

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 5164:2008  
EN 14122:2008**

Xuất bản lần 2

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH VITAMIN B<sub>1</sub>  
BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)**

*Foodstuffs – Determination of vitamin B<sub>1</sub> by  
high performance liquid chromatography (HPLC)*

**HÀ NỘI - 2008**

**Lời nói đầu**

TCVN 5164:2008 thay thế TCVN 5164:1990;

TCVN 5164:2008 hoàn toàn tương đương với EN 14122:2003;

TCVN 5164:2008 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 B<sub>1</sub> bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**

*Foodstuffs – Determination of vitamin B<sub>1</sub> by high performance liquid chromatography (HPLC)*

**CẢNH BÁO** – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể cần phải sử dụng các vật liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn khi 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 qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định vitamin B<sub>1</sub> trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Hàm lượng vitamin B<sub>1</sub> là khối lượng thiamin tổng số bao gồm các dẫn xuất đã tách phospho.

### **2 Tài liệu viện dẫn**

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. 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.

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**

Thiamin được chiết ra khỏi thực phẩm sau khi thủy phân bằng axit rồi tách phospho sử dụng cách xử lý bằng enzym và định lượng bằng HPLC có dẫn xuất sau cột hoặc trước cột với thiocrom [1] đến [6].

## 4 Thuốc thử

### 4.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước ít nhất là loại 1 của TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987) hoặc nước cất hai lần, trừ khi có qui định khác.

### 4.2 Hoá chất và các dung dịch

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

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

4.2.3 Isobutanol,  $w(\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}) \geq 98 \%$ .

4.2.4 Natri dihydro phosphat,  $w(\text{NaH}_2\text{PO}_4) \geq 99,8 \%$ .

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

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

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

4.2.8 Natri hydroxit,  $w(\text{NaOH}) \geq 99 \%$ .

4.2.9 Dung dịch natri hydroxit, nồng độ khối lượng  $\rho(\text{NaOH}) = 150 \text{ g/l}$ .

4.2.10 Dung dịch natri hydroxit,  $\rho(\text{NaOH}) = 200 \text{ g/l}$ .

4.2.11 Kali hexaxyanoferrat III,  $w(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) \geq 99 \%$ .

4.2.12 Dung dịch kali hexaxyanoferrat III,  $\rho(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 10 \text{ g/l}$ .

4.2.13 Dung dịch kali hexaxyanoferrat III kiểm (dẫn xuất trước cột),  $\rho(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 0,4 \text{ g/l}$ .

Pha loãng 2,0 ml dung dịch hexaxyanoferrat (4.2.12) bằng dung dịch natri hydroxit (4.2.9) đến 50 ml. Chuẩn bị dung dịch này trong ngày phân tích.

4.2.14 Dung dịch kali hexaxyanoferrat III kiểm (dẫn xuất sau cột),  $\rho(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]) = 0,5 \text{ g/l}$ .

Pha loãng 2,5 ml dung dịch hexaxyanoferrat (4.2.12) bằng dung dịch natri hydroxit (4.2.10) đến 50 ml.

4.2.15 Enzym tách phospho, có khả năng thủy phân thiamin liên kết từ thực phẩm.

CHÚ THÍCH Taka-Diastaza<sup>1)</sup> đã được sử dụng để xác định các dữ liệu về độ chụm.

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

**4.2.17 Dung dịch natri axetat,  $c(\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 0,5 \text{ mol/l}$ .**

#### **4.2.18 Pha động HPLC**

Các ví dụ về các hỗn hợp thích hợp với các phần thể tích ví dụ như từ 10 % đến 50 % metanol (4.2.1) trong nước hoặc sử dụng phosphat hoặc dung dịch đệm axetat được nêu trong Phụ lục C. Khả năng sử dụng các tác nhân kết cặp ion cũng được nêu trong Phụ lục C.

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

**4.2.20 Tetraetylamonioclorua,  $w(\text{C}_8\text{H}_{20}\text{NCl}) \geq 98 \%$ .**

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

**4.2.22 Dung dịch đệm axetat (pH = 4,0),  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 50 \text{ mmol/l}$ .**

### **4.3 Chất chuẩn**

#### **4.3.1 Yêu cầu chung**

Thiamin clorua hydroclorua có thể lấy được từ nhiều nhà cung cấp. Độ tinh khiết của các chất chuẩn thiamin có thể khác nhau, do đó có thể cần phải xác định nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn bằng đo phổ UV (xem 4.4.4).

**4.3.2 Thiamin clorua hydroclorua,  $w(\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}) \geq 99 \%$ .**

**4.3.3 Thiamin monophosphat clorua,  $w(\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{PS}) \geq 98 \%$ .**

**4.3.4 Thiamin pyrophosphat clorua (cocarboxylaza),  $w(\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{ClN}_4\text{O}_7\text{P}_2\text{S}) \geq 98 \%$ .**

#### **4.4 Dung dịch gốc**

**4.4.1 Thiamin clorua hydroclorua,  $\rho(\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}) \approx 0,1 \text{ mg/ml}$**

Hoà tan một lượng chính xác của chất chuẩn thiamin clorua hydroclorua (4.3.2) trong một thể tích xác định của dung môi thích hợp, ví dụ như 10 mg chất chuẩn vitamin B<sub>1</sub> trong 100 ml axit clohydric (4.2.6). Dung dịch này có thể ổn định được bốn tuần ở nhiệt độ + 4 °C.

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

**4.4.2 Thiamin monophosphat,  $\rho(C_{12}H_{17}ClN_4O_4PS) \approx 0,1$  mg/ml**

Hoà tan một lượng chính xác của chất chuẩn monophosphat (4.3.3) trong một thể tích xác định của dung môi thích hợp, ví dụ như 10 mg chất chuẩn monophosphat trong 100 ml axit clohydric (4.2.6). Dung dịch này có thể ổn định được bốn tuần ở nhiệt độ  $-20^\circ C$ .

**4.4.3 Thiamin pyrophosphat,  $\rho(C_{12}H_{19}ClN_4O_7P_2S) \approx 0,1$  mg/ml**

Hoà tan một lượng chính xác của chất chuẩn pyrophosphat (4.3.4) trong một thể tích xác định của dung môi thích hợp, ví dụ như 10 mg chất chuẩn pyrophosphat trong 100 ml axit clohydric (4.2.6).

**4.4.4 Kiểm tra nồng độ**

Pha loãng 10 ml dung dịch gốc thiamin clorua hydroclorua (4.4.1) bằng dung dịch axit clohydric (4.2.6) trong bình định mức 100 ml đến vạch. Đo độ hấp thụ của dung dịch này ở bước sóng 247 nm trong cuvet 1 cm dựa vào dung dịch axit clohydric (4.2.6) trong cuvet đối chứng sử dụng máy đo phổ UV (5.2). Tính nồng độ khối lượng,  $\rho$ , bằng microgram trên millilit dung dịch gốc, sử dụng công thức (1):

$$\rho = \frac{\epsilon_{247} \times 10^4 \times 10}{421} \quad (1)$$

trong đó

$\epsilon_{247}$  là giá trị hấp thụ của dung dịch ở bước sóng cực đại khoảng 247 nm;

421 là hệ số hấp thụ  $A_{1cm}^{1\%}$  của thiamin clorua hydroclorua trong axit clohydric 0,1 mol/l (xem [7]);

10 là hệ số pha loãng.

**4.5 Dung dịch chuẩn**

**4.5.1 Thiamin clorua hydroclorua,  $\rho(C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl) \approx 1$   $\mu$ g/ml đến 10  $\mu$ g/ml**

Dùng pipet lấy từ 1 ml đến 10 ml dung dịch gốc thiamin clorua hydroclorua (4.4.1) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng dung môi thích hợp, ví dụ như axit clohydric (4.2.6). Dung dịch này có thể ổn định được 1 tháng ở nhiệt độ  $4^\circ C$ , nơi tối.

**4.5.2 Thiamin monophosphat,  $\rho(C_{12}H_{17}ClN_4O_4PS) \approx 1$   $\mu$ g/ml đến 10  $\mu$ g/ml**

Dùng pipet lấy từ 1 ml đến 10 ml dung dịch gốc monophosphat (4.4.2) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng dung môi thích hợp, ví dụ như axit clohydric (4.2.6). Dung dịch này có thể ổn định được 1 tháng ở nhiệt độ  $4^\circ C$  ở nơi tối.

#### 4.5.3 Thiamin pyrophosphat, $\rho(C_{12}H_{19}ClN_4O_7P_2S) \approx 1 \mu\text{g/ml}$ đến $10 \mu\text{g/ml}$

Dùng pipet lấy từ 1 ml đến 10 ml dung dịch gốc pyrophosphat (4.4.3) cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng dung môi thích hợp, ví dụ như axit clohydric (4.2.6). Dung dịch này có thể ổn định được 1 tháng ở nhiệt độ 4 °C ở nơi tối.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

### 5.1 Yêu cầu chung

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

### 5.2 Máy đo phổ UV

Có thể đo các độ hấp thụ ở các bước sóng xác định.

### 5.3 Thiết bị hấp áp lực hoặc làm nóng

Dùng thiết bị áp lực cho mục đích tách chiết, ví dụ như kiểu nổi hấp áp lực, có bộ phận ghi nhiệt độ và áp suất, bộ phận đốt nóng bằng điện hoặc nổi cách thủy.

### 5.4 Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao

Gồm có bơm, bộ phận bơm mẫu, detector huỳnh quang có các bước sóng phát xạ và kích thích đã cài đặt, ví dụ như 420 nm và 366 nm, tương ứng (xem Phụ lục C) và hệ thống đánh giá như bộ tích phân.

### 5.5 Cột HPLC

#### 5.5.1 Yêu cầu chung

Có thể sử dụng các cột hoặc cỡ hạt có kích cỡ khác với quy định trong tiêu chuẩn này. Các thông số riêng cần phù hợp với vật liệu sử dụng để đảm bảo các kết quả tương đương. Chuẩn mực thực hiện đối với các cột phân tích thích hợp là độ phân giải đường nền của các chất phân tích có liên quan <sup>2)</sup>.

#### 5.5.2 Ôxy hoá trước cột

Cột phân tích, ví dụ như Lichrospher<sup>®</sup> 60 RP Select B <sup>2)</sup>, cỡ hạt 5  $\mu\text{m}$ , đường kính từ 4,0 mm đến 4,6 mm, dài từ 100 mm đến 250 mm.

<sup>2)</sup> Cột silica bao gói vật liệu thích hợp có bán sẵn là Lichrosorb<sup>®</sup> Si 60, Spherisorb<sup>®</sup> Si, Hypersil<sup>®</sup> Si và Lichrospher<sup>®</sup> 100 DIOL. Các cột RP bao gói vật liệu thích hợp như Spherisorb<sup>®</sup> ODS,  $\mu$ -Bondapak<sup>®</sup> radial C18, Supelco<sup>®</sup> LC-18-DB và Hypersil<sup>®</sup> ODS. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và CEN không ấn định phải sử dụng chúng.

## **TCVN 5164:2008**

### **5.5.3 Ôxy hoá sau cột**

Cột phân tích, ví dụ như Supeco® LC-18-DB <sup>2)</sup>, cỡ hạt 5 µm, đường kính từ 4,0 mm đến 4,6 mm, dài từ 100 mm đến 250 mm.

### **5.6 Thiết bị lọc**

Lọc pha động cũng như lọc dung dịch mẫu thử qua bộ lọc màng, ví dụ như 0,45 µm trước khi sử dụng hoặc bơm sẽ kéo dài tuổi thọ của cột.

### **5.7 Bơm phản ứng sau cột và ống dẫn xuất**

Hệ thống phân phối thuốc thử thích hợp là ống nối kiểu chữ T và ống dẫn xuất (ví dụ như 10 m x 0,33 mm).

## **6 Cách tiến hành**

### **6.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu**

Đông hoá mẫu thử. Nghiền thô nguyên liệu trong máy nghiền thích hợp và trộn lại. Cần thực hiện các biện pháp như làm nguội sơ bộ để tránh tiếp xúc với nhiệt cao trong thời gian dài.

### **6.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử**

#### **6.2.1 Tách chiết**

Cân một lượng mẫu thử thích hợp từ 2 g đến 10 g, chính xác đến mg, cho vào bình nón. Thêm một thể tích xác định từ 60 ml đến 200 ml dung dịch axit clohydric (4.2.6) hoặc axit sulfuric (4.2.7). pH của dung dịch này không được lớn hơn 3,0. Đậy nắp bình bằng mặt kính đồng hồ và hấp áp lực ở 121 °C trong 30 min hoặc làm nóng ở 100 °C trong 60 min.

**CHÚ THÍCH** Dữ liệu từ nghiên cứu BCR cho thấy rằng có thể áp dụng một dải rộng các điều kiện đối với việc thủy phân bằng axit (nhiệt độ từ 95 °C đến 130 °C, thời gian từ 15 min đến 60 min). Nhiệt độ cao hơn thì thời gian ngắn hơn.

#### **6.2.2 Xử lý bằng enzym**

Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, chỉnh chính xác pH tối ưu cho enzym bằng dung dịch natri axetat (4.2.16) hoặc (4.2.17) và thêm một lượng thích hợp enzym tách phospho (4.2.15) vào mẫu. Ủ hỗn hợp trong một khoảng thời gian và nhiệt độ tối ưu đối với enzym sử dụng. Sau khi làm nguội đến nhiệt độ phòng, dùng nước cất hoặc dung môi thích hợp để chuyển dung dịch vào bình định mức tránh ánh sáng và pha loãng đến thể tích xác định ( $V_s$ ).



Đối với mỗi enzym sử dụng, cần kiểm tra pH tối ưu, nhiệt độ ủ và thời gian ủ.

Để đảm bảo khử phospho tối ưu, bước xử lý bằng enzym cần được kiểm tra bằng các mẫu đã xử lý với thiamin monophosphat clorua (4.3.3) hoặc thiamin pyrophosphat clorua (4.3.4) và vật liệu tương tự trong ống mẫu làm mẫu thử. Vật liệu này phải là chất chuẩn đã được xác nhận.

Nếu sử dụng Taka-Diastaza để khử phosphat thì lượng thiamin có khả năng đưa vào bằng enzym cần được tính đến trong tính toán kết quả.

**CHÚ THÍCH 1** Để xác định dữ liệu về độ chụm trong tiêu chuẩn này, Taka-Diastaza<sup>1)</sup> đã được sử dụng để khử phospho dưới các điều kiện sau đây. Dịch chiết đã được điều chỉnh đến pH = 4,0 với natri axetat (4.2.16) hoặc (4.2.17) và đã bổ sung 100 mg Taka-Diastaza trên gam mẫu. Hỗn hợp này được ủ ở 37 °C đến 46 °C trong 16 h đến 24 h.

**CHÚ THÍCH 2** Việc khử phospho phụ thuộc vào chất nền của mẫu và enzyme đã sử dụng. Việc khử phospho có thể thực hiện được trong một thời gian ngắn, xem [8].

### 6.2.3 Oxy hoá thiamin về thiocrom

#### 6.2.3.1 Oxy hoá trước cột

Dùng pipet lấy 1 ml mẫu thử đã xử lý bằng enzym (6.2.2), dung dịch chuẩn (4.5.1) hoặc dung dịch trắng cho vào bình cầu hoặc lọ thích hợp, thêm 1 ml dung dịch hexaxyanoferat kiềm (4.2.13). Lắc dung dịch mẫu thử trong thời gian quy định (ví dụ: 10 s), để yên trong khoảng thời gian quy định (ví dụ: 1 min) và tiêm lên hệ thống HPLC pha đảo (xem Bảng C.1).

Cách khác, dung dịch đã oxy hoá có thể được chiết vào 1,5 ml isobutanol (4.2.3) và có thể bơm dịch chiết (ví dụ bằng H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Để loại bỏ các hợp chất gây nhiễu và bảo vệ cột HPLC thì nên trung hoà hoặc tiến hành làm sạch bằng chiết pha rắn (xem [5]).

**CHÚ THÍCH** Việc chuyển hoá thiamin thành thiocrom có thể bị ức chế bởi các chất có mặt (ví dụ như polyphenol) trong một số loại thực phẩm. Hiện tượng này thường gặp trong các thực phẩm chứa cacao, cũng có thể thấy trong một số thực phẩm khác. Nếu nghi ngờ có hiện tượng này thì nên kiểm tra độ thu hồi của phương pháp bằng cách xử lý dịch chiết mẫu bằng một thể tích thích hợp của dung dịch chuẩn thiamin trước phản ứng oxy hoá. Nếu độ thu hồi quá thấp thì nên tiến hành làm sạch dịch chiết mẫu sử dụng resin trao đổi ion hoặc sử dụng HPLC có oxy hoá sau cột.

#### 6.2.3.2 Nhận dạng bằng oxy hoá trước cột

Bơm các thể tích thích hợp giống nhau của các dung dịch hiệu chuẩn cũng như các dung dịch mẫu vào hệ thống HPLC. Nhận dạng thiocrom bằng so sánh thời gian lưu của các pic riêng lẻ trong sắc ký đồ

## TCVN 5164:2008

thu được từ dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn. Việc thêm các chất chuẩn vào dung dịch mẫu thử cũng có thể nhận dạng được pic.

Việc tách và định lượng được chứng minh là thoả mãn nếu các điều kiện thực nghiệm sau đây đã được thực hiện (xem thêm Hình A.1 và Phụ lục C về các điều kiện HPLC thay thế).

Pha tĩnh: Lichrospher® RP Select B, 5 µm, 250 mm x 4,0 mm

Pha động: Metanol (4.2.1): đệm axetat (4.2.22)

Tốc độ dòng: 0,7 ml/min

Thể tích bơm: 20 µl

Phát hiện: Huỳnh quang: bước sóng kích thích là 366 nm; bước sóng phát xạ là 435 nm.

### 6.2.3.3 Ôxy hoá sau cột

Oxy hoá thiamin về thiocrom sử dụng phản ứng sau cột với dung dịch hexaxyanoferrat (4.2.14). Thêm liên tục (ví dụ: 0,3 ml/min) thuốc thử dẫn xuất qua ống nối kiểu chữ T cho vào dịch rửa giải HPLC để tạo thành thiocrom.

CHÚ THÍCH Việc oxy hoá sau cột bị ảnh hưởng ví dụ như nồng độ natri hydroxit. Các nồng độ cao hơn trong dung dịch dẫn xuất có thể được bù bởi tốc độ bơm thấp hơn và ngược lại.

### 6.2.3.4 Nhận dạng bằng oxy hoá sau cột

Bơm các thể tích thích hợp giống nhau của các dung dịch hiệu chuẩn cũng như các dung dịch mẫu vào hệ thống HPLC. Nhận dạng thiamin bằng so sánh thời gian lưu của các pic riêng lẻ trong sắc ký đồ thu được từ dung dịch mẫu thử và dung dịch thử chuẩn. Việc thêm các chất chuẩn vào dung dịch mẫu thử cũng có thể nhận dạng được pic.

Việc tách và định lượng được chứng minh là thoả mãn nếu các điều kiện thực nghiệm sau đây đã được thực hiện (xem thêm Hình A.2 và Phụ lục C về các điều kiện HPLC thay thế).

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

Pha động: Metanol (4.2.1): đệm phosphat (4.2.19), chứa 1 g/l tetraethylamoni-clorua (4.2.20) và 5 mmol/l natri heptanesulfonat (4.2.21), (35:65)

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min

Thể tích bơm: 20 µl

Thuốc thử sau cột: dung dịch kali hexaxyanoferrat III kiềm (4.2.14)

Tốc độ dòng thuốc thử: 0,3 ml/min

Phát hiện: Huỳnh quang: bước sóng kích thích là 368 nm; bước sóng phát xạ là 440 nm.

CHÚ THÍCH Việc phân tích một số mẫu, ví dụ như thịt lợn nguyên liệu có thể cho pic bổ sung của 1-hydroxy-thiamin hoặc 2(1-hydroxyetyl) thiamin trong sắc đồ xem [10] và [11].

### 6.3 Phép xác định

Tiến hành xác định bằng ngoại chuẩn, xác định diện tích pic hoặc chiều cao pic của mẫu và so sánh các kết quả với các giá trị tương ứng của chất chuẩn có các chiều cao pic hoặc diện tích pic gần giống nhất, hoặc sử dụng đường chuẩn. Kiểm tra độ tuyến tính của việc hiệu chuẩn.

## 7 Tính toán

Tính theo đường chuẩn hoặc sử dụng chương trình thích hợp của bộ tích phân hoặc sử dụng quy trình đã đơn giản hoá sau đây. Tính khối lượng vitamin B<sub>1</sub>, w, biểu thị theo thiamin clorua hydrochlorua, bằng mg/100 g mẫu, theo công thức sau đây:

$$w = \frac{A_{ts} \times \rho \times V_s}{A_{xt} \times m_s} \times \frac{100}{1000}$$

trong đó

$A_{ts}$  là diện tích pic hoặc chiều cao pic của thiocrom thu được với dung dịch mẫu thử, tính bằng đơn vị chiều cao hoặc diện tích;

$A_{xt}$  là diện tích pic hoặc chiều cao pic của thiocrom thu được với dung dịch thử chuẩn, tính bằng đơn vị chiều cao hoặc diện tích;

$V_s$  là thể tích dung dịch mẫu thử (6.2.2), tính bằng mililit;

$\rho$  là nồng độ khối của thiamin clorua hydrochlorua trong dung dịch thử chuẩn (4.5.1), tính bằng microgram trên mililit;

$m_s$  là khối lượng của mẫu, tính bằng gam;

100 là hệ số để tính hàm lượng trên 100 g;

1000 là hệ số chuyển đổi  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  thành  $\text{mg}/100\text{ g}$ .

Báo cáo kết quả vitamin B<sub>1</sub> bằng  $\text{mg}/100\text{ g}$  được biểu thị theo thiamin clorua hydrochlorua. Nếu cần phải biểu thị kết quả theo thiamin (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>OS) thì nhân kết quả với hệ số 0,892.

**8 Độ chụm****8.1 Yêu cầu chung**

Dữ liệu về độ chụm của các phương pháp HPLC khác nhau để xác định thiamin được thiết lập năm 1996 bởi nghiên cứu so sánh quốc tế do Chương trình của Ủy ban Châu Âu về Thử nghiệm và Đo chuẩn thực hiện trên mẫu bột mì (CRM 121), bột sữa (CRM 421), rau hỗn hợp (CRM 485) và gan lợn đông khô (CRM 487). Nghiên cứu này đã cung cấp thông tin về thống kê như trong Phụ lục B.

**8.2 Độ lặp lại**

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại  $r$ .

Các giá trị đối với thiamin clorua hydroclorua là:

Một mì:	$\bar{x} = 0,452 \text{ mg/100 g}$	$r = 0,043 \text{ mg/100 g}$
Bột sữa:	$\bar{x} = 0,645 \text{ mg/100 g}$	$r = 0,071 \text{ mg/100 g}$
Rau hỗn hợp:	$\bar{x} = 0,295 \text{ mg/100 g}$	$r = 0,039 \text{ mg/100 g}$
Gan lợn:	$\bar{x} = 0,807 \text{ mg/100 g}$	$r = 0,088 \text{ mg/100 g}$

**8.3 Độ tái lập**

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được bởi hai phòng thử nghiệm khi tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập  $R$ . Các giá trị đối với thiamin clorua hydroclorua là:

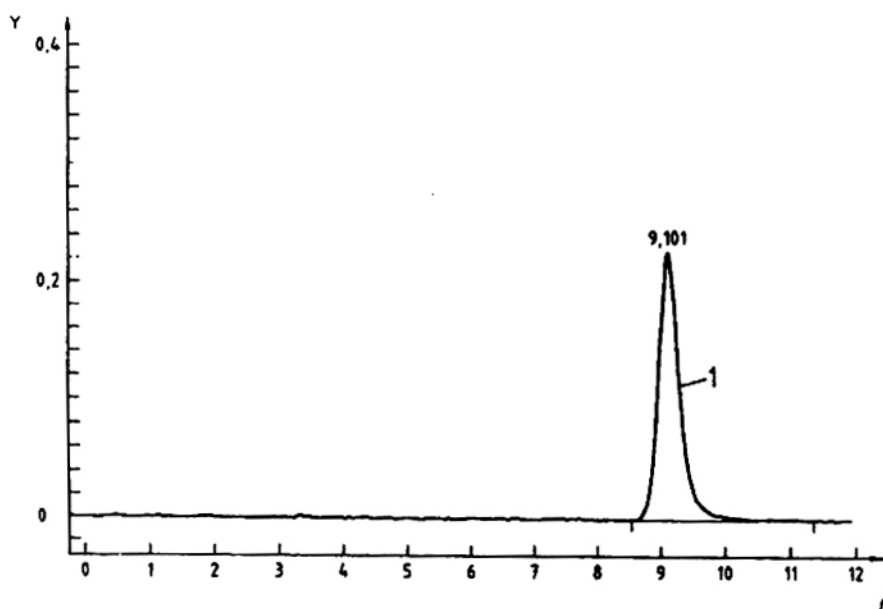
Một mì:	$\bar{x} = 0,452 \text{ mg/100 g}$	$R = 0,190 \text{ mg/100 g}$
Bột sữa:	$\bar{x} = 0,645 \text{ mg/100 g}$	$R = 0,243 \text{ mg/100 g}$
Rau hỗn hợp:	$\bar{x} = 0,295 \text{ mg/100 g}$	$R = 0,178 \text{ mg/100 g}$
Gan lợn:	$\bar{x} = 0,807 \text{ mg/100 g}$	$R = 0,623 \text{ mg/100 g}$

## 9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ ít nhất các thông tin sau đây:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;
- b) phương pháp thử đã dùng hoặc viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) ngày và phương pháp lấy mẫu đã sử dụng (nếu biết);
- d) tên và chữ ký của người phân tích;
- e) ngày nhận mẫu;
- f) kết quả thu được và đơn vị biểu thị;
- g) chi tiết quan sát được trong khi thử nghiệm;
- h) mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các có thể ảnh hưởng tới kết quả.

**Phụ lục A**  
(tham khảo)  
**Các ví dụ về sắc đồ HPLC**



Pha tĩnh: Lichrospher® RP Select B, 5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm

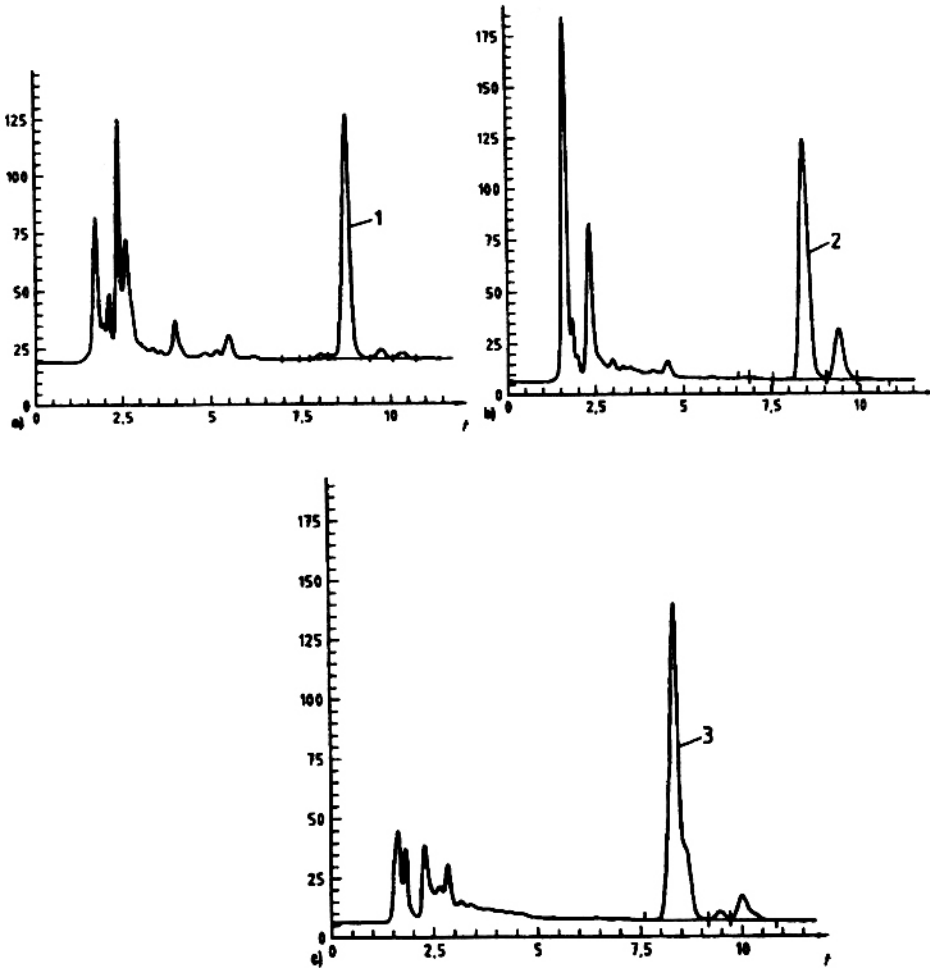
Pha động: Metanol (4.2.1): đệm axetat (4.2.22) (40:60)

Tốc độ dòng: 0,7 ml/min

Thể tích bơm: 20  $\mu$ l

Phát hiện: Huỳnh quang: bước sóng kích thích là 366 nm; bước sóng phát xạ là 435 nm.

**Hình 1 – Ví dụ về tách bằng HPLC của thiamin theo chuẩn thiocrom sử dụng dẫn xuất trước cột**



- Pha tĩnh: Purospher® RP C18, được đậy nắp ở cuối, 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4,6 mm
- Pha động: Metanol (4.2.1): đệm phosphat, pH 3,5,  $c(\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4) = 10 \text{ mmol/l}$ , chứa 1 g/l tetraethylamoniorua (4.2.20) và 5 mmol/l natri heptanesulfonat (4.2.21), (35:70)
- Tốc độ dòng: 1,5 ml/min
- Thể tích bơm: 3  $\mu\text{l}$
- Thuốc thử sau cột: dung dịch kali hexaxyanoferat III kiềm (4.2.14)
- Tốc độ dòng thuốc thử: 0,3 ml/min
- Phát hiện: Huỳnh quang: bước sóng kích thích là 365 nm; bước sóng phát xạ là 435 nm.

Hình 2 – Ví dụ về tách bằng HPLC của chuẩn thiamin sử dụng dẫn xuất sau cột trong rau diếp (a), cơ (b) và thịt lợn luộc (c)

## Phụ lục B

(tham khảo)

## Dữ liệu về độ chụm

Theo những chỉ dẫn nghiên cứu chứng nhận EU SMT, các dữ liệu đưa ra trong Bảng B.1 đã được xác định trong một phép thử liên phòng thử nghiệm [9]. Viện nghiên cứu thực phẩm, Norwich, UK thay mặt cho Ủy ban EU tham gia nghiên cứu này. Các dữ liệu đưa ra trong Bảng B.2 và Bảng B.3 đã được xác định trong một phép thử liên phòng thử nghiệm của Pháp [5].

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm đối với bột mì thô, sữa bột, rau hỗn hợp và gan lợn

MẪU	CRM 121 (bột mì thô)	CRM 421 (sữa bột)	CRM 485 (rau hỗn hợp)	CRM 487 (gan lợn)
Năm thử nghiệm	1996	1996	1996	1996
Số phòng thử nghiệm	13	14	12	15
Số lượng mẫu	2	2	2	2
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	13	14	12	15
Số ngoại lệ	0	0	0	0
Số kết quả được chấp nhận	65	70	58	72
Giá trị trung bình $\bar{x}$ (mg/100 g)	0,452	0,645	0,295	0,807
Độ lệch chuẩn của giá trị trung bình, mg/100 g	0,054	0,086	0,039	0,182
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	0,015	0,025	0,012	0,031
Hệ số biến thiên lặp lại	3,2 %	3,8 %	4,2 %	3,9 %
Giá trị lặp lại $r$ [ $r = 2,83 \times s_r$ ], mg/100 g	0,043	0,071	0,039	0,088
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ (mg/100 g)	0,053	0,085	0,063	0,182
Hệ số biến thiên tái lập	11,8 %	13,2 %	13,3 %	22,6 %
Giá trị lặp lại $R$ [ $R = 2,83 \times s_R$ ], mg/100g	0,190	0,243	0,178	0,623



**Bảng B.2 – Dữ liệu về độ chụm đối với thức ăn đóng chai dạng dung dịch, thức ăn cho trẻ em, sữa bột, bột trộn trái cây và nấm**

Mẫu	Dung dịch thức ăn trong chai	Thức ăn cho trẻ em	Sữa bột	Bột trộn trái cây	Nấm
Năm nghiên cứu	1995	1995	1995	1995	1995
Số phòng thử nghiệm	10	10	10	10	10
Số lượng mẫu	1	1	1	1	1
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	8	10	10	10	10
Số ngoại lệ	2	0	0	0	0
Số kết quả được chấp nhận	16	20	20	20	20
Giá trị trung bình $\bar{x}$ (mg/100 g)	0,11	0,2	0,56	1,04	1,31
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	0,01	0,02	0,04	0,07	0,12
Hệ số biến thiên lặp lại	7 %	8 %	7 %	7 %	9 %
Giá trị lặp lại $r$ [ $r = 2,83 \times s_r$ ], mg/100g	0,02	0,05	0,1	0,2	0,34
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , (mg/100 g)	0,04	0,04	0,08	0,19	0,17
Hệ số biến thiên tái lập	32 %	21 %	16 %	19 %	13 %
Giá trị tái lập $R$ [ $R = 2,83 \times s_R$ ], mg/100 g	0,1	0,12	0,25	0,55	0,48

**Bảng B.3 – Dữ liệu về độ chụm đối với ngũ cốc, bột sôcôla và thức ăn bổ sung**

Mẫu	Ngũ cốc	Ngũ cốc	Bột sôcôla	Thức ăn bổ sung
Năm nghiên cứu	1995	1995	1995	1995
Số phòng thử nghiệm	10	10	10	10
Số lượng mẫu	1	1	1	1
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	9	9	9	9
Số ngoại lệ	1	1	1	1
Số kết quả được chấp nhận	18	18	18	18
Giá trị trung bình $\bar{x}$ (mg/100 g)	1,42	2,95	1,55	486
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	0,06	0,18	0,13	39
Hệ số biến thiên lặp lại	4 %	6 %	8 %	8 %
Giá trị lặp lại $r$ [ $r = 2,83 \times s_r$ ], mg/100 g	0,16	0,49	0,36	111
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , (mg/100 g)	0,27	0,41	0,28	75
Hệ số biến thiên tái lập	19 %	14 %	19 %	15 %
Giá trị tái lập $R$ [ $R = 2,83 \times s_R$ ], mg/100g	0,75	1,16	0,8	212

## Phụ lục C

(tham khảo)

## Hệ thống HPLC thay thế

Việc tách và định lượng được chứng minh là thích hợp nếu áp dụng các điều kiện về sắc ký như sau [9]:

Bảng C.1 – Điều kiện HPLC thay thế

Pha cố định	Kích thước cột mm x mm	Pha động (V:V)	Sự tách sóng (Ex/Em) nm	Lưu lượng ml/min	Kiểu oxi hoá
Radial silica <sup>®</sup> 10 µm	250 x 4,6	Etanol/dung dịch đệm phosphat pH = 7,4 c(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) = 0,1 mol/l (50:50)	F: 365/435	3,0	PC <sup>a</sup>
Supelco <sup>®</sup> LC - 18 - DB 5 µm	250 x 4,6	Metanol/dung dịch đệm phosphat pH = 3,5 c(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) = 9 mmol/l chứa tetraetylamoniumclorua, c(C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> NCl) = 1 g/l và natri heptansulfonat, c(C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NaO <sub>2</sub> S) = 5 mmol/l (35:65)	F: 368/420	1,0	PC
Lichrospher <sup>®</sup> RP 18 5 µm	250 x 4,6	Metanol/natri hexansulfonat, c(C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NaO <sub>2</sub> S.H <sub>2</sub> O) = 1 mmol/l, pH = 3,0 (70:30)	F: 375/435	1,5	PC
Eurospher <sup>®</sup> 100 - C18 5 µm	250 x 4,6	Natri dihydrophosphat, c(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) = 10 mmol/l): natri perclorat, c(NaClO <sub>4</sub> ) = 0,15 mol/l (50:50)	F: 375/435	1,0	PC
Lichrospher <sup>®</sup> RP Select B 5 µm	250 x 4,6	Metanol/dung dịch đệm axetat pH = 4,0, c(CH <sub>3</sub> COONa) = 50 mmol/l (40:60)	F: 366/435	0,7	PRC <sup>b</sup>
µ-Bondapak <sup>®</sup> radial C18 5 µm	250 x 4,6	Metanol/dung dịch đệm axetat pH = 4,5, c(CH <sub>3</sub> COONa) = 0,5 mmol/l (40:60)	F: 366/435	0,8	PRC
Spherisorb <sup>®</sup> ODS2 5 µm	250 x 4,6	Metanol/dung dịch đệm phosphat pH = 4,0, c(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) = 0,1 mol/l (70:30)	F: 375/435	1,0	PRC
Lichrospher <sup>®</sup> RP 18 10 µm	250 x 4,6	Kali dihydrophosphat, c(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) = 10 mmol/l/dimetyl formamit (80:20)	F: 368:440	1,5	PRC
Hamilton <sup>®</sup> PRP-1 5 µm	150 x 4,6	Metanol/nước (40:60); pH được điều chỉnh tới 4,5 bằng axit axetic	F: 366/435	1,0	PRC
Hamilton <sup>®</sup> PRP-1 5 µm	150 x 4,1	Metanol/nước (35:65); pH = 9,0 được điều chỉnh bằng amoniac, w(NH <sub>3</sub> ) = 25 %	F: 366/435	1,0	PRC
Hypersil <sup>®</sup> NH <sub>2</sub> APS 2 5 µm	250 x 4,6	Diometan/metanol (95:5)	F: 365/440	1,0	PRC

<sup>a</sup> PC = Dẫn xuất sau cột.  
<sup>b</sup> PRC = Dẫn xuất trước cột.

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Bognár, A.: Bestimmung von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) Deutsche Lebensm. Rundschau 77. 1981. 431-436.
- [2] 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.
- [3] Bognar, A.: Determination of vitamin B1 in food by High-Performance-Liquid-Chromatography and post-column derivatization. Fresenius J. Anal. Chem. 343. 1992. 155-56.
- [4] Hagg, M. and Kumpulainen, J.: Thiamin and riboflavin contents in domestic and imported cereal products in Finland. J. Food Comp. Anal. 6, 1993. 299-306.
- [5] Arella, P., Lahely, S., Bourguignon, J. B. and Hasselmann, C.: Liquid chromatographic determination of vitamin B1 and B2 in foods. A collaborative study. Food Chem 56. 1996. 81-86.
- [6] 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, 271-297.
- [7] Dawson, R.M.C., Elliott, D C, Elliot, W. H. and Jones, K.: Data for Biochemical Research. Oxford Science Publication 3rd. ISBN 0 19 855299 8, 1989.
- [8] Hagg, 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.
- [9] Finglas, P. M., Scott, K. J., Withoft, C. M., van den Berg, H. and 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.
- [10] Takashi, U., Yukiko, T., Kohei, M., Mari, T., Kaname, K.: Simultaneous determination of 2(1-hydroxyethyl)thiamin and thiamin in foods by high performance liquid chromatography with post-column derivatisation. Vitamins (Japan). 64. 1990. 379-385.
- [11] Takashi, U., Yukiko, T., Kohei, M., Masako, M., Kaname, K.: Distribution and stability of 2(1-hydroxyethyl)thiamin and thiamin in foods. Vitamins (Japan). 65. 1991, 249-256.