

Lời nói đầu

TCVN 8276 : 2010 hoàn toàn tương đương với EN 12822 : 2000;

TCVN 8276 : 2010 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 E bằng sắc kí 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 -tocopherols

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.

Hoạt tính của vitamin E có thể tính được từ hàm lượng tocopherol chấp nhận các hệ số thích hợp nêu trong phần giới thiệu.

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.*

TCVN 2625 (ISO 5555), *Dầu mỡ động vật và thực vật – Lấy mẫu.*

3 Nguyên tắc

α -, β -, γ và δ -tocopherol trong dung dịch mẫu thích hợp được xác định bằng HPLC để tách sau đó phát hiện bằng đo quang (dải UV) hoặc tốt nhất là huỳnh quang. Trong phần lớn các trường hợp, mẫu thử cần được xà phòng hóa, sau đó được chiết tách bằng phương pháp thích hợp. Việc nhận biết được dựa vào thời gian lưu và được định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn sử dụng các diện tích pic

hoặc chiều cao pic. Các phương pháp nội chuẩn có thể được sử dụng nếu các phép thử độ thu hồi cho thấy có cùng tính năng của chất nội chuẩn trong quá trình phân tích như chất phân tích ([4] đến [13]).

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).

4.1 Metanol.

4.2 Etanol tuyệt đối, $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 100\%$ 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 thích hợp, ví dụ (KOH) = 50 g/100 ml hoặc 60 g/100 ml hoặc các dung dịch còn, ví dụ: 28 g KOH trong 100 ml hỗn hợp etanol/nước (9 + 1) (phần thể tích).

4.6 Chất chống oxi 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 (đãi 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 có thể có được từ Merck¹⁾ còn α -tocopherol có thể có được 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 (xem các phép thử về độ tinh khiết [4.10.5]).

4.9.2 α -tocopherol $M(\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2) = 430,7$ g/mol, biết trước khối lượng ít nhất là 95 %, α -tocopheryl axetat $M(\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3) = 472,7$ g/mol cũng có thể được dùng làm chất chuẩn sau khi xà phòng hóa.

¹⁾ Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, CEN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

4.9.3 β -tocopherol $M(C_{28}H_{48}O_2) = 416,7$ g/mol, biết trước phần khối lượng ít nhất là 90 %.

4.9.4 γ -tocopherol $M(C_{28}H_{48}O_2) = 416,7$ g/mol, biết trước phần khối lượng ít nhất là 90 %.

4.9.5 δ -tocopherol $M(C_{27}H_{46}O_2) = 402,6$ g/mol, biết trước phần khối lượng ít nhất là 90 %.

4.10 Dung dịch gốc

4.10.1 Dung dịch gốc α -tocopherol

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

4.10.2 Dung dịch gốc β -tocopherol

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

4.10.3 Dung dịch gốc γ -tocopherol

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

4.10.4 Dung dịch gốc δ -tocopherol

Hòa tan một lượng chất chuẩn δ -tocopherol (4.9.5), được cân chính xác đến miligam, ví dụ khoảng 10 mg trong một thể tích xác định, ví dụ 100 ml dung môi thích hợp, ví dụ *n*-hexan đối với hệ thống NP hoặc 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 nâu 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, thì lấy bình ra và hòa tan lượng cặn trong 10 ml metanol bằng cách lắc bình. Lấy dung dịch này để đo phổ.

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

$$\rho = \frac{A \times 10^4}{E_{1cm}^{1\%}} \quad (1)$$

Trong đó:

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

$E_{1cm}^{1\%}$ là giá trị của từng tocopherol được xác định theo Bảng 1.

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

Chất	Bước sóng (metanol)	$E_{1cm}^{1\%}$	Tài liệu tham khảo
α -tocopherol	292 nm	76	[11]
β -tocopherol	296 nm	89	[11]
γ -tocopherol	298 nm	91	[11]
δ -tocopherol	298 nm	87	[11]

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). Giá trị $E_{1cm}^{1\%}$ đo được ở bước sóng này cần nằm trong dải từ 6 đến 8 nếu không đạt nghĩa là đã bị biến chất ([14], [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 1 μ g/ml đến 10 μ g/ml α -tocopherol. Nếu sử dụng detector UV để kiểm soát sắc ký thì cần sử dụng dung dịch đậm đặc hơn.

Dung dịch chuẩn phải được bảo quản tránh ánh sáng và để ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C và cần được kiểm tra định kỳ.

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 từ 1 μ g/ml đến 10 μ g/ml đối với mỗi dạng tocopherol.

Dung dịch chuẩn phải được bảo quản tránh ánh sáng và để ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C và cần được kiểm tra ngay trước khi sử dụng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy đo phổ UV, có thể đo độ hấp thụ ở các bước sóng xác định, có các cuvet thích hợp, ví dụ: 1 cm.

5.2 Bộ cô quay, bằng nồi cách thủy và bộ phận khử chân không.

CHÚ THÍCH Khuyến cáo sử dụng nitơ để tạo chân không.

5.3 Hệ thống HPLC, gồm có bơm, bộ phận bơm mẫu, detector huỳnh quang có bước sóng kích thích 295 nm và 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 và dài từ 100 mm đến 250 mm, được nhồi đầy silica cỡ hạt 5 μm .

Có thể sử dụng cỡ hạt và kích thước cột khác với qui định trong tiêu chuẩn này. 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 - và δ -tocopherol.

5.5 Thiết bị lọc

Các thiết bị 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.

²⁾ Lichrosorb® 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 CEN không ấn định phải sử dụng chúng.

5.6 Bộ lọc tách pha (tùy chọn).

6 Lấy mẫu

Tiến hành lấy mẫu theo TCVN 2625 (ISO 5555), nếu thích hợp.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu

Đồng hóa mẫu thử. Nghiền mẫu bằng dụng cụ thích hợp và trộn lại. Cần thực hiện các biện pháp như làm lạnh sơ bộ để tránh mẫu bị tiếp xúc với nhiệt độ cao trong thời gian dài.

7.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

CHÚ THÍCH Cần bảo quản các dung dịch mẫu thử tránh ánh sáng trước khi phân tích.

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

7.2.1.1 Dầu và mỡ (có hàm lượng nước thấp)

Qui trình này chỉ có thể áp dụng cho các mẫu có chứa các tocopherol chưa este hóa. Nếu không, tiến hành theo 7.2.2.

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 có thể hỗ trợ cho việc hòa tan. Thêm cùng loại dung môi đến vạch. Dung dịch mẫu thử này chỉ được sử dụng cho các hệ thống NP.

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

7.2.1.2 Margarin, bơ

Cần phải 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. Lọc bỏ 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 trong một thể tích xác định của *n*-hexan và định lượng bằng HPLC pha chuẩn.

7.2.2 Các loại mẫu khác

7.2.2.1 Xà phòng hóa

Xà phòng hóa từ 2 g đến 10 g mẫu thử bằng hồi lưu 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 (4.5.1). Thêm cồn và các chất chống oxi hóa vào mẫu trước khi bổ sung dung dịch kali hydroxit.

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

Bảng 2

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	150 ml etanol	1,0 g AA	50 ml dung dịch 60 g/100 ml

Thời gian xà phòng hóa 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, mà dầu hoặc mỡ có trên bề mặt của hỗn hợp xà phòng hóa thì cần phải thêm một lượng dư dung dịch kali hydroxit và thời gian xà phòng hóa phải kéo dài.

7.2.2.2 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 của dung môi phân cực hơn để tránh thu được độ thu hồi không thỏa đáng. Sử dụng hỗn hợp, ví dụ như dầu nhẹ và ete dietyl 20 % để tách được hết các hợp chất này. Kiểm tra độ thu hồi để nhận biết khả năng thoát [16], [17].

Lặp lại qui trình chiết khoảng 3 đến 4 lần với các thể tích từ 50 ml đến 150 ml. Rửa các phần chiết thu được bằng nước (từ 2 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 [18].

7.2.2.3 Làm bay hơi

Làm bay hơi dịch chiết bằng bộ cô quay (5.2). Loại bỏ hết nước bằng cách làm khô trên natri sulfat hoặc được chưng cất đẳng phí với etanol tuyệt đối (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.

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 còn CEN không ấn định phải sử dụng chúng.

7.2.2.4 Pha loãng

Hòa tan 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.

7.3 Nhận biết

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

CHÚ THÍCH Việc tách và định lượng được chứng minh là phù hợp nếu tuân thủ các điều kiện thực 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 <i>n</i> -hexan;
Tốc độ dòng:	1,0 ml/min;
Thể tích bơm:	10 µl đến 100 µl;
Phát hiện:	Đo huỳnh quang. Bước sóng kích thích: 295 nm; bước sóng phát xạ: 330 nm

7.4 Xác định

Bơm các thể tích thích hợp (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 diện 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 mẫu và của dung dịch chuẩn hoặc bù bằng hệ số tương ứng trong phần tính toán kết quả (xem Điều 8). Kiểm tra độ tuyến tính của hàm hiệu chuẩn.

7.5 Số lần xác định

Tiến hành ít nhất hai phép xác định độc lập.

8 Tính kết quả

Việc tính toán được dựa vào đường chuẩn hoặc sử dụng các chương trình tương ứng của máy tích phân, hoặc theo công thức đã được đơn giản sau đây.

Tính nồng độ khối lượng, ρ , của α -, β -, γ hoặc δ -tocopherol bằng mg/100 g mẫu thử theo công thức (2):

$$\rho = \frac{A_S \times c \times V \times V_{ST}}{A_{ST} \times m \times V_S \times 1000} \times 100 \quad (2)$$

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 (7.2.1 đến 7.2.2), tính bằng mililit (ml);

c là độ tinh khiết đã hiệu chỉnh (4.10.5) của α -, β -, γ hoặc δ -tocopherol trong dung dịch chuẩn (4.11.1 đến 4.11.2), tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$);

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 miligam;

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].

9 Độ chụm

9.1 Yêu cầu chung

Dữ liệu về độ chụm của các phương pháp HPLC khác nhau về xác định α -tocopherol đã được thiết lập năm 1994 bằng nghiên cứu so sánh quốc tế [18] do Chương trình thử nghiệm và Đo chuẩn của Ủy ban Châu Âu thực hiện trên mẫu margarin (CRM 122)⁴⁾ và sữa bột (CRM 421)⁴⁾ và đưa ra các thông tin 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 [19], do Viện Max von Pettenkofer của Cơ quan Y tế Liên bang (nay là Viện Bảo vệ Sức khỏe Người tiêu dùng và Thú y Liên bang), Cục Hóa thực phẩm, Berlin, Đức [20] thực hiện. 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.

⁴⁾ CRM là chất chuẩn đã được chứng nhận.

9.2 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	$\bar{x} = 0,057 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$r = 0,017 \text{ mg}/100 \text{ g}$

9.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ thu được khi tiến hành thử 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	$\bar{x} = 0,057 \text{ mg}/100 \text{ g}$	$R = 0,030 \text{ mg}/100 \text{ g}$

10 Báo cáo thử nghiệm

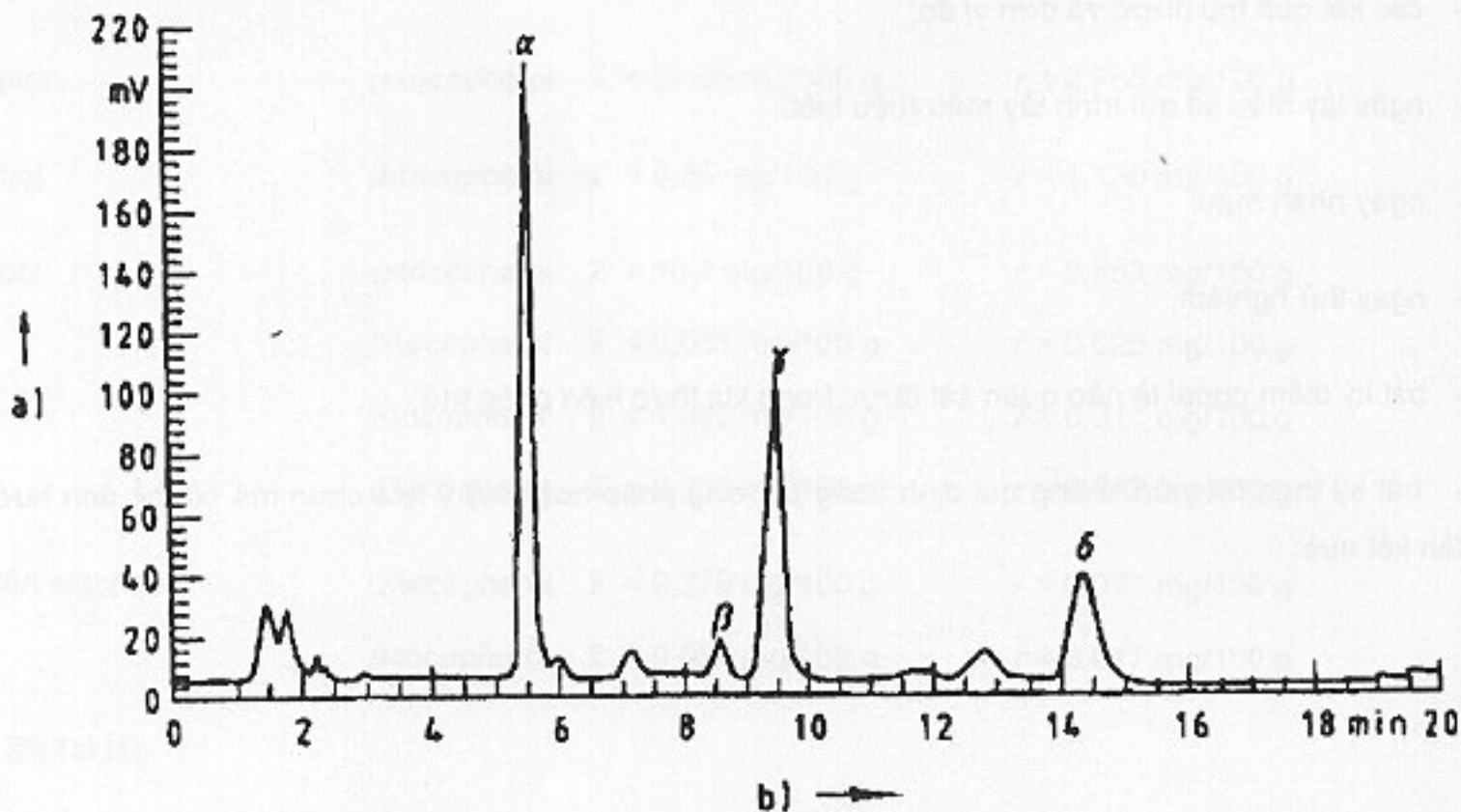
Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- thông tin về nhận biết mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp đã sử dụng;
- các kết quả thu được và đơn vị đo;
- ngày lấy mẫu và qui trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- bất kỳ điểm ngoại lệ nào quan sát được trong khi thực hiện phép thử;
- bất kỳ thao tác nào không qui định trong phương pháp hoặc tùy ý lựa chọn mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các ví dụ về phổ của HPLC



CHÚ DẪN

a: độ hấp thụ

b: Thời gian

Pha tĩnh: Lichrosorb® Si 60⁵⁾, 5 μm

Kích thước cột: 125 mm x 4 mm

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

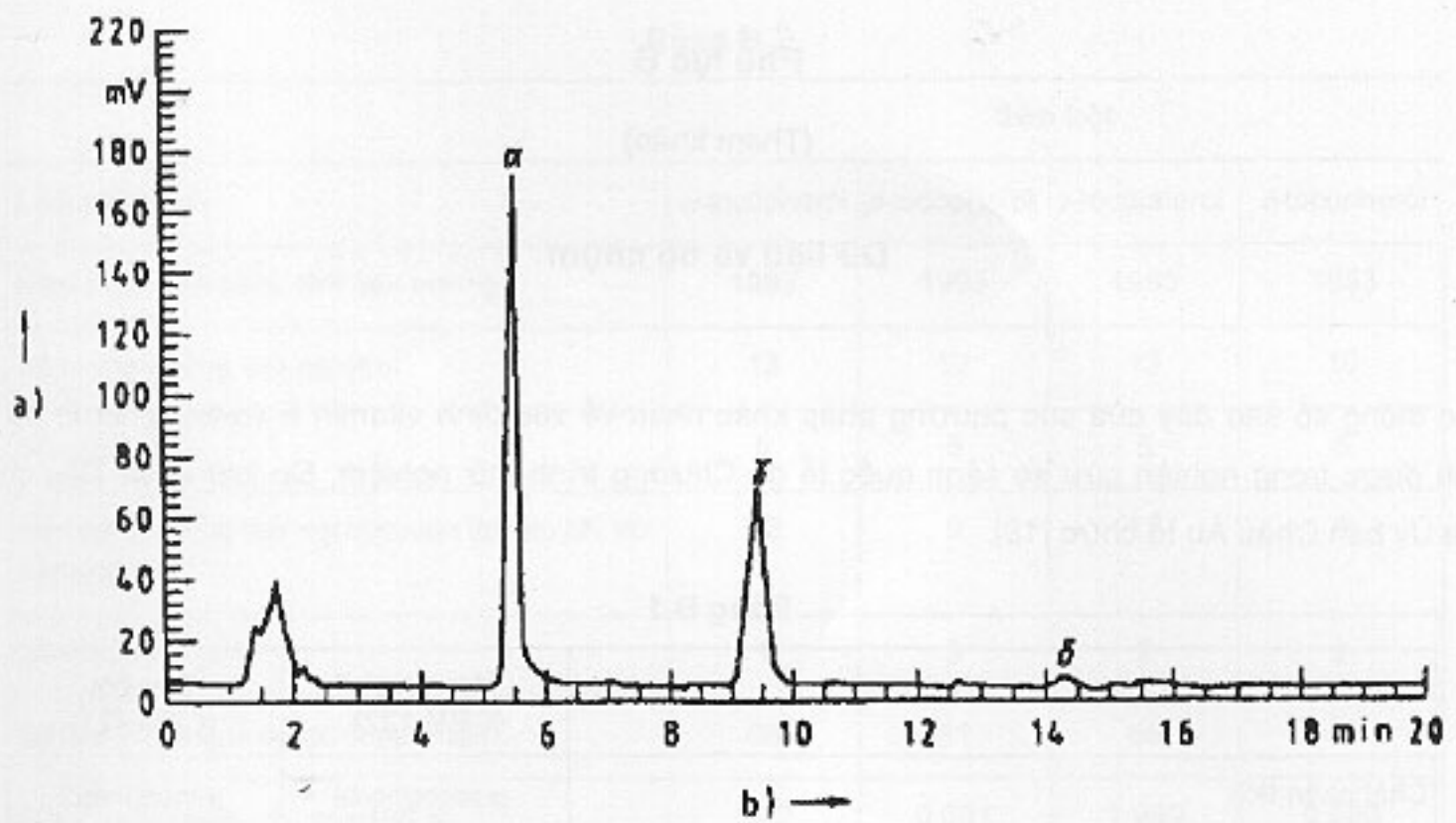
Tốc độ dòng: 1,0 ml/min;

Thể tích bơm: 20 μl ;

Phát hiện: Đo huỳnh quang, bước sóng kích thích: 295 nm và bước sóng phát xạ: 330 nm

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

⁵⁾ Xem Chú thích cuối trang số 2.



CHÚ DẪN

a:	độ hấp thụ
b:	Thời gian
Pha tĩnh:	Lichrosorb® Si 60 ⁵⁾ , 5 μm
Kích thước cột:	125 mm x 4 mm
Pha động:	Một phần thể tích của 1,4-dioxan 3 % trong <i>n</i> -hexan;
Tốc độ dòng:	1,0 ml/min;
Thể tích bơm:	20 μl;
Phát hiện:	Đo huỳnh quang, bước sóng kích thích: 295 nm và bước sóng phát xạ: 330 nm

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

⁵⁾ Xem Chú thích cuối trang số 2.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các thông số sau đây của các phương pháp khác nhau về 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 [18].

Bảng B.1

	Margarin (CRM 122)	Sữa bột (CRM 421)
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 ($2,83 \times s_r$), 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 ($2,83 \times s_R$), mg/100 g	4,180	1,960

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 thông dụng của các phòng thử nghiệm tham gia với các hệ thống HPLC như trong Phụ lục C.

Dữ liệu đánh giá đã được xác định trong phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725 : 1986 [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 Liên bang), Cục Hóa thực phẩm, Berlin, Đức [20] thực hiện.

Bảng B.2

Chất phân tích	Sữa bột			
	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 ($2,83 \times s_r$), 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 ($2,83 \times s_R$), mg/100 g	3,705	0,046	0,978	0,134

Bảng B.3

Chất phân tích	Bột yến mạch	
	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 ($2,83 \times s_r$), 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 ($2,83 \times s_R$), mg/100 g	0,133	0,030

Phụ lục C

(Tham khảo)

Các 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

Pha tĩnh	Kích thước cột, mm x mm	Pha động (phần thể tích)	Tốc độ, trên phút	Phát hiện
				F = đo huỳnh quang UV= Tử ngoại RP= Pha đảo Ex = Bước sóng kích thích Em = Bước sóng phát xạ
Knauer polygosil® 60-5	250 x 4,6	<i>n</i> -hexan + <i>di</i> -isopropyl ete (80 + 20)	1,5 ml	F: Ex: 296 nm Em: 320 nm
Si 60	250 x 4,6	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (98 + 2)	1,5 ml	F: Ex: 284 nm Em: 330 nm
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 ml	F: Ex: 295 nm Em: 330 nm
Lichrospher® Si 100,5 µm	250 x 4	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (99,85 + 0,15)	2,5 ml	F: Ex: 290 nm Em: 330 nm
Lichrosorb® Si 60,5 µm	250 x 4,6	<i>n</i> -hexan + 2-propanol (99,3 + 0,7)	1,2 ml	F: Ex: 290 nm Em: 330 nm
Lichrosorb® Si 60, 5 µm	250 x 4	<i>n</i> -hexan + dioxan (97 + 3)	1,0 ml	F: Ex: 293 nm Em: 326 nm
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 ml	F: Ex: 290 nm Em: 327 nm
Amino, 3 µm	100 x 4,6	<i>iso</i> -octan + <i>iso</i> -butanol (98 + 2)	1,5 ml	F: Ex: 290 nm Em: 330 nm
Nucleosil C ₁₈ , 5 µm	250 x 4	metanol + nước (97 + 3)	2,0 ml	UV: 292 nm
RP-8, 10 µm	250 x 4,6	acetonitril + metanol + nước (50 + 45 + 5)	2,0 ml	F: Ex: 293 nm Em: 326 nm UV: 290 nm

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Subcommittee on the Tenth Edition of the RDA's, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council, Recommended Dietary Allowances, 10th Edition, National Academy Press, Washington, D.C. 1989.
- [2] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE): Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr, 5. Überarbeitung 1991.
- [3] Brubacher, G. and Wiss, O. (1972), The Vitamins, eds Sebrell & Harris, 5th Edition, Academic Press, New York, 255.
- [4] Brubacher, G. et al., (1985). Methods for the Determination of Vitamins in Food, Elsevier App. Science Publishers, London, 97-106.
- [5] Gertz, C. and Kerrman, K. (1982). Z. Lebensmittelunters. Forsch., **174**,390-394.
- [6] Nobile, S. and Moor, H. (1953). Mitt. Lebensmittel Unters. Hyg., **44**, 396.
- [7] Determination of Tocopherols in fats and oils. L-13.03/04. September 1987 in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ Bundesgesundheitsamt (in: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods 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.
- [8] Balz, M., Schulte, E. and Thier, H.P. (1992). Fat. Sci. Technol. **6**,209-213.
- [9] Speek, A.J., Schrijver, J. and Schreurs, W.H.P. (1985), J. Food Sci. **60**,121-124.
- [10] Manz, U. and Philipp, K. (1981). Intemat. J. Vrt. Nutr. Res., **51**,342-348.
- [11] Pocklington, W.D. and Diefenbacher. A. (1988). Pure & Appl. Chem. **60**,877-892.
- [12] Bourgeois, C. (1992). Determination of Vitamin E: Tocopherols and **Tocotrienols**, Elsevier App. Science Publishers, London.
- [13] Lumley, I. D. (1993), in The Technology of Vitamins in Food, ed. by P. B. Ottaway, Blade Academic & Professional, Glasgow, 186-190.
- [14] DAB 10 (1991), Deutsches Arzneibuch 10. Ausgabe 1991, Stand 1993; Deutschar Apotheker Verlag Stuttgart.

- [15] Balz, M., Schulte, E. and Thier, H.-P.: A new parameter for checking the suitability of tocopherol standards, (1996), *Z Lebensm Unters Forsch*, **202**, 80-81.
- [16] VDLUFA-Methodenbuch: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln (The chemical analysis of animal feeding stuffs), Band III (vol III), 4. Erg (4th Add), Kapitel 13.5.5 (chapter 13.5.5), VDLUFA-Verlag, Darmstadt.
- [17] Konings, E.J.M., Roomans, H.H.S., and Beljaars, P.R.: Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Margarine, Infant Foods and Vegetables, *JAOAC*, Vol 79; No 4, 1996, 902-906.
- [18] Finglas, P.M., van den Berg, H. and de Froidmont-Gortz, I., 1997. 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.
- [19] ISO 5725:1986 Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by interlaboratory tests.
- [20] Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Tocopherolen und Tocotrienolen In dietatischen 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 § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ Bundesgesundheitsamt (In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods 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.