

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 11670:2016**

**Xuất bản lần 1**

**THỨC ĂN CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH VÀ  
SẢN PHẨM DINH DƯỠNG DÀNH CHO NGƯỜI LỚN -  
XÁC ĐỊNH VITAMIN A - PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG  
SIÊU HIỆU NĂNG (UPLC) SỬ DỤNG DETECTOR UV**

*Infant formula and adult nutritionals - Determination of vitamin A - by normal phase high performance liquid chromatography method (UPLC) and UV detection*

**HÀ NỘI - 2016**

**Lời nói đầu**

TCVN 11670:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2011.07, *Vitamins A in infant formula and adult nutritionals. UPLC-UV*;

TCVN 11670:2016 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

# Thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và sản phẩm dinh dưỡng dành cho người lớn - Xác định vitamin A - Phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) sử dụng detector UV

*Infant formula and adult nutritionals – Determination of vitamin A – Ultra-performance liquid chromatographic method (UPLC) and UV detection*

**CẢNH BÁO** – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến tất cả các vấn đề về an toàn có liên quan trong việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thực hành liên quan đến sức khỏe và an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định vitamin A (retinol) trong thức ăn công thức dành cho trẻ sơ sinh và sản phẩm dinh dưỡng dành cho người lớn bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) sử dụng detector UV.

Vitamin A được xác định là tổng của all-*trans* retinol, 13-*cis* retinol và các este retinol.

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm được nêu trong Phụ lục A.

## 2 Nguyên tắc

Xà phòng hóa vitamin A trong mẫu thử thành retinol bằng kali hydroxit với sự có mặt chất chống oxy hóa. Chiết pha rắn bằng cột diatomit sau đó rửa giải bằng *n*-hexan. Cho bay hơi dịch chiết đến khô và pha loãng trong *n*-hexan. Sau đó, retinol được phân tích bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) sử dụng detector UV ở bước sóng 326 nm và định lượng bằng cách so sánh chiều cao pic hoặc diện tích pic của retinol trong mẫu thử với chiều cao pic hoặc diện tích pic của các chất ngoại chuẩn.

### 3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Etanol tuyệt đối, CAS 64-17-5.

3.2 2-propanol, loại dùng cho HPLC, CAS 67-63-0.

3.3 *n*-Hexan, loại dùng cho HPLC, CAS 110-54-3

3.4 Kali hydroxit, loại tinh khiết, dạng viên, CAS 1310-58-3 .

3.5 All-*trans* retinol (vitamin A), dạng tinh thể, CAS 68-26-8.

3.6 Natri sulfit hydrat, CAS 27610-45-3.

3.7 Natri dodecyl sulfat, CAS 151-21-3.

3.8 Natri sulfat khan, CAS 7757-82-6.

3.9 Natri 1-pentansulfonat, CAS 207605-40-1.

3.10 Natri ascorbat, CAS 134-03-2.

3.11 Pyrogallol (tùy chọn), CAS 87-66-1.

3.12 Hydroquinon (tùy chọn), CAS 123-31-9.

3.13 Kali dihydro phosphat, CAS 7778-77-0.

3.14 Butylhydroxytoluen (2,6-di-*tert*-butyl-4-metylphenol) (BHT), CAS 128-37-0.

3.15 Takadiastase hoặc amylase, CAS 9001-19-8.

3.16 *n*-hexan chứa butylhydroxytoluen 0,05 mg/ml

Dùng cân (4.17) cân 50 mg BHT (3.14) cho vào bình định mức 1 000 ml (4.12) và thêm *n*-hexan (3.3) đến vạch. Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng trong 6 tháng.

3.17 Pha động, 2-propanol 1 % (thể tích) trong *n*-hexan

Dùng pipet (4.16) lấy 10 ml 2-propanol (3.2) cho vào bình định mức 1 000 ml (4.12). Thêm *n*-hexan (3.3) đến vạch. Bảo quản dung dịch trong bình kín khí ở nhiệt độ phòng trong 2 tháng.

### 3.18 Dung dịch chuẩn *all-trans* retinol

#### 3.18.1 Dung dịch gốc *all-trans* retinol, nồng độ khoảng 150 µg/ml

Dùng cân (4.17) cân 15 mg ± 5 mg *all-trans* retinol dạng tinh thể (3.5) cho vào bình định mức thủy tinh tối màu 100 ml (4.13). Hòa tan và thêm etanol (3.1) đến vạch. Dung dịch ổn định ở -20 °C ít nhất trong 2 tuần.

**CHÚ THÍCH** Nồng độ dung dịch được xác định bằng máy đo quang phổ trong ngày sử dụng như sau: Dùng xyranh (4.2) lấy 2 ml dung dịch gốc *all-trans* retinol cho vào bình định mức thủy tinh tối màu 100 ml (4.13). Thêm etanol đến vạch. Dung dịch này phải có nồng độ *all-trans* retinol khoảng 3 µg/ml. Đo độ hấp thụ (*A*) ở bước sóng 326 nm so với etanol. Xác định nồng độ dung dịch gốc *all-trans* retinol (*C*) theo Công thức (1):

$$C = \frac{A_{326\text{ nm}}}{0,549} \times 150 \quad (1)$$

Trong đó

$A_{326\text{ nm}}$  là độ hấp thụ đo được ở bước sóng 326 nm;

0,549 là độ hấp thụ lý thuyết của dung dịch *all-trans* retinol trong etanol ở nồng độ 3 µg/ml ( $E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 1830$ ).

Nồng độ tính được tối thiểu phải bằng 80 % nồng độ lý thuyết, nếu không thì chuẩn bị các dung dịch gốc mới. Nếu không có sẵn dung dịch chuẩn *all-trans* retinol thì có thể thay bằng axetat retinyl đã xà phòng hóa. Xem Phụ lục B.

#### 3.18.2 Dung dịch trung gian *all-trans* retinol, nồng độ khoảng 15 µg/ml

Dùng pipet (4.16) lấy 5 ml dung dịch gốc (3.18.1) cho vào bình định mức thủy tinh tối màu 50 ml (4.13). Thêm *n*-hexan (3.3) đến vạch. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

#### 3.18.3 Dung dịch làm việc *all-trans* retinol

##### 3.18.3.1 Dung dịch làm việc *all-trans* retinol, nồng độ khoảng 3,0 µg/ml

Dùng pipet (4.16) lấy 5 ml dung dịch trung gian (3.18.2) cho vào bình định mức thủy tinh tối màu 25 ml (4.13). Thêm *n*-hexan (3.3) đến vạch. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

##### 3.18.3.2 Dung dịch làm việc *all-trans* retinol, nồng độ khoảng 1,8 µg/ml

Dùng pipet (4.16) lấy 6 ml dung dịch trong 3.18.3.1 cho vào bình định mức thủy tinh tối màu 10 ml (4.13). Thêm *n*-hexan (3.3) đến vạch. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

##### 3.18.3.3 Dung dịch làm việc *all-trans* retinol, nồng độ khoảng 0,6 µg/ml

Dùng pipet (4.16) lấy 2 ml dung dịch trong 3.18.3.1 cho vào bình định mức thủy tinh tối màu 10 ml (4.13). Thêm *n*-hexan (3.3) đến vạch. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

#### 4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm, các dụng cụ thủy tinh tối màu loại A và cụ thể như sau:

4.1 **Màng lọc**, cỡ lỗ 0,22  $\mu\text{m}$ .

4.2 **Xyranh bằng chất dẻo**, dung tích 2 ml.

4.3 **Bộ chuyển dòng khí**.

4.4 **Cột diatomit**, ví dụ: Chromabond XTR (Macherey-Nagel, Duren, Đức) 70 ml/14 500 mg hoặc tương đương.

4.5 **Cột, rỗng**, dung tích 70 ml (tùy chọn), ví dụ: Chromabond hoặc tương đương.

4.6 **Vật liệu nhồi** (tùy chọn), đường kính hạt  $\leq 0,4$  mm, ví dụ: Chromabond XTR Btl 14,5 g hoặc tương đương.

4.7 **Máy đồng hóa polytron**.

4.8 **Nồi cách thủy**, có trang bị bộ khuấy từ và bộ ngưng.

4.9 **Bộ cổ quay**.

4.10 **Hệ thống UPLC**, có gắn bơm gradient hai kênh và kit thử so sánh hexan tetrahydrofuran, bộ bơm mẫu có gắn vòng bơm 5  $\mu\text{l}$ , detector UV/màng diot và phần mềm phân tích dữ liệu.

4.11 **Cột phân tích**, ví dụ UPLC BEH HILIC cỡ hạt 1,7  $\mu\text{m}$ , kích thước 2,1 mm  $\times$  100 mm hoặc tương đương.

4.12 **Bình định mức**, dung tích 1 000 ml.

4.13 **Bình định mức thủy tinh tối màu**, dung tích 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml và 100 ml.

4.14 **Bình thủy tinh đáy nhọn tối màu**, dung tích 250 ml.

4.15 **Bình thủy tinh đáy phẳng tối màu**, dung tích 250 ml, có cổ mài.

4.16 **Pipet Pasteur**.

4.17 **Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 0,01 g và 0,1 mg.

4.18 **Cốc có mỏ**, dung tích 250 ml.

4.19 **Que thủy tinh**.

## 5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này.

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

## 6 Cách tiến hành

### 6.1 Chuẩn bị mẫu thử

#### 6.1.1 Mẫu dạng bột

Dùng cân (4.17) cân 50,0 g  $\pm$  1,0 g mẫu, chính xác đến 0,1 g, cho vào cốc có mỏ 250 ml (4.18). Ghi lại khối lượng. Thêm 100 g nước ở nhiệt độ 40 °C  $\pm$  5 °C. Trộn bằng que thủy tinh (4.19) hoặc máy đồng hóa polytron (4.7) cho đến khi đồng nhất.

Nếu mẫu chứa tinh bột thì thêm 50,0 mg  $\pm$  10 mg takadiastase hoặc amylase (3.15) để dễ dàng cho việc xử lý. Trộn kỹ và để yên 15 min ở 40 °C  $\pm$  5 °C. Tiến hành theo 6.2.1.

#### 6.1.2 Mẫu dạng lỏng (ví dụ: thức ăn công thức để dùng ngay, sữa dạng lỏng)

Trộn kỹ mẫu nếu mẫu bị tách chất béo. Để mẫu phòng thử nghiệm đạt đến nhiệt độ phòng. Trộn kỹ.

Nếu mẫu chứa tinh bột thì thêm 50,0 mg  $\pm$  10 mg takadiastase hoặc amylase (3.15) để dễ dàng cho việc xử lý. Trộn kỹ và để yên trong 15 min ở 40 °C  $\pm$  5 °C. Tiến hành theo 6.2.1.

### 6.2 Chuẩn bị phân mẫu thử và dung dịch mẫu thử

**LƯU Ý** – Mẫu kiểm soát chất lượng (QC) (mẫu chuẩn đã được chứng nhận, mẫu chuẩn nội bộ hoặc mẫu thêm chuẩn) phải được kiểm tra thường xuyên và phân tích hai lần.

#### 6.2.1 Xà phòng hóa

Dùng cân (4.17) cân 30,0 g  $\pm$  0,1 g huyền phù mẫu thử (6.1) cho vào bình thủy tinh đáy phẳng tối màu 250 ml (4.15).

**CHÚ THÍCH** Mẫu này tương ứng với 10,0 g mẫu thử khô hoặc 30,0 g  $\pm$  0,1 g mẫu thử dạng lỏng.

Thêm hỗn hợp chất chống oxi hóa [1 g natri sulfit (3.6), 1 g natri ascorbat (3.10)].

**CHÚ THÍCH** 1 g natri ascorbat (3.10) có thể được thay bằng 0,5 g pyrogallol (3.11). Cũng có thể sử dụng 0,5 g hydroquinon (3.12) làm chất chống ô xi hóa thay cho hỗn hợp natri sulfit và natri ascorbat.

## TCVN 11670:2016

Thêm 7 g kali hydroxit tinh khiết (3.4). Trộn để hòa tan. Thêm 50 ml etanol tuyệt đối (3.1). Khuấy bằng que khuấy từ. Tiến hành xà phòng hóa nóng hoặc xà phòng hóa qua đêm.

Xà phòng hóa nóng: Nối bộ chuyển dòng khí (4.3) và bộ ngưng vào bình cầu. Thổi nhẹ hơi nitơ. Cho hồi lưu trong 30 min ở nhiệt độ  $85\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong khi vẫn khuấy trong nồi cách thủy có trang bị bộ khuấy từ (4.8).

Xà phòng hóa để qua đêm. Thổi nhẹ hơi nitơ trong khoảng 30 s để đuổi oxi. Đậy nắp bình. Đặt bình lên bộ khuấy từ để qua đêm ở nhiệt độ phòng  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

CHÚ THÍCH Cần đảm bảo khuấy kỹ môi trường phản ứng trong quá trình xà phòng hóa.

### 6.2.2 Chiết

Làm nguội bình đến nhiệt độ phòng. Chuyển định lượng vào bình định mức thủy tinh tối màu 100 ml (4.13). Thêm 2 g natri 1-pentansulfonat (3.9) và thêm nước đến vạch. Lắc kỹ trong 1 min.

CHÚ THÍCH Natri 1-pentansulfonat có giá thành cao và có thể được thay bằng 1,5 g natri dodecyl sulfat (3.7) rẻ hơn nhiều và ít hòa tan. Nên sử dụng dạng dung dịch (1,5 g natri dodecyl sulfat trong 3,5 ml nước).

Chuẩn bị cột (4.4) bằng cách lắp kim với bộ nối ở điểm thấp nhất của cột. Sau cùng cố định bằng kẹp.

CHÚ THÍCH Thành phần của vật liệu nhồi (4.6) quá thô sẽ làm giảm độ thu hồi của quá trình chiết. Đường kính hạt không được lớn hơn 0,4 mm.

Dùng pipet (4.16) lấy 20 ml dung dịch đã xà phòng hóa cho lên đỉnh cột. Bắt đầu lại bằng 15 ml và thay cột khác nếu dung dịch không được giữ lại toàn bộ trên cột.

CHÚ THÍCH Có thể trộn vật liệu nhồi trong cốc có mỏ bằng 20 ml dung dịch thủy phân hóa, dùng que thủy tinh và sau đó chuyển hỗn hợp vào cột (4.5) rộng. Điều này cải thiện sự phân tán và độ hấp thụ của chất lỏng qua vật liệu nhồi. Trong trường hợp này, không cần đợi 15 min trước khi bắt đầu bước rửa giải.

### 6.2.3 Rửa giải

Rửa giải hỗn hợp bằng 100 ml *n*-hexan chứa BHT (3.16), sau 15 min. Thu lấy phần rửa giải cho vào bình thủy tinh đáy nhọn tối màu 250 ml (4.14).

Ngừng rửa giải ngay khi tất cả *n*-hexan đã được rửa giải nhưng không quá 30 min sau khi tất cả *n*-hexan đã được vật liệu nhồi hấp thụ hết.

CHÚ THÍCH Trong một số trường hợp, dung dịch mẫu đã xà phòng hóa không được giữ lại hết trên cột chiết, thậm chí khi sử dụng 15 ml thay vì 20 ml. Để xử lý vấn đề này có thể sử dụng một lượng nhỏ kali hydroxit (3.4) trong quá trình xà phòng hóa, ví dụ: 4 g thay cho 7 g hoặc bằng cách thêm 1 g kali dihydro phosphat (3.13) vào 20 ml dung dịch mẫu đã xà phòng hóa, trước khi nạp lên cột chiết.



### 6.2.4 Làm bay hơi

Cho dung môi bay hơi dưới áp suất giảm, ở nhiệt độ 30 °C đến 40 °C, sử dụng bộ cô quay (4.9). Thổi hơi nitơ để làm bay hơi dung môi cho đến khi còn vài mililit. Sử dụng một lượng nhỏ *n*-hexan (3.3) để chuyển phần còn lại vào bình định mức thủy tinh tối màu 5 ml (4.13). Thêm *n*-hexan đến vạch. Lọc qua màng lọc cỡ lỗ 0,22 µm (4.1) [dung dịch này được bơm lên hệ thống UPLC (4.10)]. Tiến hành pha loãng tiếp bằng *n*-hexan để nồng độ retinol nằm trong dải hiệu chuẩn (từ 0,6 µg/ml đến 3,0 µg/ml), nếu cần.

### 6.2.5 Chạy sắc ký

#### 6.2.5.1 Các điều kiện sắc ký

Các điều kiện sắc ký được coi là thích hợp nêu trong Bảng 1

**Bảng 1 – Điều kiện sắc ký đối với hệ thống UPLC**

Thông số	Điều kiện
Cột phân tích	Xem 4.11
Nhiệt độ cột	25 °C
Pha động A	2-propanol 1 % trong <i>n</i> -hexan (3.17)
Tốc độ dòng	1,2 ml/min
Thể tích bơm	4,00 µl
Phương thức bơm	Vòng bơm từng phần (5 µl)
Bước sóng của detector UV	326 nm
Tốc độ phân tích dữ liệu	2 pts/s

#### 6.2.5.2 Kiểm tra thiết bị

Đối với hệ thống UPLC (4.10), để cân bằng ít nhất 15 min trước khi bơm mẫu chuẩn và mẫu thử. Đảm bảo áp suất hệ thống ổn định và không bị rò rỉ. Bơm ít nhất ba lần dung dịch chuẩn có nồng độ thấp nhất và đảm bảo độ ổn định của hệ thống, độ đáp ứng lặp lại và thời gian lưu trước khi bắt đầu phân tích.

CHÚ THÍCH Hệ số biến thiên đối với thời gian lưu và độ đáp ứng pic không được lớn hơn 2 % .

#### 6.2.5.3 Kế hoạch kiểm soát nội bộ

##### - Mẫu QC

Phân tích lặp lại mẫu QC (mẫu đã được chứng nhận, mẫu chuẩn nội bộ hoặc mẫu thêm chuẩn) trong mỗi dãy phân tích.

## TCVN 11670:2016

### - Mẫu thêm chuẩn

Kiểm tra tỷ lệ thu hồi bằng mẫu thêm chuẩn. Tính tỷ lệ thu hồi (*Rec*) trên mẫu thử, sử dụng Công thức (2):

$$Rec = \frac{C_s - C_n}{C_a} \times 100 \quad (2)$$

Trong đó:

$C_s$  là nồng độ của vitamin A trong phần mẫu thử thêm chuẩn;

$C_n$  là nồng độ của vitamin A trong phần mẫu thử không thêm chuẩn;

$C_a$  là nồng độ của vitamin A bổ sung vào phần mẫu thử.

Tỷ lệ thu hồi phải cao hơn 90 %.

### 6.2.6 Quy trình vận hành và phương pháp xác định

#### 6.2.6.1 Trình tự cài đặt

Chuẩn bị (hai lần) 4  $\mu$ l từng dung dịch chuẩn làm việc (3.18.3). Bơm lần lượt 4  $\mu$ l thuốc thử trắng và dung dịch mẫu thử. Mỗi lần bơm 6 mẫu đến 8 mẫu dung dịch chuẩn làm việc hoặc mẫu QC để theo dõi độ ổn định của hệ thống.

#### 6.2.6.2 Hiệu chuẩn

Tính trung bình diện tích pic (hoặc chiều cao pic) và độ lệch chuẩn SD trong dãy phân tích. Dùng đường chuẩn của vitamin A (*all-trans* retinol) theo diện tích pic (hoặc chiều cao pic) trong từng dung dịch chuẩn làm việc so với nồng độ tính bằng microgam trên millilit. Tính độ dốc, *S*, và giao điểm, *I*, của đường chuẩn, theo phương pháp hồi quy tuyến tính.

#### 6.2.6.3 Nhận biết

Nhận biết pic *all-trans* retinol, *13-cis* retinol trên sắc ký đồ bằng cách so sánh thời gian lưu của pic tương ứng trong các dung dịch chuẩn.

## 7 Tính và biểu thị kết quả

### 7.1 Tính hàm lượng *all-trans* retinol

Tính hàm lượng *all-trans* retinol trong mẫu thử,  $w_1$ , biểu thị bằng microgam trên 100 g ( $\mu$ g/100 g), theo Công thức (3):

$$w_1 = \frac{(A_{s_1} - I) \times V_0 \times V_2}{S \times m \times V_1} \times 100 \quad (3)$$

Trong đó:

$m$  là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g) ( $m = 10,0$  g đối với mẫu dạng bột và  $m = 30,0$  g đối với mẫu dạng lỏng);

$A_{s_1}$  là diện tích pic (hoặc chiều cao pic) all-*trans* retinol trên sắc ký đồ của mẫu thử;

$S$  là độ dốc của đường chuẩn;

$I$  là giao điểm của đường chuẩn;

$V_0$  là thể tích dung dịch xà phòng hóa đã pha loãng, tính bằng mililit (ml) (Ở đây  $V_0 = 100,0$  ml);

$V_1$  là thể tích của dung dịch xà phòng hóa đưa vào cột, tính bằng mililit (ml) [Ở đây  $V_1 = 20,0$  ml hoặc  $V_1 = 15,0$  ml nếu dung dịch xà phòng hóa không được giữ lại trên cột];

$V_2$  là thể tích cuối cùng của dung dịch thử, tính bằng mililit (ml) (Ở đây  $V_2 = 5,0$  ml).

## 7.2 Tính hàm lượng 13-cis retinol

Tính hàm lượng 13-*cis* retinol trong mẫu thử,  $w_2$ , biểu thị bằng microgam trên 100 g ( $\mu\text{g}/100$  g), theo Công thức (4):

$$w_2 = \frac{(A_{s_2} - I) \times V_0 \times V_2 \times 1830}{S \times m \times V_1 \times 1680} \times 100 \quad (4)$$

Trong đó:

$m$  là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g) ( $m = 10,0$  g đối với mẫu dạng bột và  $m = 30,0$  g đối với mẫu dạng lỏng);

$A_{s_2}$  là diện tích pic (hoặc chiều cao pic) 13-*cis* retinol trên sắc ký đồ của mẫu thử;

$S$  là độ dốc của đường chuẩn all-*trans* retinol;

$I$  là giao điểm của đường chuẩn all-*trans* retinol;

$V_0$  là thể tích dung dịch xà phòng hóa đã pha loãng, tính bằng mililit (ml) (Ở đây  $V_0 = 100,0$  ml);

$V_1$  là thể tích của dung dịch xà phòng hóa đưa vào cột, tính bằng mililit (ml) [Ở đây  $V_1 = 20,0$  ml hoặc  $V_1 = 15,0$  ml];

## TCVN 11670:2016

$V_2$  là thể tích cuối cùng của dung dịch thử, tính bằng mililit (ml) (Ở đây  $V_2 = 5,0$  ml);

1830 là hệ số hấp thụ E (1 cm, 1 %) của *all-trans* retinol;

1680 là hệ số hấp thụ E (1 cm, 1 %) của *13-cis* retinol.

### 7.3 Tính hàm lượng vitamin A trong mẫu thử

Tính hàm lượng vitamin A trong mẫu thử,  $X$ , biểu thị bằng microgam trên 100 g ( $\mu\text{g}/100$  g), theo Công thức (5):

$$X = w_1 + 0,75 \times w_2 \quad (5)$$

Trong đó:

$w_1$  là hàm lượng *all-trans* retinol, tính bằng microgam trên 100 g ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ );

$w_2$  là hàm lượng *13-cis* retinol, tính bằng microgam trên 100 g ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ).

## 8 Báo cáo thử nghiệm

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

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- kết quả thử thu được;
- nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

## Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm chấp nhận được của phương pháp được nêu trong Bảng A.1.

**Bảng A.1 – Các kết quả liên phòng thử nghiệm về phép xác định vitamin A trong sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh**

Chất phân tích	Giá trị chung bình, $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Hệ số biến thiên lặp lại, $SD_r, \%$	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $CV_r, \%$	Độ lặp lại, $r, \%$	Phần trăm độ lặp lại, $r, \%$	Hệ số biến thiên tái lập, $SD_R, \%$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $CV_R, \%$	Độ tái lập, $R, \%$	Phần trăm độ tái lập, $R, \%$
Vitamin A	475	6,3	1,3	17	3,7	22,7	4,8	63	13,2

**Phụ lục B**

(Quy định)

**Quy trình chuẩn bị dung dịch chuẩn *all-trans* retinol từ *all-trans* retinyl axetat**

Cân 20 mg *all-trans* retinyl axetat cho vào ống 25 ml có nắp vặn.

Thêm 5 ml etanol. Trộn cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Thêm 2 ml dung dịch kali hydroxit 50 % và 0,1 g natri ascorbat (3.10). Gia nhiệt trên nồi cách thủy (4.8) ở 85 °C trong 30 min. Làm nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm 5 ml nước và 10 ml *n*-hexan (3.3). Đậy nắp ống và lắc mạnh trong khoảng 30 s. Để yên hỗn hợp để tách pha.

Dùng pipet (4.16) để loại bỏ lớp chất lỏng phía dưới. Thêm 10 ml nước. Đậy nắp ống và lắc mạnh

Để yên để tách pha, dùng pipet để loại bỏ lớp chất lỏng phía dưới. Thêm khoảng 0,5 g natri sulfat khan (3.8). Xoay bình và lọc vào bình định mức 100 ml (4.6). Tráng ống hai lần, mỗi lần khoảng 10 ml *n*-hexan. Thêm *n*-hexan đến vạch.

---