

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 A bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Phần 2: Xác định β -caroten

*Foodstuffs – Determination of vitamin A by high-performance liquid chromatography –
Part 2: Measurement of β -carotene*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng β caroten tổng số trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

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.*

TCVN 2625 (ISO 5555), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu.*

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.*

3 Nguyên tắc

Xác định tổng của các đồng phân β -caroten trong dung dịch mẫu bằng HPLC và đo phổ trong dải nhìn thấy được. Dịch chiết thu được sau khi xả phòng hóa như quy định trong TCVN 8972-1 (EN 12823-1) có thể được dùng để định lượng. Việc nhận biết dựa vào thời gian lưu và xác định bằng phương pháp ngoại chuẩn sử dụng diện tích pic hoặc chiều cao pic, xem [3] đến [7].

Có thể sử dụng phương pháp nội chuẩn nếu các phép thử về độ thu hồi tương ứng được chứng minh là phù hợp.

4 Thuốc thử

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.

4.1 Metanol.

4.2 Etanol tuyệt đối, φ (C₂H₅OH) = 100 % thể tích.

4.3 Etanol, φ (C₂H₅OH) = 96 %.

4.4 Natri sulfat, khan.

4.5 Dung dịch KOH dùng để xà phòng hóa, có các nồng độ khối lượng thích hợp, ví dụ ρ (KOH) = 50 g/100 ml hoặc 60 g/100 ml, hoặc dung dịch ancol, ví dụ 28 g KOH trong 100 ml hỗn hợp etanol/nước (9 + 1) (tính theo thể tích).

4.6 Chất chống oxy hóa, ví dụ axit ascorbic (AA), natri ascorbat, natri sulfit (Na₂S), hydroxytoluen đã butyl hóa (BHT), pyrogallol hoặc hydroquinon.

4.7 Dung môi và dung môi chiết, ví dụ: axetonitril, dietyl ete (không chứa peroxit), di-isopropylete, dầu nhẹ (dải sôi từ 40 °C đến 60 °C), *n*-hexan, diclometan, tetrahydrofuran, toluen hoặc các hỗn hợp thích hợp của chúng.

4.8 Dung dịch amoni axetat trong metanol, ví dụ α (CH₃CO₂NH₄) = 0,05 mol/l.

4.9 Trietylamin.

4.10 Pha động HPLC, ví dụ axetonitril (4.7) + dung dịch amoni axetat trong metanol (4.8) + diclometan (4.7) (75 + 20 + 5) (thể tích) chứa hydroxy toluen đã butyl hóa (4.6) 0,1 % khối lượng và trietylamin 0,05 % khối lượng (4.9). Đối với pha động của hệ thống HPLC thay thế, xem Phụ lục C.

4.11 Chất chuẩn

4.11.1 Yêu cầu chung

β -caroten và α -caroten có thể có được từ các nhà cung cấp khác nhau, ví dụ Sigma ¹⁾. Độ tinh khiết của các chất chuẩn có thể dao động từ 90 % đến 100 %. Vì vậy cần xác định nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn bằng đo phổ (xem phép thử độ tinh khiết và xác định nồng độ [4.12.2]).

4.11.2 β -caroten, M (C₄₀H₅₆) = 536,85 g/mol, có hàm lượng đã biết ít nhất là 95 %.

¹⁾ Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải theo đúng tên nhà cung cấp. Các sản phẩm tương đương có thể được sử dụng nếu chúng cho cùng một kết quả.

4.11.3 α -Caroten, $M(C_{40}H_{56}) = 536,85$ g/mol, dùng để định tính.

4.11.4 Lycopene, $M(C_{40}H_{56}) = 536,85$ g/mol, dùng để định tính.

4.12 Dung dịch gốc và dung dịch chuẩn

4.12.1 Dung dịch gốc β -caroten

Hòa tan khoảng 3 mg chất chuẩn β -caroten (4.11.2) trong 20 ml diclometan, tetrahydrofuran hoặc toluen (4.7), đặt bình định mức vào bể siêu âm (5.6) trong khoảng 30 s. Pha loãng dung dịch này bằng *n*-hexan đến 100 ml, sau đó pha loãng 10,0 ml dung dịch thu được bằng *n*-hexan đến 100 ml. 1 ml dung dịch này chứa khoảng 3 μ g β -caroten trong *n*-hexan/diclometan (98 + 2) (tính theo thể tích), *n*-hexan/tetrahydrofuran (98 + 2) (tính theo thể tích); hoặc *n*-hexan/toluen (98 + 2) (tính theo thể tích).

Bảo quản dung dịch tránh ánh sáng, ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C.

4.12.2 Phép thử độ tinh khiết và xác định nồng độ

Đo độ hấp thụ của dung dịch gốc β -caroten (4.12.1) ở bước sóng cực đại khoảng 453 nm, dùng máy đo phổ (5.1). Tính nồng độ khối lượng, ρ , bằng microgam trên mililit, theo Công thức (1):

$$\rho = \frac{A_{453} \times 10^4}{2592} \quad (1)$$

Trong đó

A_{453} là giá trị hấp thụ của dung dịch gốc ở bước sóng cực đại khoảng 453 nm;

2592 là giá trị $E_{1cm}^{1\%}$ của β -caroten trong *n*-hexan. Giá trị này có thể thay đổi đáng kể theo thành phần của dung môi [8].

Tỷ số của A_{455}/A_{340} phải lớn hơn 15 và tỷ số A_{455}/A_{483} phải trong dải từ 1,14 đến 1,18 đối với độ tinh khiết của all-trans- β -caroten [8].

4.12.3 Dung dịch chuẩn β -caroten

Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch gốc β -caroten (4.12.1) cho vào bình cầu đáy tròn và loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm (5.2) ở nhiệt độ không quá 50 °C. Hòa tan cạn trong 20 ml dung môi phù hợp với HPLC pha đảo.

Dung dịch chuẩn phải được bảo quản tránh ánh sáng, ở nhiệt độ dưới 4 °C và thường bền đến 1 tuần.

TCVN 8972-2:2011

4.12.4 Dung dịch chuẩn của α -caroten và lycopene²⁾

Để định lượng, hòa tan sơ bộ khoảng 0,3 mg α -caroten (4.11.3) hoặc lycopene (4.11.4) trong khoảng 10 ml tetrahydrofuran (4.7) và pha loãng đến vạch 100 ml bằng ethanol (4.3) hoặc dung môi khác phù hợp với hệ thống HPLC.

Dung dịch chuẩn phải được bảo quản tránh ánh sáng, ở nhiệt độ dưới 4 °C và thường bền đến 1 tuần.

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-VIS, có khả năng đo độ hấp thụ ở các bước sóng xác định, với các cuvet thạch anh thích hợp, ví dụ: chiều dài đường quang 1 cm.

5.2 Máy cô quay, có nồi cách thủy và bộ phận chân không.

CHÚ THÍCH Nên sử dụng nitơ để giải phóng chân không.

5.3 Hệ thống HPLC, gồm có bơm, bộ bơm mẫu, detector UV-VIS và hệ thống đánh giá kết quả như máy tích phân/hoặc máy ghi.

5.4 Cột HPLC

Cột pha đảo phân tích, ví dụ cột pha đảo C₁₈, cỡ hạt 5 μ m, đường kính từ 4,0 mm đến 4,6 mm, dài 250 mm.

Có thể sử dụng các loại cột và cỡ hạt khác với quy định trong tiêu chuẩn này. Các điều kiện sắc ký có thể phải được điều chỉnh cho phù hợp đối với các nguyên liệu để đảm bảo cho kết quả tương đương.

Tiêu chí đối với các cột phân tích phù hợp là hệ số phân giải đối với all-trans- α -caroten và all-trans- β -caroten phải lớn hơn 1.

Sử dụng vật liệu nhồi cột pha đảo thích hợp, ví dụ: Vydac® 201TP54³⁾, Vydac® 218TP54³⁾, Eurospher® 100-C₁₈³⁾, Ultraspher® ODS³⁾, Spherisorb® ODS2³⁾, Zorbax® ODS2³⁾ và LiChrospher® RP 18³⁾. Các cột có thể cũng được sử dụng trong dãy phân tích. Nên dùng cột bảo vệ để tăng thời hạn sử dụng của cột phân tích.

²⁾ Các dung dịch chuẩn β -caroten và lycopene là không cần thiết đối với việc định lượng β -caroten trong dịch chiết mẫu nhưng giúp cho việc nhận biết các hợp chất khác nhau.

³⁾ Vydac® 201TP54, Vydac®218TP54, Eurospher® 100-C₁₈, Ultrasphere® ODS, Spherisorb® ODS2, Zorbax® ODS và LiChrospher® RP18 là các ví dụ về sản phẩm bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

5.5 Dụng cụ lọc

Các dụng cụ lọc loại lớn, nhỏ để lọc pha động HPLC và các dung dịch mẫu tương ứng, ví dụ có cỡ lỗ 0,45 μm là thích hợp.

CHÚ THÍCH Việc lọc pha động cũng như dung dịch mẫu thử qua bộ lọc màng trước khi sử dụng hoặc bơm có thể tăng thời gian sử dụng của cột.

5.6 Bể siêu âm.

5.7 Bộ lọc tách pha (tùy chọn).

6 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555), nếu thích hợp.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hóa mẫu thử. Nghiền mẫu bằng dụng cụ nghiền thích hợp và trộn kỹ lại. Làm lạnh sơ bộ để mẫu không tiếp xúc với nhiệt độ cao trong khoảng thời gian dài. β -caroten nhạy với bức xạ UV và ánh sáng.

7.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

7.2.1 Xà phòng hóa

Xà phòng hóa từ 2 g đến 10 g mẫu thử bằng cách cho đối lưu, tốt nhất dưới dòng nitơ, dùng các lượng thích hợp của metanol (4.1) hoặc etanol (4.3), nước, chất chống oxi hóa (4.6) và dung dịch kali hydroxit (4.5). Cho chất chống oxi hóa vào mẫu trước khi bổ sung kali hydroxit. Natri sulfit (4.6) có thể cũng được bổ sung để phòng ngừa ảnh hưởng của các kim loại dạng vết.

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

Bảng 1 – Tỷ lệ thích hợp của các thuốc thử

Khối lượng mẫu	Ancol	Chất chống oxi hóa	Kali hydroxit
2 g đến 5 g	50 ml metanol	0,25 g AA	5 ml dung dịch 50 g/100 ml
5 g đến 10 g	100 ml etanol	1,0 g AA + 0,04 g Na ₂ S	20 ml dung dịch 60 g/100 ml
10 g	150 ml etanol	1,0 g AA	50 ml dung dịch 60 g/100 ml

Thời gian xà phòng hóa thường từ 15 min đến 45 min ở nhiệt độ từ 80 °C đến 100 °C (đối lưu).

TCVN 8972-2:2011

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

CHÚ THÍCH Thực tế cho thấy rằng các mẫu có hàm lượng chất béo thấp như quả hoặc rau có thể chiết được trực tiếp bằng các dung môi thích hợp bằng phương pháp tương ứng, ví dụ như quy định trong [9] đến [11]. Tuy nhiên, cũng nên kiểm tra để chắc chắn rằng việc tách sắc ký có đáp ứng được các tiêu chí xác định ở trên (vấn đề gây nhiễu).

7.2.2 Chiết

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

Chiết β -caroten ra khỏi dung dịch mẫu đã xà phòng hóa bằng dung môi hoặc hỗn hợp dung môi thích hợp (4.7). Lặp lại quy trình chiết từ 3 đến 4 lần dùng các lượng từ 50 ml đến 150 ml. Rửa hỗn hợp các dịch chiết bằng nước (thường từ 2 đến 4 lần, mỗi lần dùng từ 50 ml đến 150 ml) đến trung tính.

7.2.3 Làm bay hơi

Làm bay hơi dịch chiết bằng máy cô quay (5.2) dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 50 °C. Loại bỏ hết nước bằng cách dùng natri sulfat (4.4) hoặc chưng cất đồng sôi với etanol tuyệt đối (4.2) hoặc toluen (4.6). Có thể dùng các kỹ thuật tương đương khác như dùng giấy lọc tách pha (5.7) để loại nước, với điều kiện chúng đã được chứng minh không ảnh hưởng đến kết quả.

7.2.4 Pha loãng

Hòa tan lại cặn trong cùng một loại hỗn hợp dung môi trong đó các dung dịch chuẩn (4.12.3 và 4.12.4) đã được chuẩn bị, tốt nhất là pha động hoặc dung môi phù hợp với HPLC khác sao cho để thu được nồng độ β -caroten lên đến 5 $\mu\text{g/ml}$. Đây là dung dịch mẫu thử.

7.3 Nhận biết

Nhận biết β -caroten bằng cách so sánh thời gian lưu của các pic đơn lẻ trong các sắc đồ thu được bằng dung dịch mẫu thử (xem 7.2.4) với thời gian lưu của các pic của dung dịch chuẩn (4.12.3 và 4.12.4). Việc nhận biết pic có thể cũng được thực hiện bằng cách bổ sung các lượng nhỏ dung dịch chuẩn thích hợp vào dung dịch mẫu thử.

CHÚ THÍCH 1 Việc tách và định lượng cho thấy thỏa mãn nếu tuân thủ các điều kiện sắc ký sau đây (xem thêm Hình A.1).

Pha tĩnh: Spherisorb®⁴⁾ ODS2, 5 μm , ống cartridge 100 mm x 4,6 mm được kết hợp với Vydac®⁴⁾ 201TP54, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm;

⁴⁾ Spherisorb® là sản phẩm của Phase Separations Inc; Vydac® là sản phẩm của The Separations Group. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và 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.

Pha động:	Axetonitril + dung dịch amoni axetat trong metanol + diclometan (75 + 20 + 5) (thể tích) chứa 0,1 % khối lượng hydroxytoluen đã butyl hóa và 0,05 % khối lượng triethylamin;
Tốc độ dòng:	1,5 ml/min;
Thể tích bơm:	50 μ l;
Bước sóng phát hiện:	450 nm.

7.4 Xác định

Bơm các thể tích thích hợp (ví dụ 20 μ l) của dung dịch chuẩn (4.12.3) cũng như dung dịch mẫu thử (xem 7.2.4) vào hệ thống HPLC (5.3). Tiến hành định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn, tích phân diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic thu được đối với dung dịch mẫu thử và so sánh các kết quả với các giá trị tương ứng đối với chất chuẩn có thời gian lưu tương tự, hoặc dùng đường chuẩn.

Bơm các thể tích bằng nhau của dung dịch mẫu thử và của các dung dịch chuẩn (4.12.3 và 4.12.4) hoặc bù bằng hệ số tương ứng trong phép tính kết quả. Kiểm tra độ tuyến tính của hàm hiệu chuẩn, dùng tối thiểu ba mức pha loãng của dung dịch gốc β -caroten (4.12.1).

7.5 Số lần xác định

Tiến hành ít nhất hai lần xác định độc lập.

8 Tính kết quả

Dựa vào đường chuẩn, hoặc dùng các chương trình tương ứng của máy tích phân, dùng quy trình đã đơn giản hóa sau đây:

Tính nồng độ khối lượng của β -caroten tổng số, ρ , bằng miligam trên 100 g mẫu (mg/100 g), theo Công thức (2):

$$\rho = \frac{A_s \times c \times V_s \times V_{st}}{A_{ST} \times m \times V_{is} \times 1000} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó

- A_s là diện tích pic hoặc chiều cao pic đối với các đồng phân β -caroten thu được bằng dung dịch mẫu thử (7.2.4), tính bằng các đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;
- c là độ tinh khiết đã được hiệu chỉnh (xem 4.12.2) của nồng độ β -caroten trong dung dịch chuẩn tính bằng microgam trên mililit (μ g/ml);

TCVN 8972-2:2011

- V_s là tổng thể tích của dung dịch mẫu thử (7.2.4), tính bằng millilit (ml);
- V_{st} thể tích bơm của dung dịch chuẩn (7.4), tính bằng microlit (μ l);
- A_{st} là diện tích pic hoặc chiều cao pic đối với β -caroten thu được bằng dung dịch mẫu thử (4.12.3), tính bằng các đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;
- m là khối lượng mẫu, tính bằng gam (g);
- V_S là thể tích bơm của dung dịch mẫu thử, tính bằng microlit (μ l);
- 1000 là hệ số chuyển đổi (microgam sang milligam);
- 100 là hệ số chuyển đổi về hàm lượng trên 100 g.

9 Độ chụm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp phù hợp với TCVN 6910 (ISO 5725) [12] được nêu trong Phụ lục B. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng để phân tích các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu trong Phụ lục B.

9.1 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 đối với β -caroten tổng số là:

Margarin	$\bar{x} = 0,253$	mg/100 g	$r = 0,032$	mg/100 g
Đồ uống có vitamin	$\bar{x} = 2,248$	mg/100 g	$r = 0,19$	mg/100 g
Bột bánh pudding	$\bar{x} = 1,531$	mg/100 g	$r = 0,24$	mg/100 g
Rau trộn	$\bar{x} = 18,05$	mg/100 g	$r = 2,0$	mg/100 g

9.2 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 hơn giới hạn tái lập R .

Các giá trị đối với β -caroten tổng số là:

Margarin	$\bar{x} = 0,253$	mg/100 g	$R = 0,069$	mg/100 g
Đồ uống có vitamin	$\bar{x} = 2,248$	mg/100 g	$R = 0,41$	mg/100 g
Bột bánh pudding	$\bar{x} = 1,531$	mg/100 g	$R = 0,40$	mg/100 g
Rau trộn	$\bar{x} = 18,05$	mg/100 g	$R = 7,6$	mg/100 g

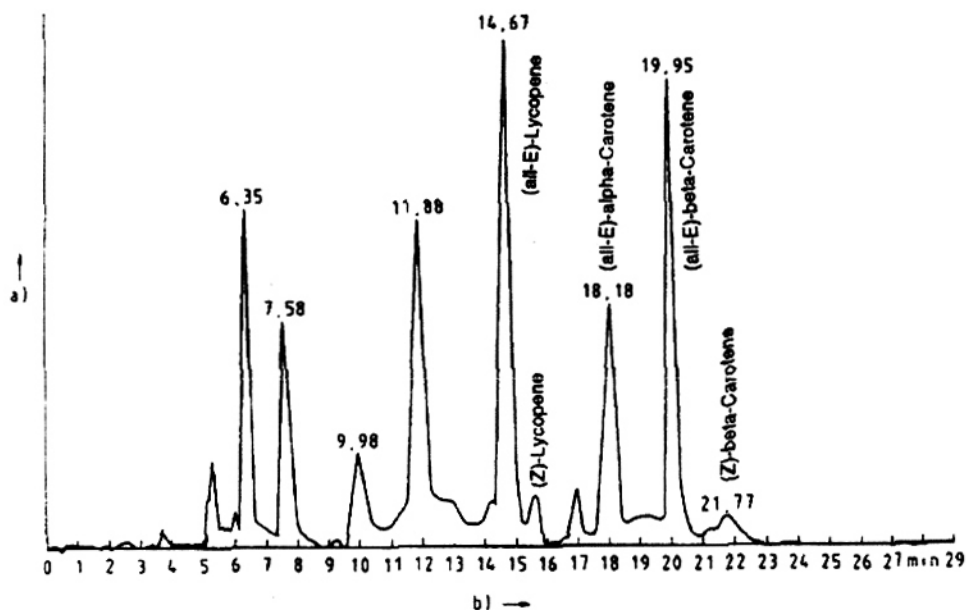
10 Báo cáo thử nghiệm

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;
- 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 sắc đồ HPLC



a) Độ hấp thụ;

b) Thời gian;

Pha tĩnh: Spherisorb^{®5)} ODS2, dài 5 m, ống cartridge 100 mm x 4,6 mm được kết hợp với Vydac^{®5)} 201TP54, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm;

Pha động: axetonitril + dung dịch nhôm axetat trong metanol + diclometan (75 + 20 + 5) (thể tích) chứa 0,1 % khối lượng hydroxytoluen đã butyl hóa và 0,05 % khối lượng trietylamin;

Tốc độ dòng: 1,5 ml/min;

Thể tích bơm: 50 µl;

Phát hiện: 450 nm.

Hình A.1 – Ví dụ về chiết α-caroten, β-caroten và lycopene trong mẫu rau trộn bằng HPLC

⁵⁾ Spherisorb[®] là tên thương mại của sản phẩm do Phase Separations Inc cung cấp; Vydac[®] là tên thương mại của sản phẩm do Separations Group cung cấp. Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác tương đương nếu cho kết quả tương tự.

Phụ lục B

(tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các kết quả và dữ liệu về độ chụm được nêu trong Bảng B.1 về xác định β -caroten tổng số thu được từ một phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994) [12] do W. Schüep và J. Schierle [11] tổ chức.

Bảng B.1 – Kết quả thử liên phòng thử nghiệm đối với β -caroten

Mẫu	Margarin	Đồ uống có vitamin	Bột pudding	Rau trộn
Chất phân tích	β -caroten tổng số	β -caroten tổng số	β -caroten tổng số	β -caroten tổng số
Năm tiến hành phép thử liên phòng thử nghiệm	1995	1995	1995	1995
Số lượng phòng thử nghiệm	13	13	13	13
Số lượng mẫu	1	1	1	1
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	11	12
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	1	2	1
Số lượng các kết quả chấp nhận được	55	59	51	56
Giá trị trung bình mg/100 g	0,253	2,248	1,531	18,05
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , mg/100 g	0,011	0,065	0,085	0,71
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r , %	4,5	2,9	5,6	3,9
Giá trị lặp lại r ($2,83 \times s_r$), mg/100 g	0,032	0,19	0,24	2,0
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , mg/100 g	0,024	0,15	0,14	2,7
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R , %	9,7	6,5	9,3	15
Giá trị tái lập, R ($2,83 \times s_R$), mg/100 g	0,069	0,41	0,40	7,6

Các dữ liệu được kiểm tra xác nhận nêu trong Bảng B.2 đã xác định được trong nghiên cứu so sánh do chương trình Tiêu chuẩn, Đo lường và Thử nghiệm của Ủy ban Châu Âu do Viện nghiên cứu thực phẩm Norwich, Vương quốc Anh tổ chức thực hiện năm 1996 về việc đo all-trans- β -caroten trong mẫu rau trộn [10].

Bảng B.2 – Kết quả thử liên phòng thử nghiệm đối với all-trans- β -caroten

Mẫu	Rau trộn
Năm tiến hành phép thử liên phòng thử nghiệm	1996
Số lượng phòng thử nghiệm	14
Số lượng mẫu	1
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	14
Số lượng bộ dữ liệu	0
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	14
Số lượng các kết quả được chấp nhận	60
Giá trị trung bình mg/100 g	2,37
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , mg/100 g	0,159
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r , %	6,7
Giá trị lặp lại, r ($2,83 \times s_r$), mg/100 g	0,450
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , mg/100 g	0,241
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R , %	10,2
Giá trị tái lập, R ($2,83 \times s_R$), mg/100 g	0,682

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 như trong Phụ lục C.

Phụ lục C

(tham khảo)

Hệ thống HPLC thay thế

Việc tách và định lượng retinol cho thấy thỏa mãn nếu sử dụng các điều kiện sắc ký trong Bảng C.1 [10].
Xem thêm [11].

Bảng C.1 ⁶⁾ – Các điều kiện sắc ký

Pha tĩnh	Kích thước cột, mm	Pha động	Tốc độ dòng	Detector
Spherisorb® ODS2, 5 µm cộng với Vydac® 201TP54, 5 µm	100 x 4,6 250 x 4,6	CH ₃ CN + (MeOH + NH ₄ Ac 0,05 mol/l) + DCM (75 + 20 + 5) chứa 0,1 % BHT và 0,05 % TEA	1,5 ml/min	450 nm
Nucleosil® 3 µm Vydac® TP54, 5 µm	125 x 4,6 250 x 4,6	CH ₃ CN + (MeOH + NH ₄ Ac 0,05 mol/l) + DCM (70 + 20 + 10) chứa 0,05 % TEA		màng diot
Vydac® 201TP54, 5 µm	250 x 4,6	MeOH + THF (95 + 5) + 0,1 % BHT	1,0 ml/min	màng diot
Vydac® 218TP54, 5 µm	250 x 4,6	MeOH + THF (99 + 1) + 50 ppm AA	1,5 ml/min	450 nm
Eurospher® 100-C18, 5 µm	250 x 4,0	CH ₃ CN + MeOH (85 + 15)	0 min đến 6 min: 1,8 ml/min. 6 min đến 20 min: 3,5 ml/min	màng diot
Spheri-5-ODS, 5 µm	220 x 4,6	Gradient với: CH ₃ CN + MeOH (85 + 15) và CH ₃ CN + DCM + MeOH (70 + 20 + 10)		màng diot
Hypersil® ODS, 3 µm		CH ₃ CN + MeOH + DCM + H ₂ O (700 + 150 + 100 + 25)		UV/VIS
Lychrospher® RP18, 5 µm	250 x 4,0	MeOH + THF (95 + 5)	2,0 ml/min	UV/VIS

⁶⁾ Chữ viết tắt:

MeOH: metanol

AA: axit ascorbic hoặc natri ascorbat

KOH: kali hydroxit

THF: tetrahydrofuran

CH₃CN: axetonitril

DCM: diclometan

NH₄Ac: nhôm axetat

TEA: trietylamin

BHT: hydroxy toluen đã butyl hóa

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] World Health Organisation, Expert Committee on Biological Standardisation, Techn. Report No. 147, 11, WHO, Geneva, 1958 and Techn. Report 222, I O, 51 -52, WHO, Geneva, 1961.
 - [2] Int. Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), The Vitamin A Potency of β -Carotene, Butterworths Scientific Publications, London 1959.
 - [3] Bushway, R.J.: Separation of Carotenoids in Fruits and Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography, J. Liq. Chromatogr. 8, 1985, 1527-47.
 - [4] Quackenbush, F.W.: Reversed Phase HPLC Separation of Cis- and Trans-Carotenoids and its Application in Food Materials, J. Liq. Chromatogr. 10, 1987, 643-653.
 - [5] O Neil, C.A., Schwartz, S.J. , Catignani, G.L.: Comparison of Liquid Chromatographic Methods for Determination of Cis-Trans Isomers of β -Carotene, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74, 1991, 36-42.
 - [6] Saleh, H.M., Tan, B.: Separation and Identification of Cisrans Carotenoid Isomers, J. Agric. Food Chem.,39, 1991, 1438-1443
 - [7] Lumley, i. D.: in The Technology of Vitamins in Food, ed. by P. B. Ottaway, Blacie Academic & Professional, Glasgow, 1993, 183-186.
 - [8] De Ritter, E. and Purcell, A.E.: Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors, ed. by J. Christopher Bauernfeind, Academic Press Inc., New York, 1981, 889.
 - [9] Hart, D.J.and Scott, K.J., 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. Food Chem 54, 101-1 11.
 - [10] Finglas, P.M., Scott, K.J., Wilthöft, C. M., van der Berg, H. 8, de Froidmont - Görtz, I., 1999. The certification of the mass fractions of vitamins in four reference materials: wholemeal flour (CRM 121), milk powder (CRM 421), lyophilized mixed vegetables (CRM 485) and lyophilized pig's liver (CRM 487). EUR-Report DOC/BCR/O1/98. Commission of the European Union, Luxembourg.
 - [11] Schüep. W. and Schiede, J., 1997. Determination of β -Carotene in Commercial Foods: Interlaboratory Study. Journal of AOAC International Vol. 80 No. 5, 1057-1064.
 - [12] TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
-