

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA ĐỐI VỚI CHẤT ĐƯỢC SỬ DỤNG ĐỂ BỔ SUNG VITAMIN A VÀO THỰC PHẨM

*National technical regulation
on substances may be added for vitamin A fortification in foods*

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia này (sau đây gọi tắt là Quy chuẩn) quy định yêu cầu kỹ thuật đối với chất và quản lý được sử dụng để bổ sung vitamin A vào thực phẩm.

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

2.1. Tổ chức, cá nhân sản xuất, kinh doanh, nhập khẩu, các chất được sử dụng để bổ sung vitamin A (bao gồm Retinol, Retinyl palmitate, Retinyl acetate và β -Caroten) vào thực phẩm (sau đây gọi tắt là tổ chức, cá nhân).

2.2. Cơ quan quản lý nhà nước có liên quan.

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:

3.1. Mã số C.A.S (Chemical Abstracts Service): Mã số đăng ký hóa chất của Hiệp hội Hóa chất Hoa Kỳ.

3.2. TS (test solution): Dung dịch thuốc thử.

3.3. IU (International Units): là một đơn vị đo lường được dùng để thể hiện hoạt lực của vitamin A. 1 IU của Vitamin A tương đương là 0,3 μ g retinol và tương đương với hoạt lực các retinol ester khác như sau: 1 IU của Vitamin A tương đương là 0,344 μ g retinol acetat; 0,550 μ g retinol palmitat; 0,6 μ g beta- caroten.

II. YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ

1. Yêu cầu kỹ thuật đối với chất được sử dụng để bổ sung vitamin A vào thực phẩm được quy định tại các phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này như sau:

Phụ lục 1: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với Retinol

Phụ lục 2: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với Retinyl acetat

Phụ lục 3: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với Retinol palmitat

Phụ lục 4: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với β -caroten

2. Phương pháp thử đối với chất được sử dụng để bổ sung vitamin A vào thực phẩm được quy định tại Phụ lục 1, Phụ lục 2, Phụ lục 3, Phụ lục 4 của Quy chuẩn này hoặc có thể thử theo các phương pháp tương đương khác.

III. YÊU CẦU QUẢN LÝ

1. Các chất được sử dụng để bổ sung vitamin A vào thực phẩm phải đảm bảo các yêu cầu theo quy định tại Quy chuẩn này.

2. Việc kiểm tra các chất được sử dụng để bổ sung vitamin A vào thực phẩm được thực hiện theo quy định của pháp luật hiện hành.

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

Tổ chức, cá nhân sản xuất, kinh doanh, nhập khẩu phải tự chịu trách nhiệm về sản phẩm và đảm bảo sản phẩm phù hợp với yêu cầu theo quy định tại Quy chuẩn này và các quy định có liên quan.

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

1. Giao Cục An toàn thực phẩm chủ trì, phối hợp với các cơ quan chức năng có liên quan hướng dẫn triển khai và tổ chức việc thực hiện Quy chuẩn này.

2. Căn cứ vào yêu cầu quản lý, Cục An toàn thực phẩm có trách nhiệm kiến nghị Bộ Y tế sửa đổi Quy chuẩn này.

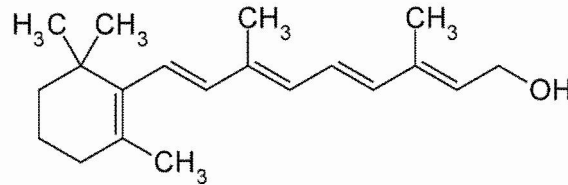
3. Trường hợp hướng dẫn của quốc tế về phương pháp thử và các quy định của pháp luật viện dẫn trong Quy chuẩn này được sửa đổi hoặc thay thế thì áp dụng theo văn bản mới.

PHỤ LỤC 1
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI RETINOL

1. Định nghĩa

Tên hóa học (2E,4E,6E,8E)-3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol

Công thức phân tử



Mã số C.A.S 68-26-8

Công thức hóa học C₂₀H₃₀O

Khối lượng phân tử 286,4516

2. Cảm quan

Có thể ở dạng lỏng hoặc rắn; có thể chứa tá dược, chất kháng sinh, chất khuếch tán và chất chống oxy hóa.

3. Chức năng

Bổ sung Vitamin A vào thực phẩm.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Định tính

Độ tan

Có thể hòa tan trong dầu ăn, Clorofom, Dietyl Ete.

Phản ứng màu với Antimony III

Xuất hiện màu xanh không bền.

Sắc ký lớp mỏng

Vết màu xanh xuất hiện, giá trị R_f xấp xỉ 0,1.

Tỉ lệ hấp thụ

- Đối với quy trình 1: Tỉ lệ [A₃₂₅] đã hiệu chỉnh/A₃₂₅ quan sát được không ít hơn 0,85.

- Đối với quy trình 2: cực đại hấp thụ trong khoảng 325-327nm. Tỉ lệ hấp thụ như sau: A₃₀₀ / A₃₂₆ không nhiều hơn 0,60;

A₃₅₀ / A₃₂₆ không nhiều hơn 0,54;

A₃₇₀ / A₃₂₆ không nhiều hơn 0,14.

4.2 Hàm lượng

Không ít hơn 95% lượng đơn vị Vitamin hoạt tính ghi trên nhãn.

5. Phương pháp thử

5.1. Định tính

Độ tan

Khả năng tan của một chất là chất thử hòa tan được trong dung môi tạo thành một dung dịch trong, đồng nhất, không còn những phần tử của chất thử.

Tiến hành: Cho dung môi vào chất thử ở nhiệt độ 25±2 °C trong 30 giây, cứ cách 5 phút lại lắc 30 giây.

Độ tan được biểu thị như sau:

| Độ tan | Số ml dung môi hòa tan 1 g chất thử |
|-------------------|-------------------------------------|
| Rất tan | Dưới 1 |
| Dễ tan | 1-10 |
| Tan | 10-30 |
| Hơi tan | 30-100 |
| Khó tan | 100-1 000 |
| Rất khó tan | 1 000-10 000 |
| Thực tế không tan | Trên 10 000 |

Phản ứng màu với Antimony III

Chuẩn bị dung dịch thử: Chứa 6 µg/ml Retinol trong Clorofom. Với 1 ml dung dịch thử, thêm vào 10 ml Antimony Triclorid TT.

Antimony triclorid TS: hòa tan 20 g Antimony triclorid trong clorofom và điền đến vạch 100 ml với clorofom. Lọc nếu cần.

Sắc ký lớp mỏng

Dung dịch chuẩn: Hòa tan chất chuẩn Retinyl Acetate và Retinyl Palmitate trong Metylen Chloride, mỗi dung dịch tương đương với 0,2 mg/ml Retinol (C₂₀H₃₀O).

Dung dịch thử dạng lỏng: Hòa tan thể tích mẫu tương đương 5 mg Retinol trong Methylene Clorit thành 10 ml dung dịch.

Dung dịch thử dạng rắn: Chuyển lượng tương đương với 5 mg Retinol vào phễu tách, thêm 75 ml nước cất, lắc mạnh khoảng 1 phút. Chiết với 10 ml Methylene Clorid bằng cách lắc trong 1 phút, ly tâm để làm trong dịch chiết Methylene Clorid.

Điều kiện sắc ký lớp mỏng:

- Chất hấp phụ: lớp Silicagel sắc ký dày 0,25 mm
- Thẻ tích chấm: Dung dịch chuẩn: 15µl; Dung dịch thử: 10 µl
- Dung môi triển khai: Hỗn hợp của Cyclohexan và Ete (4:1)
- Thuốc thử phun: Axit Phosphomolybdic TT.

Axit phosphomolybdic TT: hòa tan 20 g axit

phosphomolybdic trong Alcohol để tạo thành 100 ml. Lọc dung dịch và chỉ sử dụng dịch lọc trong.

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Chấm mẫu dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ phải thể hiện 2 vết chính xanh lá cây – xanh lục với các este tương ứng. Giá trị R_f là $0,45 \pm 0,1$ đối với Retinyl Acetate và $0,7 \pm 0,1$ đối với Retinyl Palmitate.

Tiến hành: Chấm mẫu với dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Cho phép dung môi di chuyển khoảng cách 10 cm, lấy tấm sắc ký ra, sấy khô trong không khí, phun với thuốc thử phun.

Tỉ lệ hấp thụ

Tiến hành phép thử này khi phép thử định lượng sử dụng phương pháp hóa học.

Mẫu: sử dụng lượng Vitamin A phù hợp. Tiến hành theo phần định lượng Vitamin A, phương pháp hóa học, quy trình 1 hoặc quy trình 2.

5.2. Định lượng

I. Phương pháp hóa học:

Quy trình 1: Xác định Vitamin A trong các thành phần bổ sung và thành phần dược. Quá trình tiến hành trong điều kiện giảm tối thiểu ánh sáng, oxy, các chất oxy hóa khác, sử dụng dụng cụ thủy tinh tối màu.

Dung dịch thử: Cân chính xác lượng mẫu tương đương không nhỏ hơn 0,15 mg Retinol nhưng không nhiều hơn 1 g chất béo. Nếu ở dạng không thể xà phòng hóa hiệu quả, thêm 10ml nước cất, hồi lưu trong bể cách thủy khoảng 10 phút, nghiền chất rắn còn lại bằng que thủy tinh, làm ấm thêm 5 phút.

Chuyển mẫu vào bình thủy tinh borosilicat phù hợp, thêm 30 ml Alcohol, 3 ml dung dịch KOH (9/10). Hồi lưu trong thiết bị thủy tinh borosilicat khoảng 30 phút. Làm nguội dung dịch, thêm 30 ml nước cất, chuyển vào phễu tách.

Thêm 4 g bột $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, thêm 150 ml Ete, lắc trong 2 phút (nếu tạo thành dạng nhũ tương; chiết thêm 3 lần, mỗi lần sử dụng 25 ml Ete; gộp dịch chiết lại; rửa dịch chiết với 50 ml nước cất. Lặp lại quá trình rửa thêm 3 lần, mỗi lần với 50 ml nước cất. Chuyển dịch chiết Ete đã rửa vào bình định mức 250 ml; thêm Ete tới vạch định mức.

Làm bay hơi 25 ml dịch chiết Ete thành 5 ml, không dùng

nhiệt, sử dụng thiết bị có dòng khí trơ hoặc máy hút chân không, tiếp tục làm bay hơi tới 3 ml. Hòa tan phần còn lại với lượng Isopropyl Alcohol vừa đủ để tạo ra nồng độ khoảng 3-5 µg/ml Retinol có độ hấp thụ trong dải 0,5-0,8 ở 325 nm.

Điều kiện thiết bị: máy UV, bước sóng phân tích ở 310, 325, 334 nm. Cuvet dày 1 cm, mẫu trắng sử dụng Isopropyl Alcohol.

Tiến hành: với dung dịch thử, xác định độ hấp thụ của dung dịch thử ở 310, 325, 334 nm. Hàm lượng Vitamin A được tính theo Retinol (C₂₀H₃₀O) theo công thức:

* Trường hợp $[A_{325}]/1,030 \leq A_{325} \leq [A_{325}]/0,970$:

$$\text{Kết quả (mg)} = 0,549 \times A_{325} / (L \times C)$$

* Trường hợp $[A_{325}] \leq A_{325} / 1,030$:

$$\text{Kết quả (mg)} = 0,549 \times [A_{325}] / (L \times C)$$

L là chiều dày của cuvet đo; C là nồng độ mẫu thử trong dung dịch Isopropyl Alcohol (g/100ml) hoặc (UI/100 ml).

$[A_{325}]$ là độ hấp thụ hiệu chỉnh ở 325 nm.

A_{325} là độ hấp thụ quan sát được.

$$[A_{325}] = 6,815A_{325} - 2,555A_{310} - 4,260A_{334}$$

1 mg Vitamin A tính theo Retinol tương đương với 3333 IU Vitamin A. Độ tin cậy : ±8% ở P=0,05.

Bao gói và bảo quản Giữ ở nơi mát, trong bao bì kín, tránh ánh sáng, để trong khí trơ.

Nhãn phải ghi dạng Vitamin A, ghi rõ sự có mặt của chất kháng sinh, chất phân tán, chất chống oxy hóa, các chất phụ gia.

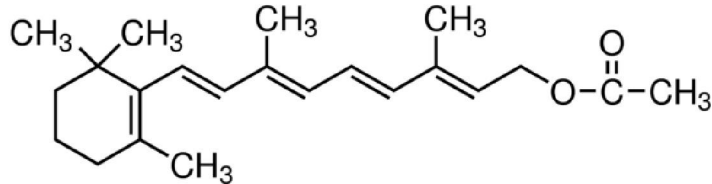
PHỤ LỤC 2
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI
RETINYL ACETATE

1. Định nghĩa

Tên hóa học

(2E,4E,6E,8E)-3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-yl Acetate

Công thức cấu tạo



Mã số C.A.S

127-47-9

Công thức hóa học

C₂₂H₃₂O₂

Khối lượng phân tử

328,50

2. Cảm quan

Có thể ở dạng lỏng hoặc rắn; có thể chứa tá dược, chất kháng sinh, chất khuếch tán và chất chống oxy hóa.

3. Chức năng

Bổ sung Vitamin A vào thực phẩm.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Định tính

Độ tan

Có thể hòa tan trong dầu ăn, Clorofom, Dietyl ete

Phản ứng tạo màu với Antimony III

Xuất hiện màu xanh không bền.

Sắc ký lớp mỏng

Vết màu xanh xuất hiện, giá trị R_f xấp xỉ 1.

Tỉ lệ hấp thụ

- Đối với quy trình 1: Tỉ lệ [A₃₂₅] đã hiệu chỉnh/ A₃₂₅ quan sát được không ít hơn 0,85.

- Đối với quy trình 2: Cực đại hấp thụ trong khoảng 325-327. Các tỷ lệ hấp thụ:

A₃₀₀/ A₃₂₆ không nhiều hơn 0,6.

A₃₅₀/ A₃₂₆ không nhiều hơn 0,54.

A₃₇₀/ A₃₂₆ không nhiều hơn 0,14

4.2 Hàm lượng

Không ít hơn 95% lượng đơn vị Vitamin hoạt tính ghi trên nhãn.

5. Phương pháp thử

5.1 Định tính

Độ tan

Khả năng tan của một chất là chất thử hòa tan được trong dung môi tạo thành một dung dịch trong, đồng nhất, không còn những phần tử của chất thử.

Tiến hành: Cho dung môi vào chất thử ở nhiệt độ 25±2 °C trong 30 giây, cứ cách 5 phút lại lắc 30 giây.

Độ tan được biểu thị như sau:

| Độ tan | Số ml dung môi hòa tan 1 g chất thử |
|-------------------|-------------------------------------|
| Rất tan | Dưới 1 |
| Dễ tan | 1-10 |
| Tan | 10-30 |
| Hơi tan | 30-100 |
| Khó tan | 100-1 000 |
| Rất khó tan | 1 000-10 000 |
| Thực tế không tan | Trên 10 000 |

Phản ứng màu với Antimony III

Chuẩn bị dung dịch thử: Chứa 6 µg/ml Retinol trong Clorofom. Thêm vào 1 ml dung dịch thử vào 10 ml Antimony1 trichlorite TT.

Thuốc thử Antimony trichlorid TT: hòa tan 20 g Antimony trichlorid trong clorofom và điền đến vạch 100 ml với clorofom. Lọc nếu cần.

Sắc ký lớp mỏng

Dung dịch chuẩn: Hòa tan chất chuẩn Retinyl acetate và Retinyl palmitate trong Methylene chloride, mỗi dung dịch tương đương với 0,2 mg/ml Retinol (C₂₀H₃₀O).

Dung dịch thử dạng lỏng: Hòa tan thể tích tương đương 5 mg Retinol trong Methylene clorid thành 10 ml dung dịch.

Dung dịch thử dạng rắn: Chuyển lượng tương đương với 5 mg Retinol vào bình tách, thêm 75 ml nước cất, lắc mạnh khoảng 1 phút, lắc với 10 ml Methylene chloride trong 1 phút, ly tâm để làm trong dịch chiết Methylene Chloride.

Hệ thống sắc ký: Sắc ký lớp mỏng;

- Chất hấp phụ: Silicagel sắc ký dày 0,25 mm;
- Thẻ tích chấm: dung dịch chuẩn 15µl; Dung dịch thử 10 µl;
- Dung môi triển khai: Hỗn hợp của Cyclohexan và Ete (4:1);
- Thuốc thử phun: Axit Phosphomolybdic TT.

Axit phosphomolybdic TT: hòa tan 20 g axit phosphomolybdic trong Alcohol để tạo thành 100 ml. Lọc dung dịch và chỉ sử dụng dịch lọc trong.

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Chấm mẫu dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ phải thể hiện 2 vết chính xanh lá cây – xanh lục với các este tương ứng. Giá trị R_f là 0,45 ±0,1 đối với Retinyl Acetate và 0,7±0,1 đối với Retinyl

Palmitate.

Tiến hành: Chấm mẫu với dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Cho phép dung môi di chuyển khoảng cách 10 cm, lấy tấm sắc ký ra, sấy khô trong không khí, phun với thuốc thử phun.

Tỉ lệ hấp thụ

Tiến hành phép thử này khi phép thử định lượng sử dụng phương pháp hóa học.

Mẫu: Sử dụng lượng Vitamin A phù hợp. Tiến hành theo phần định lượng Vitamin A, phương pháp hóa học, quy trình 1 và quy trình 2.

5.2 Định lượng

I. Phương pháp hóa học:

Quy trình 1: Xác định Vitamin A trong các thành phần bổ sung và thành phần dược. Quá trình tiến hành trong điều kiện giảm tối thiểu ánh sáng, oxy, các chất oxy hóa khác, sử dụng dụng cụ thủy tinh tối màu.

Dung dịch thử: Cân chính xác lượng mẫu tương đương không nhỏ hơn 0,15 mg Retinol nhưng không nhiều hơn 1 g chất béo. Nếu ở dạng không thể xà phòng hóa hiệu quả, thêm 10ml nước cất, hồi lưu trong bể cách thủy khoảng 10 phút, nghiền chất rắn còn lại bằng que thủy tinh, làm ấm thêm trong 5 phút.

Chuyển mẫu vào bình thủy tinh borosilicat phù hợp, thêm 30 ml Alcohol, 3 ml dung dịch KOH (9/10). Hồi lưu trong thiết bị thủy tinh borosilicat khoảng 30 phút. Làm nguội dung dịch, thêm 30 ml nước cất, chuyển vào phễu tách.

Thêm 4 g bột $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 150 ml Ete, lắc trong 2 phút (nếu tạo thành dạng nhũ tương; chiết thêm 3 lần, mỗi lần sử dụng 25 ml Ete; gộp dịch chiết lại; rửa dịch với 50 ml nước cất. Lặp lại quá trình rửa thêm 3 lần, mỗi lần với 50 ml nước cất. Chuyển dịch chiết Ete đã rửa vào bình định mức 250 ml; thêm Ete tới vạch định mức.

Làm bay hơi 25 ml dịch chiết Ete thành 5 ml, không dùng nhiệt, sử dụng thiết bị có dòng khí trợ hoặc máy hút chân không, tiếp tục làm bay hơi tới 3 ml. Hòa tan phần còn lại với lượng Isopropyl Alcohol vừa đủ để tạo ra nồng độ khoảng 3-5 $\mu\text{g/ml}$ Retinol có độ hấp thụ trong dải 0,5-0,8 ở 325 nm.

Điều kiện thiết bị: máy UV, bước sóng phân tích ở 310,

325, 334 nm. Cuvet dày 1 cm, mẫu trắng sử dụng Isopropyl Alcohol.

Tiến hành: với dung dịch thử, xác định độ hấp thụ của dung dịch thử ở 310, 325, 334 nm. Hàm lượng Vitamin A được tính theo Retinol (C₂₀H₃₀O) theo công thức:

* Trường hợp $[A_{325}]/1,030 \leq A_{325} \leq [A_{325}]/0,970$:

$$\text{Kết quả (mg)} = 0,549A_{325}/LC$$

* Trường hợp $[A_{325}] \leq A_{325}/1,030$:

$$\text{Kết quả (mg)} = 0,549[A_{325}]/LC$$

L là chiều dày của cuvet hấp thụ; C là nồng độ mẫu thử trong dung dịch Isopropyl Alcohol (g/100ml) hoặc (UI/100 ml).

$[A_{325}]$ là độ hấp thụ hiệu chỉnh ở 325 nm.

A_{325} là độ hấp thụ quan sát được.

$$[A_{325}] = 6,815A_{325} - 2,555A_{310} - 4,260A_{334}$$

1 mg Vitamin A tính theo Retinol tương đương với 3333 IU Vitamin A. Độ tin cậy : $\pm 8\%$ ở $P=0,05$

Quy trình 2: Sử dụng để xác định Vitamin A là thành phần bổ sung và các thành phần dược ở dạng Retinyl ester tinh khiết hoặc điều chế từ Retinyl ester tinh khiết cùng với tá dược.

Dung dịch thử: Hòa tan chính xác 25-100 mg mẫu trong 5 ml Pentan, pha loãng với Isopropyl Alcohol để tạo ra dung dịch có nồng độ tương đương 3-4,5 $\mu\text{g/ml}$ Retinol.

Điều kiện thiết bị: Máy UV, bước sóng phân tích ở 326 nm, Cuvet dày 1 cm, sử dụng mẫu trắng là Isopropyl Alcohol.

Tiến hành: đo độ hấp thụ của dung dịch thử.

Tính toán hàm lượng Vitamin A (mg) tính theo Retinol theo công thức:

$$\text{Kết quả (mg)} = (0,570 \times A_{326})/(L \times C)$$

A_{326} là độ hấp thụ ở 326 nm

L là chiều dày cuvet đo (cm)

C là nồng độ của dung dịch thử (g/100 ml)

1 mg Vitamin A tính theo Retinol ($C_{20}H_{30}O$) = 3333 UI Vitamin A.

II. Phương pháp sắc ký:

Phương pháp này xác định Vitamin A ở dạng thành phần được, thành phần bổ sung, hoặc là một thành phần trong thực phẩm bổ sung hoặc dược phẩm.

Trong suốt quy trình này, dung dịch thử và dung dịch chuẩn nên để trong môi trường khí trơ và sử dụng dụng cụ thủy tinh tối màu.

Quy trình 1: Quy trình này dùng để xác định Vitamin A trong nguyên liệu thô.

Pha động: n-Hexan

Dung dịch chuẩn 1: Dung dịch chuẩn Retinyl Acetate trong n-Hexan có hàm lượng 15 µg/ml Retinol.

Dung dịch chuẩn 2: Dung dịch chuẩn Retinyl Palmitate trong n-Hexan có hàm lượng 15 µg/ml Retinol.

Dung dịch phù hợp hệ thống: Trộn thể tích tương đương dung dịch chuẩn 1 và dung dịch chuẩn 2

Dung dịch thử: Cân chính xác lượng Retinyl acetate tương đương với 15 mg Retinol vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng bằng n-Hexan tới vạch định mức, trộn đều. Hút 5 ml dung dịch này vào bình định mức 50 ml, pha loãng với n-Hexan tới vạch định mức, trộn đều.

Điều kiện sắc ký: HPLC; Detector: UV 325 nm; Cột: 4,6 mm x 15 cm, 3µm, C18; Tốc độ dòng: 1ml/phút; Thể tích tiêm: 40 µl

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: sử dụng dung dịch phù hợp hệ thống, dung dịch chuẩn.

Yêu cầu: Độ phân giải không ít hơn 10 đối với All-trans-retinyl acetate và All-trans-retinyl palmitate, của dung dịch đánh giá phù hợp hệ thống; Độ lệch chuẩn tương đối không lớn hơn 3,0% đối với dung dịch chuẩn 1.

Tiến hành: Tiêm mẫu dung dịch chuẩn 1, dung dịch thử.

Tính % Vitamin A so với lượng ghi trên nhãn tính theo Retinol $C_{20}H_{30}O$ theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (mg)} = (r_u/r_s) \times C_s/C_u \times 100$$

Trong đó:

r_u là đáp ứng pic của Retinyl acetate từ dung dịch thử tương ứng.

r_s là đáp ứng pic của Retinyl acetate từ dung dịch chuẩn 1.

C_s ($\mu\text{g/ml}$) là nồng độ Vitamin A tính theo Retinol từ dung dịch chuẩn 1.

C_u ($\mu\text{g/ml}$) là nồng độ Vitamin A, tính theo Retinol trong dung dịch thử.

Quy trình 2: Quy trình này sử dụng xác định mẫu có chứa lẫn Vitamin A, D, E;

Pha động: n-Hexan và Etyl acetate (tỷ lệ 99,7:0,3)

Dung dịch Axit Sulfuric - Methanolic 3N: Thêm 9 ml axit Sulfuric vào 80 ml Methanol trong bình định mức 100 ml. Làm nguội, pha loãng với Methanol tới vạch định mức.

Dung dịch Natri Ascorbate-Pyrogallol: Chuyển 10 g Natri Ascorbate và 5 g Pyrogallol vào bình định mức 100 ml, thêm đủ nước cất để hòa tan. Thêm 1,7 ml axit Sulfuric, pha loãng bằng nước cất tới vạch định mức.

Dung dịch Lecitin: 5 mg/ml Lecitin trong 2,2,4 – Trimethylpentan.

Dung dịch chuẩn 1: Dung dịch chuẩn Retinyl acetate có hàm lượng tương đương Retinol 15 $\mu\text{g/ml}$ trong 2,2,4-trimethylpentan.

Dung dịch chuẩn 2: Dung dịch chuẩn Retinyl palmitate có hàm lượng tương đương Retinol 15 $\mu\text{g/ml}$ trong 2,2,4-trimethylpentan.

Dung dịch phù hợp hệ thống: Trộn thể tích bằng nhau dung dịch chuẩn 1 và dung dịch chuẩn 2.

Dung dịch thử: Sử dụng lượng mẫu tương ứng từ 0,4 -2,5 mg Retinol. Thêm 0,5 g Natri bicacbonat; 1,5 ml dung dịch Lecithin, và 12,5 ml 2,2,4-trimethylpentane, và trộn bằng máy voltex. Thêm 6 ml dung dịch Ascorbat-pyrogallol natri, lắc chậm để giải phóng khí. Tiếp tục lắc cho đến khi hết khí, và sau đó lắc thêm 12 phút. Thêm 6 ml Dimethyl sulfoxid, trộn bằng máy voltex để tạo thành dạng huyền phù, và lắc trong 12 phút. Thêm 6 ml dung dịch Methanolic - Axit Sulfuric 3 N, voltex để tạo thành một huyền phù, và

lắc trong 12 phút. Thêm 12,5 ml 2,2,4-trimethylpentane, trộn trên máy vortex để tạo thành dạng huyền phù, và lắc trong 10 phút. Ly tâm trong 10 phút để phá vỡ nhũ tương và tách dịch trong phía trên. Nếu cần thiết, pha loãng dịch trong trên với 2,2,4-trimethylpentane để đạt được nồng độ gần với nồng độ dung dịch chuẩn.

Điều kiện sắc ký: HPLC, Detector UV 325 nm, Cột: 4,6 mm x 25 cm, 5 μ m chứa L24; Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút; Thể tích tiêm: 40 μ l.

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: sử dụng dung dịch phù hợp hệ thống.

Yêu cầu: Độ phân giải không ít hơn 8 đối với All-trans-retinyl acetate và All-trans-retinyl palmitate; Độ lệch chuẩn tương đối không lớn hơn 3,0%.

Tiến hành: Tiêm mẫu dung dịch chuẩn 1 và dung dịch chuẩn 2, dung dịch thử.

Tính hàm lượng (mg) Vitamin A tính theo Retinol C₂₀H₃₀O theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (mg)} = (r_u/r_s) \times C_s/C_u \times 100$$

Trong đó:

r_u là đáp ứng pic của All-trans-retinyl acetate từ dung dịch thử.

r_s là đáp ứng pic của Retinyl acetate từ dung dịch chuẩn 1.

C_s (μ g/ml) là nồng độ tính theo Retinol của chất chuẩn 1.

C_u (μ g/ml) là nồng độ danh nghĩa của Vitamin A, tính theo Retinol trong dung dịch thử.

Sử dụng 26,5 ml là thể tích cuối của dung dịch thử để tính nồng độ danh nghĩa.

Quy trình 3: Quy trình này dùng xác định Vitamin A trong các dạng rắn, lỏng hòa tan trong dầu, nước, hòa tan trong dầu-nước.

Pha động: n-Hexane và Isopropyl alcohol (tỷ lệ 92:8)

Dung môi ly trích: n-Hexane và Methylene chloride (3:1).

Dung dịch KOH: 800 mg/ml KOH trong nước cất.

Dung môi pha loãng: 10 mg/ml Pyrogallol trong cồn.

Dung dịch chuẩn: Pha loãng chất chuẩn Retinyl acetate với dung môi pha loãng để đạt được nồng độ tương

đương 8,5 µg/ml Retinol (C₂₀H₃₀O). Chuyển 10,0 ml dung dịch này vào bình tam giác 125 ml có nút đậy và thêm 5 ml nước cất, 5 ml dung môi pha loãng và 3 ml dung dịch KOH. Lấp chặt nắp, lắc trong 15 phút trong bể cách thủy ở 60° ± 5, và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm 7 ml nước cất và 25,0 ml dung môi ly trích. Lấp chặt nắp, và lắc mạnh trong 60 giây. Rửa thành bình tam giác bằng 60 ml nước cất, và để yên trong 10 phút cho đến khi tách lớp. Thu hồi lớp hữu cơ để tiêm mẫu vào sắc ký. Dung dịch chuẩn này chứa 3,4 µg/ml Retinol.

Dung dịch thử: Cho lượng mẫu tương đương với 1,3 mg Retinol, vào bình tam giác 125 ml có nút đậy. Thêm 5 ml nước cất, 15 ml dung môi pha loãng, và 3 ml dung dịch KOH. Lấp chặt nắp, lắc trong 15 phút trong bể cách thủy duy trì ở 60° ± 5, và để nguội ở nhiệt độ phòng. Thêm 7 ml nước cất và 25,0 ml dung môi ly trích. Đậy chặt nắp, và lắc mạnh trong 60 giây hoặc lâu hơn, nếu cần, để ly trích hoàn toàn. Rửa thành bình tam giác bằng 60 ml nước cất, và để yên trong 10 phút cho đến khi tách lớp. (Không lắc, bởi vì có thể hình thành nhũ tương). Thu hồi lớp hữu cơ, và pha loãng nếu cần với dung môi ly trích, để có nồng độ 3,4 µg/ml Retinol.

Hệ thống sắc ký: LC; Detector UV 335 nm; Cột: 6,2-mm x 8 cm, L3; Nhiệt độ cột: 40°; Tốc độ dòng: 4 ml/phút; Thể tích tiêm: 50 µL

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn. Độ lệch chuẩn tương đối không quá 3,0%.

Tiến hành: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

Tính tỷ lệ phần trăm Vitamin A so với lượng vitamin A ghi trên nhãn tính theo retinol (C₂₀H₃₀O):

$$\text{Kết quả} = (r_{T1} / r_{T2}) \times (C_S / C_U) \times 100$$

Trong đó:

r_{T1} = Tổng các đáp ứng pic của Este All-trans-retinyl Acetate và este 13-cis-retinyl acetate từ dung dịch thử.

r_{T2} = Tổng các đáp ứng pic của Este All-trans-retinyl

acetate và este 13-cis-retinyl acetate từ dung dịch chuẩn.

C_S = nồng độ Retinol ($C_{20}H_{30}O$) trong dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

C_U = nồng độ danh nghĩa của vitamin A, tính theo Retinol ($C_{20}H_{30}O$), trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)

Quy trình 4: Quy trình này có thể được sử dụng để xác định vitamin A trong dịch Vitamin hòa tan trong dầu-nước.

Pha động: Methanol, Acetonitrile, và n-Hexane (46,5: 46,5: 7,0)

Dung môi pha loãng: Tetrahydrofuran và Acetonitrile (1:1)

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chuẩn Retinyl acetate pha trong dung môi pha loãng có hàm lượng 0,33 mg/ml Retinol ($C_{20}H_{30}O$)

Dung dịch thử dạng lỏng: Cân chính xác và chuyển lượng mẫu tương đương 3,3 mg Retinol vào phễu tách 500 ml chứa 10 ml nước cất và 20 ml Alcohol dehydrate. Thêm 150 ml dung môi hexane, đậy nắp, và lắc trong 1 phút. Thêm tiếp 150 ml dung môi hexane, đậy nắp, lắc, và để tách lớp. Bỏ lớp nước và lọc dịch chiết hexan qua Na_2SO_4 khan vào bình đáy tròn 500 ml. Làm bay hơi dung dịch tới khô bằng thiết bị bay hơi cô quay trên bề cách thủy duy trì ở 65° . Ngay lập tức bổ sung 10,0 ml dung môi pha loãng, lắc để hòa tan cặn và lọc.

Hệ thống sắc ký: LC; Detector UV 265 nm; Cột 4,6 mm x 50 cm L1 (lắp từ hai cột 4,6 mm x 25 cm); Nhiệt độ cột: 40° ; Tốc độ dòng chảy: 1,5 ml/phút; Thể tích tiêm: 20 μL

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Tiêm dung dịch chuẩn vào máy sắc khí. Yêu cầu độ lệch chuẩn tương đối không lớn hơn 5,0%.

Tiến hành: Tiến hành chạy sắc ký với dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

Tính tỷ lệ phần trăm vitamin A so với lượng ghi trên nhãn, tính theo Retinol ($C_{20}H_{30}O$), theo công thức:

$$\text{Kết quả} = (r_U / r_S) \times (C_S / C_U) \times 100$$

r_U là đáp ứng pic của Ester All-trans-Retinyl acetate từ dung

dịch thử.

r_s là đáp ứng pic của Este All-trans-retinyl acetate từ dung dịch chuẩn.

C_s = nồng độ Retinol ($C_{20}H_{30}O$) trong dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

C_u = nồng độ danh nghĩa của vitamin A, tính theo Retinol ($C_{20}H_{30}O$), trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$)

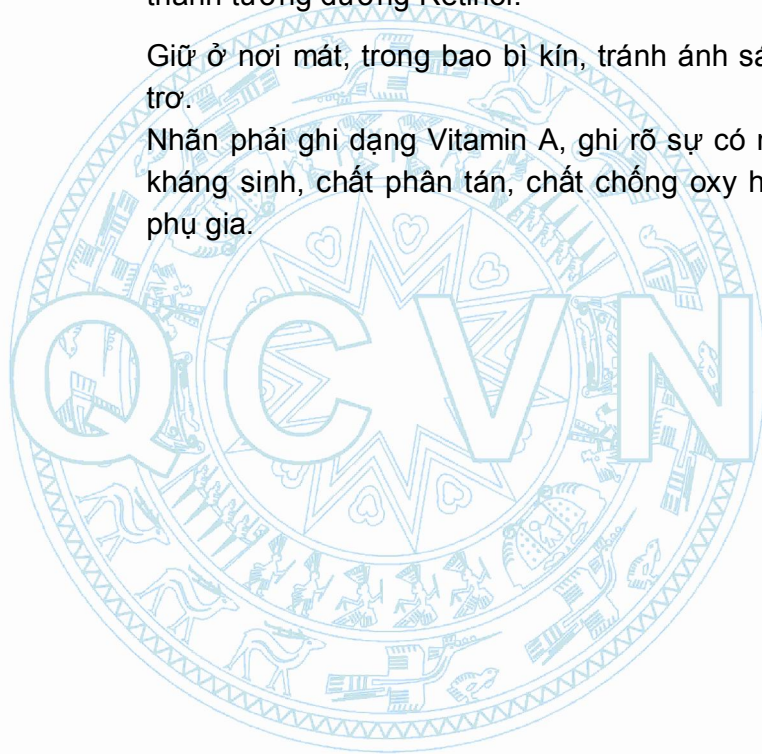
Sử dụng giá trị 0,872 để chuyển đổi Retinyl acetate thành tương đương Retinol.

Sử dụng giá trị 0,546 để chuyển đổi Retinyl palmitate thành tương đương Retinol.

6. Bao gói và bảo quản

Giữ ở nơi mát, trong bao bì kín, tránh ánh sáng trong khí tro.

Nhãn phải ghi dạng Vitamin A, ghi rõ sự có mặt của chất kháng sinh, chất phân tán, chất chống oxy hóa, các chất phụ gia.



PHỤ LỤC 3

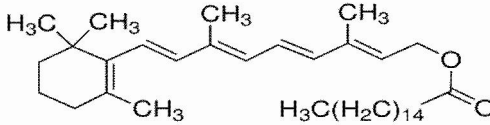
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI RETINYL PALMITATE

1. Định nghĩa

Tên hóa học

(2E, 4E, 6E, 8E)-3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraenyl] hexadecanoate

Công thức cấu tạo



Mã số C.A.S

79-81-2

Công thức hóa học

C₃₆H₆₀O₂

Khối lượng phân tử

524,86

2. Cảm quan

Có thể ở dạng lỏng hoặc rắn; có thể chứa tá dược, chất kháng sinh, chất khuếch tán và chất chống oxy hóa.

3. Chức năng

Bổ sung Vitamin A vào thực phẩm.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Định tính

Độ tan

Có thể hòa tan trong dầu ăn, Clorofom, Dietyl ete

Phản ứng tạo màu với Antimony III

Xuất hiện màu xanh không bền.

Sắc ký lớp mỏng

Vết màu xanh xuất hiện, giá trị R_f xấp xỉ 1.

Tỉ lệ hấp thụ

Qui trình 1: Tỉ lệ [A₃₂₅] đã hiệu chỉnh/ A₃₂₅ quan sát được không ít hơn 0,85.

Qui trình 2: Cực đại hấp thụ trong khoảng 325-327 nm.

Các tỷ lệ hấp thụ:

A₃₀₀/ A₃₂₆ không nhiều hơn 0,6.

A₃₅₀/ A₃₂₆ không nhiều hơn 0,54.

A₃₇₀/ A₃₂₆ không nhiều hơn 0,14

4.2 Hàm lượng

Lớn hơn 95% hoạt tính so với lượng ghi trên nhãn.

5. Phương pháp thử

5.1 Định tính

Độ tan

Khả năng tan của một chất là chất thử hòa tan được trong dung môi tạo thành một dung dịch trong, đồng nhất, không còn những phần tử của chất thử.

Tiến hành: Cho dung môi vào chất thử ở nhiệt độ 25±2 °C trong 30 giây, cứ cách 5 phút lại lắc 30 giây.

Độ tan được biểu thị như sau:

| Độ tan | Số ml dung môi hòa tan 1 g chất thử |
|---------|-------------------------------------|
| Rất tan | Dưới 1 |
| Dễ tan | 1-10 |

| | |
|-------------------|--------------|
| Tan | 10-30 |
| Hơi tan | 30-100 |
| Khó tan | 100-1 000 |
| Rất khó tan | 1 000-10 000 |
| Thực tế không tan | Trên 10 000 |

Phản ứng màu với Antimony III

Chuẩn bị dung dịch thử: Chứa 6 µg/ml Retinol trong Clorofom. Thêm vào 1 ml dung dịch thử vào 10 ml Antimony1 TriClorite TT. Thuốc thử được pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Antimony trichlorid TS: hòa tan 20 g Antimony trichlorid trong clorofom và điền đến vạch 100 ml với clorofom. Lọc nếu cần.

Sắc ký lớp mỏng

Dung dịch chuẩn: Hòa tan chất chuẩn Retinyl acetate và Retinyl palmitate trong Methylene Chloride, mỗi dung dịch tương đương với 0,2 mg/ml Retinol (C₂₀H₃₀O).

Dung dịch thử dạng lỏng: Hòa tan thể tích tương đương 5 mg Retinol trong Methylene Clorit thành 10 ml dung dịch.

Dung dịch thử dạng rắn: Chuyển lượng tương đương với 5 mg Retinol vào bình tách, thêm 75 ml nước cất, lắc mạnh khoảng 1 phút, lắc với 10 ml Methylene Chloride trong 1 phút, ly tâm để tách dịch chiết Methylene Chloride.

Hệ thống sắc ký: Sắc ký lớp mỏng;

- Chất hấp phụ lớp Silicagel dày 0,25 mm;
- Thể tích tiêm dung dịch chuẩn: 15µl; Dung dịch thử: 10 µl;
- Dung môi triển khai: Hỗn hợp của Cyclohexan và Ete (4:1);
- Thuốc thử phun: Axit Phosphomolybdic TT.

Axit phosphomolybdic TT: hòa tan 20 g axit phosphomolybdic trong Alcohol để tạo thành 100 ml. Lọc dung dịch và chỉ sử dụng dịch lọc trong.

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Chấm mẫu dung dịch chuẩn. Yêu cầu là sắc ký thể hiện 2 vết chính xanh lá cây – xanh lục với các este tương ứng. Giá trị R_f là 0,45 ±0,1 đối với Retinyl acetate và 0,7 ±0,1 đối với Retinyl palmitate.

Tiến hành: Chấm mẫu với dung dịch chuẩn và dung dịch

thử. Cho phép dung môi di chuyển khoảng cách 10 cm, lấy tấm sắc ký ra, sấy khô trong không khí, phun với thuốc thử phun.

Tỉ lệ hấp thụ

Tiến hành phép thử này khi phép thử định lượng sử dụng phương pháp hóa học.

Mẫu: sử dụng lượng Vitamin A phù hợp. Tiến hành theo phần định lượng Vitamin A, phương pháp hóa học, quy trình 1 và quy trình 2.

5.2 Định lượng

I. Phương pháp hóa học:

Quy trình 1: Xác định Vitamin A trong các thành phần bổ sung và thành phần dược. Quá trình tiến hành trong điều kiện giảm tối thiểu ánh sáng, oxy, các chất oxy hóa khác, sử dụng dụng cụ thủy tinh tối màu.

Dung dịch thử: Cân chính xác lượng mẫu tương đương không nhỏ hơn 0,15 mg Retinol nhưng không nhiều hơn 1 g chất béo. Nếu ở dạng không thể xà phòng hóa hiệu quả, thêm 10ml nước cất, hồi lưu trong bể cách thủy khoảng 10 phút, nghiền chất rắn còn lại bằng que thủy tinh, làm ấm thêm trong 5 phút.

Chuyển mẫu vào bình thủy tinh borosilicat phù hợp, thêm 30 ml Alcohol, 3 ml dung dịch KOH (9/10). Hồi lưu trong thiết bị thủy tinh borosilicat khoảng 30 phút. Làm nguội dung dịch, thêm 30 ml nước cất, chuyển vào phễu tách.

Thêm 4 g bột $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, thêm 150 ml Ete, lắc trong 2 phút (nếu tạo thành dạng nhũ tương; chiết thêm 3 lần, mỗi lần sử dụng 25 ml Ete; gộp dịch chiết lại; rửa dịch với 50 ml nước cất. Lặp lại quá trình rửa thêm 3 lần, mỗi lần với 50 ml nước cất. Chuyển dịch chiết Ete đã rửa vào bình định mức 250 ml; thêm Ete tới vạch định mức.

Làm bay hơi 25 ml dịch chiết Ete thành 5 ml, không dùng nhiệt, sử dụng thiết bị có dòng khí trợ hoặc máy hút chân không, tiếp tục làm bay hơi tới 3 ml. Hòa tan phần còn lại với lượng Isopropyl alcohol vừa đủ để tạo ra nồng độ khoảng 3-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Retinol có độ hấp thụ trong dải 0,5-0,8 ở 325 nm.

Điều kiện thiết bị: máy UV, bước sóng phân tích ở 310, 325, 334 nm. Cuvet dày 1 cm, mẫu trắng sử dụng Isopropyl Alcohol.

Tiến hành: Tiến hành với dung dịch thử, xác định độ hấp thụ của dung dịch thử ở 310, 325, 334 nm. Hàm lượng Vitamin A được tính theo Retinol ($C_{20}H_{30}O$) theo công thức:

* Trường hợp $[A_{325}]/1,030 \leq A_{325} \leq [A_{325}]/0,970$:

$$\text{Kết quả (mg)} = 0,549A_{325}/LC$$

* Trường hợp $[A_{325}] \leq A_{325}/1,030$:

$$\text{Kết quả (mg)} = 0,549[A_{325}]/LC$$

L là chiều dày của cuvet hấp thụ

C là nồng độ mẫu thử trong dung dịch Isopropyl Alcohol (g/100ml) hoặc (UI/100 ml).

$[A_{325}]$ là độ hấp thụ hiệu chỉnh ở 325 nm.

A_{325} là độ hấp thụ quan sát được.

$$[A_{325}] = 6,815A_{325} - 2,555A_{310} - 4,260A_{334}$$

1 mg Retinol tương đương với 3333 IU Vitamin A.

Độ tin cậy : $\pm 8\%$ ở $P=0,05$

Quy trình 2: Sử dụng để xác định Vitamin A là thành phần bổ sung và các thành phần dược ở dạng este tinh khiết hoặc được pha chế từ ester retinyl tinh khiết trong tá dược.

Dung dịch thử: Hòa tan chính xác 25-100 mg mẫu trong 5 ml Pentan, pha loãng với Isopropyl alcohol để tạo ra dung dịch có nồng độ tương đương 3-4,5 $\mu\text{g/ml}$ Retinol.

Điều kiện thiết bị: Máy UV, bước sóng phân tích ở 326 nm, Cuvet dày 1 cm, sử dụng mẫu trắng là Isopropyl Alcohol.

Tiến hành: Tiến hành với dung dịch thử. Tính toán hàm lượng Vitamin A (mg) tính theo Retinol theo công thức:

$$\text{Kết quả (mg)} = 0,57A_{326}/LC$$

Trong đó :

A_{326} là độ hấp thụ ở 326 nm

L là chiều dày cuvet đo (cm)

C là nồng độ của dung dịch thử (g/100 ml)

1 mg Vitamin A tính theo Retinol ($C_{20}H_{30}O$) tương đương

3333 UI Vitamin A.

II. Phương pháp sắc ký:

Phương pháp này xác định Vitamin A ở dạng thành phần được, thành phần bổ sung, hoặc là một thành phần trong thực phẩm bổ sung hoặc dạng dược. Trong suốt quy trình này, dung dịch thử và dung dịch chuẩn nên để trong môi trường khí trơ và sử dụng dụng cụ thủy tinh tối màu.

Quy trình 1: Quy trình này dùng để xác định Vitamin A trong nguyên liệu thô.

Pha động: n-Hexan

Dung dịch chuẩn 1: Dung dịch chuẩn Retinyl acetate trong n-Hexan có hàm lượng 15 µg/ml Retinol.

Dung dịch chuẩn 2: Dung dịch chuẩn Retinyl palmitate trong n-Hexan có hàm lượng 15 µg/ml Retinol.

Dung dịch phù hợp hệ thống: Trộn thể tích tương đương dung dịch chuẩn 1 và dung dịch chuẩn 2

Dung dịch thử: Cân chính xác lượng Retinyl palmitate tương đương với 15 mg Retinol vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng bằng n-Hexan tới vạch định mức, trộn đều. Hút 5 ml dung dịch này vào bình định mức 50 ml, pha loãng với n-Hexan tới vạch định mức, trộn đều.

Điều kiện sắc ký: HPLC; Detector: UV 325 nm; Cột: 4,6 mm x 15 cm, 3µ chứa L8; Tốc độ dòng: 1ml/phút; Thể tích tiêm: 40 µl

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: sử dụng dung dịch phù hợp hệ thống, dung dịch chuẩn 2. Độ phân giải không ít hơn 10 đối với All-trans-retinyl acetate và All-trans-retinyl palmitate, của dung dịch phù hợp hệ thống. Độ lệch chuẩn tương đối không lớn hơn 3,0% đối với dung dịch chuẩn 2.

Tiến hành: Tiêm mẫu dung dịch chuẩn 2, dung dịch thử tương ứng.

Tính % Vitamin A so với lượng ghi trên nhãn tính theo Retinol $C_{20}H_{30}O$ theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (mg)} = (r_u/r_s) \times C_s/C_u \times 100$$

Trong đó:

r_u là đáp ứng pic của Retinyl palmitate từ dung dịch thử.

r_s là đáp ứng pic của Retinyl palmitate từ dung dịch chuẩn 2.

C_s ($\mu\text{g/ml}$) là nồng độ tính theo Retinol của dung dịch chuẩn 2.

C_u ($\mu\text{g/ml}$) là nồng độ Vitamin A, tính theo Retinol trong dung dịch thử.

Quy trình 2: Quy trình này sử dụng để xác định mẫu có chứa lẫn Vitamin A, D, E;

Pha động: n-Hexan và Etyl acetate (99,7:0,3)

Dung dịch Methanolic – Axit Sulfuric 3N: Thêm 9 ml axit Sulfuric vào 80 ml Methanol trong bình định mức 100 ml. Làm nguội, pha loãng với Methanol tới vạch định mức.

Dung dịch Natri Ascorbat-Pyrogallol: Chuyển 10 g Natri Ascorbat và 5 g Pyrogallol vào bình định mức 100 ml, thêm đủ nước cất để hòa tan. Thêm 1,7 ml axit Sulfuric, pha loãng bằng nước cất tới vạch định mức.

Dung dịch Lecitin: 5 mg/ml Lecitin trong 2,2,4 – Trimethylpentan

Dung dịch chuẩn 1: Dung dịch chuẩn Retinyl acetate có hàm lượng tương đương Retinol 15 $\mu\text{g/ml}$ trong 2,2,4 – Trimethylpentan.

Dung dịch chuẩn 2: Dung dịch chuẩn Retinyl palmitate có hàm lượng tương đương Retinol 15 $\mu\text{g/ml}$ trong 2,2,4 – Trimethylpentan.

Dung dịch phù hợp hệ thống: Trộn thể tích bằng nhau dung dịch chuẩn 1 và dung dịch chuẩn 2,

Dung dịch thử: Sử dụng lượng mẫu tương ứng từ 0,4 mg-2,5 mg Retinol. Thêm 0,5 g Natribicacbonat; 1,5 ml dung dịch Lecithin, và 12,5 ml 2,2,4-trimethylpentane, và trộn bằng máy voltex. Thêm 6 ml dung dịch Natri Ascorbat-Pyrogallol, lắc chậm để giải phóng khí. Tiếp tục lắc cho đến khi hết khí, và sau đó lắc thêm 12 phút. Thêm 6 ml Dimethyl Sulfoxid, trộn bằng máy voltex để tạo thành dạng huyền phù, và lắc trong 12 phút. Thêm 6 ml dung dịch Methanolic-axit Sunfuric 3 N, voltex để tạo thành một huyền phù, và lắc trong 12 phút. Thêm 12,5 ml 2,2,4-Trimethylpentane, voltex để tạo thành dạng huyền phù, và lắc trong 10 phút. Ly tâm trong 10 phút để phá vỡ nhũ

tương và tách dịch trong phía trên. Nếu cần thiết, pha loãng dịch trong trên với 2,2,4-Trimethylpentane để đạt được nồng độ gần với nồng độ dung dịch chuẩn.

Điều kiện sắc ký: HPLC, Detector UV 325 nm, Cột: 4,6 mm x 25 cm, 5µm chứa L24; Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút; Thể tích tiêm: 40 µl.

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch phù hợp hệ thống. Độ phân giải không ít hơn 8 giữa All-trans-retinyl acetate và All-trans-retinyl palmitate; Độ lệch chuẩn tương đối không lớn hơn 3,0%.

Tiến hành: Tiêm mẫu dung dịch chuẩn 2, dung dịch thử.

Tính % hàm lượng Vitamin A tính theo Retinol C₂₀H₃₀O so với lượng ghi trên nhãn theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (\%)} = (r_u/r_s) \times C_s/C_u \times 100$$

Trong đó:

r_u là đáp ứng pic của All-trans-retinyl palmitate từ dung dịch thử.

r_s là đáp ứng pic của Retinyl palmitate từ dung dịch chuẩn 2.

C_s (µg/ml) là nồng độ tính theo Retinol của chất chuẩn 2.

C_u (µg/ml) là nồng độ danh nghĩa của Vitamin A, tính theo Retinol trong dung dịch thử.

Sử dụng 26,5 ml là thể tích cuối của dung dịch thử để tính nồng độ danh nghĩa.

Quy trình 3: Quy trình này dùng xác định Vitamin A trong các dạng Vitamin A rắn, lỏng hòa tan trong dầu, nước, hòa tan trong dầu-nước.

Pha động: n-Hexane và Isopropyl Alcohol (92:8)

Dung môi ly trích: n-Hexane và Methylene Chloride (3:1).

Dung dịch KOH: 800 mg/ml KOH trong nước cất.

Dung môi pha loãng: 10 mg/ml Pyrogallol trong Alcohol.

Dung dịch chuẩn: Pha loãng chất chuẩn Retinyl palmitate với dung môi pha loãng để đạt được nồng độ tương đương 8,5 µg/ml Retinol (C₂₀H₃₀O). Chuyển 10,0 ml dung dịch này vào bình tam giác 125 ml có nút đậy và thêm 5 ml nước cất, 5 ml dung môi pha loãng và 3 ml dung dịch KOH. Lấp chặt nắp, lắc trong 15 phút trong bể cách thủy ở

$60^{\circ} \pm 5$, và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm 7 ml nước cất và 25,0 ml dung môi ly trích. Lấp chặt nắp, và lắc mạnh trong 60 giây. Rửa thành bình tam giác bằng 60 ml nước cất, và để yên trong 10 phút cho đến khi tách lớp. Thu hồi lớp hữu cơ để chạy sắc ký. Dung dịch chuẩn này chứa 3,4 $\mu\text{g/ml}$ Retinol.

Dung dịch thử: Cho lượng mẫu tương đương với 1,3 mg Retinol, vào bình tam giác có nút đậy 125 ml. Thêm 5 ml nước cất, 15 ml dung môi pha loãng, và 3 ml dung dịch KOH. Lấp chặt nắp, lắc trong 15 phút trong bể cách thủy duy trì ở $60^{\circ} \pm 5$, và để nguội ở nhiệt độ phòng. Thêm 7 ml nước cất và 25,0 ml dung môi chiết. Đậy chặt nắp, và lắc mạnh trong 60 giây hoặc lâu hơn, nếu cần, để ly trích hoàn toàn. Rửa thành bình bằng 60 ml nước, và để yên trong 10 phút cho đến khi tách lớp. (Không lắc, bởi vì có thể hình thành nhũ tương). Thu hồi lớp hữu cơ, và pha loãng nếu cần, với dung môi ly trích, để có nồng độ 3,4 $\mu\text{g/ml}$ Retinol.

Hệ thống sắc ký: LC; Detector UV 335 nm; Cột: 6,2mm x 8 cm, L3; Nhiệt độ cột: 40° ; Tốc độ dòng: 4 ml/phút; Thể tích tiêm: 50 μL .

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn. Độ lệch chuẩn tương đối không quá 3,0%

Tiến hành: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

Tính tỷ lệ phần trăm so với lượng vitamin A ghi trên nhãn tính theo Retinol ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$):

$$\text{Kết quả} = (r_{T1} / r_{T2}) \times (C_S / C_U) \times 100$$

Trong đó:

r_{T1} = tổng các đáp ứng pic của Este All-trans-retinyl Palmitate và este 13-Cis-Retinyl palmitate từ dung dịch thử.

r_{T2} = tổng các đáp ứng pic của Este All-trans-retinyl Palmitate và este 13-cis-retinyl Palmitate từ dung dịch chuẩn.

C_S = nồng độ Retinol ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$) trong dung dịch chuẩn

($\mu\text{g/ml}$).

C_U = nồng độ danh nghĩa của vitamin A, tính theo Retinol ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$), trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$).

Quy trình 4: Quy trình này có thể được sử dụng để xác định vitamin A trong dịch Vitamin.

Pha động: Methanol, Acetonitrile, và n-Hexane (46,5: 46,5: 7,0)

Dung môi pha loãng: Tetrahydrofuran và Acetonitrile (1:1)

Dung dịch chuẩn: Dung dịch chất chuẩn Retinyl Palmitate pha trong dung môi pha loãng có hàm lượng 0,33 mg/ ml Retinol ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$).

Dung dịch thử dạng lỏng: Chuyển chính xác lượng mẫu tương đương 3,3 mg Retinol vào phễu tách 500 ml chứa 10 ml nước cất và 20 ml Alcohol dehydrate. Thêm 150 ml dung môi Hexane, đậy nắp, và lắc trong 1 phút. Thêm 150 ml dung môi Hexane, đậy nắp, lắc, tách lớp. Bỏ lớp nước và lọc dịch chiết Hexan qua Na_2SO_4 khan vào bình đáy tròn 500 ml. Làm bay hơi dịch lọc tới khô bằng thiết bị bay hơi cô quay trong bể cách thủy duy trì ở 65° . Ngay lập tức bổ sung 10,0 ml dung môi pha loãng, lắc để hòa tan cặn và lọc.

Hệ thống sắc ký: LC; Detector UV 265 nm; Cột 4,6 mm x 50 cm (lắp từ hai cột 4,6 mm x 25 cm) chứa L1; Nhiệt độ cột: 40° ; Tốc độ dòng chảy: 1,5 ml/phút; Thể tích tiêm: 20 μL

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Tiêm dung dịch chuẩn vào máy sắc khí. Yêu cầu độ lệch chuẩn tương đối không lớn hơn 5,0%.

Tiến hành: Mẫu tiêm với dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

Tính tỷ lệ phần trăm so với hàm lượng vitamin A ghi trên nhãn, tính theo Retinol ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$), theo công thức:

$$\text{Kết quả} = (r_U / r_S) \times (C_S / C_U) \times 100$$

r_U là đáp ứng pic của Este All-tran-Retinyl Palmitate từ dung dịch thử.

r_S là đáp ứng pic của Este All-tran-Retinyl Palmitate từ

dung dịch chuẩn.

C_S = nồng độ Retinol ($C_{20}H_{30}O$) trong dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

C_U = nồng độ danh nghĩa của vitamin A, tính theo Retinol ($C_{20}H_{30}O$), trong dung dịch thử ($\mu\text{g/ml}$).

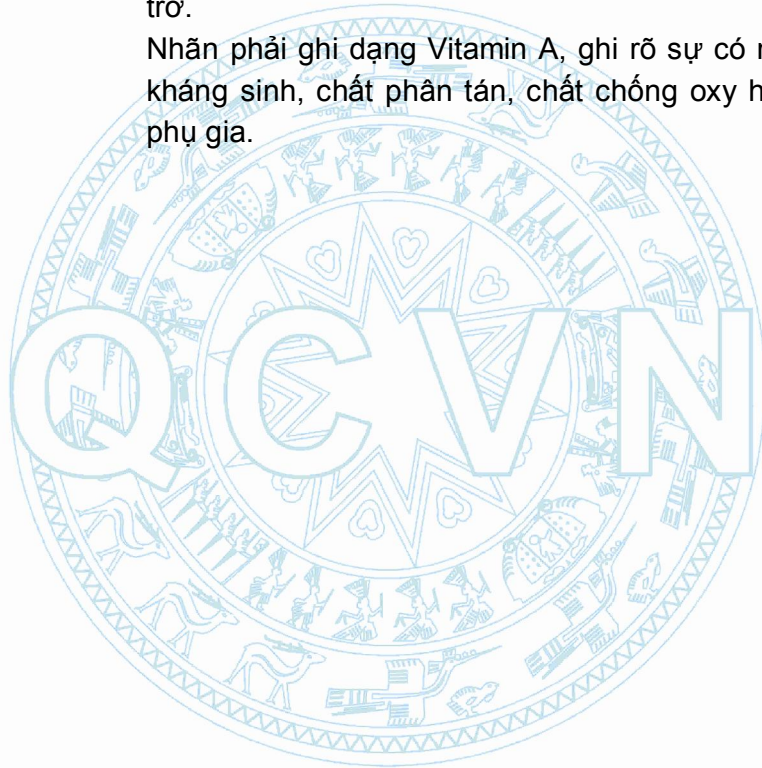
Sử dụng giá trị 0,872 để chuyển đổi Retinyl Acetate thành tương đương Retinol.

Sử dụng giá trị 0,546 để chuyển đổi Retinyl Palmitate thành tương đương Retinol.

**6. Bao gói
và bảo quản**

Giữ ở nơi mát, trong bao bì kín, tránh ánh sáng trong khí trời.

Nhãn phải ghi dạng Vitamin A, ghi rõ sự có mặt của chất kháng sinh, chất phân tán, chất chống oxy hóa, các chất phụ gia.



PHỤ LỤC 4

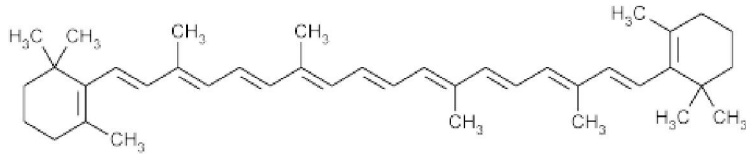
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI β -CAROTEN

1. Định nghĩa

Tên hóa học β -Caroten

Công thức hóa học $C_{40}H_{56}$

Công thức phân tử



Khối lượng phân tử 536,88

CAS 7235-40-7

2. Cảm quan Dạng rắn hoặc lỏng.

3. Chức năng Bổ sung Vitamin A vào thực phẩm.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1. Định tính

Độ tan Không tan trong nước, axit; kiềm. Nhưng tan trong Cacbon disunfit và Clorofom, tan ít trong Ete, Hexane; dầu thực vật; không tan trong Methanol và Ethanol.

Phổ hấp thụ tử ngoại

- Phổ hấp thụ UV của dung dịch thử có vai ở 427 nm, đỉnh hấp thụ cực đại ở 455 nm, đỉnh hấp thụ cực đại khác ở 483 nm. Tỷ lệ A_{455}/A_{483} ở giữa 1,14 và 1,18.
- Thời gian lưu của pic cực đại của dung dịch thử tương ứng với thời gian lưu của dung dịch chuẩn, xác định trong phần phương pháp thử hàm lượng β -Caroten.

4.2. Độ tinh khiết

- Tro còn lại sau nung Không nhiều hơn 2%.

Hàm lượng nước Không nhiều hơn 8% đối với chế phẩm rắn, không nhiều hơn 1% đối với chế phẩm lỏng.

Hàm lượng Alpha Caroten: Không nhiều hơn 1%.

Hàm lượng từng thành phần tương đương khác Không nhiều hơn 1%

Tổng hàm lượng các thành phần tương đương Không nhiều hơn 5%

khác.

4.3 Hàm lượng

Không ít hơn 95% và không nhiều hơn 130% lượng β -Caroten tổng ghi trên nhãn tính theo $C_{40}H_{56}$ trong chế phẩm khan.

Chứa không ít 95% All-trans- β -Caroten so với tổng hàm lượng β -Caroten.

5. Phương pháp thử

5.1. Định tính

Độ tan

Khả năng tan của một chất là chất thử hòa tan được trong dung môi tạo thành một dung dịch trong, đồng nhất, không còn những phần tử của chất thử.

Tiến hành: Cho dung môi vào chất thử ở nhiệt độ 25 ± 2 °C trong 30 giây, cứ cách 5 phút lại lắc 30 giây.

Độ tan được biểu thị như sau:

| Độ tan | Số ml dung môi hòa tan 1 g chất thử |
|-------------------|-------------------------------------|
| Rất tan | Dưới 1 |
| Dễ tan | 1-10 |
| Tan | 10-30 |
| Hơi tan | 30-100 |
| Khó tan | 100-1 000 |
| Rất khó tan | 1 000-10 000 |
| Thực tế không tan | Trên 10 000 |

Quang phổ

A. Dung dịch thử: Chuyển 5 ml dung dịch thử gốc A và dung dịch thử gốc B chuẩn bị như phần phương pháp thử ở phần xác định hàm lượng Carotenoid tổng vào bình định mức 100 ml, pha loãng bằng cyclohexan tới vạch.

Ghi phổ UV-VIS từ 300-600 nm. Xác định độ hấp thụ của dung dịch B ở 455nm và ở 483 nm.

B. Tiến hành như phần xác định hàm lượng β -Caroten.

5.2. Độ tinh khiết

Tro còn lại sau khi nung

Nung chén nung (bằng silica, plati, thạch anh hoặc sứ) ở $600^{\circ}\text{C} \pm 50^{\circ}$ trong 30 phút, làm nguội trong bình hút ẩm, cân khối lượng. Cân chính xác 1 g mẫu vào chén nung. Làm ẩm mẫu với 1 ml Axit Sulfuric, đun cho tới khi mẫu bị hóa than, làm nguội, thêm 1 ml Axit Sulfuric, đun cho tới khi không còn khói trắng bay ra, nung ở $600^{\circ}\text{C} \pm 50^{\circ}$ cho tới khi mẫu bị đốt hoàn toàn (không tạo thành ngọn lửa trong quá trình thí nghiệm). Làm nguội trong bình hút

ẩm, cân và tính phần trăm tro.

Nếu lượng tro còn lại vượt quá giới hạn quy định, lặp lại mẫu, làm ẩm với axit Sulfuric và nung, thời gian nung 30 phút, cho đến khi hai lần cân tro liên tiếp không chênh lệch nhiều hơn 0,5 mg hoặc cho đến khi tỷ lệ phần trăm tro còn lại phù hợp với giới hạn trong chuyên khảo.

Tiến hành nung trong tủ hút.

Hàm lượng nước

Thử theo TCVN 2309:2009 (ISO 760: 1978)

Hàm lượng Alpha Caroten Pha động, dung dịch phù hợp hệ thống, dung dịch thử và các thành phần tương và hệ thống sắc ký tiến hành theo quy trình xác định đương khác. hàm lượng β-Caroten.

Tiến hành: Tiến hành đối với dung dịch thử, thể tích tiêm là 20μl.

Phần trăm α-Caroten và các thành phần khác theo công thức:

$$\text{Kết quả} = (r_u/r_t) \times 100$$

Trong đó:

r_u là diện tích pic của α-Caroten hoặc các thành phần khác.

r_t là tổng diện tích pic của tất cả các pic.

5.3. Định lượng

Hàm lượng β-Caroten

Sử dụng dụng cụ thủy tinh tối màu.

Pha động: Cân 50 mg Butylate hydroxytoluen vào bình định mức 1 lít, hòa tan với 20 ml 2-Propanol. Thêm 0,2 ml n-Etyldi-isopropylamin, 25 ml dung dịch Ammonium acetate 0,2%, 455 ml Acetonitrile, 450ml Methanol. Để ở nhiệt độ phòng, thêm Methanol tới vạch định mức, trộn đều.

Dung môi pha loãng: 50μg/ml Butylat hydroxytoluen trong Alcohol.

Dung dịch phù hợp hệ thống: Chuyển 20 mg β-Caroten chuẩn vào bình định mức 50 ml. Thêm 1 ml nước cất, 4 ml Tetrahydrofuran, và siêu âm trong 5 phút, làm nguội tới nhiệt độ phòng, lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Dung dịch chuẩn gốc: 60μg/ml chất chuẩn β-Caroten trong Tetrahydrofuran.

Dung dịch chuẩn A: Chuyển 5,0 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 100 ml, thêm 5 ml Tetrahydrofuran và pha loãng với dung môi pha loãng đến vạch định mức. Nồng độ All-trans- β -caroten trong dung dịch này được xác định bằng quy trình đo quang sử dụng dung dịch chuẩn B.

Dung dịch chuẩn B: Chuyển 5 ml dung dịch chuẩn gốc vào bình định mức 100 ml, pha loãng bằng Cyclohexan tới vạch định mức. Chuẩn bị 3 lần mẫu.

* Xác định hàm lượng β -Caroten tổng (mg/ml) tính theo All-trans- β -caroten ($C_{40}H_{56}$) trong dung dịch chuẩn B:

Điều kiện thiết bị: Máy quang phổ, bước sóng phân tích ở 457 nm, cuvet dày 1 cm, sử dụng Cyclohexan làm mẫu trắng. Tiến hành đo với dung dịch chuẩn B.

Hàm lượng β -Caroten tổng (mg/ml) tính theo All-trans- β -caroten ($C_{40}H_{56}$) trong dung dịch chuẩn B:

$$\text{Kết quả} = A/F.$$

Trong đó:

A là độ hấp thụ trung bình của 3 mẫu dung dịch B.

F là độ hấp thụ của All-trans- β -caroten tinh khiết trong Cyclohexan = 250,5.

Dung dịch thử gốc A (đối với dạng rắn): Chuyển lượng mẫu tương đương với 10 mg β -Caroten vào bình định mức 250 ml, thêm 250 mg Butylat hydroxytoluen, 0,5 ml Protease kiềm R, thêm 15 ml nước cất. Nghiêng bình đều để làm ướt toàn bộ các chất. Siêu âm dung dịch ở 50° trong 30 phút, lắc dịch trong 10 phút. Thêm 100 ml Alcohol, lắc mạnh. Thêm 135 ml Methylene Chloride, lắc lại. Để hỗn hợp trong tối cho tới nhiệt độ phòng (khoảng 2 h). Pha loãng với Methylene Chloride tới vạch định mức, lắc mạnh, để dịch ở trong tối.

Dung dịch thử gốc B: (đối với dạng dịch lỏng trong dầu): Chuyển lượng mẫu tương đương với 20 mg β -Caroten vào bình định mức 250 ml. Thêm 250 mg Butylate Hydroxytoluen, 120 ml Methylene Chloride, và 100 ml Alcohol. Lắc bình cho tới khi mẫu hòa tan hoàn toàn. Để hỗn hợp trong tối cho tới nhiệt độ phòng (2h). Thêm Methylene Chloride tới vạch định mức, lắc mạnh lại.

Dung dịch thử: Chuyển 5 ml dung dịch thử gốc A hoặc dung dịch thử gốc B vào trong bình định mức 50 ml, hòa

tan với hỗn hợp Methylene Chloride và dung môi pha loãng (1:1) tới vạch định mức. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Điều kiện sắc ký: Mode: LC ; Detector: UV 448 nm; Cột : 4,6 mm x25 cm, 5 μ m chứa L68; Nhiệt độ cột 30 $^{\circ}$; Tốc độ dòng 0,6 ml/ phút; Cỡ mẫu tiêm: 20 μ l.

Yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống: Thời gian lưu tương đối của các thành phần trong dung dịch phù hợp hệ thống được liệt kê trong bảng sau:

| Chất phân tích | Thời gian lưu tương đối | Hệ số đáp ứng tương đối |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| All-trans- α -caroten | 0,93 | 1,1 |
| All-trans- β -caroten | 1,00 | 1,0 |
| 9-Cis- β -caroten | 1,07 | 1,0 |
| 13-Cis- β -caroten | 1,17 | 1,2 |
| 15-Cis- β -caroten | 1,21 | 1,4 |

Yêu cầu:

- *Độ tương đồng sắc ký đồ:* Sắc ký đồ của dung dịch phù hợp hệ thống tương tự với các sắc khí đồ tham chiếu.
- *Độ phân giải:* không ít hơn 1,5 giữa β -Caroten và α -Caroten; giữa β -Caroten và 9-Cis- β -caroten của dung dịch phù hợp hệ thống.
- *Hệ số đối xứng:* không nhiều hơn 2,0 đối với pic β -Caroten của dung dịch chuẩn A.
- *Độ lệch chuẩn tương đối:* không nhiều hơn 2% đối với pic β -Caroten từ các lần tiêm lặp lại của dung dịch chuẩn A.

Tiến hành:

Tiến hành đối với dung dịch chuẩn A và dung dịch thử. (Hệ số đáp ứng tương đối đối của 13-Cis- β -caroten và 15-Cis- β -caroten là 1,2 và 1,4).

Ghi các sắc ký đồ, xác định các pic của các chất phân tích trong sắc ký đồ của dung dịch thử bằng cách so sánh với pic trong sắc ký đồ của dung dịch phù hợp hệ thống. Xác định các diện tích pic.

Kết quả: Phần trăm β -Caroten tổng trong mẫu theo công thức:

$$\text{Kết quả} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

r_s = diện tích pic của All-trans- β -caroten từ dung dịch chuẩn A.

r_u = [(diện tích pic của All-trans- β -caroten) + (diện tích pic của 9-Cis- β -caroten) + (diện tích pic của 13-Cis- β -caroten x 1,2) + (diện tích pic của 15-Cis- β -caroten x 1,4) + tổng diện tích pic của các dạng đồng phân cis khác của β -Caroten)] trong dung dịch thử.

C_s là nồng độ của All-trans- β -caroten trong dung dịch chuẩn A được xác định bằng quy trình đo quang (mg/ml).

C_u là nồng độ danh nghĩa của dung dịch thử (mg/ml).

Tính toán % All-trans- β -caroten trong mẫu theo công thức:

$$\text{Kết quả} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

Trong đó:

R_s = diện tích pic của All-trans- β -caroten từ dung dịch chuẩn A.

R_u = diện tích pic của All-trans- β -caroten trong dung dịch thử.

C_s là nồng độ của All-trans- β -caroten trong dung dịch chuẩn A được xác định bằng quy trình đo quang (mg/ml).

C_u là nồng độ danh nghĩa của dung dịch thử (mg/ml).

Đơn vị tính:

1 UI Vitamin A = 0,6 mcg β -Caroten

1mcg Retinol = 1 mcg RAE

1 mcg RAE = 2 mcg supplemental β -Caroten

1 mcg RAE = 12 mcg β -Caroten

1 mcg RAE = 24 mcg α -Caroten

RAE viết tắt của từ Retinol Activity Equivalen.

6. Yêu cầu bao gói và bảo quản trong vật chứa kín, tránh oxy. Lưu kho ở nơi mát.

Nhãn ghi tên và hàm lượng của các chất mang, chất chống oxy hóa, hàm lượng Carotenoid tổng theo β -Caroten.

