

Mục lục	Trang	
• TCVN 8970 : 2011	Thực phẩm – Xác định iot-131, bari-140 và ccsi-137 bằng phương pháp đo phổ gamma.	5
• TCVN 8971 : 2011	Thực phẩm – Xác định ccsi-134 và ccsi-137 bằng phương pháp đo phổ gamma.	13
• TCVN 8972 -1 : 2011 EN 12823-1 : 2000	Thực phẩm – Xác định vitamin A bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Phần 1 : Xác định 13-cis-retinol và tất cả các đồng phân trans-retinol.	21
• TCVN 8972-2 : 2011 EN 1283-2 : 2000	Thực phẩm – Xác định vitamin A bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Phần 2 : Xác định β -caroten.	37
• TCVN 8973 : 2011 EN 12821 : 2009	Thực phẩm – Xác định vitamin D bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao – Xác định cholecalciferol (D3) hoặc ergocalciferol(D2).	51
• TCVN 8974 : 2011 EN 14148 : 2003	Thực phẩm – Xác định vi ta min K ₁ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).	75
• TCVN 8975 : 2011 EN 14152 : 2003	Thực phẩm – Xác định vitamin B ₂ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).	91
• TCVN 8976 : 2011 EN 14166: 2009	Thực phẩm – Xác định vitamin B ₆ bằng phép thử vi sinh.	105
• TCVN 8977 : 2011 EN 14130 : 2003	Thực phẩm – Xác định vitamin C bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).	121
• TCVN 8978 : 2011 EN 14131 : 2003	Thực phẩm – Xác định folat bằng phép thử vi sinh.	133

Lời nói đầu

TCVN 8970 : 2011 Được xây dựng dựa trên AOAC 973.67 Iodine-131, Barium-140 and Cesium-137 in milk and other foods. Gamma-ray spectroscopic method;

TCVN 8971 : 2011 Được xây dựng dựa trên AOAC 996.05 Cesium-134 and Cesium-137 in foods. γ -Ray spectrometric method;

TCVN 8972-1 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 12823-1 : 2000;

TCVN 8972-2 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 12823-2 : 2000;

TCVN 8973 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 12821 : 2009;

TCVN 8974 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14148 : 2003 và đính chính kỹ thuật 2005;

TCVN 8975 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14152 : 2003;

TCVN 8976 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14166 : 2009;

TCVN 8977 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14130 : 2003;

TCVN 8978 : 2011 hoàn toàn tương đương với EN 14131 : 2003;

TCVN 8970 : 2011; TCVN 8971 : 2011; TCVN 8972-1 : 2011; TCVN 8972-2 : 2011; TCVN 8973 : 2011 + TCVN 8978 : 2011 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 folat bằng phép thử vi sinh

Foodstuffs – Determination of folate by microbiological assay

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng folat tổng số trong thực phẩm bằng cách đo độ đục để phát hiện sự phát triển của vi sinh vật *Lactobacillus casei*, subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469).

Phương pháp này cho phép xác định các folat trong thực phẩm, gồm cả folat từ nguồn gốc tự nhiên và axit folic được thêm vào (axit pteroylglutamic).

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 4851:1989 (ISO 3696:1987) *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

3 Nguyên tắc

Mẫu thử sau khi tạo huyền phù trong đệm phosphat được làm nóng để chiết folat. Có thể cần xử lý protease và α -amylase để thủy phân tiếp chất nền thực phẩm. Các folylpolyglutamat từ nguồn gốc tự nhiên được thủy phân bằng γ -glutamyl hydrolase (EC 3.4.19.9) [1] thành folylmonoglutamat hoặc folyldiglutamat.

Folat sau khi chiết, được pha loãng bằng môi trường cơ bản có chứa tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết cho phát triển ngoại trừ folat. Tốc độ phát triển của *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469) với các folat đã chiết được thể hiện bởi độ đục và được so sánh với tốc độ phát triển trong các dung dịch hiệu chuẩn chứa nồng độ đã biết.

TCVN 8978:2011

Phương pháp này cho phép tùy chọn sử dụng hệ thống xử lý chất lỏng bán tự động và sử dụng microplate hoặc ống nghiệm để ủ vi sinh vật.

4 Thuốc thử

4.1 Yêu cầu chung

Trong quá trình phân tích, chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước sử dụng là nước cất hoặc ít nhất là loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Nước dùng để pha chế thuốc thử phải được chưng cất bằng dụng cụ thủy tinh.

4.2 Dung môi và hóa chất

4.2.1 Glycerol, $w(C_3H_8O_3) = 80\%$

Trộn 120 ml glycerol với 30 ml nước.

4.2.2 1-Octanol, $C_8H_{18}O$

4.2.3 Toluene, C_7H_8

4.2.4 2-mercaptoethanol, $c(C_2H_6OS) = 0,1\text{ mol/l}$

Cho 70 μl 2-mercaptoethanol vào 10 ml nước.

4.2.5 Natri ascorbat, $C_6H_7O_6Na$

Natri ascorbat được sử dụng làm thuốc thử trong một số dung dịch quy định. Có thể sử dụng axit ascorbic, nhưng có thể cần phải sửa đổi quy trình điều chỉnh pH.

4.2.6 Axit clohydric, $c(HCl) = 1\text{ mol/l}$.

4.2.7 Natri hydroxit, $w(NaOH) = 40\%$

Hòa tan 400 g natri hydroxit bằng nước và pha loãng đến 1 lít.

4.2.8 Amoni sulfat, $H_8N_2O_4S$.

4.2.9 Natri dihydro phosphat, khan, NaH_2PO_4

Các lượng natri dihydro phosphat được dùng để chuẩn bị chất đệm (4.3) đã được tính theo chất khan. Có thể sử dụng hóa chất ngâm một phân tử nước hoặc hai phân tử nước, có các quy trình được điều chỉnh cho phù hợp.

4.2.10 Axit 2-(N-cyclohexylamino)etansulfonic (CHES), $C_8H_{17}NO_3S$.

4.2.11 Axit N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-(2-etansulfonic) (HEPES), $C_8H_{18}N_2O_4S$.

4.2.12 Bột cacbon, đã được rửa bằng axit.

4.2.13 Nước muối, vô trùng

Hòa tan 9 g natri clorua trong 1000 ml nước. Phân phối các lượng 10 ml vào các ống nghiệm 20 mm x 150 mm. Đậy nắp ống nghiệm và làm nóng ở 121 °C trong 15 min. Để nguội và bảo quản trong tủ lạnh.

4.2.14 Dung dịch môi trường cơ bản không chứa axit folic, nồng độ kép

Để có mỗi 100 ml môi trường, hòa một lượng môi trường cơ bản theo khuyến cáo (Bacto Folic Acid Casei Medium hoặc môi trường tương đương¹⁾) trong 100 ml nước. Thêm 0,050 g natri ascorbat (4.2.5) và làm nóng từ 1 min đến 2 min. Để nguội đến nhiệt độ phòng và chỉnh pH đến $6,1 \pm 0,1$.

4.2.15 Chất chuẩn axit folic

Có thể thu được axit folic từ các nguồn khác nhau có chứa đến 8 % nước. Độ tinh khiết của chất chuẩn axit folic có thể dao động và do đó cần phải xác định nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn bằng phép đo phổ hấp thụ UV (xem quy trình chuẩn hóa trong 6.4.2).

4.3 Chất đệm

4.3.1 Chất đệm phosphat, pH 5,0 ($c = 0,002 \text{ mol/l}$)

Hòa tan 0,24 g natri dihydro phosphat (4.2.9) trong 900 ml nước. Dùng natri hydroxit (4.2.7) để chỉnh pH đến $5,0 \pm 0,1$ và pha loãng bằng nước đến 1000 ml.

4.3.2 Chất đệm phosphat, pH 7,0 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$)

Hòa tan 12,0 g natri dihydro phosphat (4.2.9) trong 900 ml nước. Dùng natri hydroxit (4.2.7) để chỉnh pH đến $7,0 \pm 0,1$ và pha loãng bằng nước đến 1000 ml.

4.3.3 Chất đệm phosphat, pH 5,0 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) với 2-mercaptoetanol ($c = 10 \text{ mmol/l}$)

Hòa tan 12,0 g natri dihydro phosphat (4.2.9) trong 900 ml nước. Chỉnh pH đến $5,0 \pm 0,1$, thêm 0,70 ml 2-mercaptoetanol (4.2.4) và pha loãng bằng nước đến 1000 ml.

¹⁾ Bacto Folic Acid Casei Medium là tên thương mại của sản phẩm do Difco cung cấp. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng, tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 8978:2011

4.3.4 Chất đệm phosphat, pH 4,5 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) với ascorbat (1 %)

Hòa tan 12,0 g natri dihydro phosphat (4.2.9) và 10 g natri ascorbat (4.2.5) trong 900 ml nước. Dùng natri hydroxit (4.2.7) để chỉnh pH đến $4,5 \pm 0,1$ và pha loãng bằng nước đến 1000 ml. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

4.3.5 Chất đệm phosphat, pH 6,1 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) với ascorbat (1 %)

Hòa tan 12,0 g natri dihydro phosphat (4.2.9) và 10 g natri ascorbat (4.2.5) trong 900 ml nước. Dùng natri hydroxit (4.2.7) để chỉnh pH đến $6,1 \pm 0,1$ và pha loãng bằng nước đến 1000 ml. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

4.3.6 Chất đệm phosphat, pH 7,8 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) với ascorbat (1 %)

Hòa tan 12,0 g natri dihydro phosphat (4.2.9) và 10 g natri ascorbat (4.2.5) trong 900 ml nước. Dùng natri hydroxit (4.2.7) để chỉnh pH đến $7,8 \pm 0,1$ và pha loãng bằng nước đến 1000 ml. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

4.3.7 Chất đệm CHES/HEPES, pH 7,85 ($c = 0,05 \text{ mol/l}$) với ascorbat và 2-mercaptoethanol (4.2.4) để thẩm tách huyết thanh máu chuột

Hòa tan 23,8 g HEPES (4.2.11), 20,7 g CHES (4.2.10), 40 g natri ascorbat (4.2.5) và 1,4 ml 2-mercaptoethanol (4.2.4) trong 1900 ml nước. Dùng natri hydroxit (4.2.7) để chỉnh pH đến $7,85 \pm 0,1$ và pha loãng bằng nước đến 2000 ml. Thêm 4 g bột cacbon đã rửa bằng axit (4.2.12). Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

4.4 Các enzym

4.4.1 Bổ sung xử lý enzym (tùy chọn)

Có thể cần bổ sung với protease và/hoặc α -amylase để tăng khả năng chiết folat. Các quy trình bổ sung xử lý enzym được nêu trong Phụ lục A.

4.4.2 γ -Glutamyl hydrolase

4.4.2.1 Yêu cầu chung

Hoạt tính deconjugase có được bởi γ -glutamyl hydrolase (EC 3.4.19.9) từ một số nguồn cung cấp. Ví dụ về cách chuẩn bị γ -glutamyl hydrolase từ thận lợn được mô tả trong (4.4.2.2). Các quy trình chuẩn bị γ -glutamyl hydrolase từ các nguồn tùy chọn được đưa ra trong Phụ lục A. Việc lựa chọn cách chuẩn bị enzym phải được kiểm tra bằng phương pháp phù hợp.

CHÚ THÍCH Bột nấm men, gan lợn đông khô (ví dụ BCR CRM 487 [2]), hoặc axit pteroyl-triglutamic ở một giới hạn nhất định là mẫu thích hợp để kiểm tra việc chuẩn bị enzym.

4.4.2.2 Nguồn γ -glutamyl hydrolase: thận lợn [3].

Đồng hóa 250 g thận lợn tươi ở + 2 °C trong 750 ml đệm phosphat với 2-mercaptoethanol (4.3.3). Cho ly tâm ở + 2 °C (ở 18000 g, 20 min). Ủ phần dịch nổi phía trên ở + 50 °C trong 2 h có khuấy nhẹ và sau đó cho ly tâm lại. Tách lấy phần nổi phía trên bằng cách dùng amoni sulfat đậm đặc (4.2.8) để làm kết tủa. Thu lấy phần kết tủa bão hòa với amoni sulfat trong khoảng từ 50 % đến 75 %. Hòa kết tủa trong một thể tích tối thiểu của đệm phosphat (4.3.1). Thẩm tách dựa theo chất đệm này 2 lần mỗi lần 24 h và cho ly tâm (ở 18000 g, 20 min). Chuyển các lượng 1 ml vào các lọ và làm đông khô.

4.5 Chủng cấy

4.5.1 Sinh vật thử nghiệm

Chủng cấy *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469)²⁾ đông khô.

4.5.2 Môi trường nuôi cấy

Pha loãng 50 ml dung dịch môi trường nuôi cấy cơ bản không chứa axit folic nồng độ kép (4.2.14) bằng nước đến 100 ml. Thêm 0,5 ml dung dịch gốc axit folic đã pha loãng (6.4.4), trộn và lọc để khử trùng hoặc làm nóng ở nhiệt độ + 121 °C trong 15 min và làm nguội nhanh đến nhiệt độ phòng.

4.5.3 Chủng cấy chống đông lạnh

Bằng cách vô trùng, thêm 1 ml môi trường nuôi cấy đã chuẩn bị (4.5.2) vào chủng cấy đông khô (4.5.1) và chuyển 0,15 ml huyền phù thu được vào môi trường nuôi cấy theo 4.5.2. Ủ ở + 37 °C trong 18 h.

Đun 150 ml glycerol (4.2.1) ở +121 °C trong 15 min và để nguội trong bể nước đá. Làm nguội chủng cấy vi khuẩn đã ủ trong bể nước đá và thêm 100 ml glycerol đã khử trùng và làm nguội. Khuấy trộn nhẹ. Phân phối các lượng 2 ml vào các lọ vô trùng. Khi được bảo quản ở - 20 °C dung dịch bền được 3 tháng, ở - 70 °C có thể bền được 6 tháng.

CHÚ THÍCH: Cần phải duy trì các điều kiện vô trùng trong suốt quá trình thực hiện.

4.5.4 Dịch cấy làm việc

4.5.4.1 Chủng cấy làm việc dùng để nuôi cấy trong ống nghiệm

Pha loãng 2 ml chủng cấy chống đông lạnh (4.5.3) vào 50 ml nước muối vô trùng (4.2.13). Lắc bằng máy trộn vortex.

4.5.4.2 Chủng cấy làm việc dùng cho microplate (tùy chọn)

Cho 5 ml nước muối vô trùng (4.2.13) vào 2 ml chất cấy chống đông lạnh (4.5.3). Lắc bằng máy trộn vortex.

²⁾ Các nhà cung cấp gồm có National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd (Aberdeen, Anh) và Culture Collection, University of Goteborg (Gothenburg, Thụy Điển). Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng, tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

TCVN 8978:2011

4.5.5 Dung dịch môi trường cơ bản không chứa axit folic, dùng cho phép thử microplate (tùy chọn)

Cho 1 µl chủng cấy làm việc (4.5.4.2) vào 1 ml dung dịch môi trường cơ bản không chứa axit folic (4.2.14). Trộn kỹ.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

- 5.1 Máy ly tâm lạnh**, để chuẩn bị conjugase thận lợn (4.4.2.2), chạy được ở 18000 g.
- 5.2 Thiết bị làm nóng**, nổi áp lực hoặc tương đương.
- 5.3 Tủ ấm hoặc nồi cách thủy** để ủ ở $(+37 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$.
- 5.4 Máy đo phổ/dụng cụ đo độ đục**, để đo độ đục của dịch chiết folat sau khi ủ trong ống nghiệm.
- 5.5 Giá đỡ ống nghiệm có nắp đậy**, để giữ ống nghiệm trong khi làm nóng và ủ.
- 5.6 Ống thăm tách** (tùy chọn), với ngưỡng khối lượng phân tử từ 12000 đến 14000, để chuẩn bị conjugase huyết tương chuột (Phụ lục A).
- 5.7 Hệ thống xử lý chất lỏng** (tùy chọn), để đọc tự động các ống nghiệm.
- 5.8 Máy đọc microplate** (tùy chọn), để đo độ đục sau khi ủ trong đĩa.
- 5.9 Đĩa 96 giếng đáy phẳng, vô trùng** (tùy chọn)

6 Cách tiến hành

6.1 Yêu cầu chung

Folat rất nhạy với ánh sáng UV và dễ bị oxi hóa. Không thực hiện các thao tác dưới ánh sáng tự nhiên hoặc ánh đèn huỳnh quang mạnh. Nên dùng dụng cụ thủy tinh tối màu, khi có thể.

Thực hiện phép xác định lặp lại 2 lần bằng các phép thử đơn lẻ trong hai lần khác nhau.

6.2 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu thử phải đồng nhất. Mẫu thô phải được đồng hóa bằng máy nghiền hoặc máy trộn phù hợp. Cần chú ý để mẫu không tiếp xúc với nhiệt độ cao trong quá trình nghiền. Mẫu thử đã đồng hóa phải được bảo quản trong bình chứa kín khí, tránh ánh sáng.

6.3 Chuẩn bị dung dịch mẫu

6.3.1 Yêu cầu chung

Tùy thuộc vào loại mẫu, mà việc chuẩn bị dung dịch mẫu thử có thể phải bao gồm cả việc xử lý protease và/hoặc α -amylase để thủy phân protein và cacbohydrat, để dễ chiết folat. Dịch chiết mẫu được xử lý bằng γ -glutamyl hydrolase nhằm thủy phân foylpolylglutamat có nguồn gốc tự nhiên thành foylmonoglutamat hoặc foyldiglutamat. Phương pháp này sử dụng γ -glutamyl hydrolase từ thận lợn, nhưng cũng có thể lấy từ các nguồn khác với điều kiện bảo đảm đủ hoạt độ của enzym. Các quá trình bổ sung xử lý enzym và việc sử dụng γ -glutamyl hydrolase từ các nguồn khác được nêu trong Phụ lục A.

6.3.2 Chiết

Cân chính xác một lượng thích hợp mẫu thử (tương ứng với 2 g đến 2,5 g chất khô) cho vào bình định mức 100 ml. Thêm 20 ml chất đệm phosphat chứa ascorbat pH 6,1 (4.3.5) và trộn kỹ. Thêm 30 ml nước và từ 0,1 ml đến 1 ml 1-octanol (4.2.2). Đậy nắp bình và làm nóng từ 100 °C đến 121 °C trong 15 min. Để nguội và pha loãng bằng chất đệm phosphat chứa ascorbat pH 6,1 (4.3.5) đến 100 ml.

6.3.3 Xử lý γ -glutamyl hydrolase (thận lợn)

Hoàn nguyên γ -glutamyl hydrolase thận lợn đông khô chứa trong ống nghiệm bằng 1,1 ml nước và bảo quản trong nước đá. Trộn cẩn thận trong bình định mức 10 ml các thành phần sau: 1 ml dịch chiết mẫu (6.3.2), 3,5 ml chất đệm phosphat chứa ascorbat pH 4,5 (4.3.4) và 0,5 ml γ -glutamyl hydrolase hoàn nguyên. Ủ ở 37 °C trong 3 h. Khử hoạt tính của enzym bằng cách làm nóng ở 100 °C trong 3 min. Để nguội, thêm chất đệm phosphat chứa ascorbat pH 4,5 (4.3.4) vào bình cho đến vạch. Cho ly tâm (ở 1000 g, 10 min) để loại bỏ protein kết tủa. Bảo quản phần nổi phía trên ở - 18 °C để phân tích tiếp.

6.4 Hiệu chuẩn

6.4.1 Dung dịch gốc axit folic (100 μ g/ml)

Cân chính xác 50 mg axit folic (4.2.15) đã được làm khô trước đến khối lượng không đổi và hòa tan trong chất đệm phosphat (4.3.2) đựng trong bình định mức 500 ml. Pha loãng đến vạch bằng chất đệm phosphat. Phủ toluen kín lên bề mặt dung dịch.

6.4.2 Phép thử nồng độ của dung dịch gốc axit folic

Chuyển 10 ml dung dịch gốc (6.4.1) vào bình định mức 100 ml và pha loãng đến vạch bằng chất đệm phosphat pH 7,0 (4.3.2). Đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 282 nm dùng chất đệm phosphat làm mẫu trắng. Tính nồng độ axit folic (ρ) bằng gam trên lít theo Công thức (1):

$$\rho = \frac{A \times M}{\epsilon \times b} \times V \quad (1)$$

TCVN 8978:2011

trong đó:

A là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 282 nm;

M là khối lượng phân tử của axit folic, bằng 441,4 g·mol⁻¹;

ϵ là hệ số hấp thụ phân tử của axit folic [4] ở bước sóng 282 nm, bằng 27600 l·mol⁻¹·cm⁻¹;

b là chiều dài đường quang, bằng centimet (cm);

V là hệ số pha loãng (nếu có).

6.4.3 Dung dịch chuẩn axit folic (1 µg/ml)

Cho 5 ml dung dịch gốc (6.4.1) vào 475 ml nước và chỉnh pH đến 7,5 bằng natri hydroxit (4.2.7). Thêm nước đến 500 ml. Chuẩn bị dung dịch ngay trong ngày sử dụng. Có thể cần pha loãng tiếp để phù hợp với quy mô phân tích.

6.4.4 Dung dịch chuẩn axit folic pha loãng (100 ng/ml), để dùng với chủng cấy

Cho 10 ml dung dịch chuẩn (6.4.3) vào khoảng 60 ml nước và chỉnh pH đến 7,5 bằng natri hydroxit (4.2.7). Pha loãng bằng nước đến 100 ml. Chuẩn bị dung dịch ngay trong ngày sử dụng.

6.5 Tiến hành xác định

6.5.1 Yêu cầu chung

Xác định hàm lượng axit folic trong các chế phẩm enzym được sử dụng và điều chỉnh cho phù hợp.

6.5.2 Xử lý dung dịch chuẩn (1 µg/ml)

Xử lý 1 ml dung dịch chuẩn (6.4.3) tương tự như xử lý mẫu thử và tiến hành quy trình chiết và xử lý enzym như trong 6.3. Nồng độ của axit folic thu được thường là 10 ng/ml.

6.5.3 Pha loãng dịch chết và dung dịch chuẩn đã xử lý

6.5.3.1 Yêu cầu chung

Các bước pha loãng nêu trong 6.5.3.2, 6.5.3.3, 6.5.3.4 áp dụng cho quy trình thử chuẩn trong ống nghiệm. Đối với phương thức dùng đĩa 96 giếng thì tiến hành đến 6.5.4.3.

Có thể điều chỉnh các bước pha loãng để bù cho mức nồng độ folat cao hoặc thấp.

6.5.3.2 Dung dịch hiệu chuẩn (0,3 ng/ml)

Dùng pipet lấy 7,5 ml dung dịch chuẩn đã xử lý (6.5.2) cho vào bình định mức 250 ml. Thêm 7,5 ml đệm phosphat pH 6,1 (4.3.5) và pha loãng bằng nước đến 250 ml.

6.5.3.3 Dung dịch hiệu chuẩn thứ cấp (0,2 ng/ml và 0,4 ng/ml) (tùy chọn)

Dùng pipet lấy 5 ml và 10 ml dung dịch chuẩn đã xử lý (6.5.2) cho vào các bình định mức 250 ml. Thêm một thể thích tương đương đệm phosphat pH 6,1 (4.3.5) và pha loãng bằng nước đến 250 ml.

6.5.3.4 Mẫu thử

Đối với mỗi mẫu, dùng pipet lấy 5 ml dung dịch mẫu thử đã xử lý enzym (6.3.3) cho vào bình định mức 250 ml. Thêm 5 ml đệm phosphat pH 6,1 (4.3.5) và pha loãng bằng nước đến 250 ml.

6.5.4 Phép thử**6.5.4.1 Yêu cầu chung**

Giá trị pH ban đầu của dung dịch trong quá trình ủ ấm phải là $6,1 \pm 0,1$.

Có thể thực hiện phép thử vi sinh trong ống nghiệm hoặc trong đĩa 96 giếng. Thể tích của các dung dịch hiệu chuẩn, các dịch chiết mẫu và môi trường thử có thể thay đổi tùy thuộc vào phương thức của phép thử. Các ví dụ điển hình về các thể tích v.v... được nêu trong 6.5.4.2 và 6.5.4.3.

6.5.4.2 Phương thức dùng ống nghiệm

Việc bổ sung các dung dịch vào ống nghiệm được nêu trong Bảng 1.

Chuẩn bị 21 ống nghiệm (ví dụ: 20 mm x 150 mm) để dùng cho các dung dịch hiệu chuẩn (0 ng/ml, 0 ng/ml, 0,03 ng/ml, 0,06 ng/ml, 0,09 ng/ml, 0,12 ng/ml, 0,15 ng/ml). Chia thành 3 dãy, mỗi dãy cho lần lượt 0 ml, 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml và 5 ml dung dịch hiệu chuẩn đã pha loãng (6.5.3.2) vào các ống nghiệm.

CHÚ THÍCH Ba dãy ống 0 ml sẽ được sử dụng làm mẫu trắng không cấy.

Tùy chọn: Chuẩn bị 15 ống nghiệm (ví dụ: 20 mm x 150 mm) cho mỗi dung dịch hiệu chuẩn thứ cấp. Chia thành 3 dãy, mỗi dãy cho lần lượt 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml và 5 ml dung dịch hiệu chuẩn thứ cấp đã pha loãng (6.5.3.3) vào các ống nghiệm.

Chuẩn bị 12 ống nghiệm (ví dụ: 20 mm x 150 mm) để dùng cho mỗi mẫu. Chia thành 3 dãy, mỗi dãy cho lần lượt 1 ml, 2 ml, 3 ml, và 4 ml dung dịch mẫu đã pha loãng (6.5.3.4).

Thêm nước vào mỗi ống nghiệm để có tổng thể tích là 5 ml. Thêm vào mỗi ống nghiệm 5 ml dung dịch môi trường cơ bản không chứa axit folic nồng độ kép (4.2.14).

Bảng 1 – Bổ sung các dung dịch vào các ống nghiệm theo 6.5.4.2.

	Số lượng lặp lại	Dung dịch hiệu chuẩn (0,3 ng/ml)	Dung dịch mẫu đã pha loãng	Nước	Dung dịch môi trường cơ bản nồng độ kép
Mẫu trắng không cấy	3	–	–	5 ml	5 ml
Chất hiệu chuẩn (0 ng/ml)		–	–	5 ml	5 ml
Chất hiệu chuẩn (0,03 ng/ml)	3	1 ml	–	4 ml	5 ml
Chất hiệu chuẩn (0,06 ng/ml)	3	2 ml	–	3 ml	5 ml
Chất hiệu chuẩn (0,09 ng/ml)	3	3 ml	–	2 ml	5 ml
Chất hiệu chuẩn (0,12 ng/ml)	3	4 ml	–	1 ml	5 ml
Chất hiệu chuẩn (0,15 ng/ml)	3	5 ml	–	–	5 ml
Mẫu 1 (dung dịch pha loãng 1)	3	–	1 ml	4 ml	5 ml
Mẫu 1 (dung dịch pha loãng 2)	3	–	2 ml	3 ml	5 ml
Mẫu 1 (dung dịch pha loãng 3)	3	–	3 ml	2 ml	5 ml
Mẫu 1 (dung dịch pha loãng 4)	3	–	4 ml	1 ml	5 ml
Mẫu 2 (dung dịch pha loãng 1)	3	–	1 ml	4 ml	5 ml
Mẫu 2 (dung dịch pha loãng 2)	3	–	2 ml	3 ml	5 ml
v.v...					

Đậy nắp các ống nghiệm và làm nóng ở nhiệt độ từ 121 °C đến 123 °C trong 5 min. Làm nguội thật nhanh đến dưới + 40 °C. Xử lý tất cả các dung dịch hiệu chuẩn và các mẫu giống nhau.

Trong điều kiện vô trùng, dùng bơm tiêm vô trùng hoặc dụng cụ tương tự cấy vào mỗi ống nghiệm 50 µl dịch cấy làm việc (4.5.4), ngoại trừ 1 bộ gồm 3 ống mẫu trắng (chứa 0 ml dung dịch hiệu chuẩn pha loãng).

Ủ ở 37 °C ± 0,2 °C trong thời gian từ 15 h đến 24 h.

Trộn và đặt các ống mẫu trắng không cấy vào máy đo phổ cài đặt bước sóng từ 550 nm đến 650 nm và chỉnh để đạt 100 % sự truyền qua ở trạng thái tĩnh. Đọc độ hấp thụ trên các ống nghiệm còn lại ở trạng thái tĩnh. Khoảng thời gian từ khi trộn đến khi đo phải giống nhau.

6.5.4.3 Phương thức sử dụng đĩa (tùy chọn)

Dùng pipet 12 đầu, chuyển 150 µl đệm phosphat (4.3.5) vào các giếng A1-H12 trong đĩa 96 giếng vô trùng.

Dùng pipet lấy 150 µl dung dịch chuẩn đã xử lý enzym (6.5.2) cho vào các giếng G1-G2.

Đối với mỗi dung dịch mẫu thử đã xử lý enzym (6.3.3), dùng pipet lấy 150 µl lặp lại hai lần cho vào các giếng trong dãy G. Trộn kỹ.

Chuẩn bị từng dãy các dung dịch hiệu chuẩn và các dung dịch mẫu thử bằng cách chuyển 150 µl từ các giếng G1-G12 sang các giếng F1-F12, trộn kỹ, sau đó lại chuyển từ các giếng F1-F12 sang các giếng E1-E12.v.v... Cuối cùng, lấy ra và loại bỏ 150 µl ra khỏi mỗi giếng A1-A12 sau khi trộn.

Thêm 150 µl dung dịch môi trường cơ bản không chứa axit folic đã cấy (4.5.5) vào các giếng A1-H12.

Đặt đĩa vào vật chứa bằng chất dẻo và làm kín. Đặt một nồi nước trong vật chứa để đảm bảo đủ độ ẩm làm hạn chế bay hơi nước ra khỏi giếng. Ủ đĩa ở 37 °C từ 15 h đến 24 h. Lấy đĩa ra và để nguội đến nhiệt độ phòng.

Dùng pipet 12 đầu trộn hỗn hợp chứa trong mỗi giếng bằng cách hút nhả cho đến khi huyền phù vi sinh vật đồng nhất.

Đọc độ hấp thụ của tất cả các giếng trên máy đọc đĩa ở bước sóng từ 550 đến 650 nm sử dụng các mẫu trắng đã cấy (H1-H12) làm đối chứng.

7 Tính kết quả

7.1 Đường chuẩn

Vẽ các điểm dữ liệu độ hấp thụ đối với tất cả các mức hiệu chuẩn so với khối lượng tương ứng của axit folic và dựng đường chuẩn.

7.2 Mẫu thử

Xác định khối lượng folat bằng nanogam của mỗi dung dịch mẫu thử pha loãng trong 6.5.4.2 (trung bình của số đọc ba lần lặp lại) bằng cách nội suy từ đường chuẩn.

Tính phần khối lượng, w , của folat bằng µg/100 g đối với mỗi mẫu thử theo Công thức (2):

$$w = \frac{(m_1 - m_2) \times V_1}{m_3 \times V_2} \times \frac{100}{1000} \quad (2)$$

Trong đó:

TCVN 8978:2011

m_1 là khối lượng folat có trong mỗi dung dịch mẫu thử pha loãng trong 6.5.4.2 đọc được từ đường chuẩn, tính bằng nanogam (ng);

m_2 là khối lượng folat có trong các chế phẩm enzym được sử dụng, tính bằng nanogam (ng);

V_1 là tổng thể tích cuối cùng của dung dịch mẫu thử trong 6.5.3.4, tính bằng mililit (ml);

m_3 là khối lượng mẫu thử được lấy để phân tích, tính bằng gam (g);

V_2 là thể tích dung dịch mẫu thử được chuyển vào ống nghiệm trong 6.5.4.2, tính bằng mililit (ml);

100 là hệ số chuyển đổi để thu được kết quả trên 100 g mẫu thử;

1000 là hệ số chuyển đổi để thu được kết quả tính bằng microgam folat.

7.3 Tiêu chí chấp nhận dữ liệu

Tiêu chí để chấp nhận các dữ liệu có thể phụ thuộc vào quy mô phép thử và phải do mỗi phòng thử nghiệm tự thiết lập. Ít nhất cũng phải xem xét các thông số sau:

- độ đục tối đa của các mẫu trắng đã cấy;
- độ đục tối thiểu của dung dịch hiệu chuẩn đậm đặc nhất;
- sự khác nhau giữa các độ hấp thụ thu được ở mỗi mức hiệu chuẩn;
- sự khác nhau về lượng folat tính được giữa tất cả các độ pha loãng của dung dịch mẫu thử;
- phân tích chất chuẩn có liên quan đã được chứng nhận (nếu có thể);

Tiêu chí để chấp nhận dữ liệu có thể bao gồm việc kiểm tra các kết quả với axit folic-5 formyltetrahydro làm chất chuẩn. Các kết quả cần tương đương với kết quả thu với axit folic làm chất chuẩn.

7.4 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả là phần khối lượng folat tổng số có trong mẫu thử ($\mu\text{g}/100\text{ g}$).

8 Độ chụm

8.1 Yêu cầu chung

Độ chụm của phương pháp được thiết lập bởi các phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725 [0]. Các kết quả thu được từ các phép thử này được nêu trong Phụ lục B. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng này có thể không áp dụng được để phân tích các dải nồng độ và chất nền khác với dải nồng độ và chất nền nêu trong Phụ lục B.

8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ, thu được khi tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r .

Các giá trị này là:

Bột mì nguyên cám (CRM 121)	$\bar{x} = 50,0 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 12,9 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Sữa bột (CRM 421)	$\bar{x} = 142 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 26 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Rau hỗn hợp (CRM 485)	$\bar{x} = 315 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 43 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Gan lợn (CRM 487)	$\bar{x} = 1330 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$r = 307 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

8.3 Độ tái lập

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

Các giá trị này là:

Bột mì nguyên cám (CRM 121)	$\bar{x} = 50,0 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 31,3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Sữa bột (CRM 421)	$\bar{x} = 142 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 67 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Rau hỗn hợp (CRM 485)	$\bar{x} = 315 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 122 \mu\text{g}/100 \text{ g}$
Gan lợn (CRM 487)	$\bar{x} = 1330 \mu\text{g}/100 \text{ g}$	$R = 637 \mu\text{g}/100 \text{ g}$

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- các kết quả và các đơn vị biểu thị kết quả;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong khi tiến hành thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn;
- tên và chữ ký của người chịu trách nhiệm phân tích.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Việc xử lý enzym tùy chọn

A.1 Yêu cầu chung

Việc xử lý mẫu thử bằng cách bổ sung các enzym có thể tạo thuận tiện cho việc chiết folat [5] đến [9]. Có thể bổ sung protease và α -amylase hoặc hỗn hợp của hai enzym này đồng thời vào các mẫu giàu protein và tinh bột. Cần phải tối ưu hóa các điều kiện (ví dụ: trình tự bổ sung, pH và nhiệt độ ủ) đối với loại mẫu cần nghiên cứu. Các ví dụ về quy trình xử lý bổ sung enzym được nêu trong A.2 và A.3.

Có thể cần phải lọc dịch chiết, nhất là khi có xử lý enzym. Có thể lọc dễ dàng hơn bằng cách chỉnh pH đến 4,5 trước khi pha loãng và chiết.

Có thể chuẩn bị γ -glutamyl hydrolase từ một trong nhiều nguồn. Phải chú ý bảo đảm đủ hoạt tính của γ -glutamyl hydrolase đối với chế phẩm enzym được sử dụng và tối ưu hóa pH và nhiệt độ khi ủ [10], [11]. Có thể cần đến hỗn hợp của các chế phẩm enzym khác nhau. Việc chuẩn bị γ -glutamyl hydrolase từ thận lợn được mô tả trong 4.4.2.2 và các nguồn tùy chọn được mô tả trong A.4, A.5, A.6.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng bột axeton thận lợn loại II³ làm nguồn thu γ -glutamyl hydrolase.

A.2 Xử lý protease

A.2.1 Protease

Protease vi khuẩn (mycolysin, EC 3.4.24.31) [12] từ *Streptomyces griseus* hoặc tương đương³).

A.2.2 Dung dịch protease (2mg/ml)

Hòa tan 0.05 g protease vi khuẩn vào 25 ml nước. Lọc qua bông thủy tinh nếu cần và bảo quản trong tủ lạnh. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

A.2.3 Cách tiến hành

Thêm 1 ml dung dịch protease (A.2.2) vào dịch chiết mẫu (6.3.2) đầy nắp và ủ ở +37 °C trong 3 h. Khử hoạt hóa của enzym bằng cách làm nóng ở 100 °C trong 3 min và để nguội. Xử lý tiếp bằng α -amylase (A.3) hoặc bằng γ -glutamyl hydrolase (6.3.3. hoặc A.4).

³ Đây là ví dụ về sản phẩm của hãng Sigma hoặc Difco. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng, con tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương đương nếu chúng cũng cho kết quả tương tự.

A.3 Xử lý α -amylase

A.3.1 α -amylase

α -amylase nấm (EC 3.2.1.1) [12], hoặc tương đương³⁾.

A.3.2 Dung dịch α -amylase (20mg/ml)

Hòa tan 0,5 g α -amylase nấm (A.3.1) trong 25 ml nước. Bảo quản trong tủ lạnh. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

A.3.3 Cách tiến hành

Thêm 1 ml dung dịch α -amylase (A.3.2) vào dịch chiết mẫu (6.3.2) đầy nắp và ủ ở +37 °C trong 2 h. Khử hoạt tính của enzym bằng cách làm nóng ở 100 °C trong 3 min và để nguội. Xử lý tiếp bằng α -amylase (A.3) hoặc bằng γ -glutamyl hydrolase (6.3.3. hoặc A.4).

A.4 Nguồn γ -glutamyl hydrolase tùy chọn: tuyến tụy gà

A.4.1 Tuyến tụy gà khô³⁾

A.4.2 Dung dịch tuyến tụy gà (5mg/ml)

Hòa 0,5 ml tụy gà vào trong 100 ml đệm phosphat (4.3.6). Khuấy mạnh trong 10 min. Chuyển vào các ống nghiệm 20 mm x 150 mm rồi cho ly tâm trong 10 min ở 1000 g. Gạn phần nổi phía trên qua bông thủy tinh vào cốc có mỏ, đầy nắp cốc và bảo quản trong tủ lạnh. Chuẩn bị dung dịch mới trong ngày sử dụng.

A.4.3 Cách tiến hành

Trộn cẩn thận 1 ml dịch chiết mẫu (6.3.2), 3,5 ml đệm phosphat chứa ascorbat pH 7,8 (4.3.6) và 0,6 ml dung dịch tụy gà (A.4.2). Ủ ở 37 °C trong 16 h. Khử hoạt tính enzym bằng cách làm nóng ở 100 °C trong 3 min và để nguội. Chuyển vào bình định mức 10 ml và thêm chất đệm phosphat chứa ascorbat pH 6,1 (4.3.5) cho đến vạch. Cho ly tâm (10 min ở 1000 g) để loại bỏ protein kết tủa. Bảo quản phần nổi phía trên ở nhiệt độ 20 °C để phân tích tiếp.

A.5 Nguồn γ -glutamyl hydrolase tùy chọn: huyết tương máu chuột

A.5.1 Huyết tương máu chuột, tươi³⁾

A.5.2 Huyết tương máu chuột đã thẩm tách [13]

Chuyển 100 ml huyết tương máu chuột tươi vào bình thẩm tách (5.6) và thẩm tách trong đệm CHES/HEPES, pH 7,85 (4.3.7) ở 4 °C trong 24 h. Bảo quản huyết tương máu chuột đã thẩm tách với các lượng 0,5 ml ở nhiệt độ -80 °C trong tối đa ba tháng.

TCVN 8978:2011

A.5.3 Cách tiến hành

Trộn cẩn thận 1 ml dịch chiết mẫu (6.3.2), 2,75 ml đệm phosphat chứa ascorbat pH 7,8 (4.3.6), 1 ml của 2-mercaptoethanol (4.2.4) và 0,25 ml huyết tương máu chuột đã thẩm tách (A.5.2). Ủ ở 37 °C trong 4 h. Khử hoạt tính của enzym bằng cách làm nóng ở 100 °C trong 3 min và để nguội. Chỉnh pH đến 6,1 bằng axit clohydric (4.2.6). Chuyển vào bình định mức 10 ml và pha loãng bằng đệm phosphat chứa ascorbat pH 6,1 (4.3.5) cho đến vạch. Cho ly tâm (10 min ở 1000 g) để loại bỏ protein kết tủa. Bảo quản phần nổi phía trên ở nhiệt độ -18 °C để phân tích tiếp.

A.6 Nguồn γ -glutamyl hydrolase tùy chọn: huyết tương máu người

A.6.1 Huyết tương máu chuột, đông khô

A.6.2 Huyết tương máu người hoàn nguyên

Hoàn nguyên huyết thanh người đông khô bằng 5 ml nước và khuấy nhẹ trong 30 min ở nhiệt độ phòng. Bảo quản trong đá lạnh. Chuẩn bị ngay trong ngày sử dụng.

A.6.3 Cách tiến hành

Trộn cẩn thận 1 ml dịch chiết mẫu (6.3.2), 2,75 ml đệm phosphat chứa ascorbat pH 4,5 (4.3.4), 1 ml của 2-mercaptoethanol (4.2.4) và 0,25 ml huyết tương máu người đã hoàn nguyên (A.6.2). Ủ ở 37 °C trong 3 h. Khử hoạt tính của enzym bằng cách làm nóng ở 100 °C trong 3 min và để nguội. Chỉnh pH đến 6,1 bằng natri hydroxit (4.2.7). Chuyển vào bình định mức 10 ml và pha loãng bằng đệm phosphat chứa ascorbat pH 6,1 (4.3.5) đến vạch. Cho ly tâm (10 min ở 1000 g) để loại bỏ protein kết tủa. Bảo quản phần nổi phía trên ở nhiệt độ -18 °C để phân tích tiếp.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Kết quả của các phép thử liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp đã được xác lập bởi các phép thử liên phòng thử nghiệm trong Chương trình Tiêu chuẩn, Đo lường và Thử nghiệm của EU (EU SMT) và được thực hiện theo ISO 5725. Các kết quả thử nghiệm này đã được công bố [2].

CHÚ THÍCH: Sau khi thực hiện các thử nghiệm này, ISO 5725:1986 đã được thay thế bằng ISO 5725-1, ISO 5725-2, ISO 5725-3, ISO 5725-4 và ISO 5725-6 (các phần này được ban hành năm 1994) và ISO 5725-5:1998. Các tiêu chuẩn này đã được chấp nhận thành bộ tiêu chuẩn TCVN 6910 (ISO 5725).

Bảng B.1 – Kết quả thống kê của các phép thử liên phòng thử nghiệm về xác định hàm lượng folat tổng số trong thực phẩm (EU SMT)

	CRM 121 (Bột mì nguyên hạt)	CRM 421 (Sữa bột)	CRM 485 (Rau hỗn hợp)	CRM 487 (Gan lợn)
Năm thực hiện thử nghiệm	1996	1996	1996	1996
Số lượng phòng thử nghiệm	9	10	8	12
Số lượng dữ liệu	15	15	12	17
Số kết quả riêng lẻ	73	75	61	87
Số kết quả được chấp nhận	73	75	61	87
Trung bình của các bộ dữ liệu, $\mu\text{g}/100\text{g}$	50,0	142	315	1330
Độ lệch chuẩn lặp lại, (s_r) $\mu\text{g}/100\text{g}$	4,6	9	15	110
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, (RSD_r)	9,2 %	6,7 %	4,9 %	14,8 %
Độ lệch chuẩn tái lập, (s_R) $\mu\text{g}/100\text{g}$	11,2	24	43	227
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, (RSD_R)	22,3 %	16,9 %	13,8 %	17,0 %
Độ lệch chuẩn của trung bình các bộ dữ liệu, $\mu\text{g}/100\text{g}$	11,0	24	44	198
Nửa độ rộng của khoảng tin cậy 95 % của trung bình các bộ dữ liệu, $\mu\text{g}/100\text{g}$	6,2	13	28	125

Thư mục tài liệu tham khảo

- [0] ISO 5725, Precision of test methods – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by interlaboratory tests.
- [1] Barrett, A.J., Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions, 1997, Eur J Biochem. 1997, 250(1): p. 1-6.
- [2] Finglas, P.M., et al., The certification of the mass fractions of vitamins in four reference materials; wholemeal flour (CRM 121), milk powder (CRM 421), lyophilized mixed vegetables (CRM 485) & lyophilized pig's liver (CRM 487). B1, B6 & folate in CRM 121; B1, B2, B6, B12 & folate in CRMs 421 & 487. and B1, B6, folate & carotenoids in CRM 485. 1999. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- [3] Gregory, J.F., III, Sartain, D.B, and Day, B.P.F.: Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. Journal of Nutrition. 1984, 114; p. 341-353.
- [4] Blakley, R.L., The biochemistry of folic acid and related pteridines. Frontiers of Biology. Vol. 13. 1969. Amsterdam; North-Holland Publishing.
- [5] Rader, J.I., Weaver, C.M., and Angyal, G.; Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. Food Chemistry. 1998, 62(4): p. 451-465.
- [6] Pfeiffer, C.M., Rogers, L.M., and Gregory, J.F., III: Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997, 45; p. 407-413.
- [7] Tamura, T., et al.. Food folate assay with protease, α -Amylase. and folate conjugase treatments. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997. 45: p. 135-139.
- [8] Martin, J.I., Landen, W.I. Jr. and Soliman, A.G.M.: Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 1990. 73(5): p. SOS-SOS.
- [9] DeSouza, S. and Eilenmiller, R.: Effect of different enzyme treatments on extraction of total folate from various foods prior to microbiological assay and radioassay. Journal of Micronutrient Analysis. 1990, 7: p. 37-57.
- [10] Goli, D.M., and Vanderslice, J.T.: Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate. Food Chemistry. 1992. 43: p. 57-64.
- [11] Pedersen, J.C.: Comparison of gamma-glutamyl hydrolase (conjugase; EC 3.4.22.12) and amylase treatment procedures in the microbiological assay for food folates. British Journal of Nutrition, 1988. 59(2): p. 261-271.
- [12] NC-IUBMB. Enzyme nomenclature 1992. 1992, San Diego: Academic Press.
- [13] Konings, E.J.M.: A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. Journal of AOAC International, 1999. 82(1): p. 119-127.