

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 7081-1:2010**

**ISO 12080-1:2009**

**Xuất bản lần 2**

**SỮA BỘT GÀY –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG VITAMIN A –  
PHẦN 1: PHƯƠNG PHÁP SO MÀU**

***Dried skimmed milk – Determination of vitamin A content –  
Part 1: Colorimetric method***

**HÀ NỘI - 2010**

## Lời nói đầu

TCVN 7081-1:2010 thay thế TCVN 7081-1:2002;

TCVN 7081-1:2010 hoàn toàn tương đương với ISO 12080-1:2009/IDF 142-1:2009;

TCVN 7081-1:2010 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 7081 (ISO 12080) *Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A* bao gồm các phần sau:

- TCVN 7081-1:2010 (ISO 12080-1:2009), *Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A – Phương pháp so màu*;
- TCVN 7081-2:2010 (ISO 12080-2:2009), *Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao*.

## Sữa bột gầy – Xác định hàm lượng vitamin A –

### Phần 1: Phương pháp so màu

*Dried skimmed milk – Determination of vitamin A content –*

*Part 1: Colorimetric method*

**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 và sức khoẻ 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 so màu để xác định hàm lượng vitamin A trong sữa bột gầy chứa ít nhất 10 IU (đơn vị quốc tế) vitamin A trên gam.

#### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

##### 2.1

**Hàm lượng vitamin A của sữa bột gầy** (vitamin A content of dried skimmed milk)

Phần khối lượng của các chất xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

**CHÚ THÍCH** Hàm lượng vitamin A được biểu thị bằng microgam retinol trên gam hoặc bằng đơn vị quốc tế của hoạt độ vitamin A trên gam.

#### 3 Nguyên tắc

Mẫu thử được xà phòng hoá và được chiết. Chất không thể xà phòng hoá được thì cho phản ứng với axit trifluoroacetic. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 620 nm.

#### 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

**4.1 Etanol** ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), 95 % (phần thể tích), không chứa aldehyt.

**4.2 Dung dịch natri ascorbat**, 200 g/l. Khi không có dung dịch pha chế sẵn, thì chuẩn bị bằng cách hoà tan 3,5 g axit ascorbic ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) trong 20 ml dung dịch natri hydroxit ( $\text{NaOH}$ ) 1 mol/l và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới này trong ngày sử dụng.

**4.3 Dung dịch kali hydroxit** ( $\text{KOH}$ ), 50 % phần khối lượng. Hoà tan 50 g kali hydroxit trong 50 ml nước. Trộn và làm nguội dung dịch. Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng.

**4.4 Dung dịch cồn nước kali hydroxit**, 30 g/l. Hoà tan 3 g kali hydroxit ( $\text{KOH}$ ) trong nước và thêm 10 ml etanol (4.1) vào bình định mức một vạch 100 ml. Thêm nước đến vạch và trộn. Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng.

**4.5 Dầu nhẹ**, có dải sôi từ 40 °C đến 60 °C hoặc từ 60 °C đến 80 °C.

**4.6 Cloroform** ( $\text{CHCl}_3$ ).

**4.7 Axit trifluoroaxetic** ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ).

**CẢNH BÁO** – Cloroform và axit trifluoroaxetic là các chất gây ung thư. Cần phải phòng ngừa.

**4.8 Chất màu**. Trộn một phần thể tích axit trifluoroaxetic tinh khiết (4.7) và hai thể tích cloroform (4.6).

**4.9 Dung dịch chuẩn vitamin A**. Sử dụng dung dịch chuẩn đối chứng vitamin A của US Pharmacopeia<sup>1)</sup> được pha chế từ crystallin all-*trans*-retinyl axetat trong dầu hạt bông, tương đương với 30 mg retinol (vitamin A dạng rượu,  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ ) trên gam dầu, hoặc theo công bố khi sản phẩm được bán.

Có thể sử dụng dung dịch chuẩn thứ cấp nếu đã được chuẩn hoá theo dung dịch chuẩn đối chứng ban đầu hoặc bằng cách đo UV.

Cắt một đầu của vỏ ống chứa dung dịch chuẩn đối chứng vitamin A và chuyển lượng dầu trong đó (đã trừ bì) vào trong bình định mức một vạch màu hổ phách dung tích 100 ml. Cân lượng chứa trong bình chính xác đến 0,1 mg. Thêm cloroform (4.6) đến vạch. Sử dụng dung dịch chuẩn vitamin A càng sớm càng tốt. Loại bỏ dung dịch này sau 8 h.

---

<sup>1)</sup> Sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

#### 4.10 Butylat hydroxytoluen (BHT).

### 5 Thiết bị, dụng cụ

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

**5.1 Máy so màu quang điện hoặc máy đo phổ**, có cơ chế quang học hoặc bộ lọc hoạt động ở bước sóng 620 nm (dẫn xuất vitamin A).

Sử dụng các cuvet hấp thụ thích hợp. Tốt nhất là sử dụng loại cho tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ.

**5.2 Cốc có mỏ hoặc bình nón**, dung tích 250 ml.

**5.3 Bình xà phòng hoá**, dung tích khoảng 200 ml, có gắn với một bộ ngưng hồi lưu.

**5.4 Bình định mức một vạch**, dung tích 100 ml và 200 ml, phù hợp với loại A quy định trong TCVN 7153 (ISO 1042)<sup>[3]</sup>.

**5.5 Pipet một vạch**, dung tích 2 ml, 10 ml, 25 ml và 50 ml, phù hợp với loại A quy định trong TCVN 7151 (ISO 648)<sup>[1]</sup>.

**5.6 Pipet tự động**, thích hợp cho các dung môi hữu cơ, ISO 8655-2<sup>[6]</sup> hoặc một pipet để phân phối được 10 ml.

**5.7 Nồi hơi, nồi cách thuỷ có thể đun đến sôi hoặc bếp điện.**

**5.8 Nồi cách thuỷ**, có thể duy trì nhiệt độ đến 40 °C.

**5.9 Phễu chiết**, dung tích 500 ml, tốt nhất là loại có nút đáy bằng polytetrafluoroetylen (PTFE).

**5.10 Thiết bị siêu âm.**

**5.11 Giấy lọc**, đường kính 90 mm.

### 6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)<sup>[2]</sup>.

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

## **7 Chuẩn bị mẫu thử**

Trộn kỹ mẫu thử bằng cách xoay và đảo chiều hộp đựng mẫu nhiều lần. Nếu cần, chuyển hết mẫu thử sang vật chứa kín khí có dung tích vừa đủ.

## **8 Cách tiến hành**

### **8.1 Yêu cầu chung**

Nếu cần phải kiểm tra sự thoả mãn về giới hạn lặp lại (10.2), thì tiến hành hai phép xác định riêng rẽ theo 8.2 đến 8.5.

Thực hiện tất cả các thao tác trong điều kiện ánh sáng dịu hoặc sử dụng đồ thủy tinh có độ quang hoá thấp.

### **8.2 Dung dịch thử**

Cân khoảng 20 g mẫu thử, chính xác đến 0,001 g, cho vào cốc có mỏ hoặc bình nón (5.2) và hoà tan trong 50 ml nước nóng ở nhiệt độ nhỏ nhất là 80 °C. Dùng dao trộn hoặc sử dụng thiết bị siêu âm (5.10) để phá vỡ các cục bị vón thành mảng. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Chuyển toàn bộ lượng này sang bình định mức một vạch 100 ml (5.4). Thêm nước đến vạch.

### **8.3 Xà phòng hoá và chiết**

**8.3.1** Dùng pipet (5.5) chuyển 25 ml dung dịch thử đã chuẩn bị (8.2) sang bình xà phòng hoá (5.3). Thêm 20 ml dung dịch kali hydroxit (4.3) và 10 ml dung dịch natri ascorbat (4.2). Thêm 50 ml etanol (4.1) và trộn đều.

**8.3.2** Chưng cất hồi lưu 30 min trên nồi hơi (5.7), thỉnh thoảng khuấy. Làm nguội nhanh dưới dòng nước chảy.

**8.3.3** Chuyển dung dịch lỏng sang phễu chiết (5.9), tráng bình hai lần, mỗi lần dùng 30 ml nước, 10 ml etanol (4.1) và 40 ml dầu nhẹ (4.5). Lắc mạnh trong 30 s và để yên đến khi tách thành hai pha rõ ràng.

Chuyển pha nước (phía dưới) sang phễu chiết thứ hai và lắc với hỗn hợp 10 ml etanol (4.1) và 40 ml dầu nhẹ (4.5). Để cho tách pha.

**8.3.4** Chuyển pha nước sang phễu chiết thứ ba và pha dầu nhẹ sang phễu chiết thứ nhất. Rửa phễu chiết thứ hai hai lần, dùng 10 ml dầu nhẹ (4.5). Cho nước rửa vào phễu chiết thứ nhất.

**8.3.5** Lắc pha nước với 40 ml dầu nhẹ (4.5) và 10 ml etanol (4.1). Cho pha dầu nhẹ vào phễu chiết thứ nhất. Rửa dịch chiết bằng dầu nhẹ ba lần, mỗi lần dùng 40 ml dung dịch cồn nước kali hydroxit (4.4) mới chuẩn bị, lắc mạnh. Sau đó, rửa tiếp mỗi lần dùng 40 ml nước cho đến khi nước rửa cuối

cùng trung tính với phenolphthalein. Loại bỏ hết nước, cho hai tấm giấy lọc (5.11) được cắt thành dải vào phễu chiết và lắc.

**8.3.6** Chuyển dịch chiết dầu nhẹ đã được loại nước (8.3.5) sang bình định mức một vạch 200 ml (5.4) tráng phễu chiết và giấy lọc bằng dầu nhẹ (4.5), cho nước rửa vào bình định mức, rồi thêm từ 10 mg đến 20 mg BHT (4.10). Thêm dầu nhẹ đến vạch và trộn đều.

#### **8.4 Chuẩn bị dung dịch thử so màu**

Dùng pipet lấy các phần dịch chiết đã pha loãng (8.3.6) vào bình đáy tròn. Cho bay hơi đến khô trong chân không bằng cách xoay bình trong nồi cách thủy (5.8) ở nhiệt độ không quá 40 °C. Làm nguội bình dưới dòng nước chảy và bù lại áp suất không khí, tốt nhất là bằng khí nitơ. Hòa tan ngay phần cặn trong 10,0 ml cloroform (4.6).

**CHÚ THÍCH** Nồng độ điển hình của dung dịch thử là 10 IU vitamin A trên mililit cloroform. Có thể điều chỉnh lượng dịch chiết theo kích cỡ và độ nhạy của cuvet so màu.

#### **8.5 Xác định**

Lấy hai cuvet so màu thích hợp là 1 và 2. Dùng pipet lấy 2 ml dung dịch thử so màu (8.4) cho vào cuvet 1. Dùng pipet lấy 2 ml của dung dịch chuẩn vitamin A đã pha loãng (8.6) cho vào cuvet 2. Thêm nhanh vào mỗi cuvet 10,0 ml chất màu (4.8), tốt nhất là dùng pipet tự động (5.6) và trộn đều. Kiểm tra độ hấp thụ của các dung dịch ở bước sóng 620 nm bằng máy so màu quang điện hoặc máy đo phổ (5.1) được so sánh với mẫu trắng là 2 ml cloroform (4.6) và 10 ml chất màu (4.8), cho đến khi độ hấp thụ đạt giá trị cực đại. Dựng đồ thị của độ hấp thụ và hàm lượng vitamin A thu được (8.6).

Có thể điều chỉnh thể tích và tỷ lệ sử dụng theo dung tích của cuvet so màu.

#### **8.6 Dựng đường chuẩn**

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng gấp năm lần (hoặc lớn hơn) dung dịch chuẩn vitamin A (4.9) bằng cloroform (4.6) sao cho các phần dịch lỏng 2 ml đã xử lý cho các độ hấp thụ trong dải từ 0,07 đến 0,7 ở bước sóng 620 nm. Dựng đồ thị biểu thị mối tương quan giữa độ hấp thụ và hàm lượng vitamin A, tính bằng microgam. Khi đồ thị là một đường thẳng, thì có thể tính được hệ số về hàm lượng vitamin A trong mẫu.

### **9 Tính và biểu thị kết quả**

Tính hàm lượng vitamin A, w, bằng microgam retinol trên gam (hoặc hoạt độ vitamin A, biểu thị bằng đơn vị quốc tế trên gam), theo công thức sau:

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times V_4}{V_2 \times V_5 \times m}$$

trong đó:

$\rho$  là nồng độ retinol, tính được từ đường chuẩn (8.6), tính bằng microgam retinol trên mililit (hoặc hoạt độ vitamin A tính bằng IU trên mililit) trong dung dịch mẫu thử so màu (8.4);

$V_1$  là tổng thể tích dịch chiết bằng dầu nhẹ ( $V_1 = 200$  ml), tính bằng mililit (ml);

$V_2$  là thể tích phần dịch lỏng được lấy từ  $V_1$  (8.4), tính bằng mililit (ml);

$V_3$  là thể tích cloroform dùng để hoà tan phần cặn ( $V_3 = 10$  ml), tính bằng mililit (ml);

$V_4$  là tổng thể tích dung dịch thử (8.2) ( $V_4 = 100$  ml), tính bằng mililit (ml);

$V_5$  là phần thể tích phần dung dịch thử (8.3.1) ( $V_5 = 25$  ml), tính bằng mililit (ml);

$m$  là khối lượng của phần mẫu thử (8.2), tính bằng gam (g).

## 10 Độ chụm

### 10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm đã tiến hành theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)<sup>[4]</sup> và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)<sup>[5]</sup> về độ chụm của phương pháp đã được công bố (Tài liệu tham khảo [7]). Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các dải nồng độ và các chất nền đã nêu.

### 10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 14 % trung bình cộng của hai kết quả.

### 10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống thử hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 42 % trung bình cộng của các kết quả.

## 11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã dùng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thu được hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại, nêu kết quả cuối cùng thu được.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

## Biểu thị hoạt độ bằng đơn vị quốc tế (IU)

## A.1 Hoạt độ vitamin A

Hoạt độ của vitamin A được biểu thị bằng đơn vị quốc tế. 1 IU của vitamin A được xác định là tương đương với hoạt độ 0,344  $\mu\text{g}$  *all-trans*-retinyl axetat (xem Tài liệu tham khảo [8]).

Hoạt độ của các hợp chất vitamin A khác được tính theo phép định lượng hoá học sao cho 1 IU tương đương với hoạt độ của 0,300  $\mu\text{g}$  *all-trans*-retinol, 0,359  $\mu\text{g}$  *all-trans*-retinyl propionat hoặc 0,500  $\mu\text{g}$  *all-trans*-retinyl palmitat tương ứng.

Điều đó có nghĩa là hoạt độ của 1 g *all-trans*-vitamin A dạng rượu tinh khiết và dạng este, biểu thị bằng đơn vị quốc tế, sẽ bằng:

|                                 |              |
|---------------------------------|--------------|
| – Vitamin A dạng rượu (retinol) | 3 333 000 IU |
| – Vitamin A axetat              | 2 907 000 IU |
| – Vitamin A propionat           | 2 785 000 IU |
| – Vitamin A palmitat            | 1 818 000 IU |

## A.2 Phân tích chất chuẩn vitamin A (vitamin A dạng este, tinh khiết hoặc hoà tan trong dầu)

Xem Tài liệu tham khảo [8].

Cân từ 25 mg đến 100 mg vitamin A dạng este, chính xác đến 0,1 %, cho vào bình cầu. Hoà tan lượng cân được này trong 5 ml pentan, phụ thuộc vào lượng cân, và pha loãng bằng 2-propanol để thu được nồng độ từ 10 IU/ml đến 15 IU/ml.

Kiểm tra xem độ hấp thụ tối đa,  $A_m$ , của dung dịch đã nằm trong khoảng từ 325 nm đến 327 nm hay chưa, dùng 2-propanol làm chất lỏng bù (dung dịch trắng). Đo độ hấp thụ,  $A_n$ , ở bước sóng 300 nm, 326 nm, 370 nm.

Tính tỷ số  $A_n/A_m$  đối với từng bước sóng nói trên. Nếu tỷ số này không vượt quá 0,593 ở bước sóng 300 nm, 0,537 ở bước sóng 350 nm, hoặc 0,142 ở bước sóng 370 nm tương ứng, thì tinh hàm lượng vitamin A, w, theo đơn vị quốc tế trên gam, bằng công thức:

$$w = \frac{A_m \times V \times f}{100 \times m}$$

trong đó:

$A_m$  là giá trị độ hấp thụ cực đại thu được ở bước sóng 326 nm;

$V$  là tổng thể tích vitamin A dạng este đã pha loãng có nồng độ từ 10 IU/ml đến 15 IU/ml, tính bằng mililit (ml);

$f$  là hệ số chuyển đổi từ độ hấp thụ cụ thể của vitamin A dạng este thành đơn vị quốc tế trên gam ( $f = 1\,900$ );

$m$  là khối lượng của vitamin A dạng este cân được, tính bằng gam (g).

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 7151 (ISO 648), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet một mức.*
  - [2] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Lấy mẫu.*
  - [3] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức một vạch.*
  - [4] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
  - [5] TCVN 6910- 2 (ISO 5725-2), *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.*
  - [6] ISO 8655-2, *Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes.*
  - [7] DE VRIES, E.J.et al. Dried skimmed milk - Determination of vitamin A - Colorimetric and liquid chromatographic methods, pp. 53-64. In: *Reference materials and interlaboratory collaborative studies (third series).* [Bull.IDF 1993, (285)].
  - [8] Vitamin A monograph. In: *European Pharmacopoeia.*
-