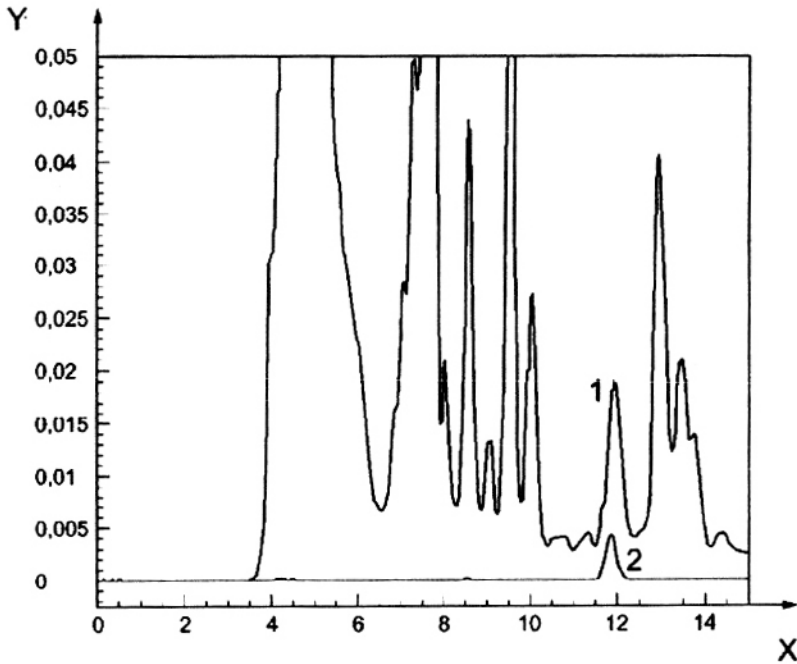
Các ví dụ về các điều kiện chiết và xà phòng hóa thích hợp được dùng để xác định vitamin D của các thành viên tham dự trong nghiên cứu chứng nhận của EU MAT [8]. Khối lượng mẫu được tính theo gam chất béo (margarin 82 % chất béo, sữa bột 27 % chất béo).

**Bảng B.1 – Các ví dụ về các hệ thống HPLC được dùng để xác định vitamin D trong dung dịch mẫu thử của các nước thành viên tham gia trong nghiên cứu chứng nhận của EU MAT**

Xà phòng hóa	Chiết
16 g chất béo + 150 ml etanol + 1 g pyrogallol + [75 ml nước + 30 g KOH <sup>a)</sup> ] + thổi nitơ; 70 °C trong 30 min	PE <sup>b)</sup> + DEE <sup>c)</sup> (9 + 1) 2 x 100 ml; rửa bằng nước 5 x 100 ml
8 g chất béo + 100 ml etanol + 1 g natri ascobat + 0,04 g natri sulfit + 12 g KOH + 50 ml nước + thổi nitơ; 80 °C trong 30 min	n-hexan, 3 x 100 ml và 3 x 50 ml; rửa bằng nước 4 x 100 ml
8 g chất béo + 35 ml etanol + 2 g natri ascobat + 10 g KOH + 50 ml nước; 100 °C trong 45 min	n-hexan, 1 x 100 ml; rửa bằng KOH 5 % , 1 x 100 ml; rửa bằng etanol 30 % trong natri clorua 9 %, 1 x 100 ml; rửa bằng natri clorua 0,9 % ; 1 x 100 ml
12 g chất béo + 30 ml etanol + 30 ml metanol + 0,1 g axit ascorbic + 30 ml KOH 50 % + thổi nitơ; 100 °C trong 30 min	DEE, 2 x 100 ml; rửa bằng nước, 4 x 50 ml
6 g đến 8 g chất béo + 100 ml etanol + 1 g axit ascorbic + 50 ml KOH 50 % + thổi nitơ; 20 °C trong 20 h	PE + DEE (1 + 1), 2 x 200 ml; rửa bằng nước, 6 x 50 ml
8 g chất béo + 1 g pyrogallol + 150 ml KOH 28 % trong etanol và nước (9 + 1) + thổi nitơ; đối lưu ở 100 °C trong 30 min	DEE + PE (1 + 1), 2 x 500 ml; rửa bằng nước, 5 x 150 ml
24 g chất béo + 90 ml etanol + 0,5 g natri ascobat + 30 ml KOH 60 % + thổi nitơ; đối lưu ở 100 °C trong 45 min	DEE, 1 x 150 ml, 3 x 75 ml; rửa, 5 x 200 ml
a) KOH = kali hydroxit b) PE = dầu nhẹ c) DEE = dietyl ete	

**Phụ lục C**  
(tham khảo)

**Các ví dụ về sắc phổ phân tích HPLC và HPLC bán điều chế thích hợp**



**CHÚ DẪN**

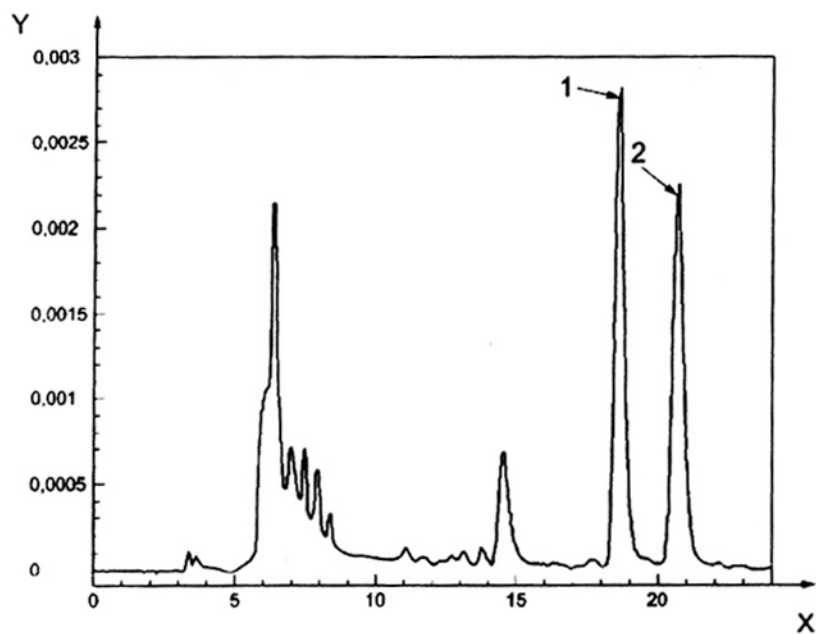
x thời gian (min)

y tín hiệu (đơn vị tùy chọn)

1 vitamin D trong sữa bột

2 vitamin D trong chất chuẩn

**Hình C.1 – Sắc đồ điển hình của HPLC bán điều chế dùng cho pha thường của sữa bột (CRM 421) đã xà phòng hóa, xử lý lỏng/ lỏng và chất chuẩn vitamin D (vitamin D<sub>2</sub> và vitamin D<sub>3</sub>)**



CHÚ DẪN

x thời gian (min)

y tín hiệu (đơn vị tùy chọn)

1 vitamin D<sub>2</sub>

2 vitamin D<sub>3</sub>

**Hình C.2 – Sắc đồ điện hình của chất chiết từ sữa bột (CRM 421) phân tích bằng HPLC pha đảo của phần vitamin D có thời gian từ 11,5 min đến 12,5 min trong bước bán điều chế (xem Hình C.1)**

**Phụ lục D**

(tham khảo)

**Dữ liệu về độ chụm**

Các thông số nêu trong Bảng D.1 trên margarin (CRM 122) và sữa bột (CRM 421) đã được xác định trong phép thử liên phòng thử nghiệm [8], phù hợp với các hướng dẫn nghiên cứu chứng nhận của EU MAT. Nghiên cứu này do phòng thử nghiệm hóa học của chính phủ Anh tổ chức.

Các thông số trong Bảng D.2 trên sữa, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng, dầu ăn, margarin, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và dầu cá đã được xác định trong phép thử liên phòng thử nghiệm theo Hướng dẫn của AOAC đối với quy trình nghiên cứu cộng tác để đánh giá các đặc tính của phương pháp phân tích [13]. Nghiên cứu này do NMKL (Ủy ban về phân tích thực phẩm của Bắc Âu) [11] tổ chức. Phương pháp này bao gồm việc xà phòng hóa, chiết, cô đặc, sử dụng HPLC điều chế và HPLC phân tích.

**Bảng D.1 – Dữ liệu về độ chụm đối với margarin và sữa bột**

Mẫu	1	2
Năm tiến hành phép thử liên phòng thử nghiệm	1994	1994
Số lượng phòng thử nghiệm	11	11
Số lượng mẫu	5	5
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	11	11
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	0	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	48	47
Giá trị trung bình, $\bar{x}$ , $\mu\text{g}/100\text{ g}$	12,30	14,30
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ , $\mu\text{g}/100\text{ g}$	0,82	0,74
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD, %	6,7	5,2
Giới hạn lặp lại, $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ], $\mu\text{g}/100\text{ g}$	2,32	2,09
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , $\mu\text{g}/100\text{ g}$	0,94	0,78
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD <sub>R</sub> , %	7,6	5,5
Giới hạn tái lập, $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ], $\mu\text{g}/100\text{ g}$	2,66	2,21
Chỉ số Horat $R$	0,3	0,3
1 Margarin có bổ sung vitamin D <sub>3</sub> (CRM 122)		
2 Sữa bột sáy phun, sữa nguyên chất (CRM 421) có bổ sung vitamin D <sub>3</sub>		

**Bảng D.2 – Dữ liệu về độ chụm đối với sữa, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng, dầu ăn, margarin, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh, dầu cá**

Mẫu	1	2	3	4	5	6
Năm tiến hành phép thử liên phòng thử nghiệm	1997	1997	1997	1997	1997	1997
Số lượng phòng thử nghiệm	8	8	8	8	8	8
Số lượng mẫu	2	2	2	2	2	2
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	7	8	8	7	7	8
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	0	0	1	1	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	14	16	16	14	14	16
Giá trị trung bình, $\bar{x}$ , $\mu\text{g}/100\text{ g}$	0,418	1,38	4,61	8,39	10,1	11,6
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ , $\mu\text{g}/100\text{ g}$	0,019	0,08	0,34	0,54	0,2	0,3
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $\text{RSD}_r$ , %	4,6	5,9	7,4	6,5	2,4	2,2
Giới hạn lặp lại, $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ], $\mu\text{g}/100\text{ g}$	0,054	0,23	0,96	1,52	0,7	0,7
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , $\mu\text{g}/100\text{ g}$	0,038	0,17	1,11	0,57	0,7	2,1
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $\text{RSD}_R$ , %	9,1	12,1	24,1	6,8	7,1	17,7
Giới hạn tái lập, $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ], $\mu\text{g}/100\text{ g}$	0,106	0,47	3,11	1,60	2,0	5,8
Độ thu hồi, %	-	-	102	-	93,9	92,9
Chỉ số Horrat $R^{a)}$	0,4	0,6	1,1	0,3	0,3	0,8
<p>1 sữa tiệt trùng (UHT) có hàm lượng lactoza thấp, không bổ sung vi chất</p> <p>2 thực phẩm ăn liền, có bổ sung vi chất, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng lỏng (bột nhão), vitamin D<sub>3</sub> công bố trên nhãn là 1,3 <math>\mu\text{g}/100\text{ g}</math></p> <p>3 dầu ăn có bổ sung vitamin D<sub>3</sub> dùng cho thử nghiệm cộng tác</p> <p>4 margarin có bổ sung vitamin D<sub>3</sub> dùng cho thử nghiệm cộng tác</p> <p>5 thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh dạng bột có bổ sung vitamin D<sub>3</sub> dùng cho thử nghiệm cộng tác</p> <p>6 dầu cá có bổ sung vitamin D<sub>3</sub> dùng cho thử nghiệm cộng tác</p> <p>a) Các giá trị này khác với các giá trị trong tài liệu tham khảo [10] vì giá trị Horwits được đặt ở 22 %, đối với các giá trị trung bình nhỏ hơn 120 ppb theo Tài liệu tham khảo [12].</p>						

**Phụ lục E**  
(tham khảo)

**Bước làm sạch bổ sung để xác định vitamin D  
có sử dụng TLC điều chế, sắc ký cột và hoặc SPE**

**E.1 Bước làm sạch bổ sung có sử dụng TLC điều chế**

**E.1.1 Yêu cầu chung**

Quy trình này đã được sử dụng rộng rãi để làm sạch các dịch chiết vitamin D trước khi đưa vào HPLC điều chế. Quy trình đã được đánh giá trên các loại thức ăn chăn nuôi như thức ăn cho lợn con chứa 50 µg vitamin D/kg.

Các ưu điểm là:

- vùng có chứa vitamin D có thể dễ dàng quan sát được dưới ánh sáng UV. Tùy thuộc vào sự phân bố chất nền mà quy định mức độ nhỏ của vùng D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>. Vì vậy các chất gây nhiễu chất nền phải được giảm thiểu;
- sử dụng nhiều bước khai triển các tấm TLC, có thể cải thiện thêm sự phân biệt của vùng D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> và các vùng chất nền.

Nhược điểm của phương pháp này là không thể thực hiện tự động. Thời gian luân chuyển bị hạn chế. Các thông tin bổ sung về quy trình này có trong [11].

**E.1.2 Nguyên tắc**

Phần dịch lỏng của dịch chiết thô sau khi xà phòng hóa được làm sạch bằng TLC điều chế. Vùng chứa vitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> được cạo ra khỏi tấm TLC rồi chuyển vào cột nhỏ và vitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> được chiết. Thể tích của các dịch chiết này cần được giảm trước khi đưa vào để phân tích bằng HPLC.

**E.1.3 Thuốc thử**

**E.1.3.1 Các tấm TLC**, ví dụ silica gel 60 F 254, Merck 5715 <sup>1)</sup>, cỡ hạt 0,25 mm, 20 cm x 20 cm.

**E.1.3.2 Hydroxytoluen đã butyl hóa (BHT).**

**E.1.3.3 *n*-hexan.**

---

<sup>1)</sup> Silica gel 60 F 254, Merck 5715 là ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

## **TCVN 8973:2011**

### **E.1.3.4 Metanol.**

### **E.1.3.5 Axeton.**

### **E.1.3.6 Dietyl ete.**

**E.1.3.7 Dung môi khai triển các tấm TLC**, hỗn hợp của 88 ml *n*-hexan, 2 ml metanol, 10 ml axeton và 10 mg BHT.

**E.1.3.8 Dung môi để rửa giải vùng vitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> đã được phân lập**, hỗn hợp của 60 ml dietyl ete và 40 ml *n*-hexan.

**E.1.3.9 Dung dịch chuẩn vitamin D<sub>3</sub>**, 250 µg/ml trong metanol.

## **E.1.4 Thiết bị, dụng cụ**

**E.1.4.1 Hộp khai triển TLC dùng cho các tấm TLC 20 cm x 20 cm.**

**E.1.4.2 Xyranh**, kín khí, dung tích 1 ml hoặc hệ thống chấm thích hợp dùng cho TLC.

**E.1.4.3 Đèn UV**, 254 nm.

**E.1.4.4 Cột mao quản mờ**, đường kính 1 cm, dài khoảng 15 cm, có nắp vận polytetrafluetylen (PTFE).

**E.1.4.5 Dao nhỏ, lưới sắc**

## **E.1.5 Cách tiến hành**

Đổ đầy dung môi (E.1.3.8) vào hộp triển khai TLC và đợi khoảng 2 h để bão hòa.

Làm bay hơi phần dịch lỏng thích hợp của dịch chiết thô sau khi xà phòng hóa cho đến khô dưới áp suất giảm và ngay sau đó hòa lại trong 2 ml *n*-hexan. Chấm 1 ml dung dịch này nhiều lần lên tấm TLC (E.1.3.1) để có được một vùng dài 10 cm và không rộng hơn 1 cm. Để xác định vị trí và nhận biết, chấm từ 5 µl đến 10 µl chất chuẩn vitamin D<sub>3</sub> (E.1.3.9) lên cả các cạnh của vùng này.

Cho triển khai tấm sắc ký hai lần đến gần mép trên. Để tăng khả năng tách thì nên triển khai theo nhiều hướng. Trước khi bắt đầu bước tách mới, sau lần chạy cuối, thì dung môi được cho bay hơi dưới dòng nitơ. Cho hiện hình vùng vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> tách được dưới ánh sáng UV (E.1.4.3) và đánh dấu bằng bút chì (0,5 cm đến 1,5 cm). Cạo vùng tương ứng bằng dao (E.1.4.5) cho lên mẫu giấy và chuyển sang cột mao quản (E.1.4.4) đã đổ đầy 10 ml dung môi (E.1.3.8).

Vitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> được rửa giải 5 lần, mỗi lần dùng 10 ml dung môi (E.1.3.8). Làm bay hơi hỗn hợp các dịch rửa giải đến khô dưới áp suất giảm và hòa lại ngay trong 1 ml dung môi HPLC (dung dịch mẫu).

## **E.2 Bước làm sạch bổ sung bằng sắc ký cột**

### **E.2.1 Nguyên tắc**

Phương pháp làm sạch được thực hiện trên cột celit polyetylen glycol. Nhược điểm của phương pháp làm sạch này là không thể thực hiện tự động. Thời gian luân chuyển bị hạn chế.

### **E.2.2 Thuốc thử**

**E.2.2.1 Ete dầu mỏ**, có dải sôi từ 40 °C đến 60 °C, đã được chưng cất.

**E.2.2.2 Ete dầu mỏ**, có dải sôi từ 60 °C đến 70 °C, đã được chưng cất.

**E.2.2.3 Diatomit**, natri cacbonat đã nung chảy CAS No.: 68855-54-9.

**E.2.2.4 Natri sulfat**

**E.2.2.5 Polyetylen glycol 600**

### **E.2.3 Thiết bị, dụng cụ**

**E.2.3.1 Máy cô quay**, có nồi cách thủy duy trì ở 40 °C.

**E.2.3.2 Máy trộn tốc độ cao chống nổ**

**E.2.3.3 Ống sắc ký**, dài 30 cm, đường kính trong 2,5 cm, có nút bằng polytetrafluoretylen (PTFE) ở đáy ống. Trên đỉnh cột có gắn một bể 100 ml, dài 10 cm, đường kính trong 1,4 cm, đáy hẹp.

**E.2.3.4 Đèn tử ngoại**, kiểu cầm tay dùng cho ánh sáng sóng dài (366 nm).

### **E.2.4 Cách tiến hành**

#### **E.2.4.1 Chuẩn bị cột**

Tạo huyền phù của 25 g diatomit (E.2.2.3) và 200 ml ete dầu mỏ (E.2.2.2) trong máy trộn (E.2.3.2). Trong khi trộn, thêm nhanh 15 ml polyetylen glycol (E.2.2.5) và tiếp tục trộn trong khoảng 20 s.

Cách khác, tạo huyền phù bằng cách tạo ra bột nghiền polyetylen glycol tương đương trên chất mang. Rót một lượng nhỏ ete dầu mỏ (E.2.2.2) vào ống sắc ký (E.2.3.3), nút đáy ống bằng nút len cotton kín khí vào và phủ một lớp natri sulfat (E.2.2.4) dày 1 cm. Rót huyền phù vào chai và nén cột dùng pittông để nén cột cho đến khi chiều dài của cột cuối cùng khoảng 15 cm. Tại thời điểm này, tất cả ete dầu mỏ dư thừa cho chảy hết. Phủ lên đỉnh cột một lớp natri sulfat dày 1 cm.



## **TCVN 8973:2011**

### **E.2.4.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu, rửa giải và thu lấy dịch rửa giải**

Chuyển dịch chiết từ bình cầu đáy tròn, dùng 3 phần ete dầu mỏ (E.2.2.2), mỗi phần khoảng 3 ml để tráng bình. Chuyển tất cả sang cột. Rửa giải bằng cách dùng ete dầu mỏ (E.2.2.2). Loại bỏ 30 ml dịch rửa giải đầu tiên. Thu lấy 50 ml dịch rửa giải tiếp theo hoặc cho đến khi dải băng retinol chạm vào đáy của cột diatomit. Điều này có thể nhìn thấy được bằng cách dùng đèn tử ngoại sóng dài (E.2.3.4). Làm bay hơi dịch rửa giải đến khô trong máy cô quay (E.2.3.1) và thêm 2 ml đến 3 ml ete dầu mỏ (E.2.2.1) hoặc (E.2.2.2). Tiếp tục với bước làm sạch sử dụng SPE (xem E.3).

## **E.3 Bước làm sạch bổ sung bằng SPE**

### **E.3.1 Nguyên tắc**

Phần này mô tả phương pháp làm sạch bằng SPE và silica. Nhược điểm của phương pháp làm sạch này là không thể thực hiện tự động. Thời gian luân chuyển bị hạn chế.

### **E.3.2 Thuốc thử**

#### **E.3.2.1 *n*-heptan p.a.**

#### **E.3.2.2 Dietyl ete**

Loại bỏ các peroxit bằng cách chưng cất trên các viên KOH mỗi ngày trước khi sử dụng.

#### **E.3.2.3 Ete dầu mỏ, dải sôi từ 40 °C đến 60 °C, đã được chưng cất.**

### **E.3.3 Thiết bị, dụng cụ**

#### **E.3.3.1 Cột chiết silica pha rắn, khoảng 700 mg.**

#### **E.3.3.2 Bình nón 50 ml, có các khớp nối mài B 29**

### **E.3.4 Cách tiến hành**

Làm bay hơi dịch rửa giải và hòa tan trong 10 ml heptan (E.3.2.1). Hoạt hóa ống (E.3.3.1) bằng 10 ml heptan. Chuẩn bị và rửa giải 10 ml dịch chiết mẫu. Dùng 10 ml dietyl ete 6 % (E.3.2.2) trong heptan để tráng rửa và dùng 20 ml dietyl ete 20 % (E.3.2.2) trong heptan để rửa giải. Thu lấy dịch rửa giải vào bình nón (E.3.3.2), làm bay hơi và hòa tan phần còn lại trong 1 ml đến 2 ml ete dầu mỏ (E.3.2.3). Tiếp tục với bước làm sạch TLC hoặc HPLC bán điều chế.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Johnsson, H., Hessel, H., and Thorzell, K. *Internat. J. Vitamin & Nutr. Res.*, 1987, 57, 357-365.
- [2] Johnsson, H., Halen, B., Hessel, H., Nyman, A., and Thorzell, K., *Internat. J. Vitamin & Nutr. Res.*, 1989, 59, 262-268.
- [3] Reynolds, S.L., and Judd, H.J. *The Analyst*, 1984, 109, 489-492.
- [4] Bognar, A., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1992, 194, 469-475.
- [5] Van Den Berg, J. *Agric. Fd. Chem.*, 1986, 34, 264-268.
- [6] Mattila, P., Piironen, V., Bäckman, C., Asunmaa, A., Uusi-Rauva, E. and Koivistoinen, P., *J. FoodComp. Anal.*, 1992, 5, 281-290.
- [7] Lumley, I.D. and Lawrance, P.R. *J. Micronutrient Anal.*, 1990, 7, 301-313.
- [8] Finglas, P.M., van den Berg, H. and de Froidmont-Görtz, I., 1997. The certification of the mass fractions of vitamins in three reference materials: margarin (CRM 122), milk powder (CRM 421), and lyophilized Brussels sprouts (CRM 431). EUR-Report 18039, Commission of the European Union, Luxembourg.
- [9] *The Pharmaceutical Codex, Incorporating the British Pharmaceutical Codex, 11th Edition*, The Pharmaceutical Press, 1979.
- [10] Staffas, A., Nyman, A., *J. AOAC Int.*, 2003, 86, 400-406
- [11] Methode 13.8.1 (Method 13.8.1): Die Bestimmung von Vitamin D – HPLC Verfahren (The determination of Vitamin D – HPLC Method); in: *Methodenbuch 3.4. Ergänzungslieferung 1997*. VDLUFA Verlag Deutschland
- [12] Thompson, M., 2000, 125, 385-386
- [13] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development, Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies p. 23 – 51
- [14] ISO 5725:1986, Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests
-