

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 K₁ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

*Foodstuffs – Determination of vitamin K₁
by high performance liquid chromatography (HPLC)*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định vitamin K₁ trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Hàm lượng vitamin K₁ được xác định bằng cách đo phylloquinon đã bị khử. Phương pháp này đã được đánh giá đối với sữa và thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh, tuy nhiên kinh nghiệm của phòng thử nghiệm cho thấy phương pháp này cũng có thể áp dụng được cho các loại thực phẩm khác [10].

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

Sau khi loại chất béo ra khỏi mẫu bằng phương pháp enzym, hàm lượng vitamin K₁ có trong dung dịch mẫu thích hợp được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao kết hợp với phản ứng khử sau cột, sau đó phát bằng đo huỳnh quang. Các đồng phân vitamin K₁ được định lượng như một pic không phân giải bằng cột C₁₈ [1] đến [4].

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 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, $w(\text{CH}_3\text{OH}) \geq 99,8\%$ khối lượng.

4.2.2 Etanol, $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) \geq 99,8\%$ thể tích.

4.2.3 Thuốc thử ancol, $(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 95\%$

Trộn 950 ml etanol (4.2.2) với 50 ml metanol (4.2.1).

4.2.4 Diclometan, $w(\text{CH}_2\text{Cl}_2) \geq 99,5\%$.

4.2.5 *n*-Hexan, $w(\text{C}_6\text{H}_{14}) \geq 97\%$.

4.2.6 Dầu nhẹ, có điểm sôi trong dải từ 35 °C đến 60 °C, loại tinh khiết phân tích.

4.2.7 Kali hydroxit, $w(\text{KOH}) \geq 85\%$.

4.2.8 Dung dịch kali hydroxit, nồng độ chất $c(\text{KOH}) = 10 \text{ mol/l}$.

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

4.2.10 Kali cacbonat, $w(\text{K}_2\text{CO}_3) \geq 99,9\%$.

4.2.11 Natri axetat, khan, $w(\text{CH}_3\text{COONa}) \geq 99,5\%$.

4.2.12 Axit axetic, $w(\text{CH}_3\text{COOH}) \geq 99,8\%$.

4.2.13 Kẽm clorua, $w(\text{ZnCl}_2) \geq 98\%$.

4.2.14 Kẽm dạng bột, cỡ hạt < 63 μm , $w(\text{Zn}) \geq 97\%$.

4.2.15 Dung dịch đệm phosphat, pH từ 7,9 đến 8,0

Hòa tan 54,0 g kali dihydro phosphat (4.2.9) trong khoảng 350 ml nước, chỉnh pH 7,9 đến 8,0 bằng dung dịch kali hydroxit (4.2.8) và pha loãng đến 500 ml bằng nước.

4.2.16 Dung dịch kẽm chlorua-axetat

Cân 13,7 g kẽm clorua (4.2.13), 4,1 g natri axetat khan (4.2.11) và 3,0 g axit axetic (4.2.12) cho vào bình định mức 50 ml, hòa tan trong metanol (4.2.1) và thêm metanol đến 50 ml.

4.2.17 Lipaza loại VII

Ví dụ, sản phẩm từ *Candida rugosa*, có hoạt độ 1000 U/mg hoặc loại thay thế khác phù hợp¹⁾; các nguồn enzym khác từ các loài *Pseudomonas* và *Rhizopus* nhưng cần xem xét đến hoạt độ của enzym.

4.2.18 Pha động dùng cho HPLC

Trộn 100 ml diclometan (4.2.4), 900 ml metanol (4.2.1) và 5 ml dung dịch kẽm clorua-axetat (4.2.16). Lọc qua bộ lọc cỡ lỗ 0,45 μm .

4.3 Chất chuẩn vitamin K₁ (phylochinon, 3-phytylmenadion), $w(\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_2) \geq 99\%$

Vitamin K₁ có thể có được từ các nhà cung cấp khác nhau. Độ tinh khiết của chất chuẩn phyloquinon có thể khác nhau. Vì vậy, cần phải xác định nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn bằng đo phổ UV (xem phép thử nồng độ ở 4.4.4).

4.4 Dung dịch gốc

4.4.1 Chú ý

Vitamin K₁ rất nhạy với ánh sáng. Do đó, khi đo cần chú ý bảo vệ chất chuẩn và dung dịch tương ứng trong suốt quy trình, ví dụ: sử dụng các dụng cụ thủy tinh màu nâu.

4.4.2 Dung dịch gốc I của vitamin K₁, nồng độ khối lượng $\rho(\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_2) \approx 1,0 \text{ mg/ml}$

Cân chính xác khoảng 100 mg chất chuẩn vitamin K₁ (4.3) cho vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong metanol (4.2.1) và thêm metanol đến 100 ml. Dung dịch này có thể bền đến 3 tháng khi được bảo quản dưới dòng nitơ, ở nơi tối, nhiệt độ $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

CHÚ THÍCH Vitamin K₁ có thể khó hòa tan trong metanol.

4.4.3 Dung dịch gốc II vitamin K₁, $\rho(\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_2) \approx 50,0 \text{ }\mu\text{g/ml}$

Dùng pipet lấy 5,0 ml dung dịch gốc I vitamin K₁ (4.4.2) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng bằng metanol (4.2.1) đến vạch. Dung dịch này có thể bền đến 1 tháng khi được bảo quản dưới dòng nitơ ở nơi tối, nhiệt độ $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

¹⁾ Ví dụ: L-1754; Sigma Chemical Co, P.O. 14508, St. Louis, MO 63178, Mỹ. Thông tin này được dùng trong nghiên cứu phòng thử nghiệm. 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 tương đương nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 8974:2011

4.4.4 Phép thử nồng độ

Làm bay hơi 5,0 ml dung dịch gốc II vitamin K₁ (4.4.3) bằng máy cô quay dưới áp suất giảm hoặc dưới dòng nitơ. Hòa tan lại căn trong 25,0 ml *n*-hexan (4.2.5) hoặc dầu nhẹ (4.2.6).

Dùng máy đo phổ (5.1) đo độ hấp thụ của dung dịch này trong cuvet 1 cm so với *n*-hexan hoặc dầu nhẹ ở bước sóng cực đại khoảng 248 nm. Tính nồng độ khối lượng vitamin K₁, ρ , bằng microgam trên mililit dung dịch gốc II vitamin K₁ (4.4.3) theo Công thức (1):

$$\rho = \frac{A_{248} \times 10^4 \times 5}{419} \quad (1)$$

Trong đó:

- A_{248} là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng cực đại khoảng 248 nm;
- 419 là giá trị $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ của vitamin K₁ trong *n*-hexan (4.2.5) hoặc dầu nhẹ (4.2.6) ở bước sóng 248 nm [5];
- 10^4 là hệ số chuyển đổi giá trị $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ sang microgam trên mililit;
- 5 là bước pha loãng trong quá trình thay đổi dung môi từ metanol sang *n*-hexan.

4.5 Dung dịch chuẩn

4.5.1 Dung dịch chuẩn trung gian, vitamin K₁, ρ (C₃₁H₄₆O₂) \approx 2,5 $\mu\text{g/ml}$

Dùng pipet lấy 5,0 ml dung dịch gốc II vitamin K₁ (4.4.3) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng metanol (4.2.1).

4.5.2 Dung dịch chuẩn vitamin K₁ dùng cho HPLC, ρ (C₃₁H₄₆O₂) \approx 25,0 ng/ml.

Dùng pipet lấy các thể tích thích hợp, ví dụ 1 ml dung dịch chuẩn trung gian vitamin K₁ (4.5.1) cho vào các bình định mức màu nâu, ví dụ dung tích 100 ml và bổ sung metanol (4.2.1) để pha loãng đến vạch. Chuẩn bị dung dịch này 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 đo được độ hấp thụ ở các bước sóng xác định, dùng các cuvet thích hợp, ví dụ: 1 cm.

5.2 Hệ thống HPLC

Hệ thống HPLC, gồm có bơm, bộ bơm mẫu, detector huỳnh quang cài đặt được bước sóng kích thích ở 243 nm và bước sóng phát xạ ở 430 nm và hệ thống xử lý số liệu như máy tích phân.

5.3 Cột HPLC

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

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

Có thể sử dụng các hệ thống khác (xem Phụ lục C) với điều kiện thỏa mãn việc tách phyloquinon ra khỏi các chất chiết cùng.

5.4 Bộ khử sau cột

Cột thép không gỉ hoặc cột thủy tinh được đặt vào giữa cột phân tích và detector huỳnh quang, ví dụ đường kính từ 2,0 mm đến 6,0 mm, dài từ 10 mm đến 150 mm, được nhồi bằng bột kẽm (4.2.14).

5.5 Dụng cụ lọc

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

CHÚ THÍCH Việc lọc pha động cũng như 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 K₁ rất nhạy với ánh sáng. Do đó, khi đo cần chú ý bảo vệ mẫu và dung dịch tương ứng trong suốt quy trình, ví dụ: sử dụng các dụng cụ thủy tinh màu nâu.

6.2 Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hóa mẫu thử. Nghiền mẫu bằng máy nghiền thích hợp và trộn đều lại. Cần có các biện pháp như làm lạnh sơ bộ để mẫu không tiếp xúc với nhiệt độ cao trong khoảng thời gian dài.

6.3 Chuẩn bị dung dịch mẫu

6.3.1 Chiết mẫu

Cân một lượng mẫu thích hợp, chính xác đến miligam, ví dụ 1 g mẫu dạng bột hoặc 10 g mẫu dạng lỏng cho vào ống nghiệm hoặc bình nón có thể đậy kín. Trộn mẫu dạng bột với 15 ml nước ở 40 °C,

TCVN 8974:2011

dùng máy vortex, đối với các mẫu dạng lỏng thêm 5 ml nước ở 40 °C. Cho chạy mẫu trắng với các thuốc thử nhưng không có mẫu thử (xem 6.5).

6.3.2 Xử lý bằng enzym

Thêm 5 ml đệm phosphat có pH 7,9 đến 8,0 (4.2.15) và trộn đều. Thêm 1,0 g lipaza (4.2.17), trộn bằng máy vortex, đậy nắp và lắc để phân tán trong khoảng từ 2 min đến 3 min. Ủ hỗn hợp ở nhiệt độ $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ trong 2 h. C ú sau một khoảng thời gian, ví dụ 20 min, thì lắc mạnh hỗn hợp bằng tay.

6.3.3 Chiết

Để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm 10 ml thuốc thử ancol (4.2.3), 1,0 g kali cacbonat (4.2.10) và trộn đều. Thêm một lượng xác định V_E của *n*-hexan (4.2.5), ví dụ 30 ml và lắc mạnh. Để yên cho tách pha ở nơi tối hoặc cho ly tâm, ví dụ ở 2 000 *g* trong 10 min. Dịch chiết *n*-hexan có thể bền qua đêm nếu được bảo quản ở nơi tối, nhiệt độ 4 °C dưới dòng nitơ.

6.3.4 Chuyển pha và pha loãng

Dùng pipet lấy một lượng dịch lỏng V_A của pha *n*-hexan (6.3.3), ví dụ 0,5 ml mẫu đã bổ sung vitamin K₁ hoặc 5,0 ml mẫu chưa bổ sung vitamin K₁ vào trong lọ nhỏ. Loại bỏ dung môi dưới dòng nitơ và hòa tan phần còn lại trong thể tích V xác định của metanol (4.2.1), ví dụ 1,0 ml. Đây là dung dịch mẫu thử cuối cùng được dùng để phân tích HPLC.

6.4 Nhận biết

Nhận biết vitamin K₁ bằng cách so sánh thời gian lưu của pic trong các sắc đồ của dung dịch thử (6.3.4) và thời gian lưu của pic trong dung dịch chuẩn (4.5.2). Việc nhận biết pic cũng có thể thực hiện bằng cách thêm các lượng nhỏ của các dung dịch chuẩn thích hợp vào dung dịch thử.

Việc tách và định lượng đã được chứng minh là thỏa mãn nếu tuân thủ các điều kiện thử nghiệm sau đây (xem thêm Hình A.1 đến Hình A.3). Đối với các điều kiện HPLC thay thế, xem Bảng C.1.

Pha tĩnh: C18, ví dụ cột phân tách C18, cỡ hạt 5 µm, kích thước 150 mm x 3,9 mm

Pha động: Trộn 100 ml diclometan (4.2.4), 900 ml metanol (4.2.1) và 5 ml dung dịch kẽm clorua axetat (4.2.16).

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min

Thể tích bơm: 20 µl

Cột khử: Cột bằng thép không gỉ kích thước 20 mm x 4 mm được nhồi bằng bột kẽm (4.2.14).

Detector: Huỳnh quang, bước sóng kích thích: 243 nm; bước sóng phát xạ: 430 nm

CHÚ THÍCH 1 Các đồng phân vitamin K₁ (cis và tran) được rửa giải vào một pic không phân giải, sử dụng các pha tĩnh của cột C18 [6, 7]. Thử nghiệm mới đây cho thấy, việc tách các đồng phân trong các mẫu thực phẩm có thể thực hiện được bằng cách dùng cột C30 [10]. Tuy nhiên, các đồng phân trong các chất chuẩn và các chất cô đặc có thể tách được bằng sắc ký pha thường, dùng detector UV [8, 9].

CHÚ THÍCH 2 Theo kinh nghiệm phòng thử nghiệm cho thấy, trong quá trình phân tích HPLC có thể làm nóng cột khử đến 40 °C để quá trình khử nhanh hơn.

6.5 Xác định

Bơm các thể tích thích hợp bằng nhau, ví dụ 20 µl dung dịch chuẩn (4.5.2) cũng như dung dịch mẫu thử (6.3.4) vào hệ thống HPLC.

Tiến hành xác định bằng phương pháp ngoại chuẩn, tích phân diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic của mẫu và so sánh các kết quả với các giá trị tương ứng đối với chất chuẩn.

Nồng độ vitamin K₁ trong dung dịch mẫu cuối cùng là rất thấp. Vì vậy, cần sử dụng các dụng cụ thủy tinh sạch để tránh nhiễm bẩn. Thực hiện phép thử trắng, sử dụng cùng quy trình nhưng không dùng mẫu thử để khẳng định không có sự nhiễm bẩn.

7 Tính kết quả

Tính kết quả dựa vào đường chuẩn hoặc sử dụng các chương trình tích phân tương ứng hoặc theo công thức giản lược sau đây:

Tính phần khối lượng của vitamin K₁, w , bằng microgam trên 100 g mẫu, theo Công thức (2):

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

Trong đó

A_S là diện tích pic hoặc chiều cao pic của vitamin K₁ thu được từ dung dịch mẫu thử (6.3.4), tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;

A_{ST} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của vitamin K₁ thu được từ dung dịch chuẩn (4.5.2), tính bằng đơn vị diện tích hoặc đơn vị chiều cao;

ρ là nồng độ vitamin K₁ của dung dịch chuẩn (4.5.2), tính bằng nanogam trên mililit (ng/ml);

V là tổng thể tích của dung dịch mẫu thử (6.3.4), tính bằng mililit (ml);

V_A là thể tích dịch lỏng của dịch chiết được dùng cho chuyển pha, tính bằng mililit (ml);

V_E là thể tích của chất chiết n-hexan (6.3.3), tính bằng mililit (ml);

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

TCVN 8974:2011

1 000 là hệ số chuyển đổi từ nanogram sang microgam;

100 là hệ số chuyển đổi sang phần khối lượng trên 100 g.

Báo cáo kết quả vitamin K₁, tính bằng microgam trên 100 g.

8 Độ chụm

8.1 Yêu cầu chung

Dữ liệu về độ chụm đối với phép xác định vitamin K₁ được thiết lập vào năm 1998 do một nghiên cứu phòng thử nghiệm tiến hành theo các hướng dẫn quốc tế AOAC trên các mẫu sữa đã bổ sung và chưa bổ sung vitamin K₁ khác nhau [4], nêu trong Phụ lục B. Dữ liệu thu được từ nghiên cứu cộng tác này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ phân tích và các chất nền khác với các dải nồng độ phân tích và các chất nền đã nêu trong Phụ lục B.

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 được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại r .

Các giá trị đối với vitamin K₁ là:

Sữa dạng lỏng nguyên chất sữa tiệt trùng (UHT),
chưa bổ sung vitamin K₁ (1)

$$\bar{x} = 0,49 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad r = 0,12 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

Bột sữa cừu nguyên chất, chưa bổ sung vitamin K₁ (2)

$$\bar{x} = 6,63 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad r = 0,60 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có sữa,
có nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K₁ (3)

$$\bar{x} = 118,07 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad r = 14,01 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey,
có một phần dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K₁ (4)

$$\bar{x} = 32,24 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad r = 4,31 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có đậu nành,
có nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K₁ (5)

$$\bar{x} = 78,69 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad r = 5,71 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey,
có nhiều dầu thực vật (6)

$$\bar{x} = 49,64 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad r = 7,11 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey,
có một phần dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K₁ (7)

$$\bar{x} = 90,94 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad r = 11,32 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

NIST SRM 1846²⁾, thức ăn công thức
dành cho trẻ sơ sinh đã trộn, dạng khô (8)

$$\bar{x} = 94,62 \mu\text{g}/100 \text{ g} \quad r = 15,05 \mu\text{g}/100 \text{ g}$$

²⁾ Giá trị quy về (94 ± 10) μg/100 g.

Các số trong dấu ngoặc đơn liên quan đến mẫu trong Bảng B.1 (xem Phụ lục B).

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 được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập R .

Các giá trị đối với vitamin K₁ là:

Sữa dạng lỏng nguyên chất tiệt trùng (UHT), chưa bổ sung vitamin K ₁ (1)	$\bar{x} = 0,49 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 0,15 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Bột sữa cừu nguyên chất, chưa bổ sung vitamin K ₁ (2)	$\bar{x} = 6,63 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 1,08 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có sữa, có nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ (3)	$\bar{x} = 118,07 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 18,19 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey, có một phần dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ (4)	$\bar{x} = 32,24 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 5,98 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có đậu nành, có nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ (5)	$\bar{x} = 78,69 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 9,53 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey, có nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ (6)	$\bar{x} = 49,64 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 10,65 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey, có một phần dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ (7)	$\bar{x} = 90,94 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 11,60 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
NIST SRM 1846, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh đã trộn, dạng khô (8)	$\bar{x} = 94,62 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 17,95 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

Các số trong dấu ngoặc đơn liên quan đến mẫu trong Bảng B.1 (xem Phụ lục B).

9 Báo cáo thử nghiệm

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

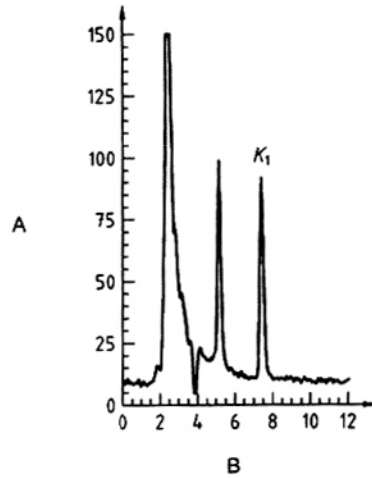
- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp thử đã sử dụng;
- các kết quả và các đơn vị biểu thị kết quả;
- ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);

TCVN 8974:2011

- e) ngày nhận mẫu;
- f) ngày thử nghiệm;
- g) các điểm đặc biệt quan sát được trong khi tiến hành thử nghiệm;
- h) 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 sắc đồ

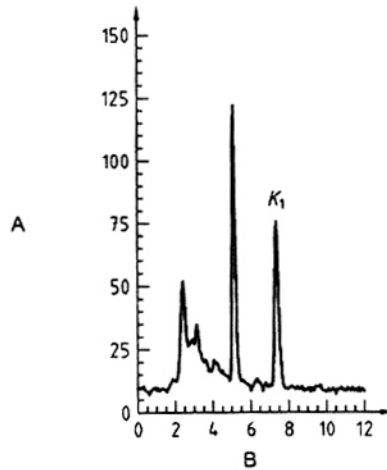


CHÚ DẪN

A Cường độ tín hiệu, mV

B Thời gian, min

Hình A.1 – Ví dụ về việc tách vitamin K₁ ra khỏi mẫu 1 bằng HPLC [sữa dạng lỏng nguyên chất tiệt trùng (UHT), chưa bổ sung vitamin K₁]

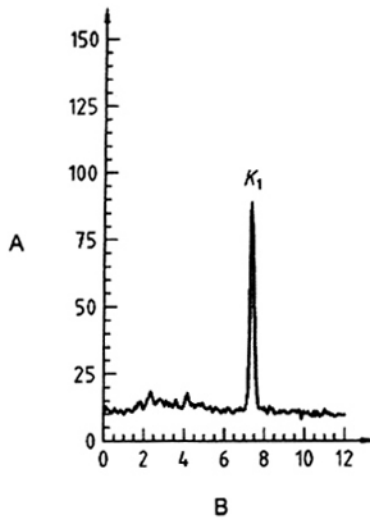


CHÚ DẪN

A Cường độ tín hiệu, mV

B Thời gian, min

Hình A.2 – Ví dụ về việc tách vitamin K₁ ra khỏi mẫu 1 bằng HPLC (bột sữa cừu nguyên chất, chưa bổ sung vitamin K₁)



CHÚ DẪN

A Cường độ tín hiệu, mV

B Thời gian, min

Hình A.3 – Ví dụ về việc tách vitamin K_1 ra khỏi 5 mẫu bằng HPLC [Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có đậu nành, nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K_1]

Pha tĩnh: Cột C18, ví dụ: Cột phân giải C18, cỡ hạt 5 μm , kích thước 150 mm x 3,9 mm

Pha động: Trộn đều 100 ml diclometan (4.2.4), 900 ml metanol (4.2.1) và 5 ml dung dịch kẽm clorua axetat (4.2.16).

Tốc độ dòng: 1,0 ml /min

Thể tích bơm: 20 μl

Cột khử: Cột bằng thép không gỉ, kích thước 20 mm x 4 mm được nhồi bằng bột kẽm (4.2.14)

Detector: Huỳnh quang, bước sóng kích thích: 243 nm; bước sóng phát xạ: 430 nm

Bảng B
(tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các dữ liệu sau đây đã được xác định trong nghiên cứu cộng tác quốc tế [4].

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm

Số lượng mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8
Chất phân tích	Vitamin K ₁	Vitamin K ₁	Vitamin K ₁	Vitamin K ₁	Vitamin K ₁	Vitamin K ₁	Vitamin K ₁	Vitamin K ₁
Năm tiến hành phép thử liên phòng thử nghiệm	1998	1998	1998	1998	1998	1998	1998	1998
Số lượng phòng thử nghiệm	33	34	34	34	34	34	34	34
Số lượng mẫu	2	2	2	2	2	2	2	2
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	32	29	34	34	34	34	33	34
Số lượng các phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	5	0	0	0	0	1	0
Số lượng bộ dữ liệu	62	56	66	66	66	66	64	66
Giá trị trung bình, \bar{x} , µg/100 g	0,49	6,63	118,07	32,24	78,69	49,64	90,94	94,62
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , µg/100 g	0,04	0,21	5,00	1,54	2,04	2,54	4,04	5,38
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r , %	9,03	3,23	4,24	4,77	2,59	5,11	4,44	5,68
Giới hạn lặp lại, r [$r=2,8 \times s_r$], µg/100 g	0,12	0,60	14,01	4,31	5,71	7,11	11,32	15,05
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , µg/100 g	0,05	0,39	6,50	2,14	3,40	3,80	4,14	6,41
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R , %	10,94	5,81	5,50	6,63	4,33	7,66	4,56	6,78
Giới hạn tái lập, R [$R=2,8 \times s_R$], µg/100 g	0,15	1,08	18,19	5,98	9,53	10,65	11,60	17,95
Các mẫu:								
1 Sữa dạng lỏng nguyên chất tiệt trùng (UHT), chưa bổ sung vitamin K ₁ ;								
2 Bột sữa cừu nguyên chất, chưa bổ sung vitamin K ₁ ;								
3 Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có sữa, có nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ ;								
4 Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey, có một phần dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ ;								
5 Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có đậu nành, có nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ ;								
6 Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey, có nhiều dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ ;								
7 Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh có whey, có một phần dầu thực vật, đã bổ sung vitamin K ₁ ;								
8 NIST SRM 1846, thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh đã được trộn khô (94 ± 10) µg/ 100 g.								

Phụ lục C
(tham khảo)

Các hệ thống HPLC thay thế

Việc tách và định lượng đã được chứng minh là thỏa mãn nếu áp dụng [4] các điều kiện thử nghiệm sau đây.

Pha tĩnh	Đường kính cột (mm x mm) ^a	Cột khử (mm x mm) ^a	Tốc độ dòng (ml/min) ^c
Alltima [®] C18, 5 μm	150 x 4,6	20 x 4	1,5
Novapak [®] C18, 5 μm	100 x 8,0	20 x 4	1,5
Lichrospher [®] 100 RP18, 5 μm	250 x 4,0	125 x 3 ^b	1,5
Resolve [®] C18, 5 μm	150 x 3,9	20 x 4	1,0
L-Column [®] ODS, 5 μm	250 x 4,6	20 x 4	0,8
L-Column [®] ODS, 5 μm	150 x 4,6	10 x 6	0,8
Capcell Pak [®] C18, 5 μm	250 x 4,6	20 x 2	1,0
Econosphere [®] C18, 5 μm	250 x 4,6	30 x 4,6	1,0
Vydac ⁺ C18, 5 μm	250 x 4,6	20 x 4	1,0
Nucleosil [®] 120 C18, 5 μm	250 x 4,0	30 x 4	1,3
Spherisorb ⁺ ODS2, 5 μm	250 x 4,6	20 x 4	1,5
Varian [®] C18, 5 μm	250 x 4,6	20 x 4,6	1,2
Pickering [®] C18, 5 μm	150 x 4,6	20 x 4	1,0
Hypersil [®] BDS C18, 3 μm	150 x 3,0	40 x 2	0,5
ChromSpher [®] C18, 5 μm	100 x 3,0	40 x 3	0,6
Hypersil ⁺ ODS, 5 μm	250 x 4,6	20 x 4	1,0
Vydac ⁺ 201 TP54 C18, 5 μm	250 x 4,6	50 x 2,1	0,8
Partisil [®] ODS3, 5 μm	250 x 4,6	20 x 4	1,0
Supelco [®] C18, 5 μm	250 x 4,0	30 x 4	1,5
YMC Pack [®] ODS-AM, 5 μm	250 x 4,6	150 x 4,6	1,3
Zorbax [®] Rx C18, 5 μm	150 x 4,6	20 x 4	1,0
Zorbax [®] ODS, 5 μm	250 x 4,6	20 x 4	1,5
μBondapak ⁺ C18, 10 μm	300 x 3,9	20 x 4	1,0
Prodigy [®] ODS3, 5 μm	150 x 4,6	20 x 4	1,5
YMC [®] C30, 5 μm ^d	250 x 4,6	20 x 4	1,5

^a Thép không gỉ.

^b Thủy tinh.

^c Thành phần của pha động được nêu trong phương pháp.

^d Cột này tách các đồng phân (cis và trans) vitamin K₁. Các kết quả thu được bằng cột này đã được loại trừ từ các dữ liệu thống kê.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Indyk, H.E., and Woollard, D.C.: Vitamin K in Milk and Infant Formulas: Determination of Phylloquinone and Menaquinone-4. *Analyst* 122, 1997, 465-469.
 - [2] Indyk, H.E., Littlejohn, V.C., Lawrence, J.L. and Woollard, D.C.: Liquid Chromatographic Determination of Vitamin K1 in Infant Formulas and Milk. *J. AOAC intern.* 78, 1995, 719-723. AOAC Official Methods of Analysis, 17th Ed, 2000, Method 999.15- Determination of Vitamin K1 by HPLC.
 - [3] Haroon, Y., Bacon, D. S., and Sadowski, J. A.: Chemical reduction system for the detection of phyloquinone (vitamin K1) and menaquinones (vitamin K2). *J. Chromatogr.* 384, 1987, 382-389.
 - [4] Indyk, H. E. and Woollard, D. C.: Vitamin K in Milk and Infant Formulas by Liquid Chromatography: Collaborative study. *J. AOAC intern.* 83, 2000, 121-130.
 - [5] The Merck Index: Vitamin K1. 12th Ed.: 7536, p. 1269 (1996).
 - [6] Ball, G. F. M, in G. F. M. Ball (Hrsg.): Fat-Soluble Vitamin Assays in Food Analysis: A Comprehensive Review. Elsevier Applied Science, London, 1988, 258-273.
 - [7] Eitenmiller, 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, 149-184.
 - [8] European Pharmacopoeia 1997: 1997: 1036; Phytomenadione. 1332-1334.
 - [9] European Pharmacopoeia – Supplement 2000: 1999: 1036; Phytomenadione. 1060-1062.
 - [10] Woolard, D.C., Indyk H.E., Bertram, Y.F and Cook, K.K.: Determination of Vitamin K 1 Isomers in Food by liquid Chromatography with C 30 Bonded-Phase Column, *J. AOAC intern.* 85, 2002, 682-691.
-