

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8276:2018

EN 12822:2014

Xuất bản lần 2

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH VITAMIN E
BẰNG SẮC KỸ LỎNG HIỆU NĂNG CAO –
ĐỊNH LƯỢNG α -, β -, γ - VÀ δ -TOCOPHEROL**

*Foodstuffs – Determination of vitamin E by high performance
liquid chromatography – Measurement of α -, β -, γ -, and δ -tocopherol*

HÀ NỘI – 2018

Lời nói đầu

TCVN 8276:2018 thay thế TCVN 8276:2010

TCVN 8276:2018 hoàn toàn tương đương với EN 12822:2014;

TCVN 8276:2018 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.

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này cung cấp cơ sở cho các phương pháp phân tích. Tiêu chuẩn này được dùng như một khung pháp lý trong đó các nhà phân tích có thể xác định việc phân tích theo quy trình chuẩn.

Vì tiêu chuẩn này liên quan đến phép đo phần khối lượng α -, β -, γ - và δ -tocopherol trong thực phẩm nên phần tham chiếu được nêu trong Thư mục tài liệu tham khảo về cách tính và biểu thị hàm lượng vitamin E theo các hoạt tính sinh học. Xem thêm thông tin trong [1], [2], [3] và [4]. Với phương pháp này không có sự khác biệt giữa RRR-tocopherol và tất cả các tocopherol racemic.

Thực phẩm – Xác định vitamin E bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Định lượng α -, β -, γ - và δ -tocopherol

Foodstuffs – Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography – Measurement of α -, β -, γ - and δ -tocopherol

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 hàm lượng vitamin E trong thực phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Việc xác định hàm lượng vitamin E được thực hiện bằng cách định lượng α -, β -, γ - và δ -tocopherol. Phương pháp này đã được đánh giá xác nhận trong hai phép nghiên cứu đánh giá liên phòng. Nghiên cứu đầu tiên là phân tích α -tocopherol trong margarin và sữa bột, dao động từ 9,89 mg/100 g đến 24,09 mg/100 g. Nghiên cứu thứ hai là phân tích α -, β -, γ - và δ -tocopherol trong sữa bột và α -, và β -tocopherol trong bột yến mạch dao động từ 0,057 mg/100 g (β -tocopherol) đến 10,2 mg/100 g (α -tocopherol).

CHÚ THÍCH Hoạt tính của vitamin E có thể tính được từ hàm lượng tocopherol chấp nhận các hệ số thích hợp nêu trong [1], [2], [3] và [4].

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 sử dụng để phân tích trong phòng thử nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*.

3 Nguyên tắc

α -, β -, γ - và δ -tocopherol trong dung dịch mẫu được xác định bằng HPLC detecto UV hoặc huỳnh quang. Trong phần lớn các trường hợp, xà phòng hóa mẫu thử, sau đó chiết nếu cần. Việc nhận biết dựa vào thời gian lưu và được định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn sử dụng diện tích pic hoặc chiều cao pic. Các phương pháp nội chuẩn có thể được sử dụng nếu các phép thử độ thu hồi tương ứng cho thấy có cùng tính năng của chất nội chuẩn trong quá trình phân tích như chất phân tích, thông tin xem thêm [4] đến [14].

CHÚ THÍCH Sử dụng các cột pha thông thường, việc tách các tocopherol và tocotrienol cũng là khả thi.

4 Thuốc thử

Sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải phù hợp với loại 1 của TCVN 4861 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác.

4.1 Metanol.

4.2 Etanol nguyên chất, $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 100\%$ thể tích.

4.3 Etanol, $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 96\%$.

4.4 Natri sulfat, khan.

4.5 Dung dịch KOH, để xà phòng hóa, nồng độ khối lượng thích hợp, ví dụ $\rho(\text{KOH}) = 50\text{ g}/100\text{ ml}$ hoặc $\rho(\text{KOH}) = 60\text{ g}/100\text{ ml}$ hoặc các dung dịch cồn, ví dụ: 28 g KOH trong 100 ml hỗn hợp của 9 phần thể tích etanol và 1 phần thể tích nước.

4.6 Chất chống oxy hóa, như axit ascorbic (AA), natri ascorbat, pyrogallol, natri sulfua (Na_2S), hydroquinon hoặc hydroxytoluen đã butylat hóa (BHT).

4.7 Dung môi và các dung môi chiết, như ete dietyl (không chứa peroxit), diclo metan, dầu nhẹ (dải sôi từ 40 °C đến 60 °C), *n*-hexan, etylaxetat hoặc các hỗn hợp thích hợp.

4.8 Pha động của HPLC: Các hỗn hợp thích hợp được biểu thị theo thể tích, ví dụ: 1,4-dioxan 3 % hoặc 2-propanol 0,5 %, metyl tert-butyl ete 3 % trong *n*-hexan hoặc *n*-heptan đối với sắc ký pha thuận (NP) hoặc 1 % đến 10 % nước trong metanol đối với sắc ký pha đảo (RP).

Đối với các hệ thống HPLC thay thế, xem Phụ lục C.

4.9 Chất chuẩn

4.9.1 Yêu cầu chung

β -, γ - và δ -tocopherol được cung cấp bởi Calbiochem¹⁾ còn α -tocopherol được cung cấp từ các nhà cung cấp khác nhau. Độ tinh khiết của các chất chuẩn tocopherol có thể dao động từ 90 % đến 100 %. Do đó, cần phải xác định nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn bằng đo phổ UV (các phép thử về độ tinh khiết, xem 4.10.5).

4.9.2 α -tocopherol $M(C_{29}H_{50}O_2) = 430,7$ g/mol, có độ tinh khiết ít nhất là 95 %.

α -tocopherol axetat $M(C_{31}H_{52}O_3) = 472,7$ g/mol cũng có thể được dùng làm chất chuẩn sau khi xà phòng hóa.

4.9.3 β -tocopherol $M(C_{28}H_{48}O_2) = 416,7$ g/mol, có độ tinh khiết ít nhất là 90 %.

4.9.4 γ -tocopherol $M(C_{28}H_{48}O_2) = 416,7$ g/mol, có độ tinh khiết ít nhất là 90 %.

4.9.5 δ -tocopherol $M(C_{27}H_{46}O_2) = 402,6$ g/mol, có độ tinh khiết ít nhất là 90 %.

4.10 Dung dịch gốc

4.10.1 Dung dịch gốc α -tocopherol

Cân một lượng chất chuẩn α -tocopherol (4.9.2), chính xác đến miligam, ví dụ: khoảng 10 mg và hòa tan trong một thể tích dung môi xác định, ví dụ: 100 ml *n*-hexan đối với hệ thống NP hoặc 100 ml metanol đối với hệ thống RP.

4.10.2 Dung dịch gốc β -tocopherol

Cân một lượng chất chuẩn β -tocopherol (4.9.3), chính xác đến miligam, ví dụ: khoảng 10 mg và hòa tan trong một thể tích dung môi xác định, ví dụ: 100 ml *n*-hexan đối với hệ thống NP hoặc 100 ml metanol đối với hệ thống RP.

4.10.3 Dung dịch gốc γ -tocopherol

Cân một lượng chất chuẩn γ -tocopherol (4.9.4), chính xác đến miligam, ví dụ: khoảng 10 mg và hòa tan trong một thể tích dung môi xác định, ví dụ: 100 ml *n*-hexan đối với hệ thống NP hoặc 100 ml metanol đối với hệ thống RP.

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng còn EN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương đương.

4.10.4 Dung dịch gốc δ -tocopherol

Cân một lượng chất chuẩn δ -tocopherol (4.9.5), chính xác đến miligam, ví dụ: khoảng 10 mg và hòa tan trong một thể tích dung môi xác định, ví dụ: 100 ml *n*-hexan đối với hệ thống NP hoặc 100 ml metanol đối với hệ thống RP.

4.10.5 Phép thử về nồng độ và độ tinh khiết

Đo độ hấp thụ của các dung dịch gốc (4.10.1 đến 4.10.4) ở các bước sóng thích hợp bằng máy đo phổ UV (5.1). Nếu sử dụng dung môi *n*-hexan thì dùng pipet lấy 10 ml dung dịch gốc cho vào bình đáy tròn bằng thủy tinh hồ phách và loại bỏ dung môi trên máy cô quay (5.2) dưới áp suất giảm ở nhiệt độ không quá 50 °C. Sau khi hồi lại áp suất khí quyển bằng nitơ, lấy bình ra và hòa tan lượng cặn trong 10 ml metanol bằng cách xoay bình. Lấy dung dịch này để đo phổ.

Tính nồng độ khối lượng của vitamin E, ρ của các α -, β -, γ - và δ -tocopherol tương ứng, bằng microgam trên mililit theo Công thức (1):

$$\rho = \frac{A.M.1000}{\varepsilon} \quad (1)$$

Trong đó:

A là giá trị độ hấp thụ của từng tocopherol trong dung dịch gốc tương ứng trong metanol;

ε là hệ số hấp thụ phân tử trong metanol tính bằng $l \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ở bước sóng xác định nêu trong Bảng 1;

M là khối lượng phân tử của từng tocopherol nêu trong Bảng 1, tính bằng gam trên mol (g/mol).

Bảng 1 – Các ví dụ về giá trị $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ và tính ε

Chất	Bước sóng (metanol)	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	Khối lượng phân tử (g.mol ⁻¹)	ε (l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	Tài liệu tham khảo
α -tocopherol	292 nm	76	430,7	3273,3	[12], [13], [15]
β -tocopherol	296 nm	89	416,7	3708,6	[12], [13], [15]
γ -tocopherol	298 nm	91	416,7	3782	[12], [13], [15]
δ -tocopherol	298 nm	87	402,6	3502,6	[12], [13], [15]

Ngoài giá trị α -tocopherol thu được ở bước sóng 292 nm, thì cần đo độ hấp thụ ở bước sóng 255 nm (nhỏ nhất). Tỷ lệ ở bước sóng này không được vượt quá $E_{255}/E_{292} = 0,18$. Nếu không, các chất này sẽ bị phân hủy (xem thêm thông tin [15]).

4.11 Dung dịch chuẩn

4.11.1 Dung dịch chuẩn α -tocopherol

Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch gốc α -tocopherol (4.10.1) cho vào bình định mức một vạch 100 ml và pha loãng đến vạch bằng dung môi thích hợp (ví dụ: *n*-hexan cho NP và metanol cho RP). Dung dịch chuẩn cần có nồng độ khối lượng từ 1 $\mu\text{g/ml}$ đến 10 $\mu\text{g/ml}$ α -tocopherol. Nếu sử dụng detector UV để kiểm soát sắc ký thì cần sử dụng dung dịch có nồng độ cao hơn.

Dung dịch chuẩn phải được bảo quản tránh ánh sáng, để ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C và cần được kiểm tra như mô tả trong 4.10.5.

4.11.2 Dung dịch chuẩn của hỗn hợp α -, β -, γ -, δ -tocopherol

Dùng pipet lấy từng dung dịch gốc (4.10), ví dụ 10 ml, cho vào bình định mức một vạch 100 ml và pha loãng đến vạch bằng dung môi thích hợp (ví dụ: *n*-hexan cho NP và metanol cho RP). Dung dịch chuẩn cần có nồng độ khối lượng từ 1 $\mu\text{g/ml}$ đến 10 $\mu\text{g/ml}$ đối với mỗi dạng tocopherol.

Dung dịch chuẩn phải được bảo quản tránh ánh sáng, để ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C và cần được kiểm tra như mô tả trong 4.10.5.

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, có thể đo độ hấp thụ ở các bước sóng xác định, có các cuvet thích hợp, ví dụ: chiều dài đường quang 1 cm.

5.2 Bộ cơ quay, có nôi cách thủy và bộ phận chân không.

Nên sử dụng nitơ để tạo chân không.

5.3 Hệ thống HPLC

Hệ thống HPLC gồm có bơm, bộ phận bơm mẫu, detector huỳnh quang có bước sóng kích thích 295 nm, bước sóng phát xạ 330 nm và hệ thống đánh giá như máy tích phân.

Có thể sử dụng detector UV. Bước sóng được cài đặt ở 292 nm và trong trường hợp này, dung dịch mẫu và dung dịch chuẩn cần phải đậm đặc hơn. Ngoài ra, khả năng phát hiện các hợp chất gây nhiễu sẽ tăng.

5.4 Cột HPLC

Cột phân tích pha thuận, ví dụ: đường kính từ 4,0 mm đến 4,6 mm, dài từ 100 mm đến 250 mm, được nhồi silica cỡ hạt 5 μm . Có thể sử dụng cỡ hạt và kích thước cột khác với qui định trong tiêu chuẩn này.

TCVN 8276:2018

Các thông số tách cần phải phù hợp với vật liệu để đảm bảo cho kết quả tương đương. Các tiêu chí về hiệu năng đối với các cột phân tích thích hợp là độ phân giải đường nền của chất phân tích có liên quan.

Các vật liệu nhồi cột silica thích hợp có sẵn từ hãng Lichrosorb® 60²⁾ Spherisorb® Si²⁾, Hypersil® Si²⁾ và Lichrospher® 100 DIOL²⁾.

Có thể sử dụng các cột pha đảo phân tích, ví dụ: C₁₈, có cỡ hạt 5 µm, đường kính 4,0 mm đến 4,6 mm, dài 100 mm đến 250 mm. Các vật liệu nhồi cột pha đảo phân tích thích hợp là Spherisorb® ODS²⁾ và Hypersil® ODS²⁾. Phần lớn các cột RP không tách được β-tocopherol và γ-tocopherol. Tuy nhiên, các cột này có thể được sử dụng để định lượng α-, δ-tocopherol và có thể cho các giá trị tổng của β- + γ-tocopherol.

5.5 Bộ lọc

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

CHÚ THÍCH Lọc pha động cũng như lọc dung dịch mẫu thử qua màng lọc trước khi sử dụng hoặc bơm thường sẽ kéo dài thời gian sử dụng của cột.

5.6 Bộ lọc tách pha (tùy chọn).

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu

Đồng hóa mẫu thử. Nghiền mẫu bằng dụng cụ thích hợp và trộn lại.

6.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

6.2.1 Biện pháp phòng ngừa

Điều quan trọng là các dung dịch mẫu thử cần được bảo vệ tránh ánh sáng trước khi phân tích.

6.2.2 Các mẫu dầu và mỡ có hàm lượng nước thấp có chứa các tocopherol chưa este hóa

6.2.2.1 Dầu và mỡ có hàm lượng nước thấp

Quy trình này chỉ có thể áp dụng cho các mẫu có chứa các tocopherol chưa este hóa. Nếu không, tiến hành theo 6.2.3.

²⁾ Lichrosorb® Si 60, Spherisorb® Si, Hypersil® Si, Lichrospher® 100 DIOL, Spherisorb® ODS và Hypersil® ODS là các ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn còn EN không ấn định phải sử dụng chúng.

Cân 2 g mẫu thử, chính xác đến 1 mg, cho vào bình định mức một vạch 25 ml. Thêm *n*-hexan hoặc dung môi thích hợp khác (4.7) và hòa tan phần mẫu thử bằng cách xoay bình. Siêu âm dung dịch để hỗ trợ cho việc hòa tan. Pha loãng bằng cùng loại dung môi đến vạch. Dung dịch mẫu thử này chỉ được sử dụng cho các hệ thống pha thường.

Có thể pha loãng dung dịch này trước khi đo sắc ký hoặc sử dụng một lượng mẫu nhỏ hơn.

6.2.2.2 Margarin và bơ

Cần tách chất béo của margarin và của bơ trước khi pha loãng mẫu. Có thể thực hiện bằng cách, ví dụ: trộn mẫu với natri sulfat khan (4.4), thêm *n*-hexan (4.7) và xử lý hỗn hợp trong thiết bị siêu âm. Lấy ra chất rắn và rửa ít nhất hai lần bằng *n*-hexan. Loại bỏ dung môi bằng bộ cô quay (5.2) và áp suất giảm, hòa tan cặn bằng một thể tích xác định *n*-hexan và định lượng bằng HPLC pha thường.

6.2.3 Các loại mẫu khác

6.2.3.1 Xà phòng hóa

Xà phòng hóa từ 2 g đến 10 g mẫu thử bằng hồi lưu tốt nhất là dưới dòng nitơ sử dụng các lượng thích hợp etanol (4.3) hoặc metanol (4.1), nước và chất chống oxi hóa như axit ascorbic, hydroquinon, pyrogallol hoặc BHT (4.6) và dung dịch kali hydroxit (4.5). Thêm cồn và các chất chống oxi hóa vào mẫu trước khi bổ sung kali hydroxit.

Các ví dụ về tỷ lệ thuốc thử thích hợp được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2 – Tỷ lệ thuốc thử thích hợp

Khối lượng mẫu	Cồn	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 đến 20 g	150 ml etanol	1,0 g AA	50 ml dung dịch 60 g/100 ml

Thời gian xà phòng hóa thường trong khoảng từ 15 min đến 40 min ở nhiệt độ từ 80 °C đến 100 °C. Nếu sau khi xà phòng hóa và làm nguội, có dầu hoặc mỡ trên bề mặt của hỗn hợp xà phòng hóa thì cần thêm một lượng dư dung dịch kali hydroxit (4.5) và thời gian xà phòng hóa phải kéo dài.

6.2.3.2 Chiết

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

Chiết các tocopherol bằng dung môi thích hợp (4.7). Nếu *n*-hexan được dùng làm dung môi để chiết γ -tocopherol và δ -tocopherol, thì cần bổ sung một lượng nhất định dung môi phân cực hơn để có được

TCVN 8276:2018

độ thu hồi tốt nhất. Sử dụng hỗn hợp, ví dụ như dầu nhẹ và ete dietyl 20 % để chiết được hết các hợp chất này. Kiểm tra độ thu hồi để nhận biết khả năng thất thoát (thông tin thêm xem [16], [17]).

Lặp lại qui trình chiết 3 lần đến 4 lần với các thể tích từ 50 ml đến 150 ml. Rửa các phần chiết thu được bằng nước (từ 2 lần đến 4 lần dùng 50 đến 150 ml) đến trung tính.

Việc chiết có thể được thực hiện bằng kỹ thuật lỏng/lỏng có hỗ trợ pha rắn (ví dụ: Extrelut^{®3)}) khi hàm lượng vitamin E không quá thấp [thông tin thêm xem [18], [22]].

6.2.3.3 Làm bay hơi

Làm bay hơi dịch chiết bằng bộ cổ quay (5.2). Loại bỏ hết nước bằng cách làm khô với natri sulfat (4.4) hoặc được chưng cất đẳng phí với etanol (4.2) hoặc toluen. Có thể sử dụng các kỹ thuật tương đương khác như giấy lọc tách pha để loại bỏ các vết nước, với điều kiện đã được chứng minh là không ảnh hưởng đến kết quả.

6.2.3.4 Pha loãng

Hòa tan lại cặn bằng pha động (4.8) hoặc dung môi HPLC tương đương khác đến nồng độ cuối cùng đối với từng tocopherol từ 1 µg/ml đến 10 µg/ml.

6.3 Nhận biết

Nhận biết các tocopherol bằng cách so sánh thời gian lưu của pic riêng rẽ trong sắc ký đồ thu được với dung dịch mẫu thử và với dung dịch chuẩn. Việc nhận biết pic có thể được thực hiện bằng cách thêm lượng nhỏ các dung dịch chuẩn thích hợp vào dung dịch mẫu thử.

CHÚ THÍCH Việc tách và định lượng được cho thấy là thỏa đáng nếu tuân theo các điều kiện thí nghiệm sau đây (xem thêm Hình A.1 và A.2). Đối với các hệ thống HPLC thay thế, xem Bảng C.1.

Pha tĩnh: Lichrosorb[®] Si 60, 5 µm;

Kích thước cột: 125 mm x 4 mm;

Pha động: Một phần thể tích của 1,4-dioxan 3 % trong *n*-hexan;

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min;

Thể tích bơm: 10 µl đến 100 µl;

Detector: huỳnh quang; bước sóng kích thích: 295 nm; bước sóng phát xạ: 330 nm.

³⁾ Extrelut[®] là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

6.4 Xác định

Bơm các thể tích thích hợp (lên đến 100 μl) của dung dịch chuẩn cũng như dung dịch mẫu thử vào hệ thống HPLC. Tiến hành định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn, tích phân các điện tích hoặc xác định chiều cao pic và so sánh các kết quả với các giá trị tương ứng đối với chất chuẩn.

Bơm các thể tích bằng nhau của dung dịch mẫu và của dung dịch chuẩn hoặc bù bằng hệ số tương ứng trong phần tính toán kết quả (xem Điều 7). Kiểm tra độ tuyến tính của hàm hiệu chuẩn.

7 Tính kết quả

Việc tính toán dựa vào đường chuẩn hoặc sử dụng các chương trình tương ứng của bộ tích phân hoặc theo công thức đã được giản lược sau đây. Tính nồng độ khối lượng, w , của α -, β -, γ hoặc δ -tocopherol bằng mg/100 g mẫu thử sử dụng Công thức (2):

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

Trong đó:

A_s là diện tích pic hoặc chiều cao pic của α -, β -, γ hoặc δ -tocopherol thu được trong dung dịch mẫu thử;

A_{ST} là diện tích pic hoặc chiều cao pic của α -, β -, γ hoặc δ -tocopherol thu được trong dung dịch chuẩn;

V là tổng thể tích dung dịch mẫu thử (xem 6.2.2 đến 6.2.3), tính bằng millilit (ml);

ρ là nồng độ của α -, β -, γ hoặc δ -tocopherol trong dung dịch chuẩn (xem 4.11.1 và 4.11.2), được hiệu chỉnh độ tinh khiết (xem 4.10.5), tính bằng microgam trên millilit ($\mu\text{g/ml}$);

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

V_{ST} là thể tích bơm của dung dịch chuẩn, tính bằng microlit (μl);

V_s là thể tích bơm của dung dịch mẫu thử, tính bằng microlit (μl);

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

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

Báo cáo kết quả về α -, β -, γ hoặc δ -tocopherol theo mg/100 g. Đối với hoạt tính vitamin E, xem phần giới thiệu và [1], [2], [3].

8 Độ chụm

8.1 Yêu cầu chung

Dữ liệu về độ chụm của các phương pháp HPLC khác nhau để xác định α -tocopherol được thiết lập năm 1994 bằng nghiên cứu so sánh quốc tế [xem 18] do Chương trình thử nghiệm và Đo chuẩn của Ủy ban Châu Âu thực hiện trên mẫu margarin (Chất chuẩn đã được chứng nhận CRM 122 và sữa bột CRM 421) và đưa ra các thông tin thống kê như trong Phụ lục B. Các dữ liệu thu được từ các nghiên cứu so sánh này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và các chất nền mẫu khác với các giá trị nêu trong Phụ lục B.

Dữ liệu về độ chụm đối với sữa bột và bột yến mạch đã được thiết lập trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm theo ISO 5725:1986, xem [19], do Viện Max von Pettenkofer của Ủy ban Y tế Liên bang (nay là Viện Bảo vệ Sức khỏe Người tiêu dùng và Thú y), Cục Hóa thực phẩm, Berlin, Đức, xem [20] thực hiện. Các dữ liệu thu được từ các nghiên cứu liên phòng này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và các chất nền mẫu khác với các giá trị nêu trong Phụ lục B.

8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người phân tích, sử dụng cùng một thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r . Độ lặp lại phụ thuộc vào nồng độ của chất phân tích có trong mẫu.

Các giá trị đó là:

margarin	α -tocopherol	$\bar{x} = 24,09 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 2,765 \text{ mg}/100 \text{ g}$
sữa bột	α -tocopherol	$\bar{x} = 9,89 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 1,130 \text{ mg}/100 \text{ g}$
sữa bột	α -tocopherol	$\bar{x} = 10,2 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,853 \text{ mg}/100 \text{ g}$
	β -tocopherol	$\bar{x} = 0,081 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,025 \text{ mg}/100 \text{ g}$
	γ -tocopherol	$\bar{x} = 1,989 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,311 \text{ mg}/100 \text{ g}$
	δ -tocopherol	$\bar{x} = 0,280 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,082 \text{ mg}/100 \text{ g}$
bột yến mạch	α -tocopherol	$\bar{x} = 0,279 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,071 \text{ mg}/100 \text{ g}$
	β -tocopherol	$\bar{x} = 0,057 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,017 \text{ mg}/100 \text{ g}$

8.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, thực hiện trong hai phòng thử nghiệm khác nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R .

Các giá trị đó là:

margarin	α -tocopherol	$\bar{x} = 24,09 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 4,18 \text{ mg}/100 \text{ g}$
sữa bột	α -tocopherol	$\bar{x} = 9,89 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 1,96 \text{ mg}/100 \text{ g}$
sữa bột	α -tocopherol	$\bar{x} = 10,2 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 3,705 \text{ mg}/100 \text{ g}$
	β -tocopherol	$\bar{x} = 0,081 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,046 \text{ mg}/100 \text{ g}$
	γ -tocopherol	$\bar{x} = 1,989 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,978 \text{ mg}/100 \text{ g}$
	δ -tocopherol	$\bar{x} = 0,280 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,134 \text{ mg}/100 \text{ g}$
bột yến mạch	α -tocopherol	$\bar{x} = 0,279 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,133 \text{ mg}/100 \text{ g}$
	β -tocopherol	$\bar{x} = 0,057 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,030 \text{ mg}/100 \text{ g}$

9 Báo cáo thử nghiệm

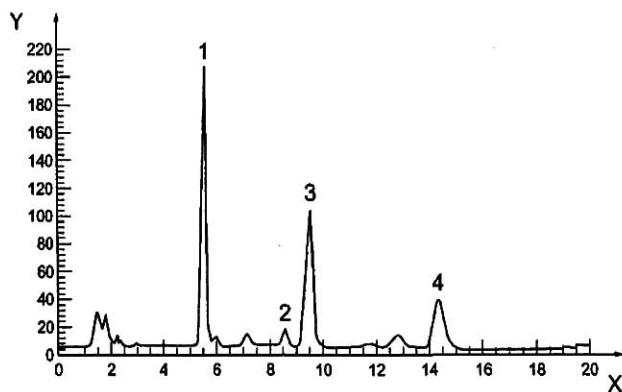
Báo cáo thử nghiệm nên phù hợp với TCVN/ISO/IEC 17025 và ít nhất bao gồm các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết cho việc nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp đã sử dụng;
- ngày lấy mẫu và qui trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- kết quả và đơn vị đo mà kết quả biểu thị;
- bất kỳ điểm đặc biệt nào quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Ví dụ về sắc ký đồ của HPLC



CHÚ DẪN

Y huỳnh quang

X thời gian (min)

1 α -tocopherol2 β -tocopherol3 γ -tocopherol4 δ -tocopherolPha tĩnh: Lichrosorb® SI 60, 5 μ m

Kích thước cột: 125 mm x 4 mm

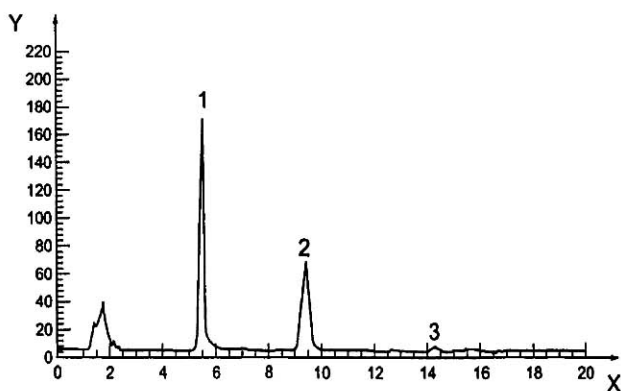
Pha động: Một phần thể tích của 1,4-dioxan 3 % trong *n*-hexan;

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min;

Thể tích bơm: 20 μ l;

Detector: huỳnh quang; bước sóng kích thích: 295 nm và bước sóng phát xạ: 330 nm

Hình A.1 – Ví dụ về tách α -, β -, γ hoặc δ -tocopherol từ mẫu margarin (CRM 122) bằng HPLC



CHỮ DẪN

Y huỳnh quang

X thời gian (min)

1 α -tocopherol

2 γ -tocopherol

3 δ -tocopherol

Pha tĩnh: Lichrosorb® Si 60, 5 μ m

Kích thước cột: 125 mm x 4 mm

Pha động: Một phần thể tích của 1,4-dioxan 3 % trong *n*-hexan;

Tốc độ dòng: 1,0 ml/min;

Thể tích bơm: 20 μ l;

Detector: huỳnh quang; bước sóng kích thích: 295 nm và bước sóng phát xạ: 330 nm

Hình A.2 – Ví dụ về tách α -, β -, γ - hoặc δ -tocopherol từ mẫu sữa bột (CRM 421) bằng HPLC

Phụ lục B

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Dữ liệu trong Bảng B.1 của các phương pháp khác nhau để xác định vitamin E (α -tocopherol) đã xác định được trong nghiên cứu so sánh quốc tế do Chương trình thử nghiệm, Đo lường và Tiêu chuẩn của Ủy ban châu Âu tổ chức, xem [18]. Dữ liệu trong Bảng B.2 và Bảng B.3 được xác định trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm theo ISO 5725:1986¹ [19], do Viện Max von Pettenkofer của Ủy ban Y tế Liên bang (nay là Viện Bảo vệ Sức khỏe Người tiêu dùng và Thú y), Cục Hóa thực phẩm, Berlin, Đức [20] thực hiện.

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm đối với margarin và sữa bột

Mẫu	CRM 122 Margarin	CRM 421 Sữa bột
Chất phân tích	α -tocopherol	α -tocopherol
Năm thực hiện phép thử liên phòng	1994	1994
Số lượng phòng thử nghiệm	9	10
Số lượng mẫu	1	1
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	9	10
Số lượng ngoại lệ	0	0
Số lượng bộ dữ liệu	9	10
Số lượng phép đo lặp lại	45	50
Giá trị trung bình, \bar{x} , mg/100 g	24,09	9,89
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , mg/100 g	0,977	0,399
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD _r , %	4,1	4,0
Giá trị độ lặp lại, r ($r = 2,83 \times s_r$), mg/100 g	2,765	1,130
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , mg/100 g	1,477	0,693
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD _R , %	6,1	7,0
Giá trị độ tái lập, R ($R = 2,83 \times s_R$), mg/100 g	4,180	1,960
Giá trị HorRat, theo [21]	0,87	0,87

CHÚ THÍCH: Dữ liệu thu được từ nghiên cứu so sánh quốc tế này thu được sử dụng các phương pháp giống nhau trong các qui trình phân tích thống dụng của các phòng thử nghiệm tham gia với các hệ thống HPLC như trong Phụ lục C.

Bảng B.2 – Dữ liệu về độ chụm đối với sữa bột

Chất phân tích	α -tocopherol	β -tocopherol	γ -tocopherol	δ -tocopherol
Năm thực hiện phép thử liên phòng	1993	1993	1993	1993
Số lượng phòng thử nghiệm	13	12	13	10
Số lượng mẫu	5	5	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	9	11	8
Số lượng ngoại lệ	1	3	2	2
Số lượng kết quả được chấp nhận	66	51	65	40
Giá trị trung bình, \bar{x} , mg/100 g	10,2	0,081	1,989	0,280
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , mg/100 g	0,301	0,009	0,110	0,029
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r , %	3,0	11,1	5,5	10,4
Giá trị độ lặp lại, r ($r = 2,83 \times s_r$), mg/100 g	0,853	0,025	0,311	0,082
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , mg/100 g	1,31	0,016	0,346	0,047
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R , %	12,8	19,8	17,4	16,8
Giá trị độ tái lập, R ($R = 2,83 \times s_R$), mg/100 g	3,705	0,046	0,978	0,134
Giá trị HorRat, theo [21]	1,1	1,2	1,7	1,2

⁷ ISO 5725:1986 hiện nay đã hủy.

Bảng B.3 – Dữ liệu về độ chụm đối với bột yến mạch

Chất phân tích	α -tocopherol	β -tocopherol
Năm thực hiện phép thử liên phòng	1993	1993
Số lượng phòng thử nghiệm	13	13
Số lượng mẫu	5	5
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	11
Số lượng ngoại lệ	1	2
Số lượng kết quả được chấp nhận	70	64
Giá trị trung bình, \bar{x} , mg/100 g	0,279	0,057
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , mg/100 g	0,025	0,006
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD _r , %	9,0	10,5
Giá trị độ lặp lại, r ($r = 2,83 \times s_r$), mg/100 g	0,071	0,016
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , mg/100 g	0,047	0,011
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD _R , %	16,8	19,3
Giá trị độ tái lập, R ($R = 2,83 \times s_R$), mg/100 g	0,133	0,030
Giá trị HoRat, theo [21]	1,2	1,1

Phụ lục C

(Tham khảo)

Hệ thống HPLC thay thế

Việc tách và định lượng đã được chứng minh là phù hợp khi áp dụng các điều kiện sắc ký sau đây [18].

Bảng C.1 – Điều kiện HPLC thay thế

Pha tĩnh ^a	Kích thước cột (mm x mm)	Pha động (Phần thể tích)	Tốc độ (ml/min)	Phát hiện (nm)
Knauer polygosi [®] 60-5	250 x 4,6	<i>n</i> -hexan + <i>di</i> -isopropyl ete (80 + 20)	1,5	F: Ex: 296 Em: 320
Si 60	250 x 4,6	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (98 + 2)	1,5	F: Ex: 284 Em: 330
Silica, 5 µm	100 x 8	<i>iso</i> -octane + <i>di</i> -isopropyl ete (với 0,15 % propanol) (97,5 + 2,5)	2,0	F: Ex: 295 Em: 330
Lichrospher [®] Si 100,5 µm	250 x 4	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (99,85 + 0,15)	2,5	F: Ex: 290 Em: 330
Lichrosorb [®] Si 60,5 µm	250 x 4,6	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (99,3 + 0,7)	1,2	F: Ex: 290 Em: 330
Lichrosorb [®] Si 60, 5 µm	250 x 4	<i>n</i> -hexan + dioxan (97 + 3)	1,0	F: Ex: 293 Em: 326
Lichrosorb [®] Si 60,5 µm	250 x 4	Gradient: 1 % 2-propanol trong <i>n</i> -heptan trong 7 min đến 1,5 % 2-propanol trong <i>n</i> -heptan	1,0	F: Ex: 290 Em: 327
Amino, 3 µm	100 x 4,6	<i>iso</i> -octan + <i>iso</i> -butanol (98 + 2)	1,5	F: Ex: 290 Em: 330
Nucleosil C ₁₈ , 5 µm	250 x 4	metanol + nước (97 + 3)	2,0	UV: 292
RP-8, 10 µm	250 x 4,6	acetonitril + metanol + nước (50 + 45 + 5)	2,0	F: Ex: 293 Em: 326 UV: 290

^a Nhãn hiệu của các sản phẩm được liệt kê là ví dụ về các sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó.

F = đo huỳnh quang
UV = Tử ngoại
RP = Pha đảo
Ex = Bước sóng kích thích
Em = Bước sóng phát xạ

CHÚ THÍCH Các cột pha đảo Nucleosil C₁₈ và RP-8 đã được sử dụng trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm của α -tocopherol của margarin và sữa bột (xem Bảng B.1).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Institute of Medicine, Nat. Acad. Press, Washington, 2000
- [2] Deutsche gesellschaft für Ernährung (DGE): Referenzwerte für Nährstoffzufuhr; 5. Überarbeitung 1991
- [3] Brubacher, g. and Wiss, O. (1972), Vitamin E active compounds, synergists and antagonists in: Sebrell, W.H. Jr. and Harris eds The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology, Methods 2nd edn Vol 5, Academic Press, New York, 255 - 258
- [4] DAB 10 (1991), Deutsches Arzneibuch 10. Ausgabe 1991, Stand 1997; T 5.6/0692 int-rac-cr-Tocopherolum Comment to Ph. Eur. 5.6. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart
- [5] Brubacher, g. et al., (1985). Methods for the Determination of Vitamins in Food, Elsevier App. Science Publishers, London, 97-106
- [6] GERTZ C., KERRMAN K. Zur Analytik der Tocopherole und Tocotrienole in Lebensmitteln. Z. Lebensmittelunters. Forsch. 1982, 174 pp. 390-394
- [7] NOBILE S., MOOR H. Analysenmethode zur Bestimmung von Vitamin E in Lebensmitteln und Futtermitteln. Mitt. Lebensmittel Unters. Hyg. 1953, 44 p. 396
- [8] Determination of Tocopherols in fats and oils. L-13.03/04. September 1987 in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/Bundesgesundheitsamt (In: Collection of official methods under article 64 of the german Federal Foods and Feeds Act, Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office), Loseblattausgabe September 1998, Bd. 1 (Loose leaf edition as of 1998-09, Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag gmbH
- [9] BALZ M., SCHULTE E., THIER H.P. Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen durch HPLC. Fat.Sei. Technol. 1992, 6 pp. 209-213
- [10] SPEEK A.J., SCHRIJVER J., SCHREURS W.H.P. Vitamin E composition of some seed oils as determined by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. J. Food Sei. 1985, 50 pp. 121—124
- [11] MANZ U., PHILLIP K. A method for the routine determination of tocopherols in animal feed and human foodstuffs. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 1981, 51 pp. 342-348
- [12] Pocklington, W.D. and Diefenbacher, A. (1988). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography: results of a collaborative study and the standardised method
- [13] BOURGEOIS C. Determination of Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols, Elsevier App. Science Publishers, London, 1992

- [14] LUMLEY I.D. (1993), Vitamin analysis in food in: *The Technology of Vitamins in Food*, ed. by P.B. Ottaway, Blacie Academic & Professional, glasgow, 186-190
- [15] BALZ M., SCHULTE E., THIER H.P. A new parameter for checking the suitability of tocopherol standards. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1996, 202 pp. 80-81
- [16] VDLUFA-Methodenbuch: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln (The chemical analysis of animal feeding stuffs), Band III (Vol III), Bestimmung der Tocopherole, HPLC-Verfahren (Determinatio of Tocopherols HPLC-method) 4. Erg (4th Add), Kapitel 13.5.5 (Chapter 13.5.5), VDLUFA-Verlag, Darmstadt
- [17] KONINGS E.J.M., ROOMANS H.H.S., BELJAARS P.R. Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Margarine. *Infant Foods and Vegetables, JAOAC.* 1996, 79 (4) pp. 902-906
- [18] FINGLAS P.M., VAN DEN BERG H., DE FROIDMONT-GORTZ I. The certification of the mass fractions of vitamins in three reference materials: margarine (CRM 122), milk powder (CRM 421), and lyophilized Brussels sprouts (CRM 431). EUR-Report 18039. Commission of the European Union, Luxembourg, 1997
- [19] ISO 5725:1986, Precision of test methods — Determination of repeatability and reproducibility fora standard test method by inter-laboratory tests
- [20] Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Tocopherolen und Tocotrienolen in diätetischen Lebensmitteln L 49.00-5 September 1998 (Food analysis - Determination of tocopherols and tocotrienols in dietetic foodstuffs L 49.00-5 September 1998) in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/Bundesgesundheitsamt (In: Collection of official methods under article 64 of the german Federal Foods and Feed Act, Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office), Loseblattausgabe September 1998, Bd. 1 (Loose leaf edition as of 1998-09, Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag gmbH
- [21] HORWITZ W., ALBERT R., The Horwitz Ratio. (HorRat): A useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *J. AOAC Int.* 2006, 89 pp. 1095-1109
- [22] Bourgeois, C.F. and Ciba, N., 1988. Disposal cartridge extraction of retinol and alpha-tocopherol from fatty samples. *J.A.O.A.C.* 71 (1), 12-15
- [23] TCVN ISO/IEC 17025:2007 (ISO/IEC 17025:2005), *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*