

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13277:2021

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ α -AMYLASE
BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ**

*Foodstuffs – Determination of α -amylase activity
by spectrophotometric method*

HÀ NỘI – 2021

Lời nói đầu

TCVN 13277:2021 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 2002.01
*Measurement of α -amylase activity in white wheat flour, milled malt, and
microbial enzyme preparations. Ceralpha assay;*

TCVN 13277:2021 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 – Xác định hoạt độ α -amylase bằng phương pháp quang phổ

Foodstuffs – Determination of α -amylase activity by spectrophotometric method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hoạt độ α -amylase trong bột mì trắng, bột mạch nha, chế phẩm enzym có nguồn gốc từ nấm và vi khuẩn bằng kỹ thuật quang phổ UV-VIS dựa trên đơn vị Ceralpha.

Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được nêu trong Phụ lục A.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

2.1

Đơn vị Ceralpha (Ceralpha unit)

CU

Lượng α -amylase xúc tác để giải phóng 1 μmol *p*-nitrophenol trong thời gian 1 min từ cơ chất *p*-nitrophenyl maltoheptaosidase bị khóa một đầu, ở nhiệt độ 40 °C, với sự có mặt của lượng dư α -glucosidase bền nhiệt.

3 Nguyên tắc

Mẫu thử được chiết bằng dung dịch muối hoặc dung dịch đệm ở nhiệt độ phòng hoặc ở 40 °C. Ly tâm hoặc lọc phần dịch chiết để thu được dịch trong, sau đó pha loãng. Phần dịch chiết đã pha loãng được ủ cùng hỗn hợp cơ chất trong điều kiện pH, nhiệt độ và thời gian xác định. Cơ chất là *p*-nitrophenyl maltoheptaoside (BPNPG7) bị khóa đầu không khử cùng các lượng dư α -glucosidase bền nhiệt. Nhóm bị khoá trong BPNPG7 ngăn sự thủy phân của cơ chất này do sự xúc tác của các *exo*-enzym như amyloglucosidase, α -glucosidase, hoặc β -amylase. Khi cơ chất bị phân tách do sự xúc tác của *endo*- α -amylase, nitrophenyl oligosaccharide bị thủy phân hoàn toàn thành *p*-nitrophenol và glucose tự do. Sau đó, tạo phản ứng màu phenolat bằng cách thêm dung dịch kiềm và đo độ hấp thụ ở bước sóng 400 nm.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, sử dụng nước cất hoặc nước đã khử ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Dung dịch đệm natri malat đậm đặc, 1 M, pH 5,4

Hòa tan 134,1 g axit malic, 70 g natri hydroxit, và 58,4 g natri clorua trong 900 mL nước. Thêm 6,0 g canxi clorua ngâm hai phân tử nước và hòa tan. Chỉnh pH đến 5,4 bằng cách thêm từng giọt natri hydroxit 4 M hoặc axit clohydric 4 M. Sau đó thêm 1,0 g natri azid để bảo quản.

CẢNH BÁO: Natri azid là chất độc và phải sử dụng theo hướng dẫn an toàn của nhà cung cấp.

CHÚ THÍCH: Việc thêm natri azid là tùy chọn. Natri azid được thêm vào như là một tác nhân kháng vi sinh vật.

Với sự có mặt của muối natri azid, dung dịch đệm này có thể ổn định ở nhiệt độ phòng hơn 1 năm. Nếu không thêm muối natri azid, dung dịch đệm ổn định ở nhiệt độ 4 °C trong khoảng 2 tuần.

4.2 Dung dịch đệm natri malat (dùng cho α -amylase có nguồn gốc từ ngũ cốc và nấm), 50 mM, pH 5,4

Pha loãng 50 ml dung dịch đệm natri malat đậm đặc (4.1) bằng nước đến 1 L. Bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 6 tháng nếu thêm natri azid. Dung dịch này ổn định ở 4 °C trong 1 tuần nếu không thêm natri azid.

4.3 Dung dịch đệm natri maleat (dùng cho α -amylase có nguồn gốc từ vi khuẩn), 0,1 M, pH 6,5

Hòa tan 23,2 g axit maleic và 11,6 g natri clorua trong 1 600 mL nước, chỉnh pH đến 6,5 bằng natri hydroxit 4 M (160 g/L). Thêm 0,6 g canxi clorua ngâm hai phân tử nước và 0,2 g natri azid. Pha loãng bằng nước đến 2 L. Dung dịch bền ở nhiệt độ phòng trong 6 tháng.

4.4 Dung dịch natri clorua (1 %, khối lượng/thể tích) kết hợp với canxi clorua (0,03 %, khối lượng/thể tích)

Hòa tan 10 g natri clorua và 0,3 g canxi clorua ngâm hai phân tử nước trong 1 L nước. Để tăng độ ổn định của dịch chiết α -amylase có nguồn gốc từ vi khuẩn, thêm albumin huyết thanh bò (BSA; 0,5 g/L) kết hợp với natri azid 0,2 g/L. Với sự có mặt của muối natri azid, dung dịch đệm này có thể ổn định ở nhiệt độ phòng trong 6 tháng. Nếu không thêm muối natri azid, dung dịch ổn định ở nhiệt độ phòng trong 6 h.

4.5 Thuốc thử dừng phản ứng (dung dịch trinitrat phosphat), 2 % (khối lượng/thể tích), pH 11,0

Hòa tan 20 g trinitrat phosphat (Na_3PO_4) trong 900 mL nước. Chỉnh đến pH 11,0 bằng cách thêm axit clohydric 4 M, sau đó pha loãng bằng nước đến 1 L. Thuốc thử này ổn định ở nhiệt độ phòng trong 6 tháng.

4.6 Dung dịch cơ chất – Thuốc thử HR Amylase

Hòa tan một lọ chứa 54,5 mg (4,6-*O*-benzilidin)-*p*-nitrophenyl maltoheptaosid và 125 đơn vị hoạt độ (U) α -glucosidase bền nhiệt trong 10 mL nước đun sôi để nguội. Chia dung dịch cơ chất này thành các phần 3 mL cho vào các ống polypropylen và bảo quản ở -20°C . Giữa các lần sử dụng, rã đông dung dịch và bảo quản lạnh. Dung dịch cơ chất ổn định trong 7 ngày ở 4°C hoặc trong 12 tháng ở -20°C .

4.7 Dung dịch *p*-nitrophenol, 10 mM

Hòa tan 139,1 mg *p*-nitrophenol (loại dùng để đo phổ) trong 90 mL nước. Chuyển dung dịch vào bình định mức 100 mL (5.14) và thêm nước đến vạch, lắc đều. Dung dịch này có thể ổn định trong 6 tháng khi bảo quản nơi tối ở 4°C .

4.8 Dung dịch *p*-nitrophenol, 0,05 mM

Pha loãng 1 mL dung dịch *p*-nitrophenol (4.7) với thuốc thử dừng phản ứng (4.5) thành 200 mL. Sử dụng dung dịch này để hiệu chuẩn máy đo quang phổ (5.8).

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 nghiền ly tâm, có rotor 12 răng và sàng cỡ lỗ 0,5 mm.

CHÚ THÍCH: Ngoài ra, có thể sử dụng máy nghiền xoay đối với các mẫu thử nhỏ.

5.2 Máy ly tâm, ly tâm các ống nghiệm ở gia tốc 1000 *g*.**5.3 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở $40^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$.****5.4 Máy trộn Vortex.****5.5 Máy đo pH.****5.6 Đồng hồ bấm giờ.****5.7 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 g.**

TCVN 13277:2021

5.8 Máy đo quang phổ, có chiều dài đường quang của cuvet là 10 mm, có thể đo được ở bước sóng 400 nm.

5.9 Pipet tự động, có các đầu tip dùng một lần, có thể phân phối các lượng 200 μL .

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng bộ phân phối bằng tay được kiểm soát.

5.10 Pipet, có thể phân phối chính xác 200 μL và 3 mL.

5.11 Bộ phân phối dung môi, dùng để phân phối thuốc thử dùng phản ứng, được cài đặt để phân phối 3 mL.

5.12 Ống nghiệm thủy tinh, đáy tròn kích thước 16 mm x 120 mm, dung tích 17 mL, thích hợp để ly tâm ở gia tốc 1000 g.

5.13 Bộ lọc màng sợi thủy tinh, ví dụ: Whatman GF/A, 9 cm hoặc loại tương đương.

5.14 Bình định mức, dung tích 25 mL, 50 mL, 100 mL và 200 mL.

6 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Tham khảo các tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm. Trong trường hợp chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm, việc lấy mẫu theo thỏa thuận giữa các bên liên quan.

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

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Nghiền khoảng 50 g mẫu thử trong máy nghiền (5.1) sao cho mẫu lọt qua sàng cỡ lỗ 0,5 mm. Chuyển tất cả mẫu đã nghiền vào lọ chất dẻo miệng rộng, trộn đều bằng cách lắc và đảo chiều.

Các chế phẩm enzym công nghiệp ở dạng lỏng hoặc dạng bột mịn không cần nghiền.

7.2 Hiệu chuẩn máy đo quang phổ

Phương pháp phân tích dựa trên lượng *p*-nitrophenol tuyệt đối được giải phóng. Do vậy giá trị độ hấp thụ cần đúng với lượng *p*-nitrophenol chuẩn. Độ hấp thụ của dung dịch chuẩn *p*-nitrophenol (4.8) phải là $0,905 \pm 0,005$ ở pH 11,0, đo ở bước sóng 400 nm. Tiến hành hiệu chuẩn máy đo quang phổ (5.8) mỗi ngày khi phân tích mẻ các mẫu thử. Kiểm tra độ tuyến tính của giá trị độ hấp thụ bằng cách sử

dùng một dãy các dung dịch pha loãng của dung dịch chuẩn *p*-nitrophenol (4.7) được chuẩn bị với thuốc thử dùng phản ứng. Đo độ hấp thụ của các dung dịch đã chọn ở bước sóng 400 nm, sử dụng thuốc thử dùng phản ứng làm mẫu trắng.

Dãy các dung dịch pha loãng và các giá trị độ hấp thụ dự kiến tương ứng được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Các dung dịch pha loãng của chất chuẩn *p*-nitrophenol đặc và giá trị độ hấp thụ tương ứng

Dung dịch pha loãng của <i>p</i> -nitrophenol 10mM ^a	Nồng độ cuối của <i>p</i> -nitrophenol, mM	Độ hấp thụ dự kiến đo được ở bước sóng 400 nm
200 µl đến 25 mL	0,080	1,448
150 µl đến 25 mL	0,060	1,086
100 µl đến 25 mL	0,040	0,724
50 µl đến 25 mL	0,020	0,362
50 µl đến 50 mL	0,010	0,181
50 µl đến 100 mL	0,005	0,091
^a Dùng pipet (5.9) lấy mẫu và chỉnh đến các thể tích 25 mL, 50 mL hoặc 100 mL trong bình định mức (5.14).		

7.3 Tách chiết α -amylase

7.3.1 Bột mì trắng

Dùng cân (5.7), cân chính xác 3,0 g bột cho vào bình định mức 50 ml (5.14). Thêm 20,0 mL dung dịch đệm natri malat (4.2) và lắc mạnh. Chiết enzym trong khoảng 15 min đến 20 min ở 40 °C trong nồi cách thủy (5.3), thỉnh thoảng lắc đều. Định mức đến vạch bằng dung dịch đệm natri malat (4.2). Lọc dịch chiết qua bộ lọc màng (5.13), hoặc ly tâm trên máy ly tâm (5.2) ở gia tốc 1000 *g* trong 10 min, thu lấy phần dịch trong. Xác định hoạt độ enzym trong vòng 1 h.

7.3.2 Bột mạch nha và chế phẩm enzym có nguồn gốc từ nấm

Dùng cân (5.7), cân chính xác 0,5 g bột mạch nha hoặc chế phẩm enzym có nguồn gốc từ nấm cho vào bình định mức 100 mL (5.14). Thêm dung dịch natri clorua (1 %, khối lượng/thể tích) kết hợp với canxi clorua (0,03 %, khối lượng/thể tích) (4.4) đến vạch. Chiết enzym trong khoảng 15 min đến 20 min ở nhiệt độ phòng, thỉnh thoảng lắc đều. Lọc dịch chiết qua bộ lọc màng (5.13) hoặc ly tâm trên máy ly tâm (5.2) ở gia tốc 1000 *g* trong 10 min nếu cần. Thực hiện dãy các dung dịch pha loãng của dịch lọc [pha loãng 1,0 mL dịch lọc bằng dung dịch đệm natri malat (4.2) thành 10 mL, v.v...] để thu được nồng độ enzym thích hợp cho giá trị độ hấp thụ trong khoảng từ 0,1 đến 1,2. Xác định hoạt độ enzym trong vòng 1 h.

7.3.3 Chế phẩm enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn

Dùng cân (5.7), cân chính xác 0,5 g bột chế phẩm enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn cho vào bình định mức 100 mL (5.14) (hoặc dùng pipet (5.9) lấy 0,5 mL chế phẩm enzym dạng lỏng). Thêm dung dịch natri clorua (1 %, khối lượng/thể tích) kết hợp với canxi clorua (0,03 %, khối lượng/thể tích) (4.4) đến vạch. Chiết enzym trong 15 min đến 20 min ở nhiệt độ phòng, thỉnh thoảng lắc đều. Làm trong dịch chiết bằng cách ly tâm ở gia tốc 1000 g trong 10 min, nếu cần.

CHÚ THÍCH: Không lọc dịch chiết vì một số vi khuẩn sinh α -amylase bị ảnh hưởng khi lọc.

Thực hiện dãy các: dung dịch pha loãng phần dịch nổi phía trên [pha loãng 1,0 mL dịch chiết bằng dung dịch đệm natri maleat (4.3) thành 10 mL, v.v.] để thu được dung dịch có nồng độ enzym thích hợp cho giá trị độ hấp thụ từ 0,1 đến 1,2. Xác định ngay hoạt độ enzym.

7.4 Xác định hoạt độ α -amylase

7.4.1 Dịch chiết từ bột mì trắng

Dùng pipet (5.9) phân phối 200 μ L dung dịch cơ chất (4.6) vào các ống nghiệm (5.12), tiến hành lặp lại cho hai ống nghiệm và ủ ở 40 °C trong 5 min (không đậy nắp ống). Tiến hành ủ đồng thời cùng với dịch chiết mẫu ở 40 °C trong 5 min. Dùng pipet (5.10) thêm chính xác 200 μ L dịch chiết mẫu đã ổn định nhiệt vào đáy của từng ống nghiệm chứa 200 μ L dung dịch cơ chất. Trộn mạnh lượng chứa trong các ống trên máy trộn Vortex (5.4) và ủ ngay ở 40 °C trong đúng 20 min, thời gian tính từ lúc thêm dịch chiết mẫu. Dùng phản ứng bằng cách thêm 3,0 mL dung dịch thuốc thử dừng phản ứng (4.5) và trộn mạnh ống trên máy trộn Vortex (5.4). Xác định độ hấp thụ của các dung dịch mẫu thử và mẫu trắng (7.4.3) so với độ hấp thụ của nước đã đặt về 0 ở bước sóng 400 nm. Tính độ hấp thụ trung bình của hai mẫu thử làm lặp lại. Nếu giá trị độ hấp thụ vượt quá 1,2 thì pha loãng dịch chiết mẫu bằng dung dịch đệm malat (4.2) và lặp lại phép phân tích dịch chiết mẫu và mẫu trắng.

7.4.2 Dịch chiết từ bột mạch nha, chế phẩm enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn và nấm

Dùng pipet (5.9) phân phối 200 μ L dung dịch cơ chất (4.6) vào các ống nghiệm (5.12), tiến hành lặp lại cho hai ống nghiệm và ủ ở 40 °C trong 5 min (không đậy nắp ống). Tiến hành ủ đồng thời cùng với dịch chiết đã pha loãng của bột mạch nha (7.3.2), chế phẩm enzym có nguồn gốc từ nấm (7.3.2) hoặc chế phẩm enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn (7.3.3) đã pha loãng bằng dung dịch đệm đến nồng độ thích hợp tại 40 °C trong 5 min. Dùng pipet (5.10) thêm chính xác 200 μ L dịch chiết mẫu đã ổn định nhiệt vào đáy của từng ống nghiệm chứa 200 μ L dung dịch cơ chất. Trộn mạnh lượng chứa trong các ống trên máy trộn Vortex (5.4) và ủ ngay ở 40 °C trong đúng 10 min, thời gian tính từ lúc thêm dịch chiết mẫu. Ở cuối giai đoạn ủ, thêm 3,0 mL dung dịch thuốc thử dừng phản ứng (4.5) và trộn mạnh ống trên máy trộn Vortex (5.4). Xác định độ hấp thụ của các dung dịch mẫu thử và mẫu trắng (7.4.3) so với độ hấp thụ của nước đã đặt về 0 ở bước sóng 400 nm. Tính độ hấp thụ trung bình của hai mẫu thử tiến hành lặp lại. Nếu độ hấp thụ vượt quá 1,2 thì pha loãng tiếp dịch chiết bằng dung dịch đệm malat

(4.2) và lặp lại phép phân tích dịch chiết mẫu và mẫu trắng. Nếu kết quả độ hấp thụ của mẫu thử tiến hành lặp lại vượt quá 3 % giá trị trung bình thì thực hiện lại phép phân tích.

7.4.3 Mẫu trắng

Cho 200 μL dịch chiết bột lúa mì hoặc dịch chiết đã pha loãng của bột mạch nha (7.3.2), chế phẩm enzym có nguồn gốc từ nấm (7.3.2) hoặc chế phẩm enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn (7.3.3) có chứa α -amylase vào ống nghiệm chứa 3,0 mL thuốc thử dừng phản ứng (4.5) và trộn đều bằng máy trộn Vortex (5.4). Thêm 200 μL dung dịch cơ chất (4.6) vào mỗi ống nghiệm và trộn đều. Xác định giá trị độ hấp thụ của dung dịch so với nước ở bước sóng 400 nm. Mẫu trắng giúp loại bỏ ảnh hưởng của bất kì tác nhân có màu vàng nào trong dịch chiết, thường xảy ra trong trường hợp dịch chiết từ bột mì trắng.

8 Tính kết quả

Hoạt độ α -amylase trong mẫu thử, U , được biểu thị bằng đơn vị Ceralpha trên gam hoặc miliilit (CU/g hoặc CU/mL) tính theo Công thức (1):

$$U = \frac{A_a - A_b}{I} \times \frac{V_r}{Z} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{V_e}{W} \times F \quad (1)$$

Trong đó:

A_a là độ hấp thụ trung bình của hai dung dịch phân tích lặp lại đo ở bước sóng 400 nm;

A_b là độ hấp thụ của mẫu trắng đo ở bước sóng 400 nm;

I là thời gian ủ (20 min đối với dịch chiết bột mì trắng, 10 min đối với dịch chiết bột mạch nha, chế phẩm enzym có nguồn gốc từ nấm và vi khuẩn);

V_r là thể tích dung dịch phản ứng (ở đây là 3,4 mL);

Z là thể tích của dịch chiết đã pha loãng dùng để phân tích (ở đây là 0,2 mL);

ε là độ hấp thụ riêng của p -nitrophenol trong dung dịch đệm trinitrat photphat 2 %, pH 11,0 (ở đây là 1,81 $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ hoặc 18,1 $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ đối với cuvet có chiều dài đường quang 10 mm) đo được ở bước sóng 400 nm;

V_e là thể tích dịch chiết (ở đây là 20 mL đối với mẫu bột mì trắng hoặc 100 mL đối với mẫu bột mạch nha, chế phẩm enzym có nguồn gốc từ nấm và vi khuẩn);

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

F là hệ số pha loãng dung dịch chiết.

CHÚ THÍCH: Các giá trị độ hấp thụ được đo trong cuvet có chiều dài đường quang 10 mm.

9 Báo cáo thử nghiệm

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

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

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Bảng A.1 – Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm xác định α -amylase trong bột mì trắng, bột mạch nha và chế phẩm có nguồn gốc từ vi sinh vật, sử dụng đơn vị Ceralpha

Mẫu	Bột mì trắng A	Bột mì trắng B (có chứa α -amylase từ nấm)	Bột mạch nha A	Bột mạch nha B	Chế phẩm có nguồn gốc từ nấm A	Chế phẩm có nguồn gốc từ nấm B	Chế phẩm có nguồn gốc từ vi khuẩn A	Chế phẩm có nguồn gốc từ vi khuẩn B
Số phòng thử nghiệm tham gia ^a	15 (0)	15 (0)	12 (3)	15 (0)	13 (2)	15 (0)	13 (2)	15 (0)
Giá trị trung bình, đơn vị α -amylase ^b	0,10	0,14	375	117	148	242	245	68
Giới hạn lặp lại, r^c	0,012	0,057	14,3	10,6	6,4	53,8	15,7	9,0
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r^a	0,004	0,020	5,1	3,8	2,3	19,2	5,6	3,2
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_n , %	4,2	14,4	1,4	3,3	1,6	7,9	2,3	4,8
Giới hạn tái lập, R^d	0,021	0,064	52,1	26,9	23,5	89,6	77,0	31,6
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R^a	0,008	0,020	18,6	9,6	8,4	32,0	27,5	11,3
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R , %	7,2	16,3	5,0	8,2	5,7	13,2	11,2	16,7
^a Mỗi giá trị là số phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ; mỗi giá trị trong ngoặc là số phòng thử nghiệm đã loại sau khi trừ ngoại lệ. ^b Đơn vị Ceralpha. ^c $r = 2,8 \times s_r$. ^d $R = 2,8 \times s_R$.								