

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 B₂ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

*Foodstuffs – Determination of vitamin B₂ by
high performance liquid chromatography (HPLC)*

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc 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 hàm lượng vitamin B₂ trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Việc xác định hàm lượng vitamin B₂ được tiến hành bằng đo hàm lượng riboflavin.

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

3 Nguyên tắc

Riboflavin trong dung dịch mẫu thích hợp được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector huỳnh quang sau khi thủy phân bằng axit rồi xử lý bằng enzym để khử phosphoryl, 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 là nước cất hai lần hoặc ít nhất là loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác.

4.2 Hóa chất và dung dịch

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

4.2.2 **Natri axetat ngậm ba phân tử nước**, $w(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 99 \%$.

4.2.3 **Dung dịch natri axetat**, nồng độ chất $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

4.2.4 **Dung dịch natri axetat**, $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 2,5 \text{ mol/l}$.

4.2.5 **Axit axetic băng**, $w(\text{CH}_3\text{COOH}) = 99,8 \%$.

4.2.6 **Dung dịch axit axetic**, $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,02 \text{ mol/l}$

4.2.7 **Axit clohydric**, $w(\text{HCl}) = 36 \%$.

4.2.8 **Axit clohydric**, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

4.2.9 **Axit clohydric**, $c(\text{HCl}) = 0,01 \text{ mol/l}$.

4.2.10 **Axit sulfuric**, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

4.2.11 **Natri hydroxit**, $w(\text{NaOH}) = 99 \%$.

4.2.12 **Dung dịch natri hydroxit**, $c(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$.

4.2.13 **Phospho pentoxit**, $w(\text{P}_2\text{O}_5) = 98 \%$.

4.2.14 **Enzym khử phosphoryl**, có khả năng thủy phân riboflavin liên kết ra khỏi thực phẩm.

CHÚ THÍCH Taka-Diastase¹⁾ được sử dụng để xác định dữ liệu về độ chum.

4.2.15 Pha động HPLC

Các ví dụ về hỗn hợp thích hợp: ví dụ từ 10 % đến 50 % metanol (4.2.1) trong nước hoặc sử dụng chất đệm phosphat hoặc chất đệm axetat nêu trong A.1 của Phụ lục A và trong Phụ lục C, cũng cho khả năng sử dụng các tác nhân cặp ion.

¹⁾ Taka-Diastase Nr.T00040 là tên thương mại của sản phẩm được cung cấp bởi Pfaltz & Bauer, Waterbury, CT 06708, Hoa Kỳ. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương đương có thể được sử dụng nếu chúng đưa ra các kết quả tương tự.

4.2.16 Chất đệm phosphat ($\text{pH} = 3,5$), $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 9,0 \text{ mmol/l}$.

4.2.17 Tetraetylamoniclorua, $w(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NCl}) = 98 \%$.

4.2.18 Natri heptansulfonat, $w(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}) = 98 \%$.

4.3 Chất chuẩn

4.3.1 Riboflavin, $w(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) = 98 \%$

Có thể có được vitamin B₂ dạng riboflavin từ các nhà cung cấp khác nhau. Độ tinh khiết của chuẩn riboflavin có thể khác nhau. Do đó cần xác định nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn bằng phép đo phổ UV (xem phép kiểm tra nồng độ 4.4.3).

4.3.2 Riboflavin-5'-phosphat

Muối natri riboflavin-5'-phosphat, $w(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{NaO}_9\text{P}) = 95 \%$; chỉ dùng cho mục đích định tính.

4.4 Dung dịch gốc

4.4.1 Chú ý phòng ngừa

Vitamin B₂ rất nhạy với ánh sáng. Cần có các biện pháp để bảo vệ vitamin B₂ và các dung dịch tương ứng trong quá trình chuẩn bị mẫu ví dụ: đựng trong dụng cụ bằng thủy tinh màu nâu.

4.4.2 Dung dịch chuẩn gốc riboflavin, nồng độ, $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx 100 \mu\text{g/ml}$

Hòa tan một lượng chất chuẩn riboflavin (4.3.1) đã sấy khô trước và được bảo quản ở nơi tối trong bình hút ẩm chân không hoặc/và trên phospho pentoxit (4.2.13), đã được cân chính xác đến miligam, ví dụ khoảng 50 mg, trong một thể tích xác định, ví dụ 500 ml, trong dung môi thích hợp, ví dụ axit axetic loãng (4.2.6) sử dụng các bình định mức màu nâu. Dung dịch này có thể bền được hai tháng khi bảo quản ở 4 °C ở nơi tối.

Riboflavin ít hòa tan. Để dễ hòa tan, làm ấm khoảng 300 ml axit axetic loãng (4.2.6) trên nồi hơi, liên tục khuấy cho đến khi hòa tan hết, để nguội và thêm axit axetic loãng (4.2.6) đến vạch 500 ml. Cách khác, thêm 5 ml dung dịch natri hydroxit (4.2.12) vào chất chuẩn trong bình định mức 500 ml. Vì tính không ổn định trong dung dịch kiềm ngay sau khi hòa tan, nên thêm 1,5 ml axit axetic băng (4.2.5) và pha loãng tới vạch bằng axit axetic loãng (4.2.6), hoặc axit thích hợp khác. Nếu cần, kiểm tra nồng độ của dung dịch mới được chuẩn bị và dung dịch được bảo quản (4.4.3).

4.4.3 Kiểm tra nồng độ

Trộn 20 ml dung dịch gốc riboflavin (4.4.2) với 3,5 ml dung dịch natri axetat (4.2.3) trong bình định mức 200 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Để chuẩn bị dung dịch mù, trộn 20 ml dung dịch axetic

TCVN 8975:2011

(4.2.6) với 3,5 ml dung dịch natri axetat trong bình định mức 200 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Lấy các dung dịch này để đo phổ.

Đo độ hấp thụ của dung dịch riboflavin ở bước sóng cực đại khoảng 444 nm trong cuvet 1 cm bằng máy đo phổ (5.1), dùng dung dịch mù để làm đối chứng. Tính nồng độ khối lượng riboflavin của dung dịch gốc (4.4.2), ρ , bằng microgam trên mililit, theo Công thức (1):

$$\rho = \frac{A_{444} \times 10^4 \times 10}{328} \quad (1)$$

Trong đó:

A_{444} là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng cực đại khoảng 444 nm;

328 là giá trị $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ của riboflavin (trong dung dịch đệm axetat, pH 3,8) ở bước sóng 444 nm [9];

10 là hệ số pha loãng.

4.5 Dung dịch chuẩn

4.5.1 Dung dịch chuẩn, $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx 10 \mu\text{g/ml}$

Chuẩn bị dung dịch pha loãng 1:10 của dung dịch gốc riboflavin (4.4.2), ví dụ, dùng pipet lấy 10 ml dung dịch gốc riboflavin (4.4.2) cho vào bình định mức màu nâu dung tích 100 ml và thêm axit axetic loãng (4.2.6) hoặc dung môi thích hợp khác đến vạch 100 ml. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

4.5.2 Dung dịch chuẩn làm việc, $\rho(\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6) \approx 0,1 \mu\text{g/ml}$ đến $1 \mu\text{g/ml}$

Dùng pipet lấy các thể tích tương ứng, ví dụ từ 1,0 ml đến 10,0 ml dung dịch chuẩn (4.5.1) cho vào các bình định mức màu nâu, ví dụ dung tích 100 ml và pha loãng bằng pha động (4.2.15) đến vạch. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy đo phổ UV

Máy đo phổ UV để đo độ hấp thụ ở các bước sóng xác định, với các cuvet thích hợp, ví dụ 1 cm.

5.2 Nồi hấp hoặc thiết bị gia nhiệt

Nồi hấp với mục đích chiết, ví dụ kiểu nồi áp suất, có dụng cụ đọc áp suất hoặc nhiệt độ; thiết bị gia nhiệt bằng điện hoặc nồi cách thủy.

5.3 Hệ thống HPLC

Hệ thống HPLC, gồm có bơm, bộ bơm mẫu, detector huỳnh quang cài đặt bước sóng kích thích, ví dụ 468 nm, bước sóng phát xạ, ví dụ 520 nm và hệ thống đánh giá kết quả như máy tích phân.

5.4 Cột HPLC

Cột pha đảo phân tích, ví dụ: đường kính từ 4,0 mm đến 4,6 mm, chiều dài từ 100 mm đến 250 mm, được nhồi bằng hạt cỡ từ 3 μm đến 10 μm .

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

Có thể sử dụng các hệ thống khác (xem Phụ lục C) với điều kiện là tách được riboflavin ra khỏi các chất bị chiết cùng.

5.5 Thiết bị lọc

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

Việc lọc pha động cũng như lọc dung dịch mẫu qua bộ lọc màng trước khi sử dụng hoặc bơm sẽ làm tăng thời gian sử dụng của cột.

6 Cách tiến hành

6.1 Chú ý

Vitamin B₂ rất nhạy với ánh sáng. Cần có các biện pháp để bảo vệ mẫu và các dung dịch tương ứng trong suốt quá trình phân tích như đựng trong dụng cụ thủy tinh màu nâu.

6.2 Chuẩn bị mẫu thử

Đông hoá mẫu thử. Nghiền thô mẫu bằng máy nghiền thích hợp. Nên làm mát sơ bộ mẫu để tránh mẫu tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian dài.

6.3 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

6.3.1 Chiết mẫu

Cân một lượng mẫu thích hợp, ví dụ từ 2 g đến 10 g, chính xác đến miligam, cho vào cốc có mỏ hoặc bình nón. Thêm một thể tích xác định từ 50 ml đến 200 ml axit clohydric (4.2.8) hoặc axit sulfuric (4.2.10). Độ pH của dung dịch phải nhỏ hơn 2,0. Đậy vật chứa bằng mặt kính đồng hồ và hấp áp lực phần mẫu thử 30 min ở 121 °C, hoặc làm nóng 60 min ở 100 °C.

TCVN 8975:2011

CHÚ THÍCH Dữ liệu từ nghiên cứu BCR cho thấy có thể áp dụng một dải rộng các điều kiện để thủy phân axit (nhiệt độ từ 95 °C tới 130 °C, thời gian từ 15 min đến 60 min, nhiệt độ cao hơn thì thời gian ngắn hơn). Tuy nhiên, việc gia nhiệt kéo dài có thể làm thất thoát riboflavin và riboflavin-5'-phosphat. Đặc biệt với các loại thực phẩm chứa socola, thực tế cho thấy rằng giá trị chiết có thể giảm khi pH lớn hơn 2.

6.3.2 Xử lý bằng enzym

Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, chỉnh dịch chiết đến pH tối ưu đối với enzym được sử dụng bằng dung dịch natri axetat (4.2.4) và thêm một lượng thích hợp enzym khử phosphoryl (4.2.14) vào mẫu. Ủ hỗn hợp với khoảng thời gian và nhiệt độ tối ưu đối với enzym được sử dụng. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, chuyển dung dịch vào bình định mức được bảo vệ tránh ánh sáng, sử dụng axit axetic loãng (4.2.6) hoặc dung môi thích hợp khác và pha loãng đến thể tích xác định (V_E).

Đối với từng enzym được sử dụng, phải kiểm tra pH, thời gian ủ và nhiệt độ ủ tối ưu.

Để đảm bảo khử phosphoryl tối ưu, bước sử dụng enzym phải được kiểm tra bằng cách phân tích mẫu được bổ sung muối natri riboflavin-5'-phosphat (4.3.2) và chất tương tự trong mẫu thử. Chất này phải là mẫu chuẩn đã được xác nhận.

Nếu Taka-Diastase được sử dụng để khử phosphoryl thì lượng riboflavin có thể thu lại với enzym phải được xem xét khi tính kết quả.

CHÚ THÍCH 1 Để xác định các dữ liệu về độ chum nêu trong tiêu chuẩn này, Taka-Diastase¹⁾ đã được sử dụng để khử phosphoryl trong các điều kiện sau. Dịch chiết được chỉnh đến pH = 4,0 bằng dung dịch natri axetat (4.2.4) và cứ một gam mẫu thì bổ sung 100 mg Taka-Diastase. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ từ 37 °C đến 46 °C trong khoảng từ 16 h đến 24 h.

CHÚ THÍCH 2 Việc khử phosphoryl có thể phụ thuộc vào chất nền mẫu và enzym (hỗn hợp) được sử dụng, xem [7], [10] và [11].

6.3.3 Dung dịch mẫu thử

Từ phần dịch lọc đã được lọc qua giấy lọc hoặc bộ lọc màng 0,45 μm , pha loãng một lượng (V_A) đến một thể tích xác định, nếu cần. Có thể cho ly tâm ở gia tốc thích hợp để làm trong dung dịch mẫu. Pha loãng một lượng dịch lọc trong (V_A) đến một thể tích xác định (V) bằng hỗn hợp dung môi thích hợp tương thích với hệ thống HPCL sử dụng, hoặc pha loãng, ví dụ 1,0 ml dịch chiết (6.3.2) với 1,0 ml metanol (4.2.1). Dung dịch mẫu thử này được dùng để phân tích HPLC.

6.4 Nhận biết

Nhận biết riboflavin bằng cách so sánh thời gian lưu của pic trong sắc phổ thu được của dung dịch mẫu thử và của dung dịch chuẩn. Có thể thực hiện phép nhận biết pic bằng cách thêm các lượng nhỏ dung dịch chuẩn thích hợp vào dung dịch mẫu thử.

CHÚ THÍCH Việc tách và định lượng cho thấy thích hợp nếu tuân thủ các điều kiện thực nghiệm sau đây (xem thêm Hình A.1). Đối với các hệ thống HPLC thay thế, xem Bảng C.1.

Pha tĩnh: Supelco[®] LC-18-DB, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm

Pha động: metanol (4.2.1) : đệm phosphat, pH 3,5 (4.2.16) có chứa tetraetyl amoniclorua 1 g/l (4.2.17) và natri heptansulfonat 5 mmol/l (4.2.18) (35:65)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min

Thể tích bơm: 20 μ l

Detector: huỳnh quang; bước sóng kích thích: 468 nm; bước sóng phát xạ: 520 nm.

6.5 Phép xác định

Bơm các thể tích bằng nhau (đến 100 μ l) của dung dịch chuẩn (4.4.2) cũng như dung dịch mẫu thử (6.3.3) vào trong hệ thống HPLC. Tiến hành định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn, tích phân các diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic và so sánh kết quả với các giá trị tương ứng của chất chuẩn.

Kiểm tra độ tuyến tính của hàm hiệu chuẩn.

7 Tính kết quả

Tính kết quả dựa trên đồ thị chuẩn hoặc sử dụng chương trình tương ứng của máy tích phân hoặc sử dụng theo công thức giản lược sau đây.

Tính phần khối lượng vitamin B₂ của mẫu thử, w , bằng miligam trên 100 g (mg/100 g), sử dụng Công thức (2):

$$w = \frac{A_S \times \rho \times V \times V_E}{A_{ST} \times m_S \times V_A \times 1000} \times 100 - \frac{m_E \times E}{m_S} \quad (2)$$

Trong đó:

A_S là diện tích pic hoặc chiều cao pic của riboflavin thu được từ dung dịch mẫu thử (6.3.3), tính bằng đơn vị diện tích hoặc chiều cao;

A_{ST} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của riboflavin thu được với dung dịch chuẩn (4.4.2), tính bằng đơn vị diện tích hoặc chiều cao;

V là tổng thể tích của dung dịch mẫu thử cuối cùng (6.3.3), tính bằng mililit (ml);

V_E là thể tích của dịch chiết (6.3.2), tính bằng mililit (ml);

V_A là thể tích phần mẫu thử được dùng để pha loãng cuối cùng (6.3.3), tính bằng mililit (ml);

ρ là nồng độ khối lượng của riboflavin trong dung dịch chuẩn (4.4.2), tính bằng microgam trên mililit (μ g/ml);

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

TCVN 8975:2011

1000 là hệ số chuyển đổi từ microgam thành miligam;

100 là hệ số chuyển đổi của phần khối lượng trên 100 g;

E là phần khối lượng riboflavin có trong enzym, tính bằng miligam trên 100 g (mg/100 g);

m_E là khối lượng enzym đã sử dụng trong phép phân tích, tính bằng gam (g).

Báo cáo kết quả vitamin B₂ bằng miligam trên 100 g (mg/100 g).

8 Độ chụm

8.1 Yêu cầu chung

Dữ liệu về độ chụm của các phương pháp HPLC khác nhau đối với phép xác định riboflavin được thiết lập năm 1996 bằng nghiên cứu so sánh quốc tế do Chương trình Tiêu chuẩn, Đo lường và Thử nghiệm của Ủy ban tiêu chuẩn Châu Âu tổ chức thực hiện trên mẫu sữa bột (CRM 421) và gan lợn đông khô (CRM 487). Nghiên cứu này cung cấp thông tin thống kê nêu trong Phụ lục B. Dữ liệu thu được từ các nghiên cứu so sánh này có thể không áp dụng cho các giải nồng độ chất phân tích và các chất nền mẫu khác với dải nồng độ và chất nền nêu trong Phụ lục B.

8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, đơn lẻ dựa 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 riboflavin là:

Sữa bột	$\bar{x} = 14,54 \text{ mg/100 g}$	$r = 1,3048 \text{ mg/100 g}$
Gan lợn	$\bar{x} = 105,46 \text{ mg/100 g}$	$r = 5,1104 \text{ mg/100 g}$

8.3 Độ tái lập

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

Các giá trị riboflavin là:

Sữa bột	$\bar{x} = 14,54 \text{ mg/100 g}$	$R = 3,0078 \text{ mg/100 g}$
Gan lợn	$\bar{x} = 105,46 \text{ mg/100 g}$	$R = 23,5342 \text{ mg/100 g}$

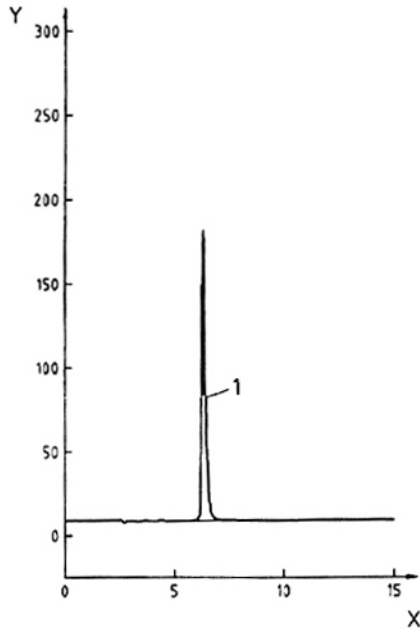
9 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) tên và chữ ký của người chịu trách nhiệm phân tích;
- b) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- c) viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp thử đã sử dụng;
- d) ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- e) ngày nhận mẫu;
- f) ngày thử nghiệm;
- g) các kết quả và các đơn vị biểu thị kết quả;
- h) các điểm đặc biệt quan sát được trong khi tiến hành thử nghiệm;
- i) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là + chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Sắc đồ



CHÚ DẪN

X: min

Y: độ hấp thụ

1: 6,380 vitamin B₂

Hình A.1 – Ví dụ về tách dung dịch chuẩn riboflavin bằng HPLC

Pha tĩnh: Supelco® LC-18-DB, 5 μm, 250 mm x 4,6 mm

Pha động: metanol (4.2.1): đệm phosphat, pH 3,5 (4.2.16) có chứa tetraetyl amoniclorua 1 g/l (4.2.17) và natri heptansulfonat 5 mmol/l (4.2.18) (35:65)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min

Thể tích bơm: 20 μl

Detector: huỳnh quang; bước sóng kích thích: 468 nm; bước sóng phát xạ: 520 nm

Phụ lục B

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các thông số sau đây của các phương pháp khác nhau về xác định riboflavin (vitamin B₂) đã được xác định trong một nghiên cứu so sánh quốc tế do chương trình Tiêu chuẩn, Đo lường và Thử nghiệm của Ủy ban Châu Âu tổ chức thực hiện [10].

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm

Mẫu	Sữa bột, CRM 421	Gan lợn, CRM 487
Chất phân tích	riboflavin	riboflavin
Năm	1996	1996
Số phòng thử nghiệm	13	11
Số mẫu	1	1
Số phòng thử nghiệm giữ lại sau khi loại trừ ngoại lệ	12	11
Số ngoại lệ	1	0
Số dữ liệu tập hợp	12	11
Số phép đo tái lập	5	5
Giá trị trung bình, \bar{x} , mg/100 g	14,54	105,46
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , mg/100 g	0,4611	1,8058
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	3,17	1,71
Giá trị lặp lại, $r[2,83.s_r]$, mg/100 g	1,3048	5,1104
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , mg/100 g	1,0628	8,3160
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	7,31	7,89
Giá trị tái lập, $R[2,83.s_R]$, mg/100 g	3,0078	23,5342

CHÚ THÍCH Dữ liệu thu được trong nghiên cứu so sánh quốc tế này thu được bằng phương pháp tương đương khác với quy trình thử nghiệm thông thường trong các phòng thử nghiệm dùng hệ thống HPLC mô tả trong Phụ lục C.

Phụ lục C

(Tham khảo)

Các hệ thống HPLC thay thế

Việc tách và định lượng đã áp dụng thấy thoả mãn nếu áp dụng các điều kiện sắc ký sau đây [10].

Bảng C.1 – Các hệ thống HPLC thay thế

Pha tĩnh	Kích thước cột, mm x mm	Pha động	Tốc độ dòng, ml/min	Detector huỳnh quang, nm
Hypersil [®] ODS, 5 μm	125 x 4,6	Metanol : nước (50:50)	1,0	Kích thích: 462 Phát xạ: 520
Supelco [®] LC-18-DB, 5 μm	250 x 4,6	Metanol : đệm phosphat (4.2.16) chứa tetraethylamoniorid, $\rho(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NCl}) = 1 \text{ g/l}$ và natri heptansulfonat, $c(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{S}) = 5 \text{ mmol/l}$ (35:65)	1,0	Kích thích: 468 Phát xạ: 520
Lichropher [®] RP 18, 5 μm	25 x 4 + 125 x 4	Metanol : amoniac 0,025 % (+ 1 g axit hexansulfonat); (250:500); pH 3,6	1,5	Kích thích: 467 Phát xạ: 525
Apex [®] C18, 3 μm	250 x 4	Metanol : nước (1:1)	1,0	Kích thích: 450 Phát xạ: 510
Bondapak [®] C18 radialpak cartridges	100 x 8	Metanol : 5 mmol đệm phosphat pH 7 (35:65)	1,0	Kích thích: 440 Phát xạ: 520
Spherisorb [®] ODS2, 5 μm	250 x 4,6	Metanol : nước (50:50)	1,0	Kích thích: 450 Phát xạ: 510
μBondapak [®] C18, 10 μm	100 x 8	Metanol : đệm natri axetat 0,05 M, pH 4,5 (40:60)	1,0	Kích thích: 422 Phát xạ: 522
Kromasil [®] C-18, 5 μm	250 x 4,6	Metanol : nước (40:60)	1,0	Kích thích: 440 Phát xạ: 520
Eurospher [®] C18, 5 μm	250 x 4,6	Metanol : nước (50:50)	1,0	Kích thích: 445 Phát xạ: 530
Spherisorb [®] ODS, 5 μm	250 x 4,6	Metanol : nước (50:50)	1,0	Kích thích: 410 Phát xạ: 510
Spherisorb [®] ODS, 5 μm	250 x 4,6	KH_2PO_4 : axetonitril : metanol (60:10:30)	0,8	Kích thích: 450 Phát xạ: 520

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Lumley, I. D. and Wiggins, R. A.: Determination of riboflavin and flavin mononucleotide in foodstuffs using high-performance liquid chromatography and a column-enrichment technique. *Analyst* 106, 1981. 1103-1108.
- [2] Finglas, P.M. and Faulks, R.M: Critical review of HPLC methods for the determination of thiamin, riboflavin and niacin in food. *J. Micronutr. Anal.* 3. 1987. 251-283.
- [3] Ball, G. F. M, in G. F. M. Ball (Ed.); *Water-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis*. Elsevier Applied Science, London, 1994, 237-246.
- [4] Hasselmann, C., Franck, D., Grimm, P., Diop, P.A. and Soules, C: High-performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietetic foods. *J. Micronutr. Anal.* 5. 1989. 269-279.
- [5] Ollilainen, V., Mattila P., Vara, P., Koivistonen, P. and Hutlunen, J.: The HPLC determination of total riboflavin in foods. *J. Micronutr. Anal.* 8. 1990,199-207.
- [6] Hägg, M. and Kurnpulanen, J.: Thiamin and riboflavin contents in domestic and imported cereal products in Finland. *J. Food Comp. Anal.* 6.1993. 299-306.
- [7] Hägg, M.: Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamin and riboflavin in foods. *J. AOAC Int.* 77. 1994. 681-686.
- [8] Eitenmtler, R. R. and Landen. W. O.: *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. CRC Press. Boca Raton. London. New York, Washington, D.C., 1999, 299-337.
- [9] *European Pharmacopoeia 1997: 1997: 0292. Riboflavme. 1442-1443.*
- [10] Finglas, P. M., Scott, K. J., Witthoft. C. M., van den Berg, H. & de Froidmont-Gortz. I.: 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 pig's liver (CRM 487). EUR-report 18320, Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg, 1999.
- [11] Ndaw, S., Bergaenzle, M., Aoude-Werner. D., Hasselmann. C: Extraction procedures for the liquid chromatography determination of thiamine, riboflavin and vitamin B₆, in foodstuffs. *Food Chemistry* 71, 2000. 129-138.