

BỘ Y TẾ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số: 01/2011/TT-BYT

Hà Nội, ngày 13 tháng 01 năm 2011

THÔNG TƯ

BAN HÀNH CÁC QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA ĐỐI VỚI PHỤ GIA THỰC PHẨM

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

Căn cứ Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật ngày 29 tháng 6 năm 2006 và Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 01 tháng 8 năm 2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật;

Căn cứ Pháp lệnh Vệ sinh an toàn thực phẩm ngày 07 tháng 8 năm 2003 và Nghị định số 163/2004/NĐ-CP ngày 07 tháng 9 năm 2004 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Pháp lệnh Vệ sinh an toàn thực phẩm;

Căn cứ Nghị định số 188/2007/NĐ-CP ngày 27 tháng 12 năm 2007 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Theo đề nghị của Cục trưởng Cục An toàn vệ sinh thực phẩm, Vụ trưởng Vụ Khoa học và Đào tạo, Vụ trưởng Vụ Pháp chế,

QUY ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Thông tư này các Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về phụ gia thực phẩm, bao gồm:

1. QCVN 4-18:2011/BYT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm - Nhóm chế phẩm tinh bột;
2. QCVN 4-19:2011/BYT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm - Enzym;
3. QCVN 4-20:2011/BYT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm - Nhóm chất làm bóng;
4. QCVN 4-21:2011/BYT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm - Nhóm chất làm dày;
5. QCVN 4-22:2011/BYT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm - Nhóm chất nhũ hóa;
6. QCVN 4-23:2011/BYT Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm - Nhóm chất tạo bọt.

Điều 2. Thông tư này có hiệu lực từ ngày 01 tháng 8 năm 2011.

Điều 3. Cục trưởng Cục An toàn vệ sinh thực phẩm, Thủ trưởng các đơn vị thuộc Bộ Y tế, các đơn vị trực thuộc Bộ Y tế; Giám đốc Sở Y tế các tỉnh, thành phố trực thuộc trung ương và các tổ chức, cá nhân có liên quan chịu trách nhiệm thi hành Thông tư này. /.

Nơi nhận:

- VPCP (Văn xã, Công báo, Cổng TTĐT Chính phủ);
- Các Bộ, cơ quan ngang Bộ, cơ quan thuộc CP;
- Bộ Tư pháp (Cục Kiểm tra VBQPPL);
- Bộ trưởng Nguyễn Quốc Triệu (để báo cáo);
- UBND các tỉnh, thành phố trực thuộc TW;
- Viện Kiểm sát nhân dân tối cao;
- Tòa án nhân dân tối cao;
- Sở Y tế các tỉnh, thành phố trực thuộc TW;
- Chi cục ATTP các tỉnh, thành phố trực thuộc TW;
- TTYTDP các tỉnh, thành phố trực thuộc TW;
- Các cơ quan KTNN đối với thực phẩm nhập khẩu;
- Tổng Cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng (để đăng bạ);
- Cổng thông tin điện tử Bộ Y tế;
- Lưu: VT, K2ĐT, PC, ATTP.

**KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG**

Trịnh Quân Huân



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 4-18:2011/BYT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM – CHẾ PHẨM TINH BỘT**

National technical regulation on Food Additive – Modified starches

HÀ NỘI – 2011

Lời nói đầu

QCVN 4-18:2011/BYT do Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM – CHẾ PHẨM TINH BỘT

National technical regulation on Food Additive – Modified starches

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia (sau đây gọi tắt là Quy chuẩn) này quy định các yêu cầu kỹ thuật và quản lý về chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chế phẩm tinh bột được sử dụng với mục đích làm phụ gia thực phẩm.

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

2.1. Tổ chức, cá nhân nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các chế phẩm tinh bột làm phụ gia thực phẩm (sau đây gọi tắt là tổ chức, cá nhân).

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

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:

3.1. JECFA monograph 1 - Vol. 4 (JECFA monographs 1 - Combined compendium of food additive specifications; Joint FAO/WHO expert committee on food additives; Volume 4 - Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications; FAO, 2006): Các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4 Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm, dung dịch thử nghiệm được sử dụng (hoặc tham chiếu) trong yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm; JECFA biên soạn; FAO ban hành năm 2006.

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

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

3.4. ADI (Acceptable daily intake): Lượng ăn vào hàng ngày chấp nhận được.

3.5. INS (International numbering system): Hệ thống mã số quốc tế về phụ gia thực phẩm.

II. YÊU CẦU KỸ THUẬT, PHƯƠNG PHÁP THỬ VÀ LẤY MẪU

1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với:

- Dextrin, tinh bột rang
- Tinh bột xử lý bằng acid
- Tinh bột xử lý bằng kiềm
- Tinh bột tẩy màu
- Tinh bột oxy hoá

- Tinh bột xử lý bằng enzym
- Monostarch phosphat
- Distarch phosphat
- Distarch phosphat đã phosphat hoá
- Distarch phosphat acetylat
- Tinh bột acetat
- Distarch adipat acetylat
- Tinh bột hydroxypropyl
- Distarch phosphat hydroxypropyl
- Tinh bột natri octenylsuccinat

sử dụng làm chế phẩm tinh bột được quy định tại phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này.

2. Các yêu cầu kỹ thuật quy định trong Quy chuẩn này được thử theo JECFA monograph 1 - Vol. 4, ngoại trừ một số phép thử riêng được mô tả trong phụ lục. Các phương pháp thử được hướng dẫn trong Quy chuẩn này không bắt buộc phải áp dụng, có thể sử dụng các phương pháp thử khác tương đương.

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư 16/2009/TT-BKHCN ngày 02 tháng 6 năm 2009 của Bộ Khoa học và Công nghệ về hướng dẫn kiểm tra nhà nước về chất lượng hàng hóa lưu thông trên thị trường và các quy định khác của pháp luật có liên quan.

III. YÊU CẦU QUẢN LÝ

1. Công bố hợp quy

1.1. Các chế phẩm tinh bột phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

1.2. Phương thức, trình tự, thủ tục công bố hợp quy được thực hiện theo Quy định về chứng nhận hợp chuẩn, chứng nhận hợp quy và công bố hợp chuẩn, công bố hợp quy ban hành kèm theo Quyết định số 24/2007/QĐ-BKHCN ngày 28 tháng 9 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ và các quy định của pháp luật.

2. Kiểm tra đối với chế phẩm tinh bột

Việc kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chế phẩm tinh bột phải thực hiện theo các quy định của pháp luật.

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

1. Tổ chức, cá nhân phải công bố hợp quy phù hợp với các quy định kỹ thuật tại Quy chuẩn này, đăng ký bản công bố hợp quy tại Cục An toàn vệ sinh thực phẩm và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn theo đúng nội dung đã công bố.

2. Tổ chức, cá nhân chỉ được nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các chế phẩm tinh bột sau khi hoàn tất đăng ký bản công bố hợp quy và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn, ghi nhãn phù hợp với các quy định của pháp luật.

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

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

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

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

PHỤ LỤC

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CHẾ PHẨM TINH BỘT

1. Tên khác, chỉ số	Dextrin, tinh bột rang: INS 1400	
	Tinh bột xử lý bằng acid: INS 1401	
	Tinh bột xử lý bằng kiềm: INS 1402	
	Tinh bột tẩy màu: INS 1403	
	Tinh bột oxy hoá: INS 1404	
	Tinh bột xử lý bằng enzym: INS 1405	
	Monostarch phosphat: INS 1410	
	Distarch phosphat: INS 1412	
	Distarch phosphat đã phosphat hoá: INS 1413	
	Distarch phosphat acetylat: INS 1414	
	Tinh bột acetat: INS 1420	
	Distarch adipat acetylat: INS 1422	
	Tinh bột hydroxypropyl: INS 1440	
	Distarch phosphat hydroxypropyl: INS 1442	
	Tinh bột natri octenylsuccinat: INS 1450	
2. Định nghĩa	Các tinh bột thực phẩm có một hoặc vài thuộc tính gốc đã được thay đổi do xử lý phù hợp với GMP, theo một số quy trình nhất định	
Mã số C.A.S.	Tinh bột acetat :	9045-28-7
	Distarch adipat acetylat:	68130-14-3
	Tinh bột hydroxypropyl:	9049-76-7
	Distarch phosphat hydroxypropyl:	53124-00-8
	Tinh bột oxy hoá acetylat:	68187-08-6
3. Cảm quan	Hầu hết chế phẩm tinh bột dạng bột không mùi, màu trắng hoặc trắng nhạt. Tùy thuộc vào phương pháp sấy, các bột này có thể gồm các hạt tinh bột nguyên dạng gốc hoặc các khối gồm nhiều hạt (dạng quả lê, dạng hạt) hoặc nếu hồ hoá trước sẽ gồm dạng vảy, bột vô định hình hoặc dạng hạt thô.	
4. Chức năng	Chế phẩm tinh bột, chất làm dày, chất ổn định, chất độn, chất nhũ hoá	
5. Yêu cầu kỹ thuật		

5.1. Định tính

<i>Độ tan</i>	Không tan trong nước lạnh (nếu không hồ hoá trước), tạo thành dung dịch keo nhớt điển hình trong nước nóng; không tan trong ethanol.
<i>Cấu trúc hiển vi</i>	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
<i>Nhuộm màu iod</i>	Phải có phản ứng nhuộm màu iod đặc trưng.
<i>Khử đồng</i>	Phải có phản ứng khử đồng đặc trưng.
<i>Tính khác biệt</i>	Xem phần thử đối với dạng tinh bột. Xem mô tả trong phần Phương pháp thử đối với : - Tinh bột oxy hoá hypochlorid - Phản ứng đặc trưng đối với các nhóm acetyl - Thử dương tính đối với các nhóm ester

5.2. Độ tinh khiết

<i>Lưu huỳnh dioxyd (SO₂)</i>	- Không được quá 50,0 mg/kg đối với chế phẩm tinh bột từ ngũ cốc - Không được quá 10,0 mg/kg đối với các loại chế phẩm tinh bột khác trừ khi được ghi rõ trong bảng 1 (xem mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg. - Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.
<i>Các độ tinh khiết bổ sung đối với từng loại chế phẩm tinh bột hoá học</i>	- Xem ở cột 3 bảng 1 - Xem mô tả trong phần Phương pháp thử

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Soi kính hiển vi</i>	Các dạng chế phẩm tinh bột không được hồ hoá trước vẫn giữ nguyên cấu trúc hạt có thể xác định là tinh bột nhờ quan sát bằng kính hiển vi. Hình dạng, kích thước và đôi khi sự sắp xếp các sọc hoặc đường vân là đặc trưng của nguồn gốc thực vật. Dưới ánh sáng phân cực qua lăng kính nicol, gốc cắt phân cực điển có thể quan sát được.
<i>Nhuộm màu iod</i>	Cho một vài giọt kali tri-iodid 0,1N vào hỗn dịch trong nước của mẫu. Các tinh bột này nhuộm màu iod giống như nhuộm màu với tinh bột tự nhiên. Màu có thể từ màu xanh đậm đến đỏ.
<i>Khử đồng</i>	Cho 2,5 g mẫu trước đó đã được rửa bằng nước vào bình chịu nhiệt, thêm 10 ml dung dịch HCl loãng 3% và 70 ml nước, lắc đều, đun với sinh hàn ngược trong 3 giờ và làm nguội. Thêm 0,5 ml dung dịch thu được vào 5 ml dung dịch kiềm nóng đồng (II) tartrat (TS). Kết tủa màu đỏ thẫm được hình thành.
<i>Tính khác biệt</i>	Để phân biệt giữa các loại tinh bột được xử lý khác nhau, tiến hành các phép thử sau: - Thử đối với tinh bột oxy hoá bằng hypochlorit (không thử đối với tinh

bột khoai tây oxy hoá nhẹ)

Nguyên tắc :

Vì trong thành phần có chứa nhóm carboxyl, tinh bột oxy hoá bằng hypochlorit có thuộc tính anion. Nó có thể được nhuộm bằng các thuốc nhuộm tích điện dương như xanh methylen.

Cách thực hiện:

Giữ hỗn dịch gồm 50 mg mẫu thử trong 25 ml dung dịch nước thuốc nhuộm 1% trong 5 – 10 phút và thỉnh thoảng khuấy. Sau khi tách dung dịch dư, tinh bột được rửa bằng nước cất. Kiểm tra bằng kính hiển vi cho màu rõ, nếu mẫu là tinh bột oxy hoá hypochlorit. Do vậy, phép thử nyaf cho phép phân biệt được tinh bột oxy hóa bằng hypochlorit với tinh bột tự nhiên hay chế phẩm tinh bột bằng acid có cùng nguồn gốc thực vật.

- Phản ứng đặc trưng của các nhóm acetyl :

Nguyên tắc : Acetat được giải phóng nhờ quá trình xà phòng hoá tinh bột acetylát. Sau khi làm giàu acetat được chuyển thành aceton bằng cách gia nhiệt với $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Nhờ đó aceton tạo thành nhuộm thành màu xanh bằng ortho-nitrobenzaldehyd.

Cách tiến hành : Tạo hỗn dịch gồm 10 g mẫu trong 25 ml nước và thêm vào 20 ml dung dịch NaOH 0,4N. Sau khi lắc trong 1 giờ tinh bột được lọc ra và phần dịch lọc thu được cô trong lò ở 110°C . Cặn được hoà tan trong một vài giọt nước và được chuyển sang ống thử. Thêm $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và gia nhiệt ống thử. Nếu mẫu là tinh bột acetylát, hơi aceton được hình thành. Hơi này tạo thành màu xanh trên mảnh giấy tẩm dung dịch bão hoà o-nitrobenzaldehyd trong NaOH 2N. Màu xanh rất dễ nhận thấy khi màu vàng gốc của các thuốc thử biến mất khi nhỏ 1 giọt dung dịch HCl 10%.

- Thử dương tính đối với các nhóm ester :

Phổ hồng ngoại tẩm film mỏng cho thấy một hấp thụ điển hình ở khoảng 1.720 cm^{-1} biểu thị sự có mặt của các nhóm ester. Giới hạn phát hiện là khoảng 0,5% các nhóm acetyl, adipyl hoặc succinyl trong sản phẩm.

6.2. Độ tinh khiết

Lưu huỳnh dioxyd (SO_2)

Phạm vi áp dụng:

Phương pháp này được áp dụng, với một vài thay đổi nhỏ, đối với mẫu chất lỏng hoặc rắn thậm chí cả sự có mặt của các hợp chất chứa lưu huỳnh dễ bay hơi khác.

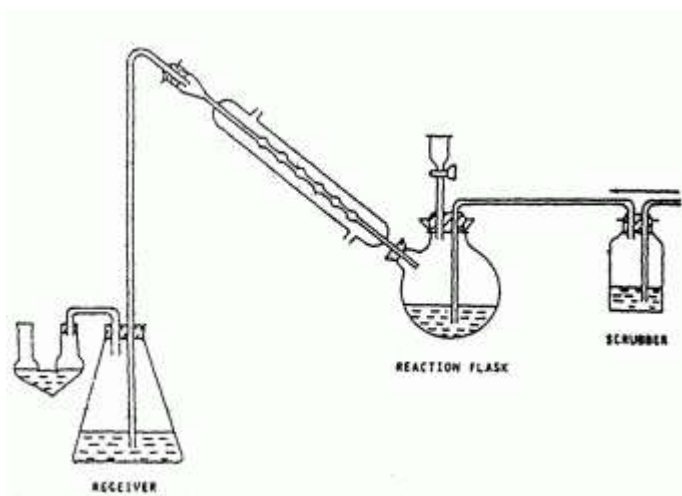
Nguyên tắc:

SO_2 được giải phóng ra từ mẫu trong môi trường acid đun sôi và tách khí SO_2 ra bằng dòng khí CO_2 . Khí tách ra được dẫn vào dung dịch hydrogen peroxid loãng nơi nó bị oxy hóa thành H_2SO_4 và được chuẩn độ bằng dung dịch kiềm tiêu chuẩn. Một cách khác, H_2SO_4 có thể được định lượng bằng BaSO_4 .

Dụng cụ:

Bộ dụng cụ “Monier-Williams” để định lượng acid sulfuro, được cấu tạo bằng các kết nối thuỷ tinh thon tiêu chuẩn, có thể mua được các cửa hàng bán dụng cụ thuỷ tinh phục vụ nghiên cứu khoa học đáng tin cậy. Tuy nhiên, dụng cụ này thường được tự lắp từ các dụng cụ thuỷ tinh thí

thiết bị tiêu chuẩn có các kết nối có nắp (xem Hình 1).



Hình 1

Bộ dụng cụ gồm bình đun hai cổ tròn dung tích 1.000 ml nối với một ống khí vào, một phễu nhỏ giọt dung tích 60 ml có van khoá kích thước lỗ 2 mm, sinh hàn ngược nghiêng Allihn. Một ống dẫn nối với phần trên cùng của sinh hàn tới đáy của bình nhận hình nón dung tích 250 ml, bình này được nối ống Peligot.

Trong quá trình vận hành, lượng khí CO_2 thoát ra được dẫn qua bình bẫy và tạo thành bọt khí cho qua hỗn hợp phản ứng nóng, dẫn SO_2 qua bình ngưng và vào các bình nhận, nơi nó được hút định lượng.

Chuẩn bị dung dịch:

Dung dịch Na_2CO_3 : Hoà tan khoảng 15 g Na_2CO_3 hoặc 40 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ trong nước cất và pha tới thể tích 100 ml.

Dung dịch hydrogen peroxyd 3%: Pha 10 ml hydrogen peroxyd trung tính 30% (hoá chất tinh khiết) với nước cất cho đến thể tích 100 ml.

Cách tiến hành:

Cho CO_2 từ máy sinh CO_2 hoặc bình khí nén CO_2 qua dung dịch bẫy Na_2CO_3 để loại clor, từ đó cho vào ống dẫn khí vào của bình đun. Cho 15 ml dung dịch hydrogen peroxyd 3% vào bình nhận và 5 ml vào ống Peligot. Lắp bộ dụng cụ, cho 300 ml nước cất và 20 ml dung dịch HCl đậm đặc vào bình đun bằng phễu nhỏ giọt. Đun sôi hỗn hợp trong khoảng 10 phút có sục khí CO_2 . Cân 100 g mẫu chính xác đến từng g và phân tán mẫu trong khoảng 300 ml nước cất vừa đun sôi. Chuyển phần bùn nhão vào bình đun bằng phễu nhỏ giọt, điều chỉnh tốc độ mẫu thêm vào và tốc độ dòng khí qua dụng cụ nhằm ngăn sự quay trở lại của hydrogen peroxyd, kể cả không khí, hoặc mùi khét của mẫu. Đun sôi nhẹ hỗn hợp trong 1 giờ có sục chậm dòng khí CO_2 . Ngừng dòng nước trong sinh hàn trước khi kết thúc chưng cất. Khi ống dẫn ở ngay bên trên bình nhận trở nên nóng, tháo ống từ sinh hàn ra ngay lập tức. Rửa các thành phần trong ống dẫn và ống Peligot vào trong bình nhận, và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N, sử dụng chất chỉ thị xanh bromphenol (xem phần Chú ý).

Thực hiện thử đối với mẫu trắng, kết quả được tính theo công thức sau:

$$(S - B) \times 0,0032 \times 100$$

$$\% \text{SO}_2 = \frac{\text{S} - \text{B}}{\text{W}} \times 100$$

W

Trong đó:

S: Số ml dung dịch NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ mẫu thử

B: Số ml dung dịch NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ mẫu trắng

W: Khối lượng mẫu thử (g)

Chú ý: Phân tích định lượng bằng phương pháp cân có thể được tiến hành sau khi chuẩn độ. Acid hoá bằng HCl, kết tủa bằng BaCl₂, để ổn định, lọc, rửa, đốt cháy và cân tính theo BaSO₄.

Bảng 1. Các yêu cầu kỹ thuật về độ tinh khiết bổ sung đối với từng loại chế phẩm tinh bột biến tính bằng hoá học

Loại tinh bột biến tính	Tóm lược phương pháp	Yêu cầu kỹ thuật đối với sản phẩm cuối cùng
Dextrin, tinh bột rang	Xử lý nhiệt khô với acid HCl hoặc acid ortho-H ₃ PO ₄	pH = 2,5 – 7,0
Tinh bột xử lý bằng acid	Xử lý bằng acid HCl hoặc ortho-H ₃ PO ₄ hoặc H ₂ SO ₄	pH = 4,8 – 7,0
Tinh bột xử lý bằng kiềm	Xử lý bằng NaOH hoặc KOH	pH = 5,0 – 7,5
Tinh bột tẩy màu	Xử lý bằng acid peracetic và hoặc hydrogen peroxid, hoặc natri hypochlorit, hoặc NaCl, hoặc SO ₂ hoặc các dạng được cho phép khác của sulfit, hoặc kali permanganat hoặc amoni persulfat	Nhóm carbonyl thêm vào không được quá 0,1%; Không có dư lượng hoá chất; Dư lượng SO ₂ không được quá 50 mg/kg; Dư lượng mangan không được quá 50 mg/kg.
Tinh bột xử lý bằng enzym	Xử lý trong dung dịch nước ở nhiệt độ dưới điểm tạo keo với một hoặc nhiều enzym thuỷ phân tinh bột dành cho thực phẩm	Dư lượng SO ₂ không được quá 50 mg/kg
Tinh bột oxy hoá	Xử lý bằng natri hypochlorit	Các nhóm carboxyl không được quá 1,1%; Dư lượng SO ₂ không được quá 50 mg/kg
Monostarch phosphat	Ester hoá bằng acid ortho-H ₃ PO ₄ , hoặc natri hoặc kali ortho-phosphat, hoặc natri tripolyphosphat	Hàm lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,5% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và

		không được quá 0,4% đối với tinh bột khác.
Distarch phosphat	Ester hoá bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxychlorid	Hàm lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,5% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và không được quá 0,4% đối với tinh bột khác.
Distarch phosphat đã phosphat hoá	Kết hợp các xử lý đối với Monostarch phosphat và Distarch phosphat	Hàm lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,5% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và không được quá 0,4% đối với tinh bột khác.
Distarch phosphat acetylat	Ester hoá bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxychlorid kết hợp với ester hoá bằng anhydrid acetic hoặc vinyl acetat	Các nhóm acetyl không được quá 2,5%; hàm lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,14% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và không được quá 0,04% đối với tinh bột khác; và vinyl acetat không được quá 0,1 mg/kg
Tinh bột acetat	Ester hoá bằng anhydrid acetic hoặc vinyl acetat	Các nhóm acetyl không được quá 2,5%
Distarch adipat acetylat	Ester hoá bằng anhydrid acetic và anhydrid adipic	Các nhóm acetyl không được quá 2,5% và các nhóm adipat không được quá 0,135%
Tinh bột hydroxypropyl	Ester hoá bằng propylen oxyd	Các nhóm hydroxypropyl không được quá 7,0%; propylen chlorohydrin không được quá 1 mg/kg
Distarch phosphat hydroxypropyl	Ester hoá bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxychlorid kết hợp với ester hoá bằng propylen oxyd	Các nhóm hydroxypropyl không được quá 7,0%; propylen chlorohydrin không được quá 1 mg/kg và dư lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,14% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột

		mì, và không được quá 0,04% đối với tinh bột khác
	Tinh bột natri octenylsuccinat	Ester hoá bằng anhydrid octenylsuccinic
		Các nhóm octenylsuccinyl không được quá 3%; và dư lượng acid octenylsuccinic không được quá 0,3%
	Tinh bột oxy hoá acetylát	Xử lý bằng natri hypochlorit sau đó ester hoá bằng anhydrid acetic
		Các nhóm acetyl không được quá 2,5% và các nhóm carboxyl không được quá 1,3%
<i>Chì</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.	
<i>pH</i>	- Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1. - Hòa 20 g mẫu với 80 ml nước. Khuấy liên tục ở tốc độ trung bình trong 5 phút (Trong trường hợp mẫu là tinh bột đã keo hóa sơ bộ, cần 3 g hòa với 97 ml nước).	
<i>Nhóm carboxyl</i>	Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1. Nguyên tắc: Tinh bột có chứa carboxyl được cân bằng với acid vô cơ để chuyển các muối carboxyl thành dạng acid. Các cation và acid dư được loại bỏ bằng cách rửa với nước. Mẫu đã rửa được hoà tan trong nước và được chuẩn độ bằng dung dịch kiềm chuẩn. Chú ý: Các nhóm phosphat tự nhiên có mặt trong tinh bột khoai tây làm tăng độ chuẩn được tìm thấy trong phương pháp này (Xem ghi chú 6). Hoá chất, thuốc thử: Dung dịch HCl 0,1N: Không cần thiết chuẩn hoá Dung dịch NaOH 0,1N: Được chuẩn hoá Dung dịch chỉ thị phenolphthalein 1% Cách tiến hành: Nếu cần thiết, nghiền mẫu hoàn toàn nhờ máy nghiền cắt thí nghiệm cho qua rây 20 mesh hoặc mịn hơn, để phòng ngừa bất kỳ sự thay đổi có ý nghĩa nào về độ ẩm và trộn đều. Cân chính xác một mẫu chứa không quá 0,25 mili đương lượng carboxyl (Ghi chú 1), và chuyển lượng mẫu vào cốc dung tích 150 ml. Thêm vào 25 ml dung dịch HCl 0,1N và thỉnh thoảng khuấy trên 30 phút. Lọc chân không lớp bột nhão qua một phễu thủy tinh xốp có lỗ xốp trung bình hoặc phễu nhỏ, sử dụng dòng nước nhỏ từ bình rửa để giúp chuyển toàn bộ lượng mẫu. Rửa mẫu bằng nước cất (thường là đủ 300 ml) cho đến khi phần dịch lọc	

được xác định không có clorid bằng phép thử AgNO_3 (Ghi chú 2).

Chuyển mẫu đã khử khoáng toàn lượng vào cốc dung tích 600 ml cùng với nước cất và chuyển mẫu thành bột nhão trong 300 ml nước cất. Gia nhiệt hỗn dịch mẫu trong cách thủy sôi hoặc trên cách thủy sôi (Ghi chú 3), khuấy liên tục cho đến khi tinh bột hóa hồ và tiếp tục gia nhiệt trong 15 phút để đảm bảo tinh bột hóa hồ hoàn toàn (Ghi chú 4).

Lấy mẫu ra khỏi cách thủy và chuẩn độ khi còn nóng bằng dung dịch NaOH 0,1N điểm kết thúc với chỉ thị phenolphthalein. Điểm kết thúc cũng có thể phát hiện bằng đo điện tại $\text{pH} = 8,3$. Xác định mẫu trắng được tiến hành giống mẫu thử để hiệu chỉnh các acid tự nhiên (Ghi chú 5). Cân cùng một lượng tinh bột như lấy chuẩn độ carboxyl và trộn lẫn với 10 ml nước cất. Khuấy đều khoảng 5 phút mỗi lần trong 30 phút. Lọc chân không bột nhão định lượng qua một phễu thủy tinh xốp có lỗ xốp trung bình hoặc phễu nhỏ, và rửa mẫu bằng 200 ml nước cất. Chuyển, làm hồ hóa và chuẩn độ mẫu bằng dung dịch NaOH 0,1N giống như cách làm đối với mẫu đã khử khoáng.

Kết quả:

$$\text{Các nhóm carboxyl (\%)} = \frac{(\text{Thể tích NaOH chuẩn mẫu thử} - \text{mẫu trắng}) \times 0,0045 \times 100}{\text{Khối lượng mẫu (g)}}$$

Chú ý và phòng ngừa:

Lượng mẫu không nên vượt quá 5,0 g đối với tinh bột oxy hoá trung bình hoặc nhỏ hơn 0,15 g đối với tinh bột thương mại oxy hoá cao.

Thêm 1 ml dung dịch AgNO_3 1% pha trong nước vào 5 ml dịch lọc. Xuất hiện kết tủa hoặc đục trong vòng 1 phút nếu có mặt của clorid.

Không nên gia nhiệt trên đĩa nóng hoặc trên đèn đốt Bunsen. Sự quá nhiệt hoặc quá nóng đối với lượng mẫu nhỏ sẽ làm phân hủy mẫu và kết quả carboxyl cao giả tạo.

Hồ hóa mẫu triệt để tạo điều kiện chuẩn độ nhanh chóng và phát hiện điểm kết thúc chính xác.

Chuẩn độ mẫu trắng được tiến hành trên mẫu đã được rửa bằng nước để hiệu chỉnh các thành phần acid không được đưa vào để oxy hoá hoặc chuyển hoá. Các acid béo tự do kết hợp với amylose trong tinh bột ngô thường là những chất có đóng góp chính đối với chuẩn độ mẫu trắng.

Hiệu chỉnh hàm lượng phosphat trong tinh bột khoai tây (qui đổi) nên được tiến hành sau khi xác định hàm lượng phospho của mẫu thử.

Qui đổi được tính theo công thức sau:

$$\frac{2 \times 45,02 \times P}{30,97} = 2,907 \times P$$

Trong đó: P là hàm lượng phospho (%)

Mangan

Được mô tả trong Cột 3 Bảng 1

Thiết bị:

Thiết bị quang phổ hấp thụ nguyên tử với đèn cathod rỗng mangan

Chuẩn bị dung dịch:

Dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch 0,5 mg mangan/lít.

Dung dịch mẫu thử: Chuyển 10 g mẫu vào bình định mức Kohlrausch dung tích 200 ml trước đó được rửa bằng dung dịch HCl 0,5N, thêm 140 ml dung dịch HCl 0,5N và lắc mạnh trong 15 phút, thích hợp nhất dùng máy lắc. Pha tới thể tích 200 ml bằng dung dịch HCl 0,5N và lắc. Li tâm khoảng 100 ml hỗn hợp trong ống ly tâm có thành dày hoặc lọ ở tốc độ 650 xg trong 5 phút và lấy dung dịch lỏng trên bề mặt. Dung dịch này là “dung dịch mẫu thử”.

Cách tiến hành:

Thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất cho vận hành của thiết bị quang phổ hấp thụ nguyên tử và hút nước cất thông qua đèn khí acetylen trong 5 phút để được một đường nền tại bước sóng 279,5 nm. Trong cùng một cách, hút một phần của “dung dịch chuẩn” và lưu kết quả. Cuối cùng, hút “dung dịch mẫu” và so sánh kết quả với kết quả của “dung dịch chuẩn”, và nhân giá trị này với 20 để có được nồng độ tính bằng mg mangan/kg mẫu ban đầu được lấy để phân tích.

Phosphor

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Hoá chất, thuốc thử:

Dung dịch amoni molybdat 5%: Hoà 50 g amoni molybdat tetrahydrat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, trong 900 ml nước ấm, làm nguội tới nhiệt độ phòng, pha loãng tới 1000 ml bằng nước và lắc đều.

Dung dịch amoni Vanadat 0,25%: Hoà 2,5 g amoni metavanadat, NH_4VO_3 , trong 600 ml nước sôi, làm nguội tới 60 – 70°C và thêm vào 20 ml dung dịch acid nitric. Làm nguội tới nhiệt độ phòng, pha loãng tới 1000 ml bằng nước và lắc đều.

Dung dịch kẽm acetat 10%: Hoà 120 g kẽm acetat dihydrat, $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, trong 880 ml nước và lọc qua giấy lọc Whatman số 2V hoặc giấy lọc tương đương trước khi sử dụng.

Dung dịch acid nitric 29%: Thêm 300 ml dung dịch acid nitric (tỷ trọng 1,42) vào 600 ml nước và lắc đều.

Dung dịch phosphor chuẩn (100 µg P/ml): Hoà 438,7 mg KH_2PO_4 trong nước trong bình định mức 1000 ml, pha tới 1000 ml bằng nước và lắc đều.

Đường chuẩn:

Dùng pipet hút 5; 10 và 15 ml dung dịch phosphor chuẩn cho vào các bình định mức riêng biệt dung tích 100 ml. Thêm vào mỗi bình và bình mẫu trắng thứ tư lần lượt theo thứ tự 10 ml dung dịch acid nitric, 10 ml dung dịch amoni Vanadat và 10 ml dung dịch amoni molybdat, lắc mạnh sau mỗi khi thêm. Pha tới thể tích 100 ml bằng nước, lắc đều và để yên trong 10 phút. Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch chuẩn trong cồng đo 1 cm ở bước sóng 460 nm bằng thiết bị quang phổ thích hợp, sử dụng mẫu trắng để đặt giá trị độ hấp thụ trên thiết bị bằng 0. Vẽ đường chuẩn trên đồ thị biểu diễn độ hấp thụ với nồng độ từng dung dịch (mg P/100 ml).

Xử lý mẫu sơ bộ:

Cho 20 – 25 g mẫu tinh bột vào cốc dung tích 250 ml; thêm vào 200 ml hỗn hợp methanol/nước (7/3), phân tán mẫu và lắc bằng máy trong 15 phút. Thu hồi tinh bột bằng cách lọc chân không vào phễu thủy tinh xốp có lỗ xốp trung bình dung tích 150 ml hoặc phễu Buchner, và rửa bánh tinh bột ẩm bằng 200 ml hỗn hợp methanol/nước. Lại chuyển bánh tinh bột ẩm thành bột nhão trong dung môi, rửa lần hai theo cách tương tự. Sấy bánh tinh bột lọc trong tủ sấy ở nhiệt độ nhỏ hơn 50°C, sau đó nghiền mẫu qua rây 20 mesh hoặc mịn hơn và trộn đều. Xác định hàm lượng chất khô bằng cách sấy một phần 5 g trong tủ sấy chân không, không quá 100 mmHg, ở 120°C trong 5 giờ. (Chú ý: xử lý được đưa ra ở trên phù hợp với các sản phẩm tinh bột không tan trong nước lạnh. Đối với tinh bột đã được hồ hóa trước và các loại tinh bột tan trong nước khác, chuẩn bị dung dịch bột nhão 1 – 2% trong nước, sau đó cho vào ống cellophan và thẩm tách nước cất liên tục trong 30 – 40 giờ. Kết tủa tinh bột bằng cách đổ dung dịch vào 4 phần thể tích acetone/1 phần thể tích dung dịch bột nhão đồng thời khuấy. Thu hồi tinh bột bằng cách lọc chân không vào phễu thủy tinh xốp có lỗ xốp trung bình hoặc phễu Buchner, rửa bánh lọc bằng ethanol tuyệt đối. Sấy bánh lọc và xác định hàm lượng chất khô theo hướng dẫn đối với các tinh bột không tan trong nước.

Chuẩn bị mẫu:

Cân chính xác 10 g mẫu đã xử lý sơ bộ, tính theo chất khô, cho vào đĩa Vycor và thêm vào 10 ml dung dịch kẽm acetat, phân tán dung dịch đều trong mẫu. Cô đến khô trên tấm gia nhiệt sau đó tăng nhiệt và carbon hoá mẫu trên tấm gia nhiệt hoặc trên ngọn lửa gas. Đốt cháy trong lò nung ở 550°C cho đến khi tro không còn carbon (khoảng 1 – 2 giờ), làm nguội. Làm ẩm tro bằng 15 ml nước và rửa chậm xuống thành đĩa bằng 5 ml dung dịch acid nitric. Gia nhiệt đến sôi, làm nguội và chuyển toàn lượng hỗn hợp vào bình định mức dung tích 200 ml, rửa đĩa bằng ba phần 20 ml nước và cho nước rửa vào bình. Pha tới thể tích 200 ml bằng nước và lắc đều. Chuyển một lượng chính xác (V ml) của dung dịch này, chứa không được quá 1,5 mg P, vào trong bình định mức dung tích 100 ml và thêm vào 10 ml dung dịch acid nitric, 10 ml dung dịch amoni Vanadat và 10 ml dung dịch amoni molybdat, lắc đều sau mỗi lần thêm. Pha tới thể tích 100 ml bằng nước, lắc đều và để yên trong 10 phút.

Cách tiến hành:

Đo độ hấp thụ của dung dịch ở mục Chuẩn bị mẫu trong công đo 1 cm ở bước sóng 460 nm bằng thiết bị quang phổ phù hợp, sử dụng mẫu trắng để cài đặt thiết bị ở 0. Từ đường chuẩn, xác định số mg phosphor trong lượng mẫu lấy, ghi lại giá trị này là a. Tính hàm lượng mg P/kg mẫu gốc theo công thức sau:

$$\frac{a \times 200 \times 1000}{V \times W}$$

Trong đó:

W: Khối lượng mẫu thử (g)

Các nhóm acetyl

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Cân chính xác 5 g mẫu và cho vào bình nón dung tích 250 ml. Tạo hỗn dịch trong 50 ml nước, thêm vào vài giọt phenolphthalein TS và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt. Thêm 25 ml dung dịch NaOH 0,45N, đậy nắp bình và lắc mạnh trong 30 phút, thích hợp nhất là lắc bằng máy. (Chú ý: Nhiệt độ không được quá 30°C, nếu không một vài loại tinh bột có thể bị hồ hóa). Tháo nắp đậy, rửa nắp và thành bình bằng một vài ml nước và chuẩn độ kiểm dư bằng dung dịch HCl 0,2N cho đến khi mất màu hồng. Ghi lại thể tích dung dịch HCl 0,2N dùng để chuẩn độ (S ml). Thực hiện chuẩn độ mẫu trắng trên 25 ml dung dịch NaOH 0,45N và ghi lại thể tích của dung dịch HCl 0,2N (B ml)

$$(B - S) \times N \times 0,043 \times 100$$

$$\% \text{ các nhóm acetyl} = \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

W

Trong đó:

N: Nồng độ đương lượng của dung dịch HCl

W: Khối lượng mẫu (g)

Vinyl acetat

Xác định bằng phương pháp sắc ký khí không gian hơi.

Sử dụng thiết bị sắc ký khí được trang bị cột thuỷ tinh nhồi Porapak Q 80 – 100 mesh (hoặc tương đương) có chiều dài 2 m, đường kính trong 2 mm; detector ion hoá ngọn lửa; thực hiện với các điều kiện sau:

- Tốc độ dòng khí mang (nitrogen): 20 ml/phút
- Nhiệt độ cổng bơm mẫu: 200°C
- Nhiệt độ cột: 50°C
- Nhiệt độ detector: 200°C

Chuẩn bị chuẩn: Cân chính xác 150 mg vinyl acetat (tinh khiết) cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Hoà tan và định mức đến thể tích 100 ml bằng nước cất. Cho 1 ml dung dịch này vào bình định mức dung tích 10 ml và định mức tới 10 ml bằng nước cất. Thêm 1 ml dung dịch loãng này vào 30 g tinh bột chưa biến tính của cùng nguồn gốc thực vật như là chất thử trong bình dung tích 100 ml có nắp gioăng. Đóng kín bình ngay lập tức bằng nắp gioăng. Cách làm này thu được tinh bột chuẩn với hàm lượng vinyl acetat 5 mg/kg.

Cách tiến hành:

Cân 30 g chất thử cho vào trong bình định mức dung tích 100 ml có nắp gioăng. Đóng kín bình. Để bình có chứa chất thử và bình có chứa tinh bột chuẩn ở chậu nước có nhiệt độ không đổi 70°C trong 30 phút. Lấy 2 ml từ thể tích khí trong bình chứa chuẩn, sử dụng syringe (xylanh) kín, bơm trực tiếp vào cổng bơm của thiết bị sắc ký khí và ghi chiều cao pick của sắc phổ. Tương tự bơm 2 ml thể tích khí từ bình chứa chất thử vào thiết bị sắc ký. Tính hàm lượng vinyl acetat trong chất thử từ việc so sánh chiều cao các pick của hai sắc ký đồ.

Các nhóm adipat

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Hoá chất và dung dịch:

N,N-Bis-trimethylsilyltrifluoroacetamid (BSTFA): của Macherey-Nagel, D 5160 Dueren, Đức hoặc tương đương.

Dung dịch acid glutaric: Hoà tan 1 g acid glutaric (của Merck hoặc tương đương) trong nước và pha tới 1.000 ml.

Dung dịch acid adipic: Hoà tan 1 g acid adipic (UCB, Brussels, Bỉ hoặc tương đương) trong 900 ml nước ấm, làm nguội đến nhiệt độ phòng, pha tới 1.000 ml và lắc đều.

Dụng cụ, thiết bị:

Thiết bị sắc ký khí Hewlett-Packard Model 7620A hoặc tương đương được trang bị detector ion hoá ngọn lửa và Thiết bị phân tích Model 3370A.

Các thông số cột: làm bằng thép không gỉ có chiều dài 2 m, đường kính trong 1,83 mm, được nhồi bằng OV-17 5% trên Chromosorb GAW-DMCS 80 - 100 mesh (Alltech Europe, Inc., B 9731 Eke, Bỉ); luyện cột ở 350°C trong 24 giờ với tốc độ khí mang nitrogen 40 ml/phút. Các tốc độ dòng khí hoạt động (ml/phút): khí mang nitrogen là 30, hydrogen là 40, không khí là 400. Nhiệt độ: buồng bơm mẫu 280°C, detector 250°C, cột 140°C. Các thời gian lưu (phút): acid glutaric là 2,83; acid adipic là 4,5.

Hiệu chuẩn:

Cân và cho vào 4 bình bình tam giác dung tích 250 ml (1 g tinh bột ngô dạng sếp/bình). Thêm vào mỗi bình 50 ml nước và 1 ml dung dịch nước chứa 1 mg acid glutaric/ml. Thêm vào bình một 0,25 ml dung dịch nước chứa 1 mg acid adipic/ml, thêm vào 3 bình còn lại lần lượt 0,5; 0,75 và 1 ml. Mỗi bình sau đó chứa 1 mg acid glutaric và lần lượt là 0,25; 0,5; 0,75 và 1 mg acid adipic. Lắc mạnh các bình bằng tay để phân tán hoàn toàn tinh bột và thêm 50 ml dung dịch NaOH 4N. Tiếp tục lắc mạnh trong 5 phút, để mỗi bình trong chậu nước ở nhiệt độ môi trường và thêm cẩn thận 20 ml dung dịch HCl 12N cho mỗi bình. Khi mỗi bình nguội, chuyển toàn lượng hỗn hợp trong bình vào phễu chiết dung tích 250 ml. Chiết với 100 ml ethyl acetat tinh khiết. Rút lớp nước ở dưới vào một cốc vại; tập trung lớp dung môi hữu cơ phía trên vào một bình bình tam giác dung tích 500 ml chứa 20 g Na₂SO₄ khan. Chuyển phần tan trong nước quay trở lại phễu chiết và lặp lại chiết bằng ethyl acetat hai lần nữa. Lắc các bình định kỳ trong 10 phút và sau đó lọc qua giấy lọc Whatman số 1 vào trong các bình đáy tròn dung tích 1 lít. Rửa các bình và các cặn không hoà tan được lọc 2 lần bằng 50 ml ethyl acetat. Cô toàn bộ phần chiết hữu cơ và nước rửa của mỗi bình ở nhiệt độ không quá 40°C, áp suất chân không (50 mgHg) cho đến khi khô hoàn toàn.

Cô ethyl acetat nên được thực hiện càng nhanh càng tốt bởi vì dễ xảy ra các phản ứng thủy phân trong quá trình thực hiện. Các sản phẩm thủy phân làm giảm độ phân giải của acid adipic trong phân tách sắc ký.

Thêm lần lượt 2 ml pyridin và 1 ml N,N-Bis-trimethylsilyltrifluoroacetamid vào các thành phần khô. Đậy nắp từng bình đáy tròn và rửa bề mặt bên trong thật kỹ bằng cách lắc xoáy. Để yên các bình trong 1 giờ sau đó chuyển khoảng 2 ml từ mỗi bình vào các lọ thủy tinh nhỏ và đậy kín ngay lập tức. Bơm 4 µl vào thiết bị sắc ký khí.

Tính kết quả:

Xác định các thời gian lưu đối với mỗi acid và xác định chiều cao pic đối với acid glutaric và đối với mỗi nồng độ acid adipic. Vẽ đồ thị biểu diễn quan hệ

tuyến tính giữa tỷ lệ chiều cao pic của acid adipic/chiều cao pic của acid glutaric với hàm lượng acid adipic. Đường hiệu chuẩn này có thể được sử dụng nhưng đơn giản hơn sử dụng một hệ số đáp ứng (RF):

$$RF = \frac{H_I \times W_S}{H_S}$$

Trong đó:

H_S và H_I : Các chiều cao lần lượt của của acid adipic chuẩn và acid glutaric;

W_S : Khối lượng acid adipic chuẩn

RF nên được kiểm tra mỗi tuần một lần.

Adipat tổng số:

Cân chính xác 1 g mẫu cho vào bình bình tam giác dung tích 250 ml, thêm vào 50 ml nước và 1 ml dung dịch tan trong nước có 1 mg acid glutaric/ml. Tiến hành như trong phần Hiệu chuẩn, bắt đầu “Lắc các bình bằng tay...”.

Acid adipic tự do:

Cân chính xác 5 g mẫu cho bình bình tam giác dung tích 250 ml, thêm vào 100 ml nước và 1 ml dung dịch acid glutaric. Lắc mạnh trong 1 giờ, lọc qua dụng cụ lọc Milipore 0,45 μ m, thêm 1 ml dung dịch HCl đậm đặc vào phần lọc được và chuyển toàn lượng vào phễu chiết dung tích 250 ml. Tiến hành như trong phần Hiệu chuẩn, bắt đầu “Chiết với 100 ml...”.

Tính kết quả:

Đối với cả hai phép định lượng (“Hàm lượng adipat tổng” và “Hàm lượng acid adipic tự do”) ghi chiều cao các pic đối với acid adipic và acid glutaric (nội chuẩn). Tính hàm lượng lần lượt adipat tổng số và acid adipic tự do có trong mẫu theo công thức sau:

$$A = \frac{H_X \times RF}{H_{IX} \times S \times 10}$$

Trong đó:

A: Hàm lượng adipat tổng số hoặc acid adipic tự do (%)

H_X : Chiều cao pic của acid adipic trong dung dịch mẫu thực

H_{IX} : Chiều cao pic của acid glutaric trong dung dịch mẫu thực

RF: Hệ số đáp ứng đối với acid adipic

S: Khối lượng mẫu trong dung dịch mẫu thực (g)

Các nhóm adipat (%) = Hàm lượng adipat tổng số (%) – hàm lượng acid adipic tự do (%)

Các nhóm hydroxypropyl

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Thuốc thử Ninhydrin:

Dung dịch 3% tinh thể 1,2,3,-triketohydrinden trong dung dịch natri bisulfit 5% trong nước.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 50 – 100 mg mẫu cho vào trong bình định mức dung tích 100 ml và thêm 25 ml dung dịch H₂SO₄ 1N. Chuẩn bị một mẫu tinh bột chưa biến tính có cùng nguồn gốc (tức là ngô hoặc khoai tây) trong cùng cách thực hiện. Đặt các bình trong cách thủy sôi và gia nhiệt cho đến khi các mẫu tạo thành dung dịch. Làm nguội và pha tới thể tích 100 ml bằng nước. Nếu cần thiết pha loãng mẫu hơn đảm bảo không được quá 4 mg nhóm hydroxypropyl/100 ml, sau đó pha mẫu trắng tinh bột tương ứng. Dùng pipet lấy 1 ml các dung dịch cho vào các ống thử định mức 25 ml có các nắp thủy tinh được ngâm trong nước lạnh, thêm từng giọt 8 ml dung dịch H₂SO₄ đậm đặc vào mỗi ống. Lắc đều và đặt các ống trong cách thủy sôi chính xác 3 phút. Chuyển ngay lập tức các ống vào chậu đá cho đến khi dung dịch lạnh. Thêm 0,6 ml ninhydrin, cẩn thận để cho thuốc thử chảy xuống theo thành của các ống thử. Lắc đều ngay lập tức và đặt các ống trong chậu nước 25°C trong 100 phút. Điều chỉnh thể tích trong mỗi ống tới 25 ml bằng acid H₂SO₄ và lắc ngược các ống vài lần. (Không được lắc). Ngay lập tức chuyển các phần của các dung dịch vào các cốc đo 1 cm và sau chính xác 5 phút đo độ hấp thụ (A) ở bước sóng 590 nm, sử dụng mẫu trắng tinh bột như là mẫu đối chứng. Chuẩn bị đường chuẩn bằng các phần 1 ml của các dung dịch chuẩn tan trong nước có 10, 20, 30, 40 và 50 µg propylen glycol/ml.

Tính kết quả:

$$C \times 0,7763 \times 10^6$$

$$\text{Các nhóm hydroxypropyl (\%)} = \frac{\text{C} \times 0,7763 \times 10^6}{W}$$

W

Trong đó:

C: Hàm lượng propylen glycol trong dung dịch mẫu tính được dựa vào đường chuẩn (µg/ml)

F: Hệ số pha loãng (nếu cần một pha loãng hơn)

W: Khối lượng mẫu (mg)

Propylen clorhydrin

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Thiết bị sắc ký khí:

Sử dụng thiết bị Hewlett-Packard Model 5750 hoặc tương đương. Một thiết bị cột kép được trang bị detector ion hoá ngọn lửa. Một thiết bị tích phân là một phần của hệ thống ghi.

Cột sắc ký khí: Sử dụng cột thép không rỉ, dài 3 m, đường kính ngoài 3,2 mm, được nhồi 10% Carbowax 20M trên 80/100 mesh Gas Chrom 2, hoặc tương đương. Sau khi nhồi, trước khi sử dụng, luyện cột qua đêm trong điều kiện nhiệt độ 200°C, sử dụng dòng khí heli với tốc độ 25 ml/phút.

Dụng cụ cô đặc: Sử dụng dụng cụ cô đặc Kuderna-Danish có một bình dung tích 500 ml, có sẵn của Công ty Kontes Glass,.. Vineland, N.J., Mỹ, (Catalog số K-57000), hoặc tương đương.

Các bình áp lực: Sử dụng các bình áp lực dung tích 200 ml, có gioăng

Neoprene, nắp đậy thuỷ tinh và gắn với một cái kẹp kim loại, có sẵn của Công ty Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, Mỹ. (Vitro 400, catalog số 3 – 100). hoặc tương đương.

Hoá chất, thuốc thử:

Diethyl ether: Sử dụng diethyl ether khan, tinh khiết dành cho phân tích.

Florisil: Sử dụng vật liệu 60/100 mesh, có sẵn của Công ty Floridin, 3 Penn Center, PA 15235, Mỹ, hoặc sản phẩm tương đương.

Propylen chlorohydrin: Sử dụng Eastman số P1325 1-Chloro-2-propanol thích hợp, chứa 25% 2-chloro-1-propanol, có sẵn của Công ty Eastman Kodak, Rochester, N.Y.14650, Mỹ hoặc tương đương.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Lấy 25 μ l hỗn hợp các đồng phân propylen chlorohydrin chứa 75% 1-chloro-2-propanol và 25% 2-chloro-1-propanol cho vào syringe (xylanh) dung tích 50 μ l. Cân chính xác syringe và bơm một phần vào bình định mức dung tích 500 ml, đã chứa một phần nước. Cân lại syringe và ghi trọng lượng các chlorohydrin đã lấy. Pha tới thể tích 500 ml bằng nước và lắc đều. Dung dịch này chứa khoảng 27,5 mg hỗn hợp các chlorohydrin, hoặc khoảng 55 μ g/ml. Chuẩn bị dung dịch này mới trong ngày sử dụng.

Chuẩn bị mẫu thử:

Cho 50 g mẫu đại diện đã được trộn vào Bình áp lực và thêm vào 125 ml dung dịch H_2SO_4 2N. Kẹp vị trí phía trên bình và lắc xoáy hỗn hợp cho đến khi mẫu được phân tán hoàn toàn. Đặt bình trong cách thuỷ sôi, gia nhiệt trong 10 phút sau đó lắc xoáy bình để trộn các thành phần, và gia nhiệt trong cách thuỷ thêm 15 phút nữa. Làm nguội trong không khí tới nhiệt độ phòng sau đó trung hoà mẫu thuỷ phân tới pH = 7 bằng dung dịch NaOH 25% và lọc qua giấy lọc Whatman số 1, hoặc tương đương, vào phễu Buchner, sử dụng lọc hút. Rửa bình và giấy lọc bằng 25 ml nước và tập hợp các nước rửa với phần lọc được. Thêm vào 30 g Na_2SO_4 khan và khuấy bằng máy khuấy từ trong 5 – 10 phút, hoặc cho đến khi Na_2SO_4 được hoà tan hoàn toàn. Chuyển dung dịch này vào một phễu tách dung tích 500 ml được trang bị với khoá teflon, rửa bình bằng 25 ml nước và tập hợp các nước rửa với dung dịch mẫu. Chiết với 5 phần x 50 ml diethyl ether, để ít nhất 5 phút trong mỗi quá trình chiết để tách pha hoàn toàn. Chuyển các phần dịch chiết ether vào dụng cụ cô đặc, đặt bình hứng chia độ của dụng cụ cô đặc trong cách thuỷ duy trì ở 50 – 55°C và cô đặc dịch chiết tới thể tích 4 ml.

(Chú ý: Dịch chiết ether của mẫu có thể chứa tạp chất lạ gây trở ngại đến phân tích và/hoặc biện giải ở các sắc đồ. Các tạp chất này là các sản phẩm được sinh ra trong quá trình thuỷ phân. Các khó khăn phân tích tạo ra bởi sự xuất hiện của các tạp chất đó có thể tránh được thông qua việc sử dụng biện pháp xử lý làm sạch sau:

Cô đặc dịch chiết ether tới 8 ml, thay vì 4 ml như đã đề cập ở trên. Thêm vào 10 g Florisil, trước đó được gia nhiệt đến 130°C trong 16 giờ ngay trước khi dùng, vào cột sắc ký có kích thước thích hợp, sau đó vỗ nhẹ và thêm vào 1 g Na_2SO_4 khan vào đỉnh trên của cột. Làm ẩm cột bằng 25 ml diethyl ether và chuyển toàn lượng dịch chiết cô đặc vào cột với sự trợ giúp của các phần nhỏ ether. Rửa giải bằng 3 phần x 25 ml ether, lấy tất cả phần rửa giải chuyển vào dụng cụ cô đặc và cô đặc đến 4 ml).

Làm nguội dịch chiết tới nhiệt độ phòng, chuyển toàn lượng vào bình định mức dung tích 5 ml với sự hỗ trợ của các phần nhỏ diethyl ether, pha tới thể

tích 5 ml bằng ether và lắc đều.

Chuẩn bị mẫu đối chứng:

Chuyển các phần 50 g tinh bột ngô dạng sáp chưa biến tính (chưa được chuyển hoá) vào 5 bình áp lực riêng biệt và thêm vào mỗi bình 125 ml dung dịch H_2SO_4 2N. Thêm 0; 0,5; 1; 2 và 5 ml dung dịch chuẩn lần lượt vào các bình, để có được các nồng độ propylen chlorohydrin so với tinh bột lần lượt là 0; 0,5; 1; 2 và 5 mg/kg. Tính nồng độ chính xác trong mỗi bình từ trọng lượng các propylen chlorohydrin đã sử dụng trong cách làm Chuẩn bị dung dịch chuẩn. Kẹp vào vị trí đầu bình, lắc xoáy cho đến khi các chất trong mỗi bình được hoà tan hoàn toàn, tiến hành thuỷ phân, trung hoà, lọc, chiết, cô phần dịch chiết và cuối cùng pha như hướng dẫn trong phần Chuẩn bị mẫu thử.

Cách tiến hành:

Các điều kiện vận hành có thể khác nhau phụ thuộc vào thiết bị cụ thể sử dụng, nhưng sắc đồ phù hợp thu được bằng thiết bị Hewlett-Packard Model 5750 sử dụng nhiệt độ cột $110^{\circ}C$ đẳng nhiệt; nhiệt độ cổng bơm $210^{\circ}C$; nhiệt độ detector $240^{\circ}C$; tốc độ dòng khí hydrogen 30 ml/phút; tốc độ dòng khí heli 25 ml/phút, hoặc tốc độ không khí 350 ml/phút như khí mang. Có bộ ghi đến 1 mV; tốc độ sắp xếp, làm loãng và giấy ghi được lựa chọn để tối ưu hoá các đặc tính tín hiệu. Bơm các phần 2 μ l của mỗi dịch chiết cô đặc được chuẩn bị theo hướng dẫn trong phần Chuẩn bị mẫu đối chứng, để thời gian đủ giữa các lần bơm đối với các pic tín hiệu tương ứng với hai đồng phân chlorohydrin ghi được (và tích phân được) và cột được làm sạch. Ghi và tính tổng các diện tích tín hiệu (thiết bị phân tích tín hiệu ra) từ hai đồng phân chlorohydrin đối với mỗi mẫu đối chứng. Sử dụng các điều kiện hoạt động thống nhất, bơm 2 μ l phần chiết cô đặc chuẩn bị theo hướng dẫn trong phần Chuẩn bị mẫu thử, ghi và tính tổng các diện tích tín hiệu (thiết bị phân tích tín hiệu ra) từ mẫu thử.

Tính kết quả:

Chuẩn bị đồ thị đường chuẩn trên giấy bằng cách vẽ các diện tích tín hiệu tổng của mỗi mẫu đối chứng với các nồng độ propylen chlorohydrin (mg/kg), xuất phát từ trọng lượng thực của đồng phân chlorohydrin sử dụng. Sử dụng các diện tích tín hiệu tổng tương ứng với 1-chloro-2-propanol và 2-chloro-1-propanol từ mẫu thử, xác định nồng độ của hỗn hợp các propylen chlorohydrin (mg/kg) trong mẫu thử liên quan tới đồ thị đường chuẩn xuất phát từ các mẫu đối chứng. Sau khi có được kinh nghiệm về cách tiến hành và biểu thị được đồ thị đường chuẩn từ các mẫu đối chứng tuyến tính và lặp lại, số mẫu đối chứng có thể được giảm đến một mẫu có chứa khoảng 5 mg/kg hỗn hợp các đồng phân propylen chlorohydrin. Hàm lượng propylen chlorohydrin trong mẫu khi đó có thể được tính theo công thức sau:

$$\text{Propylene chlorohydrins (mg / kg)} = \frac{C \times a}{A}$$

Trong đó:

C: Nồng độ (mg/kg) của các propylen chlorohydrin (tổng của các đồng phân) trong mẫu đối chứng

a: Tổng diện tích tín hiệu được tạo ra bởi các đồng phân propylen chlorohydrin trong mẫu thử

A: Tổng diện tích tín hiệu được tạo ra bởi các đồng phân propylen chlorohydrin trong đối chứng

Độ ester hóa của natri octenyl succinat tinh bột

Nguyên tắc:

Độ ester hóa được xác định bởi lượng kiềm tiêu thụ sau khi acid hoá và rửa kỹ monoester của acid octenylsuccinic với tinh bột.

Cách tiến hành:

Cân và cho 5 g mẫu vào cốc dung tích 150 ml. Làm ẩm bằng một vài ml isopropyl alcol tinh khiết. Dùng pipet thêm vào 25 ml dung dịch HCl 2,5N trong isopropanol, dùng acid để rửa mẫu bám trên thành cốc. Khuấy trong 30 phút bằng máy khuấy từ. Thêm vào 100 ml isopropanol 90% từ ống đong chia độ. Khuấy trong 10 phút. Lọc mẫu qua phễu Buchner và rửa bánh lọc bằng isopropanol 90% cho đến khi dịch lọc thu được không còn ion clorid. Sử dụng AgNO_3 0,1N để kiểm tra các ion clorid. Chuyển bánh lọc vào cốc dung tích 600 ml và rửa nhẹ phễu Buchner để rửa tinh bột trong cốc. Thêm nước cất vào cho đến thể tích 300 ml. Đặt trong cách thủy sôi có khuấy trong 10 phút. Chuẩn độ trong khi còn nóng bằng dung dịch NaOH 0,1N cho đến điểm kết thúc được phát hiện bằng phenolphthalein.

Kết quả:

$$\text{Độ ester hóa (DS)} = \frac{0,162 \times A}{1 - 0,210 \times A}$$

Trong đó:

A: số mili đương lượng của NaOH sử dụng/g octenyl succinat tinh bột

Dư lượng acid octenyl succinic trong natri octenyl succinat tinh bột

Chiết xuất và chuẩn bị dung dịch mẫu:

Chiết xuất khoảng 500 mg tinh bột với 15 ml methanol qua đêm với lắc thường xuyên (cân chính xác lượng tinh bột). Lọc hỗn hợp chiết. Rửa tinh bột trên dụng cụ lọc bằng 7 ml methanol. Lặp lại 3 lần. Tập hợp các phần dịch lọc (khoảng 80% dư lượng được chiết xuất bởi cách làm này). Thêm vào các phần dịch chiết thu được 1 ml KOH 0,16N trong methanol. Làm khô các phần dịch chiết thu được bằng thiết bị cô nhanh ở 30°C. Hoà tan cặn thu được trong 2 ml methanol. Lấy 0,5 ml dung dịch cặn cho vào lọ phản ứng. Thêm vào lọ phản ứng 0,5 ml thuốc thử tạo dẫn xuất (2,8 g 2-p-dibromoacetophenon và 0,28 g 18-Crown-6 trong 50 ml CH_3CN). Thêm 2 ml CH_3CN vào lọ phản ứng. Đậy nắp kín lọ phản ứng và gia nhiệt ở 80°C trong 30 phút. Làm nguội dung dịch phản ứng đến nhiệt độ phòng (sử dụng trong 24 giờ).

Phân tích sắc ký lỏng:

- Cột: Micro-Bondapark C_{18} (Waters) hoặc tương đương

- Pha động: rửa giải Gradient methanol 70% trong nước đến methanol 80% trong nước trong 5 phút. Đường 6 (thiết bị lập trình dung môi Waters 660).

Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút

Detector: UV tại bước sóng 254 nm, độ tắt dần 0,16 AUFS

Thể tích bơm: 5 μl

Chuẩn bị đường chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch natri octenyl succinat 0,5 M (Dung dịch A). Lấy 0,25 ml Dung dịch A bằng syringe cho vào bình định mức dung tích 25 ml. Pha tới 25 ml bằng methanol (Dung dịch B). Chuẩn bị ba chuẩn hiệu chuẩn bằng

cách lấy 0,5; 1 và 2 ml Dung dịch B cho vào 3 bình đáy tròn dung tích 50 ml. Thêm vào mỗi bình 1 ml dung dịch KOH 0,16N trong methanol. Làm khô mỗi dung dịch bằng thiết bị cô nhanh ở 30°C. Hoà tan cạn thu được trong 2 ml methanol (Dung dịch C₁, C₂ và C₃). Cho 0,5 ml dung dịch cạn vào lọ phản ứng. Thêm 0,5 ml thuốc thử tạo dẫn xuất (2,8 g 2-p-dibromoacetophenon và 0,28 g 18-Crown-6 trong 50 ml CH₃CN) vào lọ phản ứng. Thêm vào 2 ml CH₃CN. Đậy nắp kín và gia nhiệt tới 80°C trong 30 phút. Làm nguội dung dịch phản ứng đến nhiệt độ phòng (chất dẫn xuất nên được chuẩn bị khi cần và sử dụng ngay). Bơm 5 µl vào thiết bị sắc ký lỏng. Hàm lượng chất tồn dư trong mỗi lần bơm 5 µl như sau:

Đối với Dung dịch C₁ 0,2375 µg

Đối với Dung dịch C₂ 0,4750 µg

Đối với Dung dịch C₃ 0,9500 µg

Vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa chiều cao pic thu được từ trên sắc ký đồ với µg chất tồn dư/5 ml dung dịch.

Tính kết quả:

Chuẩn bị đường chuẩn dựa vào cách tiến hành. Sử dụng chiều cao pic của mẫu chưa biết từ sắc ký đồ, xác định hàm lượng chất tồn dư (tính theo acid octenyl succinic) trong thể tích bơm từ đường chuẩn.

300 x giá trị từ đồ thị

% Chất tồn dư trong tinh bột = -----

Khối lượng tinh bột (mg)

Ghi chú: Công thức này được hiệu chỉnh về độ thu hồi 100% bằng cách chia cho 0,80; do vậy 240/0,80 = 300.



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 4-19:2011/BYT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - ENZYM**

National technical regulation on Food Additive – Enzyme

HÀ NỘI – 2011

Lời nói đầu

QCVN 4-19:201/BYT do Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - ENZYM

National technical regulation on Food Additive – Enzyme

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia (sau đây gọi tắt là Quy chuẩn) này quy định các yêu cầu kỹ thuật và quản lý về chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các enzym được sử dụng với mục đích làm phụ gia thực phẩm.

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

- 2.1. Tổ chức, cá nhân nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các enzym làm phụ gia thực phẩm (sau đây gọi tắt là tổ chức, cá nhân).
- 2.2. Cơ quan quản lý nhà nước có liên quan.

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:

3.1. JECFA monograph 1 - Vol. 4 (JECFA monographs 1 - Combined compendium of food additive specifications; Joint FAO/WHO expert committee on food additives; Volume 4 - Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications; FAO, 2006): Các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4 Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm, dung dịch thử nghiệm được sử dụng (hoặc tham chiếu) trong yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm; JECFA biên soạn; FAO ban hành năm 2006.

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

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

3.4. ADI (Acceptable daily intake): Lượng ăn vào hàng ngày chấp nhận được.

3.5. INS (International numbering system): Hệ thống mã số quốc tế về phụ gia thực phẩm.

II. YÊU CẦU KỸ THUẬT, PHƯƠNG PHÁP THỬ VÀ LẤY MẪU

1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với các enzym được quy định tại các phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này như sau:

- 1.1. Phụ lục 1: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với amylase
- 1.2. Phụ lục 2: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với protease
- 1.3. Phụ lục 3: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với papain
- 1.4. Phụ lục 4: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với bromelain
- 1.5. Phụ lục 5: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với glucose oxidase và

catalase

2. Các yêu cầu kỹ thuật quy định trong Quy chuẩn này được thử theo JECFA monograph 1 - Vol. 4, ngoại trừ một số phép thử riêng được mô tả trong các phụ lục. Các phương pháp thử được hướng dẫn trong Quy chuẩn này không bắt buộc phải áp dụng, có thể sử dụng các phương pháp thử khác tương đương.

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư 16/2009/TT-BKHCN ngày 02 tháng 6 năm 2009 của Bộ Khoa học và Công nghệ về hướng dẫn kiểm tra nhà nước về chất lượng hàng hóa lưu thông trên thị trường và các quy định khác của pháp luật có liên quan.

III. YÊU CẦU QUẢN LÝ

1. Công bố hợp quy

1.1. Các enzym phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

1.2. Phương thức, trình tự, thủ tục công bố hợp quy được thực hiện theo Quy định về chứng nhận hợp chuẩn, chứng nhận hợp quy và công bố hợp chuẩn, công bố hợp quy ban hành kèm theo Quyết định số 24/2007/QĐ-BKHCN ngày 28 tháng 9 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ và các quy định của pháp luật.

2. Kiểm tra đối với enzym

Việc kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các enzym phải thực hiện theo các quy định của pháp luật.

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

1. Tổ chức, cá nhân phải công bố hợp quy phù hợp với các quy định kỹ thuật tại Quy chuẩn này, đăng ký bản công bố hợp quy tại Cục An toàn vệ sinh thực phẩm và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn theo đúng nội dung đã công bố.

2. Tổ chức, cá nhân chỉ được nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các enzym sau khi hoàn tất đăng ký bản công bố hợp quy và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn, ghi nhãn phù hợp với các quy định của pháp luật.

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

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

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

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

PHỤ LỤC 1

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI α -AMYLASE VÀ GLUCOAMYLASE

INS 1100

1. Tên khác, chỉ số

2. Định nghĩa

Được tạo ra bằng cách lên men có kiểm soát các chủng không gây độc và không gây bệnh của *Aspergillus oryzae* và được phân tách từ môi trường sinh trưởng

Các hoạt chất

alpha-Amilase (tên khác: diastase, ptyalin, glycogenase)

Glucan 1,4-alpha glucosidase (tên khác: amyloglucosidase, acid maltase, lysosomal alpha-glucosidase, exo-1,4-alpha-glucosidase)

Tên và mã số hệ thống

1,4-alpha-D-Glucan glucanohydrolase

EC 3.2.1.1

Các phản ứng được xúc tác

alpha-Amylase thủy phân các liên kết 1,4-alpha-glucosidic trong polysaccharid sinh ra dextrin, oligosaccharid và glucose

Glucosylase thủy phân các liên kết 1,4-alpha- và 1,6-alpha-glucosidic trong polysaccharide tạo ra glucose

Hoạt tính enzym thứ cấp

Lipase (EC 3.1.1.3)

Tannase (EC 3.1.1.20)

Cellulase (EC 3.2.1.4)

Endo-1,3-beta-glucanase (EC 3.2.1.6)

Pectinase (EC 3.2.1.15)

Maltase (EC 3.2.1.20)

Lactase (EC 3.2.1.23)

Endo-1,4-beta-mannanase (EC 3.2.1.78)

Protease

3. Cảm quan

Dạng bột vô định hình màu vàng nâu hoặc dạng lỏng màu vàng nâu đến nâu đậm có thể phân tán trong dịch pha loãng (tinh khiết dùng cho thực phẩm) và có thể chứa chất ổn định và chất bảo quản; tan trong nước, khó tan trong ethanol và ether

Chế phẩm enzym.

4. Chức năng

Được sử dụng trong quá trình thủy phân ngũ cốc và tinh bột; trong quá trình chế biến các sản phẩm rau quả, đồ uống, đường, các sản phẩm bánh kẹo và mật ong.

5. Yêu cầu kỹ thuật

Phải phù hợp với các Yêu cầu kỹ thuật chung đối với các chế phẩm

enzyme sử dụng trong quá trình chế biến thực phẩm

5.1. Định tính

Hoạt tính alpha-amylase

Phải có phản ứng thể hiện hoạt tính alpha-amylase (từ *Aspergillus oryzae*, var) đặc trưng (Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4)

Hoạt tính glucoamilase

Phải có phản ứng thể hiện hoạt tính glucoamylase (từ *Aspergillus oryzae*, var) đặc trưng (Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4)

PHỤ LỤC 2

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI PROTEASE (TỪ NẤM)

INS 1101(i)

1. Tên khác, chỉ số

2. Định nghĩa

Được tạo ra bằng cách lên men có kiểm soát các chủng không gây độc và không gây bệnh của *Aspergillus oryzae* và được phân tách từ môi trường sinh trưởng

Các hoạt chất

Endo- và exopeptidases

Tên và mã số hệ thống

1. Aminopeptidases (EC 3.4.11)
2. Serine endopeptidases (EC 3.4.21)
3. Aspartic endopeptidases (EC 3.4.23)

Các phản ứng được xúc tác

1. Thủy phân các protein tại N-terminal, giải phóng các amino acid
2. Thủy phân các protein có chứa các liên kết serine peptid
3. Thủy phân các protein có chứa liên kết acid aspartic

Hoạt tính enzym thứ cấp

alpha-amylase (EC 3.2.1.1)

3. Cảm quan

Dạng bột vô định hình từ trắng nhạt đến vàng nâu có thể phân tán trong môi trường phân tán hoặc chất mang (tinh khiết dùng cho thực phẩm; có thể chứa chất ổn định và chất bảo quản; tan trong nước và khó tan trong ethanol và ether

Chế phẩm enzym.

4. Chức năng

Được sử dụng trong quá trình chế biến sản phẩm thịt và thủy sản, đồ uống, súp và nước dùng, các sản phẩm sữa và bánh kẹo.

5. Yêu cầu kỹ thuật

Phải phù hợp với các Yêu cầu kỹ thuật chung đối với các chế phẩm enzym sử dụng trong quá trình chế biến thực phẩm (xem phần Hướng dẫn)

5.1. Định tính

Hoạt tính proteolytic

Phải có phản ứng thể hiện hoạt tính proteolytic đặc trưng (Sử dụng phương pháp thử hoạt tính proteolytic, Fungal (HUT))

PHỤ LỤC 3

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI PAPAIN

INS 1101(ii)

1. Tên khác, chỉ số

Là các chất proteolytic được tinh chế từ quả đu đủ *Carica Papaya* (L) (Fam. *Caricaceae*)

2. Định nghĩa

Các hoạt chất

1. Papain (papaya peptidase I, cystein proteinase)
2. Chymopapain (cystein proteinase)

Tên và mã số hệ thống

1. Không (EC 3.4.22.2)
2. Không (EC 3.4.22.6)

Các phản ứng được xúc tác

Các enzyme này thủy phân các polypeptid, các amid và ester, đặc biệt tại các liên kết của các amino acid có tính base, hoặc leucin hoặc glycin, tạo ra các peptid với phân tử lượng nhỏ hơn.

3. Cảm quan

Dạng bột vô định hình hoặc dạng lỏng có màu trắng đến vàng nâu nhạt; tan trong nước, dung dịch từ không màu đến vàng nhạt và đôi khi có màu trắng đục; không tan trong cồn, clorform và ether

Chế phẩm enzym.

4. Chức năng

Được sử dụng trong quá trình xử lý chế biến thịt bò, xử lý thịt, chế biến ngũ cốc và sản xuất dịch thủy phân protein

5. Yêu cầu kỹ thuật

Phải phù hợp với các Yêu cầu kỹ thuật chung đối với các chế phẩm enzyme sử dụng trong quá trình chế biến thực phẩm (xem phần Hướng dẫn)

5.1. Định tính

Hoạt tính papain

Phải có phản ứng thể hiện hoạt tính proteolytic thực vật đặc trưng

PHỤ LỤC 4

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI BROMELAIN

INS 1101(iii)

1. Tên khác, chỉ số

Là các chất proteolytic được tinh chế từ quả dứa *Ananas comosus* và *Ananas bracteatus* (L)

2. Định nghĩa

Hoạt chất

Bromelain (crystein proteinase)

Tên và mã số hệ thống

Không (EC 3.4.22.4)

Các phản ứng được xúc tác

Enzym thủy phân các polypeptid, các amid và ester, đặc biệt là các liên kết của amino acid có tính base, hoặc leucin hoặc glycine, tạo ra các peptid có phân tử lượng thấp hơn

3. Cảm quan

Dạng bột vô định hình có màu trắng đến vàng nâu nhạt; tan trong nước, dung dịch có màu trắng hoặc vàng nhạt và đôi khi có màu trắng đục; không tan trong cồn, clorform và ether

Chế phẩm enzym.

4. Chức năng

Được sử dụng trong quá trình xử lý thịt bò, chế biến thịt, sơ chế ngũ cốc và sản xuất dịch thủy phân protein

5. Yêu cầu kỹ thuật

Phải phù hợp với các Yêu cầu kỹ thuật chung đối với các chế phẩm enzyme sử dụng trong quá trình chế biến thực phẩm

5.1. Định tính

Hoạt tính bromelain

Phải có phản ứng thể hiện hoạt tính proteolytic thực vật đặc trưng (xem phần Hoạt tính *Proteolytic*, thực vật)

PHỤ LỤC 5

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GLUCOSE OXIDASE VÀ CATALASE TỪ ASPERGILLUS NIGER var.

1. Tên khác, chỉ số	Glucose oxyhydrase, glucose aerodehydrogenase, notatin, aero-glucose dehydrogenase; INS 1102
2. Định nghĩa	Là các chế phẩm enzyme được tạo ra từ quá trình lên men nấm <i>Aspergillus niger</i> var., có kiểm soát
Hoạt chất	1. Glucose oxidase 2. Catalase
Tên và mã số hệ thống	1. β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase (EC 1.1.3.4) 2. Hydrogen-peroxide: hydrogen-peroxide oxidoreductase (EC 1.11.1.6)
Các phản ứng được xúc tác	1. β -D-glucose + O ₂ --> D-glucono-delta-lactone + H ₂ O ₂ 2. H ₂ O ₂ + H ₂ O ₂ --> 2H ₂ O + O ₂
Hoạt tính enzym thứ cấp	Invertase (EC 3.2.1.26)
3. Cảm quan	Dạng lỏng có màu trắng nhạt đến màu nâu; tan trong nước và không tan trong ethanol, chloroform và ether Chế phẩm enzym.
4. Chức năng	Được sử dụng trong quá trình chế biến, hoặc sử dụng sữa, pho mát, trứng, đồ uống và sa lát
5. Yêu cầu kỹ thuật	Phải phù hợp với các Yêu cầu kỹ thuật chung đối với các chế phẩm enzym sử dụng trong quá trình chế biến thực phẩm
5.1. Định tính	
Hoạt tính glucose oxidase	Phải có phản ứng thể hiện hoạt tính glucose oxidase (xem Vol 4.)
Hoạt tính catalase	Phải có phản ứng thể hiện hoạt tính catalase đặc trưng (xem Vol 4.)



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 4-20:2011/BYT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT LÀM BÓNG**

National technical regulation on Food Additive – Glazing agent

HÀ NỘI - 2011

Lời nói đầu

QCVN 4-20:2011/BYT do Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT LÀM BÓNG

National technical regulation on Food Additive – Glazing agent

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia (sau đây gọi tắt là Quy chuẩn) này quy định các yêu cầu kỹ thuật và quản lý về chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chất làm bóng được sử dụng với mục đích làm phụ gia thực phẩm.

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

2.1. Tổ chức, cá nhân nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các chất làm bóng làm phụ gia thực phẩm (sau đây gọi tắt là tổ chức, cá nhân).

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

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:

3.1. Chất làm bóng: là phụ gia thực phẩm được cho thêm vào bề mặt phía ngoài của thực phẩm nhằm tạo độ bóng hoặc tạo lớp bảo vệ.

3.2. JECFA monograph 1 - Vol. 4 (JECFA monographs 1 - Combined compendium of food additive specifications; Joint FAO/WHO expert committee on food additives; Volume 4 - Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications; FAO, 2006): Các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4 Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm, dung dịch thử nghiệm được sử dụng (hoặc tham chiếu) trong yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm; JECFA biên soạn; FAO ban hành năm 2006.

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

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

3.5. ADI (Acceptable daily intake): Lượng ăn vào hàng ngày chấp nhận được.

3.6. INS (International numbering system): Hệ thống mã số quốc tế về phụ gia thực phẩm.

II. YÊU CẦU KỸ THUẬT, PHƯƠNG PHÁP THỬ VÀ LẤY MẪU

1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với các chất làm bóng được quy định tại các phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này như sau:

- 1.1. Phụ lục 1: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sáp ong
- 1.2. Phụ lục 2: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sáp Candelilla
- 1.3. Phụ lục 3: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với Shellac

- | | |
|---------------------|--------------------|
| 1. Tên khác, chỉ số | Beeswax
INS 901 |
|---------------------|--------------------|

2. Định nghĩa

Sáp ong được lấy từ tổ ong mật (họ *Apidae*, ví dụ *Apis mellifera* L) sau khi đã rút hết hoặc ly tâm hết mật ong. Tổ ong được làm chảy với nước nóng, hơi nước hoặc phơi dưới ánh mặt trời, sau đó sản phẩm đã tan chảy được lọc và đóng thành bánh sáp ong vàng. Sáp ong trắng thu được bằng cách tẩy trắng sáp ong vàng dùng các chất oxy hóa như hydro peroxyd, acid sulfuric, hay ánh sáng mặt trời. Sáp ong là một hỗn hợp các ester của các acid béo và cồn béo, các hydrocarbon và acid béo tự do, và có một phần nhỏ các cồn béo tự do.

Mã số C.A.S.

8006-40-4 (sáp ong vàng)

8012-89-3 (sáp ong trắng)

3. Cảm quan

Sáp ong vàng: chất rắn màu vàng hoặc nâu sáng, khi lạnh thì dễ vỡ, khi vỡ tạo thành miếng mờ đục, dạng hạt, không có dạng tinh thể, ở nhiệt độ khoảng 35°C trở nên mềm dẻo. Có mùi đặc trưng của mật ong.

Sáp ong trắng: chất rắn màu trắng hay màu trắng ngà (lớp mỏng thường trong mờ), có mùi nhẹ đặc trưng của mật ong.

4. Chức năng

Chất làm bóng, chất giải phóng, chất ổn định, chất tạo kết cấu cho kẹo cao su, chất mang cho phụ gia thực phẩm (bao gồm mang hương và mang màu), chất làm đục.

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong nước, ít tan trong cồn, rất dễ tan trong ether.

5.2. Độ tinh khiết

Khoảng nóng chảy

62 – 65°C

Chỉ số acid

17 – 24

Chỉ số peroxyd

Không được quá 5,0. (xem mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chỉ số xà phòng hóa

87 – 104

Sáp carnauba

Đạt yêu cầu (xem mô tả trong phần phương pháp thử)

Ceresin, parafin và một số sáp khác

Đạt yêu cầu (xem mô tả trong phần phương pháp thử).

Chất béo, sáp Nhật bản, colophan và xà phòng

Đạt yêu cầu (xem mô tả trong phần phương pháp thử).

Glycerin và các polyol khác

Không được quá 0,5% (tính theo glycerin)

(xem mô tả trong phần phương pháp thử).

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Chỉ số peroxyd

Cân chính xác 5 g mẫu vào bình nón 200 mL. Thêm 30 mL dung dịch cloroform và acid acetic (TT) 2:3 và đập nút bình nón. Làm nóng mẫu trong nước ấm và xoáy tròn để hòa tan mẫu. Để nguội đến nhiệt độ phòng và thêm 0,5 mL dung dịch kali iodid bão hòa. Đậy bình nón bằng nút và lắc mạnh trong 60 ± 5 giây. Thêm 30 mL nước lắc đều và chuẩn độ ngay bằng dung dịch natri thiosulfat dùng chỉ thị hồ tinh bột (TT).

Tiến hành thêm trên một mẫu trắng.

$$\text{Chỉ số peroxyd} = \frac{(a - b) \times N \times 1000}{m}$$

Trong đó:

a = số mL natri thiosulfat dùng cho mẫu thử

b = số mL natri thiosulfat dùng cho mẫu trắng

N = nồng độ đương lượng của natri thiosulfat

m = khối lượng mẫu (g)

Sáp carnauba

Cân khoảng 100 mg mẫu thử vào một ống nghiệm, thêm 20 mL *n*-butanol. Nhúng ống nghiệm vào chậu nước đang sôi, lắc hỗn hợp nhẹ nhàng đến khi mẫu thử hòa tan hoàn toàn. Chuyển mẫu trong ống nghiệm vào một cốc có mỏ chứa nước ở 60°C, và để yên cho nước nguội xuống nhiệt độ phòng. Một khối xốp các tinh thể mịn giống hình kim tạo thành, tách khỏi lớp dung dịch mẹ trong suốt. Dưới kính hiển vi, các tinh thể xốp hình kim hoặc các búi hình sao, không có khối vô định hình, chứng tỏ không có sáp carnauba.

Ceresin, parafin và một số loại sáp khác

Cân 3,0 g mẫu vào một bình cầu đáy tròn 100 mL, thêm 30 mL dung dịch kali hydroxyd 4% (kl/tt) trong ethanol không chứa aldehyd và đun nhẹ dưới ống sinh hàn hồi lưu trong 2 giờ. Tháo bỏ ống sinh hàn, nhúng ngay vào đó một nhiệt kế. Ngâm bình vào chậu nước 80°C và để cho nguội, liên tục lắc xoay tròn bình. Không được có kết tủa trước khi nhiệt độ đạt đến 65°C, mặc dù dung dịch có thể trắng đục.

Chất béo, sáp Nhật bản, colophan và xà phòng

Đun 1 g mẫu với 35 mL dung dịch natri hydroxyd 1:7 trong 30 phút, giữ nguyên thể tích bằng cách thỉnh thoảng thêm nước, rồi để nguội hỗn hợp. Sáp sẽ tách ra, và dung dịch vẫn trong suốt. Lọc hỗn hợp lạnh và acid hóa dịch lọc bằng acid hydrocloric. Không có kết tủa tạo thành.

Glycerin và các polyol khác

Cho 0,20 g mẫu vào một bình cầu đáy tròn, thêm 10 mL dung dịch kali hydroxyd trong ethanol (TT), nối sinh hàn hồi lưu và đun trong một bình cách thủy trong 30 phút. Thêm 50 mL acid sulfuric loãng (TT), để nguội và lọc. Rửa bình và phễu lọc bằng acid sulfuric loãng (TT). Gộp dịch chiết và dịch rửa, pha loãng thành 100,0 mL acid sulfuric loãng (TT). Lấy 1,0 mL dung dịch vào một ống nghiệm, thêm 0,5 mL dung dịch natri periodat 1,07% (kl/tt) trong nước, lắc đều và để yên trong 5 phút. Thêm 1,0 mL dung dịch fuchsin đã làm mất màu (xem ở dưới), lắc đều. Kết tủa phải tan hết. Đặt ống vào một cốc có mỏ chứa nước ở 40°C. Để nguội, quan sát trong khoảng 10 – 15 phút. Nếu dung dịch chuyển thành màu tím xanh, màu phải không được đậm hơn màu dung dịch chuẩn pha đồng thời theo cách tương tự nhưng dùng 1,0 mL dung dịch glycerin 0,001% (kl/tt) trong acid sulfuric loãng (TT).

Dung dịch fuchsin được khử màu

Hòa tan 0,1 g fuchsin dạng base trong 60 mL nước. Thêm dung dịch gồm 1 g natri sulfit khan (tinh khiết thuốc thử) trong 10 mL nước. Thêm từ từ 2 mL acid hydrocloric, vừa thêm vừa lắc liên tục. Thêm nước đến đủ 100 mL. Để yên, tránh ánh sáng trong vòng ít nhất 12 giờ, loại màu bằng than hoạt tính và lọc. Nếu dung dịch trở nên đục, lọc trước khi dùng. Nếu sau khi để yên, dung dịch chuyển sang màu tím, loại màu lần nữa bằng than hoạt tính. Bảo quản tránh ánh sáng.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 2

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SÁP CANDELILLA

1. Tên khác, chỉ số

INS 902

2. Định nghĩa

Sáp candelilla thô thu được bằng cách đun sôi các nhánh khô của cây candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*) trong nước đã được acid hóa bằng acid sulfuric để giải phóng ra sáp. Sáp tan chảy này sau đó được loại béo và để cho đông đặc lại, tiếp theo được tinh chế bằng cách xử lý với acid sulfuric và qua các công đoạn ép - lọc.

Sáp candelilla về cơ bản chứa n-alkanes mạch lẻ (C_{29} đến C_{33}) với các ester của các acid và các rượu có mạch carbon chẵn (C_{28} đến C_{34}). Các acid tự do, rượu tự do, sterol, keo trung tính và các chất khoáng cũng có mặt.

Mã số C.A.S.	8006-44-8
3. Cảm quan	Dạng chất rắn, cứng, tròn, bóng màu nâu hơi vàng, có mùi thơm khi làm nóng.
4. Chức năng	Chất làm bóng, chất tạo kết cấu cho kẹo cao su, chất phủ bề mặt, chất mang cho phụ gia thực phẩm (bao gồm mang hương và mang màu), chất làm đực.
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước, tan trong toluen.
Độ hấp thụ hồng ngoại	Phổ hồng ngoại của mẫu thử, đã được làm tan chảy và chuẩn bị để phân tích trên một tấm kali bromid phải tương ứng với phổ hồng ngoại của sáp candelilla tiêu chuẩn (xem Phụ lục).
5.2. Độ tinh khiết	
Khoảng nhiệt độ tan chảy	68,5 ⁰ – 72,5 ⁰
Chỉ số acid	Từ 12 đến 22
Chỉ số xà phòng hóa	Từ 43 đến 65.
Chì	Không được quá 2 mg/kg.
6. Phương pháp thử	
Độ tinh khiết	
Chì	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 3

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SHELLAC

1. Tên khác, chỉ số	INS 904
2. Định nghĩa	Senlac là nhựa polyester thu được từ cánh kiến đỏ, chất nhựa tiết ra từ loài côn trùng Laccifer (Tachardia) lacca Kerr (Họ Coccidae). Senlac đã tẩy màu thu được nhờ quá trình hoà tan cánh kiến đỏ trong dung dịch Na ₂ CO ₃ trong nước, sau đó tẩy màu bằng natri hypochlorit, kết tủa cánh kiến đỏ đã tẩy màu bằng dung dịch H ₂ SO ₄ loãng và sấy khô; senlac đã tẩy màu không chứa sáp được điều chế bằng cách xử lý tiếp, theo đó sáp được tách ra bằng cách lọc.
Mã số C.A.S	9000-59-3
3. Cảm quan	Sellac đã tẩy màu: dạng nhựa hạt vô định hình có màu trắng tới vàng

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Phản ứng màu

nhạt;

Senlac đã tẩy màu không chứa sáp: dạng nhựa hạt vô định hình có màu vàng sáng.

Chất làm bóng, chất phủ bề ngoài

Độ tan

Phải có phản ứng màu đặc trưng.

Không tan trong nước; tan chậm trong ethanol; ít tan trong aceton và ether.

Chỉ số acid

60 – 89 (xem mô tả trong phần Phương pháp thử)

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô

Không được quá 6,0 % (sấy ở 40°C trong 4 giờ, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng trên silicagel trong 15 giờ)

Rosin

Đạt yêu cầu (xem mô tả trong phần Phương pháp thử).

Sáp

Senlac đã tẩy màu : không được quá 5,5% ; Senlac đã tẩy màu không có sáp: không được quá 0,2%

(xem mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Phản ứng màu

Cho vài giọt dung dịch chứa 1 g amoni molybdat trong 3 ml acid sulfuric vào 50 mg mẫu. Màu xanh lá cây được hình thành chuyển sang màu hoa cà khi dung dịch mẫu được trung hoà bằng dung dịch amoni hydroxyd 6N.

Chỉ số acid

Cân chính xác 1 g mẫu nghiền mịn và hoà trong 50 ml alcol trước đó đã được trung hoà bằng NaOH với chất chỉ thị phenolphthalein, và chuẩn độ bằng dung dịch KOH 0,1N. Xác định điểm kết thúc bằng cách sử dụng phenolphthalein TS hoặc dụng cụ đo điện thế. Nếu phenolphthalein được dùng, chuẩn độ cho đến khi màu hồng nhạt bền ít nhất trong 30 giây. Tính chỉ số acid bằng công thức:

$$\text{Chỉ số acid} = 56,1V \times N/W$$

Trong đó:

V: Thể tích dung dịch NaOH (ml)

N: Nồng độ dung dịch NaOH

W: Khối lượng mẫu (g) tính theo chất khô.

6.2. Độ tinh khiết

Rosin

Hoà tan 2 g mẫu trong 10 ml ethanol đã khử nước, và thêm từ từ 50 ml dung môi hexan vừa thêm vừa lắc. Chuyển hỗn hợp vào một phễu tách, rửa 2 lần 50 ml nước và loại bỏ nước rửa. Lọc lớp dung môi, cô đến khô và thêm 2 ml hỗn hợp gồm 1 phần thể tích phenol lỏng và 2 phần thể tích methylen chlorid vào phần cặn khô vừa cô được. Khuấy và chuyển một phần hỗn hợp vào hố rỗng của đĩa phản ứng màu. Làm đầy hố rỗng liền kề bằng hỗn hợp gồm 1 phần thể tích brom và 4 phần thể tích methylen clorid, đậy cả hai hố rỗng bằng một kính đồng hồ. Không có màu tím hoặc màu xanh indigo đậm được hình thành ở trong hoặc bên trên lớp dịch lỏng chứa cặn mẫu.

Sáp

Cân chính xác 10 g mẫu đã nghiền mịn và 2,5 g Na_2CO_3 vào cốc cao dung tích 200 ml. Thêm vào 150 ml nước nóng, ngâm cốc trong cách thủy sôi và khuấy cho đến khi mẫu được hoà tan. Đậy cốc bằng một kính đồng hồ, gia nhiệt trong 3 giờ không khuấy, sau đó làm nguội trong chậu nước lạnh. Khi sáp nổi lên bề mặt, lọc hỗn hợp qua giấy lọc không tro tốc độ trung bình, chuyển sáp sang giấy và rửa phễu lọc bằng nước. Rót 5 -10 ml ethanol vào phễu lọc để làm khô nhanh. Gói giấy vào một tờ giấy lọc rộng, buộc bằng một sợi dây nhỏ và làm khô bằng cách gia nhiệt nhẹ. Chiết bằng cloroform trong dụng cụ chiết xuất liên tục thích hợp trong 2 giờ, sử dụng bình đã làm khô và cân khối lượng trước để hứng sáp trích ly và dung môi. Cô dung môi, làm khô sáp ở 105°C cho tới khối lượng không đổi, tính % sáp.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 4

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI DẦU KHOÁNG

1. Tên khác, chỉ số

Liquid parafin, liquid petrolatum, food grade mineral oil, white mineral oil
INS 905a

2. Định nghĩa

Hỗn hợp của các hydrocarbon lỏng naphthalin và parafin đã tinh chế với điểm sôi trên 350°C ; thu được từ các công đoạn tinh chế dầu khoáng thô khác nhau (ví dụ: chưng cất, trích ly và kết tinh) và làm sạch tiếp bằng acid và/hoặc xử lý hydrogen hóa có xúc tác; có thể chứa các chất chống oxy hoá được chấp thuận dùng cho thực phẩm.

8012-95-1

Mã số C.A.S

3. Cảm quan

Dạng dầu lỏng không màu, trong suốt, phát ra huỳnh quang dưới ánh sáng ban ngày; không mùi

4. Chức năng

Chất làm bóng, chất chống dính, chất bôi trơn, chất phủ bảo vệ

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong nước, ít tan trong ethanol, tan trong ether

Đốt cháy

Đốt cháy tạo ra ngọn lửa sáng chói và có mùi giống mùi parafin

5.2. Độ tinh khiết

Độ nhớt ở 100°C

Không nhỏ hơn 11 cSt

Số carbon ở điểm chưng cất 5%

Không nhỏ hơn 28

Điểm sôi ở điểm chưng cất 5% cao hơn 422°C

Khối lượng phân tử trung bình

Không nhỏ hơn 500

Độ acid hoặc độ kiềm

Đạt yêu cầu.

Các chất dễ than hoá

Đạt yêu cầu.

Hydrocarbon đa vòng thơm

Đạt yêu cầu.

Parafin rắn

Đạt yêu cầu (xem mô tả trong phần Phương pháp thử).

Chì

Không được quá 1,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

Độ acid hoặc độ kiềm

Cho 20 ml nước sôi vào 10 ml mẫu và lắc mạnh trong 1 phút. Tách lớp dung dịch nước và lọc. Cho 0,1 ml dung dịch phenolphthalein TS vào 10 ml dung dịch lọc được. Dung dịch không màu. Không được quá 0,1 ml dung dịch NaOH 0,1N thêm vào để thay đổi thành màu hồng.

Các chất dễ dàng than hoá

Cho 5 ml mẫu vào ống thử có nắp thủy tinh trước đó đã được rửa sạch bằng hỗn hợp dịch rửa acid chromic. Thêm 5 ml dung dịch H₂SO₄ TS và gia nhiệt trong cách thủy sôi trong 10 phút. Sau khi để ống thử trong chậu trong 30 giây, lấy ra nhanh và trong khi đang nắp lắc 3 lần thật mạnh theo phương thẳng đứng với biên độ 10 cm. Lặp lại sau mỗi đợt 30 giây. Không được để ống thử ngoài cách thủy quá 3 giây cho mỗi lần lắc. Kết thúc sau 10 phút tính từ thời gian bắt đầu đặt ống thử vào cách thủy cho đến khi lấy ra khỏi cách thủy. Mẫu giữ nguyên màu và acid không trở nên sẫm màu hơn màu chuẩn được chuẩn bị bằng cách trộn trong một ống thử tương tự 3 ml sắt (III) clorid TSC, 1,5 ml cobalt clorid TSC và 0,5 ml CuSO₄, hỗn hợp này được phủ bằng 5 ml dầu khoáng bên trên.

Parafin rắn

Làm khô lượng mẫu thích hợp bằng cách gia nhiệt ở 100°C trong 2 giờ và làm nguội trong bình hút ẩm trên acid H₂SO₄ đậm đặc. Cho vào ống thủy tinh có đường kính trong khoảng 25 mm, đậy ống và ngâm ống vào trong chậu nước đá. Sau 4 giờ, chất lỏng tạo thành phải đủ trong để có thể nhìn thấy dễ dàng một vạch màu đen rộng 0,5 mm trên nền trắng giữ thẳng đứng ở phía sau ống thủy tinh.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 5

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SÁP VI TINH THỂ

1. Tên khác, chỉ số

Petroleum wax;

INS 905c

2. Định nghĩa

Sáp vi tinh thể là hỗn hợp tinh chế của các hydrocarbon bão hoà, rắn chủ yếu là parafin nhánh, thu được từ dầu mỏ.

3. Cảm quan

Dạng sáp không màu hoặc trắng, hơi trong mờ, không vị và không mùi

4. Chức năng	Chất gum cao su, chất phủ bảo vệ, chất chống tạo bọt, chất làm bóng
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Không tan trong nước, tan rất ít trong ethanol, ít tan trong diethyl ether và hexan.
<i>Chỉ số khúc xạ</i>	$n(100, D): 1,434 - 1,448$
<i>Phổ hấp thụ hồng ngoại</i>	Phổ hấp thụ hồng ngoại của mẫu nóng chảy và chuẩn bị trên một tấm caesi hoặc kali bromid tương ứng với phổ trong phần Phụ lục
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Độ nhớt ở 1000C</i>	Không được nhỏ hơn $11 \text{ mm}^2/\text{giây}$
	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
<i>Số carbon ở điểm chưng cất 5%</i>	Không được quá 5% các phân tử có số carbon nhỏ hơn 25
	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
<i>Khối lượng phân tử trung bình</i>	Không nhỏ hơn 500
	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
<i>Cặn sau khi nung</i>	Không được quá 0,1%
	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
<i>Màu sắc</i>	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
<i>Lưu huỳnh</i>	Không được quá 0,4%
	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
<i>Chì</i>	Không được quá 3,0 mg/kg.
<i>Hydrocarbon đa vòng thơm</i>	Mẫu thử phải đáp ứng các giới hạn hấp thụ tia cực tím khi tiến hành phân tích như được mô tả trong Phương pháp thử.

Bước sóng (nm)	Độ hấp thụ cực đại/chiều dài đường truyền (cm)
280 - 289	0,15
290 - 299	0,12
300 - 359	0,08
360 - 400	0,02

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

Độ nhớt ở 1000C (ASTM D 445 được chấp nhận với sự cho phép từ Sách thường niên Tiêu chuẩn ASTM bản quyền của Hiệp hội Mỹ về Thử nghiệm và Vật liệu, 100 Harbor Drive, West Conshohocken, PA 19.428 bản sao của tiêu chuẩn

ASTM hoàn chỉnh có thể được mua trực tiếp từ ASTM, điện thoại 610-832. - 9.585, fax: 610-832-9555, e-mail: service@astm.org,

website: <http://www.astm.org>)

Sử dụng nhớt kế mao quản thủy tinh, đã hiệu chỉnh và có khả năng đo độ nhớt động học với độ lặp lại chỉ có 1/20 trường hợp vượt quá 0,35%. Ngâm nhớt kế trong chậu chất lỏng nóng ở nhiệt độ $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ thích hợp đối với mẫu thử, đảm bảo trong suốt quá trình đo, lúc nào mẫu thử trong nhớt kế cũng ở dưới bề mặt chất lỏng trong chậu ít nhất là 20 mm. Cho mẫu vào nhớt kế theo cách chỉ dẫn thiết kế thiết bị. Giữ mẫu trong chậu khoảng 30 phút. Điều chỉnh thể tích mẫu đến vạch qui định theo thiết kế của nhớt kế. Dùng áp lực điều chỉnh mức trên cùng của mẫu đến vị trí cách phía trên của vạch mức thứ nhất khoảng 5 mm trong nhánh mao quản của thiết bị. Cho mẫu chảy tự do, đo, thời gian cần thiết cho mặt khum của chất lỏng chuyển từ vạch định mức thứ nhất đến vạch định mức thứ hai. Thời gian đo được tính bằng giây với sai lệch $\pm 0,2$ giây. Nếu thời gian nhỏ hơn 200 giây, chọn nhớt kế có mao quản có đường kính nhỏ hơn và lặp lại cách làm. Đo thời gian chảy lần hai. Nếu cả hai lần đo có sai số trong khoảng 0,2%, độ nhớt động học được tính bằng giá trị trung bình. Nếu cả hai lần đo không tương đồng thì lặp lại cách xác định sau khi làm sạch và làm khô cẩn thận nhớt kế.

$$\text{Độ nhớt ở } 100^{\circ}\text{C (mm}^2/\text{giây)} = C \times t$$

Trong đó:

C: Hệ số hiệu chỉnh nhớt kế ($\text{mm}^2/\text{giây}$)

t: thời gian chảy (giây)

Số carbon ở điểm chung cất 5%

“Số carbon” là số nguyên tử carbon trong một phân tử. Xác định số carbon có trong mẫu bằng sắc ký khí. Dưới đây chỉ ra một số điều kiện hoạt động điển hình để xác định đến số carbon đến 45.

Chiều dài cột (m)	25	30	15
Đường kính trong (mm)	0,32	0,53	0,25
Pha tĩnh	DB-1 methyl silicon	RTX-1 methyl silicon	DB-5 5% phenyl methyl silicon
Độ dày lớp phim mỏng (μm)	0,25	0,25	0,25
Khí mang	heli	heli	heli
Tốc độ dòng (ml/phút)	1,56	5,0	2,3
Tốc độ tuyến (cm/giây)	33	35	60
Chương trình nhiệt độ			
Nhiệt độ ban đầu	80°C	80°C	80°C
Tốc độ nâng nhiệt ($^{\circ}/\text{phút}$)	10	8	5
Nhiệt độ cuối cùng	380°C	340°C	350°C
Kỹ thuật bơm	nguồn trên cột	nguồn trên cột	nguồn trên cột
Detector	FID	FID	FID

Nhiệt độ	380°C	340°C	375°C
Dung tích mẫu (µl)	1,0	1,0	1,0

Lưu ý: Bằng cách tối ưu hoá chiều dài cột tách và/hoặc nhiệt độ cột, các loại sáp với số carbon cao hơn 45 cũng có thể phân tích được.

Các chuẩn để hiệu chuẩn và định tính:

Các mẫu chuẩn của paraffin thông thường bao phủ khoảng số carbon của mẫu có độ tinh khiết lớn hơn 95%.

Chuẩn tuyến tính

Chuẩn bị một hỗn hợp đã biết khối lượng của các n – parafin có chuỗi carbon C₁₆ – C₆₅, hoà tan hỗn hợp trong cyclohexan. Sử dụng những lượng tương đương của mỗi loại parafin đã cân chính xác đến 1%. Các dung dịch có nồng độ 0,01 % (tính theo khối lượng) có thể được sử dụng. Không nhất thiết phải bao gồm mọi n-parafin trong hỗn hợp này miễn là nó chứa C₁₆, C₄₄, và cả C₆₀ nếu xác định số lượng carbon cao hơn liên quan) và ít nhất một trong mỗi n - parafin thứ tư. Chất chuẩn này phải được đậy chặt để ngăn ngừa thất thoát dung môi.

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc chứa 0,5% (theo khối lượng w/w) n – C₁₆ trong n – hexan (độ tinh khiết tối thiểu 98%) bằng cách cân chính xác 0,4 g n – C₁₆ cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Thêm 100 ml cyclohexan và cân lại. Ghi khối lượng n – C₁₆ (W_{ISTD}) tới trong khoảng 0,001 g và khối lượng của dung dịch gốc (W_S) tới trong khoảng 0,1 g. Chuẩn bị dung dịch nội chuẩn loãng bằng cách pha một phần dung dịch gốc với 99 phần cyclohexan. Tính nồng độ dung dịch nội chuẩn theo công thức sau:

$$C_{IST} = \frac{W_{ISTD}}{W_S} \times \frac{100}{100} \% (w/w)$$

Trong đó:

C_{ISTP}: Nồng độ của n – C₁₆ trong dung dịch nội chuẩn loãng (% theo khối lượng)

W_S: Khối lượng dung dịch gốc (g)

Kiểm tra mẫu trắng:

Bơm 1 µl dung môi. Không có pick nào được phát hiện trong khoảng thời gian lưu mà sáp rửa giải.

Độ phân giải cột:

Bơm 1 µl dung dịch 0,05% mỗi n – C₂₀ và n – C₂₄ trong cyclohexan. Độ phân giải cột R không được nhỏ hơn 30 được tính toán theo công thức sau:

$$R = \frac{2d}{1.699 (W_1 + W_2)}$$

Trong đó:

d: Khoảng cách giữa cực đại pic của n – C₂₀ và n – C₂₄ (mm)

W₁: Pic bằng một nửa chiều cao của n – C₂₀ (mm)

W_2 : Pic bằng một nửa chiều cao của $n - C_{24}$ (mm)

Độ tuyến tính:

Phân tích chuẩn tuyến tính. Các hệ số đáp ứng khối lượng tính toán liên quan đến hexadecan phải trong khoảng 0,90 – 1,10.

Độ lặp lại thời gian lưu:

Phân tích chuẩn tuyến tính 2 lần. Các thời gian lưu đối với phân tích 2 lần phải không chênh lệch hơn 0,1 phút.

Hiệu chuẩn đối với xác định n – parafin:

Xác định thời gian lưu của từng n – parafin trong chuỗi $C_{16} - C_{44}$ (hoặc C_{60} nếu xác định số carbon cao hơn liên quan) bằng cách bơm lượng nhỏ của mỗi parafin hoặc riêng biệt hoặc trong hỗn hợp đã biết trước.

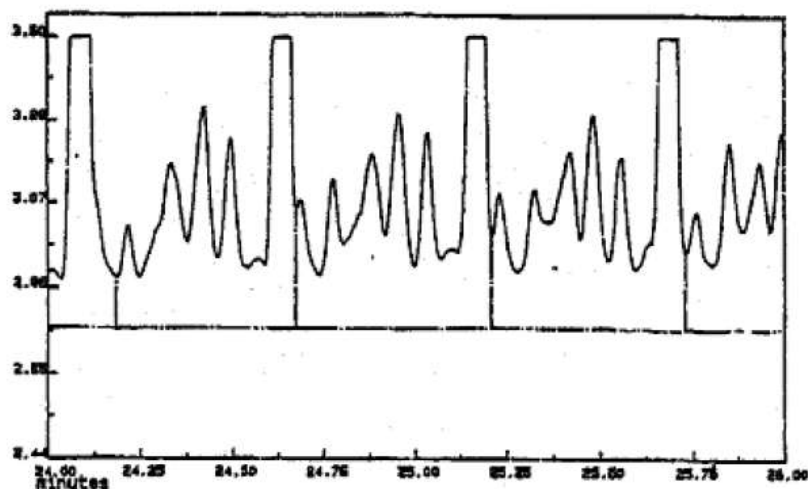
Lấy mẫu:

Gia nhiệt mẫu tại nhiệt độ cao hơn 10°C so với nhiệt độ sáp được nấu chảy hoàn toàn. Trộn đều bằng cách khuấy... sử dụng ống nhỏ giọt sạch, nhỏ một vài giọt lên trên mặt tấm lá nhôm sạch, để đông đặc và bẻ thành từng miếng. Lá nhôm thường có chứa sẵn một màng mỏng bằng dầu. Trước khi sử dụng, dầu này phải được loại bỏ bằng cách rửa lá nhôm bằng các dung môi như hexan hoặc cồn khoáng.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 0,01 g mẫu ($W_{\text{mẫu}}$) thu được theo mô tả trong phần lấy mẫu, cho vào một lọ thủy tinh có dung tích 15 ml. Thêm khoảng 12 ml dung dịch nội chuẩn loãng, đậy nắp lọ và cân chính xác khối lượng của dung dịch nội chuẩn pha loãng thêm vào (W_{INSTD}). Lắc lọ cho đến khi sáp hoà tan hoàn toàn, sử dụng cách gia nhiệt nhẹ nếu cần thiết.

Bơm 0,5 – 1,0 μl dung dịch mẫu. Ghi lại sắc ký đồ và lưu giữ tín hiệu detector. Pic từ dung dịch nội chuẩn phải được phân giải hoàn toàn khỏi diện tích mẫu sáp. Dựa vào thời gian lưu như thu được trong phần Hiệu chuẩn đối với xác định n – parafin, định tính các pic parafin. Sử dụng vạch thẳng đứng lên đường nền nằm ngang, lấy tích phân tín hiệu của detector. Tổng cộng diện tích của tất cả các pic của mỗi số carbon. Theo quy ước, các pic gán số carbon n là những pic rửa giải giữa thung lũng ngay pic parafin (C_{n-1}) và thung lũng tương ứng tiếp sau pic parafin (C_n).



Hình 1: Tổng số carbon (sắc ký đồ với đường nền nằm ngang)

Tính kết quả:

Đối với mỗi số carbon, hàm lượng tính theo % khối lượng được tính theo công thức sau:

$$C_i = \frac{A_i}{A_{ISTD}} \times RRF_i \times \frac{W_{ISTD}}{W_{mẫu}} \times C_{ISTD}$$

Trong đó:

C_i : Hàm lượng hydrocarbon có số carbon i (% theo khối lượng)

A_i : Tổng diện tích của các hydrocarbon với số carbon i

A_{ISTD} : Diện tích của peak nội chuẩn $n - C_{16}$

RRF_i : Hệ số đáp ứng liên quan đến $n - C_{16}$

W_{ISTD} : Khối lượng dung dịch nội chuẩn loãng

$W_{mẫu}$: Khối lượng mẫu sáp

C_{ISTD} : Nồng độ $n - C_{16}$ trong dung dịch nội chuẩn loãng

Hàm lượng tổng hợp của các thành phần có số carbon nhỏ hơn 25 không được quá 5%.

Khối lượng phân tử trung bình

Sử dụng phân bố số carbon thu được trong phần thử về "Số carbon tại điểm chưng cất 5%" tính khối lượng phân tử trung bình theo công thức sau:

$$\frac{\sum_{i=17}^{i=25} C_i (14i+2)}{100}$$

Trong đó:

i : Số carbon

C_i : Hàm lượng các thành phần có số carbon i (%)

Cặn sau khi nung

Cân chính xác 2 g mẫu cho vào đĩa sứ hoặc platin đã biết khối lượng và gia nhiệt trên ngọn lửa. Mẫu bay hơi mà không thoát ra mùi hăng. Nung ở nhiệt độ không quá sắc đỏ tối cho đến khi không còn carbon. Làm nguội trong bình hút ẩm và cân.

Màu sắc

Làm tan chảy khoảng 10 g mẫu trong chậu hơi nước và cho 5 ml chất lỏng vào ống thử vi sinh bằng thủy tinh sạch, kích thước 16 x 150 mm: chất lỏng được làm ấm, tan chảy không được sẫm màu hơn dung dịch được tạo ra bằng cách trộn hỗn hợp gồm 3,8 ml sắt (III) clorid TS (FNP 5) và 1,2 ml cobal clorid TS (FNP 5) trong ống thử tương tự, so sánh hai ống bằng phản chiếu ánh sáng tương phản với nền màu trắng, các ống thử được giữ trực tiếp tương phản với nền ở một góc mà không có huỳnh quang.

Lưu huỳnh

(ASTM D 2622 Xem phép thử đối với Độ nhớt ở 100°C về Bản quyền cho phép)

Xác định bằng phép đo phổ tia X sử dụng các điều kiện sau:

Dụng cụ, thiết bị:

- Máy quang phổ tia X được trang bị để phát hiện tia mềm trong dải 537 Å.
- Đường truyền quang của heli
- Thiết bị phân tích chiều cao xung hoặc các thiết bị phân biệt năng lượng khác
- Detector được thiết kế để phát hiện các tia X bước sóng dài

Tinh thể phân tích phù hợp với độ tán sắc của tia X K_{α} lưu huỳnh trong khoảng góc của thiết bị quang phổ được sử dụng. Pentaerythritol và germani là phổ biến nhất mặc dù những chất ít phản chiếu hơn như EDDT, ADP và thạch anh có thể được dùng.

Ống tia X phát bức xạ K_{α} lưu huỳnh.

Ống tia X với mục tiêu vonfram, platin hoặc crom.

Độ nhạy chuẩn:

Các chất petroleum lỏng chứa lưu huỳnh ở các nồng độ xấp xỉ khoảng giữa đồ thị hiệu chuẩn được sử dụng cho phép thử.

Chuẩn hiệu chỉnh:

Chuẩn bị chuẩn hiệu chỉnh bằng cách pha cẩn thận lượng di-n-butyl sulfid (chuẩn tinh khiết cao với một phân tích được chứng nhận, sản xuất đặc biệt như một chất hiệu chỉnh cho phương pháp này, luôn có sẵn của Công ty Philips Petroleum, Bartlesville, OK, Mỹ) với dầu trắng (chứa nhỏ hơn 5 mg/kg). Các nồng độ chuẩn chính xác được chuẩn bị gồm 0,1; 0,25; 0,5 và 1,0% (theo trọng lượng).

Đường chuẩn:

Đo bức xạ lưu huỳnh phát ra thực từ mỗi chuẩn hiệu chỉnh. Vẽ đồ thị cường độ, dưới dạng số đếm thực trên giây, với nồng độ lưu huỳnh.

Để duy trì giá trị đường chuẩn với sự thay đổi nhỏ về độ nhạy các thiết bị, đo độ nhạy chuẩn tại các khoảng thời gian thường xuyên trong các ngày chạy. Thiết lập tỷ lệ tính của chuẩn này bằng cách đo độ nhạy của chúng tại các khoảng thời gian thường xuyên trong quá trình chuẩn bị đường hiệu chuẩn. Tính hệ số hiệu chỉnh đối với các thay đổi độ nhạy của thiết bị hàng ngày bằng công thức sau:

$$F = \frac{A}{B}$$

Trong đó:

A: Số đếm của độ nhạy chuẩn được xác định tại thời điểm hiệu chỉnh

B: Số đếm của độ nhạy chuẩn được xác định tại thời gian phân tích

Cách tiến hành:

Đặt mẫu trong cốc đo thích hợp. Mặc dù bức xạ lưu huỳnh xuyên qua chỉ một khoảng nhỏ trong mẫu, phân tán từ cốc mẫu và mẫu có thể khác nhau đến mức mà một lượng cụ thể hoặc một lượng tối thiểu mẫu phải được sử dụng.

Đặt mẫu trong chùm tia X và cho phép khí quyển quang học tia X để đến trạng thái cân bằng. Xác định cường độ của bức xạ K_{α} lưu huỳnh tại 5,373 Å bằng cách đo tốc độ đếm tại những chỗ góc chính xác đặt cho

bước sóng này. Đo tốc độ đếm nền tại 5,190 Å.

Tính kết quả:

Hàm lượng lưu huỳnh trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$R = \left[\frac{C_K}{S_1} - \frac{C_B \times F'}{S_2} \right] \times F$$

Trong đó:

R: Tốc độ đếm thực đã được hiệu chỉnh

C_K: Tổng số đếm thu được tại 5,373 Å đối với mẫu

S₁: Thời gian cần thiết để thu được các số C_K (giây)

C_B: Tổng số đếm thu được tại 5,190 Å đối với nền

S₂: Thời gian cần thiết để thu được các số C_B (giây)

F': Tốc độ đếm tại 5,373 Å / tốc độ đếm tại 5,190 Å đối với mẫu không chứa lưu huỳnh

F: Hệ số hiệu chỉnh đối với các thay đổi độ nhạy thiết bị hàng ngày.

Sử dụng tốc độ đếm thực đã hiệu chỉnh, đọc nồng độ lưu huỳnh từ đường chuẩn.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

Hydrocarbon đa vòng thơm

Hướng dẫn chung:

Do độ nhạy của phép thử, khả năng sai số phát sinh từ nhiễm bẩn là khá lớn. Điều quan trọng nhất là tất cả dụng cụ thủy tinh phải được cọ rửa sạch nghiêm ngặt để loại bỏ tất cả các chất hữu cơ như dầu, mỡ, dư lượng chất tẩy rửa,... Kiểm tra tất cả dụng cụ thủy tinh, bao gồm cả nút và các van, dưới ánh sáng tử ngoại để phát hiện bất kỳ ô nhiễm huỳnh quang còn sót lại. Như một biện pháp đề phòng, khuyến nghị thực hành rửa tất cả dụng cụ thủy tinh với isooctane tinh khiết ngay trước khi sử dụng. Không sử dụng bất kỳ mỡ bôi trơn nào hoặc khớp nối. Hết sức cẩn thận để tránh ô nhiễm các mẫu sáp trong việc xử lý và để đảm bảo không có bất kỳ chất không liên quan phát sinh từ bao bì không thích hợp là điều cần thiết. Bởi vì một số các hydrocarbon đa vòng tìm được trong thử nghiệm này rất dễ bị oxy hóa bởi ánh sáng, toàn bộ quy trình phải được thực hiện dưới ánh sáng dịu.

Thiết bị, dụng cụ:

- Phễu chiết: dung tích 250 ml, 500 ml, 1.000 ml và tốt nhất là loại có dung tích 2.000 ml, có khoá van bằng polymer tetrafluoroethylen.

- Bình chứa: dung tích 500 ml, được trang bị một khớp nối thon chuẩn 24/40 nối tại đáy bình và một khớp nối cầu ở trên đỉnh bình để nối với nguồn cung cấp nitrogen. Khớp nối thích hợp phải được trang bị các móc thủy tinh.

- Cột sắc ký: dài 180 mm, đường kính trong 15,7 ±0,1 mm, được trang bị

với một đĩa thủy tinh xốp thô, khoá van polymer tetrafluoroethylen và một khớp nối thon chuẩn 24/40 có lỗ để lắp ở vị trí cuối đối diện. (chiều dài toàn bộ của cột với khớp nối có lỗ để lắp là 235 mm).

- Đĩa: được làm bằng polymer tetrafluoroethylen đường kính 2 inch, dày 3/16 inch có lỗ ở giữa để vừa khít thân cột sắc ký.

- Áo gia nhiệt: hình nón, dùng cho phễu chiết dung tích 500 ml. (Được sử dụng với bộ kiểm soát biến nhiệt).

- Bình hút: Bình lọc dung tích 250 ml hoặc 500 ml.

- Ống sinh hàn: khớp nối 24/40, nối với ống khô, chiều dài không bắt buộc

- Bình cô (không bắt buộc): Tất cả bình thủy tinh dung tích 250 ml hoặc 500 ml được trang bị với nắp đáy thon chuẩn có ống dẫn vào và ra cho phép nitrogen qua ngang bề mặt của chất lỏng được cô.

- Dụng cụ chưng cất chân không: tất cả bằng thủy tinh (để làm sạch dimethyl sulfoxid); bình cất dung tích 2 lít có áo gia nhiệt; sinh hàn Vigreux được bao chân không (hoặc tương đương) có chiều dài khoảng 45 cm và đầu chưng cất nối với ống sinh hàn có thể chia nhánh lạnh. Dùng polymer tetrafluoroethylen bọc ngoài các khớp nối thủy tinh để ngăn đóng băng. Không được sử dụng mỡ ở các khoá van hoặc các khớp nối.

- Các cổng đo quang phổ: các cổng đo làm từ thạch anh nấu chảy, chiều dài đường truyền quang $5,0 \pm 0,005$ cm; một loại cổng đo khác chỉ để kiểm tra hiệu suất của thiết bị quang phổ, có chiều dài đường truyền quang học $1,000 \pm 0,005$ cm. Với nước cất trong các cổng đo, xác định xem có chênh lệch độ hấp thụ hay không.

- Thiết bị quang phổ: Dải quang phổ 250 – 400 nm với chiều rộng khe phổ 2 nm hoặc nhỏ hơn, theo các điều kiện hoạt động của thiết bị để đo độ hấp thụ, thiết bị quang phổ cũng phải đáp ứng các yêu cầu thực hiện sau đây:

Độ lặp lại hấp thụ : $\pm 0,01$ tại độ hấp thụ 0,4

Độ chính xác hấp thụ : $\pm 0,05$ tại độ hấp thụ 0,4

Độ lặp lại bước sóng: $\pm 0,2$ nm

Độ chính xác bước sóng: $\pm 1,0$ nm

- Bình khí nitrogen: nitrogen tinh khiết trong bình khí nén được trang bị bộ điều áp và van để kiểm soát dòng khí tại 5 p.s.i.g.

Nguyên vật liệu và hoá chất:

- Dung môi hữu cơ: Tất cả dung môi được sử dụng trong qui trình phải phù hợp với các đặc tính kỹ thuật và phép thử được mô tả trong phần các đặc tính kỹ thuật này. Isooctan, benzen, acetone và methyl alcol được chỉ rõ trong danh sách dưới đây sẽ phải qua phép thử sau:

Cho lượng dung môi xác định vào trong bình tam giác dung tích 250 ml. thêm vào 1 ml n – hexadecan tinh khiết và cô trên chậu hơi nước dưới dòng nitrogen (áo lá nhôm rời bao quanh bình sẽ làm tăng tốc độ cô). Ngừng cô khi còn lại không quá 1 ml cặn. (Cho một phần 10 ml isooctan tinh khiết vào cặn từ benzen, cô lại và lặp lại một lần nữa để đảm bảo đã loại hoàn toàn benzen).

Cách khác, thời gian cô có thể giảm bằng cách sử dụng bình cô tùy chọn. Trong trường hợp này dung môi và n – hexadecan được cho vào trong bình đặt trong nồi cách thủy, lắp hệ thống ống và một dòng nitrogen được

cho vào qua đường ống vào trong khi đường ống ra được nối với một bể dung môi và đường chân không như là cách để ngăn bất kỳ dòng ngưng nào quay ngược lại vào bình.

Hoà tan 1 ml cặn hexadecan trong isooctan và định mức tới vạch. Đo độ hấp thụ trong ống đo có chiều dài đường truyền 5 cm so với isooctan làm đối chứng. Độ hấp thụ dung dịch của cặn dung môi (trừ methyl alcol) không vượt quá 0,01/cm chiều dài đường truyền trong khoảng bước sóng 280 nm và 400 nm. Đối với methyl alcol, độ hấp thụ phải bằng 0.

- Isooctan (2,2,4 – trimethylpentan): Dùng 180 ml cho phép thử được miêu tả trong đoạn trước. Làm sạch nếu cần bằng cách cho qua cột chứa silica gel đã hoạt hoá (loại 12, Công ty hoá chất Davison, Baltimore, Maryland, hoặc tương đương) có chiều dài khoảng 90 cm và đường kính 5 – 8 cm.

- Benzen tinh khiết: Dùng 150 ml cho phép thử. Làm sạch nếu cần bằng chưng cất hoặc bằng cách khác.

- Aceton tinh khiết: Dùng 200 ml cho phép thử. Làm sạch nếu cần bằng chưng cất.

- Hỗn hợp rửa giải:

+ Benzen 10% trong isooctan: Dùng pipet lấy 50 ml benzen cho vào bình định mức có nắp đậy thuỷ tinh dung tích 500 ml, điều chỉnh đến thể tích 500 ml bằng isooctan và lắc đều.

+ Benzen 20% trong isooctan: Dùng pipet lấy 50 ml benzen cho vào bình định mức có nắp đậy thuỷ tinh dung tích 250 ml, điều chỉnh đến thể tích 250 ml bằng isooctan và lắc đều.

+ Hỗn hợp aceton – benzen – nước: Cho 20 ml nước vào 380 ml aceton và 200 ml benzen, và trộn đều.

- n – hexadecan, 99% không có olefin: Pha 1 ml n – hexadecan đến thể tích 25 ml bằng isooctan và đo độ hấp thụ trong ống đo 5 cm so với isooctan làm đối chứng ở giữa 280 – 400 nm. Độ hấp thụ trên một cm đường truyền không vượt quá 0. Làm sạch nếu cần bằng lọc thẩm qua silicagel đã hoạt hoá hoặc bằng chưng cất.

- Methyl alcol tinh khiết: Dùng 10,0 ml methyl alcol. Làm sạch nếu cần bằng chưng cất.

- Dimethyl sulfoxid: tinh khiết, trong, màu trắng nước, nhiệt độ nóng chảy thấp nhất 18°C.

Pha 120 ml dimethyl sulfoxid với 240 ml nước cất trong phễu chiết dung tích 500 ml, lắc đều và để nguội trong 5 -10 phút. Thêm 40 ml isooctan vào dung dịch và chiết bằng cách lắc phễu mạnh trong 2 phút. Hút lớp nước phía dưới vào phễu chiết thứ hai có dung tích 500 ml và lặp lại quá trình tách với 40 ml isooctan. Hút và loại bỏ lớp tan trong nước. Rửa mỗi phần chiết được 40 ml ba lần bằng các phần 50 ml nước cất. Thời gian lắc cho mỗi lần rửa là 1 phút. Loại bỏ các lớp tan trong nước. Lọc phần chiết đầu tiên qua Na_2SO_4 khan đã được rửa bằng isooctan (xem Na_2SO_4 khan trong phần “Nguyên vật liệu và hoá chất” đối với chuẩn bị phễu lọc) vào trong bình tam giác hoặc bình cô tùy chọn. Rửa phễu chiết thứ nhất bằng phần chiết 40 ml isooctan thứ hai và lọc qua Na_2SO_4 vào trong bình. Sau đó rửa lần lượt phễu chiết thứ hai và thứ nhất bằng 10 ml isooctan, và cho dung môi qua Na_2SO_4 vào trong bình. Thêm 1 ml n – hexadecan và cô isooctan trên cách thủy có đuôi hơi bằng khí nitrogen. Ngưng cô khi không quá 1 ml cặn còn lại. Cho 10 ml isooctan vào cặn và lại cô tới khi còn 1 ml hexadecan. Lặp lại, cho 10 ml isooctan vào cặn và

cô tới 1ml hexadecan để đảm bảo loại bỏ hoàn toàn tất cả các chất bay hơi. Hoà tan 1 ml hexadecan trong isooctan vừa đủ 25 ml. Đo độ hấp thụ trong các ống đo có chiều dài đường truyền 5 cm so với isooctan là đối chứng.

Độ hấp thụ của dung dịch không được quá 0,02/cm chiều dài đường truyền trong dải 280 – 400 nm. (Chú ý: Việc khó đáp ứng đặc tính hấp thụ này có thể là do các tạp chất hữu cơ trong nước cất. Sự lặp lại của phép thử không có dimethyl sulfoxid sẽ phát hiện ra chúng. Nếu cần thiết để đáp ứng các đặc điểm kỹ thuật, làm sạch nước bằng chưng cất lại, cho chảy qua một loại nhựa trao đổi ion, hoặc bằng cách khác).

Làm sạch nếu cần thiết bằng cách sau: Cho 6 ml dung dịch H_3PO_4 và 50 g Norit A (carbon khử màu, kiềm) hoặc tương đương vào 1,5 lít dimethyl sulfoxid trong bình có nắp đậy thủy tinh dung tích 2 lít. Đậy nắp bình và dùng máy khuấy từ (thanh khuấy bọc polymer tetrafluoroethylen) khuấy dung môi trong 15 phút. Lọc dimethyl sulfoxid qua bốn lớp giấy có rãnh (18,5 cm) (Schleicher & Schuell số 597 hoặc tương đương). Nếu dịch lọc thu được chứa bột carbon, lọc lại theo giống cách trên cho đến khi dịch lọc thu được trong. Bảo quản sulfoxid tránh không khí và ẩm trong suốt quá trình này bằng cách phủ lên dung môi trong phễu và bình thu bằng một lớp isooctan. Chuyển phần lọc được vào phễu chiết dung tích 2 lít và hút ra dimethyl sulfoxid cho vào bình dung tích 2 lít của thiết bị chưng cất chân không và cất ở áp suất khoảng 3 mmHg hoặc thấp hơn. Loại bỏ phần phân đoạn 200 ml đầu của dung dịch chưng cất được và thay bình hứng dịch chưng cất được bằng một bình sạch. Tiếp tục chưng cất cho đến khi thu được khoảng 1 lít sulfoxid. Khi hoàn tất quá trình chưng cất, chất phản ứng cần phải được bảo quản trong các chai có nắp đậy thủy tinh vì nó dễ hút ẩm và phản ứng với một số dụng cụ chứa bằng kim loại khi có mặt của không khí.

- H_3PO_4 tinh khiết 85%

- Natri borohydrid 98%

- MgO (Sea Sorb 43, Công ty thiết bị thực phẩm, chi nhánh Westvaco, được phân phối bởi các hãng hoá chất, hoặc tương đương): Cho 100 g MgO vào một cốc lớn, thêm vào 700 ml nước cất tạo thành một chất sền sệt loãng, gia nhiệt trên cách thủy trong 30 phút và thỉnh thoảng khuấy. Lúc đầu khuấy đều đảm bảo tất cả các cấu tử MgO đều được thấm nước. Sử dụng phễu Buchner và giấy lọc có đường kính phù hợp, lọc hút. Tiếp tục lọc hút cho đến khi nước không còn chảy nhỏ giọt từ phễu nữa. Chuyển chất hấp thụ sang một máng thủy tinh được lót bằng lá nhôm (đã loại hết dầu chống dính). Làm vỡ magnesi bằng thìa sạch và trải chất hấp thụ này trên tấm lá nhôm một lớp dày 1 – 2 cm. Sấy ở $160 \pm 1^\circ C$ trong 24 giờ. Giã nhỏ magnesi bằng cối giã và chày. Rây chất hấp thụ được giã qua kích thước rây 60 – 180 mesh. Dùng magnesi còn lại trên rây 180 mesh.

- Celite 545 (Công ty Johns – Manville, đất tảo cát, hoặc tương đương)

- Hỗn hợp MgO – Celite 545 (2 + 1) theo khối lượng: Cho 2 phần MgO (60 – 180 mesh) và 1 phần Celite 545 theo khối lượng lần lượt vào bình thủy tinh có nắp đậy đủ lớn để trộn cho phù hợp. Lắc mạnh trong 10 phút. Chuyển hỗn hợp sang một máng thủy tinh được lót bằng lá nhôm (đã loại hết dầu chống dính) và trải hỗn hợp trên tấm lá nhôm một lớp dày 1 – 2 cm. Lại gia nhiệt hỗn hợp ở $160 \pm 1^\circ C$ trong 2 giờ và bảo quản trong bình đã được đậy chặt.

- Na_2SO_4 khan, tinh khiết, tốt nhất dùng ở dạng hạt: Đối với mỗi bình chứa

Na_2SO_4 tinh khiết được sử dụng, thiết lập như sau, rửa trước Na_2SO_4 cần thiết để cung cấp các bộ lọc như yêu cầu trong phương pháp: Cho khoảng 35 g Na_2SO_4 khan vào trong phễu thủy xốp thô có dung tích 30 ml hoặc phễu lọc dung tích 65 ml có chốt bông thủy tinh; rửa lần lượt các phần 15 ml dung môi chỉ định cho đến khi phần rửa 15 ml có độ hấp thụ bằng 0/cm chiều dài đường truyền tại bước sóng 280 – 400 nm khi được đo như mô tả trong phần “Dung môi hữu cơ”. Thường dùng 3 phần của dung môi rửa là đủ.

Cách tiến hành:

Trước khi thực hiện phân tích mẫu, đo độ hấp thụ trong cốc đo có chiều dài đường truyền 5 cm tại dải bước sóng 250 – 400 nm đối với mẫu trắng bằng cách thực hiện cách tiến hành, không có mẫu sáp, ở nhiệt độ phòng, ghi phổ sau giai đoạn chiết và sau khi hoàn thành cách tiến hành như mô tả. Độ hấp thụ trên 1 cm chiều dài đường truyền sau giai đoạn chiết không được quá 0,04 tại khoảng bước sóng 250 – 400 nm; Độ hấp thụ trên 1 cm chiều dài đường truyền sau hoàn thành cách tiến hành không được quá 0,07 tại khoảng bước sóng 250 – 299 nm, và cũng không vượt quá 0,045 tại khoảng bước sóng 300 – 400 nm. Nếu trong cả hai phổ xuất hiện pic của benzen đặc trưng trong vùng 250 – 260 nm, loại bỏ benzen bằng cách tiến hành trong phần “Dung môi hữu cơ” và ghi lại độ hấp thụ.

Cho 300 ml dimethyl sulfoxid vào trong phễu chiết dung tích 1 lít và thêm vào 75 ml H_3PO_4 . Lắc đều các thành phần trong phễu và để yên trong 10 phút. (Phản ứng giữa sulfoxid và acid toả nhiệt. Xả áp sau khi lắc, sau đó đóng nắp phễu lại). Thêm vào 150 ml isooctan và lắc đều các dung môi. Hút ra từng lớp riêng biệt và giữ trong các bình thủy tinh có nắp đậy.

Cho 1 kg mẫu đại diện của sáp, hoặc nếu lượng này không có đủ thì cho toàn bộ mẫu vào trong một cốc có dung tích gấp khoảng ba lần thể tích của mẫu và gia nhiệt trên cách thủy sôi, thỉnh thoảng khuấy cho đến khi sáp nóng chảy hoàn toàn và đồng nhất. Cân bốn phần $25 \pm 0,2$ g sáp nóng chảy cho vào các cốc dung tích 100 ml riêng biệt. Dự trữ ba trong bốn phần để phân tích lặp sau nếu cần. Đổ một phần mẫu đã biết khối lượng ngay sau khi nóng chảy lại trên cách thủy sôi vào phễu chiết dung tích 500 ml có chứa 100 ml hỗn hợp sulfoxid và H_3PO_4 đã cân bằng trước, gia nhiệt trong áo nhiệt ở nhiệt độ vừa đủ cao để làm nóng chảy sáp. (Chú ý: Trong quá trình gia nhiệt trước hỗn hợp sulfoxid và acid, định kỳ mở nắp đậy của phễu chiết để giảm áp suất).

Nhanh chóng hoàn thành việc chuyển mẫu vào phễu trong áo gia nhiệt với các phần isooctan cân bằng trước, làm ấm cốc nếu cần thiết, và sử dụng tổng thể tích 50 ml dung môi. Nếu sáp tách ra khỏi dung dịch trong toàn bộ cách làm này, để phễu chiết đóng nắp ở trong áo gia nhiệt cho đến khi sáp tan lại hoàn toàn. (Định kỳ mở nắp đậy của phễu chiết để giảm áp suất).

Khi sáp chảy tan thành dung dịch, lấy phễu chiết ra khỏi áo gia nhiệt và lắc mạnh trong 2 phút. Chuẩn bị sẵn 3 phễu chiết dung tích 250 ml với mỗi phễu chứa 30 ml dung môi isooctan đã cân bằng trước. Sau khi tách pha lỏng, để nguội cho đến khi phần chủ yếu của dung dịch sáp – isooctan bắt đầu hình thành kết tủa. Lắc xoáy nhẹ phễu chiết khi kết tủa lúc đầu xuất hiện ở thành trong của phễu chiết nhằm làm tăng nhanh hơn quá trình này.

Lấy cẩn thận lớp phía dưới, lọc chậm qua lớp bông thủy tinh mỏng vừa đặt lỏng trong phễu lọc vào trong phễu chiết thứ nhất dung tích 250 ml, rửa lần lượt bằng các phần 30 ml isooctan chứa trong các phễu chiết

dung tích 250 ml còn lại. Thời gian lắc đối với mỗi lần rửa là 1 phút. Lặp lại quá trình chiết bằng cách thêm hai phần hỗn hợp sulfoxid và acid, thay phễu trong áo gia nhiệt sau mỗi lần chiết để đảm bảo sáp tan trong dung dịch và rửa lần lượt mỗi phần chiết thu được bằng ba phần isooctan giống nhau.

Tập trung các phần chiết thu được (tổng thể tích 300 ml) cho vào phễu chiết (tốt nhất dùng loại phễu có dung tích 2 lít) có chứa 480 ml nước cất, lắc và để nguội trong một vài phút sau khi phần chiết thu được cuối cùng được thêm vào. Thêm 80 ml isooctan vào dung dịch và chiết bằng cách lắc mạnh phễu trong 2 phút. Rút ra lớp tan trong nước ở phía dưới trong phễu chiết thứ hai (tốt nhất dùng loại 2 lít) và lặp lại quá trình chiết bằng 80 ml isooctan. Rút ra và loại bỏ lớp tan trong nước. Rửa mỗi phần chiết thu được 80 ml ba lần với các phần 100 ml nước cất. Thời gian lắc cho mỗi lần rửa là 1 phút. Loại bỏ các lớp tan trong nước. Lọc phần chiết thứ nhất qua Na_2SO_4 khan được rửa trước bằng isooctan (xem Na_2SO_4 trong phần “Nguyên vật liệu và hoá chất” đối với chuẩn bị phễu lọc) vào trong bình tam giác (hoặc bình cô tùy chọn). Rửa phễu chiết thứ nhất bằng phần chiết 80 ml isooctan thứ hai và cho qua Na_2SO_4 . Sau đó rửa lần lượt phễu chiết thứ hai và thứ nhất bằng một phần 20 ml isooctan và cho dung môi qua Na_2SO_4 vào trong bình. Thêm 1 ml n – hexadecan và cô isooctan trong cách thủy có thổi khí nitrogen. Ngừng cô khi còn lại không quá 1 ml cặn. Thêm 10 ml isooctan vào phần cặn, cô lại tới 1 ml hexadecan và lặp lại quá trình này một lần nữa.

Chuyển toàn lượng phần cặn trong isooctan vào bình định mức dung tích 25 ml, định mức tới thể tích 25 ml và lắc đều. Đo độ hấp thụ của dung dịch trong các ống đo có chiều dài đường truyền 5 cm so với isooctan là đối chứng tại dải bước sóng 280 – 400 nm (cần thận không để mất dung dịch trong quá trình đổ mẫu đầy ống đo).

Hiệu chỉnh các giá trị độ hấp thụ đối với bất kỳ độ hấp thụ nào có nguồn gốc từ hoá chất được xác định bởi tiến hành cách làm không có mẫu sáp. Nếu độ hấp thụ không vượt quá giới hạn được mô tả tại Các đặc tính kỹ thuật, sáp đáp ứng các đặc tính kỹ thuật về hấp thụ tia cực tím. Nếu độ hấp thụ hiệu chỉnh trên mỗi cm chiều dài đường truyền vượt quá giới hạn quy định tại Các đặc tính kỹ thuật, tiến hành như sau:

Chuyển toàn lượng dung dịch isooctan vào bình được lắp khớp nối 24/40 dung tích 125 ml và cô isooctan trong chậu cách thủy dưới dòng nitrogen tới thể tích 1 ml hexadecan. Thêm 10 ml methyl alcol và khoảng 0,3 g natri borohydrid (Giảm thiểu tiếp xúc borohydrid với bầu khí quyển. Một dụng cụ nhúng đo có thể được sử dụng). Ngay lập tức, ráp bình với một sinh hàn làm nguội bằng nước được gá lắp một khớp nối 24/40 và ống làm khô dẫn vào trong bình, khuấy cho đến khi borohydrid tan, để yên trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, thỉnh thoảng lắc xoáy. Tại điểm kết thúc của giai đoạn này, tháo bình và cô methyl alcol trong cách thủy có thổi khí nitrogen cho đến khi natri borohydrid bắt đầu tách ra khỏi dung dịch. Sau đó thêm 10 ml isooctan và cô tới thể tích còn lại khoảng 2 – 3 ml. Lặp lại, cho 10 ml isooctan và cô đến thể tích khoảng 5 ml. Lắc xoáy bình lặp lại nhiều lần để đảm bảo đủ rửa cặn natri borohydrid.

Lắp đĩa polymer tetrafluoroethylen lên phần trên của thân cột sắc ký, sau đó để cột sắc ký với đĩa trên bình hút và hút chân không (áp suất khoảng 135 mmHg). Cân 14 g hỗn hợp magnesi oxyd và Celite 545 (tỷ lệ 2/1) và đổ hỗn hợp chất hấp phụ vào trong cột sắc ký với các lớp dày khoảng 3 cm. Sau khi thêm vào mỗi lớp, san bằng phần trên của chất hấp phụ bằng thanh kính phẳng hoặc pittông kim loại bằng cách nhấn xuống thật chắc

cho đến khi chất hấp thụ được nhồi vào. Nới lỏng vài ml trên cùng của mỗi lớp hấp phụ bằng thanh kim loại trước khi bổ sung lớp kế tiếp. Tiếp tục nhồi theo cách này cho đến khi tất cả 14 g chất hấp phụ được cho vào cột. San bằng phần đầu của chất hấp phụ bằng thanh kính phẳng hoặc pittông kim loại bằng cách nhấn xuống thật chắc để tạo ra độ sâu của lớp chất hấp phụ khoảng 12,5 cm. Tắt chân không và khoá bình hút. Nồi bình nhận dung tích 500 ml vào bên trên cột sắc ký và làm ẩm cột trước bằng cách cho 100 ml isooctan qua cột. Điều chỉnh áp suất khí nitrogen để tốc độ hạ xuống của isooctan ra ngoài cột là 2 – 3 ml/phút. Ngưng áp lực ngay trước khi isooctan cuối cùng đạt đến mức của chất hấp phụ. (Chú ý: Không cho phép mức chất lỏng rút dưới mức hấp phụ bất cứ khi nào).

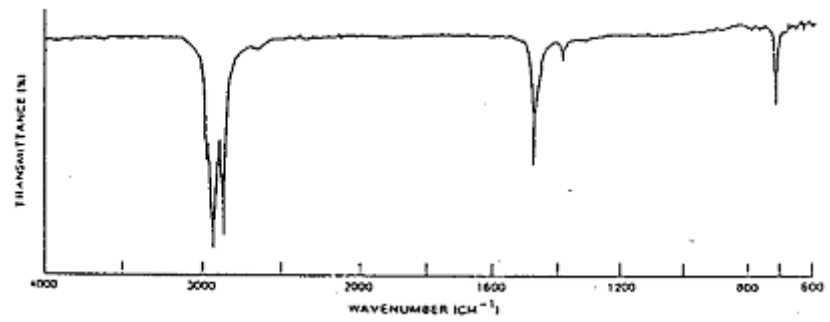
Tháo bình chứa ra và gạn 5 ml dung dịch isooctan đậm đặc vào cột và lại sử dụng áp lực nhẹ đẩy chất lỏng rút xuống chỉ trên mức chất hấp phụ. Nhanh chóng hoàn thành việc chuyển tương tự với hai phần 5 ml isooctan, lắc xoáy bình nhiều lần mỗi lần để đảm bảo đủ rửa cặn. Ngay trước khi rửa 5 ml cuối cùng đạt đến đỉnh của chất hấp phụ, thêm 100 ml isooctan vào bình nhận và tiếp tục thấm qua với tốc độ 2 – 3 ml/phút. Ngay trước khi isooctan cuối cùng đạt đến mức độ hấp phụ, thêm 100 ml dung dịch benzen 10% trong isooctan vào bình nhận và tiếp tục thấm qua với tốc độ đề cập ở trên. Ngay trước khi hỗn hợp dung môi đạt đến mức chất hấp phụ, thêm 25 ml dung dịch benzen 20% trong isooctan vào bình nhận và tiếp tục cho thấm qua với tốc độ 2 - 3 ml/phút cho đến khi tất cả hỗn hợp dung môi này đã được loại bỏ ra khỏi cột. Loại bỏ tất cả dung môi rửa giải thu được đến thời điểm này. Thêm 300 ml hỗn hợp aceton – benzen – nước vào bình nhận và cho thấm qua cột để rửa giải các hợp chất đa vòng. Thu thập các phần rửa giải vào trong một phễu chiết sạch dung tích 1 l. Để cột chảy cho đến khi hầu hết các hỗn hợp dung môi được lấy ra. Rửa phần dịch rửa giải ba lần với các phần 300 ml nước cất, lắc đều cho mỗi lần rửa. (Việc bổ sung một lượng nhỏ NaCl tạo điều kiện cho quá trình phân tách). Loại bỏ lớp dung dịch nước sau mỗi lần rửa. Sau khi tách lần cuối cùng, lọc benzen dư qua Na_2SO_4 khan được rửa trước bằng benzen (xem Na_2SO_4 trong phần “Nguyên vật liệu và hoá chất” đối với chuẩn bị phễu lọc) vào trọng bình tam giác dung tích 250 ml (hoặc vào trong bình cô tùy chọn). Rửa phễu chiết 2 lần nữa, mỗi lần với 20 ml benzen cũng đã được lọc qua Na_2SO_4 . Thêm 1 ml n – hexadecan và loại hoàn toàn benzen bằng cách cô dưới dòng nitrogen, sử dụng cách tiến hành đặc biệt để loại benzen như mô tả ở phần trước ở mục “Dung môi hữu cơ”.

Chuyển toàn lượng cặn với isooctan vào bình định mức dung tích 25 ml và điều chỉnh đến thể tích 25 ml. Đo độ hấp thụ của dung dịch trong các công đo có chiều dài đường truyền 5 cm so với isooctan là đối chứng ở khoảng bước sóng 250 – 400 nm. Hiệu chỉnh với bất kỳ độ hấp thụ nào xuất phát từ các hoá chất như xác định bằng cách thực hiện không có mẫu sáp. Nếu quang phổ cho thấy các pic benzen đặc trưng trong vùng 250 - 260 nm, cô dung dịch để loại bỏ benzen theo cách tiến hành trong phần “Dung môi hữu cơ”. Hòa tan cặn, chuyển toàn lượng và điều chỉnh thể tích đến thể tích 25 ml trong bình định mức bằng isooctan. Ghi độ hấp thụ một lần nữa. Nếu độ hấp thụ đã hiệu chỉnh không vượt quá giới hạn được mô tả trong phần Các đặc tính kỹ thuật, chỉ tiêu sáp đáp ứng kỹ thuật về hấp thụ tia cực tím.

Phụ lục

Phổ hồng ngoại

Sáp vi tinh thể





CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 4-21:2011/BYT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT LÀM DÀY**

National technical regulation on Food Additive – Thickener

HÀ NỘI – 2011

Lời nói đầu

QCVN 4-21:2011/BYT do Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT LÀM DÀY

National technical regulation on Food Additive – Thickener

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia (sau đây gọi tắt là Quy chuẩn) này quy định các yêu cầu kỹ thuật và quản lý về chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chất làm dày được sử dụng với mục đích làm phụ gia thực phẩm.

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

- 2.1. Tổ chức, cá nhân nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các chất làm dày làm phụ gia thực phẩm (sau đây gọi tắt là tổ chức, cá nhân).
- 2.2. Cơ quan quản lý nhà nước có liên quan.

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:

- 3.1. Chất làm dày: là phụ gia thực phẩm được sử dụng để làm tăng độ nhớt của thực phẩm.
- 3.2. JECFA monograph 1 - Vol. 4 (JECFA monographs 1 - Combined compendium of food additive specifications; Joint FAO/WHO expert committee on food additives; Volume 4 - Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications; FAO, 2006): Các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4 Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm, dung dịch thử nghiệm được sử dụng (hoặc tham chiếu) trong yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm; JECFA biên soạn; FAO ban hành năm 2006.
- 3.3. Mã số C.A.S (Chemical Abstracts Service): Mã số đăng ký hóa chất của Hiệp hội Hóa chất Hoa Kỳ.
- 3.4. TS (test solution): Dung dịch thuốc thử.
- 3.5. ADI (Acceptable daily intake): Lượng ăn vào hàng ngày chấp nhận được.
- 3.6. INS (International numbering system): Hệ thống mã số quốc tế về phụ gia thực phẩm.

II. YÊU CẦU KỸ THUẬT, PHƯƠNG PHÁP THỬ VÀ LẤY MẪU

1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với các chất làm dày được quy định tại các phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này như sau:

- 1.1. Phụ lục 1: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với acid alginic
- 1.2. Phụ lục 2: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với kali alginat

- | | | |
|-------|-------------|---|
| 1.3. | Phụ lục 3 : | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với amoni alginat |
| 1.4. | Phụ lục 4: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với calci alginat |
| 1.5. | Phụ lục 5: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với propylen glycol alginat |
| 1.6. | Phụ lục 6: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với agar |
| 1.7. | Phụ lục 7: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với carrageenan và muối Na, K, NH ₄ của nó |
| 1.8. | Phụ lục 8: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm đậu Carob |
| 1.9. | Phụ lục 9: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm guar |
| 1.10. | Phụ lục 10: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm tragacanth |
| 1.11. | Phụ lục 11: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm arabic |
| 1.12. | Phụ lục 12: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm xanthan |
| 1.13. | Phụ lục 13: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm karaya |
| 1.14. | Phụ lục 14: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm tara |
| 1.15. | Phụ lục 15: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm gellan |
| 1.16. | Phụ lục 16: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với pectin |
| 1.17. | Phụ lục 17: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với methyl cellulose |
| 1.18. | Phụ lục 18: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với methyl ethyl cellulose |
| 1.19. | Phụ lục 19: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với natri carboxymethyl cellulose |
| 1.20. | Phụ lục 20: | Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gelatin thực phẩm |

2. Các yêu cầu kỹ thuật quy định trong Quy chuẩn này được thử theo JECFA monograph 1 - Vol. 4, ngoại trừ một số phép thử riêng được mô tả trong các phụ lục. Các phương pháp thử được hướng dẫn trong Quy chuẩn này không bắt buộc phải áp dụng, có thể sử dụng các phương pháp thử khác tương đương.

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư 16/2009/TT-BKHCN ngày 02 tháng 6 năm 2009 của Bộ Khoa học và Công nghệ về hướng dẫn kiểm tra nhà nước về chất lượng hàng hóa lưu thông trên thị trường và các quy định khác của pháp luật có liên quan.

III. YÊU CẦU QUẢN LÝ

1. Công bố hợp quy

1.1. Các chất làm dày phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

1.2. Phương thức, trình tự, thủ tục công bố hợp quy được thực hiện theo Quy định về chứng nhận hợp chuẩn, chứng nhận hợp quy và công bố hợp chuẩn, công bố hợp quy ban hành kèm theo Quyết định số 24/2007/QĐ-BKHCN ngày 28 tháng 9 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ và các quy định của pháp luật.

2. Kiểm tra đối với chất làm dày

Việc kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chất làm dày phải thực hiện theo các quy định của pháp luật.

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

1. Tổ chức, cá nhân phải công bố hợp quy phù hợp với các quy định kỹ thuật tại Quy chuẩn này, đăng ký bản công bố hợp quy tại Cục An toàn vệ sinh thực phẩm và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn theo đúng nội dung đã công bố.

2. Tổ chức, cá nhân chỉ được nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các chất làm dày sau khi hoàn tất đăng ký bản công bố hợp quy và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn, ghi nhãn phù hợp với các quy định của pháp luật.

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

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

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

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

PHỤ LỤC 1

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ACID ALGINIC

1. Tên khác, chỉ số

Alginic acid

INS 400

ADI "Không giới hạn"

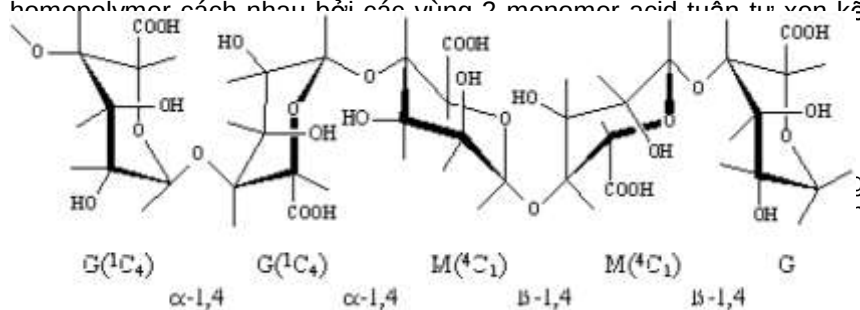
2. Định nghĩa

Acid alginic tự nhiên thu được bằng cách thủy phân keo polysaccharid từ các loài rong biển nâu (*Phaeophyceae*). Nó là một polymer mạch thẳng gồm chủ yếu các monomer của acid β -1,4-D-mannuronic và acid α -1,4-L-glucuronic. Các monomer này thường được sắp xếp thành các khối homopolymer cách nhau bởi các vùng 2 monomer acid tuân tự vận kế

Chỉ số C.A.S.

Công thức hóa học

Công thức cấu tạo



Số lượng và thứ tự của các phần mannuronat và gluconat có thể thay đổi trong alginat tự nhiên. Công thức trên chưa thể hiện sự kết hợp với nước.

Khối lượng phân tử

Đơn vị cấu trúc : 176,13 (lý thuyết); 200 (trung bình thực tế).

Đại phân tử: 10.000-600.000 (trung bình điển hình)

3. Cảm quan

Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.

4. Chức năng

Chất ổn định, chất làm dày, chất tạo gel, chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

pH

Huyền phù mẫu thử 0,3/10 có pH trong khoảng 2,0 - 3,5.

Tạo kết tủa với amoni sulfat

Phải có phản ứng tạo kết tủa với amoni sulfat đặc trưng.

Alginat

Phải có phản ứng đặc trưng của alginat.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô

Không được quá 15%
(Sấy tại 105° trong 4 giờ).

Tro sulfat

Không được quá 8% tính theo chế phẩm đã làm khô.

Chất không tan trong natri hydroxyd

Không được quá 2% tính theo chế phẩm đã làm khô.

Arsen

Không được quá 3,0 mg/kg.

Chì

Không được quá 5,0 mg/kg.

5.3 Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật hiếu khí

Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10^{-1} bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng hóa bằng máy nghiền cao tốc.

Tổng số nấm men-mốc

Không được quá 500 khuẩn lạc/g

Coliforms

Âm tính

Salmonella

Âm tính

5.4. Hàm lượng $(C_6H_8O_6)_n$

Chế phẩm khan chứa không thấp hơn 20,0% và không được quá 23,0% CO_2 tương đương với không thấp hơn 91,0% và không được quá 104,5% acid alginic $(C_6H_8O_6)_n$.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo kết tủa với amoni sulfat

Thêm dung dịch amoni sulfat bão hòa vào dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/2 thể tích dịch thử. Không được có kết tủa. Phép thử này phân biệt acid alginic với thạch, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gồm carob bean, methyl cellulose, pectin de-ester hóa, tinh bột.

Alginat

Hòa tan 0,1 g mẫu thử với 0,15 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N. Thêm 1 ml dung dịch sắt (III) sulfat (TS). Trong 5 phút, màu đỏ anh đào sẽ xuất hiện và đậm dần thành màu tím sẫm.

6.2. Độ tinh khiết

Chất không tan trong natri hydroxyd

Cân khoảng 1 g (chính xác đến mg) mẫu thử, hòa tan trong 100 ml dung dịch natri hydroxyd (TS), ly tâm, gạn lấy phần không tan. Rửa cặn 5 lần bằng nước, ly tâm hoặc gạn bỏ nước rửa. Dùng nước chuyển phần không tan vào phễu lọc thủy tinh đã cân bì, sấy tại 105° trong 1 giờ, để nguội và cân. Tính hàm lượng % theo khối lượng chế phẩm đã được làm khô.

Arsen

Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. (phương pháp II)

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25 N sử dụng tương đương với 5,5 mg carbon dioxyd hoặc 25 mg acid alginic (tương đương khối lượng 200).

PHỤ LỤC 2

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI KALI ALGINAT

1. Tên khác, chỉ số

INS 402

ADI "Không giới hạn"

2. Định nghĩa

Muối Kali của acid alginic

Chỉ số C.A.S.

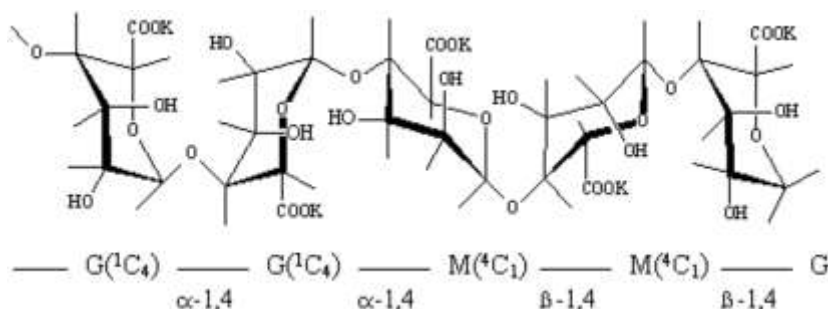
9005-36-1

Công thức hóa học

(C₆H₇KO₆)_n

Công thức cấu tạo

Công thức cấu tạo do Phillips, Wedlock and Williams công bố trong Gôms and Stabilizers for the Food Industry 5 (1990), nhà xuất bản Oxford University Press.



Số lượng và thứ tự của các phần mannuronat và gluconat có thể thay đổi trong alginat tự nhiên. Công thức trên chưa thể hiện sự kết hợp với nước.

Khối lượng phân tử

Đơn vị cấu trúc : 214,22 (lý thuyết); 238 (trung bình thực tế).

Đại phân tử: 10000-600000 (trung bình điển hình)

3. Cảm quan

Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.

4. Chức năng

Chất ổn định, chất làm dày, chất tạo gel, chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Tan chậm trong nước, tạo ra dung dịch nhớt. Không tan trong ethanol và ether.

Tạo kết tủa với calci clorid

Phải có phản ứng tạo kết tủa với calci clorid đặc trưng.

Tạo kết tủa với amoni sulfat

Phải có phản ứng tạo kết tủa với amoni sulfat đặc trưng.

Alginat

Phải có phản ứng đặc trưng của alginat.

Kali

Phải có phản ứng đặc trưng của kali.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô

Không được quá 15% (Sấy tại 105° trong 4 giờ).

Chất không tan trong nước

Không được quá 2% tính theo chế phẩm đã làm khô.

Arsen

Không được quá 3,0 mg/kg.

Chì

Không được quá 5,0 mg/kg

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật hiếu khí

Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10^{-1} bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.

Tổng số nấm men-mốc

Không được quá 500 khuẩn lạc/g

Coliforms

Âm tính

Salmonella

Âm tính

5.4. Hàm lượng $(C_6H_7KO_6)_n$ Chế phẩm khan chứa không thấp hơn 16,5% và không được quá 19,5% CO_2 tương đương với không thấp hơn 89,2% và không được quá 105,5% kali alginat $(C_6H_7KO_6)_n$.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo kết tủa với calci clorid Thêm dung dịch calci clorid 2,5% vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/5 thể tích dịch thử. Xuất hiện kết tủa khối lớn dạng keo. Phép thử này phân biệt calci alginat với gồm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gồm ghatti, gồm karaya, gồm carob bean, methyl cellulose, gồm tragacanth.

Tạo kết tủa với amoni sulfat Thêm dung dịch amoni sulfat bão hòa vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/2 thể tích dịch thử. Không được xuất hiện tủa. Phép thử này phân biệt calci alginat với thạch, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, pectin de-este hóa, gelatin, gồm carob bean, methyl cellulose và tinh bột.

Alginat Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

Kali Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

6.2. Độ tinh khiết

Chất không tan trong nước Cân 2 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu, hòa tan vào 800 ml nước trong bình 2000 ml. Trung hòa tới pH 7 bằng dung dịch natri hydroxyd (TS) và thêm dư 3 ml. Thêm 40 ml dung dịch hydrogen peroxyd 30% (kl/kl), đậy bình và đun trong khoảng 1 giờ, khuấy thường xuyên. Lọc nóng qua một chén lọc Gooch có màng lọc bằng xơ thủy tinh đã cân bì (2,4 cm, No 934 AH, Reeve Angel & Co, Clifton, N.Y., USA hoặc tương đương). Nếu quá trình lọc bị chậm do dung dịch mẫu có độ nhớt cao, đun sôi đến khi độ nhớt giảm đến mức có thể lọc được. Rửa chén lọc bằng nước nóng, sấy chén lọc và phần không tan tại 105° trong 1 giờ, để nguội và cân. Tính hàm lượng % của phần không tan đã sấy khô.

Arsen Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 (phương pháp II).

Chì - Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

6.4. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25 N sử dụng tương đương với 5,5 mg carbon dioxyd hoặc 29,75 mg kali alginat (tương đương khối lượng 238).

PHỤ LỤC 3

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI AMONI ALGINAT

1. Tên khác, chỉ số

INS 403

ADI "Không giới hạn"

2. Định nghĩa

Muối Amoni của acid alginic

9005-34-9

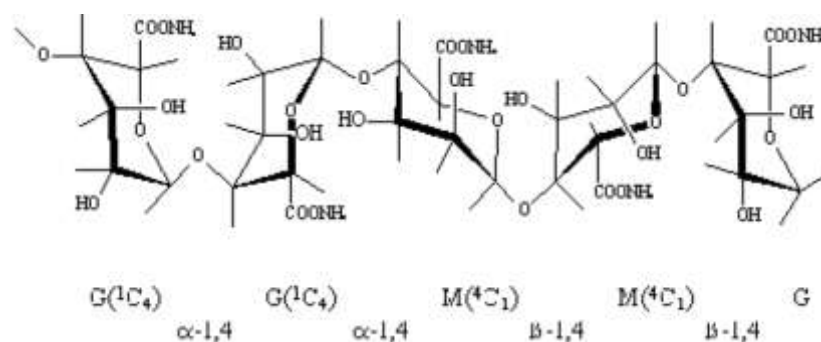
Chỉ số C.A.S.

$(C_6H_{11}NO_6)_n$

Công thức hóa học

Công thức cấu tạo

Công thức cấu tạo do Phillips, Wedlock and Williams công bố trong *Gôms and Stabilizers for the Food Industry 5* (1990), nhà xuất bản Oxford University Press.



Số lượng và thứ tự của các phần mannuronat và gluconat có thể thay đổi trong alginat tự nhiên. Công thức trên chưa thể hiện sự kết hợp với nước.

Đơn vị cấu trúc : 193,16 (lý thuyết); 217 (trung bình thực tế). Đại phân tử: 10000-600000 (trung bình điển hình)

Khối lượng phân tử

3. Cảm quan

Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.

4. Chức năng

Chất ổn định, chất làm dày, chất tạo gel, chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Tan chậm trong nước, tạo ra dung dịch nhớt. Không tan trong ethanol và ether.

Tạo kết tủa với calci clorid

Phải có phản ứng tạo kết tủa với calci clorid đặc trưng.

Tạo kết tủa với amoni sulfat

Phải có phản ứng tạo kết quả với amoni sulfat đặc trưng.

Alginat

Phải có phản ứng đặc trưng của alginat.

Amoni

Phải có phản ứng đặc trưng của amoni.

5.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15% (Sấy tại 105° trong 4 giờ).
<i>Chất không tan trong nước</i>	Không được quá 2% tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 7,0% tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3 Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10^{-1} bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.
<i>Tổng số nấm men-mốc</i>	Không được quá 500 khuẩn lạc/g
<i>Coliforms</i>	Âm tính
<i>Salmonella</i>	Âm tính

5.4. Hàm lượng $(C_6H_{11}NO_6)_n$ Chế phẩm đã làm khô chứa không thấp hơn 18% và không được quá 21% CO_2 tương đương với không thấp hơn 88,7% và không được quá 103,6% amoni alginat $(C_6H_{11}NO_6)_n$.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Tạo kết tủa với calci clorid</i>	Thêm dung dịch calci clorid 2,5% vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/5 thể tích dịch thử. Xuất hiện tủa khối lớn dạng keo. Phép thử này phân biệt calci alginat với gồm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gồm ghatti, gồm karaya, gồm carob bean, methyl cellulose, gồm tragacanth.
<i>Tạo kết tủa với amoni sulfat</i>	Thêm dung dịch amoni sulfat bão hòa vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/2 thể tích dịch thử. Không được xuất hiện tủa. Phép thử này phân biệt calci alginat với thạch, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, pectin de-este hóa, gelatin, gồm carob bean, methyl cellulose và tinh bột.
<i>Alginat</i>	Hòa tan 0,1 g mẫu thử với 0,15 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N, lắc kỹ để mẫu thử tan càng nhiều càng tốt. Thêm 1 ml dung dịch sắt(III) sulfat (TS). Trong 5 phút, màu đỏ hồng anh đào sẽ xuất hiện và đậm dần thành màu tím sẫm.
<i>Amoni</i>	Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

6.2. Độ tinh khiết

Chất không tan trong nước

Cân 2 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu, phân tán vào 800 ml nước trong bình dung tích 2000 ml. Trung hòa tới pH 7 bằng dung dịch natri hydroxyd (TS) và thêm dư 3 ml. Thêm 40 ml dung dịch hydrogen peroxyd 30% (kl/kl), đậy bình và đun trong khoảng 1 giờ, khuấy thường xuyên. Lọc nóng qua một chén lọc Gooch có màng lọc bằng xơ thủy tinh đã cân bì (2,4 cm, No 934 AH, Reeve Angel & Co, Clifton, N.Y., USA hoặc tương đương). Nếu quá trình lọc bị chậm do dung dịch mẫu có độ nhớt cao, đun sôi đến khi độ nhớt giảm đến mức có thể lọc được. Rửa chén lọc bằng nước nóng, sấy chén lọc và phần không tan tại 105° trong 1 giờ, để nguội và cân. Tính hàm lượng % của phần cặn không tan đã sấy khô.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25 N sử dụng tương đương với 5,5 mg carbon dioxyd.

PHỤ LỤC 4

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CALCI ALGINAT

INS 404

1. Tên khác, chỉ số

ADI "Không giới hạn"

Muối calci của acid alginic

2. Định nghĩa

9005-35-0

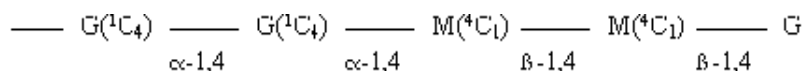
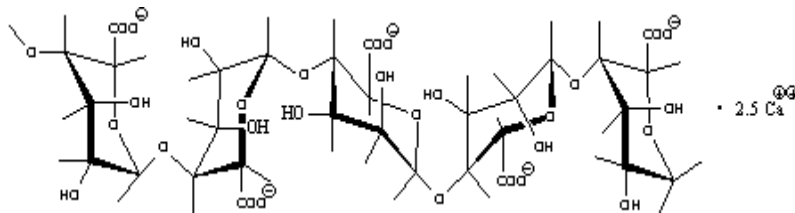
Chỉ số C.A.S.

$(C_6H_7Ca_{1/2}O_6)_n$

Công thức hóa học

Công thức cấu tạo

Công thức cấu tạo do Phillips, Wedlock and Williams công bố trong Gôms and Stabilizers for the Food Industry 5 (1990), nhà xuất bản Oxford University Press.



Số lượng và thứ tự của các phần mannuronat và gluconat có thể thay đổi trong alginat tự nhiên. Công thức trên chưa thể hiện sự kết hợp với nước.

Đơn vị cấu trúc : 195,16 (lý thuyết); 219 (trung bình thực tế). Đại phân tử: 10.000-600.000 (trung bình điển hình)

Khối lượng phân tử

Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.

3. Cảm quan

Chất ổn định, chất làm dày, chất tạo gel, chất nhũ hóa

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong nước và ether. Ít tan trong ethanol, tan chậm trong dung dịch natri polyphosphat, natri carbonat và các chất kết hợp với ion calci

Tạo kết tủa với calci clorid Phải có phản ứng tạo kết tủa với calci clorid đặc trưng.

Tạo kết tủa với amoni sulfat Phải có phản ứng tạo kết tủa với amoni sulfat đặc trưng.

Alginat Phải có phản ứng đặc trưng của alginat.

Calci Phải có phản ứng đặc trưng của calci.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô Không được quá 15% (Sấy tại 105° trong 4 giờ).

Arsen Không được quá 3,0 mg/kg.
(thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - phương pháp II).

Chì Không được quá 5,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật hiếu khí Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10^{-1} bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.

Tổng số nấm men-mốc Không được quá 500 khuẩn lạc/g

Coliforms Âm tính

Salmonella Âm tính

5.4. Hàm lượng $(C_6H_7Ca_{1/2}O_6)_n$ Không thấp hơn 18,0% và không được quá 21,0% CO_2 tương đương với không thấp hơn 89,6% và không được quá 104,5% calci alginat $(C_6H_7Ca_{1/2}O_6)_n$ tính theo chế phẩm khan.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo kết tủa với calci clorid Thêm dung dịch calci clorid 2,5% vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/5 thể tích dịch thử. Xuất hiện tủa khối lớn dạng keo. Phép thử này phân biệt calci alginat với gồm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gồm ghatti, gồm karaya, gồm carob bean, methyl cellulose, gồm tragacanth.

Tạo kết tủa với amoni sulfat Thêm dung dịch amoni sulfat bão hòa vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/2 thể tích dịch thử. Không được xuất hiện tủa. Phép thử này phân biệt calci alginat với thạch, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, pectin de-este hóa, gelatin, gồm carob bean, methyl cellulose và tinh bột.

Alginat Hòa tan 0,1 g mẫu thử với 0,15 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N, lắc kỹ để mẫu thử tan càng nhiều càng tốt. Thêm 1 ml dung dịch sắt(III) sulfat (TS). Trong 5 phút, màu đỏ hồng anh đào sẽ xuất hiện và đậm dần thành màu tím sẫm.

Calci Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

6.2. Độ tinh khiết

Arsen Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 (phương pháp II).

Chì - Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25 N sử dụng tương đương với 5,5 mg carbon dioxyd hoặc 27,38 mg calci alginat (tương đương khối lượng 219).

PHỤ LỤC 5

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI PROPYLEN GLYCOL ALGINAT

1. Tên khác, chỉ số	Ester của acid alginic với 1,2-propan-diol; Hydroxylpropyl alginat; Propan-1,2-diol alginat INS 405 ADI "không giới hạn"
2. Định nghĩa	Là ester của acid alginic, trong đó một số nhóm carboxyl bị ester hóa với propylen glycol, một số khác trung hòa với kiềm còn lại là tự do.
Chỉ số C.A.S.	9005-37-2
Công thức hóa học	$(C_9H_{14}O_7)_n$ (đã ester hóa)
Khối lượng phân tử	Đơn vị cấu trúc : 234,21 (lý thuyết). Đại phân tử: 10000-600000 (trung bình điển hình) Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.
3. Cảm quan	Chất ổn định, chất làm dày, chất nhũ hóa.
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Tan trong nước, tạo ra dung dịch nhớt, keo. Tan trong hỗn hợp dung môi ethanol/nước đến 60% tùy thuộc mức độ ester hóa.
Tạo kết tủa với acid sulfuric	Phải có phản ứng tạo kết tủa với acid sulfuric đặc trưng.
Tạo kết tủa với chì acetat	Phải có phản ứng tạo kết tủa với chì acetat đặc trưng.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 20% (Thử theo hướng dẫn trong JECFA monograph 1 - Vol.4 - Sấy tại 105° trong 4 giờ).
Chất không tan trong nước	Không được quá 2% tính theo chế phẩm đã làm khô.
Tổng propylen glycol	Không thấp hơn 15% và không được quá 45%
Propylen glycol tự do	Không được quá 15%
Arsen	Không được quá 3,0 mg/kg.
Chì	Không được quá 5,0 mg/kg.
5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật	
Tổng số vi sinh vật hiếu khí	Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10^{-1} bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat

Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.

<i>Tổng số nấm men-mốc</i>	Không được quá 500 khuẩn lạc/g
<i>Coliforms</i>	Âm tính
<i>Salmonella</i>	Âm tính
5.3. Hàm lượng CO ₂	Chế phẩm khan chứa không thấp hơn 16% và không được quá 20% CO ₂

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Tạo kết tủa với acid sulfuric</i>	Lấy 10 ml dung dịch mẫu thử 1%, thêm 1 ml dung dịch natri hydroxyd (TS). Đun nóng trong bể cách thủy nước sôi trong 5 phút, làm nguội và thêm 1 ml dung dịch acid sulfuric loãng (TS). Xuất hiện kết tủa dạng keo.
<i>Tạo kết tủa với chì acetat</i>	Lấy 5 ml dung dịch mẫu thử 1%, thêm 1 ml dung dịch chì acetat (TS). Xuất hiện kết tủa dạng keo.

6.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	- Thử theo hướng dẫn trong <i>JECFA monograph 1 - Vol.4</i> - Sấy tại 105°C trong 4 giờ.
------------------------------------	---

Chất không tan trong nước

Cân 2 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu, hòa tan vào 800 ml nước trong bình 2000 ml. Trung hòa tới pH 7 bằng dung dịch natri hydroxyd (TS) và thêm dư 3 ml. Thêm 40 ml dung dịch hydrogen peroxyd 30% (kl/kl), đậy bình và đun trong khoảng 1 giờ, khuấy thường xuyên. Lọc nóng qua một chén lọc Gooch có màng lọc bằng xơ thủy tinh đã cân bì (2,4 cm, No 934 AH, Reeve Angel & Co, Clifton, N.Y., USA hoặc tương đương). Nếu quá trình lọc bị chậm do dung dịch mẫu có độ nhớt cao, đun sôi đến khi độ nhớt giảm đến mức có thể lọc được. Rửa chén lọc bằng nước nóng, sấy chén lọc và phần không tan tại 105° trong 1 giờ, để nguội và cân. Tính hàm lượng % của phần không tan đã sấy khô.

Dịch thử:

Tổng propylen glycol

Cân 1 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu thử đã được làm khô, hòa tan trong 100 ml nước cất trong cốc 400 ml. Sau khi đã tan hoàn toàn thêm 50 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N và khuấy đều trong 30 phút, cuối cùng trung hòa bằng acid hydrocloric 0,1 N và rửa gôm bằng 25 ml dung dịch natri clorid 5%. Lọc dung dịch, sử dụng giấy lọc nhanh, thu dịch lọc vào bình định mức 250 ml, rửa kết tủa vài lần bằng nước cất, gộp dịch rửa vào dịch lọc và pha loãng đến vạch bằng nước cất.

Acid periodic 0,029 M:

Cho 5,500 g acid periodic và 200 ml nước cất vào bình định mức 1000 ml. Pha loãng đến vạch bằng acid acetic băng.

Tiến hành thử:

Dùng pipét hút 25 ml dịch thử và 25 ml dung dịch Acid periodic 0,029 M vào 1 bình nón, lắc đều và để yên trong 30 phút. Cuối cùng thêm ~ 2 g kali iodid và chuẩn độ với dung dịch natri thiosulfat 0,1 N sử dụng chỉ thị là dung dịch hồ tinh bột 1%. Tiến hành làm 1 mẫu trắng song song, sử dụng 50 ml nước cất thay cho dịch thử. Tính hàm lượng tổng propylen glycol theo công thức sau:

$$\% \text{ propylen glycol } = \frac{3,8 \times (A - B)}{W}$$

Trong đó:

A = thể tích natri thiosulfat 0,1 N chuẩn độ mẫu trắng (ml)

B = thể tích natri thiosulfat 0,1 N chuẩn độ mẫu thử (ml)

W = Khối lượng mẫu thử (g)

Propylen glycol tự do

Xác định hàm lượng % của propylen glycol tự do trong mẫu bằng cách chiết (đun hồi lưu trong 2 giờ) 2 g mẫu thử với 80 ml propan-2-ol. Để nguội về nhiệt độ phòng, sau đó xác định lượng propylen glycol tự do bằng cách chuẩn độ với Acid periodic 0,029 M như hướng dẫn xác định tổng propylen glycol.

Arsen

Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 (phương pháp II).

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25N sử dụng tương đương với 5,5mg carbon dioxyd.

PHỤ LỤC 6

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI AGAR

1. Tên khác, chỉ số	Agar; Agar-Agar; gelose; Japan Agar; Bengal; Ceylon; Chinese or Japanese isinglass; Layor Carang INS 406 ADI “không giới hạn”
2. Định nghĩa	Thạch là hợp chất keo khô ưa nước chiết xuất từ loài tảo biển thuộc lớp <i>Rhodophyceae</i> . Nó là một polysaccharid gồm các tiểu phân D- và L-galactose. Cứ khoảng 10 tiểu phân D-galactopyranose có một nhóm ester sulfat. Cation calci, maginesi, kali, natri cũng có thể liên kết với polysaccharid này.
Chỉ số C.A.S.	9002-18-0
3. Cảm quan	Không mùi hoặc có mùi đặc trưng nhẹ. Thạch thô không tán thường là hồ hợp nhiều dạng màng mỏng, dính; hoặc bột, hạt dạng vảy, miếng. Có thể có màu cam vàng nhạt hoặc vàng xám đến vàng nhạt hoặc không màu. Dai khi hút ẩm và ròn khi khô. Bột thạch có màu trắng, trắng vàng, vàng nhạt. Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hóa.
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước lạnh, tan trong nước nóng.
Tạo gel với nước	Phải có phản ứng tạo gel với nước đặc trưng.
Tạo kết tủa với dung dịch amoni sulfat	Phải có phản ứng tạo kết tủa với dung dịch amoni sulfat đặc trưng.
Tạo kết tủa với dung dịch chì acetat	Phải có phản ứng tạo kết tủa với dung dịch chì acetat đặc trưng.
Kiểm tra hiển vi	Đặt một vài mảnh thạch chưa nghiền hoặc một ít bột thạch trên lam kính, thêm vài giọt nước hoặc dung dịch cloral hydrat (TS). Soi dưới kính hiển vi, thạch trong nước có dạng hạt xen lẫn dạng sợi., thạch trong dung dịch cloral hydrat (TS) trong hơn thạch trong nước.
5.2. Độ tinh khiết	
Hấp thụ nước	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử).
Giảm khối lượng khi làm khô	Không được quá 22%.
Tro toàn phần	Không được quá 6,5% tính theo chế phẩm đã làm khô.
Tro không tan trong acid	Không được quá 0,5% tính theo chế phẩm đã làm khô.
Các tạp chất ngoại lai không tan trong nước	Không được quá 1,0%.

<i>Tinh bột và dextrin</i>	Không phát hiện được.
<i>Gelatin và các protein khác</i>	Không phát hiện được.
<i>Arsen</i>	Không được quá 3,0 mg/kg.
<i>Chì</i>	Không được quá 5,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10^{-1} bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.
<i>Tổng số nấm men-mốc</i>	Không được quá 500 khuẩn lạc/g
<i>Coliforms</i>	Âm tính
<i>Salmonella</i>	Âm tính
5.4. Hàm lượng	Ngưỡng nồng độ gel không được quá 0,25%.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Tạo gel với nước</i>	Pha dung dịch mẫu thử 1% trong nước sôi, cho vào bình, đặt bình trong bể cách thủy 30° trong 15 phút. Tạo thành gel rắn và bền. Đặt bình trong bể cách thủy 70° trong 1 giờ. Gel không bị chảy. Khi gia nhiệt đến > 95°, gel bị chảy tạo thành dung dịch trong.
<i>Tạo kết tủa với dung dịch amoni sulfat</i>	Dung dịch mẫu thử 0,5% (ủ ấm khoảng 40°) tạo kết tủa khi thêm dung dịch amoni sulfat (ủ ấm khoảng 40°) với thể tích bằng 1/2 thể tích dung dịch mẫu thử. Phép thử này phân biệt thạch với các alginat, gồm arabic, gồm ghatti, gồm karaya, pectin và tragacanth.
<i>Tạo kết tủa với dung dịch chì acetat</i>	Dung dịch mẫu thử 0,5% (ấm) tạo kết tủa khi thêm dung dịch chì acetat (ấm) với thể tích bằng 1/5 thể tích dung dịch mẫu thử. Phép thử này phân biệt thạch với methyl cellulose.

6.2. Độ tinh khiết

<i>Hấp thụ nước</i>	Cho 5 g mẫu thử vào trong một ống đong 100 ml, cho nước đến vạch, khuấy đều, để yên tại 25° trong 24 giờ. Rót dung dịch qua bông thủy tinh đã thấm nước, thu nước chảy ra vào một ống đong khác. Lượng nước chảy ra thu được không được quá 75 ml.
<i>Giảm khối lượng khi làm khô</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4. - Sau khi sấy tại 105° đến khi sự chênh lệch khối lượng giữa 2 lần cân không quá 1 mg (thời gian sấy khoảng 5 giờ); thạch thô chưa nghiền cần được cắt nhỏ thành từng miếng 2 -5 mm ² trước khi sấy).
<i>Các tạp chất ngoại lai không tan trong nước</i>	Đun sôi, hồi lưu 5 g mẫu thử với 500 ml nước và 12 ml acid sulfuric. Để nguội và lọc qua một phễu thủy tinh xốp, lỗ mịn, đã cân bì. Tráng bình và lọc bằng 50 ml nước, sấy tại 105° đến khối lượng không đổi và cân. Tính hàm lượng %.
<i>Tinh bột và dextrin</i>	Thêm vào dung dịch mẫu thử 0,5% (ấm khoảng 40°) 2 giọt dung dịch iod (TS). Khi vừa nhỏ thuốc thử vào dung dịch thì có màu tím đỏ nhưng sau

khi khuấy trộn đều dung dịch có màu nâu vàng không phải màu xanh hoặc màu đỏ.

Gelatin và các protein khác Thêm vào dung dịch mẫu thử 0,5% (ấm khoảng 40°) dung dịch acid picric (TS) (ấm khoảng 40°). Sau 10 phút dung dịch không được đục.

Arsen Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 (phương pháp II).

Chì - Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Ngưỡng nồng độ gel:

Pha một loạt dung dịch mẫu thử chứa hàm lượng mẫu thử rắn 0,15%; 0,20%; 0,25%..., cho vào các ống nghiệm kích thước dài 150 mm, đường kính trong 16 mm. Nút ống nghiệm và làm mát trong 1 giờ tại 20 - 25°. Đổ cột gel từ các ống nghiệm lên trên 1 bề mặt phẳng. Nồng độ thấp nhất chịu được trọng lực trong 5 - 30 giây mà không bị gãy vỡ là ngưỡng nồng độ gel của mẫu thử.

PHỤ LỤC 7

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CARRAGEENAN VÀ CÁC MUỐI NATRI, KALI VÀ AMONI CỦA NÓ

1. Tên khác, chỉ số

Thạch trắng từ rong biển Ailen (từ loài *Chondrus spp.*); Eucheuman (từ loài *Eucheuma spp.*); Iridophycan (từ loài *Iridaea spp.*); Hypnean (từ loài *Hypnea spp.*); Furcellaran hoặc agar Đan Mạch (từ loài *Furcellaria*);
INS 407

2. Định nghĩa

Sản phẩm có tính keo ưa nước thu được từ một số loài thuộc lớp tảo biển đỏ *Rhodophyceae*.

Carrageenan là chất keo ưa nước gồm các thành phần chính là các ester $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaSO_4 , MgSO_4 , K_2SO_4 và Na_2SO_4 của đường galactose và 3,6-anhydrogalactose polysaccharid.

Carrageenan thu được từ quá trình chiết tảo biển bằng nước hoặc dung dịch kiềm loãng.

Mã số C.A.S.

9000-07-1

3. Cảm quan

Dạng bột thô tới mịn, màu hơi vàng hoặc màu nâu vàng tới trắng, hầu như không mùi

4. Chức năng

Chất làm dày, chất tạo gel, chất ổn định, chất nhũ hoá

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong ethanol ; tan trong nước ở nhiệt độ khoảng 80°C, tạo dung dịch nhớt trong hoặc hơi trắng sữa chảy dễ dàng ; tan trong nước dễ dàng hơn nếu trước đó được làm ẩm bằng cồn, glycerol hoặc dung dịch bão hoà của glucose hoặc sucrose trong nước.

Sulfat

Phải có phản ứng đặc trưng của sulfat.

Galactose anhydrogalactose

và Phải có phản ứng đặc trưng của galactose và anhydrogalactose.

Keo ưa nước và chất đồng trùng hợp điển hình

Phải có phản ứng đặc trưng của keo ưa nước và chất đồng trùng hợp điển hình.

Hấp thụ tia hồng ngoại

Phải có phản ứng hấp thụ tia hồng ngoại đặc trưng.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô

Không được quá 12% (nhiệt độ sấy 105°C đến trọng lượng không đổi).

pH

8 – 11 (thể rắn 1%)

Độ nhớt

Không được nhỏ hơn 5 cP ở 75°C (dung dịch 1,5%)

Sulfat

Không được nhỏ hơn 15,0% và không được quá 40,0% (SO_4^{2-}) tính theo trọng lượng khô.

<i>Hàm lượng tro toàn phần</i>	Không được nhỏ hơn 15,0% và không được quá 40,0% theo trọng lượng khô
<i>Tro không tan trong acid</i>	Không được quá 1,0%
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 2,0%
	Sử dụng 2 g thu được từ phần (a) của Cách tiến hành xác định sulfat
<i>Dư lượng dung môi</i>	Không được quá 0,1% ethanol, isopropanol, hoặc methanol, dạng mỗi chất hay cộng hợp các chất.
	Xác định theo mô tả trong phần Phương pháp thử - Định lượng

<i>Arsen</i>	Không được quá 3 mg/kg (Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử H^+ đối với 3 g mẫu).
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
<i>Cadmi</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
<i>Thuỷ ngân</i>	Không được quá 1,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không được quá 5.000 cfu/g
<i>Salmonella spp.</i>	Âm tính
<i>E.coli</i>	Âm tính/1 g

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Sulfat</i>	Hoà tan 100 mg mẫu trong 20 ml nước (gia nhiệt nếu cần), thêm 3 ml dung dịch $BaCl_2$ TS và 5 ml dung dịch acid HCl loãng; lọc nếu có kết tủa. Đun sôi dung dịch hoặc phần dịch được lọc ra trong 5 phút. Xuất hiện kết tủa tinh thể trắng.
<i>Galactose</i> <i>anhydrogalactose</i>	và Tiến hành theo chỉ dẫn dưới phần Định tính các thành phần gồm (Quyển 4) sử dụng các chất chuẩn sau đây làm đối chiếu: galactose, rhamnose, acid galacturonic, 3,6 anhydrogalactose, mannose, xylose và arabinose. Galactose và 3,6 anhydrogalactose cần phải hiện diện.
<i>Keo ưa nước và chất đồng trùng hợp điển hình</i>	Cho 4 g mẫu vào 200 ml nước và gia nhiệt hỗn hợp trong chậu nước ở 80°C, khuấy với tốc độ nhất định cho đến khi hoà tan. Bổ sung lượng nước mất đi do quá trình bay hơi và làm nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng. Dung dịch sẽ trở nên nhớt và tạo gel. Thêm 200 mg KCl vào 50 ml dung dịch hoặc gel, sau đó lại gia nhiệt, khuấy đều và làm nguội. Gel giòn, dễ vỡ chỉ ra carrageenan chiếm ưu thế ở dạng kappa ; và gel mềm dẻo, đàn hồi chỉ ra carrageenan chiếm ưu thế ở dạng iota. Nếu dung dịch không tạo gel, carrageenan chiếm ưu thế ở dạng lambda.

Hấp thụ tia hồng ngoại

Ghi phổ hấp thụ tia hồng ngoại trên các phần gel và phần không gel của mẫu theo cách sau:

Hoà đều 2 g mẫu trong 200 ml dung dịch KCl 2,5%, khuấy trong 1 giờ. Để qua đêm, khuấy lại trong 1 giờ và chuyển vào một ống li tâm (nếu không chuyển được vì hệ phân tán quá nhớt, pha loãng với 200 ml dung dịch KCl). Li tâm khoảng 1.000 xg trong 15 phút.

Bỏ phần trong trên bề mặt, hoà tan phần cặn thu được trong 200 ml dung dịch KCl 2,5%, li tâm lại. Làm đông tụ phần nổi trên bề mặt bằng cách thêm gấp 2 lần thể tích ethanol 85% hoặc isopropanol (Lưu ý: giữ lại phần lắng xuống sử dụng theo cách làm sau). Thu hồi phần đông tụ và rửa bằng 250 ml cồn. Ép dịch lỏng của phần đông tụ ra ngoài và sấy khô ở 60°C trong 2 giờ. Sản phẩm thu được là phần không gel (lambda-carrageenan).

Hoà đều phần lắng xuống (đã được giữ lại ở trên) trong 250 ml nước lạnh, gia nhiệt ở 90°C trong 10 phút, làm nguội tới 60°C. Làm đông tụ hỗn hợp và sau đó thu hồi, rửa và sấy phần đông tụ theo cách làm trên. Sản phẩm thu được là phần gel (kappa và iota-carrageenan).

Chuẩn bị một dung dịch nước 0,2% cho mỗi phần, soi phim có độ dày 0,5 mm (khi sấy) trên bề mặt không dính như Teflon và thu được phổ hấp thụ tia hồng ngoại của mỗi phim (Ngoài ra, phổ hấp thụ có thể thu được nhờ kỹ thuật soi phim trên tấm kính phủ kali bromid nếu việc thực hiện tránh được ẩm).

Carrageenan có phổ hấp thụ rộng và mạnh, đặc trưng của tất cả polysaccharid trong vùng từ 1.000 đến 1.100 cm^{-1} . Hấp thụ tối đa là 1.065 và 1.020 cm^{-1} đối với dạng gel và dạng không gel. Các dải hấp thụ đặc trưng khác và cường độ hấp thụ tương ứng với hấp thụ tại 1.050 cm^{-1} như sau:

Số sóng (cm^{-1})	Phân tử	Độ hấp thụ tương ứng với 1.050 cm^{-1}		
		Kappa	Iota	Lambda da
1.220- 1.260	Ester sulfat	0,2-1,2	1,2-1,6	1,4- 2,0
928-933	3,6-anhydro galactose	0,2-0,6	0,2-0,4	0-0,2
840-850	Galactose-4-sulfat	0,1-0,5	0,2-0,4	-
825-830	Galactose-2-sulfat	-	-	0,2- 0,4
810-820	Galactose-6-sulfat	-	-	0,1- 0,3
800-805	3,6-anhydro galactose-2-sulfat	0-0,2	0,2-0,4	-

6.2. Độ tinh khiết

Sulfat

Nguyên tắc: Các nhóm sulfat thủy phân được kết tủa dưới dạng BaSO_4

Cách tiến hành:

(a) Hoà tan chính xác 8 g mẫu sản phẩm thương mại trong 400 ml hỗn hợp isopropanol/nước 60% (theo khối lượng) ở nhiệt độ phòng. Khuấy nhẹ nhàng trong 4 giờ. Lọc bằng giấy lọc không tro. Loại bỏ phần dịch lọc được. Rửa phần còn lại trên giấy lọc 2 lần bằng 10 ml hỗn hợp isopropanol/nước 60%. Sấy đến trọng lượng không đổi ở 105°C .

Phần (b) dùng khoảng 1 g chất khô. Phần còn lại được giữ lại để xác định hàm lượng tro toàn phần và hàm lượng chất không tan trong dung dịch acid.

(b) Cân chính xác 1 g mẫu (W_1) thu được ở phần (a) cho vào bình đáy tròn cổ dài dung tích 100 ml. Thêm 50 ml dung dịch acid HCl. Nối bình trên với một sinh hàn có ít nhất 5 bầu ngưng và đun sôi với sinh hàn ngược trong 1 giờ. Thêm 25 ml dung dịch hydrogen peroxyl và tiếp tục đun sôi với sinh hàn ngược trong khoảng 5 giờ hoặc cho đến khi dung dịch trong suốt hoàn toàn. Chuyển dung dịch vào cốc thủy tinh dung tích 600 ml, đun sôi và thêm 10 ml dung dịch BaCl_2 theo từng giọt. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng trong 2 giờ bằng cách thủy sôi. Lọc hỗn hợp qua giấy lọc không tro. Rửa bằng nước cất đun sôi cho đến khi dịch lọc không còn clorid. Sấy giấy lọc và các chất trong tủ sấy. Đốt ở 800°C trong chén sứ hoặc chén silica cho đến khi tro chuyển thành màu trắng. Để nguội trong bình hút ẩm.

Cân chén có tro. Tính % sulfat từ khối lượng gam (W_2) của tro (BaSO_4) sử dụng công thức: $(W_2/W_1) \times 100 \times 0,4116$

Hàm lượng tro toàn phần

Cho chính xác 2 g mẫu khô (W_1) thu được từ phần (a) trong cách tiến hành xác định sulfat ở trên vào chén silica hoặc nôi platin. Gia nhiệt mẫu bằng đèn hồng ngoại thích hợp, tăng cường độ dần dần cho đến khi mẫu hoàn toàn bị than hoá; tiếp tục gia nhiệt thêm khoảng 30 phút. Chuyển chén trên có chứa mẫu đã than hoá vào lò kín và nung ở 550°C trong 1 giờ. Làm nguội trong bình hút ẩm và cân. Làm lại việc nung trong lò kín cho đến khi đạt được khối lượng không đổi (W_2). Nếu tro không còn carbon không thu được sau lần nung thứ nhất, làm ẩm phần được than hoá bằng dung dịch NH_4NO_3 và sấy bằng đèn hồng ngoại. Làm lại bước nung.

Tính % tro toàn phần trong mẫu: $(W_2/W_1) \times 100$

Giữ lại tro cho định lượng tro không tan trong acid.

Độ nhớt

Cho 7,5 g mẫu và 450 ml nước đã khử ion vào cốc Berzelius dung tích 600 ml, khuấy từ 10 – 20 phút. Thêm vào lượng nước cần thiết để đạt khối lượng cuối cùng 500 g, khuấy và gia nhiệt trong cách thủy cho đến khi nhiệt độ đạt 80°C (khoảng 20 – 30 phút). Cho nước thêm vào để bù vào lượng nước mất đi do bốc hơi, làm nguội tới 76 – 77°C, gia nhiệt trong cách thủy ở nhiệt độ không đổi 75°C. Gia nhiệt trước phao và bộ phận bảo vệ của nhớt kế Brookfield LVF hoặc LVT khoảng 75°C trong nước. Sấy phao và bộ phận bảo vệ và lắp chúng vào nhớt kế đã được trang bị trục quay số 1 (đường kính 19 mm, chiều dài khoảng 65 mm) có khả năng quay 30 vòng/phút. Điều chỉnh độ cao của phao trong dung dịch mẫu, bắt đầu quay nhớt kế 30 vòng/phút và sau sáu vòng quay của nhớt kế, lấy nhớt kế đọc ở mức 0 – 100.

Nếu độ nhớt rất thấp, độ chính xác tăng lên có thể thu được bằng cách sử dụng UL Brookfield (cực thấp) bộ tiếp hợp hoặc tương đương. (Lưu ý: mẫu của một vài dạng carrageenan có thể quá nhớt để đọc khi sử dụng trục quay số 1). Những mẫu như vậy rõ ràng là vượt qua các đặc điểm kỹ thuật, nhưng nếu đọc độ nhớt mong muốn vì các lý do khác, sử dụng trục quay số 2 và đọc ở mức 0 - 100 hoặc ở mức 0 - 500).

Ghi lại các kết quả (đơn vị cP) thu được bằng cách đọc trên nhớt kế theo hệ số được đưa ra bởi nhà sản xuất Brookfield.

Dư lượng dung môi

Dung dịch alcol chuẩn:

Cho 500 mg mỗi loại methanol, ethanol và isopropanol có chất lượng dùng cho sắc ký vào bình định mức dung tích 50 ml, pha loãng bằng nước cho đủ thể tích 50 ml, lắc đều. Dùng pipet lấy 10 ml của dung dịch trên vào bình định mức 100 ml, pha loãng bằng nước cho đủ thể tích 100 ml, lắc đều.

Dung dịch TBA chuẩn:

Cho 500 mg tertiary-butyl alcol tinh khiết dùng cho sắc ký vào bình định mức dung tích 50 ml, pha loãng bằng nước cho đủ thể tích 50 ml, lắc đều. Dùng pipet lấy 10 ml của dung dịch trên vào bình định mức 100 ml, pha loãng bằng nước cho đủ thể tích 100 ml, lắc đều.

Hỗn hợp dung dịch chuẩn:

Dùng pipet lấy 4 ml mỗi loại dung dịch alcol chuẩn và dung dịch TBA chuẩn cho vào bình tam giác dung tích 125 ml, pha loãng đến thể tích khoảng 100 ml bằng nước và lắc đều. Dung dịch này chứa khoảng 40 µg mỗi alcol/ml.

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử:

Hoà tan 1 ml nhũ tương chống bọt thích hợp như Dow-Corning G-10 hoặc tương đương trong 200 ml nước đựng trong bình chưng cất đáy tròn 24/40 dung tích 1.000 ml. Thêm vào 5 g mẫu và lắc bằng máy lắc trong 1 giờ. Nối bình chưng cất với cột phân đoạn và chưng cất khoảng 100 ml, điều chỉnh nhiệt để bọt không được vào trong cột. Thêm 4,0 ml dung dịch chuẩn TBA vào phần chưng cất được để được dung dịch mẫu thử.

Cách tiến hành:

Bơm 5 µl hỗn hợp dung dịch chuẩn vào sắc ký khí thích hợp được trang bị detector ion hoá ngọn lửa và cột thép không rỉ 1,8-m x 3,2-mm được nhồi bằng Porapak QS 80/100-mesh hoặc tương đương. Chất mang là khí heli với tốc độ dòng 80 ml/phút. Nhiệt độ buồng bơm mẫu 200°C, nhiệt độ cột 165°C và nhiệt độ detector 200°C. Thời gian lưu của isopropanol khoảng 2 phút và thời gian lưu của tertiary-butyl alcol khoảng 3 phút.

Tính diện tích pic của methanol, ethanol, isopropanol và TBA. Tính hệ số đáp ứng của mỗi loại f_i theo công thức A_i/A_{TBA} , trong đó A_i là diện tích pic của mỗi alcol (i = methanol, ethanol hoặc isopropanol).

Tương tự, bơm 5 µl dung dịch mẫu thử và tính các diện tích pic, ghi diện tích của mỗi pic alcol là A_i và diện tích pic của tertiary-butyl alcol là A_{TBA} .

Tính hàm lượng từng alcol (mg/kg) có trong mẫu theo công thức:

$$A_i \cdot 4000 / f_i \cdot A_{TBA} \cdot W$$

Trong đó: W là khối lượng mẫu lấy (g)

Chì

Nguyên tắc:

Mẫu được tro hoá, làm ẩm bằng các acid nitric, acid perchloric và được phân tích bằng cách đo phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa (Quyển 4).

Thiết bị:

Máy đo phổ hấp thụ nguyên tử

Hoá chất:

- Acid nitric, đậm đặc, tinh khiết
- Acid perchloric, đậm đặc, tinh khiết
- Acid hydrochloric, đậm đặc, tinh khiết
- Dung dịch chuẩn chì (đã công bố)

Dung dịch:

- Dung dịch gốc (1mg/ml): Pha một thể tích thích hợp của dung dịch chuẩn chì đã công bố với nước cất và đã khử ion (D/D nước) để được 1 lít dung dịch.
- Dung dịch trung gian: (a) 100 µg/ml: Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch gốc cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước cất. (b) 10 µg/ml. Dùng pipet lấy 10 ml của dung dịch 100 µg/ml cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước cất.
- Dung dịch chuẩn: Lấy 4 bình định mức dung tích 100 ml và chuyển vào chúng lần lượt 1, 5, 10, 20 ml dung dịch chì trung gian (b). Pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước để tạo các dung dịch có nồng độ là 0,1; 0,5; 1 và 2 µg Pb/ml.

Chuẩn bị mẫu: (Chú ý: cách làm này sử dụng các acid oxy hoá đậm đặc và dẫn đến bay hơi của các khí độc. Phải thực hiện trong tủ hút).

Cân chính xác 7,5 g mẫu thử dạng bột khô đại diện cho vào bình tam giác dung tích 250 ml. Làm mẫu trắng và thực hiện các bước tương tự như với mẫu thử. Làm ẩm mẫu thử bằng khoảng 10 ml D/D nước và thêm 25 ml dung dịch acid nitric. Gia nhiệt nhẹ nhàng trên tấm gia nhiệt (100 – 150°C) cho đến khi hầu hết khói đen thoát ra (khoảng 1 giờ); Thỉnh thoảng lắc bình. Làm nguội và thêm 5 ml dung dịch acid perchloric; ở giai đoạn này các cấu tử trở nên dễ nhìn thấy. Gia nhiệt nhẹ nhàng (bằng tấm gia nhiệt, 100 – 150°C) để cô cho đến khi dung dịch chuyển sang màu hơi vàng hoặc không màu (khoảng 1 giờ). Ở giữa quá trình gia nhiệt nếu dung dịch sẫm màu, thêm từ từ mấy lần 2 – 3 ml dung dịch acid nitric nếu cần thiết cho đến khi đạt được màu mong muốn; không được để dung dịch cạn. Làm nguội phần đã gia nhiệt và rửa thành bình bằng khoảng 5 ml D/D nước và lắc xoáy. Bổ sung 2 ml dung dịch acid hydrochloric. Gia nhiệt lại cho đến khi tất cả khói màu nâu được thoát ra và dung dịch có màu trắng tới vàng nhạt. Không được để dung dịch cạn. Làm nguội dung dịch và rửa thành bình bằng khoảng 10 ml D/D nước. Chuyển dung dịch hơi nhớt vào bình định mức dung tích 50 ml và pha đến thể tích 50 ml bằng D/D nước cất. Lọc bằng giấy lọc 2 lớp (Whatman số 5 hoặc loại tương đương).

Định lượng:

Cho vào máy đo phổ hấp thụ nguyên tử trước đó đã thiết lập các điều kiện tối ưu ở bước sóng 283,3 nm sử dụng không khí/acetylen oxy hoá ngọn lửa. Đo độ hấp thụ của mẫu thử, mẫu trắng và dung dịch chuẩn.

Vẽ đường chuẩn trên đồ thị độ hấp thụ với nồng độ chì ($\mu\text{g Pb/ml}$) của mẫu trắng và dung dịch chuẩn. Định lượng nồng độ chì trong dung dịch mẫu thử từ đường chuẩn.

Nồng độ chì trong mẫu thử (mg Pb/kg):

$$[\text{Pb}] = F \times A/B$$

Trong đó: A là nồng độ chì trong dung dịch mẫu ($\mu\text{g/ml}$)

B là khối lượng mẫu thử (g)

F là hệ số pha loãng (50 ml)

Cadmi

Thực hiện như hướng dẫn trên đối với định lượng chì, sử dụng bước sóng phân tích 228,8 nm. Dung dịch trung gian và dung dịch mẫu được chuẩn bị từ dung dịch chuẩn cadmi đã công bố:

- Dung dịch trung gian: (a) 100 $\mu\text{g/ml}$: Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch gốc (1 mg/ml) cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước cất. (b) 10 $\mu\text{g/ml}$: Dùng pipet lấy 10 ml của dung dịch (a) cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước cất. (c) 1 $\mu\text{g/ml}$: Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch (a) cho vào bình định mức 100 ml, pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước cất.

- Dung dịch chuẩn: Lấy 5 bình định mức dung tích 50 ml và chuyển vào chúng lần lượt 0,5; 2,5; 5, 10, 20 ml dung dịch trung gian (c). Pha đến thể tích 50 ml bằng D/D nước cất để tạo các dung dịch có nồng độ là 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 và 0,4 $\mu\text{g Cd/ml}$.

Nồng độ cadmi trong mẫu thử (mg Cd/kg):

$$[\text{Cd}] = F \times A/B$$

Trong đó: A là nồng độ cadmi trong dung dịch mẫu ($\mu\text{g/ml}$)

B là khối lượng mẫu thử (g)

F là hệ số pha loãng (50 ml)

Thủy ngân

Nguyên tắc:

Mẫu được tro hoá, làm ẩm bằng các acid nitric, acid perchloric và được phân tích bằng cách đo phổ hấp thụ nguyên tử H^+ (Quyển 4)

Thiết bị:

Máy đo phổ hấp thụ nguyên tử được trang bị với thiết bị tạo hơi hydrogen. Không thể thiếu ống phản ứng hoặc cuộn dây và bơm pittông với các kênh ống kép: một kênh dành cho dung dịch mẫu và một kênh dành cho 2 ống dung dịch hoá chất. Kiểm soát dòng chảy được xác định bởi cỡ ống và đầu nối ống. Tốc độ dòng được đo ở đường ra của thiết bị tạo khí hydrogen.

Hoá chất:

- Acid nitric, đậm đặc, tinh khiết
- Acid perchloric, đậm đặc, tinh khiết
- Acid hydrochloric, đậm đặc, tinh khiết
- Natri borohydrid, > 98%
- Natri hydroxyd, tinh khiết
- Dung dịch chuẩn thuỷ ngân (đã công bố)

Dung dịch:

- Hỗn hợp dung dịch acid nitric và acid perchloric (1 : 1): Trộn theo tỷ lệ thể tích như nhau của hai acid.
- Dung dịch acid HCl 5M: Pha 417 ml dung dịch acid HCl đậm đặc đến thể tích 1 lít bằng nước đã khử ion.
- Dung dịch natri borohydrid 0,4% (chuẩn bị ngay trước khi dùng): Trước tiên, hoà tan 2,5 g NaOH trong nước đã khử ion. Sau đó, thêm và hoà tan 2,0 g natri borohydrid. Pha tới thể tích 500 ml.
- Dung dịch gốc (1 mg/ml): Pha một thể tích thích hợp dung dịch chuẩn thuỷ ngân đã công bố bằng nước cất và đã khử ion (D/D nước) tới thể tích 1 lít.
- Dung dịch trung gian: (a) 10.000 µg/l: Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch gốc cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước. (b) 100 µg/l: Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch 10.000 µg/l cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước cất.
- Dung dịch chuẩn: Lấy 5 bình định mức dung tích 100 ml và chuyển vào chúng lần lượt 1; 5, 10, 15 và 20 ml dung dịch trung gian (b). Mỗi bình bổ sung 10 ml hỗn hợp dung dịch acid nitric và acid perchloric (1:1). Pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước cất để tạo các dung dịch có nồng độ là 1; 5; 10; 15 và 20 µg Hg/l.

Chuẩn bị mẫu: (Chú ý: cách làm này sử dụng các acid oxy hoá đậm đặc và dẫn đến bay hơi của các khí độc. Phải thực hiện trong tủ hút).

Cân chính xác 5 g mẫu thử dạng bột khô đại diện cho vào bình tam giác dung tích 250 ml. Làm mẫu trắng và thực hiện các bước tương tự như với mẫu thử. Làm ẩm mẫu thử bằng 5 ml D/D nước và thêm 10 ml hỗn hợp dung dịch acid nitric và acid perchloric (1:1). Gia nhiệt nhẹ nhàng trên tấm gia nhiệt (100 – 150°C) cho đến khi hầu hết khói đen thoát ra và dung dịch chuyển sang màu vàng nhạt hoặc không màu; Thỉnh thoảng lắc bình. Không được để dung dịch cạn. Làm nguội và rửa thành bình bằng lượng nhỏ D/D nước. (Một vài cấu tử có thể nhìn thấy được). Đậy bình nhẹ nhàng. Để dung dịch nhốt không đáng kể qua đêm. Chuyển dung dịch vào bình định mức dung tích 50 ml và pha đến thể tích 50 ml bằng D/D nước. Lọc vào bình tam giác bằng giấy lọc 2 lớp (Whatman số 5 hoặc loại tương đương). Nhúng bình vào chậu siêu âm và bật chế độ rung siêu âm trong 10 phút hoặc cho đến khi bọt không được tạo thành trên bề mặt dung dịch.

Định lượng: Hiệu chỉnh (sử dụng nước) máy bơm pittông để đưa ra tốc độ dòng của dung dịch mẫu 8 ml/phút và tốc độ dòng kết hợp của hai dung dịch (Natri borohydrid và acid hydrochloric 5M) 2 ml/phút. (Tốc độ

dòng kết hợp được thực hiện với một thiết lập bơm duy nhất).

Đặt mẫu vào máy quang phổ trước đó đã thiết lập các điều kiện tối ưu ở bước sóng đèn đối với thủy ngân 253,7 nm.

Chuyển lượng thích hợp của hai dung dịch hoá chất vào các ống đong có chia vạch định mức riêng biệt. Đặt ống hút riêng biệt từ bơm pittông vào mỗi dung dịch hoá chất và bình chứa mẫu. Bắt đầu dòng của khí mang argon (áp suất đầu ra của thùng chứa: $3,2 \pm 0,2 \text{ kg/cm}^2$) thông qua thiết bị tạo hơi hydrogen của máy quang phổ. Khởi động bơm để bắt đầu dòng của ba dung dịch trong ống góp của thiết bị tạo hydrogen. Tại ống góp các dung dịch được trộn đều với nhau và chảy trong ống xoắn ruột gà để tạo ra thủy ngân nguyên tử và thủy ngân nguyên tử được mang đến buồng hấp thụ của máy quang phổ hấp thụ. Đo độ hấp thụ cho mẫu. Lặp lại đối với dung dịch mẫu trắng và mỗi dung dịch chuẩn.

Vẽ đường chuẩn trên đồ thị độ hấp thụ với nồng độ thủy ngân ($\mu\text{g Hg/l}$) của mẫu trắng và dung dịch chuẩn. Định lượng nồng độ thủy ngân trong dung dịch mẫu thử từ đường chuẩn.

Nồng độ thủy ngân trong mẫu thử (mg Hg/kg):

$$[\text{Hg}] = F \times A/1000B$$

Trong đó: A là nồng độ thủy ngân trong dung dịch mẫu ($\mu\text{g/l}$)

B là khối lượng mẫu thử (g)

F là hệ số pha loãng (50 ml)

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Thêm 50 g mẫu vào 450 ml dung dịch pha loãng phosphat đệm của Butterfield và đồng hoá hỗn hợp trong một máy trộn tốc độ cao.

PHỤ LỤC 8

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM ĐẬU CAROB

	Locust bean gôm, carob gôm
1. Tên khác, chỉ số	INS 410
2. Định nghĩa	Xuất xứ là nội nhũ được nghiền của các hạt từ <i>Ceratonia siliqua</i> (L) Taub. (Fam. <i>leguminosae</i>) chủ yếu bao gồm khối lượng phân tử cao (khoảng 50.000 – 3.000.000) các polysaccharid gồm có các galactomannan. Các hạt được tách vỏ ngoài bằng cách xử lý nhân hạt với acid sulfuric loãng ở nhiệt độ cao hoặc rang nhân hạt, tiếp theo là xay và sàng hạt để có được những nội nhũ. Gôm được làm sạch bằng cách rửa với ethanol hoặc isopropanol hoặc hoà trong nước sôi, sau đó lọc, làm bốc hơi dung môi và sấy khô.
Mã số C.A.S.	9000-40-2
	Dạng bột màu trắng đến màu trắng hơi vàng, gần như không có mùi
3. Cảm quan	
	Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hoá
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong ethanol
Tạo gel	Phải có phản ứng tạo gel đặc trưng.
Độ nhớt	Phải có phép thử đặc trưng của độ nhớt.
Thành phần gồm	Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần gôm.
Kiểm tra hiển vi	Phân tán mẫu gôm trong dung dịch nước chứa 0,5% iod và 1% kali iodid trải lên tiêu bản kính và soi bằng kính hiển vi. Gôm đậu carob chứa các tế bào dạng ống căng dài, tách biệt hoặc hơi đan xen nhau. Các thành phần của gôm đậu carob có màu nâu được hình thành ít thường xuyên hơn ở gôm Guar. (Gôm Guar cho thấy các nhóm tế bào dạng hình tròn tới dạng quả lê. Các thành phần của gôm Guar có màu vàng tới màu nâu).
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 14,0% (nhiệt độ sấy 105°C trong 5 giờ).
Tro tổng số	Không được quá 1,2% (nhiệt độ sấy 800°C trong 3 – 4 giờ).
Chất không tan trong acid	Không được quá 4,0% (Thử với chính xác 1,5 g mẫu thử)
Protein	Không được quá 7,0%.
Tinh bột	Không phát hiện được.
Ethanol và isopropanol	Không được quá 1%, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả ở phần Phương pháp thử)

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3 Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật Không được quá 5.000 CFU/g

E.coli Âm tính đối với mẫu thử

Salmonella Âm tính đối với mẫu thử

Nấm men và nấm mốc Không được quá 500 CFU/g

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo gel Thêm lượng nhỏ dung dịch natri borat TS vào dung dịch mẫu đã được phân tán bằng nước; gel được hình thành.

Độ nhớt Cho 2 g mẫu vào trong cốc dung tích 400 ml và làm ẩm hoàn toàn bằng 4 ml isopropanol. Bổ sung 200 ml nước và khuấy mạnh, tiếp tục khuấy cho đến khi gồm được phân tán đều hoàn toàn. Một dung dịch hơi nhớt màu trắng sữa được hình thành. Chuyển 100 ml dung dịch này vào một cốc khác dung tích 400 ml. Gia nhiệt hỗn hợp trong cách thủy sôi trong 10 phút và làm nguội tới nhiệt độ phòng. Có sự tăng độ nhớt đáng kể (đây là sự khác biệt giữa gồm đậu carob với gồm Guar).

Thành phần gồm Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định tính thành gồm (Vol. 4) sử dụng 100 mg mẫu thay thế cho 200 mg và 1 – 10 µl hydrolysate thay thế cho 1 – 5 µl. Sử dụng galactose và mannose như là chất chuẩn đối chứng. Các thành phần này luôn có mặt.

6.2. Độ tinh khiết

Protein Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định lượng nitrogen (Phương pháp Kjeldahl). % protein trong mẫu bằng % nitrogen định lượng được nhân với 6,25.

Tinh bột Thêm một vài giọt iod TS vào dung dịch mẫu 1/10. Không được xuất hiện màu xanh.

Ethanol và isopropanol

Nguyên tắc:

Các alcol được chuyển thành các ester nitrit tương ứng và được xác định bằng sắc ký khí không gian hơi.

Chuẩn bị mẫu:

Hoà tan 100 mg mẫu trong 10 ml nước sử dụng NaCl như là chất làm phân tán nếu cần.

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l n – propanol

Dung dịch alcol chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l mỗi loại ethanol và isopropanol

Cách tiến hành:

Cân 200 mg ure cho vào một lọ sẫm màu dung tích 25 ml (Reacti-flasks, Pierce, Rockford, IL, USA, hoặc tương đương). Làm trong bằng nitrogen trong 5 phút và sau đó thêm 1 ml dung dịch acid oxalic bão hoà, đóng bằng nút cao su và lắc xoáy. Thêm 1 ml dung dịch mẫu, 1 ml dung dịch nội chuẩn và đồng thời bắt đầu bấm giờ ($T = 0$). Lắc xoáy lọ và đậy nút lại bằng nút xoáy có đệm cao su silicon. Lắc xoáy cho đến khi $T = 30$ giây. Tại thời điểm $T = 45$ giây, bơm qua đệm cao su silicon 0,5 ml dung dịch natri nitrit (250 g/l). Lắc mạnh cho đến khi $T = 70$ giây và ở $T = 150$ giây hút qua đệm cao su silicon 1 ml không gian hơi sử dụng syringe khoá áp (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, Louisiana, USA, hoặc tương đương).

Sắc ký khí:

Đưa kim syringe vào cổng bơm; đẩy mẫu sau đó mở syringe và bơm mẫu.

Sử dụng các điều kiện sau:

- Cột: thủy tinh (đường kính trong 4 mm, chiều dài 90 cm)
- Chất nhồi: 15 cm đầu được nhồi bằng chrompack (hoặc tương đương) và phần còn lại được nhồi bằng Porapak R 120 -150 mesh (hoặc tương đương)
- Khí mang: nitrogen (tốc độ dòng: 80 ml/phút)
- Detector: ion hoá ngọn lửa
- Nhiệt độ: cổng bơm 250°C, cột 150°C đẳng nhiệt

Tính kết quả:

Định lượng ethanol và isopropanol có mặt trong mẫu bằng cách so sánh các diện tích pic với các pic thu được nhờ sắc ký khí không gian hơi được hình thành do thay thế 1 ml dung dịch chuẩn alcol cho 1 ml dung dịch mẫu trong Cách tiến hành nêu ở trên.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Chỉ tiêu vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ vào mỗi đĩa petri khoảng 12 – 15 ml agar PCA trước đó đã được làm nguội đến 44 – 46°C. Trộn đều bằng cách quay đảo lượt di chuyển trước, sau các đĩa, để cho agar đông đặc. Lật ngược các đĩa petri và ủ trong 48 ± 2 giờ ở 35 ± 1°C.

Sau khi ủ, đếm các khuẩn lạc phát triển nhìn thấy được trên mỗi đĩa và ghi lại số khuẩn lạc. Lấy trung bình của hai đĩa và nhân với hệ số pha loãng mẫu 100. Trường hợp không có khuẩn lạc được nhìn thấy, kết quả được thể hiện là nhỏ hơn 100 CFU/g.

E.coli

Sử dụng cellulase để phân giải mẫu gồm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gồm trong suốt quá trình thêm gồm vào canh thang tăng sinh. Chuẩn bị dung dịch cellulase 1% (1 g cellulase trong 99 ml nước) và tiệt trùng bằng cách lọc qua màng 0,45 µm (Dung dịch cellulase có thể bảo quản ở 2 – 5°C trong 2 tuần). Cho vào ống tiệt trùng có chứa 9 ml canh trường có lauryl sulfat tryptose (LST), thêm vào 0,1 ml dung dịch cellulase 1% đã tiệt trùng. Bổ sung 1 g mẫu gồm vào ống và lắc mạnh bằng máy lắc Vortex để phân tán mẫu. Ủ ống trong 24 – 48 giờ ở 35 ± 1°C. Sau 24 giờ, lắc nhẹ ống và kiểm tra sự tạo khí, tức là sự sủi bọt. Lại ủ thêm 24 giờ nếu quan sát không thấy khí thoát ra. Kiểm tra khí lần 2. Thực hiện kiểm tra xác nhận kết quả được cho là dương tính như sau :

Lắc nhẹ ống LST có thoát khí và lấy chuyển một que cấy của thể rắn vào một ống chứa 10 ml canh trường EC và một lọ lên men (Durham). Ủ ống EC trong 24 – 48 giờ ở 45,5 ± 2°C. Sau 24 giờ kiểm tra sự tạo khí; nếu âm tính, kiểm tra lại sau 48 giờ. Dùng que cấy lấy một vệt của thể rắn từ ống có sinh khí cho lên trên agar L-EMB. Quan trọng là một phần của mặt thạch xuất hiện những khuẩn lạc tách biệt. Ủ trong 18 – 24 giờ ở 35°C. Kiểm tra các đĩa đối với các khuẩn lạc điển hình của *E.coli* tức là hướng tâm màu thâm có hoặc không có ánh kim loại. Chọn hai khuẩn lạc được cho là dương tính và chuyển chúng vào thạch nghiêng PCA để kiểm tra hoá sinh và hình thái học. Ủ thạch nghiêng PCA trong 18 – 24 giờ ở 35 ± 1°C, sau đó nhuộm màu Gram trên chủng nuôi cấy. Nếu môi trường Gram âm (dạng hình que ngắn) thực hiện một trong hai sơ đồ thử hoá sinh sau đây:

Sơ đồ 1.A. Thử hoạt tính hoá sinh IMViC:

a. Tính sinh indol: Cấy vào một ống canh trường trypton và ủ trong 24 giờ ở 35°C. Thử indol bằng cách thêm 0,2 - 0,3 ml hóa chất Kovacs. Mẫu thử dương tính nếu xuất hiện màu đỏ khác biệt ở lớp chắt lỏng phía trên.

b. Hợp chất phản ứng Voges-Proskauer: Cấy vào một ống canh trường MR-VP và ủ trong 48 giờ ở 35°C. Chuyển 1 ml vào 1 ống cỡ 13x100 mm. Thêm 0,6 ml dung dịch alpha-naphthol và 0,2 ml dung dịch KOH 40%, lắc đều. Thêm vài tinh thể creatin. Lắc và để yên 2 giờ. Mẫu thử dương tính nếu màu hồng eosin lan trong môi trường.

c. Hợp chất phản ứng đồ methyl: Ủ ống MR-VP từ phép thử Voges-Proskauer thêm 48 giờ ở 35°C. Thêm 5 giọt dung dịch đồ methyl vào mỗi ống. Mẫu thử dương tính nếu có màu đỏ khác biệt. Mẫu thử âm tính nếu có màu vàng xuất hiện.

d. Khả năng sử dụng citrat: Cấy nhẹ nhàng vào một ống canh trường Koser citrat; tránh làm đục. Ủ ở 35°C trong 96 giờ. Phản ứng dương tính

khi độ đục khác biệt tăng lên.

Sơ đồ 1.B. Sử dụng chủng cấy mọc trên thạch nghiêng PCA, cấy chuyển vào 1 ống canh trường LST có chứa lọ Durham và ủ ở 35°C trong 48 giờ để kiểm tra sự phân lập có khả năng tạo acid và khí từ quá trình lên men lactose.

Nội suy: Các chủng cấy (a) sinh khí là kết quả của quá trình cấy canh trường LST và tiếp sau ủ trong 24 – 28 giờ ở 35°C, (b) xuất hiện như là Gram âm dạng que không sinh bào tử và (c) đưa các dạng IMViC – (typ sinh học 1) hoặc -+- (typ sinh học 2) được xem là E.coli.

Sơ đồ 2. Phân tán bất kỳ khuẩn lạc đang phát triển vào một thể tích nhỏ nước muối 0,85%. Khẳng định định tính sự phát triển của vi khuẩn bởi các xét nghiệm hóa học được thực hiện thuận tiện bằng cách sử dụng API 20E hoặc dải Micro ID hoặc các hệ thống tương đương. Sau khi hoàn thành các thử nghiệm, xác định định tính các sinh vật từ Sách chỉ dẫn định tính của hệ thống sử dụng và ghi lại kết quả cuối cùng.

Salmonella

Sử dụng cellulase để phân rã mẫu gồm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gồm trong suốt quá trình thêm gồm vào canh thang tăng sinh. Chuẩn bị dung dịch cellulase 1% (1 g cellulase trong 99 ml nước) và tiệt trùng bằng cách lọc qua màng 0,45 µm (Dung dịch cellulase có thể bảo quản ở 2 – 5°C trong 2 tuần). Bổ sung 25 g mẫu gồm vào cốc vô trùng dung tích 250 ml hoặc dụng cụ chứa khác thích hợp. Cho vào 1 lọ nắp xoáy miệng rộng vô trùng hoặc 1 dụng cụ chia khác thích hợp 225 ml canh trường lactose tiệt trùng và 2,25 ml dung dịch cellulase 1% tiệt trùng. Trong khi khuấy canh trường cellulase/lactose bằng máy khuấy từ cho nhanh 25 g mẫu qua phễu thủy tinh vô trùng vào canh trường cellulase/lactose. Đặt nắp dụng cụ chứa chắc chắn và để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng. Nới lỏng nắp đây và ủ dụng cụ chứa ở 35 ±1 °C trong 24 ±2 giờ. Siết chặt nắp đây và lắc nhẹ hỗn hợp mẫu đã ủ; chuyển 1 ml hỗn hợp vào 10 ml canh trường selenit cystin (SC) và 1 ml khác của hỗn hợp cho vào 10 ml canh trường tetrathionat (TT). Ủ trong 24 ±2 giờ ở 35°C. Lắc (bằng máy Vortex nếu sử dụng ống) và rĩa 1 vòng que cấy 3 mm canh trường TT đã ủ trên agar bismuth sulfit (BS), agar xylose lysin desoxycholat (XLD) và agar Hektoen enteric (HE). (Chuẩn bị các đĩa BS một ngày trước khi rĩa cấy và bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ phòng). Lặp lại đối với canh trường SC với 1 vòng 3 mm của que cấy. Ủ trong 24 ±2 giờ ở 35°C. Tiếp tục như được chỉ ra ở Quyển 4, "Kiểm tra các đĩa về sự hiện diện của khuẩn lạc".

Nấm men và nấm mốc

Cân 25 g mẫu và thêm vào 2.475 ml nước pepton 0,1% đã tiệt trùng (được chuẩn bị bằng cách cho 1 g pepton vào 1 lít nước cất, khuấy đều cho pepton tan hoàn toàn và hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút) trong khi khuấy mạnh bằng máy khuấy từ. Khuấy cho đến khi mẫu được tan hoàn toàn. Tỷ lệ pha loãng 1 : 1.000. Dùng pipet đã tiệt trùng lấy 0,1 ml cho vào 10 đĩa CCPDA-D đặc đã được làm trước đó mỗi tấm 0,1 ml (xem dưới đây). Dàn đều lên bề mặt của các đĩa, sử dụng que thủy tinh vô trùng. Ủ đĩa thẳng đứng trong 5 ngày ở 25°C, để yên, không dao động.

Sau khi ủ, đếm khuẩn lạc phát triển trên mỗi đĩa sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc và ghi tổng số khuẩn lạc có trên 10 đĩa. Tách nấm men ra khỏi nấm mốc dựa vào hình thái của chúng và đếm riêng. Lấy tổng số khuẩn lạc có trong cả 10 đĩa nhân với 100 để có được CFU/g mẫu. Nếu không có khuẩn lạc nào trên đĩa thì biểu diễn kết quả nhỏ hơn 100 CFU/g.

Môi trường CCPDA-D: Trước tiên chuẩn bị dung dịch gốc dichloran 2% (2,6-dichloran-4-nitroanilin) trong ethanol 95%. Sau đó, thêm một lượng dung dịch gốc dichloran đủ vào PDA để đạt được nồng độ 2,5 mg/l. Thêm chloramphenicol cho đến nồng độ 50 mg/l và hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Làm nguội môi trường đến khoảng 50°C trước khi rót đĩa, thêm chlortetracyclin đã được lọc và tiệt trùng đủ để có nồng độ 50 mg/l.

PHỤ LỤC 9

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM GUAR

- | | |
|----------------------------|---|
| 1. Tên khác, chỉ số | Gôm cyamopsis, guar flour
INS 412 |
| 2. Định nghĩa | Xuất xứ là nội nhũ được nghiền của các hạt từ cây <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (L) Taub. (Fam. <i>Leguminosae</i>) chủ yếu bao gồm polysaccharid có trọng lượng phân tử cao (khoảng 50.000 – 8.000.000) gồm có các galactomannan; tỷ lệ mannose: galactose là 2 : 1. Gôm được làm sạch bằng cách rửa với ethanol hoặc isopropanol hoặc hoà trong nước sôi, sau đó lọc, cô và sấy khô. |
| <i>Mã số C.A.S.</i> | 9000-30-0 |
| 3. Cảm quan | Dạng bột rời màu trắng đến màu trắng vàng, gần như không có mùi |
| 4. Chức năng | Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hoá |
| 5. Yêu cầu kỹ thuật | |
| 5.1. Định tính | |

<i>Tạo gel</i>	Thêm lượng nhỏ dung dịch natri borat TS vào dung dịch mẫu được làm phân tán bằng nước; gel được hình thành.
<i>Độ nhớt</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của độ nhớt.
<i>Thành phần gồm</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần gồm.
<i>Kiểm tra hiển vi</i>	Nghiền mẫu với dung dịch nước chứa 0,5% iod và 1% kali iodid, phết lên tiêu bản kính và soi bằng kính hiển vi. Gôm guar chứa các tế bào dạng hạt hình tròn hoặc hình trái lê, tụ thành đám, bên trong chứa các chất có màu vàng đến nâu. (Gôm đậu carob gồm có các nhóm tế bào dạng ống căng dài, tách biệt hoặc có khoảng trống nhỏ. Các thành phần bên trong của gôm đậu carob có màu nâu được hình thành ít hơn so với trong gôm Guar).

5.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15,0% (nhiệt độ sấy 105°C trong 5 giờ).
<i>Borat</i>	Không phát hiện được.
<i>Tro toàn phần</i>	Không được quá 1,5%
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 7,0%
<i>Protein</i>	Không được quá 10,0%.
<i>Ethanol và isopropanol</i>	Không được quá 1%, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3 Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Tổng số vi sinh vật</i>	Không được quá 5.000 CFU/g
<i>E. coli</i>	Âm tính đối với mẫu thử
<i>Salmonella</i>	Âm tính đối với mẫu thử
<i>Nấm men và nấm mốc</i>	Không được quá 500 CFU/g

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Độ nhớt</i>	Cho 2 g mẫu vào trong cốc dung tích 400 ml và làm ẩm hoàn toàn bằng 4 ml isopropanol. Bổ sung 200 ml nước và khuấy mạnh, tiếp tục khuấy cho đến khi gôm được phân tán đều hoàn toàn. Một dung dịch hơi nhớt màu trắng sữa được hình thành. Chuyển 100 ml dung dịch này vào một cốc khác dung tích 400 ml. Gia nhiệt hỗn hợp trong cách thủy sôi trong 10 phút và làm nguội tới nhiệt độ phòng. Không có sự tăng độ nhớt đáng kể (đây là sự khác biệt giữa gôm guar với gôm đậu carob).
<i>Thành phần gồm</i>	Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định tính thành phần gồm (FNP 5) sử dụng 100 mg mẫu thay thế cho 200 mg và 1 – 10 µl chất thủy phân thay thế cho 1 – 5 µl. Sử dụng galactose và mannose như là chất chuẩn đối chứng. Các thành phần này cần phải có mặt.

6.2. Độ tinh khiết

Borat

Hoà tan 1 g mẫu trong 100 ml nước. Dung dịch phải giữ được ở dạng lỏng và không tạo gel khi để yên. Trộn vào 10 ml dung dịch acid HCl loãng và cho một giọt hỗn hợp vừa trộn lên trên giấy nhệ. Không được tạo thành đồ nâu đậm dần trong khi sấy và thay đổi thành màu đen lục khi làm ẩm bằng dung dịch ammoniac TS.

Protein

Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định lượng nitrogen (Phương pháp Kjeldahl; FNP5). % protein trong mẫu bằng % nitrogen trong mẫu nhân với 6,25.

Ethanol và isopropanol

Nguyên tắc:

Các alcol được chuyển thành các ester nitrit tương ứng và được xác định bằng sắc ký khí (Xem quyển 4).

Chuẩn bị mẫu:

Hoà tan 100 mg mẫu trong 10 ml nước sử dụng NaCl như là chất làm phân tán nếu cần.

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l n - propanol

Dung dịch alcol chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l mỗi loại ethanol và isopropanol

Cách tiến hành:

Cân 200 mg ure cho vào một lọ sẫm màu dung tích 25 ml Reacti-flasks, Pierce, Rockford, IL, USA, hoặc tương đương). Làm trong bằng nitrogen trong 5 phút và sau đó thêm 1 ml dung dịch acid oxalic bão hoà, đóng bằng nút cao su và lắc xoáy. Thêm 1 ml dung dịch mẫu, 1 ml dung dịch nội chuẩn và đồng thời bắt đầu bấm giờ (T = 0). Lắc xoáy lọ và đậy nút lại bằng nút xoáy có đệm cao su silicon. Lắc xoáy cho đến khi T = 30 giây. Tại thời điểm T = 45 giây, bơm qua đệm cao su silicon 0,5 ml dung dịch natri nitrit (250 g/l). Lắc mạnh cho đến khi T = 70 giây và ở T = 150 giây hút qua đệm cao su silicon 1 ml không gian hơi sử dụng syringe khoá áp (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, Louisiana, USA, hoặc tương đương).

Sắc ký khí:

Đưa kim syringe vào cổng bơm; đẩy mẫu sau đó mở syringe và bơm mẫu.

Sử dụng các điều kiện sau:

- Cột: thuỷ tinh (đường kính trong 4 mm, chiều dài 90 cm)
- Chất nhồi: 15 cm đầu được nhồi bằng chrompack (hoặc tương đương) và phần còn lại được nhồi bằng Porapak R 120 -150 mesh (hoặc tương đương)
- Khí mang: nitrogen (tốc độ dòng: 80 ml/phút)
- Detector: ion hoá ngọn lửa
- Nhiệt độ: cổng bơm 250°C, cột 150°C đẳng nhiệt

Tính kết quả:

Định lượng ethanol và isopropanol có mặt trong mẫu bằng cách so sánh các diện tích pic với các pic thu được nhờ sắc ký khí không gian hơi được hình thành do thay thế 1 ml dung dịch chuẩn alcol cho 1 ml dung dịch mẫu

trong cách tiến hành nêu ở trên.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ vào mỗi đĩa petri 12 – 15 ml agar trước đó được làm nguội đến 44 – 46°C. Trộn đều bằng cách quay lần lượt và di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông đặc. Đảo ngược các đĩa và ủ trong 48 ±2 giờ ở 35 ±1 °C.

Sau khi ủ đếm các khuẩn lạc phát triển nhìn thấy được trên mỗi đĩa và ghi lại số khuẩn lạc. Lấy trung bình của hai đĩa và nhân với hệ số pha loãng mẫu 100. Trường hợp không có khuẩn lạc được nhìn thấy, kết quả được thể hiện là nhỏ hơn 100 CFU/g.

E. coli

Sử dụng cellulase để phân giải mẫu gồm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gồm trong suốt quá trình thêm gồm vào canh trường tăng sinh. Chuẩn bị dung dịch cellulase 1% (1 g cellulase trong 99 ml nước) và tiệt trùng bằng cách lọc qua màng 0,45 µm (Dung dịch cellulase có thể bảo quản ở 2 – 5°C trong 2 tuần) cho vào ống tiệt trùng có chứa 9 ml canh trường có lauryl sulfat tryptose (LST) vô trùng, thêm vào 0,1 ml dung dịch cellulase 1% tiệt trùng. Bổ sung 1 g mẫu gồm vào ống và lắc mạnh bằng máy lắc Vortex để phân tán đều mẫu. Ủ ống trong 24 – 48 giờ ở 35 ±1 °C. Sau 24 giờ, lắc nhẹ ống và kiểm tra sự tạo khí tức là sự sủi bọt. Lại ủ thêm 24 giờ nếu quan sát không thấy khí thoát ra. Kiểm tra khí lần 2. Thực hiện kiểm tra xác nhận kết quả được cho là dương tính (khi có khí được sinh ra) như sau:

Lắc nhẹ ống LST có bọt khí và chuyển lấy một que cấy của thể rắn vào một ống chứa 10 ml canh trường EC và một lọ lên men (Durham). Ủ ống EC trong 24 – 48 giờ ở 45,5 ±2 °C. Sau 24 giờ kiểm tra sự tạo khí; nếu âm tính, kiểm tra lại sau 48 giờ. Dùng que cấy lấy một vệt của thể rắn từ ống có sinh khí ria trên agar L-EMB. Quan trọng là một phần của mặt thạch xuất hiện những khuẩn lạc tách biệt. Ủ trong 18 – 24 giờ ở 35°C. Kiểm tra các đĩa đối với các khuẩn lạc điển hình của *E.coli* tức là hướng tâm màu sẫm có hoặc không có ánh kim loại. Chọn hai khuẩn lạc được cho là dương tính và chuyển chúng vào thạch nghiêng PCA để kiểm tra hoá sinh và hình thái học. Ủ thạch nghiêng PCA trong 18 – 24 giờ ở 35 ±1 °C, sau đó nhuộm màu Gram chúng đã cấy. Nếu chúng cấy Gram âm (dạng hình que ngắn) thực hiện một trong hai sơ đồ thử hoá sinh sau đây:

Sơ đồ 1.1. Thử hoạt tính hoá sinh IMViC:

a. Tạo indol: Cấy vào một ống canh trường trypton và ủ trong 24 giờ ở 35°C. Thử indol bằng cách thêm 0,2 -0,3 ml hóa chất Kovacs. Mẫu thử dương tính nếu xuất hiện màu đỏ khác biệt ở lớp chất lỏng phía trên.

b. Hợp chất phản ứng Voges-Proskauer: Cấy vào một ống canh trường MR-VP và ủ trong 48 giờ ở 35°C. Chuyển 1 ml tới ống 13x100 mm. Thêm 0,6 ml dung dịch alpha-naphthol và 0,2 ml dung dịch KOH 40%, lắc đều.

Thêm vài tinh thể creatin. Lắc và để yên 2 giờ. Mẫu thử dương tính nếu màu hồng eosin lan trong môi trường.

c. Hợp chất phản ứng đỏ methyl: Ủ ống MR-VP từ phép thử Voges-Proskauer thêm 48 giờ ở 35°C. Thêm 5 giọt dung dịch đỏ methyl vào mỗi ống. Mẫu thử dương tính nếu có màu đỏ khác biệt. Mẫu thử âm tính nếu có màu vàng xuất hiện.

d. Khả năng sử dụng citrat: Cấy nhẹ nhàng một ống canh trường Koser citrat; tránh làm đục. Ủ ở 35°C trong 96 giờ. Phản ứng dương tính khi độ đục khác biệt tăng lên.

Phương án 1.2. Sử dụng chủng cấy lên thạch nghiêng PCA, cấy lại ống canh trường LST có chứa lọ Durham và ủ ở 35°C trong 48 giờ để kiểm tra chủng phân lập có khả năng tạo acid và khí từ quá trình lên men lactose.

Nội suy: Các chủng cấy (a) sinh khí là kết quả của quá trình cấy canh trường LST và sau ủ trong 24 – 28 giờ ở 35°C, (b) xuất hiện như là Gram âm dạng que không sinh bào tử và (c) cho các dạng IMViC – (typ sinh học 1) hoặc +- (typ sinh học 2) được xem là *E.coli*.

Sơ đồ 2. Phân tán bất kỳ khuẩn lạc đang phát triển vào một thể tích nhỏ nước muối 0,85%. Khẳng định định tính các vi khuẩn mọc bởi các xét nghiệm hóa học được thực hiện thuận tiện bằng cách sử dụng API 20E hoặc dải Micro ID hoặc các hệ thống tương đương. Sau khi hoàn thành các thử nghiệm, xác định định tính các sinh vật từ Sách chỉ dẫn định tính của hệ thống sử dụng và ghi lại kết quả cuối cùng.

Salmonella

Sử dụng cellulase để phân rã mẫu gồm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gồm trong suốt quá trình thêm gồm vào canh thang tăng sinh. Chuẩn bị dung dịch cellulase 1% (1 g cellulase trong 99 ml nước) và tiệt trùng bằng cách lọc qua màng 0,45 µm (Dung dịch cellulase có thể bảo quản ở 2 – 5°C trong 2 tuần). Bổ sung 25 g mẫu gồm vào cốc vô trùng dung tích 250 ml hoặc dụng cụ chứa khác thích hợp. Cho 225 ml canh trường lactose tiệt trùng và 2,25 ml dung dịch cellulase 1% tiệt trùng vào 1 lọ nắp xoáy, miệng rộng dung tích 500 ml vô trùng. Trong khi khuấy mạnh canh trường cellulase/lactose bằng máy khuấy từ, cho nhanh 25 g mẫu qua phễu thủy tinh vô trùng vào canh trường cellulase/lactose này. Đậy chặt nắp lọ chứa chắc chắn và để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng. Nới lỏng nắp đậy và ủ lọ chứa ở 35 ± 1 °C trong 24 ± 2 giờ. Siết chặt nắp đậy và lắc nhẹ hỗn hợp mẫu đã ủ; chuyển 1 ml hỗn hợp vào 10 ml canh trường selenit cystin (SC) và 1 ml khác của hỗn hợp cho vào 10 ml canh trường tetrathionat (TT). Ủ trong 24 ± 2 giờ ở 35°C. Lắc (bằng máy Vortex, nếu sử dụng ống) và ria cấy 1 vòng que cấy (3 mm) canh trường TT đã ủ lên thạch agar bismuth sulfit (BS), agar xylose lysin desoxycholat (XLD) và agar Hektoen enteric (HE). (Chuẩn bị các đĩa BS một ngày trước khi ria cấy và bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ phòng). Lặp lại đối với canh trường SC bằng cách ria một vòng que cấy 3 mm. Ủ trong 24 ± 2 giờ ở 35°C. Tiếp tục như được chỉ dẫn ở trang 221 – 226 của Sách hướng dẫn kỹ thuật, "FAO Food and Nutrition Paper" số 5 tái bản lần 2, Rome 1991, "Kiểm tra các đĩa về sự hiện diện các khuẩn lạc".

Nấm men và nấm mốc

Cân 25 g mẫu và thêm vào 2.475 ml nước pepton 0,1% tiệt trùng (được chuẩn bị bằng cách cho 1 g pepton vào 1 lít nước cất, khuấy đều cho pepton tan hoàn toàn và hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút) trong khi khuấy mạnh bằng máy khuấy từ. Khuấy cho đến khi mẫu được tan hoàn toàn. Tỷ lệ pha loãng là 1 : 1.00. Dùng pipet đã tiệt trùng lấy 0,1 ml cho vào 10 đĩa CCPDA-D đặc đã được làm trước đó mỗi đĩa 0,1 ml (xem dưới đây). Dàn đều lên bề mặt của các đĩa, sử dụng que thủy tinh vô trùng. Ủ đĩa

thăng đứng trong 5 ngày ở 25°C, để yên.

Sau khi ủ, đếm khuẩn lạc phát triển trên mỗi đĩa sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc và ghi tổng số khuẩn lạc có trên 10 đĩa. Tách nấm men ra khỏi nấm mốc dựa vào hình thái của chúng và đếm chúng riêng. Lấy tổng số khuẩn lạc có trong cả 10 đĩa nhân với 100 để có số CFU/g mẫu. Nếu không có khuẩn lạc nào trên các đĩa thì biểu diễn kết quả nhỏ hơn 100 CFU/g.

Môi trường CCPDA-D: Trước tiên chuẩn bị dung dịch gốc dichloran 2% (2,6-dichloran-4-nitroanilin) trong ethanol 95%. Sau đó, thêm một lượng dung dịch gốc dichloran vừa đủ vào PDA để đạt được nồng độ 2,5 mg/l. Thêm chloramphenicol cho đến nồng độ 50 mg/l và hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Làm nguội môi trường đến khoảng 50°C trước khi rót đĩa, thêm chlortetracyclin đã được lọc và tiệt trùng đủ để có nồng độ 50 mg/l.

PHỤ LỤC 10

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM TRAGACANTH

INS 413

1. Tên khác, chỉ số

2. Định nghĩa

Thu được từ việc sấy khô dịch tiết ra của thân và cành cây *Astragalus gummifer* Labillardiere và các loài thuộc Châu Á khác của *Astragalus* (Fam. *Leguminosae*); chủ yếu bao gồm các polysaccharid có khối lượng phân tử cao (galactarban và polysaccharid có tính acid), Gôm Tragacanth thủy phân tạo ra acid galacturonic, galactose, arabinose, xylose và fucose; một lượng nhỏ rhamnose và glucose (được chuyển hoá từ các vết tinh bột hoặc cellulose).

Mã số C.A.S.

9000-65-1

3. Cảm quan

Gôm không nghiền ở dạng mảnh dẹt, lá, phẳng hoặc cong hoặc dạng mảnh xoắn có độ dày 0,5 – 2,5 mm và dài tới 3 cm; màu trắng tới vàng nhạt, nhưng một số mảnh có thể có màu đỏ nhạt; các mảnh cứng, dễ gãy nhỏ; không mùi. Gôm dạng bột màu trắng cho đến vàng nhạt hoặc màu nâu hơi hồng (màu nâu vàng nhạt).

Các chế phẩm thương mại có thể chứa các vật lạ như mảnh vỏ cây thì phải loại bỏ trước khi sử dụng cho thực phẩm.

Các mẫu không nghiền phải được tạo thành bột và cho qua rây số 45 (335 M) và trộn đều trước khi tiến hành bất kỳ một phép thử nào sau đây.

Chất nhũ hoá, chất ổn định, chất làm dày

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

1 g mẫu trong 50 ml nước trương nở tạo thành dịch đặc nhầy, trơn, màu trắng đục; không tan trong ethanol và không trương nở trong ethanol 60% (w/v).

Kiểm tra hiển vi

Xác định bằng kính hiển vi huyền phù của mẫu pha trong nước. Nhiều mảnh góc cạnh với các dạng lá mỏng không đều hoặc tròn, các hạt tinh bột đường kính tới 15 µm và các màng tế bào phân tầng chuyển thành màu tím nhìn thấy được bằng cách thêm dung dịch iốt có chứa iot.

Tạo kết tủa

Các mẫu tạo ra phản ứng kết tủa với dung dịch đồng (II) acetat bão hoà trong nước.

Thành phần gồm

Định tính arabinose, xylose, fucose, galactose và acid galacturonic bằng cách sau : Tiến hành như hướng dẫn ở phần « Định tính thành phần gồm » sử dụng các chất chuẩn đối chứng : arabinose, mannose, galactose, xylose, fucose, acid galacturonic và acid glucuronic. Arabinose, xylose, fucose, galactose và acid galacturonic cần phải có trong mẫu và mannose và acid glucuronic cần phải không hiện diện.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô Không được quá 16% (nhiệt độ sấy 105°C trong 5 giờ).

Tro sulfat Không được quá 4%

Tro không tan trong acid Không được quá 0,5%.

Chất không tan trong acid Không được quá 2%.

Gôm acacia và các gôm tan khác Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Agar Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Dextrin Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Gôm karaya Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Salmonella spp. Âm tính trong 1 g mẫu thử

E. coli Âm tính trong 1 g mẫu thử

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

Tro không tan trong acid Đun sôi tro thu được theo hướng dẫn Tro sulfat ở trên với 25 ml dung dịch acid HCl 3M trong 5 phút, thu lấy phần chất không tan lên trên một chén lọc đã cân bì hoặc giấy lọc không tro đã biết trọng lượng, rửa bằng nước nóng, đốt và cân. Tính phần trăm tro không tan trong acid theo khối lượng mẫu.

Chất không tan trong acid Cho 2 g gôm tragacanth và 95 ml methanol vào 1 bình đáy tròn dung tích 250 ml. Làm ẩm bột bằng cách lắc xoáy và thêm 80 ml dung dịch acid HCl. Thêm vài hạt thủy tinh chống bọt có đường kính khoảng 4 mm và đun hồi lưu trong cách thủy trong 3 giờ. Loại các hạt thủy tinh chống bọt ra và lọc hút chân không trong khi nóng qua phễu lọc thủy tinh xóp đã biết trọng lượng. Rửa bình bằng một lượng nhỏ nước và cho phần nước rửa đó qua phễu lọc. Rửa phần cặn trên phễu lọc bằng 40 ml methanol và sấy khô ở 110°C tới trọng lượng không đổi. Để nguội trong bình hút ẩm và cân. Tính phần trăm chất không tan trong acid theo khối lượng mẫu.

Gôm acacia và các gôm tan khác Cho 10 ml dung dịch $Pb(C_2H_3O_2)_2$ vào 20 ml dung dịch mẫu 0,25% (khối lượng/thể tích) trong nước mới đun sôi để nguội. Kết tủa thành cụm được tạo thành. Lọc và thêm 10 ml dung dịch $Pb(C_2H_3O_2)_2$. $2Pb(OH)_2$ vào dịch lọc. Dung dịch có thể bị vẩn đục nhẹ mà không tạo thành kết tủa.

Agar Cho 0,5 ml dung dịch acid HCl vào 4 ml dung dịch mẫu 0,5% (khối lượng/thể tích) trong nước và gia nhiệt trong cách thủy sôi trong 30 phút. Thêm vài giọt dung dịch $BaCl_2$ 3,65% (khối lượng/thể tích). Không có kết tủa được hình thành.

Dextrin Tạo mẫu trong dung dịch nước glycerol và kiểm tra dưới kính hiển vi. Bổ sung 1% dung dịch iod, không phát hiện các hạt màu vàng nâu hoặc đỏ tía.

Gôm karaya

(a) Đun sôi 1 g mẫu với 20 ml nước cho đến khi dịch nhầy được hình thành. Thêm 5 ml dung dịch acid HCl và lại đun sôi trong 5 phút. Không có màu hồng hoặc màu đỏ bền lộ rõ.

(b) Lắc 0,2 g mẫu với 10 ml ethanol 60% trong 1 ống đong đầy nắp dung tích 10 ml có vạch chia độ 0,1 ml. Bất kỳ gel nào được hình thành cũng không được vượt quá 1,5 ml.

(c) Lắc 1 g mẫu với 99 ml nước. Chuẩn độ dịch nhầy được hình thành bằng dung dịch NaOH 0,01M, sử dụng dung dịch đỏ methyl làm chất chỉ thị. Không quá 5,0 ml dung dịch NaOH 0,01M được dùng để làm thay đổi màu của dung dịch.

Chi

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 11

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM ARABIC

1. Tên khác, chỉ số	Gôm arabic (<i>Acacia senegal</i>), gôm arabic (<i>Acacia seyal</i>), Acacia gum, arabic gum, INS 414
2. Định nghĩa	Thu được từ việc sấy khô dịch tiết ra của thân và cành cây <i>Acacia senegal</i> (L) Willdenow hoặc <i>Acacia seyal</i> (fam. <i>Leguminosae</i>). Gôm arabic chủ yếu bao gồm các polysaccharid có trọng lượng phân tử cao và các muối Ca, Mg, K của chúng, khi thủy phân tạo ra arabinose, galactose, rhamnose và acid glucuronic. Các chế phẩm thương mại có thể gồm cả các chất lạ như cát và các mảnh vỏ cây, các chất này phải được loại bỏ trước khi cho vào thực phẩm.
Mã số C.A.S.	9000-01-5
3. Cảm quan	Gôm arabic (<i>Acacia senegal</i>) là chất rắn có màu trắng nhạt đến nâu da cam, khi bẻ gãy tạo các khe gãy trong. Dạng tốt nhất là dạng hạt hình cầu có các kích cỡ khác nhau với kết cấu bề mặt sần sùi. Khi nghiền, các mảnh có màu trắng nhạt hơn và xuất hiện màu trắng trong. Gôm arabic (<i>Acacia seyal</i>) giòn hơn gôm arabic (<i>Acacia senegal</i>) có các hạt dạng hình cầu. Gôm arabic có sẵn trên thị trường ở dạng vảy màu trắng đến trắng ngà, dạng hạt, dạng bột, dạng ống hoặc dạng nguyên liệu được sấy phun. Dung dịch nước 1 g trong 2 ml chảy dễ dàng và có tính acid khi thử bằng quỳ. Chất nhũ hoá, chất ổn định, chất làm dày
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	1 g hoà tan trong 2 ml nước; không tan trong ethanol
Thành phần gồm	Tiến hành như hướng dẫn ở phần « Định tính thành phần gồm » (FNP 5) sử dụng các chất chuẩn đối chứng: arabinose, galactose, mannose, rhamnose, acid galacturonic, acid glucuronic và xylose. Phải có arabinose, galactose, rhamnose và acid glucuronic; không có các vết phụ tương ứng với mannose, xylose và acid galacturonic.
Quay quang học	Gôm từ <i>A.senegal</i> : dung dịch tan trong nước quay trái Gôm từ <i>A.seyal</i> : dung dịch tan trong nước quay phải Thử một dung dịch mẫu, chuẩn bị bằng cách cho 10 g mẫu (chế phẩm khô) vào 100 ml nước (nếu cần thiết, trước đó lọc qua giấy lọc số 42 hoặc phễu lọc có kích thước lỗ 0,8 µm), sử dụng ống có chiều dài 200 mm.

5.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15% (nhiệt độ sấy 105°C trong 5 giờ) đối với dạng hạt và không được quá 10% (nhiệt độ sấy 105°C trong 4 giờ) đối với dạng chế phẩm sấy phun. Các mẫu chưa nghiền cần phải nghiền thành bột và qua rây số 40, trộn đều trước khi cân.
<i>Tro toàn phần</i>	Không vượt quá 4,0%
<i>Tro không tan trong acid</i>	Không được quá 0,5%
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 1,0%
<i>Tinh bột hoặc dextrin</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Gôm có tanin</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Salmonella</i> spp.	Âm tính đối với mẫu thử
<i>E. coli</i>	Âm tính trong 1 g mẫu thử

6. Phương pháp thử

<i>Tinh bột hoặc dextrin</i>	Đun sôi dung dịch mẫu 2%, làm nguội và thêm vài giọt iod TS. Không có màu ánh xanh hoặc ánh đỏ được hình thành.
<i>Gôm có tanin</i>	Thêm 0,1 ml dung dịch sắt (III) clorid TS vào 10 ml dung dịch mẫu 2%. Không nhuộm màu đen hoặc tạo kết tủa đen.
<i>Chì</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 12

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM XANTHAN

INS 415

1. Tên khác, chỉ số

2. Định nghĩa

Gôm xanthan là polysaccharid có khối lượng phân tử cao được sản xuất bởi quá trình lên men cacbonhydrat với chủng vi khuẩn thuần khiết *Xanthomonas campestris*, làm sạch bằng cách thu hồi với ethanol hoặc isopropanol, sấy khô và nghiền; có chứa D – glucose và D – mannose là các đơn vị hexose chiếm ưu thế, cùng với acid D – glucuronic và acid pyruvic, và được xử lý như muối Na, K hoặc Ca; các dung dịch của gôm xanthan trung tính.

Mã số C.A.S.

11138-66-2

Dạng bột màu kem.

3. Cảm quan

Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hoá, chất tạo bọt

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Tan trong nước; không tan trong ethanol

Tạo gel

Phải có phản ứng tạo gel đặc trưng.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô

Không được quá 15% (nhiệt độ sấy 105°C trong 2,5 giờ).

Tro toàn phần

Không được quá 16% sau khi sấy

Acid pyruvic

Không được nhỏ hơn 1,5%

Xem mô tả trong phần Phương pháp thử - Định tính

Nitrogen

Không được quá 1,5%

Tiến hành theo phương pháp Kjeldahl

Ethanol và isopropanol

Không được quá 500 mg/kg, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất

Xác định theo mô tả ở phần Phương pháp thử - Định tính

Chì

Không được quá 2 mg/kg.

Xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử phù hợp với từng mức độ. Lựa chọn lượng mẫu và phương pháp xử lý mẫu dựa vào các nguyên tắc của phương pháp được mô tả trong Quyển 4, « Các phương pháp công cụ »

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật

Không được quá 5.000 CFU/g

E.coli

Âm tính đối với mẫu thử

Salmonella

Âm tính đối với mẫu thử

Nấm men và nấm mốc

Không được quá 500 CFU/g

Xem mô tả dưới phần Phương pháp thử - Định tính

5.4. Hàm lượng

Hàm lượng tính theo chế phẩm khô, không được nhỏ hơn 4,2% và không được quá 5,4% CO₂, tương ứng với 91,0% – 117,0% gồm xanthan.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo gel

Cho 300 ml nước trước đó đã được đun tới 80°C vào cốc dung tích 400 ml và khuấy nhanh bằng máy khuấy, ở tại thời điểm tốc độ khuấy đạt cực đại cho hỗn hợp khô gồm 1,5 g mẫu và 1,5 g gồm đậu carob. Khuấy cho đến khi hỗn hợp chuyển thành dạng dung dịch và sau đó tiếp tục khuấy trong 30 phút nữa. Không được để nhiệt độ nước giảm xuống dưới 60°C trong quá trình khuấy. Ngừng khuấy và để hỗn hợp nguội tới nhiệt độ phòng trong ít nhất 2 giờ. Một khối gel dai chắc được hình thành sau khi nhiệt độ giảm xuống dưới 40°C, tuy nhiên không có gel như vậy hình thành trong dung dịch đối chứng 1% mẫu được chuẩn bị theo cách tương tự nhưng không có gồm đậu carob.

6.2. Độ tinh khiết

Acid pyruvic

Chuẩn bị mẫu :

Cân 600 mg mẫu chính xác đến 0,1 mg và hoà tan với lượng nước đủ đến 100 ml. Chuyển 10 ml dung dịch vào 1 bình thủy tinh có nút mài dung tích 50 ml. Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch HCl N cho vào bình, cân bình và gia nhiệt để đun sôi với sinh hàn ngược trong 3 giờ, chú ý để ngăn tổn thất do bay hơi. Làm nguội tới nhiệt độ phòng và thêm nước cho bù lượng bị tổn thất trong quá trình đun. Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch 2,4-dinitrophenylhydrazin 0,5% trong acid HCl 2N cho vào phễu tách dung tích 30 ml, sau đó thêm 2 ml dung dịch mẫu, khuấy đều và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Chiết hỗn hợp bằng 5 ml ethyl acetat và loại bỏ lớp nước. Chiết hydrazon từ ethyl acetat bằng ba phần 5 ml dung dịch Na₂CO₃ TS, lấy phần chiết được cho vào bình định mức dung tích 50 ml. Pha tới thể tích 50 ml bằng dung dịch Na₂CO₃ TS và lắc đều.

Chuẩn bị chuẩn:

Cân 45 mg acid pyruvic chính xác đến 0,1 mg và cho vào bình định mức dung tích 500 ml. Pha tới thể tích 500 ml bằng nước và lắc đều. Chuyển 10 ml dung dịch này vào bình thủy tinh có nút mài dung tích 50 ml và tiếp tục theo mô tả trong phần « Chuẩn bị mẫu », bắt đầu với « Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch HCl N cho vào bình ».

Cách tiến hành :

Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch với máy quang phổ trong các cồng đo 1 cm ở bước sóng có hấp thụ cực đại 375 nm, sử dụng Na₂CO₃ TS cho mẫu trắng. Độ hấp thụ của « Dung dịch mẫu » bằng hoặc lớn độ hấp thụ của « Dung dịch chuẩn ».

Ethanol và isopropanol

Nguyên tắc:

Các alcol được chuyển thành các ester nitrit tương ứng và được xác định bằng sắc ký khí không gian hơi (Xem quyển 4).

Chuẩn bị mẫu:

Hoà tan 100 mg mẫu trong 10 ml nước sử dụng NaCl như là chất làm phân tán nếu cần.

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l n - propanol

Dung dịch alcol chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l mỗi loại ethanol và isopropanol

Cách tiến hành:

Cân 200 mg ure cho vào lọ sẫm màu dung tích 25 ml Reacti-flasks, Pierce, Rockford, IL, USA, hoặc tương đương). Làm trong bằng nitrogen trong 5 phút và sau đó thêm 1 ml dung dịch acid oxalic bão hoà, đóng bằng nút cao su và lắc xoáy. Thêm 1 ml dung dịch mẫu, 1 ml dung dịch nội chuẩn và đồng thời bắt đầu bấm giờ ($T = 0$). Lắc xoáy lọ và đậy nút lại bằng nút xoáy có đệm cao su silicon. Lắc xoáy cho đến khi $T = 30$ giây. Tại thời điểm $T = 45$ giây, bơm qua đệm cao su silicon 0,5 ml dung dịch natri nitrit pha trong nước (250 g/l). Lắc mạnh cho đến khi $T = 70$ giây và ở $T = 150$ giây hút qua đệm cao su silicon 1 ml từ không gian hơi sử dụng syringe khoá áp (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, Louisiana, USA, hoặc tương đương).

Sắc ký khí:

Luồn kim syringe vào cổng bơm; đẩy mẫu, sau đó mở syringe và bơm mẫu.

Sử dụng các điều kiện sau:

- Cột: thuỷ tinh (đường kính trong 4 mm, chiều dài 90 cm)
- Chất nhồi: 15 cm đầu được nhồi bằng chrompack (hoặc tương đương) và phần còn lại được nhồi bằng Porapak R 120 -150 mesh (hoặc tương đương)
- Khí mang: nitrogen (tốc độ dòng: 80 ml/phút)
- Detector: ion hoá ngọn lửa
- Nhiệt độ: cổng bơm 250°C, cột 150°C đẳng nhiệt

Tính kết quả:

Định lượng ethanol và isopropanol có mặt trong mẫu bằng cách so sánh các diện tích pic với các pic tương ứng thu được từ sắc đồ không gian hơi được hình thành do thay thế 1 ml dung dịch chuẩn alcol cho 1 ml dung dịch mẫu trong cách tiến hành nêu ở trên.

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

Chì

6.3. Các yêu cầu về vi sinh

vật

Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch trên cho vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ vào mỗi đĩa petri 12 – 15 ml thạch PCA trước đó được làm nguội đến 44 – 46°C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông lại. Lật ngược các đĩa và ủ trong 48 ±2 giờ ở 35 ±1 °C.

Sau khi ủ đếm các khuẩn lạc phát triển nhìn thấy được trên mỗi đĩa và ghi lại số khuẩn lạc. Lấy trung bình của hai đĩa và nhân với hệ số pha loãng mẫu 100. Trường hợp không có khuẩn lạc được nhìn thấy, kết quả được thể hiện là nhỏ hơn 100 CFU/g.

E.coli

Sử dụng kỹ thuật vô trùng, hoà 1 g mẫu trong 99 ml canh trường lactose, sử dụng hoặc Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy cho tới khi mẫu tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 15 phút và sau đó đầy nhẹ dụng cụ chứa và ủ canh trường trong 18 – 24 giờ ở 35 ±1 °C. Dùng 1 pipet tiệt trùng lấy 1 ml canh trường đã ủ cho vào ống chứa 10 ml canh trường GN. Ủ trong 18 – 24 giờ và sau đó ria cấy các ống canh trường GN cho thấy sinh trưởng (+) tính hoặc sinh hơi lên các đĩa cặp đôi Levine EMB. Ủ các đĩa trong 24 ±2 giờ ở 35 ±1 °C và sau đó kiểm tra các khuẩn lạc điển hình của *E.coli* tức là biểu thị màu đỏ tím đậm vào tâm đen và có ánh kim loại xanh đôi lúc rải rác trên mặt thạch. Ghi lại bất kỳ khuẩn lạc *E. coli* điển hình được cho là dương tính, loại khác là âm tính. Ria cấy bất kỳ khuẩn lạc khả nghi được phân tách rõ lên đĩa PCA và ủ trong 18 - 24 giờ ở 35 ±1 °C. Nhuộm màu Gram trên bất kỳ khuẩn lạc phát triển trên môi trường cấy để khẳng định là Gram âm. Nếu vậy, phân tán bất kỳ khuẩn lạc phát triển vào lượng nhỏ nước muối 0,85% và tiến hành các phép thử hóa học để nhận dạng chủng vi khuẩn. Điều này được làm thuận lợi nhất bằng cách sử dụng dải API 20E hoặc Micro ID hoặc các hệ thống tương đương.

Sau khi hoàn tất các phép thử, nhận dạng vi sinh vật theo Hướng dẫn định danh của hệ thống được sử dụng và ghi lại kết quả cuối cùng.

Các môi trường nuôi cấy

Canh trường GN (Canh trường Gram âm)

Pepton 20 g

Dextrose 1,0 g

Mannitol 2,0 g

Natri citrat 5,0 g

Natri deoxycholat 0,5 g

Dikali phosphat (hai bazo) 4,0 g

Monokali phosphat (một bazo) 1,5 g

Natri chlorid 5,0 g

Pha thành 1 l bằng nước cất hoặc nước khử ion, pH = 7,0 ±0,2 ở 25°C

Salmonella

Sử dụng kỹ thuật vô trùng, phân tán 5 g mẫu trong 200 ml canh trường lactose tiết trùng, sử dụng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để làm hòa tan tối đa trên khoảng 15 phút. Đậy lỏng dụng cụ chứa và ủ ở $35 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

Siết chặt nắp đậy và lắc nhẹ hỗn hợp mẫu đã ủ; chuyển 1 ml hỗn hợp vào 10 ml canh trường selenit cystin (SC) và 1 ml khác của hỗn hợp cho vào 10 ml canh trường tetrathionat (TT). Ủ trong 24 ± 2 giờ ở 35°C . Lắc (bằng máy Vortex nếu sử dụng ống) và dùng vòng que cấy 3 mm canh trường TT đã ủ ria lên agar bismuth sulfite (BS), agar xylose lysin desoxycholat (XLD) và agar Hektoen enteric (HE). (Chuẩn bị các đĩa BS một ngày trước khi ria cấy và bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ phòng cho đến khi cấy). Lặp lại đối với canh trường TT với 1 vòng que cấy. Ủ trong 24 ± 2 giờ ở 35°C . Tiếp tục như được chỉ dẫn ở trang 221 – 226 của Sách hướng dẫn kỹ thuật, FAO Food and Nutrition Paper số 5 tái bản lần 2, Rome 1991, "Kiểm tra các đĩa về sự hiện diện các khuẩn lạc".

Nấm men và nấm mốc

Sử dụng kỹ thuật vô trùng, phân tán 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hòa tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hòa tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch cho vào các đĩa petri tách biệt, cặp đôi, đánh dấu tương ứng. Đổ lên dịch mẫu trong mỗi đĩa petri 15 – 20 ml Potato dextrose agar (hoặc đã acid hoá hoặc chứa chất kháng sinh) trước đó đã duy trì ở $44 - 46^\circ\text{C}$. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều và di chuyển trước sau các đĩa, để cho agar đông lại. Lật ngược các đĩa và ủ trong 5 ngày ở $20 - 25^\circ\text{C}$.

Sau khi ủ, đếm các khuẩn lạc mọc nhìn thấy được trên mỗi đĩa, sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc và ghi tổng số khuẩn lạc. Tách riêng nấm men với nấm mốc dựa vào hình thái và đếm chúng riêng. Lấy trung bình số khuẩn lạc có trên hai đĩa thạch và nhân với hệ số pha loãng 100. Nếu không có khuẩn lạc nào nhìn thấy trên đĩa thì biểu diễn kết quả nhỏ hơn 100 CFU/g.

6.4. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong phần thử đối với Xác định CO_2 bằng cách khử carboxyl (Vol. 4), cân chính xác 1,2 g mẫu.

PHỤ LỤC 13

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM KARAYA

	Gôm Karaya, Sterculia, gôm Sterculia, Kadaya, Katilo, Kullo, Kuterra
1. Tên khác, chỉ số	INS 416 ADI "Không giới hạn"
2. Định nghĩa	Gôm Karaya là nhựa khô thu được từ thân và cành của cây <i>Sterculia urens</i> Roxburgh và các chi <i>Sterculia</i> khác (Họ <i>Sterculiaceae</i>) hoặc từ <i>Cochlospermum gossipium</i> A.P. De Candolle hoặc các chi khác của loài <i>Cochlospermum</i> (Họ <i>Bixaceae</i>). Chế phẩm chứa chủ yếu là các acetyl polysaccharid cao phân tử, khi thủy phân tạo ra acid galacturonic, galactose, rhamnose cùng với lượng nhỏ acid glucuronic. 9000-36-6
Chỉ số C.A.S	
3. Mô tả	Chế phẩm thô có dạng giọt lệ với các kích thước khác nhau và các mảnh vỡ không đồng đều có vẻ ngoài dạng bán tinh thể đặc trưng; màu vàng nhạt hoặc nâu hồng, trong mờ; cứng và ráp. Dạng bột gôm màu xám nhạt đến ánh hồng, có mùi đặc trưng của acid acetic. Chế phẩm thương mại có thể có tạp chất (vỏ cây) cần loại bỏ trước khi sử dụng trong thực phẩm. Chế phẩm thô cần được nghiền mịn và qua rây chuẩn ISO cỡ 45 (355µm), trộn đều trước khi tiến hành kiểm nghiệm. Chất làm dày, chất ổn định, Chất nhũ hóa.
4. Chức năng	
5. Tính chất	
5.1. Định tính	
Độ tan	Ngâm trương nở 2g mẫu trong 50ml nước tạo ra gel dạng hạt nhầy, màu hơi đục, quánh; có tính acid khi thử bằng quỳ; không tan trong ethanol.
Trương nở trong dung dịch ethanol	Trương nở trong ethanol 60%, tính chất này giúp phân biệt gôm Karaya với các loại gôm khác.
Tạo kết tủa	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
Phản ứng màu	Phải có phản ứng màu đặc trưng.
Các thành phần của gôm	Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận định tính các thành phần của gôm tại <i>JECFA monograph 1 - Vol.4</i>, sử dụng arabinose, galactose, mannose, rhamnose, xylose, acid glucuronic và acid galacturonic làm chuẩn đối chiếu. Phải phát hiện rhamnose, galactose, acid glucuronic và acid galacturonic. Không được có mannose, arabinose, xylose.

5.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi làm khô</i>	Không được quá 20,0% (sấy tại 105°C trong 5 giờ).
<i>Tro toàn phần</i>	Không được quá 8,0%
<i>Tro không tan trong acid</i>	Không được quá 1,0%.
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 3,0%.
<i>Acid bay hơi</i>	Không được thấp hơn 10,0% tính theo acid acetic.
<i>Tinh bột</i>	Không phát hiện được.
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Salmonella spp.</i>	Âm tính trong 1g mẫu
<i>E.coli</i>	Không được có trong 1g mẫu

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Tạo kết tủa</i>	Lắc 1g mẫu thử với 80ml nước trong 24 giờ. Đun sôi 4ml dịch nhầy thu được với 0,5ml acid hydrocloric đặc, thêm 1ml dung dịch natri hydroxyd 5M, lọc. Lấy dịch lọc, thêm 3ml dung dịch kali đồng tartrat, đun nóng. Phải xuất hiện kết tủa đỏ.
<i>Phản ứng màu</i>	Đun 1g mẫu thử với 20ml nước đến khi tạo nhầy, thêm 5ml acid hydrocloric, tiếp tục đun hỗn hợp trong 5 phút, phải xuất hiện màu đỏ hoặc hồng bền. Làm ấm 0,5g mẫu thử với 2ml natri hydroxyd 5M, phải xuất hiện màu nâu.

6.2. Độ tinh khiết

<i>Tro không tan trong acid</i>	Cân 3g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu thử trong một chén nung đã cân bì. Nung tại nhiệt độ thấp (khoảng 550°), không được nung quá lửa, đến khi tro hóa hoàn toàn, để nguội trong bình hút ẩm và cân. Nếu tro chưa sạch carbon, tắt uớt tro, lọc lấy phần không tan trên giấy lọc không tro, cho cả giấy lọc và cặn vào chén nung, nung đến khi thu được tro trắng hoặc gần trắng. Gộp tro với phần dịch lọc và cho bay hơi đến khô rồi nung đến độ đỏ thẫm. Nếu tro vẫn không sạch carbon, để nguội chén nung, thêm 15ml ethanol, dùng đũa thủy tinh phá vỡ khối tro, đốt hết ethanol và lại nung đến độ đỏ thẫm, sau đó để nguội. Đun sôi tro thu được với 25ml acid hydrocloric loãng (TS) trong 5 phút. Lọc lấy phần không tan trên phễu Gooch đã cân bì hoặc giấy lọc không tro, rửa cặn bằng nước nóng, nung, để nguội và cân. Tính hàm lượng % tro không tan trong acid theo khối lượng mẫu đã cân.
<i>Chất không tan trong acid</i>	Cân 5g mẫu (chính xác đến 0,1mg) cho vào bình nón hoặc cốc thủy tinh 250ml đã chứa sẵn 100ml acid hydrocloric 5% (kl/tt). Đậy cốc bằng mặt kính đồng hồ hoặc gắn bình nón với sinh hàn hồi lưu. Đun nhẹ cho đến khi gồm tan hoàn toàn (khoảng 3 giờ). Lọc dung dịch qua 1phễu lọc thủy tinh xốp cỡ lỗ 10-20µm. Rửa cặn vài lần bằng nước nóng đến khi dịch rửa không còn acid (thử bằng giấy pH). Sấy khô phễu đến khối lượng không đổi ở 105°, để nguội về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm và cân. Tính hàm lượng %.
<i>Acid bay hơi</i>	Cân 1g mẫu cho vào bình thủy tinh 700ml cổ dài, thêm 100ml nước và 5ml acid orthophosphoric, để yên trong vài giờ hoặc đến khi gồm trương nở hoàn toàn. Đun hồi lưu nhẹ trong 2 giờ; Cát lõi cuốn hơi nước lấy khoảng 800ml dịch cất, phần acid còn lại khoảng 20ml, chuẩn độ dịch cất thu được

bằng natri hydroxyd 0,1M dùng chỉ thị là dung dịch phenolphthalein (TS). Tiến hành làm song song một mẫu trắng không có gôm. Sự chênh lệch giữa 2 lần chuẩn độ biểu thị lượng kiềm cần thiết để trung hòa acid bay hơi.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,1M tương đương với 0,006 g acid bay hơi tính theo acid acetic.

Tinh bột

Thêm vào dung định mẫu thử 1/10, vài giọt dung dịch iod (TS). Dung dịch không được có màu xanh xuất hiện.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 14

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM TARA

1. Tên khác, chỉ số

Peruvian carob

INS 417

ADI "Không giới hạn"

2. Định nghĩa

Thu được bằng cách nghiền mịn phần nội nhũ của hạt cây *Caesalpinia spinosa* (Họ *Leguminosae*); gồm chủ yếu là các polysaccharid phân tử lượng lớn cấu tạo chủ yếu từ galactomannans. Thành phần chính gồm chuỗi mạch thẳng các tiểu phân (1,4)-beta-D-mannopyranose gắn với các tiểu phân alpha-D-galacto-pyranose theo các liên kết 1-6; Tỷ số mannose/galactose trong gôm tara là 3:1. (Trong gôm đậu carob tỷ số này là 4:1 và trong gôm guar là 2:1). Chế phẩm thương mại còn được phân loại thêm qua độ nhớt và giảm khối lượng khi làm khô.

3. Mô tả

Bột trắng hoặc gần như trắng, gần như không mùi.

4. Chức năng

Chất làm dày, chất ổn định.

5. Tính chất

5.1. Định tính

Độ tan

Tan trong nước, không tan trong ethanol.

Tạo gel

Phải có phản ứng tạo gel đặc trưng.

Độ nhớt

Phải có phản ứng đặc trưng của độ nhớt.

Các thành phần của gôm

Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần gôm.

Kiểm tra cấu trúc hiển vi

Phải có phản ứng đặc trưng khi kiểm tra cấu trúc hiển vi.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi làm khô

Không được quá 15%.

Tro toàn phần

Không được quá 1,5%.

Tro không tan trong acid

Không được quá 2,0%.

<i>Protein</i>	Không được quá 3,5%.
<i>Tinh bột</i>	Không phát hiện được.
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Tạo gel</i>	Thêm lượng nhỏ natri borat vào dung dịch mẫu thử trong nước, tạo thành gel.
<i>Độ nhớt</i>	Cân 2 g mẫu thử vào cốc 400 ml, tắm ướt bằng khoảng 4 ml isopropanol. Thêm 200 ml nước, vừa thêm vừa khuấy mạnh đến khi gôm phân tán hoàn toàn tạo thành dung dịch có độ nhớt trung bình, đục như sữa (độ nhớt của dung dịch này kém dung dịch gôm guar nhưng nhớt hơn dung dịch gôm đậu carob khi chuẩn bị cùng trong điều kiện như trên). Chuyển 100 ml dung dịch này sang cốc 400 ml khác, đun nóng hỗn hợp trong bể cách thủy nước sôi trong 10 phút và làm mát đến nhiệt độ phòng. Độ nhớt của dung dịch tăng một cách rõ rệt.
<i>Các thành phần của gôm</i>	Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận định tính xác thành phần của gôm, sử dụng galactose và mannose làm chuẩn. Phải phát hiện thấy galactose và mannose.
<i>Kiểm tra vi phẫu</i>	Cho một ít bột mẫu vào trong dung dịch chứa 0,5% iod và 1% kali iodid trên một lam kính, tiến hành soi dưới kính hiển vi. Gôm tara chứa các nhóm tế bào hình trái lê hoặc tròn có màu vàng đến nâu. (các tế bào gôm guar có hình dạng tương tự nhưng kích thước lớn hơn. Trong khi đó tế bào của gôm đậu carob hình ống dài, tách rời nhau hoặc giữa chúng có khe nhỏ rất dễ phân biệt với gôm tara.

6.2. Độ tinh khiết

<i>Protein</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận Xác định nitrogen (phương pháp Kjeldahl). - Hàm lượng % của nitrogen xác định được nhân với 5,7 để thu được hàm lượng % protein trong mẫu thử.
<i>Tinh bột</i>	Thêm vào dung dịch mẫu thử (1/10) vài giọt dung dịch iod (TS) . Dung dịch không được xuất hiện màu xanh lam.
<i>Chì</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 15

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM GELLAN

INS 418

1. Tên khác, chỉ số

2. Định nghĩa

Gôm gellan là gôm polysaccharid có khối lượng phân tử cao được sản xuất bởi quá trình lên men chủng vi khuẩn thuần khiết *Pseudomonas elodea* trong môi trường carbohydrat, làm sạch bằng cách thu hồi isopropyl alcol, sấy khô và nghiền; Polysaccharid có khối lượng phân tử cao chủ yếu gồm một tetrasaccharid lặp đi lặp lại của một đơn vị rhamnose, một acid glucuronic, và hai đơn vị glucose, và được thay thế bằng các nhóm acyl (Glyceryl và acetyl) như các ester liên kết O-glycosidic. Acid glucuronic được trung hoà thành muối hỗn hợp của K, Na, Ca và Mg. Gôm gellan thường chứa một lượng nhỏ nitrogen có trong các hợp chất thu được từ quá trình lên men.

Mã số C.A.S.

71010-52-1

Khối lượng phân tử

Khoảng 500.000

Dạng bột màu trắng nhạt

3. Cảm quan

Chất làm dày, chất tạo gel, chất ổn định

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Tan trong nước, tạo thành dung dịch nhớt; không tan trong ethanol

Tạo gel với ion calci

Phải có phản ứng tạo gel với ion calci đặc trưng.

Tạo gel với ion natri

Phải có phản ứng tạo gel với ion natri đặc trưng.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô

Không được quá 15,0% (nhiệt độ sấy 105°C trong 2,5 giờ).

Nitrogen

Không được quá 3,0%

Isopropyl alcol

Không được quá 750,0 mg/kg (mô tả ở phần Phương pháp thử)

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật Không được quá 10.000 khuẩn lạc/g

E. coli Âm tính đối với mẫu thử

Salmonella Âm tính đối với mẫu thử

Nấm men và nấm mốc Không được quá 400 khuẩn lạc/g

5.4. Hàm lượng Không được nhỏ hơn 3,3% và không được quá 6,8% CO₂ tính theo chế phẩm khô.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo gel với ion calci Cho 1,0 g mẫu vào 99 ml nước và khuấy trong 2 giờ, sử dụng máy khuấy có cánh khuấy kiểu chân vịt. Dùng pipet lấy một lượng nhỏ dung dịch này cho vào dung dịch CaCl₂ 10%. Gel dạng sợi dai được hình thành ngay lập tức.

Tạo gel với ion natri Cho 1,0 g mẫu vào 99 ml nước và khuấy trong 2 giờ, sử dụng máy khuấy có cánh khuấy kiểu chân vịt. Thêm 0,5 g NaCl, gia nhiệt đến 80°C đồng thời khuấy, và giữ ở 80°C trong 1 phút. Để dung dịch nguội đến nhiệt độ phòng. Gel cứng chắc được hình thành.

6.2. Độ tinh khiết

Isopropyl alcol

Dung dịch chuẩn isopropyl alcol (IPA):

Cho 500,0 mg isopropyl alcol đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký vào bình định mức dung tích 50 ml, pha loãng tới thể tích 50 ml bằng nước và lắc đều. Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch này cho vào bình định mức dung tích 100 ml, pha loãng đến thể tích 100 ml bằng nước và lắc đều.

Dung dịch chuẩn tert - butyl alcol (TBA):

Cho 500,0 mg tert - butyl alcol đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký vào bình định mức dung tích 50 ml, pha loãng tới thể tích 50 ml bằng nước và lắc đều. Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch này cho vào bình định mức dung tích 100 ml, pha loãng đến thể tích 100 ml bằng nước và lắc đều.

Dung dịch hỗn hợp chuẩn:

Dùng pipet lấy 4 ml mỗi dung dịch chuẩn IPA và TBA cho vào bình tam giác dung tích 125 ml, pha loãng tới 100 ml bằng nước và lắc đều. Dung dịch này gồm khoảng 40 µg/ml mỗi loại isopropyl alcol và tert – butyl alcol.

Chuẩn bị mẫu:

Cho 1 ml nhũ tương chống tạo bọt thích hợp như Dow-Corning G-10 hoặc loại tương đương vào 200 ml nước được đựng trong bình chưng cất đáy tròn dung tích 1.000 ml. Thêm vào 5 g mẫu và lắc bình trong 1 giờ trên máy lắc có xoáy. Nối bình với cột phân đoạn và cất khoảng 100 ml; điều chỉnh nhiệt để bọt không trào vào cột. Thêm 4,0 ml dung dịch chuẩn TBA vào dịch cất để có được Dung dịch mẫu thử.

Cách tiến hành:

Bơm 5 µl dung dịch hỗn hợp chuẩn vào thiết bị sắc ký khí được trang bị detector ion hoá ngọn lửa và cột được làm bằng thép không gỉ, kích thước 1,8 m x 2,3 mm, được nhồi Porapak QS 80/100 mesh hoặc loại tương đương. Khí mang là He với tốc độ dòng 80 ml/phút. Nhiệt độ buồng bơm mẫu 200°C, nhiệt độ cột 165°C và nhiệt độ detector 200°C. Thời gian lưu của isopropyl alcol khoảng 2 phút, và của tert – butyl alcol khoảng 3 phút.

Xác định diện tích các pic của IPA và TBA và tính hệ số đáp ứng $f = A_{IPA}/A_{TBA}$, trong đó A_{IPA} là diện tích pic của isopropyl alcol và A_{TBA} là diện tích pic của tert – butyl alcol.

Tương tự, bơm 5 µl dung dịch mẫu thử và xác định các diện tích pic, ghi lại diện tích pic của isopropyl alcol là a_{IPA} và diện tích pic của tert – butyl alcol là a_{TBA} .

Tính kết quả: hàm lượng isopropyl alcol (mg/kg) trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$(a_{IPA} \times 4.000)/(f \times a_{TBA} \times W)$$

Trong đó W là khối lượng mẫu phân tích (g)

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Các yêu cầu về vi sinh

vật

Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ lên dịch mẫu trong mỗi đĩa petri 12 – 15 ml agar trước đó được làm nguội đến 44 – 46°C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông lại. Lật ngược các đĩa và ủ trong 48 ± 2 giờ ở 35 ± 1 °C.

Sau khi ủ đếm các khuẩn lạc phát triển nhìn thấy được trên mỗi đĩa và ghi lại số khuẩn lạc. Lấy trung bình của hai đĩa và nhân với hệ số pha loãng mẫu 100. Trường hợp không có khuẩn lạc được nhìn thấy, kết quả được thể hiện là nhỏ hơn 100 CFU/g.

E.coli

Sử dụng kỹ thuật vô trùng, hoà 1 g mẫu trong 99 ml canh trường lactose, sử dụng hoặc Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy cho tới khi mẫu tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 15 phút và sau đó đẩy nhẹ dụng cụ chứa và ủ canh trường trong 18 – 24 giờ ở 35 ± 1 °C. Dùng 1 pipet tiệt trùng lấy 1 ml canh trường đã ủ cho vào ống chứa 10 ml canh trường GN. Ủ trong 18 – 24 giờ và sau đó ria cấy các ống canh trường GN cho thấy sinh trưởng (+) tính hoặc sinh hơi lên các đĩa cặp đôi Levine EMB. Ủ các đĩa trong 24 ± 2 giờ ở 35 ± 1 °C và sau đó kiểm tra các khuẩn lạc điển hình của *E.coli* tức là biểu thị màu đỏ tím đậm vào tâm đen và có ánh kim loại xanh đôi lúc rải rác trên mặt thạch. Ghi lại bất kỳ khuẩn lạc *E. coli* điển hình được cho là dương tính, loại khác là âm tính. Ria cấy bất kỳ khuẩn lạc khả nghi được phân tách rõ lên đĩa PCA và ủ trong 18 - 24 giờ ở 35 ± 1 °C. Nhuộm màu Gram trên bất kỳ khuẩn lạc phát triển trên môi trường cấy để khẳng định là Gram âm. Nếu vậy, phân tán bất kỳ khuẩn lạc phát triển vào lượng nhỏ nước muối 0,85% và tiến hành các phép thử hóa học để nhận dạng chủng vi khuẩn. Điều này được làm thuận lợi nhất bằng cách sử dụng dải API 20E hoặc Micro ID hoặc các hệ thống tương đương.

Sau khi hoàn tất các phép thử, nhận dạng vi sinh vật theo Hướng dẫn định danh của hệ thống được sử dụng và ghi lại kết quả cuối cùng.

Các môi trường

Canh trường GN (Canh trường Gram âm)

Pepton 20 g

Dextrose 1,0 g

Mannitol 2,0 g

Natri citrat 5,0 g

Natri deoxycholat 0,5 g

Dikali phosphat 4,0 g

Monokali phosphat 1,5 g

Natri chlorid 5,0 g

Pha thành 1 l bằng nước khử ion, pH = 7,0 ± 0,2 ở 25°C

Salmonella

Sử dụng kỹ thuật thanh trùng, phân tán 5 g mẫu trong 200 ml canh trường lactose tiệt trùng sử dụng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan tối đa trên khoảng 15 phút. Đậy lỏng dụng cụ chứa và ủ ở 35

± 1 oC trong 24 ± 2 giờ.

Tiếp tục như bằng phương pháp ở trang 221 của FNP 5/Rev.2 (1991). Định tính có thể tiến hành thuận tiện hơn khi sử dụng các hệ thống API hoặc Micro ID hoặc hệ thống tương đương.

Nấm men và nấm mốc

Sử dụng kỹ thuật vô trùng, phân tán 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy cho đến khi tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri tách biệt, cặp đôi, đánh dấu tương ứng. Đổ lên dịch mẫu trong mỗi đĩa petri 15 – 20 ml Potato dextrose agar (hoặc đã acid hoá hoặc chứa chất kháng sinh) trước đó đã khồng chế đến 44 – 46°C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông đặc. Lật ngược các đĩa và ủ trong 5 ngày ở 20 – 25°C.

Sau khi ủ, đếm khuẩn lạc phát triển nhìn thấy trên mỗi đĩa sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc và ghi tổng số khuẩn lạc. Tách nấm men ra khỏi nấm mốc dựa vào hình thái và đếm chúng riêng. Lấy trung bình số khuẩn lạc có trên các đĩa canh trường nhân với hệ số pha loãng 100. Nếu không có khuẩn lạc nào nhìn thấy trên đĩa thì biểu diễn kết quả là nhỏ hơn 100 CFU/g.

6.4. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong phần thử đối với Xác định CO₂ bằng cách khử carboxyl trong “Các phương pháp chung”, (Vol. 4), sử dụng chính xác 1,2 g mẫu.

PHỤ LỤC 16

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI PECTIN

INS 440

1. Tên khác, chỉ số

2. Định nghĩa

Pectin bao gồm chủ yếu là các ester của acid polygalacturonic đã được methyl hoá một phần và các muối natri, kali, calci, amoni của chúng; Pectin thu nhận được từ quá trình chiết các loại nguyên liệu thực vật ăn được với nước, thường là táo hay quả có múi (citrus); chỉ có methanol, ethanol và isopropanol được sử dụng làm chất kiểm rửa, trong một số trường hợp một phần của các ester methyl có thể chuyển thành các dạng amid bậc 1 khi xử lý bằng amoniac trong môi trường kiềm. SO_2 có thể thêm vào làm chất bảo quản.

Sản phẩm pectin thương mại thường được pha loãng với đường nhằm mục đích chuẩn hoá. Ngoài các loại đường, pectin có thể được trộn với các loại muối dùng cho thực phẩm khi cần nhằm kiểm soát pH và tạo ra các đặc tính mong muốn. Thông tin thương mại của sản phẩm được chỉ rõ giá trị pH, mức độ tạo gel, độ nhớt, mức độ ester hoá và các đặc trưng kỹ thuật.

Mã số C.A.S.

9000-69-5

3. Cảm quan

Dạng bột màu trắng, hơi vàng, hơi xám hoặc hơi nâu

Chất tạo gel, chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hoá

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Tan trong nước, không tan trong methanol, ethanol và isopropanol

Pectin

Phải có phản ứng đặc trưng của pectin.

Nhóm amid

Chỉ áp dụng đối với các pectin đã được amid hoá (mô tả ở phần Phương pháp thử)

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô

Không được quá 12,0 % (sấy ở 105°C trong 2 giờ)

SO_2

Không được quá 50 mg/kg.

Dư lượng dung môi

Không vượt quá 1% methanol, ethanol và 2-propanol ở dạng đơn chất hoặc hợp chất

<i>Tro không tan trong acid</i>	Không vượt quá 1,0%
<i>Tổng số chất không tan</i>	Không quá 3,0%.
<i>Nitrogen</i>	Không vượt quá 2,5% sau khi rửa bằng acid và ethanol
<i>Acid galacturonic</i>	Không được nhỏ hơn 65,0% tính theo chế phẩm khô và không có tro.
<i>Mức độ amin hoá</i>	Không vượt quá 25,0% tổng số các nhóm carboxyl của pectin.
<i>Chì</i>	Không được quá 5,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Pectin

Làm ẩm 0,05 g mẫu bằng 2 - propanol. Bổ sung 50 ml nước và khuấy bằng thiết bị khuấy từ. Điều chỉnh pH đến 12 bằng dung dịch NaOH 0,5 mol/l và để yên dung dịch trong thời gian 15 phút. Làm giảm pH xuống 7 bằng acid HCl 0,5 mol/l. Bổ sung nước cất cho đến thể tích 100 ml. Cho các mẫu vào các cuvet thạch anh 1cm như sau:

	Dung dịch đệm pH = 7,0 *)	Dung dịch mẫu thử	Nước	Dung dịch enzym **)
Không có enzym	0,5 ml	1,0 ml	1,0 ml	-
Không có mẫu thử	0,5 ml	-	1,5ml	0,5 ml
Mẫu thử	0,5 ml	1,0 ml	0,5ml	0,5 ml

*) Hoà tan 6,055 g tris (hydroxymethyl) aminomethane (ví dụ: TRIZMA Base, Sigma) và 0,147 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trong 1 lít nước. Điều chỉnh pH đến 7,0 bằng acid HCl 1 mol/l.

**) Pha loãng enzym tinh khiết pectate lyase theo tỷ lệ 1 : 100 bằng dung dịch đệm có pH = 7.

Lắc đều các dung dịch và đo độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm tại thời điểm 0 và 10 phút.

Kết quả:

A_0 = độ hấp thụ ở 0 phút = Mẫu thử– (Không có enzym + Không có mẫu thử)

A_{10} = độ hấp thụ ở 10 phút = Mẫu thử– (Không có enzym + Không có mẫu thử)

Lượng sản phẩm không bão hoà sinh ra tương ứng với thay đổi độ hấp thụ ($A_{10} - A_0$). Giá trị này phải lớn hơn 0,023. Điều này phân biệt pectin so với các loại gồm khác, thể hiện sự không thay đổi về độ hấp thụ.

Nhóm amid

Cho 2 ml acid HCl đậm đặc và 50 ml ethanol 60% vào 0,5 g mẫu, khuấy đều trong 20 phút. Sau đó chuyển vào ống lọc thủy tinh xối rửa 6 lần mỗi lần 10 ml hỗn hợp HCl-ethanol 60%. Hoà tan trong 100 ml nước cất; cho thêm một vài giọt NaOH 0,1 mol/l để thu được dung dịch. Chuyển 4 ml của dung dịch này vào ống nghiệm (có đường kính trong 15,5 mm và chiều dài 146 mm). Thêm 1 ml dung dịch NaOH 5 mol/l và lắc đều. Hỗn hợp sẽ tạo thành dạng gel. Làm đầy ống thủy tinh nhỏ (có đường kính trong 7,8 mm và chiều dài 79 mm) bằng 2,5 ml acid boric TS và để vào bên trong ống nghiệm. Bao kín bằng parafilm và ủ qua đêm ở nhiệt độ 30°C. Trong trường hợp có mặt của các nhóm amid chất chỉ thị chuyển từ màu đỏ sang màu xanh lá cây vì đã giải phóng ra khí amoniac.

6.2. Độ tinh khiết

SO₂

Trộn 100 g mẫu vào 500 ml methanol trong bình tam giác đáy tròn dung tích 1.000 ml có ống hút khí và nối cổ bình với sinh hàn ngược. Chuẩn bị một khớp nối thủy tinh kết nối từ sinh hàn tới bình thu hoặc ống chữ U chứa 10 ml dung dịch hydrogen peroxyd 3% được trung hoà nhờ có dung dịch đỏ methyl TS. Nối ống hút khí với nguồn carbon dioxyd hoặc nitrogen không có oxygen, duy trì dòng khí nhằm tạo ra bọt khí đều đều. Ngay sau bộ dụng cụ đã đuổi hết không khí, đổ 30 ml dung dịch acid HCl (10 ml dung dịch acid HCl đậm đặc pha trong 20 ml nước) vào sinh hàn ngược, và ngay lập tức nối bình thu hoặc ống chữ U. Gia nhiệt từ từ cho đến khi methanol bắt đầu chảy ngược và đun để methanol chảy ngược từ từ trong 2 giờ. Tháo bộ dụng cụ ra, cho dung dịch đỏ methyl vào và chuẩn độ hydrogen peroxyd bằng dung dịch NaOH 0,01 mol/l. Mỗi ml dung dịch NaOH 0,01 mol/l tương ứng với 0,32 mg SO₂.

Dư lượng dung môi

Áp dụng Phương pháp I trong Quyển 4, Phương pháp chung, các thành phần hữu cơ

Dung dịch chuẩn gốc: Cân 5 g mỗi loại methanol, ethanol và 2 – propanol cho vào 500 ml nước trong bình định mức dung tích 1.000 ml. Định mức đến thể tích 1.000 ml bằng nước.

Dung dịch nội chuẩn: Cân chính xác 5 g 2 – butanol ($W_{\text{chuẩn}}$) cho vào 500 ml nước trong bình định mức dung tích 1.000 ml và định mức tới 1.000 ml bằng nước.

Dung dịch trắng: Không định lượng mẫu trắng

Mẫu: Bảo quản mẫu ở nơi khô ráo và mát. Trộn đều mẫu trước khi phân tích.

Cân chính xác 1 g mẫu ($W_{\text{mẫu}}$) vào cốc dung tích 100 ml và trộn với 5 g sucrose. Cho vào bình tan giác có thanh khuấy từ, thêm vào 95 ml nước và 1 ml dung dịch nội chuẩn. Trong khi khuấy nhanh, thêm từ từ hỗn hợp pectin-sucrose. Đậy nắp bình và khuấy trong 2 giờ. Pectin phải được hoà tan hoàn toàn. Cân chính xác 1 g dung dịch này ($M_{\text{mẫu}}$) vào lọ để phân tích bằng GC không gian hơi.

Dung dịch hiệu chỉnh: Dùng pipet lấy 2 ml dung dịch gốc chuẩn và 2 ml dung dịch nội chuẩn cho vào bình định mức dung tích 200 ml và định mức tới 200 ml bằng nước. Cân chính xác 1 g dung dịch này ($M_{\text{chuẩn}}$) cho vào lọ và được dùng cho phân tích bằng GC không gian hơi.

Cách tiến hành:

Tiếp tục phân tích như mô tả ở Quyển 4 “Dư lượng dung môi”, sử dụng các điều kiện đưa ra trừ nhiệt độ gia nhiệt mẫu nên là 70°C, và nhiệt độ syringe nên là 80°C.

Tính kết quả:

Nồng độ (%) của mỗi dư lượng dung môi:

$$\% \text{ dung môi} = \frac{R_{\text{mẫu}} \times W_{\text{chuẩn}} \times M_{\text{chuẩn}}}{R_{\text{chuẩn}} \times W_{\text{mẫu}} \times M_{\text{mẫu}} \times 1.000} \times 100$$

Trong đó:

$R_{\text{mẫu}}$ là diện tích pic tương đối của mẫu

$R_{\text{chuẩn}}$ là diện tích pic tương đối của chuẩn

$W_{\text{mẫu}}$ là khối lượng mẫu (g)

$W_{\text{chuẩn}}$ là khối lượng dung môi dùng cho dung dịch gốc chuẩn

$M_{\text{mẫu}}$ là khối lượng dung dịch mẫu dùng cho phân tích bằng GC

$M_{\text{chuẩn}}$ là khối lượng dung dịch hiệu chỉnh dùng cho phân tích bằng GC.

Tổng số chất không tan

Sấy giấy lọc sợi thủy tinh 70 mm (GF/B (Whatman code 1821 070) trong tủ sấy có quạt ở 105°C trong khoảng 1 giờ. Chuyển giấy lọc vào bình hút ẩm có chứa silicagel và để nguội. Cân giấy lọc (M_1). Cân khoảng 1 g (S) mẫu cho vào cốc dung tích 250 ml. Thêm 5 ml 2 – propanol để phân tán mẫu. Trong khi khuấy từ, thêm 100 ml dung dịch NaOH 0,03 mol/l có chứa 0,1% (theo khối lượng) ethylen diamin tetra-acetic acid (muối natri), đã được lọc qua giấy lọc GF/B. Khuấy khoảng 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó gia nhiệt đến sôi (không phải gia nhiệt nếu có quá nhiều bột).

Lọc chân không dung dịch nóng qua giấy lọc sợi thủy tinh ví dụ kit lọc chân không có 3 phễu Hartley (70 cm), có tấm chịu nhiệt. Rửa cốc 5 lần và lọc nước rửa bằng 100 ml nước ấm (khoảng 50°C) đã được lọc qua giấy lọc GF/B.

Sấy giấy lọc cùng với cặn ở 105°C trong 1 giờ. Chuyển vào bình hút ẩm chứa silicagel và để nguội. Cân giấy (M_2). Tính % tổng số chất không tan:

$$\text{Tổng số chất không tan (\%)} = [(M_2 - M_1)/S] \times 100$$

*Acid galacturonic và mức độ
amid hoá*

Cân 5 g mẫu chính xác đến 0,1 mg và chuyển vào cốc thích hợp. Khuấy trong 10 phút với hỗn hợp 5 ml dung dịch acid HCl TS và 100 ml ethanol 60%. Chuyển vào một ống lọc thủy tinh xốp (dung tích từ 30 - 60 ml) và rửa bằng 6 lần 15 ml hỗn hợp HCl và ethanol 60%, sau đó bằng ethanol 60% cho đến khi dịch lọc không còn clorid. Cuối cùng rửa bằng 20 ml ethanol, sấy trong 2,5 giờ trong tủ sấy ở 105°C, làm nguội và cân. Chuyển chính xác 1/10 tổng khối lượng tịnh của mẫu đã sấy khô (tương ứng với 0,5 g mẫu gốc chưa được rửa) vào bình nón dung tích 250 ml và làm ẩm mẫu bằng 2 ml ethanol TS. Thêm 100 ml nước cất đun sôi để nguội, đóng nút lại và thỉnh thoảng lắc cho đến khi dung dịch hoàn chỉnh được hình thành. Thêm 5 giọt phenolphthalein TS, chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 mol/l và ghi lại kết quả như độ chuẩn ban đầu (V_1).

Thêm chính xác 20 ml dung dịch NaOH 0,5 mol/l, đập nút lại, lắc mạnh và để yên trong 15 phút. Thêm chính xác 20 ml dung dịch acid HCl 0,5 mol/l và lắc cho đến khi màu hồng biến mất. Chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 mol/l đến màu hồng nhạt vẫn tồn tại sau khi lắc mạnh; ghi lại giá trị này như là độ chuẩn xà phòng hoá (V_2). Chuyển toàn lượng các thành phần trong bình nón vào bình chưng cất dung tích 500 ml có bẫy Kjeldahl và sinh hàn làm mát bằng nước, ống dẫn đưa xuống phía dưới bề mặt của 150 ml hỗn hợp của nước không có CO₂ và 20,0 ml dung dịch acid HCl 0,1 mol/l trong bình thu nhận. Thêm 20 ml dung dịch NaOH 10% vào bình chưng cất, gắn kín các chỗ kết nối và sau đó bắt đầu gia nhiệt cẩn thận tránh bọt trào. Tiếp tục gia nhiệt đến khi lấy được 80 – 120 ml dịch cất. Thêm một vài giọt dung dịch đỏ methyl TS vào bình thu nhận và chuẩn độ acid dư bằng dung dịch NaOH 0,1 mol/l, ghi lại thể tích đã chuẩn độ S (ml). Tiến hành định lượng mẫu trắng trên 20,0 ml dung dịch acid HCl 0,1 mol/l và ghi lại thể tích đã sử dụng B (ml). Độ chuẩn amid = B - S

Cho chính xác 1/10 tổng khối lượng tịnh của mẫu khô (tương ứng với 0,5 g mẫu gốc chưa được rửa) và làm ẩm bằng 2 ml ethanol trong cốc dung tích 50 ml. Hoà tan pectin trong 25 ml dung dịch NaOH 0,125 mol/l. Khuấy dung dịch trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Chuyển toàn lượng dung dịch pectin đã được xà phòng hoá vào bình định mức dung tích 50 ml và pha loãng đến thể tích 50 ml bằng nước cất. Chuyển 20 ml dung dịch pectin đã pha loãng vào thiết bị cụ chưng cất và thêm vào 20 ml dung dịch Clark có chứa 100 g magnesi sulfat heptahydrat, 0,8 ml dung dịch acid H₂SO₄ đậm đặc và nước cất đến tổng thể tích 180 ml. Thiết bị chưng cất gồm có thiết bị bốc hơi nước kết nối với bình đáy tròn có nối với sinh hàn. Cả hai thiết bị bốc hơi nước và bình đáy tròn đều được trang bị áo nhiệt.

Chưng cất bằng cách gia nhiệt bình đáy tròn chứa mẫu. Lấy 15 ml dịch cất tách ra đầu tiên cho vào ống đong có vạch định mức. Sau đó cung cấp hơi và tiếp tục chưng cất cho đến khi lấy được 150 ml dịch cất cho vào cốc dung tích 200 ml. Thêm toàn lượng 15 ml dịch cất đầu tiên và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,05 mol/l tới pH = 8,5 và ghi lại thể tích đã chuẩn độ A (ml).

Thực hiện định lượng mẫu trắng trên 20 ml nước cất. Ghi lại thể tích đã dùng A₀ (ml). Độ chuẩn ester acetat là (A – A₀).

Tính mức độ amid hoá (bằng % tổng các nhóm carboxyl) theo công thức:

$$100 \times \frac{B - S}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

Tính hàm lượng acid galacturonic (mg) theo công thức:

$$19.41 \times [V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)]$$

Số mg acid galacturonic thu được theo cách này chính là hàm lượng trong 1/10 trọng lượng mẫu khô đã được rửa. Tính % acid galacturonic theo ẩm và không có tro, nhân số mg thu được với 1.000/x, trong đó x là khối lượng mẫu khô đã được rửa (mg).

Chú ý 1: Nếu pectin được biết là loại không được amid hoá, chỉ cần xác định V₁ và V₂, còn B – S được coi là bằng 0.

Chú ý 2: Đối với pectin từ quả táo hoặc quả có múi (citrus) thì hiệu số A – A₀ không có ý nghĩa trong tính toán hàm lượng acid galacturonic và mức độ amid hoá.

Chú ý 3: Nếu muốn, tính độ ester hoá (bằng % tổng các nhóm carboxyl) theo công thức:

$$100 \times \frac{V_2 - (A - A_0)}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

Chú ý 4: Nếu muốn, tính độ ester acetat (bằng % tổng các nhóm carboxylic từ acid galaturonic) theo công thức:

$$100 \times \frac{A - A_0}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

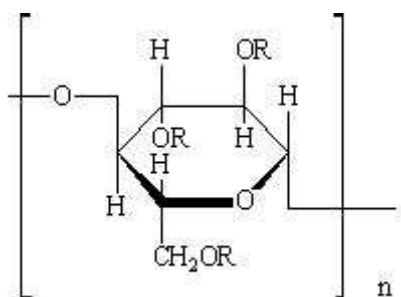
Chỉ

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 17

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI METHYL CELLULOSE

	Cellulose methyl ether;
1. Tên khác, chỉ số	INS 461 ADI “không giới hạn”
2. Định nghĩa	Ether methyl của cellulose, được sản xuất từ bột gỗ hoặc bông bằng cách xử lý với kiềm, và methyl hóa cellulose kiềm bằng methyl clorid. Chế phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.
Tên hóa học	Methyl ether của cellulose; Cellulose methyl ether
Mã số C.A.S.	9004-67-5
Công thức hóa học	$[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_3)_y]_n$ trong đó $x = 1,00$ đến $1,55$ $y = 2,00$ đến $1,45$ $x+y = 3,00$ (y = độ thay thế)
Công thức cấu tạo	 trong đó $R = H$ hoặc CH_3
Khối lượng phân tử	Đơn vị cấu trúc không thế: 162,14 Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế là 1,45: 182 Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế là 2,00: 190 Đại phân tử: từ khoảng 20000 (n khoảng 100) đến khoảng 380000 (n có giá trị khoảng 2000) Dạng hạt mịn, sợi nhỏ, hoặc bột, màu trắng hoặc trắng nhạt, không có mùi, hút ẩm.
3. Cảm quan	Chất nhũ hóa, chất ổn định, chất làm dày.
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	

<i>Độ tan</i>	Trương nở trong nước, tạo dung dịch từ trong đến trắng đục, nhớt, keo; không tan trong ethanol, ether và cloroform; tan trong acid acetic băng.
<i>Tạo bột</i>	Phải có phản ứng tạo bột đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.

5.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi làm khô</i>	Không được quá 10,0% (sấy tại 105°C, trong 3 giờ).
<i>pH</i>	5,0 - 8,0 (dung dịch 1/100).
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 1,5 %. (Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Phương pháp I, cân 1 g mẫu).
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không được thấp hơn 25% và không được quá 33% nhóm methoxyl

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Tạo bột</i>	Lắc mạnh dung dịch mẫu thử 0,1%. Cần xuất hiện một lớp bột. (Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxymethyl cellulose với các ether cellulose khác.
<i>Tạo kết tủa</i>	Thêm 5 ml dung dịch đồng sulfat hoặc nhôm sulfat 5% vào 5 ml dung dịch mẫu thử 0,5%. Trong dung dịch không được xuất hiện kết tủa. Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxymethyl cellulose với các ether cellulose khác.

6.2. Độ tinh khiết

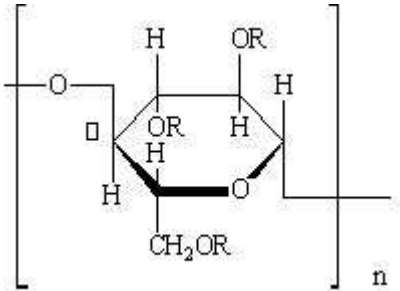
<i>Chì</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.
------------	---

6.3. Định lượng

Xác định hàm lượng nhóm methoxyl bằng phương pháp Xác định nhóm Ethoxyl và Methoxyl (xem JECFA monograph 1 - Vol.4)

PHỤ LỤC 18

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI METHYL ETHYL CELLULOSE

	MEC;
1. Tên khác, chỉ số	INS 465
	ADI “không giới hạn”
2. Định nghĩa	Hỗn hợp ether của cellulose, được sản xuất từ cellulose bằng cách xử lý với kiềm, dimethyl sulfat và ethyl clorid; cả hai nhóm methyl và ethyl được gắn với các tiểu phân anhydroglucose bằng liên kết ether. Sản phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.
Tên hóa học	Ethyl methyl ete của cellulose.
Mã số C.A.S.	9004-69-7
Công thức hóa học	$[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_3)_y(OC_2H_5)_z]_n$ trong đó $z = 0,57 \div 0,8$ $y = 0,2 \div 0,4$ $x = 3 - (y + z)$ ($y + z$ = độ thay thế)
Công thức cấu tạo	
	Trong đó R = H hoặc CH ₂ hoặc C ₂ H ₅
Khối lượng phân tử	Đơn vị cấu trúc không thế: 162,14 Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế 0,77: 181 Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế 1,2: 190 Đại phân tử: 30000 đến 40000 ($n \sim 200$) Dạng bột mịn hoặc hình que, màu hơi vàng, không mùi và dễ hút ẩm.
3. Cảm quan	
	Chất nhũ hóa, chất ổn định, chất làm dày, chất tạo bột.
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	

5.1. Định tính

<i>Độ tan</i>	Trương nở trong nước, tạo dung dịch từ trong đến trắng đục, nhớt, keo; không tan trong ethanol.
<i>Tạo bột</i>	Phải có phản ứng tạo bột đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
<i>Mức độ thay thế</i>	Xác định mức độ thay thế bằng sắc ký khí.

5.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi làm khô</i>	Không được quá 15% đối với dạng que, không được quá 10% đối với dạng bột. (sấy đến khối lượng không đổi).
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 0,6 %.
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng

Không được thấp hơn 3,5% và không được quá 6,5% nhóm methoxyl ($-OCH_3$), không được thấp hơn 14,5% và không được quá 19% nhóm ethoxyl ($-OCH_2CH_3$), không thấp hơn 13,2% và không được quá 19,6% tổng các nhóm alkoxyl, tính theo methoxyl (theo lượng khô).

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Tạo bột</i>	Lắc mạnh dung dịch mẫu thử 0,1%. Cần xuất hiện một lớp bột. (Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxymethyl cellulose với các ether cellulose khác, các alginat và các gồm tự nhiên).
<i>Tạo kết tủa</i>	Thêm 5 ml dung dịch đồng sulfat hoặc nhôm sulfat 5 % vào 5 ml dung dịch mẫu thử 0,5 %. Trong dung dịch không được xuất hiện kết tủa. (Phép thử này cho phép phân biệt các ether cellulose với natri carboxymethyl cellulose, gelatin, gồm carob bean và gồm tragacanth).

6.2. Độ tinh khiết

<i>Tro sulfat</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Phương pháp I. - Cân 1 g mẫu.
<i>Chì</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

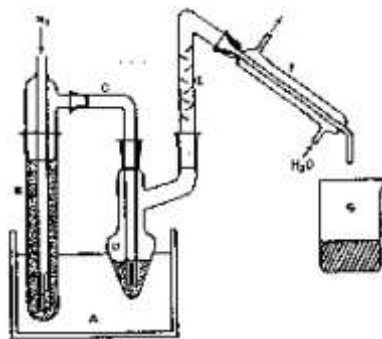
6.3. Định lượng

Xác định nhóm ethoxyl (có thể xác định riêng biệt ethoxyl và methoxyl bằng sắc ký khí (Cobler, Samsel and Beaver, Talanta, 9, 473, 1962)).

Thiết bị

Thiết bị dùng để xác định nhóm hydroxypropoxy được mô tả ra trong hình vẽ dưới đây. Bình cất hai cổ (D), cổ cạnh được nối với cột Vigreux được bọc bằng giấy nhôm (E) và cổ giữa nối với một ống sục khí chạy từ cổ tới đáy bình để dẫn hơi nước và nitrogen. Bộ phận tạo hơi nước (B), được nối với ống sục khí qua ống C. Sinh hàn (F), được nối với cột Vigreux. Bình cất và bộ phận tạo hơi nước được đặt trong bể dầu (A), có gắn thiết bị điều nhiệt để duy trì nhiệt độ 155°C và tốc độ gia nhiệt mong muốn. Sản phẩm

cát được thu vào bình 150 ml (G), hoặc một dụng cụ chứa phù hợp khác.



Tiến hành

Chuyển khoảng 100 mg (cân chính xác đến 0,1 mg) mẫu thử đã được sấy khô ở 105°C trong 2 giờ, vào bình cát. Thêm vào đó 10 ml dung dịch crom trioxyd (60 g trong 140 ml nước). Đặt bộ phận tạo hơi nước và bình đun vào bể dầu (tại nhiệt độ phòng) ngang vạch trên cùng của dung dịch crom trioxyd. Bắt đầu làm lạnh nước qua ống sinh hàn và sục khí nitrogen qua bình đun với tốc độ 1 bọt/giây. Nâng nhiệt độ bể dầu từ nhiệt độ phòng lên 155°C trong thời gian không ít hơn 30 phút, và duy trì nhiệt độ này đến khi xác định xong. Cát lấy khoảng 50 ml dịch cát. Tháo sinh hàn ra khỏi cột Vigreux, rửa bằng nước, thu dịch rửa vào bình đựng dịch cát. Chuẩn độ dịch rửa và dịch cát bằng NaOH 0,02 N đến pH = 7,0, sử dụng máy đo pH với thang đo mở rộng, (Ghi chú: Có thể sử dụng dung dịch phenolphthalein (TS) là chỉ thị cho phép chuẩn độ, trong trường hợp này sử dụng đồng thời đối với tất cả mẫu chuẩn và mẫu trắng).

Ghi lại thể tích dung dịch NaOH dùng để chuẩn độ, V_a .

Thêm 500 mg natri bicarbonat và 10 ml dung dịch acid sulfuric loãng (TS). Sau khi hết khí carbon dioxyd bay ra, thêm một gam kali iodid. Đóng nắp bình, lắc đều rồi để yên trong bóng tối trong 5 phút. Chuẩn độ lượng iod tạo thành bằng dung dịch natri thiosulfat 0,02 N tới khi mất màu vàng, xác định điểm kết thúc chuẩn độ bằng cách thêm vài giọt dung dịch hồ tinh bột (TS). Ghi lại thể tích natri thiosulfat đã sử dụng, Y_a .

Tiến hành làm vài mẫu trắng (hóa chất), trong đó chỉ sử dụng dung dịch crom trioxyd trong qui trình trên. Tỉ số giữa thể tích natri hydroxyd (V_b) và thể tích natri thiosulfat (Y_b) dùng để chuẩn độ được gọi là tỉ số độ acid/độ oxi hóa $K = V_b/Y_b$, cho crom trioxyd trong quá trình cất phải là hằng số đối với tất cả các thí nghiệm.

Tiến hành làm vài mẫu trắng (chuẩn), trong đó thay mẫu thử bằng 100 mg methyl cellulose (không chứa tạp chất). Tỉ số giữa thể tích natri hydroxyd (V_m) và thể tích natri thiosulfat (Y_m).

Tính hàm lượng ethoxyl (mg) của mẫu thử, theo công thức sau:

$$45.0 \times [N_2(V_a - V_m) - kN_2(Y_a - Y_m)]$$

trong đó

N_1 = Nồng độ chính xác của dung dịch natri hydroxyd 0,02N

N_2 = Nồng độ chính xác của dung dịch natri thiosulfat 0,02N

$$k = V_b N_1 / Y_b N_2$$

Ghi lại phần trăm ethoxyl, B%.

Xác định hàm lượng methoxyl

Xác định hàm lượng methoxyl cộng ethoxyl (hàm lượng tổng alkoxyl) như hướng dẫn trong phần Xác định nhóm Ethoxyl và Methoxyl. Sau đó tính hàm lượng methoxyl như sau:

$$\% \text{Methoxyl} = \frac{31}{45} \times (A - B)$$

trong đó

A = hàm lượng tổng alkoxyl , biểu diễn bằng % ethoxyl.

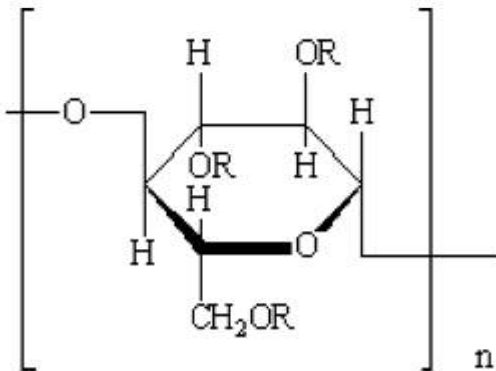
B = hàm lượng % ethoxyl, được xác định ở trên.

Xác định hàm lượng tổng alkoxyl (theo methoxyl)

Mỗi ml dung dịch natri thiosulfat 0,1N tiêu tốn trong quá trình xác định hàm lượng tổng alkoxyl tương đương với 0,517 mg alkoxyl, tính theo methoxyl.

PHỤ LỤC 19

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI NATRI CARBOXYMETHYL CELLULOSE

	Sodium cellulose glucolate, NaCMC, CMC, gồm cellulose, natri CMC,
1. Tên khác, chỉ số	INS 466 ADI “không giới hạn”
2. Định nghĩa	Được sản xuất từ cellulose bằng cách xử lý với kiềm và acid monoclo acetic hoặc muối natri của nó. Sản phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.
Tên hóa học	Muối natri của carboxymethyl ether của cellulose.
Mã số C.A.S.	9004-32-4
Công thức hóa học	$[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_2COONa)_y]_n$ trong đó n là độ polyme hóa $x = 1,50 \div 2,80$ $y = 0,2 \div 1,50$ $x + y = 3,0$ (y là độ thay thế)
Công thức cấu tạo	 Trong đó R = H hoặc CH₂COONa
Khối lượng phân tử	Một đơn vị cấu trúc có độ thay thế 0,2: 178,14 Một đơn vị cấu trúc có độ thay thế 1,5: 282,18 Đại phân tử: lớn hơn 17000 (n có giá trị khoảng 100)
3. Cảm quan	Dạng hạt, bột mịn hoặc hình que nhỏ, có màu trắng hoặc hơi vàng. Dễ hút ẩm, gần như không có mùi.
4. Chức năng	Chất làm dày, chất ổn định, tác nhân tạo huyền phù.
5. Yêu cầu kỹ thuật	

5.1. Định tính

<i>Độ tan</i>	Tạo dung dịch keo nhớt trong nước, không tan trong ethanol.
<i>Tạo bột</i>	Phải có phản ứng tạo bột đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
<i>Phản ứng màu</i>	Phải có phản ứng màu đặc trưng.

5.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi làm khô</i>	Không được quá 12,5 % sau khi sấy (sấy tại 105°C đến khối lượng không đổi)
<i>pH</i>	6,0 ÷ 8,5 (dung dịch 1 trong 100).
<i>Natri</i>	Không được quá 12,4 % tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Natri clorid</i>	Không được quá 0,5 % tính theo chế phẩm đã làm khô (mô tả trong phần Phương pháp thử).
<i>Glycolat tự do</i>	Không được quá 0,4 % tính theo natri glycolat tính theo chế phẩm đã làm khô (mô tả trong phần Phương pháp thử).
<i>Độ thay thế</i>	Không được nhỏ hơn 0,2 và không được quá 1,5 (mô tả trong phần Phương pháp thử).
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không thấp hơn 99,5% natri carboxymethyl cellulose, tính theo chế phẩm đã được làm khô.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>Tạo bột</i>	Lắc mạnh dung dịch mẫu 0,1%. Trong dung dịch không được xuất hiện lớp bột. Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxymethyl cellulose với các ether cellulose khác, các alginat và các gôm tự nhiên.
<i>Tạo kết tủa</i>	Thêm 5 ml dung dịch đồng sulfat hoặc nhôm sulfat 5% vào 5 ml dung dịch mẫu thử 0,5% Trong dung dịch không được xuất hiện kết tủa. (Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxymethyl cellulose với các ether cellulose khác, gelatin, gôm carob bean và tragacanth).
<i>Phản ứng màu</i>	Vừa thêm 0,5 g natri carboxymethyl cellulose dạng bột vào 50 ml nước vừa khuấy đều để tạo sự phân tán đồng nhất. Tiếp tục khuấy cho đến khi tạo thành dung dịch trong. Lấy 1 ml dung dịch này vào một ống nghiệm nhỏ, pha loãng bằng nước với thể tích tương đương, thêm 5 giọt 1-naphtol (TS). Nghiêng ống nghiệm và cẩn thận thêm vào thành ống 2 ml acid sulfuric sao cho tạo thành một lớp mỏng nằm dưới. Màu tím đỏ phải xuất hiện ở mặt phân cách giữa hai lớp.

6.2. Độ tinh khiết

Natri clorid	Nung nóng nhẹ trên bếp 5g mẫu (cân chính xác đến 0,1 mg) trong chén platin hoặc chén sứ, đầu tiên trên ngọn lửa nhỏ để mẫu không bị nung, khi than hóa hoàn toàn tiếp tục nung mẫu trong lò điện 15 phút ở nhiệt độ 500°C. Làm nguội, nghiền nhỏ tro thu được và chiết vài lần bằng nước
--------------	--

âm. Lọc dịch chiết vào bình định mức 500 ml, acid hóa bằng acid nitric và định mức tới vạch. Xác định hàm lượng NaCl trong 100 ml dịch chiết này bằng phương pháp Volhard, sử dụng dung dịch bạc nitrat 0,02 N và amoni nitrat 0,02N.

Mỗi ml dung dịch bạc nitrat 0,02 N tương đương với 1,169 mg NaCl. Tính hàm lượng natri clorid theo công thức sau:

$$\% \text{ natri glucolat} = (a \times 0,001169 \times 5) / b$$

trong đó a = Thể tích (ml) dung dịch bạc nitrat 0,02 N đã dùng để chuẩn độ.

b = Khối lượng mẫu thử sau khi trừ đi hàm lượng nước (g).

Glycolat tự do

Cân 0,5g mẫu (chính xác đến 0,1 mg) rồi chuyển vào một cốc vại có mở dung tích 100 ml. Cân trọng thấm ướt mẫu bằng 5 ml acid acetic băng, sau đó bằng 5 ml nước rồi khuấy bằng đũa thủy tinh đến tan hoàn toàn (thường mất khoảng 15 phút). Vừa khuấy vừa thêm từ từ 50 ml aceton, sau đó thêm khoảng 1g natri sulfat. Tiếp tục khuấy thêm vài phút để đảm bảo toàn bộ carboxymethyl cellulose kết tủa hết. Lọc qua giấy lọc mềm, đã được thấm ướt trước đó bằng một lượng nhỏ aceton. Thu dịch lọc vào bình định mức 100 ml. Dùng 30 ml acetone để thúc đẩy quá trình lọc và để rửa kết tủa. Định mức tới vạch bằng aceton và lắc đều.

Chuẩn bị mẫu trắng gồm 5 ml nước, 5 ml acid acetic băng và aceton trong bình định mức 100 ml khác. Dùng pipet lấy 2 ml mẫu thử và 2 ml mẫu trắng vào 2 bình định mức 25 ml. Làm bay hơi aceton bằng cách đun cách thủy bình định mức, không đóng nút trong 20 phút. Làm nguội đến nhiệt độ phòng và thêm vào đó 5 ml dung dịch naphthalendiol (TS), lắc kỹ, sau đó thêm tiếp vào 15 ml Dung dịch naphthalendiol (TS) và lắc đều. Đậy miệng bình bằng một mảnh giấy nhôm và đun cách thủy trong 20 phút. Làm nguội đến nhiệt độ phòng và định mức đến vạch bằng dung dịch naphthalendiol (TS).

Đo độ hấp thụ quang của dung dịch mẫu so với mẫu trắng tại bước sóng 540 nm sử dụng cuvet 1cm. Đọc số mg acid glycolic tương ứng từ đường chuẩn như sau:

Thêm 0; 1; 2; 3; và 4 ml dung dịch acid glycolic chuẩn (1 mg/ml, được pha như sau: cân chính xác 0,100g acid glycolic (đã được làm khô trong bình hút ẩm chân không ít nhất 16h), sau đó hòa tan vào 100 ml nước, không giữ dung dịch quá 30 ngày) vào 5 bình định mức 100 ml. Thêm nước vào mỗi bình đến thể tích 5 ml, sau đó thêm 5 ml acid acetic băng và định mức đến vạch bằng aceton và lắc đều. Dùng pipet lấy 2 ml của mỗi dung dịch (có chứa lần lượt 0; 1; 2; 3 và 4 mg acid glycolic trong 100 ml) vào 5 bình định mức 25 ml và tiến hành qui trình như miêu tả trong phần chuẩn bị dung dịch thử.

Dựng đường chuẩn bằng cách vẽ đồ thị biểu thị sự phụ thuộc giữa lượng acid glycolic (mg) trong 100 ml dung dịch ban đầu với độ hấp thụ quang. Tính hàm lượng natri glycolat (glycolat tự do) theo công thức:

$$\% \text{ natri glycolat} = (a \times 0,129) / b$$

trong đó

a = Lượng (mg) glycolic acid tính từ đường chuẩn

b = Khối lượng mẫu thử sau khi trừ đi hàm lượng nước (g).

Độ thay thế

Chuẩn bị mẫu

Cân 5g mẫu (chính xác đến 0,1 mg) và chuyển vào bình nón 500 ml. Thêm 350 ml methanol hoặc ethanol (80% theo thể tích). Lắc huyền phù trong 30 phút. Gạn qua phễu lọc Thủy tinh đã cân bì, hút chân không nhẹ. Cuối quá trình lọc gạn tránh không để không khí bị hút qua phễu. Lặp lại quá trình trên với dung môi chiết cho đến khi thử ion clorid bằng dung dịch bạc nitrat (TS) cho kết quả âm tính. Thường cần xử lý khoảng 3 lần. Chuyển dung dịch natri carboxymethyl cellulose vào chén. Loại bỏ dung môi chiết còn bám trên cặn bằng acetone. Sấy khô chén trong lò ở nhiệt độ 110°C đến khối lượng không đổi. Cân lần đầu sau 2 giờ. Mỗi lần cân phải làm nguội chén trong bình hút ẩm và trong khi cân cần lưu ý rằng natri carboxymethyl cellulose hút ẩm nhẹ.

Tiến hành

Cân 2g mẫu khô (chính xác 0,1 mg), thu được từ qui trình chiết còn trên vào chén sứ đã cân bì. Đầu tiên nung nóng nhẹ trên bếp để đốt cháy mẫu từ từ, sau đó tăng nhiệt độ nung nóng mạnh trong 10 phút. Làm nguội, sau đó thấm ướt tro còn lại bằng 3-5 ml acid sulfuric đặc. Cần thận nung cho tới khi hết khói bay ra. Sau khi làm nguội, thêm khoảng 1 g amoni carbonat, dàn đều bột trong toàn bộ thể tích của chén. Nung nóng lại trên bếp, đầu tiên nhẹ nhàng cho đến khi hết khói, sau đó nung đến nóng đỏ thấm trong 10 phút. Lặp lại qui trình xử lý với acid sulfuric và amoni carbonat nếu tro natri sulfat vẫn còn chứa carbon. Làm nguội chén trong bình hút ẩm và cân. Nếu không thêm amoni carbonat và nung trên bếp, có thể nung chén trong lò trong 1 giờ ở nhiệt độ khoảng 600°C.

Tính hàm lượng natri của mẫu chiết với cặn theo công thức sau:

$$\% \text{ natri} = (a \times 32,28) / b$$

trong đó:

a = khối lượng của cặn natri sulfat

b = khối lượng cặn khô thu được sau giai đoạn chiết bằng cặn

Tính độ thay thế theo công thức sau:

$$\text{Mức độ thay thế} = (162 \times \% \text{ natri}) / [2300 - (80 \times \% \text{ natri})]$$

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Tính hàm lượng % natri carboxymethyl cellulose trong mẫu bằng cách lấy 100% trừ đi tổng % của natri clorid và natri glucolat (glucolat tự do), đã được xác định theo hướng dẫn ở trên.

$$\text{Hàm lượng (\%)} = 100 - (\% \text{ NaCl} + \% \text{ Na glycolat})$$

PHỤ LỤC 20

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GELATIN THỰC PHẨM

	Gelatin edible
1. Tên khác, chỉ số	ADI “không giới hạn”
2. Định nghĩa	Gelatin thực phẩm được sản xuất bằng cách bán thủy phân collagen trong da, gân, dây chằng, xương... của động vật. Chế phẩm thương mại có thể được phân loại theo các tiêu chí như: độ bền của gel, giới hạn sắt, calci, lactose và các hóa chất khác; các giới hạn đối với vi sinh vật gây bệnh bao gồm <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium spp.</i> và bào tử nấm mốc. các yêu cầu về giới hạn vi sinh vật dưới đây là tạm thời.
Chỉ số C.A.S.	9000-70-8
3. Cảm quan	Dạng片片, vảy, mảnh hoặc bột mịn, bột thô, màu vàng nhạt hoặc hổ phách, màu tùy theo kích thước tiểu phân, có mùi nhẹ giống mùi nước thịt; bền trong không khí khô nhưng trong khi hút ẩm hoặc trong dung dịch bị vi sinh vật làm hỏng. Chất tạo gel, chất ổn định, chất nhũ hóa, chất kìm hãm cho quá trình kết tinh.
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước lạnh, nhưng trương nở và mềm ra đồng thời hút nước với khối lượng gấp 5-10 lần khi ngâm trong nước; tan trong nước nóng, khi nguội tạo thạch đông; tan trong acid acetic; không tan trong ethanol, cloroform và ether.
Tạo kết tủa	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
Tạo đục	Phải có phản ứng tạo đục đặc trưng.
Giải phóng amoniac	Khi đun nóng mẫu thử với soda vôi, khí amoniac sẽ được giải phóng.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi làm khô	Không được quá 18% (sấy tại 100 - 105° trong 6 giờ).
Các hợp chất không tan trong nước và có mùi	Dung dịch mẫu thử 1/40 nóng không được có mùi khó chịu. Khi quan sát lớp dày 2 cm, hầu như trong, chỉ được phép trắng đục như sữa rất nhẹ.
Lưu huỳnh dioxyd	Không được quá 40,0 mg/kg.
Tro	Không được quá 2,0%.
Arsen	Không được quá 1,0 mg/kg.
Chì	Không được quá 1,5 mg/kg.
Cadimi	Không được quá 0,5 mg/kg.
Thủy ngân	Không được quá 0,15 mg/kg.
5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật	

Tổng số vi sinh vật hiếu khí < 10⁴ /g

Enterobacteriaceae hoặc vi khuẩn nhóm coli-aerogens < 10/g

Streptococci nhóm Lancefield D < 10² / g

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo kết tủa

Pha dung dịch mẫu thử 1/100, thêm hỗn hợp gồm dung dịch trinitrophenol (TS) hoặc dung dịch kali dichromat 1/15 trộn với acid hydrochloric loãng (tỷ lệ trộn 5/1 - tt/tt), trong dung dịch xuất hiện kết tủa vàng.

Pha dung dịch mẫu thử 1/100, thêm dung dịch thủy ngân (II) nitrat, trong dung dịch xuất hiện kết tủa trắng, khi đun nóng kết tủa này sẽ chuyển thành màu đỏ gạch.

Tạo đục

Pha dung dịch mẫu thử 1/5000, thêm dung dịch acid tannic (TS), dung dịch sẽ trở nên đục.

6.2. Độ tinh khiết

Arsen

- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.
- Phương pháp II.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.
- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

Cadimi

- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.
- Phương pháp II.

Thủy ngân

- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.
- Phương pháp II.



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 4-22:2011/BYT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT NHũ HÓA**

National technical regulation on Food Additive – Emulsifier

HÀ NỘI - 2011

Lời nói đầu

QCVN 4-22:2011/BYT do Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT NHũ HÓA

National technical regulation on Food Additive – Emulsifier

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia (sau đây gọi tắt là Quy chuẩn) này quy định các yêu cầu kỹ thuật và quản lý về chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chất nhũ hóa được sử dụng với mục đích làm phụ gia thực phẩm.

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

- 2.1. Tổ chức, cá nhân nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các chất nhũ hóa làm phụ gia thực phẩm (sau đây gọi tắt là tổ chức, cá nhân).
- 2.2. Cơ quan quản lý nhà nước có liên quan.

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:

3.1. Chất nhũ hóa: là phụ gia thực phẩm được bổ sung vào thực phẩm nhằm mục đích tạo ra hoặc duy trì dạng nhũ tương đồng nhất của hai hay nhiều thành phần của thực phẩm.

3.2. JECFA monograph 1 - Vol. 4 (JECFA monographs 1 - Combined compendium of food additive specifications; Joint FAO/WHO expert committee on food additives; Volume 4 - Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications; FAO, 2006): Các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4 Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm, dung dịch thử nghiệm được sử dụng (hoặc tham chiếu) trong yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm; JECFA biên soạn; FAO ban hành năm 2006.

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

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

3.5. ADI (Acceptable daily intake): Lượng ăn vào hàng ngày chấp nhận được.

3.6. MTDI

3.6. INS (International numbering system): Hệ thống mã số quốc tế về phụ gia thực phẩm.

II. YÊU CẦU KỸ THUẬT, PHƯƠNG PHÁP THỬ VÀ LẤY MẪU

1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với các chất nhũ hóa được quy định tại các phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này như sau:

- 1.1. Phụ lục 1: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với mono- và di-glycerid của acid béo

1.2.	Phụ lục 2:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của glycerol với acid lactic và acid béo
1.3.	Phụ lục 3 :	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của glycerol với acid citric và acid béo
1.4.	Phụ lục 4:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của glycerol với acid diacetyl tartric và acid béo
1.5.	Phụ lục 5:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sucroglycerid
1.6.	Phụ lục 6:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của polyglycerol với các acid béo
1.7.	Phụ lục 7:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với stearyl citrat
1.8.	Phụ lục 8:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với trikali ortho-phosphat
1.9.	Phụ lục 9:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với các muối amoni của acid phosphatidic
1.10.	Phụ lục 10:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sucrose acetat isobutyrat
1.11.	Phụ lục 11:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester glycerol của nhựa cây
1.12.	Phụ lục 12:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với dinatri diphosphat
1.13.	Phụ lục 13:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với calci polyphosphat
1.14.	Phụ lục 14:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với các muối của acid myristic, palmitic và stearic (Ca, Na, K, NH ₄)
1.15.	Phụ lục 15:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của sucrose với các acid béo
1.16.	Phụ lục 16:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với dioctyl natri sulphosucinat
1.17.	Phụ lục 17:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với stearyl tartrat
1.18.	Phụ lục 18:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan monostearat
1.19.	Phụ lục 19:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan tristearat
1.20.	Phụ lục 20:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan monolaurat
1.21.	Phụ lục 21:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan monooleat
1.22.	Phụ lục 22:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan monopalmitat

2. Các yêu cầu kỹ thuật quy định trong Quy chuẩn này được thử theo JECFA monograph 1 - Vol. 4, ngoại trừ một số phép thử riêng được mô tả trong các phụ lục. Các phương pháp thử được hướng dẫn trong Quy chuẩn này không bắt buộc phải áp dụng, có thể sử dụng các phương pháp thử khác tương đương.

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư 16/2009/TT-BKHCN ngày 02 tháng 6 năm 2009 của Bộ Khoa học và Công nghệ về hướng dẫn kiểm tra nhà nước về chất lượng hàng hóa lưu thông trên thị trường và các quy định khác của pháp luật có liên quan.

III. YÊU CẦU QUẢN LÝ

1. Công bố hợp quy

1.1. Các chất nhũ hóa phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

1.2. Phương thức, trình tự, thủ tục công bố hợp quy được thực hiện theo Quy định về chứng nhận hợp chuẩn, chứng nhận hợp quy và công bố hợp chuẩn, công bố hợp quy ban hành kèm theo Quyết định số 24/2007/QĐ-BKHHCN ngày 28 tháng 9 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ và các quy định của pháp luật.

2. Kiểm tra đối với chất nhũ hóa

Việc kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chất nhũ hóa phải thực hiện theo các quy định của pháp luật.

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

1. Tổ chức, cá nhân phải công bố hợp quy phù hợp với các quy định kỹ thuật tại Quy chuẩn này, đăng ký bản công bố hợp quy tại Cục An toàn vệ sinh thực phẩm và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn theo đúng nội dung đã công bố.

2. Tổ chức, cá nhân chỉ được nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các chất nhũ hóa sau khi hoàn tất đăng ký bản công bố hợp quy và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn, ghi nhãn phù hợp với các quy định của pháp luật.

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

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

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

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

PHỤ LỤC 1

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI MONO VÀ DIGLYCERID CỦA CÁC ACID BÉO

	Glyceryl monostearate, glyceryl monopalmitate, glyceryl monooleate; monostearin, monopalmitin, monoolein; GMS (đối với glyceryl monostearate);																																
1. Tên khác, chỉ số	INS 471																																
2. Định nghĩa	Hỗn hợp các ester mono- và diglyceryl mạch dài với các acid béo bão hòa và không bão hòa có trong chất béo thực phẩm; có chứa hàm lượng alpha-monoglycerid không thấp hơn 30% và cũng có thể có chứa các monoglycerid đồng phân; cũng như di- và triglycerid, glycerol tự do, các acid béo tự do, sản phẩm xà phòng hóa và nước; thường được sản xuất bằng cách thủy phân tách glyceryl của các chất béo và dầu thực phẩm, nhưng cũng có thể được sản xuất bằng cách este hóa các acid béo với glycerol có hoặc không qua chưng cất phân tử.																																
Công thức cấu tạo	<table><tr><td>alfa-mono-</td><td>beta-mono-</td><td>alfa,beta-di-</td><td>alfa,alfa-di-</td></tr><tr><td>$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$</td><td>$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOOCR} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$</td><td>$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOOCR} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$</td><td>$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OOCR} \end{array}$</td></tr></table> Trong đó –OCR là của acid béo Glyceryl monostearat: 358,6 Khối lượng phân tử Glyceryl distearat: 625,0 Chất béo rắn dạng sáp có màu trắng hoặc kem hoặc dạng lỏng sánh <tr><td>3. Cảm quan</td><td></td></tr> <tr><td></td><td>Chất nhũ hoá</td></tr> <tr><td>4. Chức năng</td><td></td></tr> <tr><td>5. Yêu cầu kỹ thuật</td><td></td></tr> <tr><td>5.1. Định tính</td><td></td></tr> <tr><td>Độ tan</td><td>Không tan trong nước, tan trong ethanol, cloroform và benzen.</td></tr> <tr><td>Hấp thụ hồng ngoại</td><td>Phải có phổ hồng ngoại đặc trưng của ester một phần của acid béo với polyol.</td></tr> <tr><td>Acid béo</td><td>Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.</td></tr> <tr><td>Glycerol</td><td>Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol.</td></tr> <tr><td>5.2. Độ tinh khiết</td><td></td></tr> <tr><td>Nước</td><td>Không được quá 2,0 % (phương pháp Karl Fischer)</td></tr> <tr><td>Chỉ số acid</td><td>Không được quá 6.</td></tr>	alfa-mono-	beta-mono-	alfa,beta-di-	alfa,alfa-di-	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOOCR} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOOCR} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OOCR} \end{array}$	3. Cảm quan			Chất nhũ hoá	4. Chức năng		5. Yêu cầu kỹ thuật		5.1. Định tính		Độ tan	Không tan trong nước, tan trong ethanol, cloroform và benzen.	Hấp thụ hồng ngoại	Phải có phổ hồng ngoại đặc trưng của ester một phần của acid béo với polyol.	Acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.	Glycerol	Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol.	5.2. Độ tinh khiết		Nước	Không được quá 2,0 % (phương pháp Karl Fischer)	Chỉ số acid	Không được quá 6.
alfa-mono-	beta-mono-	alfa,beta-di-	alfa,alfa-di-																														
$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOOCR} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOOCR} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOCR} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OOCR} \end{array}$																														
3. Cảm quan																																	
	Chất nhũ hoá																																
4. Chức năng																																	
5. Yêu cầu kỹ thuật																																	
5.1. Định tính																																	
Độ tan	Không tan trong nước, tan trong ethanol, cloroform và benzen.																																
Hấp thụ hồng ngoại	Phải có phổ hồng ngoại đặc trưng của ester một phần của acid béo với polyol.																																
Acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.																																
Glycerol	Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol.																																
5.2. Độ tinh khiết																																	
Nước	Không được quá 2,0 % (phương pháp Karl Fischer)																																
Chỉ số acid	Không được quá 6.																																

Glycerol tự do

Không được quá 7%

Xà phòng

Không được quá 6%, tính theo natri oleat.

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

Xà phòng

Thêm 10 g mẫu thử vào hỗn hợp gồm 60 ml aceton và 0,15 ml dung dịch xanh bromophenol (0,5%) đã được trung hòa trước bằng acid hydrocloric 0,1N hoặc natri hydroxyd 0,1N. Làm ấm từ từ trên cách thủy cho đến khi dung dịch tan hoàn toàn, chuẩn độ bằng acid hydrocloric 0,1N cho đến khi màu xanh biến mất. Để yên dung dịch trong 20 phút, làm ấm cho đến khi cặn được hòa tan và màu xanh tái xuất hiện, tiếp tục chuẩn độ đến mất màu xanh.

Mỗi ml acid hydrocloric 0,1N tương đương với 0,0304 g $C_{18}H_{33}O_2Na$.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 2

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA GLYCEROL VỚI ACID LACTIC VÀ ACID BÉO

Lactic acid esters of mono- and diglycerides; lactoglycerides

1. Tên khác, chỉ số

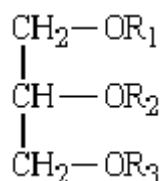
INS 472b

2. Định nghĩa

Là hỗn hợp các ester của glycerol với acid lactic và acid béo trong chất béo thực phẩm.

Sản phẩm thương mại có thể chỉ rõ hàm lượng monoglycerid, acid lactic, chỉ số acid, chỉ số xà phòng hóa, hàm lượng acid béo tự do, điểm đông đặc của các acid béo tự do, chỉ số iod, hàm lượng glycerol tự do và hàm lượng nước.

Công thức cấu tạo



Trong đó R₁, R₂ và R₃ là của acid béo, acid lactic hoặc hydrogen (theo thành phần)

Chất rắn dạng sáp

3. Cảm quan

Chất nhũ hoá

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong nước lạnh nhưng có thể phân tán trong nước nóng.

Acid béo

Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.

Acid lactic

Phải có phản ứng đặc trưng của acid lactic.

Glycerol

Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol.

5.2. Độ tinh khiết

Các acid

Chỉ có acid béo và acid lactic.

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 -

Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 3

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA GLYCEROL VỚI ACID CITRIC VÀ ACID BÉO

	Citric acid esters of mono- and di-glycerides, citroglycerides, CITREM; INS 472c
1. Tên khác, chỉ số	
2. Định nghĩa	Thu được nhờ quá trình ester hoá glycerol với acid citric và acid béo thực phẩm hoặc nhờ phản ứng của hỗn hợp mono và diglycerid của acid béo với acid citric; chế phẩm bao gồm các ester hỗn hợp của acid citric và các acid béo với glycerol; có thể chứa lượng nhỏ các acid béo tự do, glycerol tự do, acid citric tự do và mono – và diglycerid; có thể được trung hoà hoàn toàn hoặc một phần bằng NaOH hoặc KOH (như được công bố trên nhãn mác).
Công thức cấu tạo	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{OR}_1 \\ \\ \text{CH}-\text{OR}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{OR}_3 \end{array}$
	Trong đó: ít nhất một trong R ₁ , R ₂ hoặc R ₃ là của acid citric, một là của acid béo và R còn lại có thể là của acid citric, acid béo hoặc hydrogen.
	Dạng dầu tới sáp, màu trắng đến trắng ngà
3. Cảm quan	
	Chất ổn định, chất nhũ hoá, chất chống oxy hoá
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước lạnh, có thể phân tán trong nước nóng; tan trong dầu và mỡ; không tan trong ethanol lạnh
Acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo .
Acid citric	Phải có phản ứng đặc trưng của acid citric.
Glycerol	Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol.
5.2. Độ tinh khiết	
Tro sulfat	Sản phẩm không được trung hoà : Không được quá 0,5% Sản phẩm được trung hoà hoàn toàn hoặc một phần: Không được quá 10% (Sử dụng 2 g mẫu thử, phương pháp I)
Glycerol tự do	Không được quá 4%
Glycerol tổng số	8 – 33% (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Acid citric tổng số

13 – 50% (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Acid béo tổng số

37 – 81% (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

Glycerol tổng số

Cân chính xác 2 g mẫu và cho vào bình xà phòng hoá, thêm vào 50 ml dung dịch KOH 0,5 M trong ethanol, và đun sôi với sinh hàn ngược trong 30 phút. Thêm chính xác 99 ml (từ buret) chloroform và 25 ml acid acetic băng vào bình định mức dung tích 1 lít. Chuyển toàn lượng dịch trong bình xà phòng hoá vào bình định mức dung tích 1 lít, cho 3 lần 25 ml nước. Thêm vào 500 ml nước và lắc mạnh trong 1 phút. Pha đến thể tích 1 lít bằng nước, lắc đều và để yên cho tách thành các lớp.

Dùng pipet lấy 50 ml dung dịch acid acetic periodic TS vào trong các cốc dung tích 400 ml. Chuẩn bị 2 mẫu trắng bằng cách thêm 50 ml nước vào mỗi cốc. Dùng pipet lấy 50 ml dung dịch mẫu trong nước cho vào một trong các cốc chứa 50 ml acid acetic periodic TS, lắc nhẹ cho đều, đầy bằng tấm kính nhìn qua được và để yên trong 30 phút. Nhưng không được quá 1,5 giờ. Thêm 20 ml dung dịch KI 15%, lắc nhẹ cho đều và để yên ít nhất 1 phút nhưng không được quá 5 phút. Không được để dưới ánh sáng trực tiếp hoặc ánh sáng trắng. Bỏ sung 100 ml nước và chuẩn độ bằng dung dịch natri thiosulfat 0,1 N. Sử dụng dụng máy khuấy để làm đều dung dịch. Tiếp tục chuẩn độ cho đến khi mất màu iod nâu trong dung dịch nước. Thêm 2 ml tinh bột TS và tiếp tục chuẩn độ cho đến khi mất màu iod trong lớp chloroform được tách ra trong quá trình chuẩn độ và mất màu xanh của tinh bột iodo trong dung dịch nước.

Kết quả: Glycerol tổng số (%):

$$= [(B - S) \times N \times 2.302]/W$$

Trong đó:

B: Lượng dung dịch natri thiosulfat dùng để chuẩn độ mẫu trắng chứa 50 ml nước

S: Lượng dung dịch natri thiosulfat dùng để chuẩn độ mẫu thử

N: Nồng độ dung dịch natri thiosulfat 0,1 N

W: Khối lượng mẫu thử được lấy bằng pipet đem chuẩn độ và được tính theo công thức:

$$W = [a \times 50]/900$$

Trong đó: a: Khối lượng mẫu (g) đem xà phòng hóa

Acid citric tổng số

Nguyên tắc:

Mẫu được xà phòng hoá bằng dung dịch KOH trong alcol và các acid béo được tách ra bằng trích ly. Acid citric được chuyển thành các dẫn suất trimethylsilyl (TMS) và được phân tích bằng sắc ký khí lỏng.

Xà phòng hoá:

Cân chính xác 1 g mẫu cho vào bình đáy tròn, thêm 25 ml dung dịch KOH 0,5M trong ethanol và đun sôi với sinh hàn ngược trong 30 phút. Acid hoá hỗn hợp bằng HCl và cho bốc hơi bằng máy cô quay hoặc

bằng phương pháp thích hợp khác.

Trích ly:

Chuyển toàn lượng mẫu trong bình vào một bình gạn, sử dụng không quá 50 ml nước và trích ly bằng 3 lần 50 ml heptan, loại bỏ phần dịch chiết heptan tách ra. Chuyển lớp dung dịch nước vào bình định mức dung tích 100 ml, trung hoà, pha tới thể tích 100 ml bằng nước và lắc đều.

Dẫn xuất hoá:

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch pha được ở trên, 1 ml dung dịch acid tartric (1 mg/ml trong nước) cho vào bình đáy tròn có thể đựng dung tích 10 ml và cô đến khô. Thêm 1 ml pyridin, 0,2 ml dung dịch trimethyl-chlorosilan (TMCS), 0,4 ml hexamethyl-disilazan (HMDS), 0,1 ml n-methyl-n-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (MSTFA). Đậy nắp chặt và lắc cẩn thận để được dung dịch tan hoàn toàn. Gia nhiệt bình trong tủ sấy ở 60°C trong 1 giờ.

Sắc ký khí:

Bất kỳ sắc ký khí thích hợp có thể được dùng với detector ion hoá ngọn lửa và cột (thủy tinh, chiều dài 1,8 m và đường kính trong 2 mm), được nhồi bằng DC-200 10% trên chromosorb Q (80/100 mesh). Các điều kiện cho sắc ký khí: nhiệt độ lò cột 165°C, nhiệt độ buồng tiêm 240°C, nhiệt độ detector 240°C; tốc độ dòng khí mang nitrogen 24 ml/phút.

Cách tiến hành:

Bơm 5 µl mẫu các dẫn xuất TMS. Thời gian lưu đối với acid tartric khoảng 12 phút và thời gian lưu tương đối của acid citric/acid tartric khoảng 2,3.

Lặp lại cách tiến hành được mô tả ở trên trong phần Dẫn xuất hoá và Sắc ký khí sử dụng 1 ml dung dịch đối chứng acid citric (3 mg/ml trong nước) thay thế 1 ml dung dịch mẫu thử.

Tính kết quả:

Đo diện tích mỗi pic bằng phương pháp thích hợp.

Acid citric tổng (%) =

$$[A_{CS} \times \dot{A}_{TR} \times W_{CR} \times 100 \times 100] / [A_{TS} \times A_{CR} \times W]$$

Trong đó:

A_{CS} : Diện tích pic của acid citric (dung dịch mẫu)

A_{TS} : Diện tích pic của acid tartric (dung dịch mẫu)

A_{TR} : Diện tích pic của acid tartric (dung dịch đối chứng)

A_{CR} : Diện tích pic của acid citric (dung dịch đối chứng)

W_{CR} : Khối lượng (g) của acid citric trong 1 ml dung dịch đối chứng

W : Khối lượng (g) của mẫu ester glycerol với acid citric và acid béo.

Acid béo tổng số

Cân chính xác 5 g mẫu cho vào bình đáy tròn dung tích 250 ml, thêm vào 50 ml dung dịch KOH 1 N trong ethanol, và đun sôi với ống sinh hàn ngược trên nồi cách thủy trong 1 giờ.

Chuyển toàn lượng dung dịch trong bình xà phòng hoá vào phễu chiết dung tích 1.000 ml, cho 3 lần 25 ml nước và thêm 5 giọt da cam methyl TS.

Thêm cẩn thận dung dịch HCl đậm đặc cho đến khi màu của dung dịch chuyển sang màu đỏ rõ rệt và lắc đều để tách các acid béo.

Trích ly các acid béo tách được bằng ba lần 100 ml dung môi diethyl ether. Hoà chung các phần tách được và rửa mỗi lần bằng 50 ml dung dịch NaCl 10% cho đến khi dung dịch NaCl được rửa trở nên trung tính.

Làm khô dung dịch ether bằng Na_2SO_4 khan. Sau đó cô bốc hơi trên cách thủy ether, để thêm 10 phút nữa trên cách thủy và cân phần cặn.

PHỤ LỤC 4

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA GLYCEROL VỚI ACID DIACETYL TARTRIC VÀ ACID BÉO

Diacetyltartric acid esters of mono- and diglycerides, DATEM;

1. Tên khác, chỉ số

INS 472e

Tartric, acetic and fatty acid esters of glycerol, mixed; Mixed acetic and tartric acid esters of mono and diglycerides of fatty acids;

INS 472f

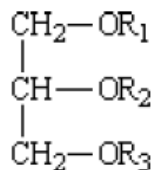
2. Định nghĩa

Sản phẩm gồm hỗn hợp các ester của glycerol với acid mono, diacetyltartric và các acid béo thực phẩm. Nó được tổng hợp bằng phản ứng giữa anhydrid diacetyltartric và mono, diglycerid của acid béo có mặt acid acetic, hoặc bằng cách tương tác giữa anhydrid acetic và mono, diglycerid của acid béo có mặt acid tartric.

Do trao đổi nhóm acyl trong nội phân tử hoặc giữa các phân tử, cả hai phương pháp sản xuất đều tạo ra các thành phần chính như nhau, việc tạo ra các thành phần chính phụ thuộc vào tỷ lệ tương đối của các nguyên liệu cơ bản, vào nhiệt độ và thời gian phản ứng. Sản phẩm này có thể chứa một lượng nhỏ glycerol tự do, các acid béo tự do, acid tartric và acid acetic tự do. Sản phẩm thương mại có thể được quy định các chỉ tiêu kỹ thuật rõ hơn như chỉ số acid, hàm lượng acid tartric tổng số, hàm lượng acid acetic tự do, chỉ số xà phòng hoá, chỉ số iod, hàm lượng acid béo tự do, điểm đông đặc của acid béo tự do.

Các thành phần chính là:

Công thức cấu tạo



Trong đó:

1) Một hoặc hai nhóm R là của acid béo

2) Nhóm R khác là của hoặc

- acid diacetylat tartric
- acid monoacetylat tartric
- acid tartric
- acid acetic
- hydrogen

Từ dạng lỏng, bột nhão đến dạng rắn giống sáp (vảy hoặc bột)

3. Cảm quan

Chất nhũ hoá

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

<i>Độ tan</i>	Phân tán trong nước nóng và nước lạnh, tan trong methanol và ethanol.
<i>1, 2- diol</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của 1,2-diol.
<i>Acid béo</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo
<i>Acid acetic</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của acid acetic
<i>Acid tartric</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của acid tartric
<i>Glycerol</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol

5.2. Độ tinh khiết

<i>Acid</i>	Không phát hiện được các loại acid khác ngoài acid acetic, acid tartric và acid béo.
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 0,5% được xác định ở $800 \pm 25^{\circ}\text{C}$
<i>Acid béo tự do</i>	Không được quá 3% tính theo acid oleic
<i>Acid acetic tổng số</i>	Không được nhỏ hơn 8% và không được quá 32% sau khi thuỷ phân (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Acid tartric tổng số</i>	Không được nhỏ hơn 10% và không được quá 40% sau khi xà phòng hoá (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Glycerol tổng số</i>	Không được nhỏ hơn 11% và không được quá 28% sau khi xà phòng hoá (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Glycerol tự do</i>	Không được quá 2,0%
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

<i>1, 2- diol</i>	Cho vài giọt chì acetat TS vào dung dịch có 500 mg mẫu trong 10 ml methanol. Chất kết tủa vón, màu trắng không tan được hình thành.
-------------------	---

6.2. Độ tinh khiết

Acid acetic tổng số

Dụng cụ:

Lắp ráp bộ dụng cụ chưng cất Hortvet – Sellier cải tiến như hình vẽ sau, sử dụng ống Sellier có kích thước bên trong đủ lớn (khoảng 38-x 203 mm) và bẫy chưng cất dung tích lớn.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 4 g mẫu và cho vào ống bên trong của bộ dụng cụ và lắp ống vào bình ngoài có chứa khoảng 300 ml nước nóng vừa đun sôi. Thêm 10 ml acid perchloric 4 N [35 ml (60 g) acid perchloric 70% trong 100 ml nước] vào mẫu thử, và nối ống bên trong với sinh hàn làm mát bằng nước qua bẫy chưng cất. Chưng cất bằng cách gia nhiệt bình phía ngoài để sao cho thu được 100 ml dung dịch cất trong khoảng 20 - 25 phút. Tập hợp các phần dịch cất được 100 ml và thêm phenolphthalein TS vào mỗi phần, chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,5 N. Tiếp tục chưng cất cho đến khi phần 100 ml dung dịch cất được cần không quá 0,5 ml dung dịch NaOH 0,5N để trung hoà. (Chú ý: không được chưng cất đến cạn khô). Tính khối lượng (mg) acid bay hơi trong mẫu theo công thức $V \times e$, trong đó V là tổng thể tích (ml) của dung dịch NaOH 0,5N đã dùng để chuẩn độ và e là hệ số đương lượng 30,03.

Acid tartric tổng số

Đường chuẩn:

Chuyển 100 mg acid tartric tinh khiết được cân chính xác vào bình định mức dung tích 100 ml, hoà tan acid tartric trong 90 ml nước và thêm nước đến thể tích 100 ml, lắc đều. Lấy các phần 3, 4, 5 và 6 ml cho vào các cuvet riêng biệt phù hợp (kích thước 19 x 150 mm), thêm lượng nước thích hợp để được dung dịch thể tích 10 ml. Cho vào mỗi cuvet 4 ml dung dịch natri metavanadat 5% vừa mới pha, 1 ml acid acetic. (Chú ý: sử dụng các dung dịch này trong vòng 10 phút sau khi màu tăng lên). Chuẩn bị mẫu trắng giống như cách trên, sử dụng 10 ml nước thay thế dung dịch acid tartric. Đặt thiết bị ở vị trí bằng 0 đối với mẫu trắng và sau đó đo độ hấp thụ của 4 dung dịch acid tartric tại bước sóng 520 nm với máy quang phổ thích hợp hoặc máy so màu quang điện được trang bị kính lọc 520 nm. Từ số liệu thu được, xây dựng đường chuẩn trên hệ trục tọa độ vuông góc với trục tung biểu diễn độ hấp thụ, trục hoành biểu diễn lượng acid tartric tương ứng (mg).

Chuẩn bị mẫu thử:

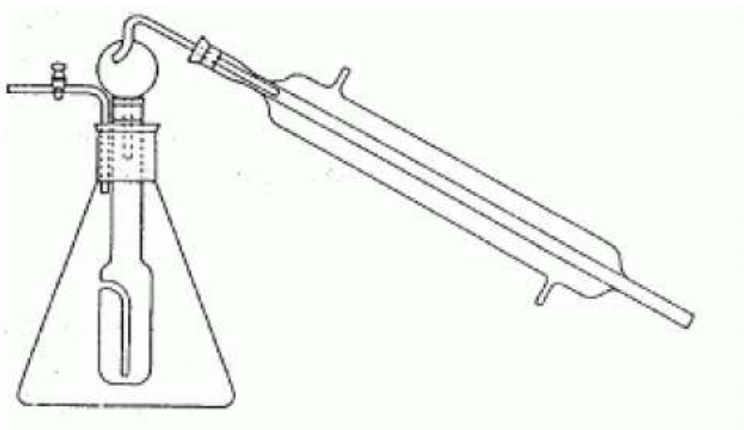
Cân chính xác 4 g mẫu cho vào bình tam giác dung tích 250 ml, thêm vào 80 ml dung dịch KOH 0,5N và 0,5 ml phenolphthalein TS. Nối bình với một sinh hàn không khí có chiều dài ít nhất 65 cm, gia nhiệt hỗn hợp trên tấm nhiệt trong 2,5 giờ. Thêm vào hỗn hợp nóng khoảng 10% acid phosphoric cho đến khi hỗn hợp có phản ứng acid rõ với giấy chỉ thị đỏ Congo. Nối lại bình với sinh hàn không khí và gia nhiệt cho đến khi acid béo được hoá lỏng và trong. Làm nguội và sau đó chuyển hỗn hợp vào một bình gạn dung tích 250 ml với sự hỗ trợ của các phần nhỏ nước và chloroform. Chiết các acid béo được giải phóng ra bằng 3 lần 25 ml nước cất liên tiếp và cho phần nước rửa vào bình gạn có chứa lớp nước. Chuyển toàn bộ hỗn hợp trong bình gạn đầu vào cốc dung tích 250 ml, gia nhiệt trên nồi cách thủy để loại bỏ các vết của chloroform, lọc qua giấy lọc mịn đã được rửa acid vào bình định mức dung tích 500 ml, và cuối cùng pha tới thể tích 500 ml bằng nước cất (Dung dịch I). Dùng pipet lấy 25 ml dung dịch này cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha tới thể tích 100 ml bằng nước (Dung dịch II). Giữ phần còn lại của Dung dịch I để xác định glycerol tổng số.

Cách tiến hành:

Cho 10 ml Dung dịch II đã được chuẩn bị trong phần Chuẩn bị mẫu thử vào cuvet 19 x 150 mm và tiếp tục làm theo hướng dẫn trong phần Đường chuẩn, bắt đầu với “cho vào mỗi cuvet 4 ml dung dịch metavanadat 5%”. Từ đường chuẩn xác định khối lượng (mg) acid tartric trong lần pha loãng cuối cùng, sau đó nhân với 20 và chia kết quả cho khối lượng mẫu gốc để thu được % acid tartric.

Glycerol tổng số

Chuyển 5 ml Dung dịch I đã chuẩn bị trong phần xác định Acid tartric tổng số vào trong bình bình tam giác có nắp thủy tinh dung tích 250 ml hoặc bình iod. Thêm vào bình 15 ml acid acetic băng và 25 ml dung dịch acid periodic, được chuẩn bị bằng cách hoà tan 2,7 g acid periodic (H_5IO_6) trong 50 ml nước, thêm 950 ml acid acetic băng và lắc mạnh; bảo quản dung dịch này tránh ánh sáng. Lắc đều hỗn hợp trong 1 hoặc 2 phút, để yên trong 15 phút, thêm 15 ml dung dịch KI 15% và 15 ml nước, lắc xoáy, để yên trong 1 phút và sau đó chuẩn độ iod được giải phóng ra bằng dung dịch natri thiosulfat 0,1N, dùng tinh bột TS là chất chỉ thị. Thực hiện chuẩn độ mẫu trắng sử dụng nước thay thế mẫu thử. Thể tích thực là số ml dung dịch natri thiosulfat 0,1N dùng để chuẩn độ glycerol và acid tartric trong mẫu thử có 5 ml Dung dịch I. Từ % xác định được trong Phương pháp thử Acid tartric tính thể tích dung dịch natri thiosulfat 0,1N dùng để chuẩn độ acid tartric. Chênh lệch giữa thể tích thực và thể tích tính toán được dùng đối với acid tartric là số ml của dung dịch natri thiosulfat 0,1N đã tiêu thụ bởi glycerol trong mẫu. Một ml dung dịch natri thiosulfat 0,1N tương đương với 2,303 mg glycerol và 7,505 mg acid tartric.



Dụng cụ chưng cất Hortvet-Sellier cải tiến

Chỉ

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.
- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 5

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SUCROGLYCERID

INS 474

1. Tên khác, chỉ số

2. Định nghĩa

Sucroglycerid thu được nhờ phản ứng giữa sucrose với chất béo hoặc dầu ăn có hoặc không có mặt của dung môi. Sản phẩm gồm có hỗn hợp mono- và di-ester của sucrose và acid béo kết hợp với mono-, di- và triglycerid từ chất béo hoặc dầu. Chỉ các dung môi sau đây có thể được sử dụng trong sản xuất: dimethyl formamid, cyclohexan, isobutanol, isopropanol và ethyl acetat.

3. Cảm quan

Không mùi, dạng mềm, dạng đặc, dạng bột có màu trắng đến trắng nhạt, hoặc dạng gel cứng.

Chất nhũ hoá

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong nước lạnh, tan trong ethanol.

Acid béo

Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.

Đường

Phải có phản ứng đặc trưng của đường.

5.2. Độ tinh khiết

Tro sulfat

Không được quá 2%

Thử 2 g mẫu (Phương pháp I)

Chỉ số acid

Không được quá 6

Sucrose tự do

Không được quá 5% (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Dimethylformamid

Không được quá 1 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Cyclohexan và isobutanol

Không được quá 10 mg/kg, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Ethyl acetat và isopropanol

Không được quá 350 mg/kg, dạng đơn chất hoặc hợp chất

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng

Không được nhỏ hơn 40% và không được lớn hơn 60% ester sucrose

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Acid béo

Cho 1 ml ethanol vào 0,1 g mẫu, làm ẩm và hoà tan, thêm 5 ml dung dịch H_2SO_4 loãng TS, gia nhiệt trong nồi cách thủy trong 30 phút và làm nguội. Chất đặc màu trắng vàng hoặc dầu được hình thành, và được hoà tan khi thêm 3 ml diethyl ether.

Đường

Cho vào 2 ml lớp dung dịch nước tách ra từ chất đặc hoặc dầu trong

phép thử acid béo, 1 ml anthron TS vào trong ống thử, cho chảy cẩn thận vào thành ống thử; bề mặt ranh giới giữa hai lớp chuyển thành màu xanh da trời hoặc xanh lá cây.

6.2. Độ tinh khiết

Sucrose tự do

Xác định bằng sắc ký khí lỏng (xem Quyển 4)

Hoá chất, thuốc thử:

- Dung dịch nội chuẩn: Dung dịch cholesterol trong chloroform 5 mg/ml hoặc tetracosan trong chloroform 10 mg/ml
- Pyridin (làm khô được qua rây phân tử)
- N, O- Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA)
- Trimethylchlorosilan (TMCS)

Cách tiến hành: Cân chính xác 20 – 50 mg mẫu cho vào bình silyl hóa, thêm 1 ml dung dịch nội chuẩn, 1 ml pyridin, 0,5 ml N, O-bis (trimethylsilyl) acetamid (BSA) và 0,5 ml trimethylchlorosilan (TMCS). Đậy nắp bình và gia nhiệt ở 70°C trong 30 phút. Bơm 1 µl vào thiết bị sắc ký khí lỏng.

Các điều kiện sắc ký:

Cột:

- Chiều dài 0,3 m
- Đường kính trong 4 mm
- Chất liệu: thuỷ tinh
- Được nhồi bằng dexil

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 40 ml/phút

Detector: FID

Chương trình nhiệt độ: giữ ở 160°C trong 1 phút sau đó tăng đến 160 – 375°C với tốc độ 15°C/phút.

Đo các diện tích pic của sucrose và nội chuẩn. Hệ số đáp ứng (RF) được tính từ quá trình chạy sắc ký khí lỏng với các

dung dịch chuẩn sucrose chứa nội chuẩn.

Kết quả:

$$RF = \frac{\text{mg nội chuẩn} \times \text{diện tích pic sucrose}}{\text{Diện tích pic nội chuẩn} \times \text{mg sucrose}}$$

và

$$\% \text{ sucrose tự do} = \frac{\text{mg nội chuẩn} \times \text{diện tích pic sucrose} \times 100}{RF \times \text{diện tích nội chuẩn} \times \text{mg mẫu}}$$

Dimethylformamid

Xác định bằng sắc ký khí lỏng

Hoá chất, thuốc thử:

- Dimethyl formamid
- Dimethylamin hydrochlorid
- Methanol
- Ethanol
- HCl
- NaOH

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc dimethylaminhydroclorid trong ethanol 4,47 mg/ml (tương đương với 4,0 mg/ml dimethyl formamid) và chuẩn bị một loạt các dung dịch chuẩn tương ứng với 4; 2 và 1 µg/ml dimethylformamid bằng cách pha loãng dung dịch gốc với dung dịch NaOH 0,1% trong ethanol.

Chuẩn bị mẫu:

Bộ dụng cụ thuỷ phân được trình bày trong phần Phụ lục. Cân chính xác 40 g mẫu cho vào bình đáy tròn dung tích 1.000 ml. Thêm 500 ml dung dịch NaOH 5% trong methanol, và gắn bình vào bộ dụng cụ thuỷ phân. Đặt bình cất bình tam giác chứa 10 ml dung dịch HCl 1% trong methanol vào bộ dụng cụ thuỷ phân. Gia nhiệt bình đáy tròn và chưng cất với sinh hàn ngược có nước làm mát trong 1 giờ, sau đó cất lấy 50 ml dịch cất được thì dừng lại. Cô dịch cất được cho đến khô trong cách thuỷ sôi. Hoà tan phần cặn bằng một lượng nhỏ ethanol, thêm 2,5 ml dung dịch NaOH 5% trong ethanol và pha loãng đến thể tích 25 ml bằng ethanol để chuẩn bị một dung dịch mẫu.

Cách tiến hành:

Bơm 2 µl dung dịch mẫu vào thiết bị sắc ký khí lỏng với các điều kiện dưới đây.

Đường chuẩn:

Chuẩn bị đường chuẩn bằng cách bơm 2 µl các dung dịch chuẩn vào thiết bị sắc ký khí.

Các điều kiện sắc ký:

Cột:

- Dài: 2m
- Đường kính trong: 2 mm
- Chất liệu: thuỷ tinh
- Cột nhồi: 10% amin 220 và KOH 10% trên nền chromosorb W yếu 80/100 đã được rửa acid yếu
- Luyện cột: Gia nhiệt tới 130°C qua đêm với tốc độ dòng nitrogen 5 ml/phút

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 17 ml/phút

Detector: FID

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: $198 \pm 5^{\circ}\text{C}$

- Cột: 60°C .

Tính kết quả:

Nồng độ dimethylformamid (C_{DFA}) tính theo công thức sau:

$$C_{\text{DFA}} (\text{mg/kg}) = \frac{C (\mu\text{g/ml}) \times 25 (\text{ml})}{W (\text{g})}$$

Trong đó:

C: Nồng độ dimethylformamid phát hiện được ($\mu\text{g/ml}$)

W: Khối lượng mẫu (g)

Cyclohexan và isobutanol

Xác định bằng sắc ký khí lỏng (xem Quyển 4) sử dụng các điều kiện sau:

Hoá chất, thuốc thử:

- Dimethylformamid (tinh khiết dùng cho GLC)
- Cyclohexan (dùng cho quang phổ UV)
- Isobutanol (dùng cho phân tích)

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc cyclohexan và isobutanol trong dimethylformamid bằng cách dùng pipet lấy 130 μ l cyclohexan và 125 μ l isobutanol cho vào dimethylformamid và làm đầy đến thể tích 10 ml.

Từ dung dịch gốc trên pha một loạt các dung dịch chuẩn pha loãng có 5, 10 và 20 mg/kg cyclohexan và isobutanol. Vẽ đường đáp ứng bằng cách bơm 5 μ l các dung dịch chuẩn đã pha loãng vào thiết bị sắc ký khí với các điều kiện sau.

Chuẩn bị mẫu thử:

Cân 5 g mẫu chính xác đến 10 mg cho vào bình có nắp đậy thuỷ tinh, thêm vào 5 g dimethylformamid và làm ấm để hoà tan. Làm nguội và bơm 5 μ l vào thiết bị sắc ký khí với các điều kiện sau.

Cột:

- Dài: 3m
- Đường kính trong: 4,5 mm
- Chất liệu: thép không gỉ
- Chất nhồi: 20% carbowax 20 M trên Chromosorb G 60/80

Khí mang: heli (áp suất 1,6 bar)

Detector: ion hoá ngọn lửa

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 130°C
- Cột: 130°C
- Detector: 200°C

Xác định nồng độ cyclohexan và isobutanol trong dung dịch mẫu (50%) bằng cách so sánh với các dung dịch chuẩn và nhân nồng độ với 2 để chuyển các kết quả cho phù hợp với sucroglycerid gốc.

Isopropanol và ethyl acetat

Xác định bằng sắc ký khí (xem Quyển 4) có buồng lấy mẫu không gian hơi sử dụng các điều kiện sau:

Hoá chất, thuốc thử:

- Isopropanol
- Ethyl acetat

Dung dịch chuẩn:

Lấy 1 g mỗi loại isopropanol và ethyl acetat vào một bình định mức và thêm nước cho đến khi đạt thể tích 100 ml, và pha loãng dung dịch này để được các dung dịch có nồng độ 0,02 – 0,4 g/100 ml.

Nếu cần, chuẩn bị các dung dịch chuẩn chứa tới 7 g/100 ml isopropanol và ethyl acetat.

Cách tiến hành:

Cân 1 g chính xác đến 0,1 g bột mẫu cho vào lọ mẫu. Thêm 5 µl nước vào lọ mẫu và nắp kín nhanh bằng septum. Để lọ mẫu vào thiết bị sắc ký khí đã đặt trước chương trình và bắt đầu phân tích theo các điều kiện đề cập dưới đây.

Đường chuẩn:

Lấy 1 g bột ester của sucrose với các acid béo, không chứa dung môi hoặc các dung môi tồn dư đã biết, cho vào lọ mẫu, thêm 5 µl dung dịch chuẩn và đậy kín bằng septum. Để lọ mẫu vào thiết bị sắc ký khí đã đặt trước chương trình và bắt đầu phân tích theo các điều kiện đề cập dưới đây và vẽ được đường chuẩn của mỗi dung môi.

Cột:

- Dài: 30 m
- Đường kính trong: 0,53 mm
- Chất liệu: mao quản silica
- Fim mỏng: 100% methyl polysiloxan
- Luyện cột: Gia nhiệt tới 60°C trong 2 – 3 giờ với tốc độ khí nitrogen khoảng 10 ml/phút.

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 5 ml/phút

Detector: ion hoá ngọn lửa

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 110°C
- Cột: 40°C.
- Detector: 110°C

Buồng không gian hơi:

- Lượng mẫu: 1 g ± 0,1 g + 5 µl
- Nhiệt độ gia nhiệt mẫu: 80°C
- Thời gian gia nhiệt mẫu: 40 phút
- Nhiệt độ syringe: 85°C

- Thể tích mẫu dạng hơi: 0,4 ml

Kết quả: được tính theo công thức:

$$C_i = A_i \times C_{f_i} \times 1000$$

Trong đó:

C_i: Nồng độ dung môi i (mg/kg);

A_i: Diện tích pic dung môi i (μv.giây.);

C_{f_i}: Hệ số chuyển đổi dung môi i (độ dốc của đường chuẩn)
(μg/μv.giây).

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.2. Định lượng

Xác định bằng sắc ký lỏng cao áp (xem Quyển 4) sử dụng các điều kiện sau:

Chuẩn bị mẫu:

Cân chính xác 250 mg mẫu cho vào bình định mức 50 ml. Pha tới thể tích 50 ml bằng tetrahydrofuran và lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,5 µm.

Cách tiến hành:

Bơm 100 µl mẫu vào thiết bị sắc ký lỏng cao áp đã ổn định trước.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: Styren-divinylbenzen copolymer đối với sắc ký thẩm thấu qua gel (TSK-GEL G2000 (Supelco) hoặc tương đương)

Pha động: tetrahydrofuran dùng cho HPLC đã đuổi khí

Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút

Detector: RI (chỉ số khúc xạ)

Nhiệt độ:

- Cột: 38°C.

- Detector: 38°C

Ghi sắc ký đồ trong khoảng 90 phút.

Tính % ester sucrose trong mẫu:

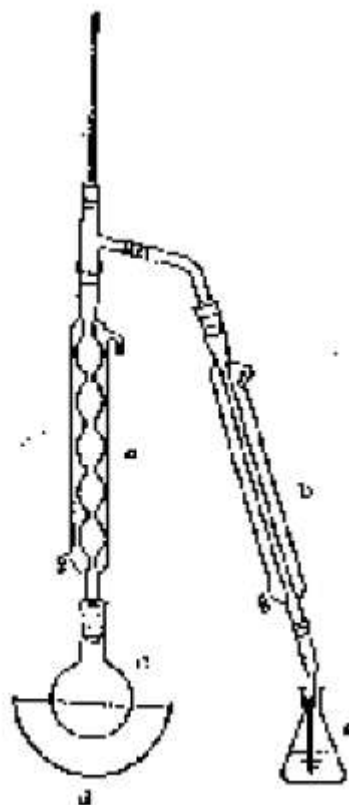
$$\% \text{ ester sucrose} = 100 A/T$$

Trong đó:

A: Tổng các diện tích pic đối với 3 thành phần chính, mono-, di- và tri-ester, rửa giải lần lượt ở khoảng 65, 68 và 73 phút.

T: Tổng diện tích tất cả các pic rửa giải trong khoảng 90 phút

Phụ lục:



Bộ dụng cụ thủy phân:

a: Sinh hàn ngược

b: Sinh hàn

c: Bình đáy tròn

d: Chậu nước

e: Bình tam giác

PHỤ LỤC 6

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA POLYGLYCEROL VỚI CÁC ACID BÉO

	Polyglycerol fatty acid esters, glyceryl fatty acid esters;
1. Tên khác, chỉ số	INS 475
2. Định nghĩa	Là các ester một phần hỗn hợp được tạo thành bằng phản ứng glycerol đã polymer hóa với mỡ và dầu ăn, hoặc với acid béo; có thể chứa một lượng nhỏ mono-, di- và triglyceride, glycerol tự do và polyglycerol, acid béo tự do và muối natri của các acid béo; độ polymer hóa có thể thay đổi và được chỉ ra bằng một con số (thí dụ là tri-, 3), đó là số trung bình nhóm (gốc) glycerol tính cho 1 phân tử polyglycerol. Một polyglycerol nhất định bao gồm một sự phân bố các mảnh phân tử đặc trưng cho độ polymer hóa danh định của nó. Bằng cách thay đổi tỷ lệ cũng như bản chất các chất béo hoặc acid béo phản ứng với polyglycerol, người ta thu được một nhóm lớn và đa dạng các sản phẩm ester này; Các sản phẩm ester thương mại còn được đặc trưng với 1 số chỉ tiêu khác như chỉ số xà phòng hóa, điểm đông đặc của acid béo tự do, chỉ số iod, chỉ số hydroxyl và hàm lượng tro.
Công thức cấu tạo	$R_1O-(CH_2-\overset{\overset{OR_2}{ }}{CH}-CH_2O)_n-R_3$
	Trong đó giá trị trung bình của n khoảng là 3 và mỗi R₁, R₂, R₃ có thể là của acid béo hoặc hydro. Dạng lỏng như dầu tới rất nhớt, có màu vàng sáng đến hổ phách; chất dẻo hoặc nhựa có màu vàng nhạt đến màu nâu; chất rắn hoặc chất sáp có màu vàng nhạt đến màu nâu.
3. Cảm quan	Chất nhũ hoá
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Từ rất ưa nước tới rất ưa dầu, nhưng là một loại chất có xu hướng phân tán trong nước và hòa tan trong dung môi hữu cơ và các loại dầu.
Acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.
Glycerol và polyglycerol	Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol và polyglycerol.
5.2. Độ tinh khiết	
Acid	Không phát hiện được acid nào ngoài acid béo.
Polyglycerol	Phần polyglycerol gồm có không nhỏ hơn 70% di-, tri-, tetraglycerol và phải có không quá 10% polyglycerol bằng hoặc cao hơn heptaglycerol.
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Glycerol và polyglycerol

Chấm 5 – 20 μ l lớp dung dịch nước thu được trong phép thử acid béo. Phép thử định tính các nhóm chức dọc theo các chấm đối chứng glycerol trên giấy Whatman số 3 và triển khai sắc ký đi xuống trong 36 giờ với hệ dung môi isopropanol: nước (90:10). Vết glycerol di chuyển được 40 cm và tiếp sau là các polyglycerol được phát hiện lần lượt phía dưới sau glycerol khi giấy được phun hoặc permanganat trong acetone hoặc bạc nitrat trong amoniac.

6.2. Độ tinh khiết

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 7

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI STEARYL CITRAT

INS 484

1. Tên khác, chỉ số

ADI = 0 - 50 mg/kg thể trọng, được thiết lập tại kỳ họp lần thứ 17 của JECFA (1973).

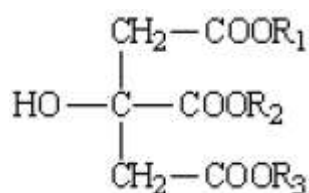
2. Định nghĩa

Được tổng hợp bằng cách ester hóa acid citric với cồn stearyllic thương mại, có thể chứa n-octadecanol và đến 50% n-hexadecanol và đạt được các yêu cầu dưới đây.

Chế phẩm thương mại có thể được phân loại theo chỉ số xà phòng hóa; hàm lượng và thành phần của cồn stearyllic; chỉ số iod; chỉ số acid và hàm lượng acid citric.

Công thức cấu tạo

Thành phần gần đúng



Trong đó R₁, R₂ và R₃ lần lượt có thể là C₁₈H₃₇ (stearyl), C₁₆H₃₃ (palmityl) hoặc H

Hợp chất nhòn, màu kem.

3. Mô tả

Chất tạo phức kim loại, chất nhũ hóa.

4. Chức năng

5. Tính chất

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong nước và trong ethanol lạnh, tan trong ethanol nóng.

Cồn stearyllic

Phải có phản ứng đặc trưng của cồn stearyllic.

Citrat

Phải có phản ứng đặc trưng của citrat.

5.2. Độ tinh khiết

Các acid khác và rượu khác

Không được có các acid khác ngoài acid citric và các rượu khác ngoài các rượu có mặt trong chế phẩm cồn stearyllic thương mại.

Chất không tan trong cloroform

Không được quá 0,5% (mô tả trong phần Phương pháp thử).

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Cồn stearyllic

Thủy phân 2 g mẫu thử bằng cách đun hồi lưu trong 1 giờ với 50 ml dung dịch natri hydroxyd (TS) thu được dung dịch nước. Làm mát và

chiết với ether dầu hỏa. Lấy lớp ether dầu hỏa và cho bay hơi trên đĩa sứ hoặc thủy tinh. Phần không bay hơi phải có khoảng nóng chảy từ 43° đến 58°.

Citrat

Lấy 5 ml dung dịch nước thu được trong phép thử cồn stearyllic, thêm 1 ml dung dịch calci clorid (TS) và 3 giọt dung dịch xanh da trời bromothymol (TS), acid hóa nhẹ bằng dung dịch acid hydrocloric loãng (TS). Thêm dung dịch natri hydroxyd (TS) đến khi dung dịch chuyển thành màu xanh da trời sáng, sau đó đun sôi dung dịch trong 3 phút, lắng nhẹ trong khi đun. Trong dung dịch xuất hiện kết tủa trắng, kết tủa này không tan trong dung dịch natri hydroxyd (TS) nhưng tan trong dung dịch acid acetic (TS).

Lấy 10 ml dung dịch nước thu được trong phép thử cồn stearyllic, thêm 1 ml dung dịch thủy ngân (II) sulfat (TS). Đun sôi hỗn hợp và thêm vài giọt dung dịch kali permanganat (TS). Trong dung dịch xuất hiện kết tủa trắng là muối thủy ngân của acid aceton dicarboxylic.

6.2. Độ tinh khiết

Chất không tan trong cloroform Hòa tan khoảng 50g (cân chính xác đến mg) mẫu trong 400 ml cloroform. Lọc dung dịch qua phễu lọc thủy tinh xốp số 3 đã cân bì (chính xác đến mg). Giữ phễu lọc còn ẩm, rửa phần không tan bằng cloroform, sau đó sấy khô tại 100°.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

PHỤ LỤC 8

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI TRIKALI *ortho*-PHOSPHAT

1. Tên khác, chỉ số	Tripotassium phosphate; Tribasic potassium phosphate; Potassium phosphate. INS 340iii MTDI=70mg/kg thể trọng tính theo Phospho từ các nguồn thực phẩm
2. Định nghĩa	
Tên hóa học	Trikali phosphat; Trikali orthophosphat; Trikali monophosphat
Chỉ số C.A.S.	7778-53-2
Công thức hóa học	Dạng khan: K_3PO_4 Dạng hydrat: $K_3PO_4 \cdot xH_2O$
Khối lượng phân tử	212,27 (dạng khan)
3. Cảm quan	Dạng tinh thể hoặc hạt không màu hoặc màu trắng, không mùi; dạng hydrat gồm monohydrat và trihydrat
4. Chức năng	Đậm, chất nhũ hóa, chất tạo phức kim loại
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Dễ tan trong nước, không tan trong ethanol.
pH	11,5 - 12,5 (dung dịch 1/100).
Kali	Phải có phản ứng đặc trưng của kali.
Phosphat	Phải có phản ứng đặc trưng của phosphat.
<i>ortho</i> -phosphat	Phải có phản ứng đặc trưng của <i>ortho</i> -phosphat.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi nung	Dạng khan: Không được quá 3% (120°C trong 2 giờ, sau đó 800°C trong 30 phút) Dạng hydrat: Không được quá 23% (120°C trong 2 giờ, sau đó 800°C trong 30 phút)
Các chất không tan trong nước	Không được quá 0,2%.
Fluorid	Không được quá 10,0 mg/kg.
Arsen	Không được quá 3,0 mg/kg (thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - phương pháp II).
Chì	Không được quá 4,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng K_3PO_4	Không được thấp hơn 97,0% sau khi nung

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Kali

Thêm 1 thể tích dung dịch natri hydrogen tartrat bão hòa và 1 thể tích dung dịch ethanol vào dung dịch mẫu thử (1/100) và lắc. Trong dung dịch phải xuất hiện kết tủa tinh thể trắng.

Phosphat

Thêm 1ml dung dịch acid nitric và 5ml dung dịch nhôm molybdat (TS) vào 5ml dung dịch mẫu thử (1/100) và đun nóng. Trong dung dịch phải xuất hiện kết quả vàng nhạt.

ortho-phosphat

Hòa tan 0,1g mẫu thử trong 10ml nước cất, acid hóa nhẹ dung dịch bằng acid acetic loãng (TS) và thêm 1ml bạc nitrat (TS). Trong dung dịch phải xuất hiện kết tủa màu vàng

6.2. Độ tinh khiết

Fluorid

Cân 5 g mẫu thử cho vào một bình cầu cất 250 ml, thêm 25 ml nước, 50 ml acid perchloric, 5 giọt dung dịch bạc nitrat (1 trong 2) và vài viên bi thủy tinh. Nối bình cầu với 1 sinh hàn có gắn nhiệt kế và một ống mao quản sục khí, đầu nhiệt kế và ống mao quản phải ngập trong dung dịch chứa trong bình. Gắn một phễu nhỏ giọt chứa nước hoặc bộ sinh hơi nước vào ống mao quản. Đặt bình trên tấm amiăng có lỗ sao cho 1/3 đáy bình tiếp xúc với ngọn lửa. Tiến hành cất đến khi nhiệt độ trong bình đạt 135°. Thêm nước từ phễu vào bình hoặc cho hơi nước qua bình để duy trì nhiệt độ trong bình luôn đạt 135°-140°. Tiếp tục cất đến khi thu được 225-240 ml dịch cất sau đó pha loãng dịch cất thu được với nước đến đủ 250 ml, lắc đều. Lấy 50 ml dung dịch này cho vào một ống Nessler 100 ml. Trong một ống Nessler tương tự khác lấy 50 ml làm mẫu chứng. Thêm vào mỗi ống 0,1 ml dung dịch natri alizarinsulfonat (nồng độ 1/4000) đã lọc và 1 ml dung dịch hydroxylamin (nồng độ 1/4000) mới pha, lắc đều. Thêm từng giọt dung dịch natri hydroxyd 0,05 N vào ống chứa dịch cất, vừa thêm vừa khuấy, đến khi màu ống chứa dịch cất giống với màu ống chứng là màu hồng nhạt. Sau đó thêm vào mỗi ống chính xác 1 ml dung dịch acid hydrochloric 0,1 N và lắc đều. Sử dụng buret chia vạch 0,05 ml thêm từ từ vừa đủ dung dịch thori nitrat (nồng độ 1/4000) vào ống chứa dịch cất để sau khi lắc đều màu của dung dịch chuyển về màu hồng nhạt. Ghi thể tích dung dịch thori nitrat (nồng độ 1/4000) đã sử dụng, thêm chính xác lượng dung dịch thori nitrat (nồng độ 1/4000) như vậy vào ống chứng, lắc đều. Dùng buret thêm dung dịch natri fluorid (TS) (10 µg F / ml) vào ống chứng để cho màu hai ống giống nhau sau khi pha loãng về cùng thể tích. Lắc đều, để yên cho bọt khí thoát hết trước khi so màu. Kiểm tra điểm tương đương bằng cách thêm 1-2 giọt dung dịch natri fluorid (TS) vào ống chứng. Sự thay đổi màu rõ rệt sẽ xảy ra. Ghi lại thể tích dung dịch natri fluorid (TS) đã sử dụng.

Thể tích dung dịch natri fluorid (TS) sử dụng không được quá 1 ml.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Cân mẫu thử (chính xác đến mg), khối lượng tương đương với 8g K₃PO₄ khan, hòa tan vào trong 40 ml nước cất trong cốc 400ml. Thêm 100ml dung dịch acid hydrochloric 1N. Sục không khí đã khử carbon dioxyd vào dung dịch, chỉ sao cho bọt khí nhỏ, thời gian sục 30 phút để đuổi hết carbon dioxyd, đẩy nhẹ cốc để tránh mất dung dịch trong khi sục. Rửa nắp và thành cốc bằng nước cất và cho điện cực của pH kế thích hợp vào dung dịch. Chuẩn độ dung dịch bằng dung dịch natri hydroxyd 1N đến điểm uốn tại pH~4, sau đó tính thể tích (A) dung dịch acid hydrochloric 1N đã sử dụng. Bảo vệ dung dịch để tránh hấp thụ carbon dioxyd từ không khí và tiếp tục chuẩn độ với dung dịch natri hydroxyd 1N đến điểm uốn tại pH~8,8. Tính thể tích (B) dung dịch natri hydroxyd 1N đã tiêu tốn trong chuẩn độ này.

Nếu (A) ≥ 2(B), mỗi ml natri hydroxyd 1N trong thể tích (B) tương đương với 212,3mg K₃PO₄.

Nếu (A) < 2(B), mỗi ml natri hydroxyd 1N trong hiệu thể tích (A)-(B) tương đương với 212,3mg K₃PO₄.

PHỤ LỤC 9

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CÁC MUỐI AMONI CỦA ACID PHOSPHATIDIC

1. Tên khác, chỉ số	Ammonium phosphatides, Emulsifier YN, Mixed ammonium salts of phosphorylated glycerides; INS 442
2. Định nghĩa	ADI = 0 -30 mg/kg thể trọng
3. Công thức cấu tạo (thành phần gần đúng)	Chế phẩm này chủ yếu gồm hỗn hợp các hợp chất amoni của các acid phosphatidic bắt nguồn từ chất béo ăn được (thường là dầu hạt cải hydrogen hóa một phần). Là một mono- hoặc diglycerid có thể được gắn phosphor. Tuy nhiên, hai ester phosphor có thể liên kết với nhau ở dạng phosphatidyl phosphatid. Chế phẩm được sản xuất bằng cách phân hủy chất béo bằng glyceryl, sau đó phosphoryl hóa bằng phosphor pentoxyd, $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{P}-\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} + \text{ac.}$ có quy định thêm những chi tiết cụ thể như iông tan trong hexan, chất vô cơ không tan lượng triglycerid.
4. Chức năng	Trong đó R có thể là một gốc mono- hoặc di-glycerid Chất nửa rắn trơn nhờn.
5. Yêu cầu kỹ thuật	Chất nhũ hóa
5.1. Định tính	

Độ tan Không tan trong nước, tan một phần trong ethanol và aceton; tan trong chất béo.

Phosphat Phải có phản ứng đặc trưng của phosphat.

Acid béo Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.

Glyceryl Phải có phản ứng đặc trưng của glyceryl.

5.2. Độ tinh khiết

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng
Hàm lượng phosphor không được nhỏ hơn 3,0% và không lớn hơn 3,4% theo khối lượng; hàm lượng nitrogen amoni không được nhỏ hơn 1,2% và không lớn hơn 1,5%.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Phosphat Nung 1 g mẫu thử với 2 g natri carbonat khan. Để nguội và hòa tan cẩn trong 5 ml nước và 5 ml acid nitric. Thêm 5 ml amoni molybdat (TS) và đun tới sôi. Xuất hiện kết tủa màu vàng.

Acid béo Đun hồi lưu 1 g chế phẩm thử trong 1 giờ với 25 ml kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol. Amoniac bay ra từ phía đầu của ống sinh hàn hồi lưu, nhận ra bằng mùi của nó và phản ứng trên giấy quỳ đỏ ẩm. Làm lạnh cẩn tới 0°C, tủa xà phòng kali tạo thành.

6.2. Độ tinh khiết

Chì - Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Phosphor Phương pháp quang phổ hấp thụ

Thuốc thử và dung dịch làm việc

Acid sulfuric: tỷ trọng tương đối 1,84

Acid nitric: tỷ trọng tương đối 1,42

Acid perchloric: 60%, tỷ trọng tương đối 1,54

Dung dịch vanadat-molybdat: Hòa tan riêng trong nước 20 g amoni molybdat và 1 g amoni vanadat. Trộn hai dung dịch, thêm 140 ml acid nitric đặc và pha loãng tới 1000 ml bằng nước. Lắc đều.

Dung dịch phosphat chuẩn: Dung dịch gốc: Hòa tan 3,8346 g kali dihydro phosphat, đã làm khô ở 110°C, vào trong nước và pha loãng tới 1000 ml; 1 ml dung dịch này = 2,0 mg P₂O₅.

Dung dịch chuẩn làm việc phosphat: Chuyển 50,0 ml dung dịch phosphat chuẩn (1ml = 2,0 mg P_2O_5) vào bình định mức 500 ml và pha loãng tới vạch bằng nước và lắc đều. 1 ml dung dịch chuẩn làm việc phosphat = 0,2 mg P_2O_5 .

Tiến hành

Cân chính xác 1,5 tới 1,6 g mẫu thử vào một bát thủy tinh nhỏ và cho vào trong bình Kjeldahl 300-ml chứa 5 ml acid sulfuric và 10 ml acid nitric. Đun nóng bình, đầu tiên đun nhẹ và lắc liên tục, sau đó đun mạnh hơn trên ngọn lửa trần. Thêm nhiều lần tại các thời điểm khác nhau mỗi lần một lượng acid nitric, làm nguội bình trước khi thêm, và tiếp tục đun tới khi thu được dịch phân hủy trong và có màu vàng kim. Để nguội, thêm 5 ml acid perchloric 60% và tiếp tục oxy hóa tới khi tạo thành khói acid trắng trong bình. Lại làm nguội và thêm 5 ml nước và tiếp tục đun tới khi hết khói trắng bay lên. Để nguội, pha loãng cẩn thận bằng nước, lại để nguội và chuyển toàn lượng sang bình định mức 500-ml. Pha loãng tới vạch bằng nước và lắc đều (Dung dịch thử).

Làm một mẫu trắng phân hủy đúng theo cách như trên nhưng không cho mẫu thử và sử dụng cùng thể tích acid như đã dùng để vô cơ hóa ướt mẫu thử (Dung dịch trắng phân hủy).

Cho vào các bình định mức 100-ml riêng, thêm từ buret:

- (a) 25,0 ml dung dịch chuẩn làm việc phosphat (= 5,0 mg P_2O_5),
- (b) 30,0 ml dung dịch chuẩn làm việc phosphat (= 6,0 mg P_2O_5),
- (c) 25 ml dung dịch thử chứa từ 5 đến 6 mg P_2O_5

Cho vào mỗi bình chứa phosphor chuẩn, (a) và (b), một lượng dung dịch trắng phân hủy có cùng thể tích như dung dịch cho vào (c), để bù đối với vết phosphor có thể có do thuốc thử phân hủy acid mà nó có thể có trong dung dịch thử.

Cho vào mỗi bình 25 ml thuốc thử vanadat-molybdat, lắc đều, pha loãng bằng nước tới gần 100 ml, lắc đều, điều chỉnh nhiệt độ của dung dịch tới 20°C, pha loãng tới vạch bằng nước và lắc đều.

Sau 10 phút, đo độ hấp thụ của cả dung dịch 6 mg P_2O_5 và dung dịch thử, mẫu trắng là dung dịch chứa 5 mg chất chuẩn. Dùng cốc đo 1 cm và đo ở

bước sóng 420 nm, hoặc kính lọc Ilford 604 nếu dùng máy so màu quang điện.

Tính toán

$$\% \text{ phosphor} = \left[5 + \frac{A_t}{A_{6\text{mg}}} \right] \times \frac{0,873}{m}$$

Trong đó:

A_t = hiệu độ hấp thụ giữa chuẩn 5 mg và dung dịch thử

$A_{6\text{mg}}$ = hiệu độ hấp thụ giữa chuẩn 6 mg và 5 mg

m = khối lượng mẫu thử (g)

Xác định nitrogen amoni

Thiết bị cất kéo hơi nước

Thiết bị gồm một bình 2-L đầy nút cao su, lắp xuyên qua nút có một ống thủy tinh khoảng 7,5 cm, được lắp sao cho đầu dưới của ống gần sát đáy bình, và một đoạn ống hình chữ L ngắn hơn lắp sao cho ống chĩa ngang khoảng 6 mm bên dưới bề mặt của nút, để hoạt động như ống ra của luồng hơi nước. Bình được thêm nước cất đã acid hóa nhẹ bằng acid sulfuric loãng (TS) tới khoảng 2/3 thể tích bình và vài mảnh thủy tinh xóp để tránh trào khi hỗn hợp trong bình sôi mạnh. Bình này dùng làm nguồn cung cấp hơi nước. Có thể lắp một vòi vào bình nếu muốn dễ dàng bổ sung nước vào bình giữa các lần xác định.

Ống ra của hơi được nối qua một bể ngưng tới đầu vào của đầu cất hơi, nối vào một bình cầu đáy tròn cổ ngắn 1-L cổ bình cỡ B34. Đầu cất phải sao cho ống đầu vào của hơi gần chạm đáy bình 1-L và đầu ra phải nối với hai bể tránh bắn, một gần đỉnh của bình 1-L và cái kia gần đỉnh của một sinh hàn thẳng đứng, nối cỡ B19, nối với đầu cất. Sinh hàn thẳng phải lắp với ống đầu ra kéo dài, chạm tới đáy của một bình nón 500-ml.

Thuốc thử

Dung dịch acid boric 2% (kl/tt) trong nước

Dung dịch natri hydroxyd 40% (kl/tt) trong nước

Acid hydrocloric 0,02 N

Hỗn hợp chỉ thị: Trộn 5,0 ml dung dịch xanh lục bromocresol 0,1% (kl/tt) trong alcol và 2,0 ml dung dịch đỏ methyl 0,1% (kl/tt) trong alcol và pha loãng tới 30 ml bằng alcol 95%.

Dịch silicon 200/50 MS

Tiến hành

Lắp và cho hơi nước đi qua thiết bị. Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu thử muối amoni của acid phosphatidic trung tính vào trong một lọ thủy tinh nhỏ (đường kính khoảng 18 mm, sâu khoảng 12 mm). Chuyển lọ và mẫu thử đã cân vào bình cất và thêm khoảng 250 ml nước cất. Nối đầu cất và bẫy chống bắn với bình cất và sinh hàn đứng, lắp sinh hàn sao cho đầu ra ngập dưới bề mặt của 10 ml acid boric 2% và 1 ml hỗn hợp chỉ thị đựng trong bình nón 500-ml.

Thêm vào bình cất qua phễu gắn bằng một ống cao su gắn vào ống dẫn hơi nước vào, 75 ml natri hydroxyd 40%, và rửa vào trong bằng nước cất. Bỏ phễu và nối ống vào của hơi với nguồn cung cấp hơi. (Có thể cho natri hydroxyd vào bình qua phễu có khóa, lắp với bình cất nếu muốn và rửa phía trong bằng nước cất. Nếu làm như vậy phải duy trì một lớp chất lỏng trên phễu trong suốt quá trình thêm và cất). Cất kéo mạnh bằng hơi nước hỗn hợp trong bình cất và thu lấy 200 ml dịch cất vào trong acid boric. Trong quá trình cất khuấy nhẹ bình cất nếu cần, để tránh mẫu thử bị lắng đọng xung quanh bề mặt phía trên của bình. Khi đã thu đủ lượng dịch cất theo yêu cầu, hạ thấp bình hứng, ngừng cung cấp hơi nước và rửa phía trong của sinh hàn và bên ngoài đầu phía dưới với một lượng nhỏ nước cất, gộp dịch rửa vào bình hứng.

Chuẩn độ hỗn hợp trong bình hứng bằng acid hydrocloric 0,02 N. Làm ít nhất một mẫu trắng tiến hành theo cùng cách nhưng không có mẫu thử.

Trong quá trình cất có thể có bọt xuất hiện của hỗn hợp trong bình cất. Nếu có, thêm 2 giọt dịch silicon vào bình cất tại thời điểm cho mẫu thử; và một lượng tương tự được cho vào mẫu trắng.

Tính toán

Mỗi ml HCl 0,02 N = 0,2802 mg nitrogen.

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{V_t - V_o}{m_t} \times 28,02$$

Trong đó

V_t = thể tích dung dịch HCl 0,02 N dùng chuẩn độ mẫu thử (ml)

V_o = thể tích dung dịch HCl 0,02 N dùng chuẩn độ mẫu trắng (ml)

m_t = khối lượng mẫu thử (mg).

PHỤ LỤC 10

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SUCROSE ACETAT ISOBUTYRAT

SAIB

1. Tên khác, chỉ số

INS 444

2. Định nghĩa

Hỗn hợp được tạo thành bằng cách este hóa sucrose thực phẩm với anhydrid acetic và anhydrid isobutyric và chưng cất. Hỗn hợp bao gồm tất cả các este với tỷ lệ phân tử của acetat và isobutyrat là khoảng 2:6

Sucrose diacetat hexaisobutyrat

Tên hóa học

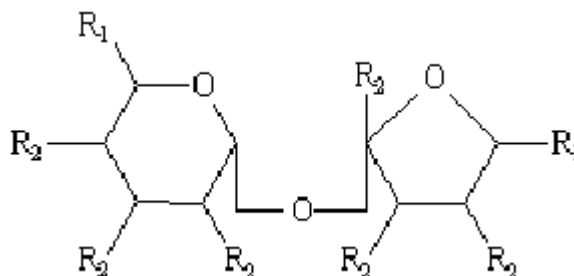
137204-24-1; 27216-37-1; 126-13-6

Chỉ số C.A.S

$C_{40}H_{62}O_{19}$ đối với sucrose diacetat hexaisobutyrat

Công thức hóa học

Công thức cấu tạo



Trong đó

$R_1 = -CH_2OCOCH_3$

$R_2 = -CH_2OCOCH(CH_3)_2$, hoặc $-OCOCH(CH_3)_2$

832 – 856

Khối lượng phân tử

$C_{40}H_{62}O_{19} = 846,9$

Dạng lỏng màu vàng nhạt, không cặn và có mùi nhẹ

3. Cảm quan

Chất nhũ hóa, chất điều chỉnh độ đậm đặc, chất tạo đục đối với đồ uống không cồn

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong nước, tan trong hầu hết dung môi hữu cơ.

Chỉ số khúc xạ

$n(40, D): 1,4492 - 1,4504$

Khối lượng riêng

$d(25, 25): 1,141 - 1,151$

Hấp thụ hồng ngoại

Phổ hồng ngoại của mẫu thử phân tán trong kali bromid tương ứng với phổ hồng ngoại chuẩn trong Phụ lục.

5.2. Độ tinh khiết

<i>Chỉ số acid</i>	Không được quá 0,2 (sử dụng 50 g mẫu thử).
<i>Chỉ số xà phòng hóa</i>	Giữa 524 và 540 (sử dụng 1 g mẫu thử)
<i>Triacetin</i>	Không được quá 0,1%.
<i>Chì</i>	Không được quá 2 mg/kg.
5.3. Hàm lượng $C_{40}H_{62}O_{19}$	Không được nhỏ hơn 98,8% và không được quá 101,9%.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

<i>Triacetin</i>	Sử dụng phương pháp sắc kí khí như sau: Dụng cụ, thiết bị: Máy sắc ký khí được trang bị detector ion hóa ngọn lửa Cột: thép không gỉ, dài 1,5 m, đường kính trong là 3,2 mm. Chuẩn bị mẫu: Pha loãng mẫu thử bằng cách cho thêm một thể tích carbon disulfid tương đương. Điều kiện: Pha tĩnh: SE-30, 3% Pha rắn: Chromosorb AW-DMCS, 80-100 mesh Khí mang: Heli Tốc độ khí: 20 ml/min Nhiệt độ - Cột: Chương trình nhiệt độ: ngay sau khi bơm mẫu, nhiệt độ cột tăng từ 100° (lên đến 300°C, tốc độ tăng 10°C/phút. - Nhiệt độ buồng bơm: 300°C Thể tích bơm mẫu: 1 µl
<i>Chì</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.2. Định lượng

Sử dụng chỉ số xà phòng hóa, tính % $C_{40}H_{62}O_{19}$ theo công thức:

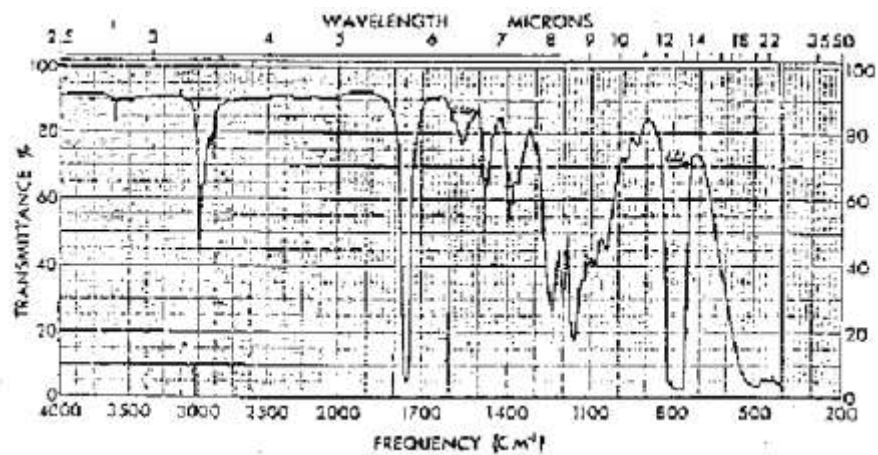
$$\frac{SV \times 0,10586}{56,1} \times 100$$

Trong đó

SV = chỉ số xà phòng hóa

Phổ hồng ngoại

Sucrose acetat isobutyrat



PHỤ LỤC 11

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA GLYCEROL VỚI NHỰA CÂY

	Ester gum;
1. Tên khác, chỉ số	INS 445
2. Định nghĩa	Ester phức hợp của triglycerol và diglycerol với các acid từ nhựa gỗ thông thu được nhờ quá trình trích ly gốc cây thông lâu năm bằng dung môi sau đó được tinh chế trong hệ dung môi lỏng-lỏng. Loại trừ khỏi các yêu cầu kỹ thuật này là các dẫn xuất của gum nhựa, dịch tiết ra từ cây thông sống, nhựa dầu thông cao và sản phẩm phụ của quá trình sản xuất bột giấy. Sản phẩm cuối cùng gồm có 90% acid nhựa và 10% chất trung tính (chất không acid). Phần acid nhựa là một phức hợp của các đồng phân acid monocarboxylic diterpenoid có công thức thực nghiệm điển hình là $C_{20}H_{30}O_2$, trong đó thành phần chính là acid abietic. Glycerol ester của nhựa gỗ thông được tinh chế bằng phương pháp bốc hơi nước hoặc chưng cất ngược dòng.
Mã số C.A.S.	8050-30-4
	Chất rắn màu vàng đến màu hổ phách nhạt
3. Cảm quan	
4. Chức năng	Thành phần base trong kẹo cao su, chất nhũ hoá, chất ổn định, chất độn, chất điều chỉnh hương liệu trong đồ uống
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước, tan trong acetone
Hấp thụ hồng ngoại	Phổ hồng ngoại của lớp mỏng mẫu được đặt trên tấm kali bromid tương ứng với phổ hồng ngoại điển hình dưới đây
Alcol nhựa và glycerol nhựa	Phải có phản ứng đặc trưng của alcol nhựa và glycerol nhựa.
5.2. Độ tinh khiết	
Không có mặt nhựa dầu cao (Lưu huỳnh)	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần phương pháp thử).
Tỷ trọng	d (20, 25) : Không được nhỏ hơn 0,935 khi xác định trong dung dịch 50% trong d-limonen (97%, điểm sôi 175,5 - 176,0°C, d (20, 4) : 0,84)
Điểm nóng chảy	82 – 90°C (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Chỉ số acid	3 – 9
Chỉ số hydroxyl	15 – 45 (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
6. Phương pháp thử	
6.1. Định tính	

Alcol nhựa và glycerol nhựa

Các nhóm ester phức tạp trong ester của glycerol nhựa gỗ thông được khử bằng phản ứng với một hydrid kim loại (natri bis (2-methoxyethoxy) nhôm dihydrid) trong dung dịch toluen để tạo thành một hỗn hợp của alcol nhựa và glycerol nhựa. Chất khử dư sau đó được thuỷ phân bằng dung dịch acid tạo thành hai pha. Sắc ký khí của pha toluen tạo ra một sắc ký đồ của alcol nhựa cấu thành ester nhựa gỗ thông và có thể phân biệt với các ester gum và ester nhựa dầu cao. Nhựa gỗ có thể phân biệt được với nhựa dầu cao dựa vào tỷ lệ của abietyl và dehydroabietyl alcol: trong nhựa gỗ abietyl chiếm ưu thế, trong khi nhựa dầu cao, dehydroabietyl chiếm ưu thế. Nhựa gỗ có thể phân biệt được với gum rosin dựa vào tỷ lệ của isopimaryl và palustryl alcol: trong nhựa gỗ isopimaryl chiếm ưu thế, trong khi gum rosin, palustryl chiếm ưu thế. Sắc ký của pha trung tính trong nước trên cột khác kiểm tra sự xuất hiện của glycerol.

Thiết bị, dụng cụ:

- Sắc ký khí được trang bị detector ion hoá ngọn lửa
- Cột sắc ký I: Column I: DB-1 methyl silicon (ngoại quan và liên kết chéo), cột mao quản dài 15 m, đường kính trong 0,53 mm, dày 1,5 μm , dải nhiệt độ 60 - 300/320°C (Ví dụ: J & W Scientific Inc., Cat. No. 125-1012). Có đường dẫn bơm hơi nhanh, trực tiếp.
- Cột sắc ký II: : DB-Wax polyethyleneglycol (ngoại quan và liên kết chéo), cột mao quản dài 15 m, đường kính trong 0,53 mm, dày 1,0 μm , dải nhiệt độ 20 - 230°C (Ví dụ: J & W Scientific Inc., Cat. No. 125-7012).
- Bộ ghi: 0 – 1V
- Syringe: 1 μl
- Pipet: 3,0 ml; 5,0 ml
- Bình tam giác: 25 ml
- Lọ: 17 ml
- Cân phân tích: cân chính xác đến 0,001 g
- Ống li tâm có vạch định mức: 15 ml
- Máy li tâm: có thể đạt tốc độ 3.200 vòng/phút
- Thanh khuấy: được bao bằng Teflon, kích thước 1 inch
- Máy khuấy từ

Hoá chất, thuốc thử:

- Toluene tinh khiết
- Natri Vitride TM [natri bis (2-methoxyethoxy) nhôm dihydrid, thường xấp xỉ 70% trong toluen (khoảng 3,5 mol/l)] (Tập đoàn hoá chất Fluka ., Hauppauge, NY, Mỹ). Lấy 10 ml cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Pha đến thể tích 100 ml bằng toluen và lắc đều.
- Dung dịch thuỷ phân: Thêm từ từ 50 ml dung dịch H₂SO₄ đậm đặc, tinh khiết vào 200 ml nước cất đồng thời khuấy trong chậu nước đá. Làm nguội tới nhiệt độ phòng.
- Dung dịch phenolphthalein: 1% trong ethanol.
- Dung dịch NaOH: Hoà tan 16 g NaOH trong 70 – 80 ml nước cất và

làm nguội tới nhiệt độ phòng. Pha tới 100 ml bằng nước cất và lắc đều. Để trong bình polyethylen.

- 1, 4- Butandiol: 99%

- Glycerol: 99%

- Dung dịch nội chuẩn: Cân 0,1 g 1, 4- butandiol cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Pha tới thể tích 100 ml bằng nước cất và lắc đều.

- Dung dịch glycerol: Cân 0,1 g 1, 4- butandiol và 0,1 g glycerol cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Pha tới thể tích 100 ml bằng nước cất và lắc đều.

Điều kiện chạy sắc ký khí:

I (alcol nhựa)

Nhiệt độ:

- Cột: 190°C, đẳng nhiệt

- Đầu vào: 250°C

- Detector: 250°C

Tốc độ dòng:

- Khí mang (He): 30 ml/phút tại 63 psi

- H₂: 30 ml/phút

- Không khí: 240 ml/phút

II (glycerol)

Nhiệt độ:

- Cột: đặt theo chương trình, 120 – 200°C với tốc độ 6°C/phút

- Đầu vào: 250°C

- Detector: 250°C

Tốc độ dòng:

- Khí mang (He): 30 ml/phút tại 63 psi

- H₂: 30 ml/phút

- Không khí: 240 ml/phút

Cách tiến hành I (đối với nhựa):

Cân 250 – 300 mg mẫu cho vào bình tam giác dung tích 25 ml có thanh khuấy từ. Dùng pipet lấy 5,0 ml toluen cho vào bình và khuấy từ cho đến khi mẫu được hoà tan. Lấy 5,0 ml Natri Vitride™ cho vào bình, đậy nắp bình và khuấy trong 30 phút. Mở nắp ra đồng thời khuấy, dùng pipet lấy 3,0 ml dung dịch thuỷ phân cho vào bình. Tiếp tục khuấy trong 3 phút. Chuyển hỗn hợp trong bình vào ống li tâm, đậy nắp và lắc đều. Cho thoát khí và li tâm với tốc độ 2.800 – 3.200 vòng/phút trong 5 phút. Bơm 0,5 µl lớp trên vào thiết bị sắc ký khí với các điều kiện kỹ thuật đã đặt và ghi sắc ký đồ. So sánh với các sắc ký đồ được biểu thị phía dưới để xác nhận thứ tự thời gian lưu của các alcol nhựa.

Cách tiến hành II (đối với glycerol)

Dùng pipet hoặc syringe hypodermic, loại bỏ lớp toluen và một phần

dung dịch nước và để lại khoảng 2 ml dung dịch nước trong ống li tâm. Thêm 1 giọt dung dịch phenolphthalein và trung hoà bằng dung dịch NaOH. Các muối nhôm sẽ kết tủa. Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch nội chuẩn cho vào ống, pha đến 15 ml bằng nước cất, đậy nắp, lắc và li tâm với tốc độ 2.800 – 3.200 vòng/phút trong 5 phút. Bơm 1 μ l dịch trong trên bề mặt vào thiết bị sắc ký khí với các điều kiện kỹ thuật đã đặt và ghi sắc ký đồ. Bơm 1 μ l dung dịch glycerol và ghi sắc ký đồ. Đo các thời gian lưu của bất kỳ các pic so với 1,4- butandiol. So sánh các thời gian lưu với thời gian lưu của glycerol.

6.2. Độ tinh khiết

Không có nhựa dầu cao (Lưu huỳnh)

Khi các hợp chất hữu cơ có chứa lưu huỳnh được gia nhiệt với sự có mặt của natri format, lưu huỳnh chuyển hoá thành hydrogen sulfid được phát hiện bằng cách sử dụng giấy chỉ acetat. Phép thử dương tính cho thấy việc sử dụng nhựa dầu cao thay cho nhựa gỗ.

Thiết bị, dụng cụ:

- Ống thử: loại tiêu chuẩn, kích thước 10 x 70 mm, làm bằng thủy tinh chịu nhiệt.

- Đèn Bunsen: Thường dùng cỡ nhỏ dạng ngọn lửa nhỏ

Hoá chất, thuốc thử:

- Dung dịch natri format: Hoà tan 20 g natri format tinh khiết (NaOOCH) trong 100 ml nước cất.

- Giấy thử chì acetat: dạng thương mại có sẵn của hầu hết các nhà cung cấp hoá chất

Cách tiến hành:

Cân 40 – 50 mg mẫu cho vào ống thử và thêm 1 -2 giọt dung dịch natri format 20% (khối lượng/thể tích). Để dài giấy thử chì acetat trên miệng ống thử. Gia nhiệt ống thử bằng ngọn lửa cho đến khi khói được hình thành và tiếp xúc với giấy thử. Tiếp tục gia nhiệt trong 2 – 5 phút. Không được có đốm đen của chì sulfid hình thành, nếu có đốm đen thì chứng tỏ sự có mặt của các hợp chất chứa lưu huỳnh. (Giới hạn phát hiện: 50 mg/kg lưu huỳnh).

Điểm nóng chảy

Điểm nóng chảy được định nghĩa là nhiệt độ tại đó một đĩa mẫu được giữ bên trong một chiếc nhẫn nằm ngang giảm xuống một khoảng 25,4 mm dưới trọng lượng của một cầu thép khi mẫu được gia nhiệt với tốc độ qui định trong chậu cách thủy hoặc cách glycerol.

Thiết bị:

Thiết bị được minh họa trong Hình 1 và Hình 2 gồm có các bộ phận được mô tả trong các phần dưới đây.

Chiếc nhẫn: được làm bằng đồng thau phù hợp với kích thước trình bày trong Hình 1a. Nếu cần, vòng có thể được gắn bằng cách hàn hoặc cách khác thuận tiện với một dây đồng thau loại 13 B&S (đường kính 0,06 – 0,08 inch hoặc 1,52 – 2,03 mm) được trình bày ở Hình 2a.

Quả cầu: thường dùng quả cầu được làm bằng thép có đường kính 3/8 inch (9,53 mm), khối lượng 3,45 – 3,55 g.

Hướng dẫn chỉnh tâm quả cầu: Hướng dẫn chỉnh tâm quả cầu được làm đồng thau và có hình dạng, kích thước chung được minh họa trong Hình 1c, có thể được sử dụng nếu muốn.

Dụng cụ chứa:

Sử dụng bình thủy tinh chịu nhiệt như cốc Griffin dạng lùn dung tích 800 ml, đường kính không được nhỏ hơn 3,34 inch (8,5 cm) và chiều sâu tính từ đáy đến phần loe ra không được nhỏ hơn 5 inch (12,7 cm).

Dụng cụ giữ chiếc nhẫn và nhiệt kế:

Bất kỳ dụng cụ hữu hiệu nào phù hợp với các yêu cầu sau dùng để giữ vòng và nhiệt kế đều có thể được sử dụng: (1) Vòng nhẫn có thể được giữ ở vị trí nằm ngang; (2) khi sử dụng thiết bị mô tả trong Hình 1d, đáy của vòng tròn nằm trên và cách tám nằm ngang phía dưới 1 inch (25,4 mm), bề mặt đáy của tám nằm ngang cách ít nhất 0,5 inch (13 mm) và không được quá 0,75 inch (18 mm) so với đáy của dụng cụ chứa ở bên trên, chiều sâu của dịch lỏng trong dụng cụ chứa không được nhỏ hơn 4,0 inch (10,2 cm); (3) khi sử dụng thiết bị đưa ra ở Hình 1e, đáy của vòng tròn cách 1 inch (25,4 mm) so với đáy của dụng cụ chứa ở phía trên, với điểm dưới cùng của thanh nghỉ đặt trên đáy của dụng cụ chứa và chiều sâu của dịch lỏng trong dụng cụ chứa không được nhỏ hơn 4,0 inch (10,2 cm) như mô tả ở Hình 1 a, b và c; (4) trong cả hai dụng cụ, nhiệt kế được treo lên sao cho khoảng cách từ đáy của bầu nhiệt kế đến đáy của chiếc nhẫn khoảng 0,5 inch (13 mm) nhưng không được chạm vào nhẫn.

Nhiệt kế thủy ngân:

Phụ thuộc vào điểm nóng chảy của mẫu, sử dụng hoặc nhiệt kế ASTM 15C (-2 đến 80°C) đối với loại có điểm nóng chảy thấp hoặc nhiệt kế ASTM 16C (30 - 200°C) đối với loại có điểm nóng chảy cao.

Máy khuấy:

Sử dụng máy khuấy thích hợp với tốc độ 500 – 700 vòng/phút. Để đảm bảo phân tán nhiệt đều trong môi trường nóng, hướng của trục quay nên đẩy dịch lỏng lên phía trên. (Xem Hình 2d).

Chuẩn bị mẫu:

Lấy mẫu đại diện gồm các mảnh vừa mới bị vỡ có bề mặt chưa bị oxy hoá. Nạo lớp trên bề mặt mẫu để thu các mảnh vỡ ngay trước khi sử dụng, tránh bao gồm các bột mịn hoặc bụi. Lượng mẫu lấy thường ít

nhất gấp đôi lượng cần để đủ cho số chiếc nhãn yêu cầu nhưng không được nhỏ hơn 40 g. Ngay sau đó làm nóng chảy mẫu trong dụng cụ chứa sạch, sử dụng tủ sấy, tấm gia nhiệt hoặc cách cát hoặc cách dầu để ngăn quá nhiệt cục bộ. Tránh hình thành bọt khí trong mẫu nóng chảy, không được gia nhiệt trên nhiệt độ cần thiết để đổ mẫu dễ dàng mà không bao gồm bọt khí. Thời gian tính từ lúc bắt đầu gia nhiệt cho đến lúc đổ mẫu không quá 15 phút. Ngay trước khi đổ đầy các chiếc nhãn, gia nhiệt mẫu trước đến nhiệt độ tại đó mẫu được rót. Trong khi rót, các vòng tròn được giữ trên tấm đồng thau. Rót mẫu vào các vòng tròn để thừa cho nguội. Làm nguội ít nhất 30 phút và sau đó cắt bỏ phần mẫu thừa bằng dao đã hơi nóng hoặc dao bay. Sử dụng dụng cụ chứa sạch và một mẫu mới nếu phép thử được lặp lại.

Cách tiến hành:

Mẫu có điểm nóng chảy trên 80°C: Rót glycerol vào bình thủy tinh tới độ sâu không được nhỏ hơn 4 inch (10,2 cm) và không được quá 4,25 inch (10,8 cm). Nhiệt độ ban đầu của chậu là 32°C. Đối với nhựa thông (gồm cả nhựa gỗ), glycerol cần được làm nguội đến nhiệt độ không được nhỏ hơn 45°C dưới điểm nóng chảy dự đoán trước nhưng không được thấp hơn 35°C. Vị trí trục của trục khuấy gần thành sau của dụng cụ chứa, với các lưỡi dao không chạm vào thành và phần dưới của cánh dao cách đỉnh của vòng 0,75 in (18 mm). Trừ khi có hướng dẫn chỉnh tâm cầu được sử dụng, làm lõm nhẹ ở trung tâm của mẫu bằng cách nhấn quả cầu hoặc một que tròn đã được hơi nóng dùng cho mẫu cứng, vào mẫu tại thời điểm này. Treo vòng tròn có chứa các mẫu trong chậu glycerol để bề mặt dưới của vòng tròn đầy cách bề mặt của tấm ngang thấp hơn là 1,0 inch (25,4 mm) (xem Hình 1d), ít nhất 0,5 inch (13 mm) và không quá 0,75 inch (18 mm) ở trên so với đáy của bình thủy tinh, hoặc 1,0 inch (25,4 mm) trên so với đáy của dụng cụ chứa (xem Hình 2e). Đặt quả cầu trong glycerol nhưng không được đặt lên trên mẫu thử. Treo nhiệt kế ASTM 16C trong glycerol sao cho đáy bầu của nhiệt kế cách đáy chiếc nhãn khoảng 0,5 inch (13 mm) nhưng không được chạm vào chiếc nhãn. Duy trì nhiệt độ ban đầu của glycerol trong 15 phút và sau đó dùng kẹp thích hợp để đặt quả cầu vào trung tâm bề mặt trên của mẫu trong chiếc nhãn. Bắt đầu khuấy và tiếp tục khuấy với tốc độ 500 – 700 vòng/phút cho đến khi hoàn tất việc xác định. Gia nhiệt theo tốc độ tăng nhiệt độ của glycerol 5°C/phút, tránh ảnh hưởng của cận bằng cách sử dụng các tấm chắn nếu cần thiết.

[Chú ý: Tốc độ tăng nhiệt sẽ không đổi và sẽ không được tính theo giá trị trung bình trong toàn bộ quá trình thử. Loại bỏ tất cả các phép thử trong đó tốc độ tăng nhiệt vượt quá $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ cho bất kỳ quá trình nào sau 3 phút đầu].

Ghi lại điểm nóng chảy, chính là nhiệt độ trên nhiệt kế tại đó mẫu chạm vào tấm nằm ngang phía dưới (xem Hình 1d) hoặc đáy của dụng cụ chứa (xem Hình 2e). Không hiệu chỉnh thân nhiệt kế.

Mẫu có điểm nóng chảy dưới 80°C: thực hiện theo cách tiến hành trên, ngoại trừ sử dụng nhiệt kế ASTM 15C và sử dụng nước vừa đun sôi được làm mát tới 5°C tạo môi trường nhiệt. Đối với nhựa thông (gồm cả nhựa gỗ), sử dụng nước được làm nguội đến nhiệt độ không được nhỏ hơn 45°C dưới điểm nóng chảy dự đoán trước nhưng không được thấp hơn 5°C.

Chỉ số hydroxyl

Chỉ số hydroxyl được định nghĩa là số mg KOH dùng để trung hoà carbamat sulfonyl có khả năng kết hợp với các nhóm hydroxyl trong 1 g mẫu. Các nhóm hydroxyl trong hợp chất hữu cơ phản ứng nhanh với p – toluensulfonyl isocyanat dư (p - TSI) trong dung môi trơ để tạo thành carbamat sulfonyl. Sau phản ứng của thuốc thử dư với nước tạo thành p – toluensulfonamid, carbamat sulfonyl có tính acid được chuẩn độ bằng trực quan hoặc thiết bị chuẩn độ bằng dung dịch KOH trong methanol, phát triển điểm tương đương bằng đo thế hoặc bằng chỉ thị màu. Các hiệu chỉnh được thực hiện đối với mẫu trắng và sự có mặt của bất kỳ các hợp chất có tính acid.

Thiết bị, dụng cụ:

- Thiết bị chuẩn độ tự động: sử dụng thang đo pH 0 – 14, đặt ở tốc độ 4 (khoảng 2 ml/phút) và một buret 20 ml.
- Điện cực thủy tinh
- Điện cực calomel
- Bình tam giác: dung tích 250 ml có khớp nối thủy tinh hình tròn
- Sinh hàn Allihn: dài 300 mm có khớp nối thủy tinh hình tròn khớp với bình tam giác.

Hoá chất, thuốc thử:

- Acid benzoic, đạt tiêu chuẩn chất chuẩn gốc
- Methanol, tinh khiết, dạng khan
- Toluene, tinh khiết, đã sấy khô qua rây phân tử 3 Å
- KOH 0,1 N pha trong methanol: Hoà tan 7 g KOH trong 1 lít methanol.

Chuẩn hoá bằng cách cân chính xác đến 0,0001 g, khoảng 0,12 g acid benzoic vào cốc dung tích 150 ml. Cho thanh khuấy từ và 80 ml hỗn hợp toluen/methanol theo tỷ lệ 1/1. Khuấy đều dung dịch trong khi chuẩn độ với dung dịch KOH trong methanol. Dung dịch KOH cần phải cho xuống dưới bề mặt của dung dịch, cách xa điện cực. Tính toán nồng độ dung dịch KOH trong methanol dựa theo phương trình tính toán được biểu thị dưới đây.

- Tetrahydrofuran (THF): sấy qua đêm và cho qua rây phân tử 3 Å
- p-Toluenesulfonyl isocyanat (p-TSI)
 - Dung dịch p-Toluenesulfonyl isocyanat: khoảng 0,22 M hoặc 4,5 mEq/20 ml dung dịch. Dùng pipet lấy 15 ml p-Toluenesulfonyl isocyanat (p-TSI) cho vào 500 ml tetrahydrofuran (THF) khô và lắc đều.

Chú ý:

Vì isocyanat có bản chất rất độc nên khi chuẩn bị và sử dụng dung dịch isocyanat phải được tiến hành trong tủ hút. Cần phải đeo găng tay khi cầm vào isocyanat và dung dịch của isocyanat để tránh tiếp xúc với da.

- Dung dịch chỉ thị bromocresol đỏ tía: cho 0,1 g bromocresol đỏ tía vào 18,5 ml dung dịch NaOH 0,1 N và pha tới thể tích 250 ml bằng nước cất.

Cách tiến hành:

Cân 1 - 1,5 g mẫu chính xác đến 0,0001 g cho vào bình tam giác khô dung tích 250 ml được nối với khớp nối thủy tinh hình tròn. Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch THF khô cho vào bình và hoà tan mẫu. Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch p – TSI cho vào bình và lắc đều. Cho vài hạt đá bọt, nối với sinh hàn và để bình trên tấm gia nhiệt. Gia nhiệt đến khi sôi với sinh hàn ngược trong 10 phút. Trong quá trình chưng cất bổ sung thêm nước thích hợp qua sinh hàn:

Mẫu trắng

Mẫu thử

Chuẩn độ với chỉ thị màu

2

2

Chuẩn độ bằng đo thể

1

1

Lấy bình và sinh hàn ra khỏi tấm gia nhiệt và để nguội tới nhiệt độ phòng. Rửa sinh hàn bằng 5 ml THF. Tháo sinh hàn ra khỏi bình và chuyển toàn bộ phần dịch trong bình vào cốc dung tích 150 ml với sự trợ giúp của 50 ml THF. Cho thanh khuấy từ và nhúng các điện cực vào hoặc thêm 20 giọt dung dịch chỉ thị. Vừa khuấy vừa chuẩn độ bằng thiết bị chuẩn độ đo thể hoặc chuẩn độ với chỉ thị màu trực quan với dung dịch KOH trong methanol. Dung dịch KOH cần phải cho xuống dưới bề mặt của dung dịch cách xa điện cực. Xác định thể tích dung dịch KOH đã dùng để chuẩn độ mẫu thử và chuẩn độ mẫu trắng được thực hiện qua tất cả các bước tiến hành trên.

Tính kết quả:

Nồng độ của dung dịch KOH trong methanol (N):

$$N = \frac{W \times 1000}{122.1 \times KOH}$$

Trong đó:

W: Khối lượng acid benzoic

122,1: Đương lượng của acid benzoic

KOH: Số ml dung dịch KOH trong methanol dùng để chuẩn

Chỉ số hydroxyl trong mẫu:

$$= \frac{(A - B) \times N \times 56.1}{g \text{ sample}} - AV$$

Trong đó:

A: Số ml dung dịch KOH dùng để chuẩn độ mẫu thử

B: Số ml dung dịch KOH dùng để chuẩn độ mẫu trắng

N: Nồng độ dung dịch KOH trong alcol

56,1: Số mg KOH/mEq

AV: Chỉ số acid

Asen

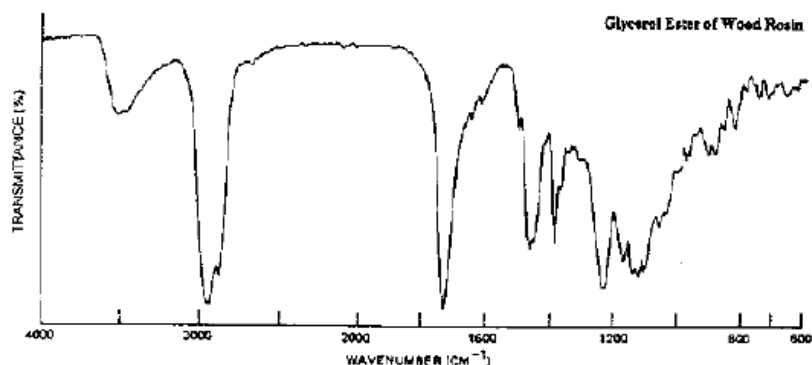
Chuẩn bị dung dịch mẫu như sau: Cân chính xác 1 g mẫu và cho vào bình Kjeldahl, đặt đầu nút ống của bình trong quả bầu bốc hơi được gắn với máy hút nước, thêm 5 ml dung dịch H_2SO_4 và 4 ml dung dịch hydrogen peroxyd 30% và phá mẫu trên ngọn lửa nhỏ. Tiếp tục thêm 2 ml peroxyd trong 2 lần, để phản ứng lắng cặn giữa hai lần thêm cho đến khi tất cả chất hữu cơ bị phá hủy, khói của acid H_2SO_4 bốc ra mạnh và dung dịch trở lên không màu. Duy trì các điều kiện oxy hoá tại tất cả các thời điểm trong quá trình phá mẫu bằng cách bổ sung peroxyd mỗi khi hỗn hợp chuyển màu nâu hoặc tối màu. (Lượng peroxyd cần để phá hoàn toàn mẫu sẽ thay đổi nhưng trong một số trường hợp mức tối đa có thể là 200 ml, điều này phụ thuộc vào trạng thái tự nhiên của mẫu). Làm nguội, chú ý thêm 10 ml nước, lại cho bốc hơi đến khi tạo thành khói mạnh và làm nguội. Chuyển dung dịch tới bình tạo arsin, rửa bình Kjeldahl và quả bầu bằng nước, thêm nước rửa vào bình và pha tới 35 ml bằng nước. Dung dịch này phải đáp ứng được các yêu cầu của Giới hạn thử arsenic.

Chì

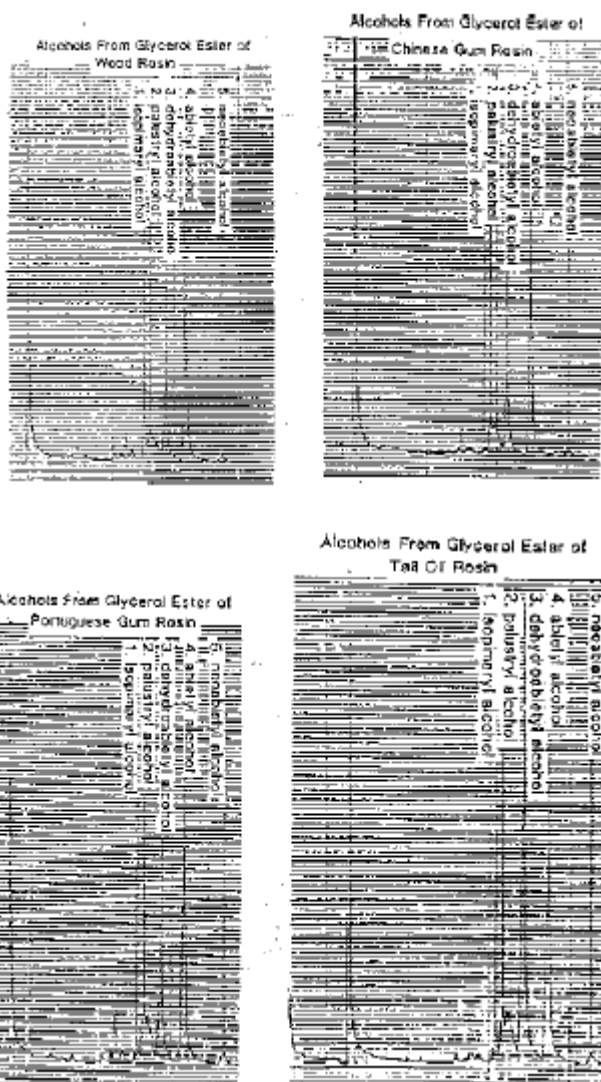
Cân chính xác 5 g mẫu và cho vào đĩa sứ hoặc bát sứ, đun trên tấm gia nhiệt cho đến khi than hoá hoàn toàn, sau đó gia nhiệt trong lò nung ở $480^\circ C$ 8 giờ hoặc qua đêm, để nguội. Thêm cẩn thận 5 ml acid nitric, làm bay hơi đến khô trên tấm gia nhiệt, sau đó nung trong lò nung ở $480^\circ C$ trong 15 phút, và làm nguội. Trích ly tro trong 10 ml nước trong 2 lần, lọc mỗi phần dịch chiết vào một bình gạn. Lọc qua bất kỳ chất không tan trên dụng cụ lọc bằng 6 ml dung dịch amoni citrat TS, 2 ml hydroxylamin hydrochlorid TS và 5 ml nước, thêm nước rửa đã được lọc vào bình gạn. Tiếp tục theo hướng dẫn trong phần Cách tiến hành trong thử Giới hạn, bắt đầu với "Thêm 2 giọt phenol đỏ TS vào bình gạn", sử dụng 10 μg ion chì (Pb) trong mẫu đối chứng.

Phổ hồng ngoại

Glycerol của nhựa gỗ thông

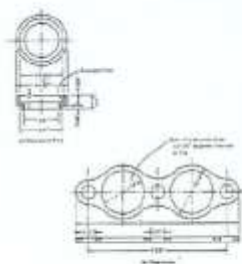


Sắc ký khí của các alcol
nhựa thông



Thiết bị, dụng cụ - Điểm
nóng chảy

(a)Shouldered Ring



(b)Ring Holder

(c)Bell Centering Guide

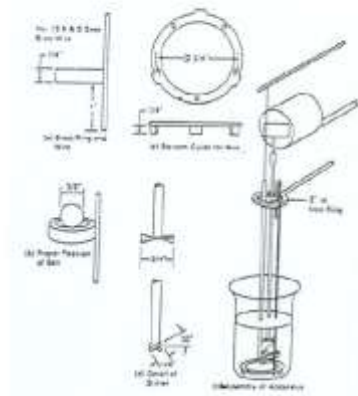


(d)Assembly Apparatus with Two Rings

Hình 1

(a) Brass Ring and Wire

(c) Bottom Guide for Wire



(b) Proper Position of Ball

(e) Assembly of Apparatus

(d) Detail of Stirrer

Hinh 2

PHỤ LỤC 12

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI DINATRI DIPHOSPHAT

1. Tên khác, chỉ số	Disodium pyrophosphate; Disodium dihydrogen diphosphate; acid sodium pyrophosphate. INS 450i MTDI=70mg/kg thể trọng tính cho Phospho từ các nguồn thực phẩm
2. Định nghĩa	
Tên hóa học	Disodium dihydrogen diphosphate; Disodium dihydrogen pyrophosphate
Chỉ số C.A.S.	7758-16-9
Công thức hóa học	Dạng khan: $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$
Khối lượng phân tử	221,94 Dạng tinh thể hoặc hạt màu trắng.
3. Cảm quan	Chất nhũ hóa, độn, chất tạo phức kim loại, chất tạo xốp
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Tan trong nước.
pH	3,7-5,0 (dung dịch 1/100).
Natri	Phải có phản ứng đặc trưng của natri.
Phosphat	Phải có phản ứng đặc trưng của phosphat.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 0,5% (105°C trong 4 giờ)
Các chất không tan trong nước	Không được quá 1%.
Fluorid	Không được quá 10,0 mg/kg
Arsen	Không được quá 3,0 mg/kg
Chì	Không được quá 4,0 mg/kg
5.3. Hàm lượng $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Dạng khan, hemihydrat và monohydrat: không thấp hơn 97,0% tính theo chế phẩm khan. Dạng dodecahydrat: không thấp hơn 92,0% tính theo chế phẩm sau khi nung.
6. Phương pháp thử	

6.1. Độ tinh khiết

Các chất không tan trong nước Hòa tan 10 g mẫu thử trong 100 ml nước nóng. Lọc qua một chén lọc đã cân bì. Rửa cặn không tan trên chén lọc bằng nước nóng. Sấy khô tại (105°C trong 2 giờ). Để nguội và cân.

6.2. Định lượng

Cân 400mg (chính xác đến mg) mẫu thử đã được sấy khô trước tại (105°C trong 4 giờ), hòa tan trong 100 ml nước trong cốc 400 ml. Chính pH dung dịch về 3,8 bằng dung dịch acid hydrocloric loãng (TS) hoặc dung dịch natri hydroxyd (TS), dùng pH kế để xác định pH dung dịch. Sau đó thêm 50 ml dung dịch kẽm sulfat (125 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ hòa tan trong nước, pha loãng đến đủ 1000ml, lọc và chỉnh pH về 3,8), để yên trong khoảng 2 phút. Chuẩn độ acid được giải phóng bằng dung dịch natri hydroxyd 0,1 N đến khi pH dung dịch lại trở về 3,8. Sau mỗi lần thêm natri hydroxyd gần đến điểm tương đương, cần để một thời gian để nếu có kết tủa kẽm hydroxyd thì kết tủa có thể tan hết.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,1 N tương đương với 11,10mg $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

PHỤ LỤC 13

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CALCI POLYPHOSPHAT

	INS 452iv
1. Tên khác, chỉ số	MTDI=70mg/kg thể trọng tính cho phospho từ các nguồn thực phẩm
2. Định nghĩa	Hỗn hợp dị thể của các muối calci của acid polyphosphoric có công thức chung là $H_{n+2}P_nO_{n+1}$.
3. Cảm quan	Tinh thể hoặc bột không mùi, không màu.
4. Chức năng	Chất nhũ hóa, Chất giữ ẩm, chất tạo phức kim loại, chất tạo kết cấu.
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Thường không tan hoàn toàn trong nước, tan trong môi trường acid.
Phosphat	Phải có phản ứng đặc trưng của phosphat.
Calci	Phải có phản ứng đặc trưng của calci (Dịch thử chuẩn bị như trong phần thử phosphat)
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi nung	Không được quá 2%. Sấy tại 105° trong 4 giờ sau đó nung tại 550° trong 30 phút.
Phosphat vòng	Không được quá 8% tính theo hàm lượng P_2O_5 .
Fluorid	Không được quá 10,0 mg/kg.
Arsen	Không được quá 3,0 mg/kg.
Chì	Không được quá 4,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng P_2O_5	Không được thấp hơn 50,0% và không được quá 71,0% P_2O_5 tính theo chế phẩm sau khi nung.
6. Phương pháp thử	
6.1. Định tính	
Phosphat	Cân 0,5g mẫu, trộn với 10ml acid nitric và 50ml nước. Đun sôi trong 30 phút và làm mát. Dung dịch này được sử dụng làm dịch thử.
6.2. Độ tinh khiết	
Arsen	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - phương pháp II,. - Hòa tan 1 g mẫu thử trong 15 ml dung dịch acid hydrocloric loãng (TS),

thêm 20 ml nước, dung dịch này được sử dụng làm dịch thử).

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Cân khoảng 300 mg mẫu thử, chính xác đến mg, hòa tan trong 15 ml acid nitric và 30 ml nước cất. Đun sôi trong khoảng 30 phút, pha loãng với nước đến 100 ml. Đun nóng đến 60°C, thêm lượng dư dung dịch amoni molybdat (TS) và đun ở 50°C trong 30 phút. Lọc và rửa kết tủa bằng acid nitric loãng (dung dịch 1/36), tiếp theo bằng dung dịch kali nitrat (1/100) đến khi dịch rửa không còn acid với quỳ tím. Hòa tan kết tủa trong 50 ml dung dịch natri hydroxyd 1N, thêm dung dịch phenolphthalein (TS) và chuẩn độ lượng natri hydroxyd dư bằng acid sulfuric 1N.

Mỗi ml dung dịch natri hydroxyd 1 N tương đương với 3,086mg P_2O_5 .

PHỤ LỤC 14

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CÁC MUỐI CỦA CÁC ACID BÉO

Salts of fatty acids

1. Tên khác, chỉ số

INS 470

ADI “không giới hạn”

2. Định nghĩa

Các sản phẩm này chứa muối calci, kali và natri của các acid myristic, oleic, palmitic, stearic hoặc hỗn hợp các acid này thu được từ mỡ và dầu ăn. Sản phẩm thương mại còn được phân loại dựa trên:

- Chỉ số xà phòng hóa;
- Điểm đông đặc của các acid béo thu được từ mẫu thử;
- Chỉ số iod;
- Cặn còn lại sau khi nung bao gồm cả hàm lượng các cation;
- Độ ẩm.

3. Cảm quan

Tinh thể rắn hoặc nửa rắn, bóng, màu trắng hoặc vàng nhạt, hoặc bột màu trắng hoặc trắng vàng.

Chất chống đông vón, Chất nhũ hóa.

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Các muối kali và natri tan trong nước và ethanol, các muối calci không tan trong nước, ethanol và ether.

Cation

Phải có phản ứng đặc trưng của cation.

Thành phần acid béo

Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần acid béo

5.2. Độ tinh khiết

Các acid béo tự do

Không được quá 3%

Các chất không xà phòng hóa

Không được quá 2 %.

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng

Không thấp hơn 95 % tổng các muối acid béo, tính theo khối lượng khô.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Cation

Đun nóng 1 g mẫu thử với hỗn hợp gồm 25 ml nước và 5 ml acid hydrochloric. Các acid béo tạo thành lớp nổi trên bề mặt thành một lớp rắn hoặc dầu, tan trong hexan. Sau khi làm nguội, gạn lấy lớp nước và cho

bay hơi đến khô. Hòa tan chất rắn còn lại trong nước và thử các cation thích hợp.

Thành phần acid béo

Sử dụng phương pháp định lượng để định tính riêng các acid béo có trong thành phần của mẫu. Các acid béo chiếm lượng lớn nhất phải phù hợp với các acid được đưa ra trên nhãn sản phẩm.

6.2. Độ tinh khiết

Các acid béo tự do

Xác định các acid béo tự do theo hướng dẫn trong phần Phương pháp xác định Acid béo tự do. Tính hàm lượng acid béo tự do, sử dụng hệ số tương đương (e) tương đương với 1/10 khối lượng phân tử của muối.

Các chất không xà phòng hóa

Các chất không xà phòng hóa là toàn bộ lượng sản phẩm có mặt trong các chất béo sau khi được xà phòng hóa với các hydroxyd kim loại kiềm và chiết bằng một dung môi nhất định, vẫn không bay hơi trong các điều kiện xác định của phép thử.

Các chất này bao gồm các lipid có nguồn gốc tự nhiên như các sterol, các rượu no mạch dài hơn, các phẩm màu và các hydrocarbon cũng như bất kỳ một tạp chất không bay hơi nào ở 103°C có mặt trong sản phẩm.

Cân khoảng 5 g mẫu thử (chính xác đến 0,01g) đã được trộn đều vào bình cầu đáy tròn 250 ml. Thêm 50 ml dung dịch kali hydroxyd ~ 0,5 N và thêm một ít đá bọt. Gắn bình vào sinh hàn hồi lưu, đun sôi nhẹ trong 1 giờ. Ngừng đun. Thêm 100 ml nước cất qua đầu sinh hàn và lắc.

Sau khi làm mát, chuyển dung dịch vào phễu tách. Rửa bình và đá bọt vài lần bằng diethyl ether (dùng khoảng 100 ml) và đổ dịch rửa vào phễu tách. Đóng nút và lắc mạnh trong 1 phút, đều đặn xả áp suất bằng cách lật ngược phễu tách và mở khóa vòi.

Để yên phễu tách cho đến khi 2 pha hoàn toàn tách lớp. Sau đó rút lấy càng triệt để càng tốt dung dịch xà phòng vào phễu tách thứ 2.

Chiết dung dịch xà phòng trong ethanol thêm hai lần nữa, mỗi lần với 100 ml diethyl ether theo cách trên. Gộp 3 dịch chiết ether vào 1 phễu tách có sẵn 40 ml nước.

Nhẹ nhàng quay tròn phễu tách chứa dịch chiết và 40 ml nước. Nếu lắc quá mạnh trong giai đoạn này, nhũ tương có thể hình thành. Để hỗn hợp tách lớp hoàn toàn và rút bỏ lớp nước ở dưới. Rửa lớp ether hai lần nữa với 40 ml nước, lắc đều và loại bỏ lớp nước ở dưới sau khi hỗn hợp đã phân lớp. Với mỗi dung dịch rửa rút ra đến khi chỉ còn khoảng 2 ml, sau đó quay tròn phễu tách quanh trục, đợi vài phút, rút bỏ phần tách ra, đóng khóa vòi khi ether bắt đầu chảy qua lỗ của khóa vòi.

Rửa dung dịch ether nhiều lần bằng 40 ml dung dịch kali hydroxyd, 40 ml nước, rửa thêm một lần bằng 40 ml dung dịch kali hydroxyd, sau đó rửa ít nhất 2 lần nữa bằng 40 ml nước. Liên tục rửa bằng nước cho đến khi dung dịch hết màu hồng khi thử bằng chỉ thị là dung dịch phenolphthalein.

Chuyển toàn lượng từng ít một dung dịch ether qua cuống của phễu tách vào bình cầu khô và đã cân bì khối lượng chính xác đến 0,0001 g.

Làm bay hơi dung môi bằng cách cất trong bể cách thủy. Thêm 5 ml acetone và loại bỏ hoàn toàn dung môi bay hơi bằng cách thổi không khí nhẹ, nghiêng bình cầu khi quay trong bể cách thủy.

Sấy khô phần cặn còn lại ở nhiệt độ 103±2°C trong 15 phút, đặt bình cầu theo phương gần như nằm ngang. Làm nguội trong bình hút ẩm và cân (chính xác đến 0,0001 g). Lặp lại quá trình sấy trong mỗi 15 phút liên tiếp cho đến khi chênh lệch giữa 2 lần cân liên tiếp nhỏ hơn 0,0015g.

Chú ý: Nếu không thu được khối lượng không đổi sau 3 lần sấy khô, các chất không xà phòng hóa có thể đã bị nhiễm bẩn.

Sau khi đã cân, hòa tan phần cặn trong 4 ml diethyl ether, thêm 20 ml ethanol đã được trung hòa (dung dịch có màu hồng khi thêm chỉ thị là dung dịch phenolphthalein(TS). Chuẩn độ bằng dung dịch kali hydroxyd trong ethanol 0,1 N đã chuẩn hóa (pha dung dịch kali hydroxyd trong ethanol có nồng độ gần đúng 1 N bằng cách hòa tan 60 g kali hydroxyd trong 50 ml nước và pha loãng thành 1 L bằng ethanol; pha loãng dung dịch này 1:10 bằng ethanol) đến khi dung dịch có màu phớt hồng.

Hiệu chuẩn khối lượng cặn còn lại bằng cách trừ đi hàm lượng acid tự do. Tính hàm lượng chất không xà phòng hóa, theo % (kl/kl) bằng công thức sau:

$$\frac{100 \times (m_1 - 0.281 \times T \times V)}{m}$$

trong đó:

m = khối lượng (g), của phần mẫu thử,

m₁ = khối lượng (g), của cặn còn lại.

V = thể tích dung dịch kali hydroxyd đã chuẩn hóa nồng độ dùng để chuẩn độ.

T = Nồng độ chính xác của dung dịch kali hydroxyd dùng để chuẩn độ.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

Nguyên tắc:

6.2. Định lượng

Xà phòng hóa các muối và ester hóa các acid béo bằng methanol, có mặt bo trifluorid, methanol kiềm. Tiến hành sắc kí lỏng khí các ester methyl của acid béo.

Phần A - Chuẩn bị các ester methyl của acid béo

Thiết bị

- Bình đáy tròn cổ nhám 50 và 100 ml.
- Sinh hàn hồi lưu, chiều dài hiệu dụng 20 to 30 cm, có khớp nối nhám tương thích với bình cầu.
- Các phễu tách 250 ml.
- Đường ống vào dẫn khí nitrogen.
- Ống nghiệm có nút thủy tinh nhám.
- Pipet chia độ, có thể tích ít nhất là 10 ml, có gắn quả bóp cao su, hoặc pipet tự động.

Thuốc thử

- Heptan, dùng cho sắc kí (*Chú ý 2 và 4*)
- Dầu nhẹ đã được cất lại (nhiệt độ sôi từ 40-60°), chỉ số brom < 1, không có cặn, hoặc hexan (*Chú ý 2*)
- Natri sulfat khan
- Dung dịch Natri hydroxyd trong methanol ~ 0.5 N: Hòa tan 2g natri hydroxyd trong 100 ml methanol chứa không quá 0.5% (kl/kl) nước. Nếu giữ dung dịch tương đối lâu có thể tạo thành một lượng nhỏ kết tủa màu trắng của natri. Điều này không ảnh hưởng đến kết quả điều chế methyl ester.
- Dung dịch bo trifluorid trong methanol, 12 đến 25% (kl/kl) . Chế phẩm thương mại sẵn có là dung dịch 14 và 50% (*chú ý 2*)

Cảnh báo: Bo trifluorid độc. Vì vậy thử nghiệm viên không nên pha dung dịch bo trifluorid trong methanol từ methanol và boron trifluorid. (chú ý 3).

- Dung dịch bão hòa natri clorid trong nước.
- Methyl đỏ, dung dịch 1 g/l trong ethanol 60% (tt/tt)
- Nitrogen, có hàm lượng oxy < 5 mg/kg

Tiến hành

Do bo trifluorid độc, các thí nghiệm sau tốt nhất nên tiến hành trong tủ hút. Các dụng cụ thủy tinh phải được rửa bằng nước ngay sau khi sử dụng.

Sấy khô mẫu ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi, cứ 2 giờ thì kiểm tra khối lượng 1 lần. Cân khoảng 350mg (chính xác đến mg) mẫu đã sấy khô. Có thể lấy lượng mẫu lớn hoặc nhỏ hơn 350 mg, tuy nhiên, thể tích của bình cầu và lượng thuốc thử sử dụng phải phù hợp với số liệu trong

bảng sau:

Khối lượng mẫu	Thể tích bình	NaOH 0.5 N	Dung dịch BF ₃ trong methanol
(mg)	(ml)	(ml)	(ml)
100-250	50	4	5
250-500	50	6	7
500-700	100	8	9
750-1000	100	10	12

Cho lượng acid béo đã định vào bình cầu phù hợp. Thêm với lượng phù hợp dung dịch bo trifluorid trong methanol. Đun sôi trong vòng 2 phút.

Thêm 2 đến 5 ml heptan (*chú ý 4*) (lượng chính xác không ảnh hưởng đến phản ứng) qua đầu trên của sinh hàn vào hỗn hợp đang sôi và tiếp tục đun sôi trong 1 phút.

Ngắt nguồn nhiệt, lấy sinh hàn ra. Thêm lượng nhỏ dung dịch natri clorid bão hòa và lắc nhẹ bình bằng cách quay tròn bình vài lần.

Thêm dung dịch natri clorid bão hòa vào bình cầu sao cho mức chất lỏng ngang cổ bình. Để yên cho hỗn hợp tách lớp và chuyển khoảng 1 ml lớp trên (lớp heptan) vào ống nghiệm cổ nhám và thêm vào một lượng nhỏ natri sulfat khan để loại hết nước. Nếu lượng mẫu lấy là 350 mg, dung dịch này chứa khoảng 7-17% methyl ester và có thể bơm trực tiếp vào cột sắc kí khí-lỏng. Nếu không thì pha loãng dung dịch bằng heptan để đạt được nồng độ methyl ester là 5-10% (*chú ý 5*).

Để thu hồi toàn bộ lượng ester khô, chuyển dung dịch muối và lớp heptan vào phễu tách. Tách riêng các lớp. Chiết phần dung dịch muối 2 lần bằng 50 ml dầu nhẹ. Gộp dịch chiết dầu nhẹ thu được vào phần dung dịch heptan, rửa bằng 20 ml nước đến khi hết acid (thử bằng chỉ thị đồ methyl). Làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cho bay hơi dung môi trong bể cách thủy và thổi khí nitrogen (*chú ý 6 và 7*). Với các mẫu có khối lượng nhỏ hơn 500 mg phải giảm thể tích dung môi và nước sử dụng theo tỷ lệ tương ứng.

Bên cạnh phương pháp trên còn có một số phương pháp khác không sử dụng đến bo trifluorid. Nhìn chung có thể thay các thuốc thử methyl hóa, dung dịch natri hydroxyd 0,5N trong methanol và dung dịch bo trifluorid 12-25 %, trong methanol bằng các chất sau:

- Kali hydroxyd 1 N trong methanol, (phản ứng với chất béo khi có mặt lượng dư methanol có hàm lượng nước nhỏ);
- Dung dịch natri methylat (điều chế bằng cách hòa tan 1 g natri kim loại trong 100 ml methanol có hàm lượng nước nhỏ).

Chú ý

1. Nếu các chất không xà phòng hóa gây cản trở, pha loãng dung dịch xà phòng hóa với nước và loại bỏ các chất không xà phòng hóa bằng cách chiết với diethyl ether hoặc hexan. Acid hóa dung dịch nước xà phòng và tách lấy các acid béo. Điều chế các methyl ester từ các acid béo theo

hướng dẫn.

2. Khi đo sắc kí khí lỏng của các methyl ester, một số thuốc thử, đặc biệt là bo trifluorid trong methanol có thể tạo nên các peak ngẫu nhiên trên sắc đồ (trong vùng các ester có mạch C_{20} - C_{22} nếu dùng bo trifluorid trong methanol). Do vậy cần phải kiểm tra lại mỗi đợt thuốc thử mới bằng cách điều chế các methyl ester của acid oleic tinh khiết, và đo sắc kí. Nếu xuất hiện peak ngẫu nhiên, phải bỏ không dùng thuốc thử. Các thuốc thử khác nhau không được phép cho peak gây nhiễu đến các peak của các methyl ester của các acid béo trong quá trình chạy sắc kí.

Dung dịch bo trifluorid trong methanol phải được bảo quản trong tủ lạnh.

3. Nếu bắt buộc phải điều chế dung dịch bo trifluorid từ bo trifluorid khí, nên dùng phương pháp sau: Cân khối lượng của bình cầu 2 L chứa 1 L methanol. Làm lạnh trong bể đá. Vẫn giữ nguyên bình trong bể đá, sục khí BF_3 từ chai khí (cylinder) qua ống dẫn thủy tinh vào dung dịch methanol cho đến khi hấp thụ được 125 g BF_3 . Tiến hành thí nghiệm trong tủ hút. Phải cho BF_3 chạy qua ống thủy tinh trước khi đặt ống vào và rút ống ra khỏi methanol để tránh trường hợp chất lỏng bị hút vào hệ thống van của chai khí. Không được cho khí chạy nhanh quá để có hơi khí trắng ra khỏi bình. Thuốc thử pha theo cách này bền trong 2 năm.

4. Nếu các acid béo chứa 20 hoặc nhiều hơn 20 nguyên tử carbon không có mặt, nên thay heptan bằng hexan (hỗn hợp của các đồng phân C_7 tinh khiết có thể được kiểm tra bằng sắc kí khí lỏng)

5. Nếu không có đủ lượng mẫu như yêu cầu, có thể lấy 10 mg, thậm chí ít hơn, miễn là lượng thuốc thử và kích cỡ của các dụng cụ thủy tinh được giảm theo tỷ lệ tương ứng.

6. Các dung dịch methyl ester nên được phân tích càng sớm càng tốt. Nếu cần, bảo quản dung dịch heptan chứa các methyl ester trong môi trường khí trơ trong tủ lạnh. Nếu cần phải bảo quản trong thời gian dài, nên bảo vệ các methyl ester khỏi sự oxy hóa bằng cách thêm vào dung dịch các chất chống oxy hóa ở nồng độ không ảnh hưởng đến kết quả phân tích, ví dụ như 0,05 g/L EHT (2,6-di-tertbutyl-4-methyl phenol).

Trong trường hợp cần thiết, có thể bảo quản các methyl ester khô sạch dung môi trong khí trơ trong tủ lạnh trong 24 giờ, hoặc có thể bảo quản lâu hơn nếu giữ đông lạnh sâu trong ống kín trong chân không.

7. Một phần các methyl ester dễ bay hơi nhất có thể bị mất nếu thời gian bay hơi dung môi kéo dài, hoặc nếu dòng khí nitrogen quá mạnh,

Để đo phổ hồng ngoại, phải loại bỏ dung môi càng triệt để càng tốt.

Để đo sắc kí khí lỏng, loại bỏ hoàn toàn dung môi.

Phần B - Sắc kí khí lỏng của các ester methyl acid béo

Thiết bị

Thiết bị thông thường dùng cho sắc kí khí lỏng, dùng cột nhồi và detector ion hóa ngọn lửa (chú ý 1). Bất kỳ một thiết bị nào cho hiệu quả và độ phân giải cao với chất béo cần xác định đều phù hợp.

Sắc kí khí lỏng

Hệ thống bơm mẫu: Hệ thống bơm mẫu phải có không gian chết nhỏ nhất có thể. Nếu được, phải nâng được nhiệt độ cao hơn nhiệt độ cột từ 20 đến 50°C.

Lò: Lò phải cung cấp cho cột nhiệt độ ít nhất là 220° và phải duy trì được nhiệt độ cần thiết trong khoảng $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Nếu dùng chương trình đặt nhiệt độ, nên dùng thiết bị có cột đôi.

Cột nhồi:

- Cột: Cột phải được làm từ loại vật liệu trơ với chất cần phân tích: thủy tinh hoặc nếu không thì dùng thép không rỉ (*chú ý 2*). Chiều dài: 1 đến 3 m, nên dùng cột tương đối ngắn nếu có các acid mạch dài (C_{20+}). Để xác định các acid béo C_4 và C_6 , nên dùng cột 2 m; đường kính trong từ 2 đến 4 mm.

Nhồi cột

- Chất mang: Diatomid rửa acid và đã được silan hóa, hoặc các chất mang trơ phù hợp khác có khoảng biến thiên đường kính hẹp ($25\mu\text{m}$) trong khoảng đường kính cỡ hạt từ 125-200 μm , cỡ hạt trung bình phải tương quan với đường kính trong và chiều dài cột.

- Pha tĩnh: Dạng polyester của một chất lỏng phân cực (ví dụ diethylen glycol polysuccinat, butandiol polysuccinat, ethylen glycol polyadipat ...) hoặc bất kỳ chất lỏng nào khác (ví dụ cyanosilicon ...) thỏa mãn các điều kiện dưới đây. Pha tĩnh phải chiếm 5 đến 20 % khối lượng nhồi. Có thể dùng một pha tĩnh không phân cực, tùy theo từng phép tách cụ thể.

- Luyện cột mới chế tạo: Tách cột ra khỏi detector. Nếu có thể, từ từ nung lò đến 185°C và dẫn dòng khí trơ qua cột với tốc độ 20-60 ml/phút trong ít nhất là 16 giờ tại nhiệt độ này, và thêm 2 giờ nữa tại 195°C .

Detector: Các vận hành dưới đây tương ứng với detector ion hóa ngọn lửa (*chú ý 1*)

Syring: Syring, có dung tích tối đa là 10 μl , chia độ đến 0.1 μl .

Máy ghi:

Nếu sử dụng đường ghi để tính thành phần hỗn hợp phân tích, phải dùng một máy ghi điện tử có độ chính xác cao. Máy ghi phải tương thích với thiết bị đo. Các đặc trưng của máy ghi phải như sau:

- Tốc độ đáp ứng dưới 1,5 giây, tốt nhất là dưới 1 giây (tốc độ đáp ứng là thời gian cần để bút ghi chạy từ 0 đến 90 % theo 100 % tín hiệu)

- Độ rộng của giấy: tối thiểu là 25 cm

- Tốc độ giấy: 25-100 cm/giờ.

Bộ tích phân Integrator hoặc máy tính (tùy chọn)

Có thể tính một cách nhanh và chính xác nếu dùng bộ tích phân điện tử hoặc máy tính. Trong trường hợp này phải tạo được tín hiệu tuyến tính với độ nhạy phù hợp, và phần hiệu chỉnh cho sự lệch đường nền phải thỏa đáng.

Hóa chất

- Khí mang: Khí trơ (nitrogen, heli, argon ...) khô, và chứa ít hơn 10 mg/kg oxy.

- Khí phụ trợ: Hydrogen (tinh khiết tối thiểu 99.9%) không có các tạp chất hữu cơ, không khí hoặc oxygen.

- Các chất chuẩn so sánh: Hỗn hợp của các methyl ester, hoặc các methyl ester của một chất dầu đã biết trước thành phần, tốt nhất là tương tự với chất béo cần phân tích.

Tiến hành

Điều kiện thử

Xác định các điều kiện vận hành tối ưu: Các giá trị cho trong bảng 1 và 2 cho dưới đây về nguyên tắc có thể cho các kết quả mong muốn:

Bảng 1

Đường kính trong của cột	Khí mang cung cấp
2 mm	15-25 ml/phút
3 mm	20-40 ml/ phút
4 mm	40-60 ml/ phút

Bảng 2

Nồng độ của pha tĩnh	Nhiệt độ
5%	175°
10%	180°
15%	180°
20%	185°

Nếu được, injector phải ở nhiệt độ khoảng 200°C và detector phải ở nhiệt độ bằng hoặc cao hơn nhiệt độ cột.

Về nguyên tắc dòng khí hydrogen cung cấp cho detector ion hóa ngọn lửa phải có tốc độ bằng một nửa tốc độ khí mang, và tốc độ khí oxygen phải bằng khoảng 5 đến 10 lần tốc độ khí hydrogen.

Xác định hiệu suất và độ phân giải (tùy chọn)

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn methyl stearat. Lựa chọn cỡ mẫu, nhiệt độ cột tách và tốc độ khí mang sao cho peak của methyl stearat xuất hiện 15 phút sau peak dung môi và cao khoảng 3/4 tín hiệu toàn thang.

- Phân tích:

Dùng mẫu kiểm tra là 0,1 đến 2 µl dung dịch heptan của methyl esters, pha theo hướng dẫn trong phần A. Trong trường hợp không có các ester trong dung dịch, chuẩn bị dung dịch có nồng độ khoảng 10% trong heptan và bơm 0,1 đến 1 µl dung dịch này.

Các điều kiện tiến hành được cho dưới đây. Tuy nhiên, có thể làm việc với nhiệt độ cột thấp hơn nếu xác định các acid có mạch carbon dưới C₁₂ hoặc ở nhiệt độ cao hơn nếu xác định các acid béo trên C₂₀.

Đôi khi có thể sử dụng chương trình đặt nhiệt độ cho cả 2 trường hợp trên. Nếu mẫu có chứa các methyl ester của các acid béo dưới C₁₂, phải bơm mẫu ở nhiệt độ 100°C (hoặc ở nhiệt độ từ 50 - 60°C nếu có acid butyric) và ngay lập tức tăng nhiệt độ với tốc độ tăng nhiệt từ 4 - 8 °C/phút cho đến nhiệt độ tối ưu. Trong một số trường hợp có thể gộp cả 2 qui trình lại: sau khi tăng nhiệt, tiếp tục rửa giải tại nhiệt độ không đổi cho đến khi tất cả các hợp phần được rửa giải ra. Nếu thiết bị không vận hành với chương trình nhiệt độ, làm việc tại 2 nhiệt độ cố định trong khoảng từ 100 đến 195°C.

Biểu thị kết quả

Phân tích định tính

Phân tích hỗn hợp chất chuẩn so sánh có thành phần đã biết trong các

điều kiện sử dụng để đo mẫu thử. Đo khoảng cách lưu (hoặc thời gian lưu) cho các ester béo tương ứng. Dùng giấy bán logarit, vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của logarit khoảng cách lưu (hoặc thời gian lưu) vào số nguyên tử carbon của các acid; trong điều kiện đẳng nhiệt đồ thị của các ester mạch thẳng có cùng độ không bão hòa (no) phải là các đường thẳng, gần như song song với nhau.

Nhận dạng các peak của mẫu thử từ các đồ thị này, nếu cần thì dùng phép nội suy. Phải tránh các điều kiện đo làm xuất hiện các “peak bị che phủ (masked peaks)”, có nghĩa là độ phân giải không đủ lớn để tách được 2 hợp phần.

Phân tích định lượng

Xác định thành phần

Trừ các trường hợp đặc biệt, sử dụng phương pháp chuẩn hóa diện tích, có nghĩa là giả thiết rằng toàn bộ các hợp phần đều được biểu diễn trên sắc đồ, sao cho tổng diện tích các peak biểu diễn 100 % các hợp phần (tổng rửa giải).

Bằng một qui trình chuẩn hóa phù hợp (dùng hỗn hợp chuẩn so sánh hoặc dùng chất chuẩn nội), xác định tổng khối lượng của các acid béo trong mẫu khô. Tính hàm lượng muối của các acid béo với các cation đặc trưng trong mẫu. Tổng hàm lượng Muối Acid Béo không được lớn hơn 95% khối lượng mẫu khô. Ngoài ra, nếu có các chỉ tiêu cho hàm lượng của mỗi acid béo ghi trên nhãn sản phẩm, mẫu phải thỏa mãn được các chỉ tiêu này.

Chú ý

1. Có thể sử dụng máy sắc ký khí - lồng dùng thiết bị đo độ dẫn nhiệt của khí (catharometer) (làm việc trên nguyên tắc đo sự thay đổi độ dẫn nhiệt). Các điều kiện đo khi đó được thay đổi như sau:

Cột

- chiều dài: 2 đến 4 m
- đường kính trong: 4 mm
- chất mang: đường kính hạt trong khoảng 160 đến 200 μm
- pha tĩnh: 15 đến 25%

Khí mang: heli, nếu không thì dùng hydrogen, có hàm lượng oxygen càng nhỏ càng tốt. Không dùng khí phụ trợ

- Tốc độ khí: thường trong khoảng từ 60 đến 80 ml/phút

Nhiệt độ

Injector: cao hơn từ 40° đến 60°C so với nhiệt độ cột

Cột: 180° to 200°C

Phân tích định lượng: phải hiệu chỉnh theo các hệ số thu được khi phân tích hỗn hợp so sánh của các ester có thành phần đã biết trong cùng điều kiện đo với mẫu thử.

2. Nếu trong mẫu có các thành phần chứa nhiều hơn 3 nối đôi, chúng có thể bị phân hủy trên cột thép không rỉ.

PHỤ LỤC 15

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA SUCROSE VỚI CÁC ACID BÉO

	Sucrose fatty acid esters;
1. Tên khác, chỉ số	INS 473
2. Định nghĩa	Mono, di, tri ester của sucrose với các acid béo thực phẩm, được điều chế từ sucrose và methyl, ethyl ester của các acid béo thực phẩm bằng cách ester hoá với sự có mặt của chất xúc tác, hoặc tách từ sucroglycerid. Chỉ các dung môi sau có thể được sử dụng để sản xuất: dimethylformamid, dimethyl sulfoxid, ethyl acetat, isopropanol, propylen glycol, isobutanol và methyl ethyl keton.
3. Cảm quan	Dạng gel cứng, dạng chất đặc mềm hoặc dạng bột có màu trắng đến trắng hơi xám
4. Chức năng	Chất nhũ hoá
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Ít tan trong nước, tan trong ethanol.
Acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.
Đường	Phải có phản ứng đặc trưng của đường.
5.2. Độ tinh khiết	
Tro sulfat	Không được quá 2% Thử 1 g mẫu (Phương pháp I)
Chỉ số acid	Không được quá 6
Sucrose tự do	Không được quá 5% (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Dimethylformamid	Không được quá 1,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Dimethyl sulfoxid	Không được quá 2,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Ethyl acetat, isopropanol và propylen glycol	Không được quá 350,0 mg/kg, dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Isobutanol	Không được quá 10,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Methanol	Không được quá 10,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Methyl ethyl keton	Không được quá 10,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không được nhỏ hơn 80,0% ester sucrose
6. Phương pháp thử	

6.1. Định tính

Acid béo

Cho 1 ml ethanol vào 0,1 g mẫu, làm ấm và hoà tan, thêm 5 ml dung dịch H_2SO_4 loãng TS, gia nhiệt trong cách thủy trong 30 phút và làm nguội. Chất đặc hoặc dầu màu trắng vàng được hình thành, không có mùi của acid isobutyric và được hoà tan khi thêm 3 ml diethyl ether. Sử dụng lớp dung dịch nước tách khỏi từ diethyl ether cho Phép thử đường.

Đường

Cho vào 2 ml lớp dung dịch nước tách khỏi diethyl ether trong phép thử acid béo, 1 ml anthron TS vào trong ống thử, cho cẩn thận theo thành ống nghiệm; bề mặt ranh giới giữa hai lớp chuyển thành màu xanh da trời hoặc xanh lá cây.

6.2. Độ tinh khiết

Sucrose tự do

Xác định bằng sắc ký khí lỏng (Quyển 4)

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc chứa 5 mg/ml sucrose trong N, N-dimethylformamid. Chuẩn bị một loạt các dung dịch chuẩn chứa 0,5; 1,25 và 2,5 mg/ml sucrose bằng cách pha loãng dung dịch gốc với pyridin.

Dung dịch nội chuẩn:

Cân chính xác 0,25 g octacosan cho vào bình định mức dung tích 50 ml, thêm vào 25 ml tetrahydrofuran để hoà tan octacosan, và định mức đến thể tích 50 ml bằng pyridin.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: 2% Dexsil 300GC trên Uniport HP 80/100 mesh (ít phân cực, 2,1 m x 3.2 mm đường kính trong) hoặc tương đương

Khí mang: nitrogen

Detector: FID

Nhiệt độ:

- Bồn bơm mẫu: 280°C

- Cột: giữ ở 160°C trong 1 phút sau đó tăng từ 160 đến 300°C với tốc độ 15°C/phút, giữ trong 60 phút ở 300°C.

- Detector: 320°C

Thời gian lưu lần lượt của sucrose và octacosan đo được với các điều kiện trên xấp xỉ 8,2 và 9,8 phút.

Cách tiến hành: Cân chính xác 20 – 50 mg mẫu cho vào ống li tâm, thêm 1 ml dung dịch nội chuẩn, 1 ml pyridin, 0,4 ml N, O-bis(trimethylsilyl) acetamid (BSA) và 0,2 ml trimethylchlorosilan (TMCS). Sau khi đậy nắp ống, lắc và để yên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Bơm 1 µl vào thiết bị sắc ký khí lỏng.

Đường chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch chuẩn silylat theo cách tiến hành như nhau sử dụng 1 ml mỗi loại dung dịch chuẩn thay thế mẫu và pyridin. Vẽ đường chuẩn trên đồ thị lượng sucrose (mg) trong 1 ml dung dịch chuẩn (biểu thị trên trục X) so với tỷ lệ diện tích pic của sucrose/nội chuẩn (biểu thị trên trục Y).

Đo diện tích pic đối với sucrose và nội chuẩn. Tính tỷ lệ diện tích các pic của chúng, và tính được hàm lượng sucrose trong mẫu dựa vào đường chuẩn.

Lượng sucrose phát hiện được (mg)

% sucrose = ----- x 100

Khối lượng mẫu (mg)

Dimethylformamid

Xác định bằng sắc ký khí lỏng

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc chứa 1 mg/ml dimethylformamid trong tetrahydrofuran. Chuẩn bị một loạt các dung dịch chuẩn chứa 0,05; 0,1 và 0,2 µg/ml dimethylformamid bằng cách pha loãng dung dịch gốc với tetrahydrofuran.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: polyethylen glycol (dài 30 m x 0,32 mm đường kính trong với độ dày lớp phim mỏng 0,5 µm)

Khí mang: heli

Áp suất: 150 kPa (áp suất không đổi)

Detector: detector nitrogen phosphor (NPD) [(tên khác: Detector nhiệt ion ngọn lửa (FTD))]

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 180°C

- Cột: giữ ở 40°C trong 2 phút sau đó tăng từ 40 đến 160°C với tốc độ 20°C/phút, giữ trong 2 phút ở 160°C.

- Detector: 325°C

Phương pháp tiêm mẫu: Tiêm không chia dòng 1,0 µl mẫu bằng bơm tự động, sau đó bắt đầu làm sạch sau 1 phút.

Thời gian lưu của dimethylformamid đo được với các điều kiện trên xấp xỉ 6,4 phút.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 2 g mẫu cho vào bình định mức dung tích 20 ml, thêm vào 10 ml tetrahydrofuran để hoà tan mẫu, thêm tetrahydrofuran vào bình đến thể tích 20 ml và lắc đều dung dịch. Bơm 1,0 µl dung dịch mẫu vào thiết bị sắc ký.

Đường chuẩn:

Chuẩn bị hàng ngày bằng cách bơm 1,0 µl mỗi dung dịch chuẩn vào thiết bị sắc ký.

Tính nồng độ dimethylformamid (C_{DFA}) theo công thức sau:

$$C_{DFA} \text{ (mg/kg)} = [C \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times 20 \text{ (ml)}] / W \text{ (g)}$$

Trong đó:

C: Nồng độ dimethylformamid phát hiện được (µg/ml)

W: Khối lượng mẫu (g)

Lưu ý: Detector nitrogen phosphor không nhạy với các thành phần không chứa N hoặc P. Vì thế, cột mao quản có thể tắc với các hợp chất bay hơi thấp, mặc dù đường nền của sắc ký ổn định. Do đó, cột phải được luyện thường xuyên. Luyện qua đêm (dòng khí mang theo hướng ngược ở 180°C) được thực hiện sau khoảng mỗi đợt 15 mẫu.

Dimethyl sulfoxid

Xác định bằng sắc ký khí lỏng

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc 0,25 mg/ml dimethyl sulfoxid trong tetrahydrofuran. Chuẩn bị một loạt các dung dịch chuẩn chứa 0,5; 1 và 5 µg/ml dimethyl sulfoxid bằng cách pha loãng dung dịch gốc với tetrahydrofuran.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: 10% PEG 20M và 3% KOH trên Gas Chrom Z (chiều dài 2 m x 3 mm đường kính trong). Tăng nhiệt độ lò tới 180°C với tốc độ 10°C/phút và để ổn định 24 – 48 giờ với điều kiện tốc độ dòng khí nitrogen 30 – 40 ml/phút để luyện cột.

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 50 ml/phút

Detector: detector trắc quang ngọn lửa (sử dụng bộ lọc lưu huỳnh 394 nm)

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 210°C

- Cột: 160°C.

Thời gian lưu của dimethyl sulfoxid đo được với các điều kiện trên xấp xỉ 3,4 phút.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 5 g mẫu cho vào bình định mức dung tích 25 ml, thêm vào 10 ml tetrahydrofuran để hoà tan mẫu, thêm tetrahydrofuran vào bình đến thể tích 20 ml và lắc đều dung dịch. Bơm 3 µl dung dịch mẫu vào thiết bị sắc ký.

Đường chuẩn:

Chuẩn bị hàng ngày bằng cách bơm 3 µl mỗi dung dịch chuẩn vào thiết bị sắc ký.

Tính nồng độ dimethyl sulfoxid (C_{DMSO}) theo công thức sau:

$$C_{DMSO} \text{ (mg/kg)} = [C \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times 25 \text{ (ml)}] / W \text{ (g)}$$

Trong đó:

C: Nồng độ dimethyl sulfoxid phát hiện được (µg/ml)

W: Khối lượng mẫu (g)

Propylen glycol

Xác định bằng sắc ký khí lỏng

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch 500 µg/ml của ethylen glycol trong pyridin

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch 50 µg/ml của propylen glycol trong pyridin

Các điều kiện sắc ký:

Cột: Polydimethylsiloxan (chiều dài 30 m x 0,32 mm đường kính trong với độ dày lớp phim mỏng 0,25 µm)

Khí mang: heli

Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút (dòng không đổi)

Detector: FID

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 230°C

- Cột: giữ ở 60°C trong 5 phút sau đó tăng từ 60 đến 250°C với tốc độ 20°C/phút, giữ trong 5 phút ở 250°C.

- Detector: 250°C

Thời gian lưu lần lượt của dẫn xuất ethylen glycol và dẫn xuất propylen glycol xấp xỉ 7,7 phút và 7,9 phút.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 1 g mẫu cho vào bình định mức dung tích 10 ml, thêm vào 100 µl dung dịch nội chuẩn. Hoà tan và định mức đến thể tích 10 ml bằng pyridin. Lấy 0,5 ml dung dịch mẫu cho vào ống li tâm, và thêm 0,25 ml 1,1,1,3,3,3 – hexamethyldisilazan (HMDS) và 0,1 ml trimethylchlorosilan

(TMCS). Sau khi đậy chặt nắp ống, lắc mạnh, để yên trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó li tâm. Bơm 1 µl dung dịch nổi trên mặt ống sau li tâm vào thiết bị sắc ký.

Đường chuẩn:

Tiến hành sắc ký như trên, trong đó dùng 0,05; 0,2; 0,5 và 1ml dung dịch chuẩn thay thế cho dung dịch mẫu thử.

Tính nồng độ propylen glycol (C_{PG}) theo công thức sau:

$$C_{PG} \text{ (mg/kg)} = [C \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times 10 \text{ (ml)}] / W \text{ (g)}$$

Trong đó:

C: Nồng độ propylen glycol phát hiện được (µg/ml)

W: Khối lượng mẫu (g)

Lưu ý: Nhất thiết phải làm sạch cổng bơm mẫu và luyện cột ở 300°C sau mỗi đợt 20 mẫu phân tích, bởi cột bị nhiễm bẩn.

Methanol, isopropanol,
isobutanol, ethyl acetat và
methyl ethyl keton

Xác định bằng sắc ký khí có buồng lấy mẫu không gian hơi.

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch chuẩn A chứa 4.000 mg/l mỗi loại methanol, isopropanol, isobutanol, ethyl acetat và methyl ethyl keton bằng cách cân chính xác 0,2 g mỗi dung môi và cho vào bình định mức dung tích 50 ml chứa khoảng 20 ml nước, sau đó thêm nước vào đến thể tích 50 ml. Chuẩn bị các dung dịch chứa 2.000 mg/l (dung dịch chuẩn B) và 1.000 mg/l (dung dịch chuẩn C) bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn A.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 4 g mẫu cho vào 4 lọ (mỗi lọ 1 g mẫu). Cho 5 μ l nước vào lọ thứ nhất, cho lần lượt vào lọ thứ hai, thứ ba, thứ bốn dung dịch chuẩn A, B và C; đập nhanh septum. (Nồng độ của mỗi dung môi sau khi thêm 5 μ l dung dịch chuẩn A, B, C vào 1 g mẫu tương đương lần lượt bằng 20, 10 và 5 mg/kg mẫu). Để lọ mẫu trong buồng lấy mẫu không gian hơi và phân tích với các điều kiện sau:

Cột: 100% Polydimethylsiloxan (chiều dài 30 m x 0,53 mm đường kính trong với độ dày màng phim mỏng 1,5 μ m), ví dụ: DB – 1 được sản xuất bởi Công ty TNHH J & W)

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 3,5 ml/phút

Detector: FID

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 110°C

- Cột: 40°C.

- Detector: 110°C

Buồng lấy mẫu không gian hơi:

- Nhiệt độ cách nhiệt mẫu: 80°C

- Thời kỳ cách nhiệt mẫu: 40 phút

- Nhiệt độ syringe: 85°C

- Bơm mẫu dạng khí: 1,0 ml

Kết quả:

Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa lượng thêm vào với diện tích pic đối với mỗi dung môi sử dụng các kết quả phân tích. Mối tương quan phải tuyến tính ($R^2 > 0,99$). Ngoại suy và xác định x phần bị chặn, w_i , và tính nồng độ dung môi C_i (mg/kg) trong mẫu:

$$C_i = w_i / W$$

Trong đó:

w_i : Phần bị chặn của đường thẳng tương quan sử dụng phương pháp thêm chuẩn (μ g)

W: Khối lượng mẫu (g)

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Xác định bằng HPLC sử dụng các điều kiện sau:

Cách tiến hành:

Cân chính xác 250 mg mẫu và cho vào bình định mức dung tích 50 ml. Pha tới thể tích 50 ml bằng tetrahydrofuran và lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,5 µm. Bơm 100 µl mẫu vào thiết bị sắc ký đã ổn định trước.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: Styren-divinylbenzen copolymer đối với sắc ký thẩm thấu qua gel (TSK-GEL G2000 (Tosoh) hoặc tương đương)

Pha động: tetrahydrofuran dùng cho HPLC đã bài khí

Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút

Detector: RI

Nhiệt độ:

- Cột: 38°C.

- Detector: 38°C

Ghi sắc ký đồ trong khoảng 90 phút.

Tính % ester sucrose trong mẫu:

$$\% \text{ ester sucrose} = 100 A/T$$

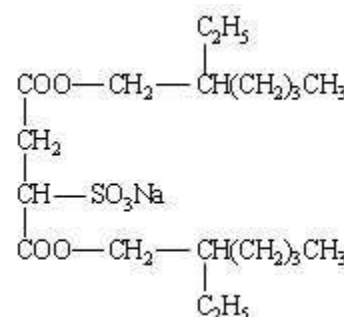
Trong đó:

A: Tổng các diện tích pic đối với 3 thành phần chính, mono-, di- và tri-ester, rửa giải lần lượt ở khoảng 65, 68 và 73 phút.

T: Tổng diện tích tất cả các pic rửa giải trong khoảng 90 phút

PHỤ LỤC 16

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI DIOTYL NATRI SULFOSUCINAT

	DSS, natri docusat, INS 480 ADI = 0 - 0,1 mg/kg thể trọng
1. Tên khác, chỉ số	
2. Định nghĩa	Natri 1,4-bis-(2-ethylhexyl)-sulfosuccinat; Muối natri của acid ester sulfo-1,4-bis-(2-ethylhexyl) butanedioic; dioctyl natri sulfosuccinat
Tên hóa học	
Số C.A.S.	577-11-7
Công thức hóa học	$C_{20}H_{37}NaO_7S$
Công thức cấu tạo	
Khối lượng phân tử	444,56
3. Cảm quan	Chất rắn dạng dẻo, giống sáp, màu trắng có mùi đặc trưng giống octanol, nhưng không có mùi của các dung môi khác. Chất nhũ hóa, chất làm ẩm
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Ít tan trong nước, dễ tan trong ethanol và glycerol
Phổ hồng ngoại	Phổ hồng ngoại của mẫu phân tán trong kali bromid tương ứng với phổ của mẫu chuẩn đối chiếu (Chuẩn đối chiếu USP dioctyl sulfosuccinate có ở công ty United States Pharmacopoeia, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Md 20852, USA)
pH	5.8 - 6.9 (dung dịch 1/100)

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi làm khô

Không được quá 2 % (105°C trong 2 giờ)

Độ trong của dung dịch

Hòa tan 25 g mẫu thử vào 94 ml ethanol. Dung dịch không được vẩn đục sau 24 giờ.

Tro sulfat

Trong khoảng từ 15,5 % đến 16,2 %.

(thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4; Phương pháp I, cân 1 g mẫu)

Bis-(2-ethylhexyl)-maleat

Không được quá 0,4 %.

Chở

Không được quá 2,0 mg/kg.

Không thấp hơn 98,5 % tính theo khối lượng khô.

5.3. Hàm lượng

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Bis-(2-ethylhexyl)-maleat

Thuốc thử

- Chất điện giải hỗ trợ: Hòa tan 21,2 g lithi perchlorat (LiClO_4) khan vào 175 ml nước trong cốc 250 ml. Điều chỉnh pH của dung dịch này đến 3,0 bằng cách thêm từng giọt acid acetic bằng (khoảng 1 đến 2 giọt là đủ), dùng một máy đo pH phù hợp. Chuyển toàn lượng dung dịch vào bình định mức 200 ml, pha loãng đến vạch bằng nước, và trộn đều.

- Dung dịch chuẩn: Chuyển 100 - 110 mg (cân chính xác) bis-(2-ethylhexyl)-maleat, (bis-(2-ethylhexyl)-maleat với độ tinh khiết phù hợp có tên khác là OT-35 của Công ty American Cyanamid, Pine Chemicals Department, Pearl River, New York 10965, USA), vào bình 100 ml. Ghi lại khối lượng chính xác, chính xác đến 0,1 mg, Wa. Pha loãng đến vạch bằng nước, trộn đều.

- Dung dịch mẫu thử gốc: Chuyển 12,5 g mẫu thử, đã được cân chính xác, vào cốc 150 ml. Ghi lại khối lượng chính xác, Ws, chính xác đến 10 mg. Thêm 80-90 ml isopropanol, khuấy bằng đũa thủy tinh đến khi mẫu tan hoàn toàn. Chuyển toàn lượng dung dịch này vào bình định mức 250 ml bằng isopropanol. Pha loãng đến vạch bằng isopropanol, trộn đều.

- Dung dịch thử A: Dùng pipet lấy 50,0 ml "Dung dịch mẫu thử gốc" và 20,0 ml "Dung dịch điện giải hỗ trợ" vào bình định mức 100 ml. Pha loãng với isopropanol đến khoảng dưới vạch định mức 15 mm, đậy nút, lắc đều và để trong 2 phút. Pha loãng tiếp bằng isopropanol đến vạch, đậy nút, lắc đều. Phải thu được dung dịch tuyệt đối trong.

- Dung dịch thử B: Dùng pipet lấy 50,0 ml "Dung dịch mẫu thử gốc", 10,0 ml "Dung dịch chuẩn", và 20,0 ml "Dung dịch điện giải hỗ trợ" vào bình định mức 100 ml, và tiếp tục qui trình như miêu tả trong phần "Dung dịch thử A"

- Mẫu trắng: Dùng pipet lấy 20,0 ml "Dung dịch điện giải hỗ trợ" vào bình định mức 100-ml, pha loãng đến vạch bằng isopropanol, trộn đều.

Tiến hành

Rửa bình cực phổ H-cell vài lần bằng từng lượng nhỏ "Dung dịch thử A", sau đó đổ đầy một nửa bình bằng dung dịch này, đặt một mẫu giấy thấm lên miệng bình và cho dòng khí nitrogen chạy từ từ qua dung dịch trong 15 phút (Chú ý: Trước hết phải bão hòa nitrogen bằng cách cho chạy qua bình sục phù hợp có chứa isopropanol). Sau 15 phút, hướng dòng nitrogen lên bề mặt dung dịch và lấy giấy ra khỏi bình. Với một cực phổ kế phù hợp đã được hiệu chuẩn trước (như cực phổ kế Metrohm Polacord E-261, hoặc tương đương đặt một thể phân cực ở -1,3V. Điều chỉnh độ nhạy dòng tới thang thấp nhất (nhạy nhất) mà tại đó các dao động dòng vẫn nằm trong thang. Ghi lại cực phổ đồ tại độ nhạy này, quét thể trong khoảng từ -0,9 đến -1,5 V, dùng điện cực so sánh là điện cực calomel bão hòa. Ghi lại dao động trung bình A tại thể -1,3 V, và dao động trung bình B, tại thể -1,0 V, theo mm. (Chú ý: nếu sử dụng cực phổ kế không tự động, ghi lại các dao động dòng khuếch tán trung bình của dung dịch tương ứng tại -1,3 V và -1,0V). Lặp lại toàn bộ quá trình với dung dịch thử B, ghi lại giá trị dao động dòng khuếch tán trung bình, D, tại -1,3 V và E, tại -1,0 V.

Làm tương tự với mẫu trắng, ghi lại giá trị dao động dòng khuếch tán trung bình, G, tại -1,3V và H, tại -1 V.

Tính toán:

Trước hết tính các giá trị sau (theo mA):

$$C = (A - B) \times S_1$$

trong đó

C là cường độ dòng khuếch tán của "Dung dịch thử A" và

S₁ là độ nhạy dòng khi đo "Dung dịch thử A"

$$F = (D - E) \times S_2$$

trong đó

F là cường độ dòng khuếch tán của "Dung dịch thử B" và

S₂ là độ nhạy dòng khi đo "Dung dịch thử B"

$$I = (G - H) \times S_3$$

trong đó

I là cường độ dòng khuếch tán của "Mẫu trắng" và

S₃ là độ nhạy dòng khi đo "Mẫu trắng"

$$J = F - C$$

trong đó

J là dòng khuếch tán gây ra do thêm maleat từ Dung dịch chuẩn vào Dung dịch thử B.

$$K = C - I$$

trong đó

K dòng khuếch tán gây ra do maleat có trong Dung dịch thử A.

Cuối cùng, tính phần trăm của bis-(2-ethylhexyl)-maleat có trong mẫu ban đầu theo công thức sau:

$$\frac{K \times 50W_A}{J \times W_S}$$

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.2. Định lượng

Các dung dịch

- Dung dịch mẫu: Chuyển khoảng 3,8 g mẫu thử, trước đó đã được sấy khô ở 105°C trong 2 giờ và đã được cân chính xác, vào bình định mức 500 ml, hòa tan trong cloroform. Pha loãng đến vạch bằng dung môi trên, trộn đều.
- Dung dịch tetra-n-butylamoni iodid: Chuyển 1,250 g tetra-n-butylamoni iodid vào bình định mức 500 ml, pha loãng đến vạch bằng nước, trộn đều.
- Dung dịch muối: Hòa tan 100 g natri sulfat khan và 10 g natri carbonat vào một lượng nước vừa đủ để có được thể tích cuối cùng là 1000 ml.

Tiến hành

Dùng pipet lấy 10,0 ml "Dung dịch mẫu" vào bình định mức 250 ml, thêm vào đó 40 ml cloroform, 50 ml "Dung dịch muối", 10 giọt dung dịch xanh bromophenol (TS). Chuẩn độ bằng "Dung dịch tetra-n-butylamoni iodid" đến khi bắt đầu xuất hiện màu xanh trong lớp cloroform sau khi lắc mạnh dung dịch. Tính hàm lượng (%) $C_{20}H_{37}NaO_7S$ theo công thức:

$$\frac{V \times 1.250 \times 444.6 \times 10}{W \times 369.4}$$

trong đó

V = thể tích (ml) của dung dịch tetra-n-butylamoni iodid dùng để chuẩn độ.

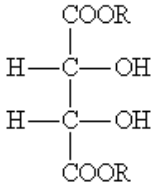
444,6 = khối lượng phân tử của dioctyl natri sulfosuccinat

W = khối lượng (g) của mẫu thử

369,4 = khối lượng phân tử của tetra-n-butylamoni iodid.

PHỤ LỤC 17

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI STEARYL TARTRAT

	Stearyl palmityl tartrat;
1. Tên khác, chỉ số	INS 483
2. Định nghĩa	Sản phẩm của quá trình ester hoá acid tartric với cồn stearyllic thương mại, về cơ bản gồm cồn stearyllic và palmitylic; gồm thành phần chính là diester, với lượng nhỏ monoester và các nguyên liệu ban đầu không thay đổi.
Tên hoá học	Các thành phần chính là distearyl tartrat, dipalmityl tartrat và stearyl-palmityl tartrat.
Công thức hoá học	Distearyl tartrat: $C_{40}H_{78}O_6$ Dipalmityl tartrat: $C_{36}H_{70}O_6$ Stearyl-palmityl tartrat: $C_{38}H_{74}O_6$
Công thức cấu tạo	
	Trong đó R là $(CH_2)_{17}CH_3$ hoặc $(CH_2)_{15}CH_3$
Khối lượng phân tử	Distearyl tartrat: 655,06 Dipalmityl tartrat: 598,95 Stearyl-palmityl tartrat: 627 Chất nhòn có màu kem
3. Cảm quan	Chất nhũ hóa, chất xử lý bột
4. Chức năng	
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước, không tan trong ethanol lạnh, tan trong ethanol nóng.
Nhiệt độ nóng chảy	67 – 77°C
Chỉ số hydroxyl	200 – 220
Tartrat	Phải có phản ứng đặc trưng của tartrat.

5.2. Độ tinh khiết

Tro sulfat

Không được quá 0,5% (Thử trên 2 g mẫu, phương pháp I)

Acid tartric tổng số

Không được nhỏ hơn 18% và không được quá 35% (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chất không xà phòng hóa

Không được nhỏ hơn 77% và không được quá 83% (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chỉ số acid

Không được quá 6 (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng

Không được nhỏ hơn 90% hàm lượng ester tổng số tương ứng với chỉ số ester trong khoảng 163 – 180.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Acid tartric tổng số

Đường chuẩn:

Cân 100 mg acid tartric tinh khiết cho vào bình định mức dung tích 100 ml, hoà tan trong khoảng 90 ml nước, thêm nước vào cho đến khi đạt thể tích 100 ml và lắc đều. Chuyển các phần tách biệt 3, 4, 5, 6 ml vào trong các cuvet phù hợp 19 x 150 mm, thêm lượng nước vừa đủ đến 10 ml. Thêm vào 4 ml dung dịch natri metavanadat 5% vừa chuẩn bị và 1 ml acid acetic vào mỗi cuvet. (Chú ý: sử dụng các dung dịch này trong 10 phút sau khi xuất hiện màu). Chuẩn bị mẫu trắng theo cách tương tự, sử dụng 10 ml nước thay thế dung dịch acid tartric. Đặt trên thiết bị độ hấp thụ bằng 0 đối với mẫu trắng, sau đó đo độ hấp thụ của 4 dung dịch acid tartric ở bước sóng 520 nm với máy quang phổ thích hợp hoặc máy so màu quang điện được trang bị kính lọc 520 nm. Từ các kết quả thu được, vẽ đường chuẩn trên hệ tọa độ vuông góc với trục tung biểu diễn độ hấp thụ và trục hoành biểu diễn hàm lượng acid tartric (mg).

Chuẩn bị mẫu thử:

Cân chính xác 4 g mẫu cho vào bình tam giác dung tích 250 ml và thêm vào 80 ml dung dịch KOH 0,5N và 0,5 ml phenolphthalein TS. Nối bình với một sinh hàn không khí có chiều dài ít nhất 65 cm và gia nhiệt hỗn hợp trên tấm bản nóng trong 2,5 giờ. Thêm vào hỗn hợp nóng acid phosphoric 10% cho đến khi có phản ứng acid rõ rệt phát hiện được bằng giấy thử đỏ congo. Lại kết nối sinh hàn khí và gia nhiệt cho đến khi acid béo hoá lỏng và trong. Làm nguội và chuyển hỗn hợp vào một phễu chiết dung tích 250 ml bằng các phần nhỏ nước và chloroform. Chiết tách các acid béo được giải phóng ra bằng 3 lần liên tiếp 25 ml nước và cho phần nước rửa vào phễu chiết chứa lớp nước. Chuyển các thành phần có trong phễu chiết thứ nhất vào cốc 250 ml, gia nhiệt trên chậu hơi nước để loại các vết chloroform, lọc qua giấy lọc mịn vào bình định mức dung tích 500 ml và cuối cùng pha tới thể tích 500 ml bằng nước (Dung dịch I). Dùng pipet lấy 25 ml dung dịch này cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha tới thể tích 100 ml bằng nước (Dung dịch II).

Cách tiến hành:

Chuyển 10 ml Dung dịch II đã được chuẩn bị trong phần Chuẩn bị mẫu thử vào cuvet 19 x 150. Thêm vào 4 ml dung dịch natri metavanadat 5% vừa chuẩn bị và 1 ml acid acetic. (Chú ý: sử dụng các dung dịch này trong 10 phút sau khi xuất hiện màu). Chuẩn bị mẫu trắng theo cách tương tự, sử dụng 10 ml nước thay thế dung dịch acid tartric. Đặt trên thiết bị đo độ hấp thụ bằng 0 đối với mẫu trắng, sau đó đo độ hấp thụ của 4 dung dịch acid tartric ở bước sóng 520 nm với máy quang phổ thích hợp hoặc máy so màu quang điện được trang bị kính lọc 520 nm. Từ đường chuẩn xác định hàm lượng acid tartric (mg) trong dung dịch pha cuối cùng, nhân hàm lượng acid tartric xác định được với 20 và chia cho trọng lượng mẫu ban đầu để thu được % acid tartric.

Chất không xà phòng hóa

Cách tiến hành này xác định những chất hòa tan trong chất béo mà không được xà phòng hoá bởi kiềm nhưng được hòa tan trong dung môi chất béo thông thường.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 5 g mẫu cho vào bình dung tích 250 ml, thêm dung dịch có 2 g KOH trong 40 ml alcol và đun sôi nhẹ có sinh hàn ngược trong 1 giờ. Chuyển toàn bộ hỗn hợp chứa trong bình vào ống đông có nắp đáy thủy tinh (chiều cao khoảng 30 cm, đường kính 3,5 cm và có vạch định mức 40, 80 và 130 ml). Rửa bình bằng alcol phù hợp đến thể tích 40 ml trong ống đông, thêm nước ấm, sau đó bằng nước lạnh cho đến khi tổng thể tích đạt 80 ml. Cuối cùng rửa bình bằng vài ml ether dầu hỏa, cho phần dung môi rửa vào ống đông, làm mát hỗn hợp trong ống đông đến nhiệt độ phòng và thêm 50 ml ether dầu hỏa.

Đậy nắp, lắc ống đông mạnh ít nhất trong 1 phút, để hai lớp tách ra trong. Hút lớp bên trên hoàn toàn nếu có thể mà không hút bất kỳ một chút dịch nào của lớp dưới, lấy phần ether cho vào trong một phễu tách dung tích 500 ml. Lặp lại quá trình trích ly và hút dịch ít nhất 6 lần bằng các phần 50 ml ether dầu hỏa, lắc mạnh mỗi lần. Rửa hỗn hợp phần trích ly bằng các phần 25 ml alcol 10% và lắc mạnh cho đến khi nước rửa được trung hoà sử dụng chất chỉ thị phenolphthalein, và loại bỏ phần nước rửa. Chuyển phần ether tách được vào cốc đã biết khối lượng và rửa phễu tách bằng 10 ml ether, sau đó cho nước rửa vào cốc.

Cô ether trong cách thủy đến khô và làm khô phần cặn đến khối lượng không đổi, tốt nhất 75 – 80°C ở áp suất chân không không quá 200 mm Hg, hoặc ở 100°C ở áp suất thường trong 30 phút. Làm mát trong bình hút ẩm và cân để thu được khối lượng chưa hiệu chỉnh của chất không xà phòng.

Xác định hàm lượng acid béo trong cặn bằng cách sau: Hoà tan cặn trong 50 ml alcol ấm (chứa phenolphthalein TS và trước đó được trung hoà bằng NaOH tới màu hồng nhạt), chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,02N cho đến khi xuất hiện màu hồng nhạt. Mỗi ml dung dịch NaOH 0,02N tương ứng với 5,659 mg acid béo, tính theo acid oleic. Hiệu số khối lượng chưa hiệu chỉnh của chất không xà phòng và khối lượng acid béo tính được từ phép chuẩn độ trên là khối lượng chất không xà phòng hóa trong mẫu thử.

Chỉ số acid

Cân chính xác 1 g mẫu và hoà tan trong 20 ml ethanol 95% nóng, trước đó đã được trung hoà có sử dụng 0,5 ml chất chỉ thị phenolphthalein TS. Làm nguội dung dịch sau đó trung hoà bằng cách chuẩn độ với dung dịch KOH 0,01N trong ethanol.

$0,561 \times \text{thể tích dung dịch KOH dùng để chuẩn độ (ml)}$

Chỉ số acid = -----

Khối lượng mẫu (g)

Giữ lại dung dịch đã được trung hoà cho phần Định lượng.

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.2. Định lượng

Thêm chính xác 50 ml dung dịch KOH 0,1N trong ethanol vào dung dịch đã được trung hoà ở trên từ phần xác định chỉ số acid và đun sôi đều trong 2 phút. Làm nguội dung dịch và chuẩn độ dư KOH bằng B ml dung dịch HCl 0,1N. Thực hiện xác định với mẫu trắng (bằng A ml dung dịch HCl 0,1N).

$$\text{Chỉ số ester} = \frac{5,611 \times (A - B)}{\text{Khối lượng mẫu (g)}}$$

PHỤ LỤC 18

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAL MONOSTEARAT

INS 491

1. Tên khác, chỉ số

ADI=0-25mg/kg thể trọng

2. Định nghĩa

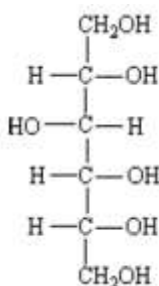
Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid stearic thực phẩm.

Chỉ số C.A.S

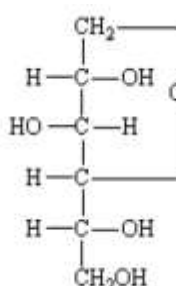
1338-41-6

Công thức cấu tạo

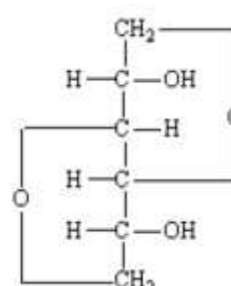
Gồm acid palmitic este hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol



1,4-Sorbitan



Isosorbitid

Hạt hay mảnh có màu kem nhạt đến vàng nâu hoặc dạng sáp rắn, có mùi nhẹ đặc trưng.

3. Cảm quan

Chất nhũ hóa

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Tại nhiệt độ cao hơn điểm chảy, tan trong toluen, dioxan, carbon tetrachlorid, ether, methanol, ethanol và anilin; không tan trong ether dầu hỏa và aceton, không tan trong nước lạnh nhưng có thể phân tán trong nước ấm. Tại nhiệt độ trên 50°C tan dạng sương mù trong dầu khoáng và ethyl acetat.

Khoảng nhiệt độ đông đặc

50-52°C.

Hấp thụ hồng ngoại

Phổ hồng ngoại của mẫu thử đặc trưng cho este một phần của acid béo với polyol

5.2. Độ tinh khiết

Nước

Không được quá 1,5% (phương pháp Karl Fischer).

Chỉ số acid

Không được thấp hơn 5 và không được quá 10.

Chỉ số xà phòng hóa

Không được thấp hơn 147 và không được quá 157.

Chỉ số Hydroxyl

Không được thấp hơn 235 và không được quá 260.

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng

Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được khoảng 31,5g polyol và 73g acid béo. Hàm lượng polyol không được thấp hơn 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

Chì

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định hàm lượng sorbitan ester (JECFA monograph 1 - Vol.4).

6.2. Định lượng

PHỤ LỤC 19

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAN TRISTEARAT

INS 492

1. Tên khác, chỉ số

ADI=0-25mg/kg thể trọng

2. Định nghĩa

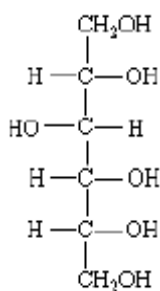
Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid stearic thực phẩm.

Chỉ số C.A.S

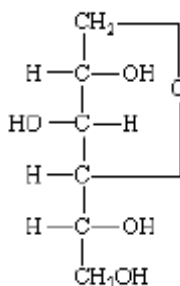
26658-19-5

Công thức cấu tạo

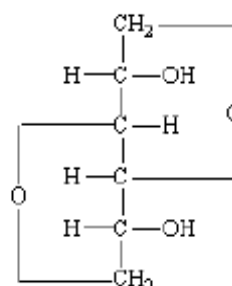
Gồm acid stearic este hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol



1,4-Sorbitan



Isosorbitid

Hạt hay mảnh có màu kem nhạt đến vàng nâu hoặc dạng sáp rắn

3. Cảm quan

Chất nhũ hóa

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Khó tan trong toluen, ether, carbon tetrachlorid, ethyl acetat; có thể phân tán trong ether dầu hỏa, dầu khoáng, dầu thực vật, aceton và dioxan; không tan trong nước, methanol và ethanol (thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4).

Khoảng nhiệt độ đông đặc

47-50°C.

5.2. Độ tinh khiết

Nước

Không được quá 1,5% (phương pháp Karl Fischer).

Tro sulfat

Không được quá 0,5%.

Chỉ số acid

Không được quá 15.

Chỉ số xà phòng hóa

Không được thấp hơn 176 và không được quá 188.

Chỉ số Hydroxyl

Không được thấp hơn 66 và không được quá 80.

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng

Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được không thấp hơn 14g và không được quá 21g polyol và không thấp hơn 85g và không được quá 92g acid béo. Hàm lượng polyol không được thấp hơn 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Chỉ

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.2. Định lượng

Cân 25g mẫu thử, chính xác đến mg, chuyển vào bình cầu đáy tròn 500 ml, thêm 250 ml cồn và 7,5g kali hydroxyd và trộn đều. Lắp bình cầu với sinh hàn thích hợp, đun hồi lưu hỗn hợp trong từ 1-2 giờ sau đó chuyển hỗn hợp sang cốc 800 ml, tráng sạch bình bằng 100 ml nước cất và gộp dịch rửa vào cốc. Cho bay hơi hết cồn trên bể cách thủy, thỉnh thoảng thêm nước để thay thế lượng cồn đã bay hơi. Dừng quá trình đuổi cồn khi không còn mùi cồn bay ra. Hiệu chỉnh thể tích cuối cùng cho đủ 250 ml bằng nước nóng. Trung hoà dung dịch xà phòng với acid sulfuric loãng (1/2), thêm 10% dư và đun nóng, khuấy đều cho đến khi acid béo tách lớp. Chuyển lớp acid béo sang phễu chiết 500 ml, rửa 3 hoặc 4 lần, mỗi lần với 20 ml nước nóng để loại hết các polyol, gộp dịch rửa với pha nước chứa polyol thu được từ quá trình xà phòng hoá. Chiết pha nước này 3 lần 20 ml ether dầu hoả/lần, lấy lớp ether dầu hoả gộp với phần acid béo, cho bay hơi tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân.

Trung hoà dung dịch chứa polyol bằng dung dịch kali hydroxyd 1/10 tới pH = 7, sử dụng pH kế thích hợp. Cho bay hơi dung dịch này tới gần cạn, tách phần polyol khỏi các muối bằng cách chiết vài lần với cồn nóng. Cho bay hơi dịch chiết cồn trên bể cách thủy tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân. Tránh khô quá trong quá trình đun nóng.

Tiến hành định lượng một mẫu khác (25g) theo hướng dẫn chuyên luận xác định hàm lượng ester sorbitan để xác định % ester sorbitan.

PHỤ LỤC 20

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAN MONOLAU RAT

INS 493

1. Tên khác, chỉ số

ADI=0-25mg/kg thể trọng

2. Định nghĩa

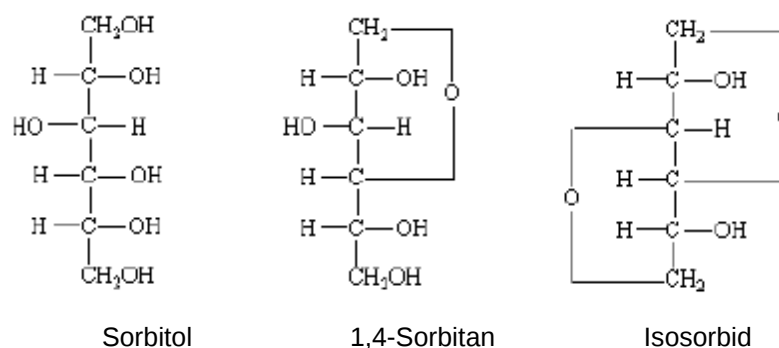
Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid lauric thực phẩm.

Chỉ số C.A.S

1338-39-2

Công thức cấu tạo

Gồm acid lauric este hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Dạng lỏng nhớt sánh có màu hổ phách, dạng hạt hay mảnh có màu kem nhạt đến vàng nâu hoặc dạng sáp rắn, có mùi nhẹ đặc trưng.

3. Cảm quan

Chất nhũ hóa, chất ổn định

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Có thể phân tán được trong nước nóng và nước lạnh.

5.2. Độ tinh khiết

Nước

Không được quá 2,0% (phương pháp Karl Fischer).

Tro sulfat

Không được quá 0,5%.

Chỉ số acid

Không được quá 7.

Chỉ số xà phòng hóa

Không được thấp hơn 155 và không được quá 170.

Chỉ số Hydroxyl

Không được thấp hơn 330 và không được quá 358.

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng

Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được không thấp hơn 36g và không được quá 49g polyol, không thấp hơn 56g và không được quá 68g acid béo. Hàm lượng polyol không được thấp hơn 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

Chì

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.2. Định lượng

Cân 25g mẫu thử, chính xác đến mg, chuyển vào bình cầu đáy tròn 500 ml, thêm 250 ml cồn và 7,5g kali hydroxyd và trộn đều. Lắp bình cầu với sinh hàn thích hợp, đun hồi lưu hỗn hợp trong từ 1-2 giờ sau đó chuyển hỗn hợp sang cốc 800 ml, tráng sạch bình bằng 100 ml nước cất và gộp dịch rửa vào cốc. Cho bay hơi hết cồn trên bể cách thủy, thỉnh thoảng thêm nước để thay thế lượng cồn đã bay hơi. Dừng quá trình đuổi cồn khi không còn mùi cồn bay ra. Hiệu chỉnh thể tích cuối cùng cho đủ 250 ml bằng nước nóng.

Trung hoà dung dịch xà phòng với acid sulfuric loãng (1/2), thêm 10% dư và đun nóng, khuấy đều cho đến khi acid béo tách lớp. Chuyển lớp acid béo sang phễu chiết 500 ml, rửa 3 hoặc 4 lần, mỗi lần với 20 ml nước nóng để loại hết các polyol, gộp dịch rửa với pha nước chứa polyol thu được từ quá trình xà phòng hoá. Chiết pha nước này 3 lần 20 ml ether dầu hoả/lần, lấy lớp ether dầu hoả gộp với phần acid béo, cho bay hơi tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân.

Trung hoà dung dịch chứa polyol bằng dung dịch kali hydroxyd 1/10 tới pH = 7, sử dụng pH kế thích hợp. Cho bay hơi dung dịch này tới gần cạn, tách phần polyol khỏi các muối bằng cách chiết vài lần với cồn nóng. Cho bay hơi dịch chiết cồn trên bể cách thủy tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân. Tránh khô quá trong quá trình đun nóng.

PHỤ LỤC 21

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAN MONOOLEAT

INS 494

1. Tên khác, chỉ số

ADI=0-25mg/kg thể trọng

2. Định nghĩa

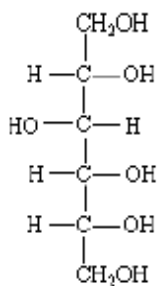
Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid oleic thực phẩm (R). Thành phần lớn nhất là 1,4-Sorbitan monooleat, thành phần ít hơn là isosorbid monooleat, sorbitan dioleat và sorbitan trioleat.

Chỉ số C.A.S

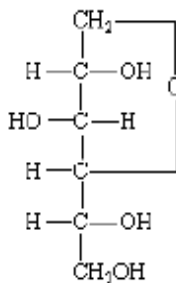
1338-43-8

Công thức cấu tạo

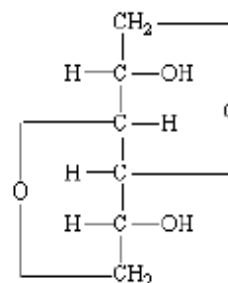
Gồm acid oleic este hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol



1,4-Sorbitan



Isosorbid

Dạng sệt sánh màu hổ phách, dạng hạt hay mảnh có màu kem nhạt đến vàng nâu hoặc dạng sáp rắn, có mùi nhẹ .

3. Cảm quan

Chất nhũ hóa, chất ổn định

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Tại nhiệt độ cao hơn điểm chảy, tan trong ethanol, ether, ethylacetat, anilin, toluen, dioxan, ether dầu hỏa, carbon tetrachlorid; không tan trong nước lạnh nhưng có thể phân tán trong nước ấm.

Chỉ số iod

Phần acid oleic thu được bằng cách xà phòng hoá sorbitan monooleat trong quá trình định lượng có chỉ số iod từ 80 đến 100.

5.2. Độ tinh khiết

Nước

Không được quá 2% (phương pháp Karl Fischer).

Tro sulfat

Không được quá 0,5%.

Chỉ số acid

Không được quá 8.

Chỉ số xà phòng hóa

Không được thấp hơn 145 và không được quá 160.

Chỉ số Hydroxyl

Không được thấp hơn 193 và không được quá 210.

Chỉ

Không được quá 2,0 mg/kg

5.3. Hàm lượng

Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được không thấp hơn 28g và không được quá 32g polyol, không thấp hơn 73g và không được quá 77g acid béo. Hàm lượng polyol không được thấp hơn 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbitid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

Chỉ

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.2. Định lượng

Cân 25g mẫu thử, chính xác đến mg, chuyển vào bình cầu đáy tròn 500 ml, thêm 250 ml cồn và 7,5g kali hydroxyd và trộn đều. Lắp bình cầu với sinh hàn thích hợp, đun hồi lưu hỗn hợp trong từ 1-2 giờ sau đó chuyển hỗn hợp sang cốc 800 ml, tráng sạch bình bằng 100 ml nước cất và gộp dịch rửa vào cốc. Cho bay hơi hết cồn trên bể cách thủy, thỉnh thoảng thêm nước để thay thế lượng cồn đã bay hơi. Dừng quá trình đuổi cồn khi không còn mùi cồn bay ra. Hiệu chỉnh thể tích cuối cùng cho đủ 250 ml bằng nước nóng. Trung hoà dung dịch xà phòng với acid sulfuric loãng (1/2), thêm 10% dư và đun nóng, khuấy đều cho đến khi acid béo tách lớp. Chuyển lớp acid béo sang phễu chiết 500 ml, rửa 3 hoặc 4 lần, mỗi lần với 20 ml nước nóng để loại hết các polyol, gộp dịch rửa với pha nước chứa polyol thu được từ quá trình xà phòng hoá. Chiết pha nước này 3 lần 20 ml ether dầu hoả/lần, lấy lớp ether dầu hoả gộp với phần acid béo, cho bay hơi tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân.

Trung hoà dung dịch chứa polyol bằng dung dịch kali hydroxyd 1/10 tới pH = 7, sử dụng pH kế thích hợp. Cho bay hơi dung dịch này tới gần cạn, tách phần polyol khỏi các muối bằng cách chiết vài lần với cồn nóng. Cho bay hơi dịch chiết cồn trên bể cách thủy tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân. Tránh khô quá trong quá trình đun nóng.

Tiến hành định lượng một mẫu khác (25g) theo hướng dẫn chuyên luận xác định hàm lượng sorbitan ester để xác định % sorbitan ester.

PHỤ LỤC 22

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAN MONOPALMITAT

INS 495

1. Tên khác, chỉ số

2. Định nghĩa

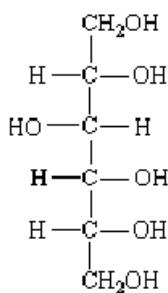
Chỉ số C.A.S

Công thức cấu tạo

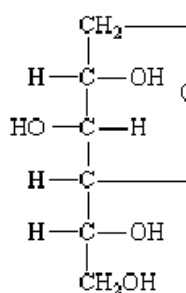
Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid palmitic thực phẩm

26266-57-9

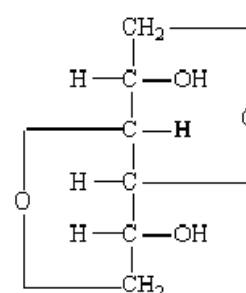
Gồm acid palmitic ester hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol



1,4-Sorbitan



Isosorbide

Dạng sáp rắn có màu kem nhạt đến vàng nâu, có mùi nhẹ.

3. Cảm quan

Chất nhũ hóa

4. Chức năng

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Tại nhiệt độ cao hơn điểm chảy, tan trong methanol, ether, ethylacetat, anilin, toluen, dioxan, ether dầu hỏa, carbon tetrachlorid; không tan trong nước lạnh nhưng có thể phân tán trong nước ấm.

Độ đông đặc

45 - 47°

Hấp thụ hồng ngoại

Phải có phổ hồng ngoại đặc trưng của ester của acid béo với polyol

5.2. Độ tinh khiết

Nước

Không được quá 1,5% (phương pháp Karl Fischer).

Chỉ số acid

Không được thấp hơn 4 và không được quá 7,5.

Chỉ số xà phòng hóa

Không được thấp hơn 140 và không được quá 150.

Chỉ số Hydroxyl

Không được thấp hơn 270 và không được quá 305.

Chì

Không được quá 2,0 mg/kg

5.3. Hàm lượng

Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được khoảng 37 g polyol và 65 g acid béo. Hàm lượng polyol phải vào khoảng 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

Chì

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định hàm lượng sorbitan ester (JECFA monograph 1 - Vol.4).

6.2. Định lượng



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

QCVN 4-23:2011/BYT

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT TẠO BỌT**

National technical regulation on Food Additive – Foaming agent

HÀ NỘI – 2011

Lời nói đầu

QCVN 4-23:2011/BYT do Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT TẠO BỌT

National technical regulation on Food Additive – Foaming agent

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia (sau đây gọi tắt là Quy chuẩn) này quy định các yêu cầu kỹ thuật và quản lý về chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chất tạo bọt được sử dụng với mục đích làm phụ gia thực phẩm.

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

- 2.1. Tổ chức, cá nhân nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng các chất tạo bọt làm phụ gia thực phẩm (sau đây gọi tắt là tổ chức, cá nhân).
- 2.2. Cơ quan quản lý nhà nước có liên quan.

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:

- 3.1. Chất tạo bọt: là phụ gia thực phẩm được cho vào thực phẩm nhằm tạo ra hoặc duy trì sự phân tán đồng nhất của pha khí trong thực phẩm dạng lỏng hoặc dạng rắn.
- 3.2. JECFA monograph 1 - Vol. 4 (JECFA monographs 1 - Combined compendium of food additive specifications; Joint FAO/WHO expert committee on food additives; Volume 4 - Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications; FAO, 2006): Các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4 Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm, dung dịch thử nghiệm được sử dụng (hoặc tham chiếu) trong yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm; JECFA biên soạn; FAO ban hành năm 2006.
- 3.3. Mã số C.A.S (Chemical Abstracts Service): Mã số đăng ký hóa chất của Hiệp hội Hóa chất Hoa Kỳ.
- 3.4. TS (test solution): Dung dịch thuốc thử.
- 3.5. ADI (Acceptable daily intake): Lượng ăn vào hàng ngày chấp nhận được.
- 3.6. INS (International numbering system): Hệ thống mã số quốc tế về phụ gia thực phẩm.

II. YÊU CẦU KỸ THUẬT, PHƯƠNG PHÁP THỬ VÀ LẤY MẪU

1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với chất chiết xuất từ Quillaia sử dụng làm chất tạo bọt được quy định tại phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này.
2. Các yêu cầu kỹ thuật quy định trong Quy chuẩn này được thử theo JECFA monograph 1 - Vol. 4, ngoại trừ một số phép thử riêng được mô tả trong phụ lục. Các phương pháp thử được hướng dẫn trong Quy chuẩn này không bắt buộc phải áp dụng, có thể sử dụng các phương pháp thử khác tương đương.

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư 16/2009/TT-BKHCN ngày 02 tháng 6 năm 2009 của Bộ Khoa học và Công nghệ về hướng dẫn kiểm tra nhà nước về chất lượng hàng hóa lưu thông trên thị trường và các quy định khác của pháp luật có liên quan.

III. YÊU CẦU QUẢN LÝ

1. Công bố hợp quy

1.1. Chất tạo bọt phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

1.2. Phương thức, trình tự, thủ tục công bố hợp quy được thực hiện theo Quy định về chứng nhận hợp chuẩn, chứng nhận hợp quy và công bố hợp chuẩn, công bố hợp quy ban hành kèm theo Quyết định số 24/2007/QĐ-BKHCN ngày 28 tháng 9 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ và các quy định của pháp luật.

2. Kiểm tra đối với chất tạo bọt

Việc kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn đối với chất tạo bọt phải thực hiện theo các quy định của pháp luật.

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

1. Tổ chức, cá nhân phải công bố hợp quy phù hợp với các quy định kỹ thuật tại Quy chuẩn này, đăng ký bản công bố hợp quy tại Cục An toàn vệ sinh thực phẩm và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn theo đúng nội dung đã công bố.

2. Tổ chức, cá nhân chỉ được nhập khẩu, xuất khẩu, sản xuất, buôn bán và sử dụng chất tạo bọt sau khi hoàn tất đăng ký bản công bố hợp quy và bảo đảm chất lượng, vệ sinh an toàn, ghi nhãn phù hợp với các quy định của pháp luật.

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

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

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

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

PHỤ LỤC

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CHẤT CHIẾT XUẤT TỪ QUILLAIA (DẠNG 1)

1. Tên khác, chỉ số

Quillaja extract, Soapbark extract, Quillay bark extract, Bois de Panama, Panama bark extract, Quillai extract.

ADI : 0 - 1mg/kg thể trọng (tính cho cả dạng 1 và 2)

INS 999i

2. Định nghĩa

Chất chiết xuất từ quillaia (dạng 1) thu được từ quá trình chiết với nước vỏ hoặc gỗ của thân và cành *Quillaja saponaria* Molina (họ *Rosaceae*). Chế phẩm chứa saponin triterpenoid trong đó chủ yếu là glycosid của acid quillaic. Polyphenol và tanin là những

	thành phần chính, ngoài ra còn có một vài loại đường và calci oxalat.
	Chế phẩm chiết xuất từ quillaia (dạng 1) thương mại ở dạng lỏng hoặc bột sáy phun có chất mang như lactose, maltitol hoặc maltodextrin. Sản phẩm dạng lỏng thường được bảo quản bằng natri benzoat hoặc ethanol.
	Saponin triterpenoid (quillaia saponin), glycosid của acid quillaic
Tên hóa học	
	68990-67-0
Mã số C.A.S.	
Khối lượng phân tử	Các saponin dạng monomer có khối lượng phân tử khoảng 1.800 – 2.300, phù hợp với một triterpen gồm 8 – 10 monosaccharid.
3. Cảm quan	Dạng lỏng màu nâu đỏ hoặc dạng bột màu nâu sáng có ánh hồng
4. Chức năng	Chất nhũ hoá, chất tạo bọt
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Tan tốt trong nước ; không tan trong ethanol, aceton, methanol và butanol.
<i>Tạo bọt</i>	Phải có phản ứng tạo bọt đặc trưng.
<i>Sắc ký</i>	Thời gian lưu của pic chính của mẫu tương ứng với pic saponin chính (QS-18) của chuẩn (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Màu sắc và độ đục</i>	Phải có màu sắc và độ đục đặc trưng.
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Nước</i>	Dạng bột : Không được quá 6% (theo phương pháp Karl Fischer)
<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Dạng lỏng : 50 – 80% (sấy 2 g mẫu ở nhiệt độ 105°C trong 5 giờ)
<i>pH</i>	3,7 – 5,5 (đối với nồng độ dung dịch 4%)
<i>Tro</i>	Không được quá 14% theo chế phẩm khô (dùng 1 g mẫu đối với dạng bột; đối với mẫu dạng lỏng sử dụng phần còn lại sau khi sấy khô)
<i>Tanin</i>	Không được quá 8% theo chế phẩm khô (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Hàm lượng saponin : không được thấp hơn 20% và không được quá 26% tính theo chế phẩm khô.
6. Phương pháp thử	
6.1. Định tính	
<i>Tạo bọt</i>	Hoà tan 0,5 g mẫu dạng bột trong 9,5 g nước hoặc 1 ml mẫu dạng lỏng trong 9 ml nước. Cho 1 ml hỗn hợp và 350 ml nước vào trong ống đong loại 1.000 ml. Bịt kín ống đong và lắc mạnh

30 lần, để yên. Ghi lại mức bọt (ml) sau 30 phút. Bình thường mức bọt đạt khoảng 150 ml bọt.

Màu sắc và độ đục

Đối với dạng bột : Hoà tan 0,5 g mẫu trong 9,5 g nước. Dung dịch không đục. Độ hấp thụ của dung dịch so với nước ở bước sóng 520 nm phải nhỏ hơn 1,2.

6.2. Độ tinh khiết

Tanin

Cân 3,0 g mẫu dạng bột hoặc lượng mẫu dạng lỏng tương đương tính theo lượng chế phẩm khô sau khi sấy. Hoà tan mẫu trong 250 ml nước. Điều chỉnh pH = 3,5 bằng acid acetic. Sấy 25 ml dung dịch thu được ở nhiệt độ 105°C trong thời gian 5 giờ và xác định khối lượng chất khô theo đơn vị g (W_i). Trộn 50 ml dung dịch trên với 360 mg polyvinyl polypyrrolidon, sau đó khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ phòng; li tâm với tốc độ 8.000 vòng/phút. Lấy phần dung dịch trong ở phía trên, sấy ở nhiệt độ 105°C, thời gian 5 giờ. Cân phần chất khô thu được (W_f , đơn vị tính g). Hàm lượng tanin (%) trong mẫu được tính như sau :

$$\% \text{ Tanin (theo chế phẩm khô)} = 100 \times (W_i - W_f/2)/W_i$$

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

- Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

6.3. Định lượng

Nguyên tắc:

Saponin QS-7, QS-17, QS-18 và QS-21 được tách bằng HPLC pha đảo, kết quả định lượng được xem là tổng hàm lượng saponin có trong chất chiết xuất từ *Quillaia* (dạng 1)

Chuẩn bị mẫu:

Đối với mẫu dạng bột: Cân 0,5 g mẫu và hoà tan trong 9,5 g nước. Lọc qua bộ lọc cỡ 0,2 μm .

Dịch chiết nước (khoảng 550 mg chất khô/ml): Cân 1 g mẫu và pha với 9 g nước. Lọc qua bộ lọc cỡ 0,2 μm .

Trong cả hai trường hợp trên, thể tích mẫu khoảng 10 ml.

Chuẩn bị mẫu chuẩn:

Cân 1,5 g saponin tinh sạch (của các hãng SuperSap, Natural Response, Chilê; Quil-A, Superfos, Đan Mạch hoặc tương đương, đã biết hàm lượng saponin), hoà tan trong 100 ml nước. Lọc qua bộ lọc cỡ 0,2 μm .

Điều kiện HPLC :

- Cột : Vydac 214TP54 (dài 4,6 x 250 mm, lỗ 5 μm) hoặc loại tương ứng

- Nhiệt độ cột : nhiệt độ phòng

- Bơm : đặt chế độ gradient

- Dung môi A : 0,15% TFA (acid trifloroacetic) trong nước dùng cho HPLC

- Dung môi B : 0,15% TFA (acid trifloroacetic) trong acetonitril dùng cho HPLC

- Gradient :

Thời gian (phút)	% Dung môi A	% Dung môi B
0	70	30
40	55	45
45	70	30

- Tốc độ dòng : 1 ml/phút

- Bước sóng phát hiện : 220 nm

- Thể tích bơm mẫu : 20 μl

Tính kết quả: Nồng độ saponin (mg/ml) trong dung dịch được chuẩn bị như trên là :

$$C_{\text{mẫu}} = (A_{\text{mẫu}}/A_{\text{chuẩn}})C_{\text{chuẩn}}$$

Trong đó:

- $C_{\text{mẫu}}$: Nồng độ saponin (mg/ml) trong mẫu thử
- $C_{\text{chuẩn}}$: Nồng độ saponin chuẩn (mg/ml) được bơm vào (ví dụ : $C_{\text{chuẩn}} = 13,5$ mg/ml nếu hàm lượng saponin của 1,5 g mẫu chuẩn là 90%)
- $A_{\text{mẫu}}$ và $A_{\text{chuẩn}}$: Tổng diện tích các pic tương ứng với 4 loại saponin chính (QS-7, QS-17, QS-18, QS-21) có trong mẫu cần phân tích và mẫu chuẩn. (Tanin và polyphenol được tách giải trước saponin. Các pic của saponin xuất hiện sau pic chính của polyphenol – xem hình ở phụ lục).

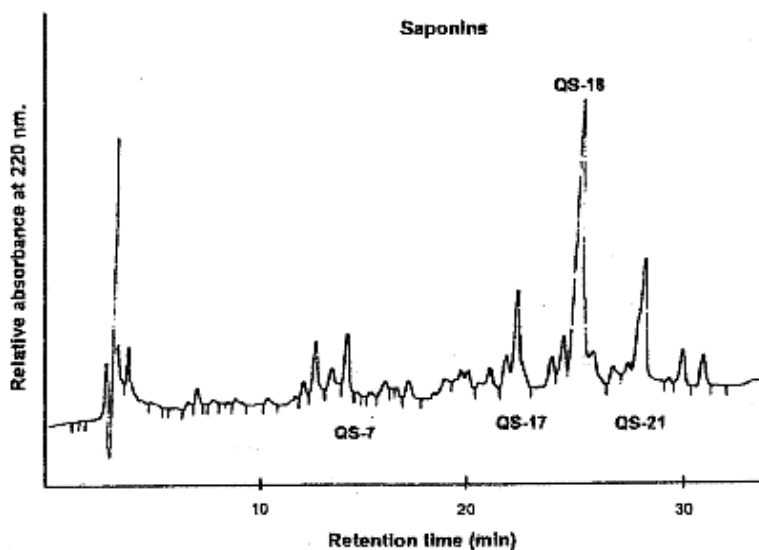
% Saponin có trong mẫu thử được tính như sau :

$$\% \text{ Saponin} = 100 \times C_{\text{mẫu}} / (0,1 W_{\text{mẫu}})$$

Trong đó:

- $W_{\text{mẫu}}$: Khối lượng mẫu (mg) được lấy để chuẩn bị mẫu và 0,1 là nghịch đảo của thể tích mẫu (10 ml).

Sắc ký đồ của chất chuẩn (15 mg chất khô/ml tương ứng với 13,5 mg saponin/ml)



Sắc ký đồ của chất chiết xuất từ Quillaia (dạng 1) (55 mg chất khô/ml)