PHẦN VĂN BẢN QUY PHẠM PHÁP LUẬT

BỘ Y TẾ

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

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. /.

KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG

Trịnh Quân Huấn

QCVN 4 - 18: 2011/BYT

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - NHÓM CHẾ PHẨM TINH BỘT

National technical regulation on Food Additive - Modified starches

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 hóa
- Tinh bột xử lý bằng enzym

- Monostarch phosphat
- Distarch phosphat
- Distarch phosphat đã phosphat hóa
- Distarch phosphat acetylat
- Tinh bột acetat
- Distarch adipat acetylat
- Tinh bột hydroxypropyl
- Distarch phosphat hydroxypropyl
- Tinh bột natri octenylsucinat

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 số 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 hóa: INS 1404
Tinh bột xử lý bằng enzym: INS 1405
Monostarch phosphat: INS 1410
Distarch phosphat: INS 1412
Distarch phosphat đã phosphat hóa: 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 octenylsucinat: 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 hóa 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 mạt) hoặc nếu hồ hóa 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 hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

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

5.2. Độ tinh khiết

Lưu huỳnh dioxyd (SO_2)	- 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)
Chì	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.
Các độ tinh khiết bổ sung đối với từng loại chế phẩm tinh bột hóa học	- Xem ở cột 3 bảng 1 - Xem mô tả trong phần Phương pháp thử

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Soi kính hiển vi	Các dạng chế phẩm tinh bột không được hồ hóa 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 vằn 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.

Nhuộm màu iod 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.

Khử đồng 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.

Tính khác biệt 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 hóa bằng hypochlorit (không thử đối với tinh bột khoai tây oxy hóa nhẹ)

Nguyên tắc:

Vì trong thành phần có chứa nhóm carboxyl, tinh bột oxy hóa 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 hóa hypochlorit. Do vậy, phép thử nyaf cho phép phân biệt được tinh bột oxy hóa bằng hypoclorit 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 hóa tinh bột acetylat. Sau khi làm giàu acetat được chuyển thành aceton bằng cách gia nhiệt với $Ca(OH)_2$. 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 110^0C. Cặn được hòa tan trong một vài giọt nước và được chuyển sang ống thử. Thêm $Ca(OH)_2$ và gia

nhiệt ống thử. Nếu mẫu là tinh bột acetylat, hơi aceton được hình thành. Hơi này tạo thành màu xanh trên mảnh giấy tẩm dung dịch bão hòa 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 tấm film mỏng cho thấy một dải 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:

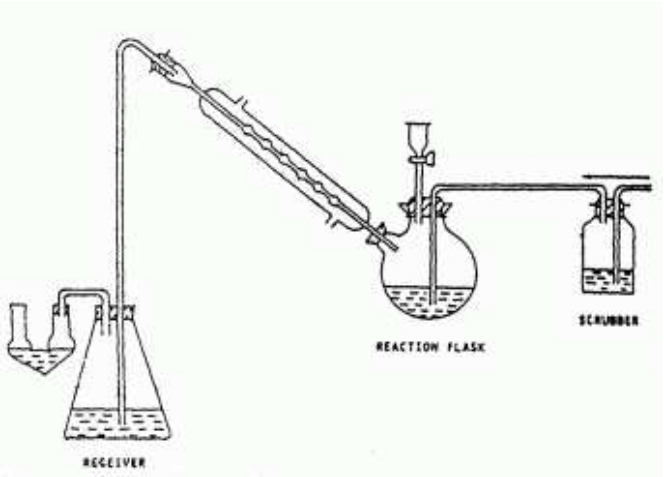
Phương pháp này được áp dụng, với một vài thay đổi nhỏ, đối với mẫu chất lỏng hoặc rắn thậm chí cả sự có mặt của các hợp chất chứa lưu huỳnh dễ bay hơi khác.

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 thu được cho 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 sulfurơ, được cấu tạo bằng các kết nối thủy tinh thon tiêu chuẩn, có thể mua được các cửa hàng bán dụng cụ thủy tinh phục vụ nghiên cứu khoa học đáng tin cậy. Tuy nhiên, dụng cụ này thường được tự lắp từ các dụng cụ thủy tinh thí nghiệm 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 khóa 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 khi cho qua hỗn hợp phản ứng nóng, quét 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: Hòa tan khoảng 15 g Na_2CO_3 hoặc 40 g $Na_2CO_3.10H_2O$ trong nước cất và pha tới thể tích 100 ml.

Dung dịch hydrogen peroxyd 3%: Pha 10 ml hydrogen peroxyd trung tính 30% (hóa 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:

$$\% SO_2 = \frac{(S - B) \times 0,0032 \times 100}{W}$$

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 hóa bằng HCl, kết tủa bằng $BaCl_2$, để ổn định, lọc, rửa, đốt cháy và cân tính theo $BaSO_4$.

Bảng 1. Các yêu cầu kỹ thuật về độ tinh khiết bổ sung đối với từng loại chế phẩm tinh bột biến tính bằng hóa 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_3PO_4	pH = 2,5 - 7,0
Tinh bột xử lý bằng acid	Xử lý bằng acid HCl hoặc ortho-H_3PO_4 hoặc H_2SO_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 hóa 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 thủy phân tinh bột dành cho thực phẩm	Dư lượng SO_2 không được quá 50 mg/kg
Tinh bột oxy hóa	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 hóa bằng acid ortho-H_3PO_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 hóa 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 hóa	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 hóa bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxychlorid kết hợp với ester hóa 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 hóa bằng anhydrid acetic hoặc vinyl acetat	Các nhóm acetyl không được quá 2,5%
Distarch adipat acetylat	Ester hóa 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 hóa bằng propylen oxyd	Các nhóm hydroxypropyl không được quá 7,0%; propylen chlorohydrin không được quá 1 mg/kg
Distarch phosphat hydroxypropyl	Ester hóa bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxychlorid kết hợp với ester hóa 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 hóa bằng anhydrid octenylsuccinic	Các nhóm octenylsuccinyl không được quá 3%; và dư lượng acid octenylsuccinic không được quá 0,3%
	Tinh bột oxy hóa acetylat	Xử lý bằng natri hypochlorit sau đó ester hóa bằng anhydrid acetic	Các nhóm acetyl không được quá 2,5% và các nhóm carboxyl không được quá 1,3%

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.

pH

- 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, cân 3 g hòa với 97 ml nước).

Nhóm carboxyl

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 hòa 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).

Hóa chất, thuốc thử:

Dung dịch HCl 0,1N: Không cần thiết chuẩn hóa

Dung dịch NaOH 0,1N: Được chuẩn hóa

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, đề phòng ngăn 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 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:

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

Chú ý và phòng ngừa:

Lượng mẫu không nên vượt quá 5,0 g đối với tinh bột oxy hóa trung bình hoặc nhỏ hơn 0,15 g đối với tinh bột thương mại oxy hóa 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 hóa hoặc chuyển hóa. 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 (quy đổi) nên được tiến hành sau khi xác định hàm lượng phospho của mẫu thử.

Quy 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. Ly tâm khoảng 100 ml hỗn hợp trong ống ly tâm có thành dầy 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.

Hóa chất, thuốc thử:

Dung dịch amoni molybdat 5%: Hòa 50 g amoni molybdat tetrahydrat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$, 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%: Hòa 2,5 g amoni metavanadat, NH_4VO_3, trong 600 ml nước sôi, làm nguội tới 60 - 70^{0}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%: Hòa 120 g kẽm acetat dihydrat, $Zn(C_2H_3O_2)_2$, H_2O, 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): Hòa 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 cóng 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 50^0C, 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 120^0C 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 aceton/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 hóa mẫu trên tấm gia nhiệt hoặc trên ngọn lửa gas. Đốt cháy trong lò nung ở 550^0C 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 cóng 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 30^0C, 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 kiềm 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)

$$\% \text{ các nhóm acetyl} = \frac{(B - S) \times N \times 0{,}043 \times 100}{W}$$

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 thủy tinh nhồi Porapak Q 80 - 100 mesh (hoặc tương đương) có chiều dài 2 m, đường kính trong 2 mm; detector ion hóa ngọn lửa; thực hiện với các điều kiện sau:

- Tốc độ dòng khí mang (nitrogen): 20 ml/phút
- Nhiệt độ cổng bơm mẫu: 200^0C
- Nhiệt độ cột: 50^0C
- Nhiệt độ detector: 200^0C

Chuẩn bị chuẩn: Cân chính xác 150 mg vinyl acetat (tinh khiết) cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Hòa 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 70^0C 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.

Hóa chất và dung dịch:

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

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

Dung dịch acid adipic: Hòa 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 hóa ngọn lửa và Thiết bị phân tích Model 3370A.

Các thông số cột: làm bằng thép không rỉ 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 350^0C 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 280^0C, detector 250^0C, cột 140^0C. Các thời gian lưu (phút): acid glutaric là 2,83; acid adipic là 4,5.

Hiệu chuẩn:

Cân và cho vào 4 bình Erlenmeyer dung tích 250 ml (1 g tinh bột ngô dạng sáp/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 Erlenmeyer dung tích 500 ml chứa 20 g Na_2SO_4 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 Hòa tan được lọc 2 lần bằng 50 ml ethyl acetat. Cô toàn bộ phần chiết hữu cơ và các nước rửa của mỗi bình ở nhiệt độ không quá 40^0C, 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. 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-trimethyl-silyltrifluoroacetamid 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):

$$RF = \frac{H_l \times W_s}{H_s}$$

Trong đó:

H_s và H_l: 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 Erlenmeyer 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 Erlenmeyer 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 µm, 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:

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

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 H_2SO_4 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 H_2SO_4 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 25^0C trong 100 phút. Điều chỉnh thể tích trong mỗi ống tới 25 ml bằng acid H_2SO_4 và lắc ngược các ống vài lần. (Không được lắc). Ngay lập tức chuyển các phần của các dung dịch vào các cóng 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:

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

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 hóa 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 200^0C, 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 thủy 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.

Hóa 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 µl 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 µl. 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 µg/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 thủy sôi, gia nhiệt trong 10 phút sau đó lắc xoáy bình để trộn các thành phần, và gia nhiệt trong cách thủy thêm 15 phút nữa. Làm nguội trong không khí tới nhiệt độ phòng sau đó trung hòa mẫu thủy 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 hòa tan hoàn toàn. Chuyển dung dịch này vào một phễu tách dung tích 500 ml được trang bị với khóa 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 thủy duy trì ở 50 - 55^{0}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 thủy 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^{0}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 hóa) 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 hòa tan hoàn toàn, tiến hành thủy phân, trung hòa, 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^{0}C đẳng nhiệt; nhiệt độ cổng bơm

210^0C; nhiệt độ detector 240^0C; 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 hóa các đặc tính tín hiệu. Bơm các phần 2 µl 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 phần 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 µl 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 hóa 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 sucinic trong natri octenyl sucinat 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 30^0C. Hòa 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 80^0C 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 C18 (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 30^0C. Hòa tan cặn thu được trong 2 ml methanol (Dung dịch C_1, C_2 và C_3). Cho 0,5 ml dung dịch cặn 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 CH_3CN) vào lọ phản ứng. Thêm vào 2 ml CH_3CN. Đậy nắp kín và gia nhiệt tới 80^0C 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 C_1 0,2375 µg

Đối với Dung dịch C_2 0,4750 µg

Đối với Dung dịch C_3 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.

$$\% \text{ Chất tồn dư trong tinh bột} = \frac{300 \times \text{giá trị từ đồ thị}}{\text{Khối lượng tinh bột (mg)}}$$

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.

QCVN 4 - 19: 2011/BYT

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

National technical regulation on Food Additive - Enzyme

Lời nói đầu

QCVN 4-19:2011/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 - 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 α-amylase và glucoamylase

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 có giá trị tương đương.

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư số 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

1. Tên khác, chỉ số	INS 1100
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 Glucoamylase 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
4. Chức năng	Chế phẩm enzym. 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 enzym 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 nấm) đặc trưng (Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4)
Hoạt tính glucoamylase	Phải có phản ứng thể hiện hoạt tính glucoamylase 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)

1. Tên khác, chỉ số	INS 1101(i)
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
4. Chức năng	Chế phẩm enzym. 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

1. Tên khác, chỉ số	INS 1101(ii)
2. Định nghĩa	Là các chất proteolytic được tinh chế từ quả đu đủ *Carica Papaya* (L) (Fam.*Caricaceae*)
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
4. Chức năng	Chế phẩm enzym. 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

1. Tên khác, chỉ số	INS 1101(iii)
2. Định nghĩa	Là các chất proteolytic được tinh chế từ quả dứa *Ananas comosus* và *Ananas bracteatus* (L)
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 glycin, 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
4. Chức năng	Chế phẩm enzym. 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 *Aspergillus niger* var., có kiểm soát
Hoạt chất	1. Glucose oxidase 2. Catalase
Tên và mã số hệ thống	1. ß-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. ß-D-glucose + O_2 --> D-glucono-delta-lactone + H_2O_2 2. $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
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
4. Chức năng	Chế phẩm enzym. 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.)

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

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 Candelila

1.3. Phụ lục 3: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với Shellac

1.4. Phụ lục 4: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với dầu khoáng

1.5. Phụ lục 5: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sáp vi tinh thể

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 số 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 bóng 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 bóng

Việc kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chất làm bóng 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 bóng 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 SÁP ONG

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 đậy 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 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 xoáy 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). <u>Dung dịch fuchsin được khử màu</u> 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, ròn, 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 đục.

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 hòa tan cánh kiến đỏ trong dung dịch Na_2CO_3 trong nước, sau đó tẩy màu bằng natri hypochlorit, kết tủa cánh kiến đỏ đã tẩy màu bằng dung dịch H_2SO_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	Senlac đã tẩy màu: dạng nhựa hạt vô định hình có màu trắng tới vàng nhạt; Senlac đã tẩy màu không chứa sáp: dạng nhựa hạt vô định hình có màu vàng sáng.
4. Chức năng	Chất làm bóng, chất phủ bề ngoài
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Phản ứng màu	Phải có phản ứng màu đặc trưng.
Độ tan	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 40^0C 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 hòa bằng dung dịch amoni hydroxyd 6N.

Chỉ số acid Cân chính xác 1 g mẫu nghiền mịn và hòa trong 50 ml alcol trước đó đã được trung hòa 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:

Chỉ số acid = 56,1V x 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 Hòa 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 tía 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 hòa 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 105^0C 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 350^0C; 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 hóa được chấp thuận dùng cho thực phẩm.
Mã số C.A.S	8012-95-1
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 100^0C	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 422^0C
Khối lượng phân tử trung bình	Không nhỏ hơn 500
Độ acid hoặc độ kiềm	Đạt yêu cầu.
Các chất dễ than hóa	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 hóa	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 H_2SO_4 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 đậy 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 $CuSO_4$, 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 100^0C trong 2 giờ và làm nguội trong bình hút ẩm trên acid H_2SO_4 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 hòa 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

Độ tan	Không tan trong nước, tan rất ít trong ethanol, ít tan trong diethyl ether và hexan.
Chỉ số khúc xạ	n (100, D): 1,434 - 1,448
Phổ hấp thụ hồng ngoại	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

Độ nhớt ở 100^0C	Không được nhỏ hơn 11 mm^2/giây Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
Số carbon ở điểm chưng cất 5%	Không được quá 5% các phân tử có số carbon nhỏ hơn 25 Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
Khối lượng phân tử trung bình	Không nhỏ hơn 500 Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
Cặn sau khi nung	Không được quá 0,1% Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
Màu sắc	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
Lưu huỳnh	Không được quá 0,4% Xem mô tả trong phần Phương pháp thử
Chì	Không được quá 3,0 mg/kg.
Hydrocarbon đa vòng thơm	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 100^0C (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 $\pm 0,1^0C$ 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 quy 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 ±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.

Độ nhớt ở 100^0C (mm^2/giây) = C x t

Trong đó:

C: Hệ số hiệu chỉnh nhớt kế (mm^2/giây)

t: thời gian chảy (giây)

Số carbon ở điểm chưng 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	80^0C	80^0C	80^0C
Tốc độ nâng nhiệt (^{0}/phút)	10	8	5
Nhiệt độ cuối cùng	380^0C	340^0C	350^0C
Kỹ thuật bơm	nguội trên cột	nguội trên cột	nguội trên cột
Detector	FID	FID	FID
Nhiệt độ	380^0C	340^0C	375^0C
Dung tích mẫu (µl)	1,0	1,0	1,0

Lưu ý: Bằng cách tối ưu hóa 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 parrafin 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 C_{16} - C_{65}, hòa 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

C_{16}, C_{44}, và cả C_{60} 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 - C_{16} trong n - hexan (độ tinh khiết tối thiểu 98%) bằng cách cân chính xác 0,4 g n - C_{16} cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Thêm 100 ml cyclohexan và cân lại. Ghi khối lượng n - C_{16} (W_{ISTP}) 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:

$$C_{INST} = \frac{W_{ISTD}}{Ws} \times \frac{100}{100} \text{ \% (w/w)}$$

Trong đó:

C_{ISTP}: Nồng độ của n - C_{16} 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 - C_{20} và n - C_{24} trong cyclohexan. Độ phân giải cột R không được nhỏ hơn 30 được tính toán theo công thức sau:

$$R = \frac{2d}{1.699\ (W1 + W2)}$$

Trong đó:

d: Khoảng cách giữa cực đại pic của n - C_{20} và n - C_{24} (mm)

W_1: Pic bằng một nửa chiều cao của n - C_{20} (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.

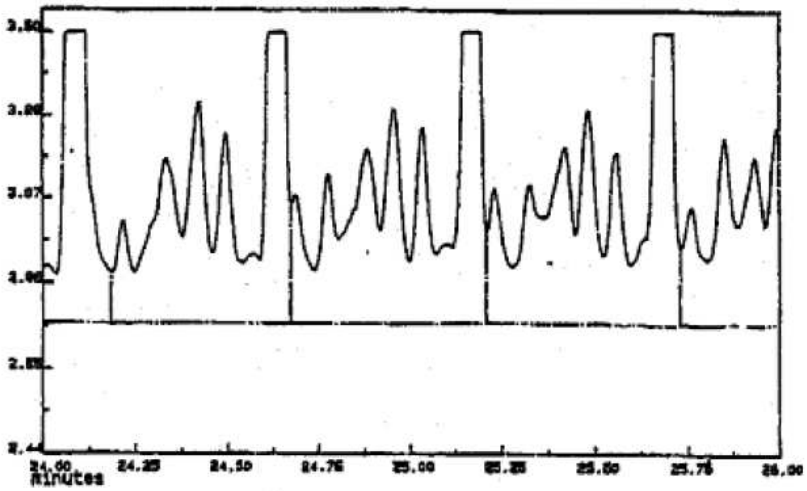
Lấy mẫu:

Gia nhiệt mẫu tại nhiệt độ cao hơn 10^0C 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 ($W_{mẫu}$) 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 hòa 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 pick nội chuẩn n - C_{16}

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

W_{INSTD}: 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:

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

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 100^0C 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:

Để mẫu trong cóng 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 Kα 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

S_1: 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

S_2: 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 khóa 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, khóa 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 đậy 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 Vigreaux 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 khóa van hoặc các khớp nối.

- Các cóng đo quang phổ: các cóng đo làm từ thạch anh nấu chảy, chiều dài đường truyền quang 5,0 ±0,005 cm; một loại cóng đo khác chỉ để kiểm tra hiệu suất của thiết bị quang phổ, có chiều dài đường truyền quang học 1,000 ± 0,005 cm. Với nước cất trong các cóng 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: ± 0,01 tại độ hấp thụ 0,4

Độ chính xác hấp thụ: ± 0,05 tại độ hấp thụ 0,4

Độ lặp lại bước sóng: ± 0,2 nm

Độ chính xác bước sóng: ± 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 hóa chất:

- Dung môi hữu cơ: Tất cả dung môi được sử dụng trong quy 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, aceton 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 Erlenmeyer 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 - hexandecan 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 bẫy dung môi và đường chân không như là cách để ngăn bất kỳ dòng ngưng nào quay ngược lại vào bình.

Hòa tan 1 ml cặn hexadecan trong isooctan và định mức tới vạch. Đo độ hấp thụ trong cóng 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 hóa (loại 12, Công ty hóa 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 thủy 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 thủy 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 cóng 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 thấm qua silica gel đã hoạt hóa 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 18^0C.

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 hóa chất" đối với chuẩn bị phễu lọc) vào trong bình Erlenmeyer hoặc bình cô tùy chọn. Rửa phễu chiết thứ nhất bằng phần chiết 40 ml isoocatan 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 đuổi hơi bằng khí nitrogen. Ngừng 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. Hòa tan 1 ml hexadecan trong isooctan vừa đủ 25 ml. Đo độ hấp thụ trong các cóng 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 ban đầu 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 hóa 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 $\pm 1^0$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 $\pm 1^0$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 cóng 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 ± 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 hóa chất" đối với chuẩn bị phễu lọc) vào trong bình Erlenmeyer (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 cóng đo có chiều dài đường truyền 5 cm so với isooctan là đối chứng tại dải bước sóng 280 -

400 nm (cẩn thận không để mất dung dịch trong quá trình đổ mẫu đầy cóng đo).

Hiệu chỉnh các giá trị độ hấp thụ đối với bất kỳ độ hấp thụ nào có nguồn gốc từ hóa 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 khóa bình hút. Nối 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

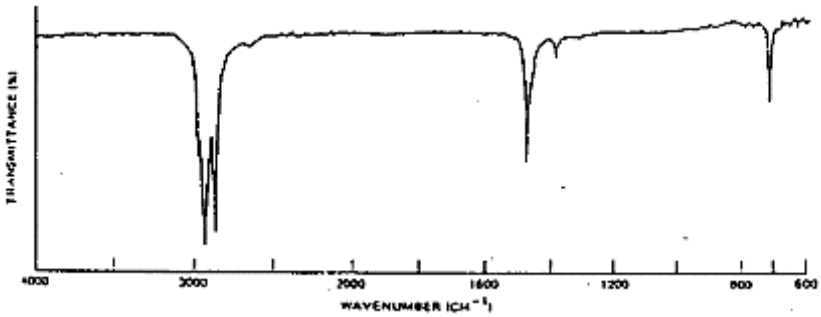
2 - 3 ml/phút. Ngưng áp lực ngay trước khi isooctan cuối cùng đạt đến mức của chất hấp phụ. (Chú ý: Không cho phép mức chất lỏng rút dưới mức hấp phụ bất cứ khi nào).

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 hóa chất" đối với chuẩn bị phễu lọc) vào trọng bình Erlenmeyer 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 cóng 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 hóa 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



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 - Thickeners

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 - Thickeners

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 celulose

1.18. Phụ lục 18: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với methyl ethyl celulose

1.19. Phụ lục 19: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với natri carboxymethyl celulose

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 có giá trị tương đương.

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư số 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

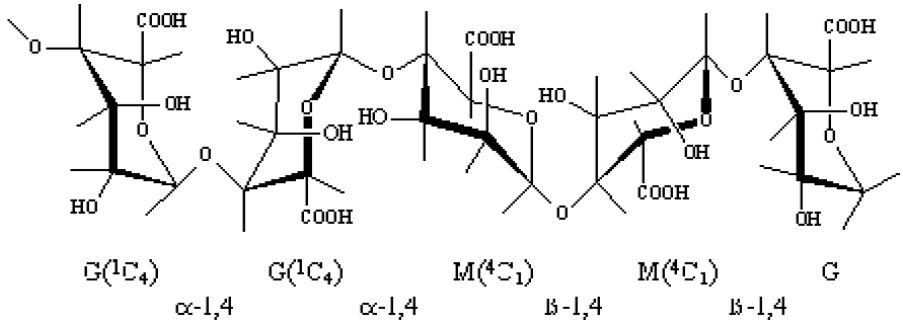
1. Tên khác, chỉ số Alginic acid
INS 400
ADI "Không giới hạn"

2. Định nghĩa Acid alginic tự nhiên thu được bằng cách thủy phân keo polysaccarid từ các loài rong biển nâu (*Phaeophyceae*). Nó là một polymer mạch thẳng gồm chủ yếu các monomer của acid β-1,4-D-mannuroric và acid a-1,4-L-glucuronic. Các monomer này thường được sắp xếp thành các khối homopolymer cách nhau bởi các vùng 2 monomer acid tuần tự xen kẽ nhau.

Chỉ số C.A.S. 9005-32-7

Công thức hóa học $(C_6H_8O_6)_n$

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: 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, gôm carob bean, methyl celllulose, 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 cắn 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

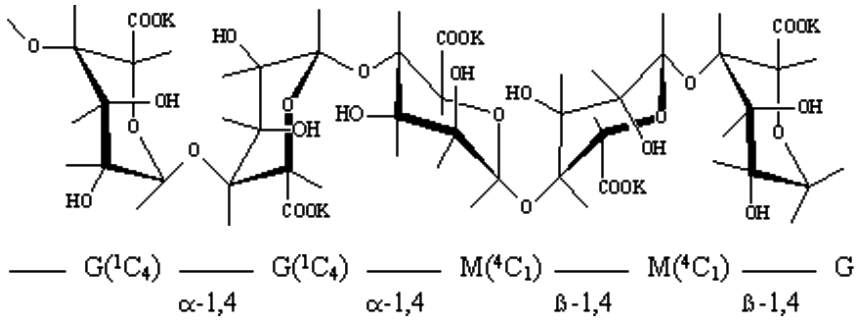
ADI "Không giới hạn"

2. Định nghĩa Muối Kali của acid alginic

Chỉ số C.A.S. 9005-36-1

Công thức hóa học $(C_6H_7KO_6)n$

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 trung.

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 tủa khối lớn dạng keo. Phép thử này phân biệt calci alginat với gôm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gôm ghatti, gôm karaya, gôm carob bean, methyl celllulo, gôm 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, gôm carob bean, methyl celllulo 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, phân tán 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 % cửa 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

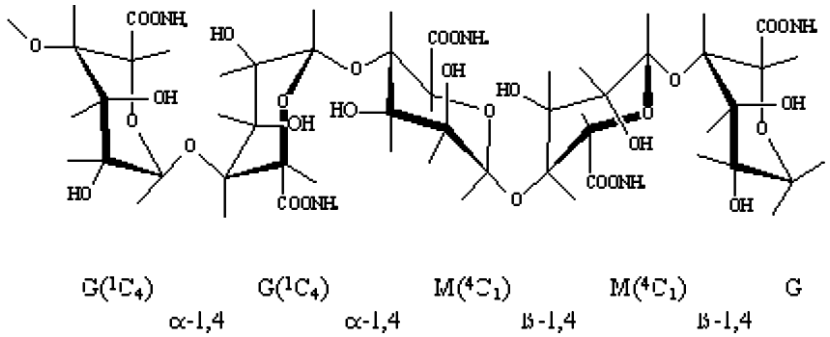
ADI "Không giới hạn"

2. Định nghĩa Muối Amoni của acid alginic

Chỉ số C.A.S. 9005-34-9

Công thức hóa học $(C_6H_{11}NO_6)_n$

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: 193,16 (lý thuyết); 217 (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 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

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.
Tro sulfat	Không được quá 7,0% tính theo chế phẩm đã làm khô.
Chì	Không được quá 2,0 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 $(C_6H_{11}NO_6)_n$	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

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 gôm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gôm ghatti, gôm karaya, gôm carob bean, methyl celllulo, gôm 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, gôm carob bean, methyl celllulo 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.

Amoni 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

1. Tên khác, chỉ số INS 404

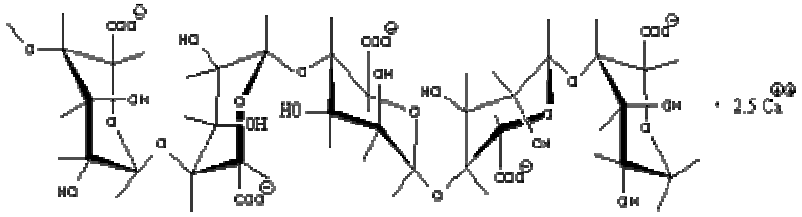
ADI "Không giới hạn"

2. Định nghĩa Muối calci của acid alginic

Chỉ số C.A.S. 9005-35-0

Công thức hóa học $(C_6H_7Ca_{1/2}O_6)_n$

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: 195,16 (lý thuyết); 219 (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

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 gôm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gôm ghatti, gôm karaya, gôm carob bean, methyl celllulo, gôm 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, gôm carob bean, methyl celllulo 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)
3. Cảm quan	Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.
4. Chức năng	Chất ổn định, chất làm dày, chất nhũ hóa.
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.
Tổng số nấm men-mốc	Không được quá 500 khuẩn lạc/g
Coliforms	Âm tính
Salmonella	Âm tính
5.4. 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

Tạo kết tủa với acid sulfuric	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.
Tạo kết tủa với chì acetat	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

Giảm khối lượng khi sấy khô	- Thử theo hướng dẫn trong *JECFA monograph 1 - Vol.4* - Sấy tại 105°C trong 4 giờ.
Chất không tan trong nước	Cân 2 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu, phân tán 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 % cửa phần không tan đã sấy khô.
Tổng propylen glycol	<u>Dịch thử:</u> 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 tủa gồm 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 tủa vài lần bằng nước cất, gộp dịch rửa vào dịch lọc và pha loãng đến cạch 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 *Rhodophyceae*. 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, magnesi, 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 hỗn 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.
4. Chức năng	Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hóa.

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 sấy 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%.
Tinh bột và dextrin	Không phát hiện được.
Gelatin và các protein khác	Không phát hiện được.
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	Ngưỡng nồng độ gel không được quá 0,25%.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo gel với nước	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.
Tạo kết tủa với dung dịch amoni sulfat	Dung dịch mẫu thử 0,5% (ấm khoảng 40°) tạo kết tủa khi thêm dung dịch amoni sulfat (ấm khoảng 40°) với thể tích bằng 1/2 thể tích dung dịch mẫu thử. Phép thử này phân biệt thạch với các alginat, gôm arabic, gôm ghatti, gôm karaya, pectin và tragacanth.
Tạo kết tủa với dung dịch chì acetat	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

Hấp thụ nước	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.
Giảm khối lượng khi làm khô	- 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).
Các tạp chất ngoại lai không tan trong nước	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 %.
Tinh bột và dextrin	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

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 fastigiata*);

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 được lấy chủ yếu từ các họ và loài của lớp tảo biển đỏ *Rhodophyceae gồm:*

Furcellariacaea như *Furcellaria*

Gigartinaceae như *Chondrus, Gigartina, Iridaea*

Hypnaeceae như *Hypnea*

Phyllophoraceae như *Phyllophora, Gynmogongrus, Ahnfeltia*

Solieriaceae như *Eucheuma, Anatheca, Meristotheca.*

Carrageenan là chất keo ưa nước gồm các thành phần chính là các ester của đường galactose và 3,6-anhydrogalactose polysaccharide với $(NH_4)_2SO_4$, $CaSO_4$, $MgSO_4$, K_2SO_4 và Na_2SO_4. Các đường hexoza này có liên kết α-1,3 và ß-1,4 trong copolymer. Tỷ lệ tương đối giữa các cation tồn tại trong carrageenan có thể thay đổi trong quá trình chế biến khi một cation chiếm phần chính.

Các polysaccarid phổ biến trong carrageenan là kappa-, iota- và lambda-carrageenan. Kappa-carrageenan thường ở dạng polymer của D-galactose-4-sulfat và 3,6- anhydro-D-galactose; iota-carrageenan cũng tương tự như vậy, ngoại trừ 3,6-anhydrogalactose được sulfat hóa ở vị trí cacbon số 2. Giữa kappa-carrageenan và iota-carrageen có một hợp phần trung gian khác nhau về mức độ sulfat hóa ở vị trí cacbon số 2. Đối với lambda-carrageenan, các đơn vị đồng phân chủ yếu là D-galactoza-2-sulfat (liên kết 1,3) và D-galactoza-2,6-disulfat (liên kết 1,4).

Carrageenan thu được từ quá trình chiết tảo biển bằng nước hoặc dung dịch kiềm loãng. Thu hồi carrageenan trong dịch chiết bằng phương pháp kết tủa cồn hoặc phương pháp kết tủa với dung dịch kali clorid và làm lạnh đông. Chỉ sử dụng

	methanol, ethanol và isopropanol để thu hồi và tinh chế. Ngoài ra, chế phẩm thương mại có thể có thể chứa đường (để chuẩn hóa), muối (để làm dày và keo hóa).
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 hóa
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong ethanol; tan trong nước ở nhiệt độ khoảng 80^0C, 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 hòa của glucose hoặc sucrose trong nước.
Sulfat	Phải có phản ứng đặc trưng của sulfat.
Galactose và anhydrogalactose	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 105^0C đến trọng lượng không đổi).
pH	8 - 11 (thể vẩn 1%)
Độ nhớt	Không được nhỏ hơn 5 cP ở 75^0C (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.
Hàm lượng tro toàn phần	Không được nhỏ hơn 15,0% và không được quá 40,0% theo trọng lượng khô
Tro không tan trong acid	Không được quá 1,0%
Chất không tan trong acid	Không được quá 2,0% Sử dụng 2 g thu được từ phần (a) của Cách tiến hành xác định sulfat
Dư lượng dung môi	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

Arsen	Không được quá 3,0 mg/kg (Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử H^+ đối với 3 g mẫu).
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
Cadmi	Không được quá 2,0 mg/kg.
Thủy ngân	Không được quá 1,0 mg/kg.
5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật	
Tổng số vi sinh vật hiếu khí	Không được quá 5.000 cfu/g
Salmonella spp.	Âm tính
E.coli	Âm tính/1 g

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Sulfat	Hòa 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.
Galactose và anhydrogalactose	Tiến hành theo chỉ dẫn dưới phần Định tính các thành phần gôm (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.
Keo ưa nước và chất đồng trùng hợp điển hình	Cho 4 g mẫu vào 200 ml nước và gia nhiệt hỗn hợp trong chậu nước ở 80^0C, khuấy với tốc độ nhất định cho đến khi hòa 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: Hòa 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 ly tâm (nếu không chuyển được vì hệ phân tán quá nhớt, pha loãng với 200 ml dung dịch KCl). Ly tâm khoảng 1.000 xg trong 15 phút. Bỏ phần trong trên bề mặt, hòa tan phần cặn thu được trong 200 ml dung dịch KCl 2,5%, ly 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 60^0C trong 2 giờ. Sản phẩm thu được là phần không gel (lambda-carrageenan).

Hòa đều phần lắng xuống (đã được giữ lại ở trên) trong 250 ml nước lạnh, gia nhiệt ở 90^0C trong 10 phút, làm nguội tới 60^0C. 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
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) Hòa 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 105^0C.

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 peroxyd 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 800^0C 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 nồi platin. Gia nhiệt mẫu bằng đèn hồng ngoại thích hợp, tăng cường độ dần dần cho đến khi mẫu hoàn toàn bị than hóa; tiếp tục gia nhiệt thêm khoảng 30 phút. Chuyển chén trên có chứa mẫu đã than hóa vào lò kín và nung ở 550^0C 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 hóa 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 80^0C (khoảng 20 - 30 phút). Cho nước thêm vào để bù vào lượng nước mất đi do bốc hơi, làm nguội tới 76 - 77^0C, gia nhiệt trong cách thủy ở nhiệt độ không đổi 75^0C. Gia nhiệt trước phao và bộ phận bảo vệ của nhớt kế Brookfield LVF hoặc LVT khoảng 75^0C 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 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.

Hỗn hợp dung dịch chuẩn:

Dùng pipet lấy 4 ml mỗi loại dung dịch alcol chuẩn và dung dịch TBA chuẩn cho vào bình Erlenmeyer 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:

Hòa 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 hóa 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 200^0C, nhiệt độ cột 165^0C và nhiệt độ detector 200^0C. 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 hóa, 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

Hóa 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. (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.

- 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 hóa đậm đặc và dẫn đến bay hơi của các khí độc. Phải thực hiện trong tủ hốt).

Cân chính xác 7,5 g mẫu thử dạng bột khô đại diện cho vào bình Erlenmeyer 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^{0}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^{0}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. 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 hóa 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 (µg 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):

$$[Pb] = F \times A/B$$

Trong đó: A là nồng độ chì trong dung dịch mẫu (µg/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 µg/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. (b) 10 µg/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. (c) 1 µg/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.

- 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 để tạo các dung dịch có nồng độ là 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 và 0,4 µg Cd/ml.

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

$$[Cd] = F \times A/B$$

Trong đó: A là nồng độ cadmi trong dung dịch mẫu (µg/ml)

B là khối lượng mẫu thử (g)

F là hệ số pha loãng (50 ml)

Thủy ngân

Nguyên tắc:

Mẫu được tro hóa, 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 hóa 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.

Hóa 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 thủy 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, hòa tan 2,5 g NaOH trong nước đã khử ion. Sau đó, thêm và hòa 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 thủy 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.

- 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 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 hóa đậm đặc và dẫn đến bay hơi của các khí độc. Phải thực hiện trong tủ hốt).

Cân chính xác 5 g mẫu thử dạng bột khô đại diện cho vào bình Erlenmeyer 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^{0}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 nhớt 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 Erlenmeyer 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 hóa chất vào các ống đong có chia vạch định mức riêng biệt. Đặt ống hút riêng biệt từ bơm pittông vào mỗi dung dịch hóa chất và bình chứa mẫu. Bắt đầu dòng của khí mang argon (áp suất đầu ra của thùng chứa: 3,2 ±0,2 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 (µg 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):

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

Trong đó: A là nồng độ thủy ngân trong dung dịch mẫu (µg/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 hóa 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

1. Tên khác, chỉ số	Locust bean gôm, carob gôm INS 410
2. Định nghĩa	Xuất xứ là nội nhũ được nghiền của các hạt từ *Ceratonia siliqua* (L) Taub. (Fam. *leguminosae*) chủ yếu bao gồm khối lượng phân tử cao (khoảng 50.000 - 3.000.000) các poly-saccharid 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 Hòa trong nước sôi, sau đó lọc, làm bốc hơi dung môi và sấy khô.
Mã số C.A.S.	9000-40-2
3. Cảm quan	Dạng bột màu trắng đến màu trắng hơi vàng, gần như không có mùi
4. Chức năng	Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hóa

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 gôm	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 105^0C trong 5 giờ).
Tro tổng số	Không được quá 1,2% (nhiệt độ sấy 800^0C 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 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. Có sự tăng độ nhớt đáng kể (đây là sự khác biệt giữa gôm đậu carob với gôm Guar).
Thành phần gôm	Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định tính thành gôm (Vol. 4) sử dụng 100 mg mẫu thay thế cho 200 mg và 1 - 10 µl hydrolysat 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:

Hòa 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 hòa 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 khóa 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 hóa ngọn lửa
- Nhiệt độ: cổng bơm 250^0C, cột 150^0C 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 hòa tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hòa 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^{0}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^{0}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 gôm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gôm trong suốt quá trình thêm gôm 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^{0}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 gôm 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 vẩn 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 vẩn 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 35^0C. Kiểm tra các đĩa đối với các khuẩn lạc điển hình của *E.coli* tức là hướng tâm màu thẫm 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 hóa sinh và hình thái học. Ủ thạch nghiêng PCA trong 18 - 24 giờ ở 35 $\pm 1^o$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 hóa sinh sau đây:

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

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

b) Hợp chất phản ứng Voges-Proskauer: Cấy vào một ống canh trường MR-VP và ủ trong 48 giờ ở 35^0C. Chuyển 1ml vào 1 ống cỡ 13 x 100 mm. Thêm 0,6ml 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 35^0C. 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 vào một ống canh trường Koser citrat; tránh làm đục. Ủ ở 35^0C 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 35^0C 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 35^0C, (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 gôm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gôm trong suốt quá trình thêm gôm 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^{0}C trong 2 tuần). Bổ sung 25 g mẫu gôm vào cốc vô trùng dung tích 250 ml hoặc dụng cụ chứa khác thích hợp. Cho vào 1 lọp 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. Đậy nắp dụng cụ chứa chắc chắn và để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng. Nới lỏng nắp đậy và ủ dụng cụ 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 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 ria 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^{0}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^{0}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 121^0C trong 15 phút. Làm nguội môi trường đến khoảng 50^0C 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 *Cyamopsis tetragonolobus* (L) Taub. (Fam. *Leguminosae*) 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 hòa trong nước sôi, sau đó lọc, cô và sấy khô.
Mã số C.A.S.	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 hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Tạo gel	Thêm lượng nhỏ dung dịch natri borat TS vào dung dịch mẫu được làm phân tán bằng nước; gel được hình thành.
Độ nhớt	Phải có phản ứng đặc trưng của độ nhớt.
Thành phần gôm	Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần gôm.
Kiểm tra hiển vi	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

Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 15,0% (nhiệt độ sấy 105^0C trong 5 giờ).
Borat	Không phát hiện được.
Tro toàn phần	Không được quá 1,5%
Chất không tan trong acid	Không được quá 7,0%
Protein	Không được quá 10,0%.

Ethanol và isopropanol	Không được quá 1%, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả trong 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

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 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).
Thành phần gôm	Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định tính thành phần gôm (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	Hòa 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 nghệ. Không được tạo thành đỏ 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	<u>Nguyên tắc:</u> Các alcol được chuyển thành các ester nitrit tương ứng và được xác định bằng sắc ký khí (Xem quyển 4).

Chuẩn bị mẫu:

Hòa 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 hòa 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 khóa 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 hóa ngọn lửa
- Nhiệt độ: cổng bơm 250^0C, cột 150^0C 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 hòa tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hòa 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^{0}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 gôm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gôm trong suốt quá trình thêm gôm 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^{0}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 gôm 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 vẩn 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 vẩn 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 35^0C. 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 hóa sinh và hình thái học. Ủ thạch nghiêng PCA trong 18 - 24 giờ ở 35 ±1^oC, sau đó nhuộm màu Gram chủng đã cấy. Nếu chủng cấy Gram âm (dạng hình que ngắn) thực hiện một trong hai sơ đồ thử hóa sinh sau đây:

Sơ đồ 1.1. Thử hoạt tính hóa sinh IMViC:

a) Tạo indol: Cấy vào một ống canh trường trypton và ủ trong 24 giờ ở 35^0C. Thử idol 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 35^0C. 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 35^0C. 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 35^0C 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 35^0C 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 35^0C, (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 gôm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gôm trong suốt quá trình thêm gôm 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^{0}C trong 2 tuần). Bổ sung 25 g mẫu gôm 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 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^{0}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 thẳng đứng trong 5 ngày ở 25^{0}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 121^0C trong 15 phút. Làm nguội môi trường đến khoảng 50^0C 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

1. Tên khác, chỉ số INS 413

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 (galactoarban 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 hóa 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.

4. Chức năng Chất nhũ hóa, chất ổn định, chất làm dày

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 kẽm clorid có chứa iod.

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

Thành phần gôm Định tính arabinose, xylose, fucose, galactose và acid galacturonic bằng cách sau: Tiến hành như hướng dẫn ở phần

	"Định tính thành phần gôm" 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 105^0C 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 xốp 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 110^0C 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 đậy 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.
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 11
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM ARABIC

1. Tên khác, chỉ số

Gôm arabic *(Acacia senegal)*, gôm arabic *(Acacia seyal)*, Acacia gum, arabic gum,
INS 414

2. Định nghĩa

Thu được từ việc sấy khô dịch tiết ra của thân và cành cây *Acacia senegal* (L) Willdenow hoặc *Acacia seyal* (fam. *Leguminosae*).

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 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 *(Acacia senegal)* 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 *(Acacia seyal)* giòn hơn gôm arabic *(Acacia senegal)* 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.

4. Chức năng

Chất nhũ hóa, chất ổn định, chất làm dày

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan 1 g hòa tan trong 2 ml nước; không tan trong ethanol

Thành phần gôm Tiến hành như hướng dẫn ở phần "Định tính thành phần gôm" (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 *A.senegal:* dung dịch tan trong nước quay trái Gôm từ *A.seyal:* 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	
Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 15% (nhiệt độ sấy 105^0C trong 5 giờ) đối với dạng hạt và không được quá 10% (nhiệt độ sấy 105^0C 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.
Tro toàn phần	Không vượt quá 4,0%
Tro không tan trong acid	Không được quá 0,5%
Chất không tan trong acid	Không được quá 1,0%
Tinh bột hoặc dextrin	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Gôm có tanin	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 đối với mẫu thử
E. coli	Âm tính trong 1 g mẫu thử

6. Phương pháp thử

Tinh bột hoặc dextrin	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.
Gôm có tanin	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.
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.

(Xem tiếp Công báo số 539 + 540)

VĂN PHÒNG CHÍNH PHỦ XUẤT BẢN

Địa chỉ: Số 1, Hoàng Hoa Thám, Ba Đình, Hà Nội
Điện thoại: 080.44946 – 080.44417
Fax: 080.44517
Email: congbao@chinhphu.vn
Website: http://congbao.chinhphu.vn
In tại: Xí nghiệp Bản đồ 1 - Bộ Quốc phòng

Giá: 10.000 đồng