

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8970 : 2011; TCVN 8971 : 2011; TCVN 8972-1 : 2011;
EN 12823-1 : 2000
TCVN 8972-2 : 2011; TCVN 8973 : 2011; TCVN 8974 : 2011;
EN 12823-2 : 2000 EN 12821 : 2009 EN 14148 : 2003
TCVN 8975 : 2011; TCVN 8976 : 2011; TCVN 8977 : 2011.
EN 14152 : 2003 EN 14166 : 2009 EN 14130 : 2003
TCVN 8978 : 2001.
EN 14131 : 2003

Xuất bản lần 1

TUYỂN TẬP
TIÊU CHUẨN QUỐC GIA VỀ THỰC PHẨM –
XÁC ĐỊNH CÁC THÀNH PHẦN HÓA HỌC

HÀ NỘI – 2011

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 β -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 ₁ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).	75
• TCVN 8975 : 2011 EN 14152 : 2003	Thực phẩm – Xác định vitamin B ₂ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).	91
• TCVN 8976 : 2011 EN 14166: 2009	Thực phẩm – Xác định vitamin B ₆ 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. γ -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 B₆ bằng phép thử vi sinh

Foodstuffs – Determination of vitamin B₆ by microbiological assay

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định tổng số vitamin B₆ có trong thực phẩm bằng phép thử vi sinh (MBA). Hàm lượng vitamin B₆ được xác định là khối lượng của pyridoxin, pyridoxal và pyridoxamin, kể cả các dẫn xuất đã phosphoryl hoặc glycosyl hóa, hàm lượng này thường được biểu thị bằng miligam B₆ trên 100 g thực phẩm. Phương pháp này có thể áp dụng cho các mẫu có thể đồng hóa được và không chứa hàm lượng cao các chất kháng sinh hoặc các chất gây nhiễu khác.

Phương pháp này đã được đánh giá liên phòng thử nghiệm về việc xác nhận giá trị sử dụng trên các mẫu bột, sữa bột, rau hỗn hợp và gan lợn không bổ sung và có bổ sung vitamin ở các mức từ 0,5 mg/100 g đến 1,9 mg/100 g. Thông tin chi tiết về kết quả đánh giá liên phòng, xem Phụ lục B.

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

Pyridoxin, pyridoxal và/hoặc pyridoxamin được chiết ra khỏi mẫu thử bằng cách thủy phân với axit. Bước thủy phân giải phóng các đồng phân của vitamin B₆ ra khỏi các protein và carbohydrat trong mẫu và thủy phân các phosphat thành các đồng phân tự do. Hàm lượng vitamin B₆ tổng số trong dịch chiết mẫu được xác định bằng cách so sánh tốc độ phát triển của vi sinh vật thử nghiệm trong môi trường dịch chiết mẫu với tốc độ phát triển trong môi trường chất chuẩn pyridoxin hydroclorua, xem [1].

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 4851:1989 (ISO 3696:1987), trừ khi có quy định khác. Nước dùng để pha chế thuốc thử phải được chưng cất bằng dụng cụ thủy tinh. Nước sau khi được chưng cất chỉ dùng trong vòng năm ngày.

4.2 Hóa chất và các dung dịch

4.2.1 Dung dịch axit sulfuric, nồng độ chất $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,22 \text{ mol/l}$

4.2.2 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/l}$

4.2.3 Thạch Worrt, (Difco¹⁾ hoặc loại tương đương).

Hòa tan thạch trong nước được chưng cất bằng dụng cụ thủy tinh, theo hướng dẫn của nhà sản xuất, đun đến sôi. Phân phối các lượng 5 ml vào các lọ thủy tinh, đậy nắp và hấp áp lực 15 min ở 121 °C. Nghiêng lọ cho nguội để tạo thành bề mặt nghiêng. Bảo quản trong tủ lạnh đến ba tháng.

4.2.4 Môi trường cơ bản (Môi trường Difco Pyridoxine Y¹⁾ hoặc loại tương đương)

Cần chọn nồng độ của môi trường thử nghiệm tùy thuộc vào quy mô của phép thử, để đảm bảo thu được nồng độ khuyến cáo của nhà sản xuất có trong thể tích thử cuối cùng.

4.2.5 Môi trường nuôi cấy lỏng

Pha loãng môi trường cơ bản (4.2.4) với cùng một thể tích nước có chứa 2,0 ng/ml pyridoxin, pyridoxamin và pyridoxal. Phân phối các lượng 10 ml vào các ống nghiệm có nắp vặn và hấp áp lực 5 min ở 121 °C và làm nguội nhanh. Bảo quản các ống nghiệm này trong tủ lạnh đến một tháng.

4.2.6 Môi trường để tráng rửa chủng cấy

Pha loãng môi trường cơ bản (4.2.4) với cùng một thể tích nước. Phân phối các lượng 10 ml vào các ống nghiệm có nắp vặn và hấp áp lực 5 min ở 121 °C và làm nguội nhanh. Bảo quản các ống nghiệm này trong tủ lạnh đến một tháng.

4.2.7 Natri clorua, $w(\text{NaCl}) \geq 98,0 \%$ khối lượng.

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

4.2.8 Dung dịch nước muối vô trùng

Hòa tan 0,9 g natri clorua (4.2.7) trong 100 ml nước. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C.

4.2.9 Axit clohydric, $\alpha(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ **4.2.10 Dung dịch natri hydroxit, $\alpha(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$** **4.3 Vi sinh vật thử nghiệm, *Saccharomyces uvarum* ATCC 9080 (nấm men đông khô)****4.3.1 Duy trì vi sinh vật thử nghiệm (chủng gốc)**

Vi sinh vật thử nghiệm được nuôi dưỡng bằng cách hàng tuần chuyển vào môi trường thạch agar (4.2.3) sử dụng quy trình sau đây:

Chuẩn bị 50 ml môi trường cơ bản pyridoxin (4.2.4) và cho vào các lọ thủy tinh thành dày dung tích 100 ml hoặc bình thích hợp. Thêm 2 ml dung dịch hiệu chuẩn pyridoxin 20 (4.8.1), đậy nắp và hấp áp lực ở 121 °C trong 5 min. Làm nguội càng nhanh càng tốt trong nước lạnh đến 30 °C. Bằng cách vô trùng, cho 1 ml môi trường đã hấp áp lực vào chùng cấy đông khô (4.3) và sử dụng pipet vô trùng cho 0,5 ml huyền phù tạo thành vào môi trường còn lại. Ủ ở 30 °C trong 16 h. Sau khi ủ, vi sinh vật sẽ mọc dày đặc. Chuyển môi trường vào ống ly tâm vô trùng thích hợp và ly tâm ở 2000 g trong 5 min. Loại bỏ phần nổi phía trên và rửa tế bào còn lại hai lần mỗi lần dùng 50 ml nước muối vô trùng (4.2.8), cho ly tâm giữa hai lần rửa. Hoà lại các tế bào trong 50 ml dung dịch nước muối vô trùng.

Sử dụng vòng cấy vô trùng, chuyển các tế bào từ huyền phù này vào ba lọ đựng môi trường thạch nghiêng (4.2.3) theo đường zigzag và ủ từ 16 h đến 20 h trong 30 °C. Sau khi ủ, trên đường chéo cho thấy sinh vật mọc lên và không có sinh vật mọc trong vùng xung quanh. Bảo quản sinh vật trong tủ lạnh. Vi sinh vật cần được chuyển sang ống thạch nghiêng mới hàng tuần. Cần duy trì các điều kiện vô trùng trong suốt quá trình chuẩn bị và chuyển dung dịch.

4.3.2 Chùng làm việc

Một ngày trước khi sử dụng, chuyển các tế bào từ môi trường gốc (4.3.1) vào hai ống nghiệm đựng môi trường nuôi cấy lỏng (4.2.5) trong các điều kiện vô trùng. Ủ từ 16 h đến 20 h ở 30 °C. Trong các điều kiện vô trùng, ly tâm chùng cấy ở 2000 g trong 2 min và gạn phần nổi phía trên. Các tế bào có thể được rửa 2 lần, mỗi lần dùng 10 ml môi trường tráng rửa chùng cấy (4.2.6) và loại bỏ phần nổi phía trên sau mỗi lần rửa. Hoà lại các tế bào trong 10 ml môi trường tráng rửa chùng cấy lần thứ ba. Các tế bào này được sử dụng làm chùng phân tích.

4.4 Chất chuẩn**4.4.1 Pyridoxin hydroclorua, $w(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}) \geq 98 \%$.**

TCVN 8976:2011

4.5 Dung dịch gốc

4.5.1 Dung dịch gốc pyridoxin, $\rho(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3) \approx 200 \mu\text{g/ml}$

Cân chính xác 121,5 mg pyridoxin hydroclorua (4.4.1), chính xác đến 0,1 mg, cho vào cốc có mỏ nhỏ. Hòa tan trong nước đã được chưng cất bằng dụng cụ thủy tinh, sau đó chuyển định lượng vào bình định mức dung tích 500 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn. Dung dịch này khi được bảo quản trong tủ lạnh có thể bền được hai tuần.

4.6 Phép thử nồng độ

Pha loãng 2 ml dung dịch gốc (4.5.1) bằng HCl 0,1 mol/l đến 20 ml. Đo độ hấp thụ ở 290 nm dựa vào dung dịch HCl 0,1 mol/l ($\text{pH} \approx 1$).

Tính nồng độ khối lượng của dung dịch gốc, ρ , bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$), theo công thức (1):

$$\rho = \frac{A \times M_w \times V}{\varepsilon} \quad (1)$$

Trong đó:

A là độ hấp thụ của dung dịch ở 290 nm;

ε là hệ số tắt phân tử trong dung dịch axit clohydric có $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ ở $\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$ (trong trường hợp này, $\varepsilon = 8400 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, xem [2]);

M_w là khối lượng phân tử của chất chuẩn, tính bằng gam trên mol (g/mol);

V là hệ số pha loãng, nghĩa là bằng 10.

4.7 Dung dịch hiệu chuẩn pyridoxin trung gian, $\rho(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3) \approx 400 \text{ ng/ml}$

Pha loãng 2 ml dung dịch gốc pyridoxin (4.5.1) bằng nước đến 1000 ml. Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

4.8 Dung dịch hiệu chuẩn

4.8.1 Dung dịch hiệu chuẩn pyridoxin 20, $\rho(\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3) = 20 \text{ ng/ml}$

Pha loãng 5 ml dung dịch hiệu chuẩn trung gian (4.7) bằng nước đến 100 ml. Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

4.8.2 Dung dịch hiệu chuẩn pyridoxin 10, $\rho(C_8H_{11}NO_3) = 10$ ng/ml

Pha loãng 25 ml dung dịch hiệu chuẩn pyridoxin 20 (4.8.1) bằng nước đến 50 ml. Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

4.8.3 Dung dịch hiệu chuẩn pyridoxin 5, $\rho(C_8H_{11}NO_3) = 5$ ng/ml

Pha loãng 25 ml dung dịch hiệu chuẩn pyridoxin 20 (4.8.1) bằng nước đến 100 ml. Chuẩn bị dung dịch trong ngày sử dụng.

CHÚ THÍCH Có thể chuẩn bị nồng độ khác để thích hợp cho phép thử được sử dụng, xem 6.3.1 và 6.3.2.

5 Thiết bị, dụng cụ**5.1 Yêu cầu chung**

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thủy tinh của phòng thử nghiệm thông thường. Tất cả các dụng cụ thủy tinh phải được rửa sạch bằng chất tẩy rửa không kích thích hay kìm hãm sự phát triển của sinh vật phân tích. Dụng cụ thủy tinh phải được rửa và tráng kỹ bằng nước. Nếu sử dụng ống nghiệm bằng thủy tinh trong phép thử, thì các ống nghiệm này phải được rửa kỹ và sau đó được làm nóng ở nhiệt độ tối thiểu 160 °C qua đêm trước khi sử dụng. Các dụng cụ dưới đây cũng được sử dụng.

5.2 Nồi hấp, hoặc thiết bị gia nhiệt tương tự.

5.3 Máy đo phổ UV.

5.4 Tủ ấm hoặc nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ xác định không đổi và có bộ phận lắc.

5.5 Pipet và/hoặc syranh vô trùng.

5.6 Lọ hoặc bình có thể hấp áp lực được.

5.7 Lọ hoặc ống nghiệm vô trùng.

6 Cách tiến hành**6.1 Chuẩn bị mẫu thử**

Mẫu thử phải được đồng nhất. Sử dụng máy nghiền và/hoặc bộ trộn để đồng hóa chất thô. Có thể phải làm lạnh sơ bộ mẫu thử để tránh mẫu bị tiếp xúc với nhiệt độ cao.

6.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Cân một lượng thích hợp của mẫu thử (khoảng từ 0,5 g đến 10 g tương ứng với khoảng 2 µg vitamin B₆), chính xác đến 1 mg, cho vào lọ thủy tinh có nắp đậy hoặc bình nón. Thêm 150 ml dung dịch axit sulfuric (4.2.1) và xoay mạnh bình để trộn. Đậy nắp lọ (hoặc bình) và hấp áp lực ở 121 °C trong 5 h. Làm nguội đến nhiệt độ phòng trong nước lạnh, thêm 15 ml dung dịch natri hydroxit (4.2.2) và làm nguội trở lại. Chỉnh pH của dung dịch mẫu đến 4,5 ± 0,1 bằng dung dịch natri hydroxit (4.2.10) dùng máy đo pH. Chuyển dung dịch vào bình định mức 200 ml và pha loãng đến vạch bằng nước. Trộn kỹ bằng cách đảo chiều lọ chứa và lọc qua giấy lọc mịn. Pha loãng bằng nước đến nồng độ chất phân tích thích hợp cho dải hiệu chuẩn phân tích được sử dụng. Cần thực hiện trên mẫu trắng thuốc thử đối với mỗi dãy mẫu thử.

6.3 Xác định vitamin B₆ bằng phép thử vi sinh vật

6.3.1 Bố trí thử nghiệm – chất chuẩn

Tốc độ phát triển của các vi sinh vật phân tích đáp ứng với các đồng phân vitamin B₆ là khác nhau (xem Phụ lục A). Độ đáp ứng của pyridoxal hơi thấp hơn so với pyridoxin và độ đáp ứng của pyridoxamin còn thấp hơn (ví dụ: pyridoxin trong thực phẩm có nguồn gốc thực vật, pyridoxal trong thực phẩm có nguồn gốc từ sữa, pyridoxal hoặc pyridoxamin trong thịt). Thực tế thường sử dụng pyridoxin làm chất hiệu chuẩn nhưng có thể cho kết quả đánh giá không đúng khi có mặt pyridoxamin ở các mức đáng kể.

Các phép phân tích vi sinh vật có thể được thực hiện trong các ống nghiệm hoặc trong tấm microtitre. Các thể tích chất chuẩn, dịch chiết mẫu, và môi trường phân tích được sử dụng sẽ khác nhau giữa các phòng thử nghiệm phụ thuộc vào quy mô phân tích. Trong Bảng 1 và Bảng 2 dưới đây đưa ra hai bố trí thử nghiệm, sử dụng các thể tích dịch chiết mẫu cao và thấp tương ứng.

Tùy thuộc vào quy mô phân tích (xem Bảng 1 và Bảng 2), dùng pipet lấy một lượng thích hợp của các dung dịch hiệu chuẩn (4.8.1 đến 4.8.3) cho vào các ống phân tích. Dùng pipet lấy tất cả các chất chuẩn phân tích lặp lại hai lần vào các ống (hai ống cho mỗi mức chất chuẩn). Ống 1 và ống 2 là mẫu trắng không được cấy và ống 3 và ống 4 là mẫu trắng được cấy. Thêm một lượng môi trường phân tích (4.2.4) và thêm nước vào mỗi ống, nếu cần. Chuẩn bị tương tự với các ống pyridoxin theo yêu cầu.

Bảng 1 – Ví dụ về bố trí thử nghiệm 1 – Các chất chuẩn

Số ống	0 2	3 4	5 6	7 8	9 10	11 12	13 14	15 16	17 18	19 20	21 22	23 24	25 26	27 28
Nước, ml	0,4	0,4												
Chất chuẩn PN (20 ng/ml), ml			0,1	0,2	0,3	0,4								
Nanogram PN mỗi ống			2	4	6	8								
Chất chuẩn PN (10 ng/ml), ml							0,1	0,2	0,3	0,4				
Nanogram PN mỗi ống							1	2	3	4				
Chất chuẩn PN (5 ng/ml), ml											0,1	0,2	0,3	0,4
Nanogram PN mỗi ống											0,5	1	1,5	2
Môi trường phân tích, ml	9,6	9,6	9,9	9,8	9,7	9,6	9,9	9,8	9,7	9,6	9,9	9,8	9,7	9,6
Tổng thể tích, ml	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

6.3.2 Bố trí thử nghiệm – Chất chiết mẫu thử

Tuỳ thuộc vào quy mô phân tích, dùng pipet lấy một lượng thích hợp của dịch chiết mẫu thử (6.2), lặp lại hai lần, cho vào các ống nghiệm như mô tả trong Bảng 3 và Bảng 4. Điều này phải phù hợp với quy mô được sử dụng đối với các chất chuẩn (6.3.1). Các chất chuẩn và mẫu phải được phân tích ở cùng một thời điểm và trong cùng các điều kiện. Độ pha loãng của dịch chiết mẫu phụ thuộc vào quy mô phân tích được sử dụng và phải được xác định sao cho đồ thị về tốc độ phát triển vi sinh vật của mẫu tương ứng với tốc độ phát triển vi sinh vật của chất chuẩn.

Bảng 3 – Ví dụ về bố trí thử nghiệm 1 – Dung dịch mẫu thử

Số lượng ống nghiệm	29 – 30	31 – 32	33 – 34	35 – 36
Dịch chiết mẫu thử	0,10 ml	0,20 ml	0,30 ml	0,40 ml
Môi trường phân tích	9,9 ml	9,8 ml	9,7 ml	9,6 ml

Bảng 4 – Ví dụ về bố trí thử nghiệm 2 – Dung dịch mẫu thử

Số ống nghiệm	29 – 30	31 – 32	33 – 34	35 – 36
Dịch chiết mẫu thử	1,0 ml	2,0 ml	3,0 ml	4,0 ml
Nước	4,0 ml	3,0 ml	2,0 ml	1,0 ml
Môi trường phân tích nồng độ kép	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml

Mô hình này được lặp lại trong các ống nghiệm tiếp theo đối với các mẫu.

6.3.3 Tiệt trùng chuẩn và dịch chiết mẫu thử

Đậy nắp tất cả các ống nghiệm (từ 6.3.1 và 6.3.2) để tránh nhiễm khuẩn và hấp áp lực tất cả các ống nghiệm ở 121 °C trong 5 min. Làm nguội nhanh các ống nghiệm dưới dòng nước lạnh đến nhiệt độ môi trường.

6.3.4 Nuôi cấy

Cấy một cách vô trùng vào từng ống nghiệm, sử dụng pipet vô trùng hoặc dụng cụ tương tự bổ sung 100 µl chủng cấy (4.3.2), trừ các ống nghiệm 1 và 2 chứa mẫu trắng không cấy. Trộn các lượng chứa trong mỗi ống sau khi cấy. Trước khi cấy, nhiệt độ của lượng các lượng chứa trong ống nghiệm phải thấp hơn 30 °C.

TCVN 8976:2011

6.3.5 Ủ ấm

Ủ các ống nghiệm ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong khoảng từ 18 h đến 24 h trong nồi cách thủy. Nên sử dụng nồi cách thủy có bộ phận lắc.

Làm nguội các ống nghiệm dưới dòng nước lạnh sau khi ủ và trước khi đọc mật độ quang.

6.3.6 Đo mật độ quang

Trộn lượng chứa trong mỗi ống (ví dụ bằng máy trộn vortex) và đo mật độ quang trong vùng quang phổ nhìn thấy (ví dụ ở bước sóng từ 550 nm đến 600 nm). Điều này có thể thực hiện được bằng cách đo trực tiếp các ống nghiệm trong các máy đo phổ thích hợp, chuyển một lượng môi trường phân tích vào cuvet và đo, hoặc sử dụng quy trình tự động hoá. Các tấm microtitre được đọc thông qua máy đọc tấm microtitre tự động. Khoảng thời gian từ khi trộn ống nghiệm đến khi đo mật độ quang phải chuẩn hóa đối với tất cả các ống nghiệm.

7 Tính kết quả

7.1 Hiệu chuẩn

Các dữ liệu kép cần thu được đối với tất cả các chất chuẩn. Mẫu trắng không nuôi cấy phải trong. Các mẫu trắng đã có chùng cấy cũng phải trong hoặc chỉ hơi đục. Nếu các mẫu trắng đã cấy đạt yêu cầu thì đọc độ hấp thụ của các ống còn lại. Dụng đồ thị độ hấp thụ của từng ống dựa vào nồng độ của chất chuẩn trong ống phân tích tương ứng và dụng đường chuẩn. Phụ lục A thể hiện đường chuẩn điển hình thu được.

7.2 Mẫu thử

Ở mỗi độ pha loãng phải được đo hai lần lặp lại. Nội suy lượng chất phân tích trong mẫu thử từ đường chuẩn. Việc tính toán có thể được tính thủ công hoặc sử dụng chương trình máy tính thích hợp.

7.3 Tính phần khối lượng vitamin B₆ trong mẫu thử

Tính phần khối lượng của vitamin B₆, ρ , bằng miligam trên 100 g (mg/100 g) mẫu thử theo Công thức (2):

$$\rho = \frac{m_{B_6} \times V_s}{V_{ts} \times m_s \times 10^6} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

m_{B_6} là lượng vitamin B₆ trong ống phân tích tại mức pha loãng dung dịch mẫu thử (trung bình của hai lần đọc), tính bằng nanogram (ng);

V_s là tổng thể tích cuối cùng của dung dịch mẫu thử (6.2), tính bằng mililit (ml);

V_{is} là thể tích của dung dịch mẫu thử được lấy bằng pipet cho vào ống phân tích, tính bằng mililit (ml);

m_s là khối lượng phần mẫu thử được lấy để phân tích, tính bằng gam (g);

100 là số nhân để thu được kết quả trên 100 g;

10^6 là hệ số để thu được kết quả tính bằng miligam (chuyển đổi từ nanogam).

Tính kết quả vitamin B₆ trong mẫu thử từ giá trị trung bình của tất cả các mức pha loãng, tính bằng miligam trên 100 g. Kết quả được biểu thị bằng hoạt độ vi sinh liên quan đến pyridoxin hydroclorua (4.4) được sử dụng để hiệu chuẩn.

Các phép tính trong 7.3 có thể thực hiện đồng thời với các thao tác trong 7.1 và 7.2 sử dụng một chương trình máy tính phù hợp.

8 Các tiêu chí để chấp nhận dữ liệu

Các tiêu chí để chấp nhận dữ liệu có thể phụ thuộc vào quy mô phân tích và phải được thiết lập trong mỗi phòng thử nghiệm. Ít nhất các tiêu chí dưới đây cần được xem xét:

- độ đục tối đa của các dung dịch mẫu trắng đã được cấy;
- độ đục tối thiểu của các dung dịch hiệu chuẩn đậm đặc nhất;
- dao động giữa các giá trị độ hấp thụ lặp lại thu được ở mỗi mức hiệu chuẩn;
- dao động các lượng vitamin B₆ tính được theo pyridoxine giữa tất cả các mức pha loãng của dung dịch mẫu thử;
- có sẵn phép phân tích các mẫu kiểm soát chuẩn có liên quan.

9 Độ chụm

9.1 Tóm tắt thống kê

Các chi tiết của phép thử nghiệm liên phòng về độ chụm của phương pháp được đưa ra trong Phụ lục B. Các giá trị thu được từ phép thử nghiệm liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và các chất nền khác được đưa ra trong Phụ lục B.

9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hết nhau sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r .

Các giá trị pyridoxin tính bằng miligam trên 100 g chất khô:

Bột mì nguyên cám	$\bar{x} = 0,45 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,08 \text{ mg}/100 \text{ g}$
Sữa bột	$\bar{x} = 0,65 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,11 \text{ mg}/100 \text{ g}$
Rau trộn	$\bar{x} = 0,46 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,07 \text{ mg}/100 \text{ g}$
Gan lợn	$\bar{x} = 1,87 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,50 \text{ mg}/100 \text{ g}$

9.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, thu được trên vật liệu giống nhau bởi hai phòng thử nghiệm khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R .

Các giá trị pyridoxin tính bằng miligam trên 100 g chất khô:

Bột mì nguyên cám	$\bar{x} = 0,45 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,36 \text{ mg}/100 \text{ g}$
Sữa bột	$\bar{x} = 0,65 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,29 \text{ mg}/100 \text{ g}$
Rau trộn	$\bar{x} = 0,46 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,29 \text{ mg}/100 \text{ g}$
Gan lợn	$\bar{x} = 1,87 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 1,37 \text{ mg}/100 \text{ g}$

10 Báo cáo thử nghiệm

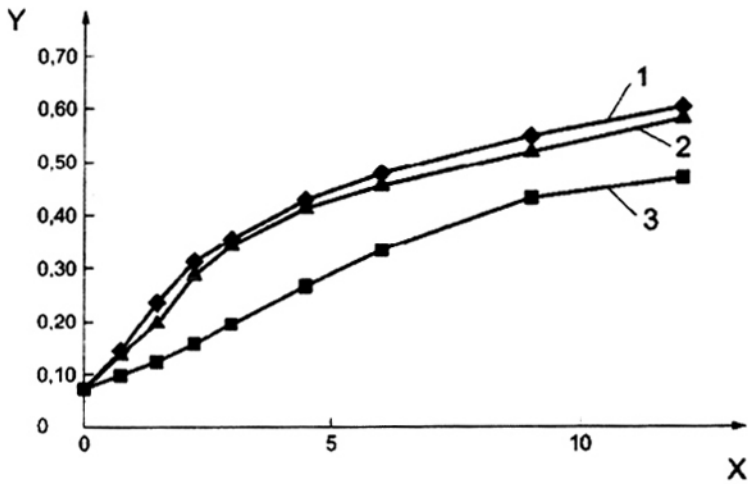
Báo cáo thử nghiệm ít nhất phải bao gồm các thông tin sau đây:

- 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;
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- các kết quả và các đơn vị biểu thị kết quả;
- 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;
- ngày đưa ra báo cáo kết quả, tên và chữ ký của người chịu trách nhiệm phân tích.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Đường chuẩn vitamin B₆ thu được bằng phép thử vi sinh
sử dụng *Saccharomyces uvarum* làm vi sinh vật thử nghiệm



HƯỚNG DẪN

Trục x: .ng/ống

Trục y: độ hấp thụ

1: pyridoxine

2: pyridoxal

3: pyridoxamin

Hình A.1 – Liều phản ứng của *Saccharomyces uvarum* tạo các đồng phân B₆

Phụ lục B

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Theo dữ liệu thu được trong phép thử liên phòng thử nghiệm năm 1996 giữa các phòng thử nghiệm Châu Âu, xem [3].

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm

Mẫu	Bột mì nguyên cám	Sữa bột	Rau trộn	Gan lợn
Năm thử nghiệm	1996	1996	1996	1996
Số phòng thử nghiệm	7	7	7	7
Ngoại lệ	0	0	0	0
Giá trị trung bình \bar{x} (mg/100 g)	0,45	0,65	0,45	1,87
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r (mg/100 g)	0,03	0,04	0,02	0,18
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại	6 %	6 %	5 %	9 %
Giá trị lặp lại r (95 %) (mg/100 g)	0,08	0,11	0,07	0,50
Độ lệch chuẩn tái lập s_R (mg/100 g)	0,13	0,10	0,10	0,49
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập	28 %	15 %	23 %	26 %
Giá trị tái lập R (95 %) (mg/100 g)	0,36	0,28	0,29	1,37

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] *Microbiological assay of vitamins of the B group*, Bell, J.G., Lab. Practice, 1974, 23, 235 - 242
 - [2] Metzler and Snell (1955): *Spectra and ionisation constants of the vitamin B6 group and related 3-hydroxypyridine derivatives*. Journal of the American Chemical Society 77: 2431 – 2437
 - [3] *The certification of the mass fractions of vitamins in four reference materials: wholemeal flour (CRM 121), milk powder (CRM 421), lyophilised mixed vegetables (CRM 485) and lyophilised pigs liver (CRM 487)*. Finglas, P.M., Scott, K.J., Withoft, C., van den Berg, H. & Froidmont-Görtz, I. (1999); EUR-report 18320, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
-