INSO
17572
1st. Edition
2014

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۷۵۷۲
چاپ اول
۱۳۹۲

مواد غذایی - اندازه‌گیری ویتامین B_1 به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

Foodstuffs - Determination of vitamin B_1 by High Performance Liquid Chromatography

ICS:67.050

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود . پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1]،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/ یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه-بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

---

1 - International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3 - International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«مواد غذایی -اندازه‌گیری ویتامین B_1 به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا»

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
معصوم، سعید (دکترای شیمی تجزیه)	دانشگاه کاشان
دبیر:	
انصاری، فرزانه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در رشته تغذیه)	سازمان ملی استاندارد- پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)	
بلقیسی، سبا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد- پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
جلیلی، مریم (دکترای صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد- پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
حاتم بیگی، نادر (فوق لیسانس شیمی تجزیه)	آزمایشگاه همکار کیمیا تست فام
شهرآشوب، حامد (لیسانس صنایع غذایی)	آزمایشگاه همکار کیمیا تست فام
علائی روزبهانی، زهرا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد- پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
نجفی، الهام (دکترای شیمی معدنی)	پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی
ولیدی، ملیحه (لیسانس صنایع غذایی)	آزمایشگاه همکار کیمیا تست فام

فهرست مندرجات

عنوان		صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران		ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد		د
پیش گفتار		و
۱	هدف و دامنه کاربرد	۱
۲	مراجع الزامی	۱
۳	اصول آزمون	۱
۴	مواد و / یا واکنشگرها	۲
۵	وسایل	۶
۶	روش اجرای آزمون	۷
۷	روش محاسبه	۱۱
۸	دقت	۱۱
۹	گزارش آزمون	۱۳
پیوست الف (اطلاعاتی)- مثال‌هایی از کروماتوگرام های سیستم HPLC		۱۴
پیوست ب (اطلاعاتی)- اطلاعات مربوط به دقت		۱۶
پیوست پ (اطلاعاتی)- سیستم های HPLC جایگرین		۱۸
پیوست ت (اطلاعاتی)- کتابنامه		۱۹

پیش گفتار

استاندارد" مواد غذایی - اندازه‌گیری ویتامین B_1 به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا " که پیش نویس آن توسط کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در یک هزار و سیصد و نوزدهمین اجلاس کمیتهٔ ملی استاندارد خوراک و فرآورده های کشاورزی مورخ ۱۳۹۲/۱۲/۵ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان ملی استاندارد ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیراست:

1- DIN EN 14122: 2003, Foodstuffs – Determination of vitamin B_1 by HPLC.

مواد غذایی - اندازه‌گیری ویتامین B_1 به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش اندازه‌گیری میزان ویتامین B_1 در مواد غذایی، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا[1]، می‌باشد.

یادآوری: ویتامین B_1، جزء جرمی تیامین کل و حاوی مشتقات فسفوریله شده‌ی آن می‌باشد.

۲ مراجع الزامی

مدارک زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزیی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه ها و تجدید نظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مرجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸: سال ۱۳۸۱، آب- مورد مصرف درآزمایشگاه تجزیه - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون.

۳ اصول آزمون

تیامین موجود در مواد غذایی با استفاده از هیدرولیز اسیدی و سپس واکنش دِفسفوریلاسیون طی فرآیند آنزیمی استخراج و به وسیله دستگاه HPLC از طریق مشتق سازی (قبل و/ یا بعد از ستون) به تیوکروم تبدیل و اندازه‌گیری می‌شود.

1 HPLC : High Performance Liquid Chromatography

۴ مواد و/یا واکنشگرها

۴-۱ کلیات

در طی مراحل اندازه‌گیری، اگر دستور دیگری داده نشده باشد، فقط از واکنشگرهای تجزیه‌ای[1] خالص آزمایشگاهی شناخته شده بهره بگیرید. آب مصرفی برای آزمایش باید آب مقطر نوع ۱ مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه – ویژگی ها و روش های آزمون، یا آب دوبار تقطیر باشد.

۴-۲ موادشیمیایی و محلول ها

۴-۲-۱ متانل با درجه HPLC $w(CH_3OH) \geq 99.8\ \%$

۴-۲-۲ اسید استیک $c(CH_3COOH) = 0.02\ mol/l$

۴-۲-۳ ایزوبوتانل $w(C_4H_{10}O) \geq 98\ \%$

۴-۲-۴ سدیم دی هیدروژن فسفات $w(NaH_2PO_4) \geq 99.8\ \%$

۴-۲-۵ هیدروکلریک اسید $w(HCl) = 36\ \%$

۴-۲-۶ هیدروکلریک اسید $c(HCl) = 0.1\ mol/l$

۴-۲-۷ سولفوریک اسید $c(H_2SO_4) = 0.05\ mol/l$

۴-۲-۸ سدیم هیدروکسید $w(NaOH) \geq 99\ \%$

۴-۲-۹ محلول سدیم هیدروکسید $\rho\ (NaOH) = 150\ g/l$

۴-۲-۱۰ محلول سدیم هیدروکسید $\rho\ (NaOH) = 200\ g/l$

۴-۲-۱۱ پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) $w\{K_3[Fe(CN)_6]\} \geq 99\ \%$

۴-۲-۱۲ محلول پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) $\rho\ \{K_3[Fe(CN)_6]\} = 10\ g/l$

۴-۲-۱۳ محلول قلیایی پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) $\rho\ \{K_3[Fe(CN)_6]\} = 0.4\ g/l$

1 Analytical grade

مقدار ۲ میلی‌لیتر محلول پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) (طبق بند **۴-۲-۱۲**) را با محلول سدیم هیدروکسید (طبق بند **۴-۲-۹**) به حجم ۵۰ میلی لیتر برسانید.

این محلول را تازه و به صورت روزانه تهیه کنید.

۴-۲-۱۴ محلول قلیایی پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) $\rho\{K_3[Fe(CN)_6]\} = 0.5\ g/l$

مقدار ۲٫۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) (طبق بند **۴-۲-۱۲**) را با محلول سدیم هیدروکسید (طبق بند **۴-۲-۹**) به حجم ۵۰ میلی لیتر برسانید.

۴-۲-۱۵ آنزیم تاکادیاستاز[1](آنزیم دِفسفریلاسیون)

یادآوری: تاکادیاستاز (این ماده تیامین هیدروکلراید نیز نامیده می‌شود) برای اندازه گیری اطلاعات دقت استفاده می شود.

۴-۲-۱۶ محلول سدیم استات $c(CH_3COONa \cdot 3H_2O) = 2.5\ mol/l$

۴-۲-۱۷ محلول سدیم استات $c(CH_3COONa \cdot 3H_2O) = 0.5\ mol/l$

۴-۲-۱۸ فاز متحرک[2] HPLC

مثال‌هایی برای مخلوط‌های مناسب حلال (بر اساس جزء حجمی)، متانل ۱۰ تا ۵۰ درصد (طبق بند ۴-۲-۱) در آب و یا استفاده از بافر فسفات و یا بافر استات اشاره شده در پیوست پ اطلاعاتی این استاندارد.

امکان استفاده از موادی با یون های جفت شده وجود دارد.

۴-۲-۱۹ بافر فسفات $c(KH_2PO_4) = 9\ mmol/l\ (pH=3.5)$

۴-۲-۲۰ ترا اتیل آمونیوم کلرید $w(C_8H_{20}NCl) \geq 98\ \%$

۴-۲-۲۱ سدیم هپتان سولفونات $w(C_7H_{15}NaO_3S) \geq 98\ \%$

۴-۲-۲۲ بافر استات $c(CH_3COOH) = 50\ mmol/l\ (pH=4.0)$

۴-۲-۲۳ مواد استاندارد[3]

۴-۲-۲۳-۱ کلیات

---

1 Taka diastase
2 Mobile phase
3 Standard substances

تیامین‌کلریدهیدروکلرید را می توانید از تامین کننده‌های مختلفی تهیه کنید. درجه خلوص مواد استاندارد حاوی تیامین می‌تواند متفاوت باشد، بنابراین لازم است غلظت محلول کالیبراسیون به روش بیناب سنجی ماورای بنفش[1] تعیین شود.

۴-۲-۲۳-۲ تیامین کلرید هیدروکلرید $w(C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl) \geq 99\ \%$

۴-۲-۲۳-۳ تیامین منوفسفات کلرید $w(C_{12}H_{17}ClN_4O_4PS) \geq 98\ \%$

۴-۲-۲۳-۴ تیامین پیروفسفات کلرید (کوکربوکسیلاز) $w(C_{12}H_{19}ClN_4O_7P_2S) \geq 98\ \%$

۴-۲-۲۴ محلول های ذخیره[2]

۴-۲-۲۴-۱ تیامین کلرید هیدروکلرید $(C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl)$ $\rho \approx 0.1$ mg/ml

برای مثال مقدار معینی از تیامین کلرید هیدروکلرید استاندارد (طبق بند۴-۲-۲۳-۲) را به دقت وزن کنید و درحلال مناسب حل کرده و به حجم معین برسانید. برای مثال مقدار ۱۰ میلی‌گرم تیامین‌کلریدهیدروکلرید (طبق بند۴-۲-۲۳-۲) را در یک بالن اندازه دار ۱۰۰ میلی‌لیتری به دقت وزن کنید و با هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) ابتدا حل و سپس به حجم برسانید.
این محلول در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت زمان ۴ هفته قابل نگهداری می‌باشد.

۴-۲-۲۴-۲ تیامین منو فسفات $(C_{12}H_{17}ClN_4O_4PS)$ $\rho \approx 0.1$ mg/ml

برای مثال مقدار معینی از تیامین‌منوفسفات استاندارد (۴-۲-۲۳-۳)را به دقت وزن کنید و درحلال مناسب حل و به حجم معین برسانید. برای مثال مقدار ۱۰میلی‌گرم تیامین منو فسفات کلراید (طبق بند ۴-۲-۲۳-۳) را در یک بالن اندازه دار ۱۰۰ میلی‌لیتری به دقت وزن کنید و با هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) ابتدا حل و سپس به حجم برسانید.
این محلول در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت زمان ۴ هفته قابل نگهداری می‌باشد.

۴-۲-۲۴-۳ تیامین پیرو فسفات $(C_{12}H_{19}ClN_4O_7P_2S)$ $\rho \approx 0.1$ mg/ml

برای مثال مقدار معینی از تیامین‌پیروفسفات استاندارد (طبق بند۴-۲-۲۳-۴) را به دقت وزن کنید و درحلال مناسب حل و به حجم معین برسانید. برای مثال مقدار ۱۰ میلی‌گرم تیامین‌پیروفسفات‌کلراید (طبق

1 UV-spectrometry
2 Stock solutions

بند ۴-۲-۲۳-۴) را در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری به دقت وزن کنید و با هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) ابتدا حل و سپس به حجم برسانید.

۴-۲-۲۴-۴ آزمون های غلظت

مقدار ۱۰ میلی لیتر از محلول ذخیره تیامین‌کلریدهیدروکلرید (طبق بند ۴-۲-۲۳-۲) را با هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانید و میزان جذب آن را در سل کوارتز ۱ سانتی‌متری، در طول موج بیشینه حدود ۲۴۷ نانومتر در مقابل هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) در سل مرجع به عنوان شاهد، با استفاده از دستگاه بیناب سنج ماورای بنفش اندازه‌گیری کنید.

غلظت جرمی به میکروگرم در میلی‌لیتر را با استفاده از فرمول زیر محاسبه کنید:

$$\rho = \frac{\varepsilon_{247} \times 10000 \times 10}{421}$$

که در آن:

ε_{247} جذب محلول استاندارد تیامین کلرید هیدروکلرید در ۲۴۷ نانومتر؛

۴۲۱ ضریب جذب محلول یک درصد تیامین کلراید هیدروکلراید در هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار (طبق بند ۴-۲-۶) و در سل ۱ سانتی متری ($A_{1cm}^{1\%}$)؛

۱۰ فاکتور رقیق سازی.

۴- ۲-۲۵ محلول های استاندارد

۴-۲-۲۵-۱ تیامین کلرید هیدروکلرید $(C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl)$ $\rho \approx 1$ µg /ml to 10 µg /ml

به وسیله پیپت، مقدار ۱ تا ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ذخیره تیامین‌کلریدهیدروکلرید (طبق بند ۴-۲-۲۳-۲) را به داخل بالن اندازه‌دار ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده سپس با حلال مناسب به عنوان مثال هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) به حجم برسانید.

این محلول در دمای ۴ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت ۱ ماه قابل نگهداری می‌باشد.

۴-۲-۲۵-۲ تیامین منو فسفات $(C_{12}H_{17}ClN_4O_4PS)$ $\rho \approx 1$ µg /ml

به وسیله پیپت، مقدار ۱ تا ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ذخیره تیامین‌منوفسفات (طبق بند ۴-۲-۲۳-۳) را به داخل بالن اندازه‌دار ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده سپس با حلال مناسب به عنوان مثال هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) به حجم برسانید.

این محلول در دمای ۴ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت ۱ ماه قابل نگهداری می‌باشد.

۴-۲-۲۵-۳ تیامین پیرو فسفات $(C_{12}H_{19}ClN_4O_7P_2S)$ $\rho \approx 1$ µg /ml

به وسیله پیپت، مقدار ۱ تا ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ذخیره تیامین‌پیروفسفات (طبق بند ۴-۲-۲۳-۴) را به داخل بالن اندازه‌دار ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده سپس با حلال مناسب به عنوان مثال هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) به حجم برسانید.
این محلول در دمای ۴ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت ۱ ماه قابل نگهداری می باشد.

۵ وسایل

۵-۱ کلیات

افزون بر وسایل معمولی آزمایشگاه، وسایل به شرح زیر نیز مورد نیاز است:

۵-۲ بیناب سنج ماورای بنفش[1]، قادر به اندازه‌گیری جذب در طول موج های تعیین شده.

۵-۳ دستگاه اتوکلاو یا/وسیله گرم کننده، دستگاه اتوکلاو به منظور استخراج برای مثال انواع دستگاه‌های مجهز به سیستم اندازه‌گیری فشار و دما، دستگاه گرم‌کننده‌ی الکتریکی یا حمام آب.

۵-۴ **سیستم HPLC**، دارای یک پمپ، وسیله تزریق کننده نمونه[2]، آشکارساز فلورسانس[3] با طول موج‌های تهیجی و نشری تنظیم شده به عنوان مثال: به ترتیب در طول موج های ۳۶۶ و ۴۲۰ نانومتر و سیستم ارزیابی مانند انتگرال‌گیر[4].

۵-۵ ستون های HPLC

۵-۶-۱ کلیات

از ستون‌هایی با اندازه ذرات یا ابعاد متفاوت، غیر از آن چه در این استاندارد ملی استفاده شده است را نیز می‌توانید استفاده کنید. به منظور تضمین نتایج یکسان، باید پارامترهای جداسازی با شرایط مورد استفاده تطبیق داده شود. معیار کارایی برای ستون تجزیه مناسب، تفکیک آنالیت‌های مورد نظر در خط پایه[5] می‌باشد.

1 UV Spectrometer
2 Sample injecting device
3 Fluorescence detector
4 Integrator
5 Base line

۵-۶-۲ پیش ستون اکسایش[1]، ستون تجزیه‌ای[2] به عنوان مثال 60 RP با جنس بستر ذرات سیلیکاژل با اندازه ذرات ۵ میکرومتر، قطر ۴٫۰ تا ۴٫۶ میلی‌متر و طول ۱۰۰ تا ۲۵۰ میلی‌متر.

۵-۶-۳ پس ستون اکسایش[3]، ستون تجزیه‌ای به عنوان مثال LC-18، اندازه ذرات ۵ میکرومتر، قطر ۴/۰ تا ۴/۶ میلی‌متر و طول ۱۰۰تا ۲۵۰ میلی‌متر.

۵-۷ دستگاه صافی[4]، عبور فاز متحرک به هنگام عبور محلول‌های آزمایه از صافی غشایی برای مثال: با اندازه روزنه ۰٫۴۵ میکرومتر، قبل از استفاده یا تزریق، موجب افزایش طول عمر ستون خواهد شد.

۵-۸ پمپ واکنشگر پس ستون و لوله مشتق ساز[5] ، سیستم مناسب توزیع واکنشگر، لوله رابط نوع T و لوله مشتق ساز برای مثال ۱۰ متر × ۰٫۳۳ میلی متر.

۶ روش اجرای آزمون

۶-۱ آماده سازی آزمایه

آزمایه یا نمونه آزمایشگاهی را همگن و یکنواخت کنید. مواد زبر و خشن را به وسیله آسیاب مناسب خرد کرده و مجدداً مخلوط کنید. اقدامات احتیاطی، مانند سرد نمودن ابتدایی نمونه‌ها جهت اجتناب از قرار گرفتن در معرض دمای بالا به مدت طولانی، باید انجام پذیرد.

۶-۲ آماده سازی محلول نمونه آزمون[6]

۶-۲-۱ استخراج

مقدار معینی، برای مثال مقدار ۲ الی ۱۰ گرم از آزمایه را به دقت وزن کرده و به یک ارلن مایر منتقل کنید. سپس به آن حجم مشخصی از ۶۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید (طبق بند ۴-۲-۶) یا سولفوریک‌اسید (طبق بند ۴-۲-۷) اضافه کنید. pH این محلول، نباید بیشتر از ۳ شود. دهانه ظرف را با شیشه‌ی ساعت پوشانده و آن را در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت زمان ۳۰ دقیقه، یا حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت زمان ۶۰ دقیقه قرار دهید.

---

1 Pre-column oxidation
2Analytical Column
3 Post-column oxidation
4 Filter device
4Post-Column reactor pump and derivitization tube
6 Sample test solution

یادآوری: داده‌های مطالعات مراکز تحقیقاتی نشان داده است که محدوده وسیعی از شرایط برای هیدروکلریک اسید را می‌توان به کار برد. (دمای ۹۵ تا ۱۳۰ درجه سلسیوس ، مدت زمان ۱۵ دقیقه تا ۶۰ دقیقه) در دماهای بالاتر، زمان کوتاهتر خواهد شد.

۶-۲-۲ تیمار آنزیمی

پس از خنک کردن تا دمای اتاق، pH عصاره را به منظور فعالیت آنزیمی، با استفاده از محلول سدیم استات بند (طبق بند ۴-۲-۱۶) یا (طبق بند ۴-۲-۱۷) و افزودن مقدار مناسب آنزیم دِفسفریلاسیون (طبق بند ۴-۲-۱۵)، تنظیم کنید. مخلوط به دست آمده را در دما و مدت زمان مناسب، برای فعالیت آنزیم به کاربرده شده گرم‌خانه‌گذاری کنید. پس از خنک کردن تا دمای اتاق، محلول را به یک بالن اندازه‌دار تیره منتقل کرده و آن را با آب مقطر یا حلال مناسب دیگر تا رسیدن به حجم مورد نظر رقیق کنید (V_e).

یادآوری۱: در صورت استفاده از تاکادیاستاز، با استفاده از محلول سدیم استات بند (طبق بند ۴-۲-۱۶) یا (طبق بند ۴-۲-۱۷) و افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم در هر گرم نمونه، تاکادیاستاز (طبق بند ۴-۲-۱۵)، pH عصاره را به منظور فعالیت آنزیمی به ۴ برسانید. مخلوط حاصل را در دمای ۳۷ تا ۴۶ درجه سلسیوس، به مدت زمان ۱۶ الی ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری کنید.

یادآوری۲: واکنش دِفسفوریلاسیون به ماتریکس نمونه[1] و آنزیمِ مورد استفاده بستگی دارد. دِفسفریلاسیون کامل می‌تواند در زمان کوتاهتر صورت پذیرد.

به منظور دستیابی به دِفسفوریلاسیون[2] بهینه، مرحله آنزیمی را با نمونه‌ای حاوی مقدار معینی از ویتامین B_1 فسفات و یا با افزودن تیامین‌فسفات، یا تیامین‌منوفسفات به آزمونه، انجام دهید. با اندازه‌گیری میزان تیامین حاصل، کفایت روش تایید می‌شود.

آنزیم مورد استفاده جهت واکنش دِفسفوریلاسیون، تاکا دیاستاز[3] ، می‌تواند حاوی تیامین باشد. مقدار تیامین وارد شده توسط آنزیم، در محاسبات نتیجه آزمون در نظر گرفته شده است.

۶-۲-۳ اکسیداسیون تیامین به تیوکروم

۶-۲-۳-۱ پیش ستون اکسایش

مقدار ۱ میلی لیتر از نمونه حاصل از فرآیند آنزیمی (طبق بند ۶-۲-۲)، محلول استاندارد (طبق بند ۴-۲-۲۳) یا محلول شاهد را به ویال یا ظروف مناسب منتقل کرده و به هر یک از ویال‌ها ۱ میلی‌لیتر محلول قلیایی پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) (طبق بند ۴-۲-۱۴) بیافزایید. محلول نمونه آزمون را برای مدت زمان معین (برای مثال: ۱۰ ثانیه) تکان دهید. پس از مدت زمان معین (برای مثال: یک دقیقه) آن را به دستگاه HPLC فاز معکوس[4] تزریق کنید. (به جدول پ-۱ پیوست اطلاعاتی این استاندارد مراجعه کنید)

1 Sample matrix
2 Dephosphorylation
3 Taka diastase
4 Reversed phase HPLC system

متعاقباً، محلول اکسید شده را می‌توانید در ۱٫۵میلی لیتر ایزوبوتانول (طبق بند ۴-۲-۳) استخراج و سپس عصاره استخراجی را تزریق کنید (برای مثال: با فسفریک اسید). به منظور رفع ترکیبات مزاحم و محافظت از ستونHPLC، توصیه می‌شود که خنثی سازی[1] شود و یا عمل پاکسازی[2] توسط استخراج فاز جامد[3] صورت پذیرد.

یادآوری: اکسیداسیون تیامین به تیوکروم می‌تواند توسط موادی (مانند:پلی فنل‌ها) موجود در برخی مواد غذایی، مهار شود. این امر اغلب در مواد غذایی حاوی کاکائو ایجاد می‌شود؛ هر چند در سایر مواد غذایی نیز می تواند مشاهده شود.
اگر چنین اشکالی به وجود آید؛ توصیه می‌شود، با افزودن حجم مشخصی از محلول استانداردِ تیامین به عصاره نمونه (spick)، قبل از واکنش اکسیداسیون، میزان بازیافت کنترل شود. در صورتی که بازیافت خیلی پایین باشد توصیه می‌شود، مرحله پاکسازی عصاره با استفاده از رزین تبادل کاتیونی و یا با استفاده از HPLC مجهز به سیستم اکسیداسیون پس ستون انجام پذیرد.

۶-۲-۳-۲ شناسایی توسط اکسیداسیون پیش ستون

حجم‌های معینی از محلول های کالیبراسیون را همانند محلول‌های حاوی نمونه به دستگاه HPLC تزریق کنید. با مقایسه زمان بازداری پیک‌های مجزای کروماتوگرام محلول حاوی نمونه و محلول استاندارد، تیوکروم را شناسایی کنید.
افزودن مواد استاندارد به محلول مورد آزمون، هم چنین می‌تواند منجر به شناسایی پیک شود.

چنانچه شرایط ذکر شده در زیر دنبال گردد، جداسازی و اندازه گیری رضایت بخش خواهد بود.

(به شکل الف-۱ و پیوست اطلاعاتی پ -شرایط جایگزین HPLC این استاندارد مراجعه کنید)

فاز ساکن : Lichrospher® 60 RP Select B[2)]، اندازه ذرات ۵ µm و ابعاد ۴ mm × ۲۵۰ mm؛
فاز متحرک : متانل(طبق بند ۴-۲-۱)، بافر استات (طبق بند ۴-۲-۲۲)؛
میزان جریان : ۰٫۷ ml/min ؛
حجم تزریق : ۲۰ µl؛
آشکارسازی : فلوروسنجی؛ طول موج تهییج : ۳۶۶ nm و طول موج نشر : ۴۳۵ nm.

۶-۲-۳-۳ اکسیداسیون پس ستون

با استفاده از اکسیداسیون پس ستون و طی واکنش با محلول هگزاسیانوفرات (طبق بند ۴-۲-۱۴)، تیامین به تیوکروم اکسید می‌شود. جهت تشکیل تیوکروم، واکنشگر هگزاسیانوفرات (طبق بند ۴-۲-۱۴) را از طریق لوله اتصال T شکل، به حلال HPLC به طور مداوم (مثال:۰٫۳ ml/min) بیافزایید.

1-Neutralize
2-Clean up
3-Solid phase extraction

یادآوری: مرحله اکسیداسیون پس ستون (طبق بند ۶-۲-۳-۳) برای مثال تحت تاثیر: غلظت سدیم هیدروکساید قرار می‌گیرد. غلظت‌های بالای محلول هگزاسیانوفرات (طبق بند ۴-۲-۱۴) را می‌توانید با کاهش میزان جریان و بالعکس جبران کنید.

۶-۲-۳-۴ شناسایی توسط اکسیداسیون پس ستون

حجم‌های مناسبی از محلول‌های کالیبراسیون را همانند محلول‌های حاوی نمونه به دستگاه HPLC تزریق کنید. با مقایسه‌ی زمان بازداری پیک‌های مجزای کروماتوگرام محلول حاوی نمونه و محلول استاندارد، تیامین را شناسایی کنید. افزودن مواد استاندارد به محلول نمونه آزمون، هم چنین می تواند منجر به شناسایی پیک شود.

چنانچه شرایط ذکر شده در زیر دنبال کنید، جداسازی و اندازه‌گیری رضایت بخش خواهد بود.

(به شکل الف-۲ و پیوست اطلاعاتی پ -شرایط جایگزین HPLC این استاندارد مراجعه کنید).

فاز ساکن: Supelco® LC-18-D[2] ، اندازه ذرات ۵ µm و ابعاد ۴/۶ mm × ۲۵۰ mm؛

فاز متحرک: متانل (طبق بند ۴-۲-۱)؛ بافر فسفات (طبق بند ۴-۲-۱۹)، حاوی یک گرم در لیتر تترااتیل آمونیوم کلراید (طبق بند ۴-۲-۲۰) و ۵ mmol/l سدیم هپتان سولفونات (طبق بند ۴-۲-۲۱) (۳۵:۶۵)؛

میزان جریان: ۱ml/min؛

حجم تزریق: ۲۰µl ؛

واکنشگر پس‌ستون: محلول قلیایی پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) (طبق بند ۴-۲-۱۴)؛

شدت جریان واکنشگر: ۰/۳ ml/min؛

آشکارسازی: فلوروسنجی؛ طول موج تهییج : ۳۶۸ nm و طول موج نشر : ۴۴۰ nm.

یادآوری: درآنالیز برخی نمونه‌ها ممکن است، یک پیک اضافه مربوط به ۱- هیدروکسی- تیامین یا (۱- هیدروکسی اتیل) تیامین در کروماتوگرام مشاهده شود.

۶-۳ اندازه گیری

جهت اندازه‌گیری به روش کالیبراسیون خارجی، سطح زیر منحنی حاصل از نمونه را انتگرال‌گیری یا ارتفاع پیک حاصل از نمونه را اندازه‌گیری کرده و مقادیر متناظر را با نتایج پیک مشابه حاصل از ماده استاندارد مقایسه کنید. خطی بودن منحنی کالیبراسیون را کنترل کنید.

۷ روش محاسبه

محاسبه را بر اساس منحنی کالیبراسیون انجام دهید یا از برنامه های انتگرال‌گیری یا از روش ساده شده زیر استفاده کنید:

جزء جرمی (w) ویتامین B_1 را بر حسب تیامین کلراید هیدروکلراید با استفاده از فرمول زیر محاسبه کرده و به میلی‌گرم در ۱۰۰گرم نمونه گزارش کنید.

$$w = \frac{A_{ts} \times \rho \times v_e}{A_{st} \times m_s} \times \frac{100}{1000}$$

که در آن:

A_{ts} سطح زیر منحنی یا ارتفاع پیک (قله) تیوکروم محلول نمونه آزمون در واحدهای سطح یا ارتفاع؛

A_{st} سطح زیر منحنی یا ارتفاع پیک تیوکروم محلول استاندارد در واحدهای سطح یا ارتفاع؛

V_e حجم محلول نمونه آزمون به میلی لیتر؛

ρ غلظت جرمی تیامین کلراید هیدروکلراید در محلول استاندارد به میکروگرم در میلی لیتر؛

m_s وزن نمونه به گرم؛

۱۰۰ فاکتور محاسبه در ۱۰۰ گرم؛

۱۰۰۰ فاکتور تبدیل میکروگرم در ۱۰۰ گرم به میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم.

جهت بیان جزء جرمی (w) ویتامین B_1 بر حسب تیامین($C_{12}H_{17}CIN_4OS$)، نتیجه را در فاکتور ۰٫۸۹۲ ضرب کنید.

۸ دقت

۸-۱ کلیات

اطلاعات مربوط به دقت روش‌های متفاوت HPLC برای اندازه‌گیری تیامین در سال ۱۹۹۶ با یک بررسی مقایسه‌ای بین‌المللی، به نیابت از طرف کمیسیون اروپایی برنامه اندازه‌گیری و آزمون استانداردها[1]، بر روی نمونه آرد کامل (CRM[2]121) ، شیر خشک (CRM 421)، سبزی‌های مخلوط (CRM 485) ، جگر خشک‌شده (CRM 487) تهیه و تنظیم شده است (پیوست ب - اطلاعاتی این استاندارد).

۸-۲ تکرارپذیری[3]

تغییرپذیری در نتیجه به دست آمده از یک آزمایش که روی یک ماده مشخص مورد آزمون، به وسیله یک آزمایشگر، با به‌کارگیری همان تجهیزات، در کوتاه‌ترین دوره زمانی ممکن به دست آمده باشد، نباید در بیشتر از ۵ درصد[4] موارد، از حد تکرار پذیری r بیشتر باشد.

مقادیر تیامین کلراید هیدروکلراید عبارتند از:

1 European Commission's Standards Measurement and Testing Programme

2 Certified Reference Material

3 Repeatability

۴- در این استاندارد تکرار پذیری زمانی قابل قبول است که اختلاف تکرار آزمایش، بیشتر از ۵ درصد نباشد.

آرد کامل : $\bar{x}$ =۰/۴۵۲ $mg/100\ g$ r = ۰/۰۴۳ $mg/100\ g$

شیر خشک : $\bar{x}$ =۰/۶۴۵ $mg/100\ g$ r = ۰/۰۷۱ $mg/100\ g$

سبزی‌های مخلوط : $\bar{x}$ =۰/۲۹۵ $mg/100\ g$ r = ۰/۰۳۹ $mg/100\ g$

جگر : $\bar{x}$ =۰/۸۰۷ $mg/100\ g$ r ۰/۰۸۸ $mg/100\ g$

۳-۸ تجدیدپذیری[1]

تغییرپذیری در نتیجه میانگین به دست آمده از نتایج آزمون‌های مستقل، روی یک ماده مشخص مورد آزمون، که در آزمایشگاه‌های مختلف و با استفاده از تجهیزات متفاوت توسط آزمایشگرهای متفاوت انجام گیرد، نباید در بیشتر از ۵ درصد موارد، از حد تجدید پذیری R بیشتر باشد.

مقادیر تیامین کلراید هیدروکلراید عبارتند از:

آرد کامل : $\bar{x}$ =۰/۴۵۲ $mg/100\ g$ R = ۰/۱۹۰ $mg/100\ g$

شیر خشک : $\bar{x}$ =۰/۶۴۵ $mg/100\ g$ R = ۰/۲۴۳ $mg/100\ g$

سبزی‌های مخلوط : $\bar{x}$ =۰/۲۹۵ $mg/100\ g$ R = ۰/۱۷۸ $mg/100\ g$

جگر : $\bar{x}$ =۰/۸۰۷ $mg/100\ g$ R = ۰/۶۲۳ $mg/100\ g$

1 -Reproducibility

۹ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۹-۱ کلیه آگاهی‌های لازم برای شناسایی نمونه (نوع نمونه، منشاء نمونه، عنوان).

۹-۲ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران به شماره ....

۹-۳ تاریخ نمونه برداری.

۹-۴ روش نمونه برداری (در صورت وجود و اطلاع).

۹-۵ تاریخ دریافت نمونه از سوی آزمایشگاه.

۹-۶ نتایج به دست آمده و واحدهایی که با آن نتایج بیان شده است.

۹-۷ هرگونه نکته خاص مشاهده شده در جریان آزمون.

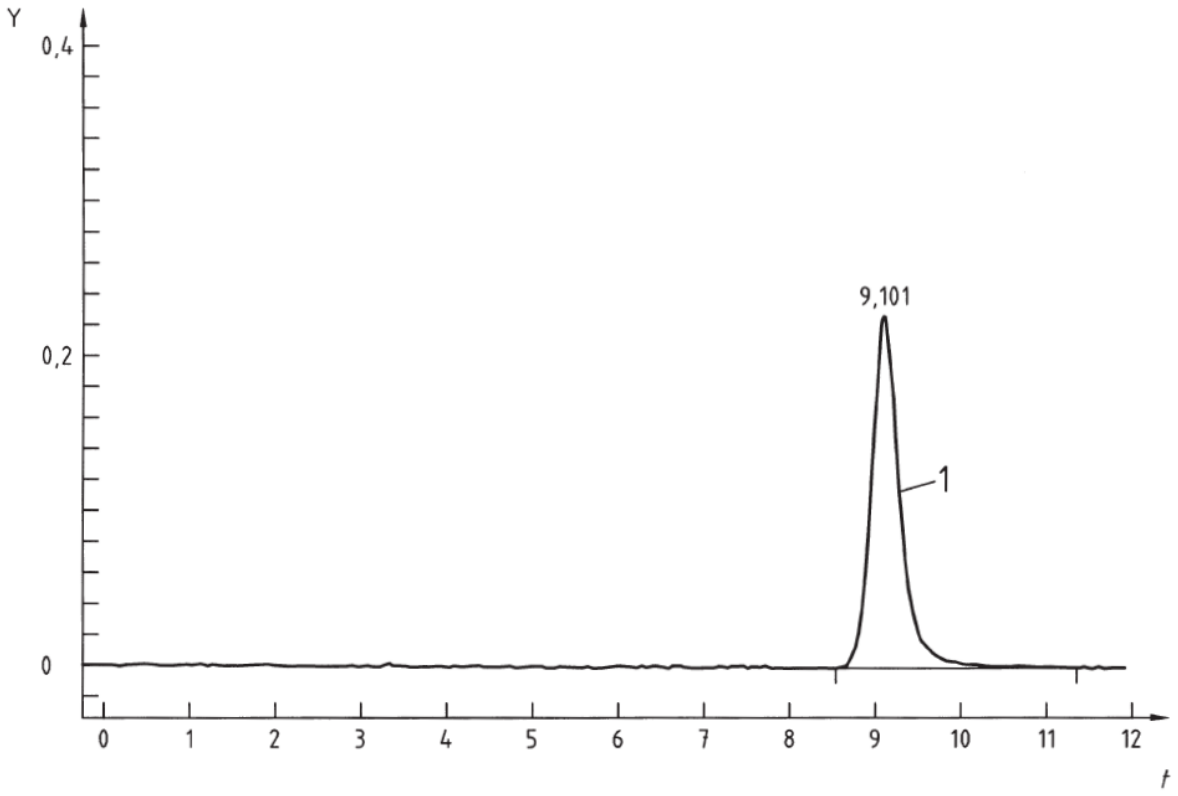
۹-۸ تاریخ انجام آزمون.

۹-۹ هر گونه کارهای دیگری که در این استاندارد نوشته نشده است یا به طور اختیاری انجام گرفته و ممکن است روی نتایج آزمون موثر باشد.

۹-۱۰ نام و نام خانوادگی و امضای آزمون کننده.

پیوست الف

(اطلاعاتی)
مثال‌هایی از کروماتوگرام های سیستم HPLC



فاز ساکن: Lichrospher® 60 RP Select B[2)]، اندازه ذرات ۵ µm و ابعاد ۴ mm × ۲۵۰ mm؛

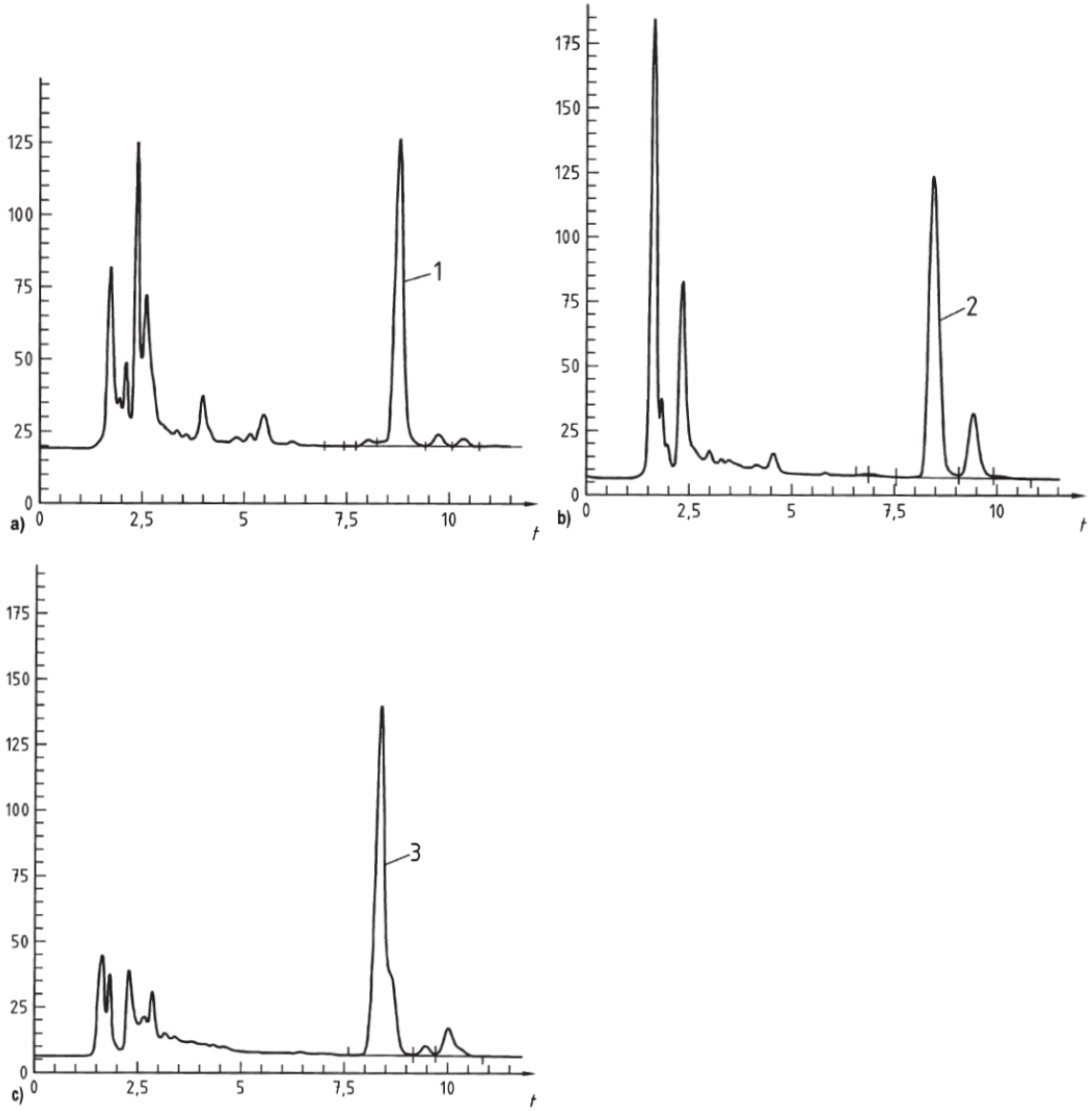
فاز متحرک: متانل (۴-۲-۱)، بافر استات (۴-۲-۲۲) (۴۰:۶۰)؛

میزان جریان: ۰٫۷ ml/min؛

حجم تزریق: ۲۰ µl؛

آشکارسازی: فلوروسنجی؛ طول موج تهییج : ۳۶۶ nm و طول موج نشر : ۴۳۵ nm.

شکل الف-۱- مثال یک سیستم HPLC مربوط به جداسازی تیامین به صورت استاندارد تیوکروم با استفاده از مشتق سازی پیش ستونی



فاز ساکن: Supelco® LC-18-D[2] ، اندازه ذرات ۵ µm و ابعاد ۴٫۶ mm × ۲۵۰ mm؛

فاز متحرک: متانل(۴-۲-۱)؛ بافر فسفات (طبق بند ۴-۲-۱۹) (pH =۳٫۵) $c(NH_4H_2PO_4)$ =10 mmol/l حاوی ۱ g/l تترا اتیل آمونیوم کلراید (طبق بند ۴-۲-۲۰) و ۵ mmol/l سدیم هپتان سولفونات (طبق بند ۴-۲-۲۱) (۳۵:۷۰)؛

میزان جریان: ۱٫۵ ml/min؛

حجم تزریق : ۳ µl ؛

واکنشگرپس ستون: محلول قلیایی پتاسیم هگزاسیانوفرات (III) (طبق بند ۴-۲-۱۴)؛

شدت جریان واکنشگر: ۰٫۳ ml/min؛

آشکارسازی: فلوروسنجی؛ طول موج تهییج: ۳۶۶ nm و طول موج نشر : ۴۳۵ nm.

شکل الف-۲- مثال‌هایی از یک سیستم HPLC مربوط به جداسازی استاندارد تیامین با استفاده از مشتق سازی پس ستون در کاهو(a) ، برنج پخته شده (b) ،گوشت پخته شده (c)

پیوست ب

(اطلاعاتی)

اطلاعات مربوط به دقت

بر اساس EU SMT Study guidlines ، اطلاعات ارایه شده در جدول ب-۱ طی آزمون بین آزمایشگاهی، تعیین شده است.

جدول ب – ۱- اطلاعات مربوط به دقت برای آرد کامل و شیرخشک، سبزی‌های مخلوط

نمونه ها	CRM 121 آرد کامل	CRM 421 شیرخشک	CRM 485 سبزی‌های مخلوط
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۱۹۹۶	۱۹۹۶	۱۹۹۶
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۳	۱۴	۱۲
تعداد نمونه‌ها	۲	۲	۲
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکرد آن‌ها خارج از محدوده بوده است	۱۳	۱۴	۱۲
تعداد خارج از محدوده‌ها (آزمایشگاه ها)	صفر	صفر	صفر
تعداد نتایج پذیرفته شده	۶۵	۷۰	۵۸
مقدار میانگین ، $\bar{x}$ ($g\,mg/100$)	۰٫۴۵۲	۰٫۶۴۵	۰٫۲۹۵
میانگین انحراف معیار means of.dev.st ($g\,mg/100$)	۰٫۰۵۴	۰٫۰۸۶	۰٫۰۳۹
انحراف معیار تکرارپذیری S_r	۰٫۰۱۵	۰٫۰۲۵	۰٫۰۱۲
ضریب پراکندگی تکرارپذیری %	۳٫۲	۳/۸	۴٫۲
حد تکرارپذیری r $[r=2.83\times s_r]$ ، $g\,mg/100$	۰٫۰۴۳	۰٫۰۷۱	۰٫۰۳۹
انحراف معیار تجدید پذیری s_R، $g\,mg/100$	۰٫۰۵۳	۰٫۰۸۵	۰٫۰۶۳
ضریب پراکندگی تجدید پذیری %	۱۱٫۸	۱۳٫۲	۱۳٫۳
حد تجدید پذیری R $[R=2.83\times s_R]$ ، $g\,mg/100$	۰٫۱۹۰	۰٫۲۴۳	۰٫۱۷۸

جدول ب – ۲- اطلاعات مربوط به دقت برای TUBE FEEDING SOLUTION ، غذای کودک، شیر خشک، آرد با میوه و مخمر

نمونه ها	TUBE FEEDING SOLUTION	غذای کودک	شیر خشک	آرد با میوه	مخمر
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۱۹۹۵	۱۹۹۵	۱۹۹۵	۱۹۹۵	۱۹۹۵
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد نمونه‌ها	۱	۱	۱	۱	۱
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکرد آن‌ها خارج از محدوده بوده است	۸	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد خارج از محدوده‌ها (آزمایشگاه ها)	۲	صفر	صفر	صفر	صفر
تعداد نتایج پذیرفته شده	۱۶	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
مقدار میانگین ، $\bar{x}$ $(g\,mg/100)$	۰٫۱۱	۰٫۲	۰٫۵۶	۱٫۰۴	۱٫۳۱
انحراف معیار تکرارپذیری s_r	۰٫۰۱	۰٫۰۲	۰٫۰۴	۰٫۰۷	۰٫۱۲
ضریب پراکندگی تکرارپذیری %	۷	۸	۷	۷	۹
حد تکرارپذیری r $[r=2.83\times s_r]$ ، $g\,mg/100$	۰٫۰۲	۰٫۰۵	۰٫۱	۰٫۲	۰٫۳۴
انحراف معیار تجدید پذیری s_R، $g\,mg/100$	۰٫۰۴	۰٫۰۴	۰٫۰۸	۰٫۱۹	۰٫۱۷
ضریب پراکندگی تجدید پذیری %	۳۲	۲۱	۱۶	۱۹	۱۳
حد تجدید پذیری R $[R=2.83\times s_R]$ ، $g\,mg/100$	۰٫۱	۰٫۱۲	۰٫۲۵	۰٫۵۵	۰٫۴۸

جدول ب – ۳- اطلاعات مربوط به دقت برای غلات، پودر شکلات و مکمل غذایی

نمونه ها	غلات	غلات	پودر شکلات	مکمل غذایی
سال آزمون بین آزمایشگاهی	۱۹۹۵	۱۹۹۵	۱۹۹۵	۱۹۹۵
تعداد آزمایشگاه‌ها	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
تعداد نمونه‌ها	۱	۱	۱	۱
تعداد آزمایشگاه‌های باقیمانده پس از حذف آزمایشگاه هایی که نتیجه عملکرد آن‌ها خارج از محدوده بوده است	۹	۹	۹	۹
تعداد خارج از محدوده‌ها (آزمایشگاه ها)	۱	۱	۱	۱
تعداد نتایج پذیرفته شده	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
مقدار میانگین ، $\bar{x}$ $(g\,mg/100)$	۱٫۴۲	۲٫۹۵	۱٫۵۵	۴۶۸
انحراف معیار تکرارپذیری s_r	۰٫۰۶	۰٫۱۸	۰٫۱۳	۳۹
ضریب پراکندگی تکرارپذیری %	۴	۶	۸	۸
حد تکرارپذیری r $[r=2.83\times s_r]$ ، $g\,mg/100$	۰٫۱۶	۰٫۴۹	۰٫۳۶	۱۱۱
انحراف معیار تجدید پذیری s_R، $g\,mg/100$	۰٫۲۷	۰٫۴۱	۰٫۲۸	۷۵
ضریب پراکندگی تجدید پذیری %	۱۹	۱۴	۱۹	۱۵
حد تجدید پذیری R $[R=2.83\times s_R]$ ، $g\,mg/100$	۰٫۷۵	۱٫۱۶	۰٫۸	۲۱۲

پیوست پ

(اطلاعاتی)

سیستم های HPLC جایگرین

چنانچه شرایط کروماتوگرافی زیر اعمال گردد، جداسازی و اندازه گیری رضایت بخش می باشد.

جدول پ-۱- شرایط سیستم های HPLC جایگرین

نوع اکسیداسیون	میزان جریان ml/min	آشکارسازی فلوروسنجی) /نشر تهییج) nm	فاز متحرک (V:V)	ابعاد ستون mm × mm	فاز ساکن
پس ستونی	۳	۳۶۵/۴۳۵	**اتانل/بافر فسفات** $c(KH_2PO_4)=0.1$ mol/l , pH= 7.4 (50:50)	۲۵۰×۴/۶	Radial silica ® 10 µm
پس ستونی	۱	۳۶۸/۴۲۰	**متانل/بافر فسفات** $c(KH_2PO_4)=9$ mmol/l , pH=۳,۵ حاوی تترا اتیل آمونیوم کلراید $c(C_8H_{20}NCl)=1$ g/l و سدیم هپتان سولفونات $c(C_7H_{15}NaO_3S)=5$ mmol /l (35:65)	۲۵۰×۴/۶	Supelco® LC-18-D[2] 5 µm
پس ستونی	۱/۵	۳۷۵/۴۳۵	**متانل**/سدیم هگزان سولفونات $c(C_6H_{13}NaO_3S.H_2O)$= 1mmol/l , pH= 3 (70:30)	۲۵۰×۴/۶	Eurospher RP-18 5 µm
پس ستونی	۱	۳۷۵/۴۳۵	**سدیم دی هیدروژن فسفات** $c(NaH_2PO_4)=10$ mmol/l/**سدیم پرکلرات** $c(NaClO4)=0.15$ mol/l (50:50)	۲۵۰×۴/۶	Eurospher 100-C18 5 µm
پیش ستونی	۰/۷	۳۶۶/۴۳۵	**متانل/بافر استات**pH=4 , $c(CH_3COONa)=50$mmol/l (40+60)	۲۵۰×۴/۶	Lichrospher® 60 RP Select B[2] 5 µm
پیش ستونی	۰/۸	۳۶۶/۴۳۵	**متانل/بافر استات**pH=۴,۵ $c(CH_3COONa)=0.5$mol/l , (40:60)	۲۵۰×۴/۶	µ-Bondapak radial 18 5 µm
پیش ستونی	۱	۳۷۵/۴۳۵	**متانل/بافر** فسفات $c(KH_2PO_4)=0.1$ mol/l , pH= 4 (70:30)	۲۵۰×۴/۶	Spherisorb ODS2 5 µm
پیش ستونی	۱/۵	۳۶۸/۴۴۰	پتاسیم دی هیدروژن فسفات/دی متیل فرمامید (80:20) $c(KH_2PO_4)=10$ mmol/l	۲۵۰×۴/۶	Lichrospher® RP18 10 µm
پیش ستونی	۱	۳۶۶/۴۳۵	**متانل/آب** (40:60) تنظیم pH با اسید استیک تا pH=۴,۵	۱۵۰×۴/۶	Hamilton PRP-1 5 µm
پیش ستونی	۱	۳۶۶/۴۳۵	**متانل/آب** (35:65) تنظیم pH با آمونیاک $w(NH_3)=25$ % تا pH=۹	۱۵۰×۴/۱	Hamilton PRP-1 5 µm
پیش ستونی	۱	۳۶۵/۴۴۰	**دی کلرو متان/متانل** (95:5)	۲۵۰×۴/۶	Hypersil NH_2APS2 5 µm

پیوست ت
(اطلاعاتی)
کتابنامه

[1] Bognár, A.: Bestimmung von Riboflavin und Thiamin in Lebensmitteln mit Hilfe der Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie (HPLC). Deutsche Lebensm. Rundschau **77**, 1981, 431-436.

[2] Hasselmann, C., Franck, D., Grimm, P., Diop, P.A. and Soules, C.: High-performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietic foods. J. Micronutr. Anal. **5**, 1989, 269-279.

[3] Bognár, A.: Determination of vitamin B1 in food by High-Performance-Liquid-Chromatography and post-column derivatization. Fresenius J. Anal. Chem. **343**, 1992, 155-56.

[4] Hägg, M. and Kumpulainen, J.: Thiamin and riboflavin contents in domestic and imported cereal products in Finland. J. Food Comp. Anal. **6**, 1993, 299-306.

[5] Arella, F., Lahély, S., Bourguignon, J. B. and Hasselmann, C.: Liquid chromatographic determination of vitamin B1 and B2 in foods. A collaborative study. Food Chem. **56**, 1996, 81-86.

[6] Eitenmiller, R. R. and Landen, W. O.: Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 1999, 271-297.

[7] Dawson, R.M.C., Elliott, D. C., Elliot, W. H. and Jones, K.: Data for Biochemical Research. Oxford Science Publication 3rd. ISBN 0 19 855299 8, 1989.

[8] Hägg, M.: Effect of various commercially available enzymes in the liquid chromatographic determination with external standardization of thiamin and riboflavin in foods. J. AOAC Int. 77, 1994, 681-686.

[9] Finglas, P. M., Scott, K. J., Witthoft, C. M., van den Berg, H. and de Froidmont-Gortz, I.: The certification of the mass fractions of vitamins in four reference materials: Wholemeal flour (CRM 121), milk powder (CRM 421), lyophilised mixed vegetables (CRM 485) and lyophilised pig's liver (CRM 487). EUR-report 18320, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1999.

[10] Takashi, U.,Yukiko, T., Kohei, M., Mari, T., Kaname, K.: Simultaneous determination of 2(1-hydroxyethyl)thiamin and thiamin in foods by high performance liquid chromatography with post-column derivatisation. Vitamins (Japan), **64**, 1990, 379-385.

[11] Takashi, U.,Yukiko, T., Kohei, M., Masako, M., Kaname, K.: Distribution and stability of 2(1-hydroxyethyl)thiamin and thiamin in foods. Vitamins (Japan), **65**, 1991, 249-256.