

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11063:2016

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM CHỨC NĂNG –
XÁC ĐỊNH TỔNG HÀM LƯỢNG ISOFLAVON ĐẬU TƯƠNG
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Dietary supplements – Determination of total soy isoflavones content
by high performance liquid chromatographic method*

HÀ NỘI – 2016

Lời nói đầu

TCVN 11063:2016 được xây dựng trên cơ sở AOAC 2008.03 *Total soy isoflavones in dietary supplements, supplement ingredients, and soy foods. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*;

TCVN 11063:2016 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm chức năng – Xác định tổng hàm lượng isoflavon đậu tương bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

*Dietary supplements – Determination of total soy isoflavones content
by high performance liquid chromatographic method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector UV để xác định hàm lượng từng isoflavon và tổng hàm lượng isoflavon có nguồn gốc từ đậu tương trong nguyên liệu và sản phẩm thực phẩm chức năng.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho thực phẩm chức năng và các sản phẩm khác có chứa cỏ ba lá đỏ (*Trifolium pratense* L.) hoặc sắn dây [*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi] vì chúng chứa một số loại isoflavon không có trong đậu tương. Các thực phẩm chức năng chứa apigenin không xác định được vì trong phương pháp này apigenin được sử dụng làm chất chuẩn nội.

Giới hạn định lượng của phương pháp đối với hàm lượng isoflavon tổng số là 0,5 mg/g.

2 Nguyên tắc

Mẫu thử được bổ sung chất chuẩn nội và chiết bằng hỗn hợp axetonitril (3.1) : nước : dimetyl sulfoxit (3.4) (tỉ lệ thể tích 58,5 : 39,0 : 2,5) ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 h. Dịch chiết được pha loãng với nước để làm giảm nồng độ dung môi hữu cơ, sau đó được ly tâm, lọc để loại bỏ các chất không tan. Phân tích dịch thu được trên hệ thống HPLC với detector UV tại bước sóng 260 nm, pha tĩnh là cột C18 pha đảo, pha động là hỗn hợp axetonitril : nước, rửa giải theo gradient. Tổng hàm lượng isoflavon được tính từ 12 chất: malonyl daidzin, malonyl glycitin, malonyl genistin, axetyl daidzin, axetyl glycitin, axetyl genistin, daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein, genistein. Đường lượng aglycon của daidzein, glycitein, genistein cũng được tính từ 12 chất trên. Sử dụng ba chất chuẩn isoflavon glucosid và ba chất chuẩn isoflavon aglycon. Hệ số đáp ứng của isoflavon dạng malonyl và axetyl được tính từ hệ số đáp ứng của isoflavon glucosid.

TCVN 11063:2016

3 Thuốc thử

Tất cả thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích, dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao hoặc có chất lượng tương đương. Nước sử dụng là nước đã loại ion, được lọc qua màng lọc 0,45 µm hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Axetonitril.

3.2 n-Hexan.

3.3 Axit phosphoric, 85 %.

3.4 Dimetyl sulfoxit (DMSO) (≥ 99,9 %).

3.5 Dung môi pha loãng

Thêm 400 ml axetonitril (3.1) vào 600 ml nước, trộn kỹ.

Có thể sử dụng dung môi pha loãng này để tráng kim bơm mẫu cho bộ phận bơm mẫu tự động hoặc để rửa kim giữa các lần bơm mẫu bằng tay.

3.6 Pha động

a) Kênh A: Pha 1 ml axit phosphoric (3.3) trong 2 lít nước, trộn kỹ, loại khí và lọc trước khi dùng, nếu cần.

b) Kênh B: Axetonitril (3.1).

3.7 Chất chuẩn isoflavon đậu tương, dạng glucosid: daidzin, glycitin, genistin, dạng aglycon: daidzein, glycitein, genistein và chất chuẩn nội apigenin, sử dụng độ tinh khiết của các chất trong giấy chứng nhận chất lượng của chất đó để hiệu chỉnh nồng độ của các dung dịch chuẩn.

CHÚ THÍCH: Các chất chuẩn malonyl isoflavon và axetyl isoflavon không ổn định trong dung dịch và phải sử dụng trong vòng 4 h sau khi pha. Vì vậy các chất chuẩn này chỉ dùng để xác định các pic của malonyl isoflavon và axetyl isoflavon (xem 6.2.2), không sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Để xác định các malonyl isoflavon và axetyl isoflavon trong mẫu thử, cần sử dụng các chất chuẩn isoflavon glucosid.

3.8 Dung dịch chuẩn

3.8.1 Dung dịch chuẩn nội

Cân 0,2 g apigenin (3.7), chính xác đến 0,01 mg, cho vào lọ màu nâu (4.5), thêm chính xác 100 ml DMSO (3.4) vào, lắc đều cho tan hết và đậy nắp kín. Dung dịch chuẩn nội đã pha có thể ổn định ít nhất 6 tháng ở nhiệt độ phòng.

Dung dịch chuẩn nội này có thể sử dụng cho khoảng 200 mẫu thử. Nếu phân tích lượng mẫu lớn hơn thì cần chuẩn bị lượng chất chuẩn nội lớn hơn. Phải sử dụng cùng một mẻ dung dịch chuẩn nội cho các chuẩn và các mẫu thử trong cùng một dãy phân tích.

3.8.2 Dung dịch chuẩn gốc

Cân 100 mg daidzin, 25 mg glycitin, 100 mg genistin, 10 mg daidzein, 10 mg glycitein, 10 mg genistein (3.7), chính xác đến 0,01 mg, cho vào bình định mức 50 ml (4.7) (ghi lại khối lượng sau mỗi lần thêm chất chuẩn và tính khối lượng mỗi chất chuẩn được thêm vào). Thêm khoảng 30 ml DMSO (3.4), lắc bình trong khoảng 5 min cho các chất chuẩn tan hết rồi thêm DMSO đến vạch và lắc đều.

Bảo quản dung dịch chuẩn gốc trong lọ thủy tinh màu nâu (4.5), nắp kín. Dung dịch chuẩn gốc đã pha có thể ổn định ít nhất 6 tháng ở nhiệt độ phòng.

3.8.3 Dung dịch chuẩn làm việc

Dùng pipet (4.15) lấy các thể tích chính xác dung dịch chuẩn gốc (3.8.2) và dung dịch chuẩn nội (3.8.1) cho vào ống nghiệm thủy tinh (4.8) như Bảng 1. Thêm dung môi pha loãng (3.5) đến 20 ml.

Bảng 1 – Chuẩn bị các dung dịch chuẩn làm việc

Số	Dung dịch chuẩn gốc (3.8.2), ml	Dung dịch chuẩn nội (3.8.1), ml	Dung môi pha loãng (3.5), ml
Trắng	0	0,5	19,5
1	0,5	0,5	19,0
2	1,0	0,5	18,5
3	1,5	0,5	18,0
4	2,0	0,5	17,5
5	2,5	0,5	17,0

Chuyển dung dịch chuẩn làm việc đã chuẩn bị sang các lọ màu nâu 25 ml (4.6). Dung dịch chuẩn đã pha có thể ổn định ít nhất 2 tháng ở nhiệt độ phòng.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

TCVN 11063:2016

4.1 Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao, gồm bộ loại khí dung môi, bơm gradient 2 kênh, gradient hỗn hợp, bộ bơm mẫu có thể bơm 5 µl (bơm mẫu tự động hoặc bơm mẫu bằng tay), buồng cột, detector UV tại bước sóng 260 nm và hệ thống phân tích dữ liệu.

4.2 Cột phân tích HPLC

Cột HPLC pha đảo silica dẫn xuất octadecylsilan (ODS, C18) (từ 15 % đến 20 %) đã được khóa đuôi, với cỡ lỗ từ 100 Å đến 125 Å, kích thước 250 mm x 3 mm hoặc 250 mm x 4,6 mm, hạt nhồi cỡ 5 µm hoặc loại tương đương.

CHÚ THÍCH: Các cột có chiều dài 150 mm với cỡ hạt nhồi nhỏ hơn (< 3,5 µm) cũng có thể cho độ phân giải tương đương.

4.3 Cột bảo vệ, sử dụng cột C18 có thể tích chết nhỏ.

4.4 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 mg.

4.5 Lọ thủy tinh màu nâu, dung tích 125 ml, có nắp đậy kín.

4.6 Lọ thủy tinh màu nâu, dung tích 25 ml.

4.7 Bình định mức, dung tích 50 ml.

4.8 Ống nghiệm thủy tinh, có nắp kín, kích thước 20 mm x 125 mm.

4.9 Máy lắc, tốt nhất là loại có thể xoay hoặc lắc đảo chiều.

4.10 Máy ly tâm, có thể ly tâm ống nghiệm 20 mm x 125 mm với gia tốc 200 g.

4.11 Màng lọc xyranh, làm bằng polyvinyliden florua (PVDF), đường kính 13 mm hoặc 25 mm, cỡ lỗ 0,45 µm.

CHÚ THÍCH: Có thể dùng màng polypropylen (PP) ưa nước hoặc polytetrafluetylen (PTFE) nhưng không được dùng màng lọc nylon.

4.12 Xyranh, bằng chất dẻo, dung tích 3 ml hoặc 5 ml.

4.13 Lọ HPLC, phù hợp với bộ bơm mẫu của máy HPLC.

4.14 Chày và cối.

4.15 Pipet các loại, có thể phân phối chính xác 0,5 ml.

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không được quy định trong tiêu chuẩn này.

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

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị dung dịch thử

Các mẫu rắn cần được nghiền nhỏ bằng chày, cối (4.14) và trộn kỹ.

Cân khoảng 1 g protein đậu tương hoặc các sản phẩm đậu tương khác, tương ứng với khoảng 20 mg isoflavon đậu tương đậm đặc (chứa 40 % isoflavon) hoặc một lượng (không lớn hơn 1 g) chứa từ 8 mg đến 10 mg isoflavon tổng số cho vào ống nghiệm (4.8). Dùng cân phân tích có thể đọc đến 0,01 mg (4.4) để cân các mẫu isoflavon nồng độ cao (chứa từ 10 % đến 100 % isoflavon) hoặc các mẫu nguyên liệu đậm đặc. Lượng mẫu lấy không được vượt quá 10 mg tổng isoflavon vì độ tan của các isoflavon trong dung môi chiết bị hạn chế.

Thêm chính xác 0,500 ml dung dịch chuẩn nội (3.8.1) vào ống nghiệm, lắc nhẹ để thấm ướt mẫu. Thêm 8,00 ml axetonitril (3.1), lắc hoặc xoay ống để phần chất rắn phân tán hoàn toàn. Thêm 5,00 ml nước, đập nút và trộn. Không để mẫu dính trên thành ống nghiệm, lắc xoáy nhẹ nếu cần.

Trộn trong thời gian 60 min bằng máy lắc (4.9) hoặc trộn đảo chiều ống nghiệm vài lần trong mỗi khoảng thời gian ít nhất là 5 min. Bước này không cần thiết nếu mẫu tan hoàn toàn khi trộn ban đầu.

Thêm 6,5 ml nước, lắc đều cho đồng nhất.

Ly tâm với gia tốc 200 g trong 10 min để tách phần không tan (bỏ qua bước này nếu mẫu tan hoàn toàn trong dung môi chiết).

Lấy phần dịch phía trên, lọc qua màng lọc 0,45 µm (4.11), cho vào lọ HPLC (4.13).

LƯU Ý: Các mẫu chứa một lượng axetyl và malonyl isoflavon nên được phân tích trong vòng 4 h sau khi chiết vì malonyl và axetyl không bền trong dung dịch.

6.2 Xác định bằng HPLC

6.2.1 Điều kiện vận hành HPLC

- Gradient pha động: ban đầu 10 % pha động B, tăng dần lên 30 % pha động B sau 60 min, nửa 3 min với 90 % pha động B, cân bằng 10 min ở mức 10 % pha động B;
- Detector: UV-Vis ở bước sóng 260 nm;
- Thể tích mẫu bơm: 5 µl (không sử dụng thể tích bơm lớn hơn 5 µl);

TCVN 11063:2016

- Tốc độ dòng: 1,5 ml/min đối với cột có đường kính 4,6 mm và 0,65 ml/min đối với cột 3 mm;
- Nhiệt độ cột: 40 °C.

6.2.2 Nhận biết malonyl isoflavon và axetyl isoflavon

Nếu có sẵn các chuẩn malonyl isoflavon và axetyl isoflavon thương mại thì chuẩn bị các dung dịch chuẩn tương tự như với các dung dịch chuẩn isoflavon glucosid. Nếu không có sẵn các chuẩn malonyl isoflavon và axetyl isoflavon thì có thể sử dụng phương pháp so sánh sắc đồ của mẫu thử với sắc đồ của các sản phẩm đậu tương đã biết có hàm lượng cao các dạng malonyl isoflavon và/hoặc axetyl isoflavon. Quy trình này dựa trên thực tế là các dạng tự nhiên của isoflavon trong đậu tương là dạng malonyl và các dạng malonyl này có thể bị biến đổi thành các dạng axetyl.

a) Chuẩn bị mẫu thử

Nghiền từng lượng nhỏ đậu tương hạt (khoảng 5 g đến 10 g) hoặc các sản phẩm đậu tương dạng khô đã chế biến (ví dụ: bột đậu tương có hoạt độ enzym cao) và loại chất béo. Chuyển bột đã nghiền vào ống nghiệm nhựa 50 ml có nắp kín và thêm 30 ml hexan (3.2). Vặn nắp ống và lắc trong thời gian 1 min đến 2 min. Để lắng rồi gạn bỏ phần dịch lỏng. Thêm tiếp 10 ml hexan vào ống nghiệm, vặn nắp, lắc trong thời gian 1 min đến 2 min và để lắng, gạn bỏ dịch lỏng. Chuyển phần bột ướt vào bình thủy tinh để quan sát và để cho hexan bay hơi hết, thực hiện trong tủ hút.

Chia phần bột khô này thành hai phần. Đun nóng một phần trên một đĩa không sâu trong tủ sấy ở 110 °C đến 120 °C trong khoảng thời gian từ 2 h đến 20 h để khử nhóm carboxyl của một số dạng malonyl thành dạng axetyl. Chiết cả hai mẫu này theo 6.1 và phân tích trên HPLC theo 6.2.1.

b) Xác định thời gian lưu của các dạng malonyl isoflavon và axetyl isoflavon

Xác định thời gian lưu của 6 hợp chất isoflavon đã biết và của chất chuẩn nội từ lần phân tích chuẩn ngay trước đó. Xác định thời gian lưu của các dạng malonyl isoflavon và axetyl isoflavon bằng cách so sánh sắc đồ thu được từ chất phân tích trên như sau:

Nhận biết các pic malonyl daidzin, malonyl glycitin và malonyl genistin từ sắc đồ của phần sản phẩm đậu tương không đun nóng. Malonyl daidzin là pic đầu tiên ngay sau pic genistin và có thời gian lưu khoảng 25 min. Malonyl glycitin ngay sau pic malonyl daidzin (khoảng 26,5 min) và có kích thước khoảng 25 % đến 30 % pic malonyl daidzin. Malonyl genistin là pic lớn nhất trên sắc đồ và được rửa giải gần với daidzin tại phút thứ 33,5. Ghi lại thời gian lưu của malonyl daidzin, malonyl glycitin và malonyl genistin từ sắc đồ của phần sản phẩm đậu tương không đun nóng.

Nhận biết các pic axetyl isoflavon từ sắc đồ phần sản phẩm đậu tương đã đun nóng. Axetyl daidzin là pic lớn đầu tiên của sắc đồ theo sau malonyl glycitin, được tách ra ở phút thứ 31,5. Axetyl glycitin được rửa giải gần với (thường là ngay trước) malonyl genistin và có diện tích khoảng 25 % đến 30 % diện tích pic

axetyl daidzin. Sự phân tách của axetyl glycitin khỏi malonyl genistin là thông số quan trọng của phương pháp này. Pic axetyl genistin là pic lớn nhất của sắc đồ và có thời gian lưu từ 41 min đến 42 min.

6.2.3 Kiểm soát hiệu năng cột và hệ thống HPLC

Quy trình này được quy định để đánh giá chất lượng cột HPLC hoặc hệ thống trước khi được sử dụng cho mục đích phân tích.

a) Pic daidzin chẻ

Chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc theo 3.8.3, sử dụng chuẩn làm việc số 3, bơm 5 μ l vào cột HPLC. Xem xét cẩn thận pic daidzin. Pic này phải đối xứng và không xuất hiện thêm vai pic hoặc một đường thẳng trên đỉnh pic. Nếu các hiện tượng này xuất hiện cho thấy thể tích bơm quá lớn. Kiểm tra phần cài đặt thể tích bơm có phải là 5 μ l không. Nếu sử dụng vòng loop bơm mẫu, nguyên nhân có thể do thể tích chết (nơi tiếp xúc của vòng loop tiếp xúc bộ phận bơm mẫu) quá lớn, cần thay thế vòng loop. Sử dụng các cột sắc ký có đường kính lớn hơn (4,6 mm hoặc 3 mm) cũng có thể giải quyết được vấn đề này.

b) Khả năng rửa giải của chất chuẩn nội

Kiểm tra các pic genistein và apigenin trên cùng một sắc đồ. Xác định thời gian lưu của chất chuẩn nội apigenin với mẫu trắng được chuẩn bị cùng với các dung dịch chuẩn làm việc. Apigenin và genistein phải tách rời nhau và tách với các pic khác ($R > 1,4$).

c) Khả năng phân giải của axetyl glycitin, malonyl genistin và daidzein

Chuẩn bị một mẫu sản phẩm đậu tương đã được đun nóng theo 6.2.2. Chuẩn bị và phân tích mẫu, đảm bảo các pic của axetyl glycitin, malonyl genistin và daidzein phân tách hoàn toàn khỏi các pic khác.

Các cột sắc ký HPLC không đủ khả năng tách các chất này thì không phù hợp để sử dụng. Một số cột HPLC sẽ thay đổi thứ tự rửa giải của các pic, các cột được sử dụng nếu có thể nhận biết đúng các pic và các pic đó hoàn toàn phân tách.

6.2.4 Thử tính thích hợp của hệ thống

Tính thích hợp của hệ thống là một yêu cầu bắt buộc để đảm bảo hệ thống HPLC hoạt động đúng.

a) Kiểm tra nhiễm chéo

Bơm dung dịch chuẩn làm việc số 5 rồi bơm mẫu trắng. Kiểm tra cẩn thận các pic nhiễm chéo đối với mẫu trắng. Tính độ nhiễm chéo của các pic trong sắc đồ mẫu trắng theo phần trăm so với trong mẫu chuẩn số 5.

TCVN 11063:2016

b) Độ tuyến tính của đường chuẩn

Phân tích 5 điểm chuẩn làm việc và dựng đường chuẩn. Hệ số tương quan tuyến tính (R^2) của mỗi chất chuẩn phải lớn hơn 0,9990. Nếu không đạt được độ tuyến tính này thì chuẩn bị lại các dung dịch chuẩn làm việc mới.

c) Độ lặp lại của hệ thống

Phân tích lặp lại 5 lần dung dịch chuẩn làm việc số 3. Tính lại nồng độ của mỗi lần phân tích và tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (SD), độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Giá trị RSD của các pic phải nhỏ hơn 0,2 %. Nếu RSD > 0,5 % thì hệ thống không thể sử dụng.

6.2.5 Dựng đường chuẩn

Sau khi thiết bị đã ổn định, bơm lần lượt các dung dịch chuẩn làm việc (3.8.2) lên phân tích trên hệ thống HPLC.

Xác định diện tích hoặc chiều cao pic của các chuẩn trên sắc đồ, dựng đường chuẩn dựa vào tỉ lệ diện tích hoặc chiều cao pic của mỗi isoflavon với diện tích hoặc chiều cao pic chất chuẩn nội và nồng độ chuẩn làm việc tương ứng.

6.2.6 Phân tích mẫu thử

Bơm mẫu thử với cùng điều kiện như bơm chuẩn, xác định tỉ lệ diện tích pic hoặc chiều cao chất phân tích so với chất chuẩn nội.

Dựa vào đường chuẩn, xác định hàm lượng các isoflavon có trong mẫu thử.

Nếu tỉ lệ diện tích pic hoặc chiều cao pic của mẫu lớn hơn tỉ lệ diện tích pic hoặc chiều cao pic của chuẩn cao nhất thì phải tiến hành pha loãng mẫu và bơm lại.

7 Tính kết quả

a) Tính hàm lượng mỗi isoflavon trong mẫu thử, X_i , bằng miligam trên gam (mg/g), theo Công thức (1):

$$X_i = \frac{C_i \times V_1}{w} \quad (1)$$

Trong đó:

V_1 là thể tích dịch chiết mẫu thu được sau khi pha loãng (xem 6.1) (ở đây $V_1 = 20$ ml);

w là khối lượng của mẫu thử, tính bằng gam (g);

C_i là nồng độ mỗi isoflavon trong dịch chiết, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml). Đối với các isoflavon glucosid và isoflavon aglycon, C_i xác định được từ đường chuẩn (6.2.5); đối với các malonyl isoflavon và axetyl isoflavon, C_i được xác định theo Công thức (2):

$$C_i = \frac{A_i}{A_{IS}} \times RF \times CF \tag{2}$$

Trong đó:

- A_i là diện tích pic của mỗi malonyl isoflavon hoặc mỗi axetyl isoflavon;
- A_{IS} là diện tích pic của chất chuẩn nội;
- RF là hệ số đáp ứng, được tính bằng nồng độ chất chuẩn nội chia cho tỉ lệ diện tích pic isoflavon và chất chuẩn nội;
- CF là hệ số chuyển đổi, theo Bảng 2.

Bảng 2 – Hệ số chuyển đổi từ isoflavon glucosid sang malonyl isoflavon và axetyl isoflavon

Chuẩn glucosid	Hệ số chuyển đổi axetyl isoflavon	Hệ số chuyển đổi malonyl isoflavon
Daidzin	1,101	1,207
Glycitin	1,094	1,193
Genistin	1,097	1,199

Ví dụ: Nếu hệ số RF của genistin là 200, diện tích pic malonyl genistin là 400 000, diện tích pic chất chuẩn nội là 1 000 000 thì nồng độ của malonyl genistin được tính:

$$C_{MG} = \frac{400\,000}{1\,000\,000} \times 200 \times 1,199$$

$$C_{MG} = 95,9 \text{ mg/ml}$$

- b) Tính tổng hàm lượng isoflavon, bằng miligam trên gam (mg/g), từ tổng hàm lượng của 12 dạng isoflavon trong mẫu.
- c) Tính đương lượng isoflavon aglycon từ các dạng aglycon, glucosid, axetyl glucosid, malonyl glucosid của mỗi isoflavon, sử dụng các hệ số chuyển đổi theo Bảng 3.

Bảng 3 – Hệ số chuyển đổi các dạng aglycon, glucosid, axetyl glucosid, malonyl glucosid về isoflavon aglycon

	isoflavon aglycon	Glucosid	Axetyl glucosid	Malonyl glucosid
Daidzein	1,000	0,611	0,555	0,506
Glycitein	1,000	0,637	0,582	0,534
Genistein	1,000	0,625	0,570	0,521

VÍ DỤ: Tính đương lượng daidzein, E_{daidzein} , theo công thức sau:

$$E_{\text{daidzein}} = C_{\text{daidzein}} + C_{\text{daidzin}} \times 0,611 + C_{\text{axetyl daidzin}} \times 0,555 + C_{\text{malonyl daidzin}} \times 0,506$$

Trong đó C_{daidzein} , C_{daidzin} , $C_{\text{axetyl daidzin}}$, $C_{\text{malonyl daidzin}}$ lần lượt là hàm lượng của các dạng aglycon, glucosid, axetyl glucosid, malonyl glucosid.

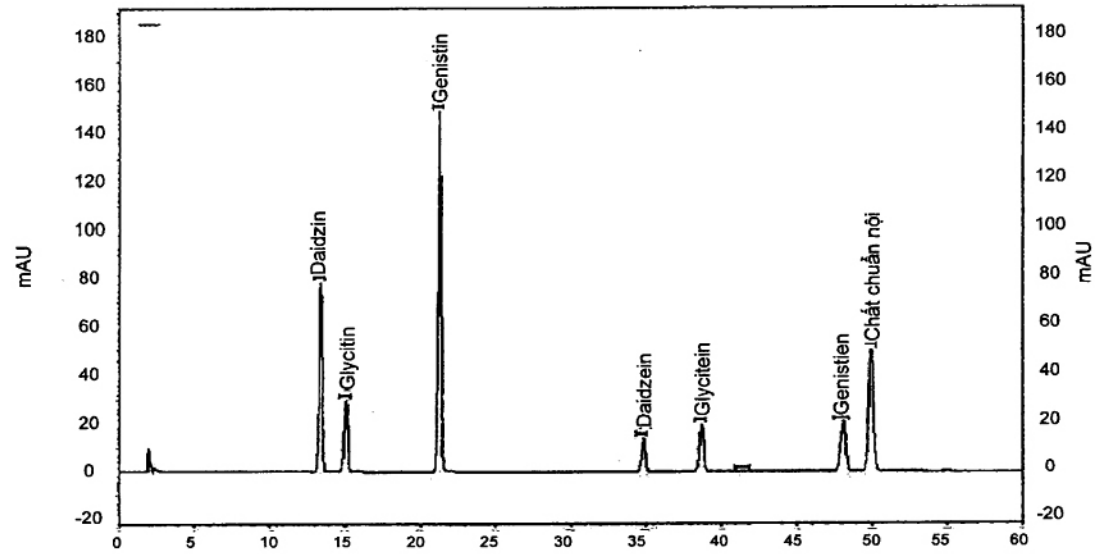
8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

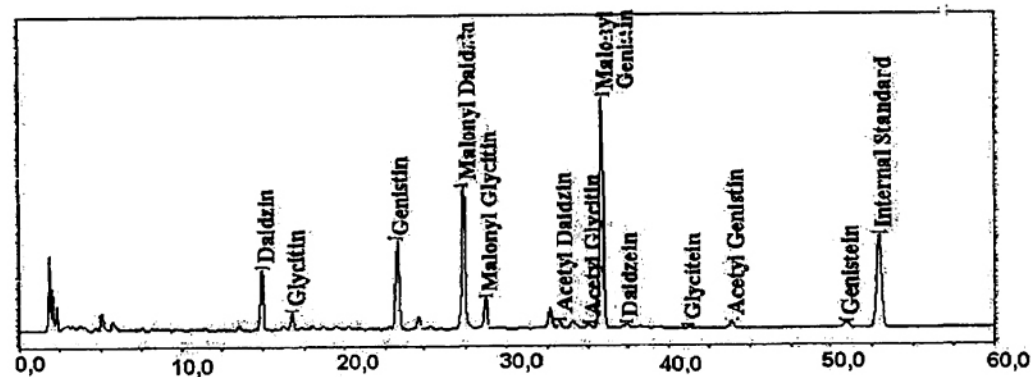
- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

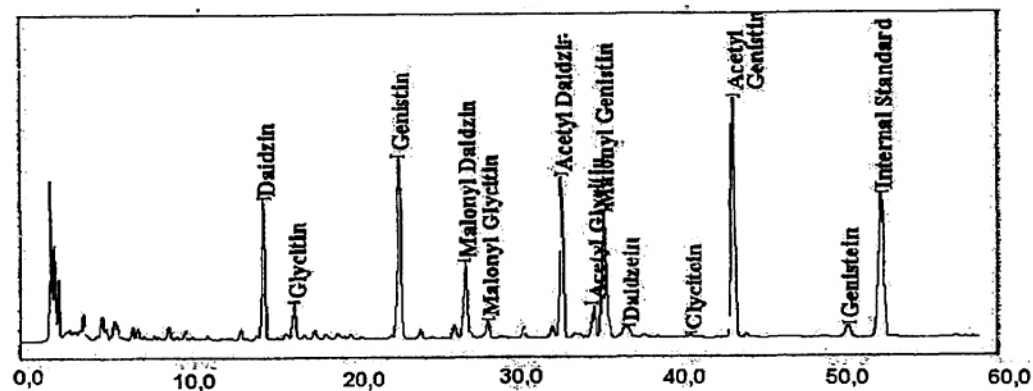
Ví dụ về sắc đồ



Hình A.1 – Sắc đồ của các chất chuẩn trên cột Waters YMC™ ODS-AM 250 mm x 3,0 mm, hạt nhồi cỡ 5 µm



a) Mẫu t đậm tương chưa gia nhiệt



n) Mẫu t đậm tương gia nhiệt qua đêm (20 h) ở 110 °C

Hình A.2 – Sắc đồ của malonyl isoflavon và axetyl isoflavon trên cột Waters YMC™ ODS-AM 250 mm x 3,0 mm, hạt nhồi cỡ 5 µm

Phụ lục B
(Tham khảo)

Kết quả phép thử liên phòng thử nghiệm

Mẫu	A-F	B-H	C-E	D-G	J	K-Q	L-P	M	N
Hàm lượng tổng isoflavon, mg/g									
Tổng số các phòng thử nghiệm tham gia, p	13	13	13	12	13	11	11	11	12
Tổng số các lần làm lặp lại, Sum(n(L))	25	25	26	23	13	22	21	11	12
Giá trị trung vị, $\bar{x}$	411,8	485,3	450,2	257,7	82,5	1,80	0,87	6,14	0,022
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	4,39	6,38	5,99	5,30		0,05	0,03		
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	9,44	11,35	12,00	6,73	3,31	0,11	0,08	0,30	0,040
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r	1,07	1,32	1,33	2,06		2,70	3,31		
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R	2,29	2,34	2,67	2,61	4,01	6,05	9,36	4,86	175
Giá trị HorRat	1,00	1,05	1,18	1,07	1,38	1,17	1,62	1,14	17,6
Hàm lượng tổng isoflavon aglycon, mg/g									
Tổng số các phòng thử nghiệm tham gia, p	13	13	13	12	13	11	11	11	12
Tổng số các lần làm lặp lại, Sum(n(L))	25	25	26	23	13	22	21	11	12
Giá trị trung vị, $\bar{x}$	256,1	302,9	279,7	160,3	51,32	1,03	0,53		
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	2,74	3,98	3,72	3,30		0,026	0,02	3,31	0,014
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	5,65	7,00	7,29	4,21	2,02	0,064	0,05		
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r	1,07	1,32	1,33	2,06		2,53	2,89	0,17	0,022
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R	2,21	2,31	2,61	2,63	3,94	6,22	9,00	5,16	164
Giá trị HorRat	0,90	0,97	1,08	1,00	1,26	1,10	1,44	1,10	15,2

Lưu ý: Các mẫu lặp lại A-F, B-H, D-G và L-P có một kết quả ngoại lệ bởi thử nghiệm Cochran đã được loại bỏ bằng phương pháp thống kê phân tích, mẫu mù lặp lại C-E không có kết quả ngoại lệ nào. Các kết quả phòng thử nghiệm 3 bị loại bởi thử nghiệm Single Grubb về mẫu lặp lại D-G, K-Q và L-P. Mẫu M của phòng thử nghiệm 5 bị loại bởi thí nghiệm Grubb. Phòng thử nghiệm 13 không có phương pháp cho mẫu K-N, P và Q. Kết quả của phòng thử nghiệm 13 trong các mẫu thực phẩm đậu tương bị loại bởi thống kê phân tích (mẫu lặp lại K-Q, L-P, M và N) bởi vì lượng mẫu không đủ để phân tích. Mẫu N có chứa quá ít isoflavon nên không đủ phân tích.