PHẦN VĂN BẢN QUY PHẠM PHÁP LUẬT

BỘ Y TẾ

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

(Ban hành kèm theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 ban hành các Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với phụ gia thực phẩm)

(Tiếp theo Công báo số 537 + 538)

Phụ lục 12

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

1. Tên khác, chỉ số	INS 415
2. Định nghĩa	Gôm xanthan là polysaccharid có khối lượng phân tử cao được sản xuất bởi quá trình lên men cacbonhydrat với chủng vi khuẩn thuần khiết *Xanthomonas campestris*, làm sạch bằng cách thu hồi với ethanol hoặc isopropanol, sấy khô và nghiền; có chứa D - glucose và D - mannose là các đơn vị hexose chiếm ưu thế, cùng với acid D - glucuronic và acid pyruvic, và được xử lý như muối Na, K hoặc Ca; các dung dịch của gôm xanthan trung tính.
Mã số C.A.S.	11138-66-2
3. Cảm quan	Dạng bột màu kem.
4. Chức năng	Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hóa, chất tạo bọt

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Tan trong nước; không tan trong ethanol
Tạo gel	Phải có phản ứng tạo gel đặc trưng.

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 15% (nhiệt độ sấy 105^0C trong 2,5 giờ).

Tro toàn phần	Không được quá 16% sau khi sấy
Acid pyruvic	Không được nhỏ hơn 1,5%
	Xem mô tả trong phần Phương pháp thử - Định tính
Nitrogen	Không được quá 1,5%
	Tiến hành theo phương pháp Kjeldahl
Ethanol và isopropanol	Không được quá 500 mg/kg, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất
	Xác định theo mô tả ở phần Phương pháp thử - Định tính
Chì	Không được quá 2 mg/kg.
	Xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử phù hợp với từng mức độ. Lựa chọn lượng mẫu và phương pháp xử lý mẫu dựa vào các nguyên tắc của phương pháp được mô tả trong Quyển 4, "Các phương pháp công cụ"
5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật	
Tổng số vi sinh vật	Không được quá 5.000 CFU/g
E.coli	Âm tính đối với mẫu thử
Salmonella	Âm tính đối với mẫu thử
Nấm men và nấm mốc	Không được quá 500 CFU/g
	Xem mô tả dưới phần Phương pháp thử - Định tính
5.4. Hàm lượng	Hàm lượng tính theo chế phẩm khô, không được nhỏ hơn 4,2% và không được quá 5,4% CO_2, tương ứng với 91,0% - 117,0% gôm xanthan.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo gel Cho 300 ml nước trước đó đã được đun tới 80^0C vào cốc dung tích 400 ml và khuấy nhanh bằng máy khuấy, ở tại thời điểm tốc độ khuấy đạt cực đại cho hỗn hợp khô gồm 1,5 g mẫu và 1,5 g gôm đậu carob. Khuấy cho đến khi hỗn hợp chuyển thành dạng dung dịch và sau đó tiếp tục khuấy trong 30 phút nữa. Không được để nhiệt độ nước giảm xuống dưới 60^0C trong quá trình khuấy. Ngừng khuấy và để hỗn hợp nguội tới nhiệt độ phòng trong ít nhất 2 giờ. Một khối gel dai chắc được hình thành sau khi nhiệt độ giảm xuống dưới 40^0C, tuy nhiên không có gel như vậy hình thành trong dung dịch đối chứng 1% mẫu được chuẩn bị theo cách tương tự nhưng không có gôm đậu carob.

6.2. Độ tinh khiết

Acid pyruvic

Chuẩn bị mẫu:

Cân 600 mg mẫu chính xác đến 0,1 mg và hòa tan với lượng nước đủ đến 100 ml. Chuyển 10 ml dung dịch vào 1 bình thủy tinh có nút mài dung tích 50 ml. Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch HCl N cho vào bình, cân bình và gia nhiệt để đun sôi với sinh hàn ngược trong 3 giờ, chú ý để ngăn tổn thất do bay hơi. Làm nguội tới nhiệt độ phòng và thêm nước cho bù lượng bị tổn thất trong quá trình đun. Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch 2,4-dinitrophenylhydrazin 0,5% trong acid HCl 2N cho vào phễu tách dung tích 30 ml, sau đó thêm 2 ml dung dịch mẫu, khuấy đều và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Chiết hỗn hợp bằng 5 ml ethyl acetat và loại bỏ lớp nước. Chiết hydrazon từ ethyl acetat bằng ba phần 5 ml dung dịch Na_2CO_3 TS, lấy phần chiết được cho vào bình định mức dung tích 50 ml. Pha tới thể tích 50 ml bằng dung dịch Na_2CO_3 TS và lắc đều.

Chuẩn bị chuẩn:

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

Cách tiến hành:

Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch với máy quang phổ trong các cóng đo 1 cm ở bước sóng có hấp thụ cực đại 375 nm, sử dụng Na_2CO_3 TS cho mẫu trắng. Độ hấp thụ của "Dung dịch mẫu" bằng hoặc lớn độ hấp thụ của "Dung dịch chuẩn".

Ethanol và isopropanol

Nguyên tắc:

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

Chuẩn bị mẫu:

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 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 pha trong nước (250 g/l). Lắc mạnh cho đến khi T = 70 giây và ở T = 150 giây hút qua đệm cao su silicon 1 ml từ không gian hơi sử dụng syringe khóa áp (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, Louisiana, USA, hoặc tương đương).

Sắc ký khí:

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

Sử dụng các điều kiện sau:

- Cột: 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 tương ứng thu được từ sắc đồ không gian hơi được hình thành do thay thế 1 ml dung dịch chuẩn alcol cho 1 ml dung dịch mẫu trong cách tiến hành nêu ở trên.

Chì

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

6.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy

để hòa tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hòa tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch trên cho vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ vào mỗi đĩa petri 12 - 15 ml thạch PCA trước đó được làm nguội đến 44 - 46^{0}C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông lại. Lật ngược các đĩa và ủ trong 48 ±2 giờ ở 35 ±1 ^{o}C.

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

E.coli

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

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

Các môi trường nuôi cấy

Canh trường GN (Canh trường Gram âm)

Pepton 20 g

Dextrose 1,0 g

Mannitol 2,0 g

Natri citrat 5,0 g

Natri deoxycholat 0,5 g

Dikali phosphat (hai bazơ) 4,0 g

Monokali phosphat (một bazơ) 1,5 g

Natri chlorid 5,0 g

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

Salmonella

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

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

Nấm men và nấm mốc

Sử dụng kỹ thuật vô trùng, phân tán 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hòa tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hòa tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch cho vào các đĩa petri tách biệt, cặp đôi, đánh dấu tương ứng. Đổ lên dịch mẫu trong mỗi đĩa petri 15 - 20 ml Potato dextrose agar (hoặc đã acid hóa hoặc chứa chất kháng sinh) trước đó đã duy trì ở 44 - 46^0C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều và di chuyển trước sau các đĩa, để cho agar đông lại. Lật ngược các đĩa và ủ trong 5 ngày ở 20 - 25°C.

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

6.4. Định lượng

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

Phụ lục 13
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM KARAYA

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

arabinose, galactose, mannose, rhamnose, xylose, acid glucuronic và acid galacturonic làm chuẩn đối chiếu.

Phải phát hiện rhamnose, galactose, acid glucuronic và acid galacturonic.

Không được có mannose, arabinose, xylose.

5.2. Độ tinh khiết

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

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Salmonella spp.	Âm tính trong 1g mẫu
E.coli	Không được có trong 1g mẫu

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo kết tủa Lắc 1g mẫu thử với 80ml nước trong 24 giờ. Đun sôi 4ml dịch nhầy thu được với 0,5ml acid hydrocloric đặc, thêm 1ml dung dịch natri hydroxyd 5M, lọc. Lấy dịch lọc, thêm 3ml dung dịch kali đồng tartrat, đun nóng. Phải xuất hiện kết tủa đỏ.

Phản ứng màu Đun 1g mẫu thử với 20ml nước đến khi tạo nhầy, thêm 5ml acid hydrocloric, tiếp tục đun hỗn hợp trong 5 phút, phải xuất hiện màu đỏ hoặc hồng bền.

Làm ấm 0,5g mẫu thử với 2ml natri hydroxyd 5M, phải xuất hiện màu nâu.

6.2. Độ tinh khiết

Tro không tan trong acid Cân 3g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu thử trong một chén nung đã cân bì. Nung tại nhiệt độ thấp (khoảng 550°), không được nung quá lửa, đến khi tro hóa hoàn toàn, để nguội trong bình hút ẩm và cân. Nếu tro chưa sạch carbon, tẩm ướt tro, lọc lấy phần không tan trên giấy lọc không tro, cho cả giấy lọc và cặn vào

chén nung, nung đến khi thu được tro trắng hoặc gần trắng. Gộp tro với phần dịch lọc và cho bay hơi đến khô rồi nung đến độ đỏ thẫm. Nếu tro vẫn không sạch carbon, để nguội chén nung, thêm 15ml ethanol, dùng đũa thủy tinh phá vỡ khối tro, đốt hết ethanol và lại nung đến độ đỏ thẫm, sau đó để nguội. Đun sôi tro thu được với 25ml acid hydrocloric loãng (TS) trong 5 phút. Lọc lấy phần không tan trên phễu Gooch đã cân bì hoặc giấy lọc không tro, rửa cặn bằng nước nóng, nung, để nguội và cân. Tính hàm lượng % tro không tan trong acid theo khối lượng mẫu đã cân.

Chất không tan trong acid — Cân 5g mẫu (chính xác đến 0,1mg) cho vào bình nón hoặc cốc thủy tinh 250ml đã chứa sẵn 100ml acid hydrocloric 5% (kl/tt). Đậy cốc bằng mặt kính đồng hồ hoặc gắn bình nón với sinh hàn hồi lưu. Đun nhẹ cho đến khi gôm tan hoàn toàn (khoảng 3 giờ). Lọc dung dịch qua 1phễu lọc thủy tinh xốp cỡ lỗ 10-20µm. Rửa cặn vài lần bằng nước nóng đến khi dịch rửa không còn acid (thử bằng giấy pH). Sấy khô phễu đến khối lượng không đổi ở 105°, để nguội về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm và cân. Tính hàm lượng %.

Acid bay hơi — Cân 1g mẫu cho vào bình thủy tinh 700ml cổ dài, thêm 100ml nước và 5ml acid orthophosphoric, để yên trong vài giờ hoặc đến khi gôm trương nở hoàn toàn. Đun hồi lưu nhẹ trong 2 giờ; Cất lôi cuốn hơi nước lấy khoảng 800ml dịch cất, phần acid còn lại khoảng 20ml, chuẩn độ dịch cất thu được bằng natri hydroxyd 0,1M dùng chỉ thị là dung dịch phenolphtalein (TS). Tiến hành làm song song một mẫu trắng không có gôm. Sự chênh lệch giữa 2 lần chuẩn độ biểu thị lượng kiềm cần thiết để trung hòa acid bay hơi.

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

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

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

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

Phụ lục 14
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM TARA

1. Tên khác, chỉ số	Peruvian carob INS 417 ADI "Không giới hạn"
2. Định nghĩa	Thu được bằng cách nghiền mịn phần nội nhũ của hạt cây *Caesalpinia spinosa* (Họ *Leguminosae*); gồm chủ yếu là các polysaccarid phân tử lượng lớn cấu tạo chủ yếu từ galactomannans. Thành phần chính gồm chuỗi mạch thẳng các tiểu phân (1,4)-beta-D-mannopyranose gắn với các tiểu phân alpha-D-galacto-pyranose theo các liên kết 1-6; Tỷ số mannose/galactose trong gôm tara là 3:1. (Trong gôm đậu carob tỷ số này là 4:1 và trong gôm guar là 2:1). Chế phẩm thương mại còn được phân loại thêm qua độ nhớt và giảm khối lượng khi làm khô.
3. Mô tả	Bột trắng hoặc gần như trắng, gần như không mùi.
4. Chức năng	Chất làm dày, chất ổn định.
5. Tính chất	
5.1. Định tính	
Độ tan	Tan trong nước, không tan trong ethanol.
Tạo gel	Phải có phản ứng tạo gel đặc trưng.
Độ nhớt	Phải có phản ứng đặc trưng của độ nhớt.
Các thành phần của gôm	Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần gôm.
Kiểm tra cấu trúc hiển vi	Phải có phản ứng đặc trưng khi kiểm tra cấu trúc hiển vi.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi làm khô	Không được quá 15%.
Tro toàn phần	Không được quá 1,5%.
Tro không tan trong acid	Không được quá 2,0%.
Protein	Không được quá 3,5%.
Tinh bột	Không phát hiện được.
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

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

6.2. Độ tinh khiết

Protein	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận Xác định nitrogen (phương pháp Kjeldahl). - Hàm lượng % của nitrogen xác định được nhân với 5,7 để thu được hàm lượng % protein trong mẫu thử.
Tinh bột	Thêm vào dung dịch mẫu thử (1/10) vài giọt dung dịch iod (TS) . Dung dịch không được xuất hiện màu xanh lam.
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 15
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM GELLAN

1. Tên khác, chỉ số	INS 418
2. Định nghĩa	Gôm gellan là gôm polysaccharid có khối lượng phân tử cao được sản xuất bởi quá trình lên men chủng vi khuẩn thuần khiết *Pseudomonas elodea* trong môi trường carbohydrat, làm sạch bằng cách thu hồi isopropyl alcol, sấy khô và nghiền; Polysaccharid có khối lượng phân tử cao chủ yếu gồm một tetrasaccharid lặp đi lặp lại của một đơn vị rhamnose, một acid glucuronic, và hai đơn vị glucose, và được thay thế bằng các nhóm acyl (Glyceryl và acetyl) như các ester liên kết O-glycosidic. Acid glucuronic được trung hòa thành muối hỗn hợp của K, Na, Ca và Mg. Gôm gellan thường chứa một lượng nhỏ nitrogen có trong các hợp chất thu được từ quá trình lên men.
Mã số C.A.S.	71010-52-1
Khối lượng phân tử	Khoảng 500.000
3. Cảm quan	Dạng bột màu trắng nhạt
4. Chức năng	Chất làm dày, chất tạo gel, chất ổn định
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Tan trong nước, tạo thành dung dịch nhớt; không tan trong ethanol
Tạo gel với ion calci	Phải có phản ứng tạo gel với ion calci đặc trưng.
Tạo gel với ion natri	Phải có phản ứng tạo gel với ion natri đặc trưng.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 15,0% (nhiệt độ sấy 105^0C trong 2,5 giờ).
Nitrogen	Không được quá 3,0%
Isopropyl alcol	Không được quá 750,0 mg/kg (mô tả ở phần Phương pháp thử)
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật	
Tổng số vi sinh vật	Không được quá 10.000 khuẩn lạc/g

E. coli	Âm tính đối với mẫu thử
Salmonella	Âm tính đối với mẫu thử
Nấm men và nấm mốc	Không được quá 400 khuẩn lạc/g
5.4. Hàm lượng	Không được nhỏ hơn 3,3% và không được quá 6,8% CO_2 tính theo chế phẩm khô.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo gel với ion calci	Cho 1,0 g mẫu vào 99 ml nước và khuấy trong 2 giờ, sử dụng máy khuấy có cánh khuấy kiểu chân vịt. Dùng pipet lấy một lượng nhỏ dung dịch này cho vào dung dịch $CaCl_2$ 10%. Gel dạng sợi dai được hình thành ngay lập tức.
Tạo gel với ion natri	Cho 1,0 g mẫu vào 99 ml nước và khuấy trong 2 giờ, sử dụng máy khuấy có cánh khuấy kiểu chân vịt. Thêm 0,5 g NaCl, gia nhiệt đến 80^0C đồng thời khuấy, và giữ ở 80^0C trong 1 phút. Để dung dịch nguội đến nhiệt độ phòng. Gel cứng chắc được hình thành.

6.2. Độ tinh khiết

Isopropyl alcol

<u>Dung dịch chuẩn isopropyl alcol (IPA):</u>

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

<u>Dung dịch chuẩn tert - butyl alcol (TBA):</u>

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

<u>Dung dịch hỗn hợp chuẩn:</u>

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

Chuẩn bị mẫu:

Cho 1 ml nhũ tương chống tạo bọt thích hợp như Dow-Corning G-10 hoặc loại tương đương vào 200 ml nước được đựng trong bình chưng cất đáy tròn dung tích 1.000 ml. Thêm vào

5 g mẫu và lắc bình trong 1 giờ trên máy lắc có xoáy. Nối bình với cột phân đoạn và cất khoảng 100 ml; điều chỉnh nhiệt để bọt không trào vào cột. Thêm 4,0 ml dung dịch chuẩn TBA vào dịch cất để có được Dung dịch mẫu thử.

Cách tiến hành:

Bơm 5 µl dung dịch hỗn hợp chuẩn vào thiết bị sắc ký khí được trang bị detector ion hóa ngọn lửa và cột được làm bằng thép không rỉ, kích thước 1,8 m x 2,3 mm, được nhồi Porapak QS 80/100 mesh hoặc loại tương đương. Khí mang là He với tốc độ dòng 80 ml/phút. Nhiệt độ buồng bơm mẫu 200^0C, nhiệt độ cột 165^0C và nhiệt độ detector 200^0C. Thời gian lưu của isopropyl alcol khoảng 2 phút, và của tert - butyl alcol khoảng 3 phút.

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

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

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

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

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

Chì

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

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

6.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để 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 lên dịch mẫu trong mỗi đĩa petri 12 - 15 ml agar trước đó được làm nguội đến 44 - 46^0C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông lại. Lật ngược các đĩa và ủ trong 48 ±2 giờ ở 35 ±1 ^{o}C.

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

E.coli

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

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

<u>Các môi trường</u>

Canh trường GN (Canh trường Gram âm)

Pepton 20 g

Dextrose 1,0 g

Mannitol 2,0 g

Natri citrat 5,0 g

Natri deoxycholat 0,5 g

Dikali phosphat 4,0 g

Monokali phosphat 1,5 g

Natri chlorid 5,0 g

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

Salmonella

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

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

Nấm men và nấm mốc

Sử dụng kỹ thuật vô trùng, phân tán 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy cho đến khi tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hòa tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri tách biệt, cặp đôi, đánh dấu tương ứng. Đổ lên dịch mẫu trong mỗi đĩa petri 15 - 20 ml Potato dextrose agar (hoặc đã acid hóa hoặc chứa chất kháng sinh) trước đó đã khống chế đến 44 - 46^{0}C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông đặc. Lật ngược các đĩa và ủ trong 5 ngày ở 20 - 25^{0}C.

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

6.4. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong phần thử đối với Xác định CO_2 bằng cách khử carboxyl trong "Các phương pháp chung", (Vol. 4), sử dụng chính xác 1,2 g mẫu.

Phụ lục 16
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI PECTIN

1. Tên khác, chỉ số	INS 440
2. Định nghĩa	Pectin bao gồm chủ yếu là các ester của acid polygalacturonic đã được methyl hóa một phần và các muối natri, kali, calci, amoni của chúng; Pectin thu nhận được từ quá trình chiết các loại nguyên liệu thực vật ăn được với nước, thường là táo hay quả có múi (citrus); chỉ có methanol, ethanol và isopropanol được sử dụng làm chất kiềm tủa, trong một số trường hợp một phần của các ester methyl có thể chuyển thành các dạng amid bậc 1 khi xử lý bằng amoniac trong môi trường kiềm. SO_2 có thể thêm vào làm chất bảo quản. Sản phẩm pectin thương mại thường được pha loãng với đường nhằm mục đích chuẩn hóa. Ngoài các loại đường, pectin có thể được trộn với các loại muối dùng cho thực phẩm khi cần nhằm kiểm soát pH và tạo ra các đặc tính mong muốn. Thông tin thương mại của sản phẩm được chỉ rõ giá trị pH, mức độ tạo gel, độ nhớt, mức độ ester hóa và các đặc trưng kỹ thuật.
Mã số C.A.S.	9000-69-5
3. Cảm quan	Dạng bột màu trắng, hơi vàng, hơi xám hoặc hơi nâu
4. Chức năng	Chất tạo gel, chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hóa
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Tan trong nước, không tan trong methanol, ethanol và isopropanol
Pectin	Phải có phản ứng đặc trưng của pectin.
Nhóm amid	Chỉ áp dụng đối với các pectin đã được amid hóa (mô tả ở phần Phương pháp thử)
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 12,0 % (sấy ở 105^0C trong 2 giờ)
SO_2	Không được quá 50 mg/kg.
Dư lượng dung môi	Không vượt quá 1% methanol, ethanol và 2-propanol ở dạng đơn chất hoặc hợp chất
Tro không tan trong acid	Không vượt quá 1,0%

Tổng số chất không tan	Không quá 3,0%.
Nitrogen	Không vượt quá 2,5% sau khi rửa bằng acid và ethanol
Acid galacturonic	Không được nhỏ hơn 65,0% tính theo chế phẩm khô và không có tro.
Mức độ amin hóa	Không vượt quá 25,0% tổng số các nhóm carboxyl của pectin.
Chì	Không được quá 5,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Pectin

Làm ẩm 0,05 g mẫu bằng 2 - propanol. Bổ sung 50 ml nước và khuấy bằng thiết bị khuấy từ. Điều chỉnh pH đến 12 bằng dung dịch NaOH 0,5 mol/l và để yên dung dịch trong thời gian 15 phút. Làm giảm pH xuống 7 bằng acid HCl 0,5 mol/l. Bổ sung nước cất cho đến thể tích 100 ml. Cho các mẫu vào các cuvet thạch anh 1cm như sau:

	Dung dịch đệm pH = 7,0 *)	Dung dịch mẫu thử	Nước	Dung dịch enzym **)
Không có enzym	0,5 ml	1,0 ml	1,0 ml	-
Không có mẫu thử	0,5 ml	-	1,5ml	0,5 ml
Mẫu thử	0,5 ml	1,0 ml	0,5ml	0,5 ml

*) Hòa tan 6,055 g tris (hydroxymethyl) aminomethane (ví dụ: TRIZMA Base, Sigma) và 0,147 g $CaCl_2.2H_2O$ trong 1 lít nước. Điều chỉnh pH đến 7,0 bằng acid HCl 1 mol/l.

**) Pha loãng enzym tinh khiết pectate lyase theo tỷ lệ 1: 100 bằng dung dịch đệm có pH = 7.

Lắc đều các dung dịch và đo độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm tại thời điểm 0 và 10 phút.

Kết quả:

A_0 = độ hấp thụ ở 0 phút = Mẫu thử - (Không có enzym + Không có mẫu thử)

A_{10} = độ hấp thụ ở 10 phút = Mẫu thử - (Không có enzym + Không có mẫu thử)

Lượng sản phẩm không bão hòa sinh ra tương ứng với thay đổi độ hấp thụ (A_{10} - A_0). Giá trị này phải lớn hơn 0,023. Điều này phân biệt pectin so với các loại gôm khác, thể hiện sự không thay đổi về độ hấp thụ.

Nhóm amid

Cho 2 ml acid HCl đậm đặc và 50 ml ethanol 60% vào 0,5 g mẫu, khuấy đều trong 20 phút. Sau đó chuyển vào ống lọc thủy tinh xốp rửa 6 lần mỗi lần 10 ml hỗn hợp HCl-ethanol 60%. hòa tan trong 100 ml nước cất; cho thêm một vài giọt NaOH 0,1 mol/l để thu được dung dịch. Chuyển 4 ml của dung dịch này vào ống nghiệm (có đường kính trong 15,5 mm và chiều dài 146 mm). Thêm 1 ml dung dịch NaOH 5 mol/l và lắc đều. Hỗn hợp sẽ tạo thành dạng gel. Làm đầy ống thủy tinh nhỏ (có đường kính trong 7,8 mm và chiều dài 79 mm) bằng 2,5 ml acid boric TS và để vào bên trong ống nghiệm. Bao kín bằng parafilm và ủ qua đêm ở nhiệt độ 30^0C. Trong trường hợp có mặt của các nhóm amid chất chỉ thị chuyển từ màu đỏ sang màu xanh lá cây vì đã giải phóng ra khí amoniac.

6.2. Độ tinh khiết

SO_2

Trộn 100 g mẫu vào 500 ml methanol trong bình tam giác đáy tròn dung tích 1.000 ml có ống hút khí và nối cổ bình với sinh hàn ngược. Chuẩn bị một khớp nối thủy tinh kết nối từ sinh hàn tới bình thu hoặc ống chữ U chứa 10 ml dung dịch hydrogen peroxyd 3% được trung hòa nhờ có dung dịch đỏ methyl TS. Nối ống hút khí với nguồn carbon dioxyd hoặc nitrogen không có oxygen, duy trì dòng khí nhằm tạo ra bọt khí đều đều. Ngay sau bộ dụng cụ đã đuổi hết không khí, đổ 30 ml dung dịch acid HCl (10 ml dung dịch acid HCl đậm đặc pha trong 20 ml nước) vào sinh hàn ngược, và ngay lập tức nối bình thu hoặc ống chữ U. Gia nhiệt từ từ cho đến khi methanol bắt đầu chảy ngược và đun để methanol chảy ngược từ từ trong 2 giờ. Tháo bộ dụng cụ ra, cho dung dịch đỏ methyl vào và chuẩn độ hydrogen peroxyd bằng dung dịch NaOH 0,01 mol/l. Mỗi ml dung dịch NaOH 0,01 mol/l tương ứng với 0,32 mg SO_2.

Dư lượng dung môi

Áp dụng Phương pháp I trong Quyển 4, Phương pháp chung, các thành phần hữu cơ

Dung dịch gốc chuẩn: Cân 5 g mỗi loại methanol, ethanol và 2 -propanol cho vào 500 ml nước trong bình định mức dung tích 1.000 ml. Định mức đến thể tích 1.000 ml bằng nước.

Dung dịch nội chuẩn: Cân chính xác 5 g 2 - butanol ($W_{chuẩn}$) cho vào 500 ml nước trong bình định mức dung tích 1.000 ml và định mức tới 1.000 ml bằng nước.

Dung dịch trắng: Không định lượng mẫu trắng

Mẫu: Bảo quản mẫu ở nơi khô ráo và mát. Trộn đều mẫu trước khi phân tích.

Cân chính xác 1 g mẫu ($W_{mẫu}$) vào cốc dung tích 100 ml và trộn với 5 g sucrose. Cho vào bình Erlenmeyer có thanh khuấy từ, thêm vào 95 ml nước và 1 ml dung dịch nội chuẩn. Trong khi khuấy nhanh, thêm từ từ hỗn hợp pectin-sucrose. Đậy nắp bình và khuấy trong 2 giờ. Pectin phải được hòa tan hoàn toàn. Cân chính xác 1 g dung dịch này ($M_{mẫu}$) vào lọ để phân tích bằng GC không gian hơi.

Dung dịch hiệu chỉnh: Dùng pipet lấy 2 ml dung dịch gốc chuẩn và 2 ml dung dịch nội chuẩn cho vào bình định mức dung tích 200 ml và định mức tới 200 ml bằng nước. Cân chính xác 1 g dung dịch này ($M_{chuẩn}$) cho vào lọ và được dùng cho phân tích bằng GC không gian hơi.

Cách tiến hành:

Tiếp tục phân tích như mô tả ở Quyển 4 "Dư lượng dung môi", sử dụng các điều kiện đưa ra trừ nhiệt độ gia nhiệt mẫu nên là 70^0C, và nhiệt độ syringe nên là 80^0C.

Tính kết quả:

Nồng độ (%) của mỗi dư lượng dung môi:

$$\% \text{ dung môi} = \frac{R_{mẫu} \times W_{chuẩn} \times M_{chuẩn}}{R_{chuẩn} \times W_{mẫu} \times M_{mẫu} \times 1.000} \times 100$$

Trong đó:

$R_{mẫu}$ là diện tích pic tương đối của mẫu

$R_{chuẩn}$ là diện tích pic tương đối của chuẩn

$W_{mẫu}$ là khối lượng mẫu (g)

$W_{chuẩn}$ là khối lượng dung môi dùng cho dung dịch gốc chuẩn

$M_{mẫu}$ là khối lượng dung dịch mẫu dùng cho phân tích bằng GC

$M_{chuẩn}$ là khối lượng dung dịch hiệu chỉnh dùng cho phân tích bằng GC.

Tổng số chất không tan

Sấy giấy lọc sợi thủy tinh 70 mm (GF/B (Whatman code 1821 070) trong tủ sấy có quạt ở 105^0C trong khoảng 1 giờ. Chuyển giấy lọc vào bình hút ẩm có chứa silicagel và để nguội. Cân giấy lọc (M_1). Cân khoảng 1 g (S) mẫu cho vào cốc dung tích 250 ml. Thêm 5 ml 2 - propanol để phân tán mẫu. Trong khi khuấy từ, thêm 100 ml dung dịch NaOH 0,03 mol/l có chứa 0,1% (theo khối lượng) ethylen diamin tetra-acetic acid (muối natri), đã được lọc qua giấy lọc GF/B. Khuấy khoảng 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó gia nhiệt đến sôi (không phải gia nhiệt nếu có quá nhiều bọt).

Lọc chân không dung dịch nóng qua giấy lọc sợi thủy tinh ví dụ kit lọc chân không có 3 phễu Hartley (70 cm), có tấm chịu nhiệt. Rửa cốc 5 lần và lọc nước rửa bằng 100 ml nước ấm (khoảng 50^0C) đã được lọc qua giấy lọc GF/B.

Sấy giấy lọc cùng với cặn ở 105^0C trong 1 giờ. Chuyển vào bình hút ẩm chứa silicagel và để nguội. Cân giấy (M_2). Tính % tổng số chất không tan:

Tổng số chất không tan (%) = $[(M_2 - M_1)/S] \times 100$

Acid galacturonic và mức độ amid hóa

Cân 5 g mẫu chính xác đến 0,1 mg và chuyển vào cốc thích hợp. Khuấy trong 10 phút với hỗn hợp 5 ml dung dịch acid HCl TS và 100 ml ethanol 60%. Chuyển vào một ống lọc thủy tinh xốp (dung tích từ 30 - 60 ml) và rửa bằng 6 lần 15 ml hỗn hợp HCl và ethanol 60%, sau đó bằng ethanol 60% cho đến khi dịch lọc không còn clorid. Cuối cùng rửa bằng 20 ml ethanol, sấy trong 2,5 giờ trong tủ sấy ở 105^0C, làm nguội và cân. Chuyển chính xác 1/10 tổng khối lượng tịnh của mẫu đã sấy khô (tương ứng với 0,5 g mẫu gốc chưa được rửa) vào bình nón dung tích 250 ml và làm ẩm mẫu bằng 2 ml ethanol TS. Thêm 100 ml nước cất đun sôi để nguội, đóng nút lại và thỉnh thoảng lắc cho đến khi dung dịch hoàn chỉnh được hình thành. Thêm 5 giọt phenolphthalein TS, chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 mol/l và ghi lại kết quả như độ chuẩn ban đầu (V_1).

Thêm chính xác 20 ml dung dịch NaOH 0,5 mol/l, đậy nút lại, lắc mạnh và để yên trong 15 phút. Thêm chính xác 20 ml dung dịch acid HCl 0,5 mol/l và lắc cho đến khi màu hồng biến mất. Chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 mol/l đến màu hồng nhạt vẫn tồn tại sau khi lắc mạnh; ghi lại giá trị này như là độ chuẩn xà phòng hóa (V_2). Chuyển toàn lượng các thành phần trong bình nón vào bình chưng cất dung tích 500 ml có bẫy Kjeldahl và sinh hàn làm mát bằng nước, ống dẫn đưa xuống phía dưới bề mặt của 150 ml hỗn hợp của nước không có CO_2 và 20,0 ml dung dịch acid HCl 0,1 mol/l trong bình thu nhận. Thêm 20 ml dung dịch NaOH 10% vào bình chưng cất, gắn kín các chỗ kết nối và sau đó bắt đầu gia nhiệt cẩn thận tránh bọt trào. Tiếp tục gia nhiệt đến khi lấy được 80 - 120 ml dịch cất. Thêm một vài giọt dung dịch đỏ methyl TS vào bình thu nhận và chuẩn độ acid dư bằng dung dịch NaOH 0,1 mol/l, ghi lại thể tích đã chuẩn độ S (ml). Tiến hành định lượng mẫu trắng trên 20,0 ml dung dịch acid HCl 0,1 mol/l và ghi lại thể tích đã sử dụng B (ml). Độ chuẩn amid = B - S

Cho chính xác 1/10 tổng khối lượng tịnh của mẫu khô (tương ứng với 0,5 g mẫu gốc chưa được rửa) và làm ẩm bằng 2 ml ethanol trong cốc dung tích 50 ml. hòa tan pectin trong 25 ml dung dịch NaOH 0,125 mol/l. Khuấy dung dịch trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Chuyển toàn lượng dung dịch pectin đã được xà phòng hóa vào bình định mức dung tích 50 ml và pha loãng đến thể tích 50 ml bằng nước cất. Chuyển 20 ml dung dịch pectin đã pha loãng vào thiết bị cụ chưng cất và thêm vào 20 ml dung dịch Clark có chứa 100 g magnesi sulfat heptahydrat, 0,8 ml dung dịch acid H_2SO_4 đậm đặc và nước cất đến tổng thể tích 180 ml. Thiết bị chưng cất gồm có thiết bị bốc hơi nước kết nối với bình đáy tròn có nối với sinh hàn. Cả hai thiết bị bốc hơi nước và bình đáy tròn đều được trang bị áo nhiệt.

Chưng cất bằng cách gia nhiệt bình đáy tròn chứa mẫu. Lấy 15 ml dịch cất tách ra đầu tiên cho vào ống đong có vạch định mức. Sau đó cung cấp hơi và tiếp tục chưng cất cho đến khi lấy được 150 ml dịch cất cho vào cốc dung tích 200 ml. Thêm toàn lượng 15 ml dịch cất đầu tiên và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,05 mol/l tới pH = 8,5 và ghi lại thể tích đã chuẩn độ A (ml).

Thực hiện định lượng mẫu trắng trên 20 ml nước cất. Ghi lại thể tích đã dùng A_0 (ml). Độ chuẩn ester acetat là ($A - A_0$).

Tính mức độ amid hóa (bằng % tổng các nhóm carboxyl) theo công thức:

$$100 \, x \frac{B - S}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

Tính hàm lượng acid galacturonic (mg) theo công thức:

$$19.41 \, x \, [V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)]$$

Số mg acid galacturonic thu được theo cách này chính là hàm lượng trong 1/10 trọng lượng mẫu khô đã được rửa. Tính % acid galacturonic theo ẩm và không có tro, nhân số mg thu được với 1.000/x, trong đó x là khối lượng mẫu khô đã được rửa (mg).

Chú ý 1: Nếu pectin được biết là loại không được amid hóa, chỉ cần xác định V_1 và V_2, còn B - S được coi là bằng 0.

Chú ý 2: Đối với pectin từ quả táo hoặc quả có múi (citrus) thì hiệu số $A - A_0$ không có ý nghĩa trong tính toán hàm lượng acid galacturonic và mức độ amid hóa.

Chú ý 3: Nếu muốn, tính độ ester hóa (bằng % tổng các nhóm carboxyl) theo công thức:

$$100 \, x \, \frac{V_2 - (A - A_0)}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

Chú ý 4: Nếu muốn, tính độ ester acetat (bằng % tổng các nhóm carboxylic từ acid galaturonic) theo công thức:

$$100 \, x \, \frac{A - A_0}{V_1 + V_2 + (B - S) - (A - A_0)}$$

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 17
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI METHYL CELLULOSE

1. Tên khác, chỉ số Cellulose methyl ether;
INS 461
ADI "không giới hạn"

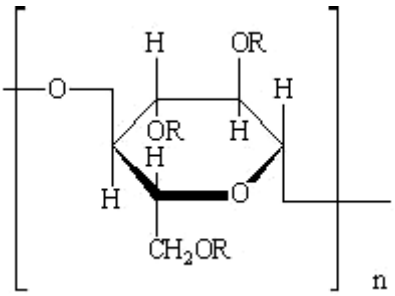
2. Định nghĩa Ether methyl của cellulose, được sản xuất từ bột gỗ hoặc bông bằng cách xử lý với kiềm, và methyl hóa cellulose kiềm bằng methyl clorid. Chế phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.

Tên hóa học Methyl ether của cellulose; Cellulose methyl ether

Mã số C.A.S 9004-67-5

Công thức hóa học $[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_3)_y]_n$
trong đó
x = 1,00 đến 1,55
y = 2,00 đến 1,45
x + y = 3,00
(y = độ thay thế)

Công thức cấu tạo



trong đó R = H hoặc CH_3

Khối lượng phân tử Đơn vị cấu trúc không thế: 162,14
Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế là 1,45: 182
Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế là 2,00: 190
Đại phân tử: từ khoảng 20000 (n khoảng 100) đến khoảng 380000 (n có giá trị khoảng 2000)

3. Cảm quan Dạng hạt mịn, sợi nhỏ, hoặc bột, màu trắng hoặc trắng nhạt, không có mùi, hút ẩm.

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

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Trương nở trong nước, tạo dung dịch từ trong đến trắng đục, nhớt, keo; không tan trong ethanol, ether và cloroform; tan trong acid acetic băng.
Tạo bọt	Phải có phản ứng tạo bọt đặc trưng.
Tạo kết tủa	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi làm khô	Không được quá 10,0% (sấy tại 105°C, trong 3 giờ).
pH	5,0 - 8,0 (dung dịch 1/100).
Tro sulfat	Không được quá 1,5 %. (Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Phương pháp I, cân 1 g mẫu).
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không được thấp hơn 25% và không được quá 33% nhóm methoxyl

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính	
Tạo bọt	Lắc mạnh dung dịch mẫu thử 0,1%. Cần xuất hiện một lớp bọt. (Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxylmethyl cellulose với các ether cellulose khác.
Tạo kết tủa	Thêm 5 ml dung dịch đồng sulfat hoặc nhôm sulfat 5% vào 5 ml dung dịch mẫu thử 0,5%. Trong dung dịch không được xuất hiện kết tủa. Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxylmethyl cellulose với các ether cellulose khác.
6.2. Độ tinh khiết	
Chì	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.
6.3. Định lượng	
	Xác định hàm lượng nhóm methoxyl bằng phương pháp Xác định nhóm Ethoxyl và Methoxyl (xem JECFA monograph 1 - Vol.4)

Phụ lục 18
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI METHYL ETHYL CELLULOSE

1. Tên khác, chỉ số MEC;

INS 465

ADI "không giới hạn"

2. Định nghĩa Hỗn hợp ether của cellulose, được sản xuất từ cellulose bằng cách xử lý với kiềm, dimethyl sulfat và ethyl clorid; cả hai nhóm methyl và ethyl được gắn với các tiểu phân anhydroglucose bằng liên kết ether. Sản phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.

Tên hóa học Ethyl methyl ete của cellulose.

Mã số C.A.S 9004-69-7

Công thức hóa học $[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_3)_y(OC_2H_5)_z]_n$

trong đó

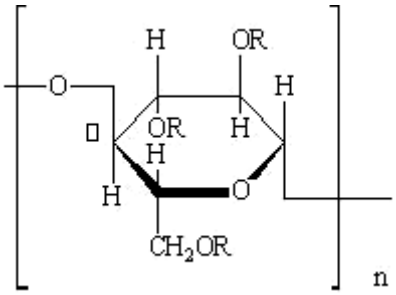
$z = 0,57 \div 0,8$

$y = 0,2 \div 0,4$

$x = 3 - (y + z)$

(y + z = độ thay thế)

Công thức cấu tạo



Trong đó R = H hoặc CH_2 hoặc C_2H_5

Khối lượng phân tử Đơn vị cấu trúc không thế: 162,14

Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế 0,77: 181

Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế 1,2: 190

Đại phân tử: 30000 đến 40000 (n ~ 200)

3. Cảm quan Dạng bột mịn hoặc hình que, màu hơi vàng, không mùi và dễ hút ẩm.

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

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Trương nở trong nước, tạo dung dịch từ trong đến trắng đục, nhớt, keo; không tan trong ethanol.
Tạo bọt	Phải có phản ứng tạo bọt đặc trưng.
Tạo kết tủa	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
Mức độ thay thế	Xác định mức độ thay thế bằng sắc ký khí.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi làm khô	Không được quá 15% đối với dạng que, không được quá 10% đối với dạng bột (sấy đến khối lượng không đổi).
Tro sulfat	Không được quá 0,6 %.
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không được thấp hơn 3,5% và không được quá 6,5% nhóm methoxyl ($-OCH_3$), không được thấp hơn 14,5% và không được quá 19,0% nhóm ethoxyl ($-OCH_2CH_3$), không thấp hơn 13,2% và không được quá 19,6% tổng các nhóm alkoxyl, tính theo methoxyl (theo lượng khô).

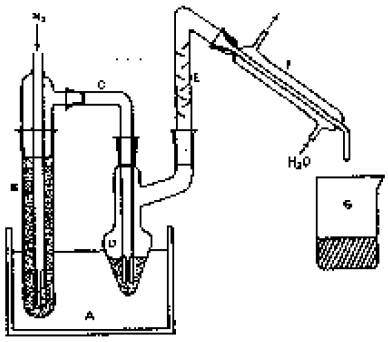
6. Phương pháp thử

6.1. Định tính	
Tạo bọt	Lắc mạnh dung dịch mẫu thử 0,1%. Cần xuất hiện một lớp bọt. (Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxylmethyl cellulose với các ether cellulose khác, các alginat và các gôm tự nhiên.
Tạo kết tủa	Thêm 5 ml dung dịch đồng sulfat hoặc nhôm sulfat 5 % vào 5 ml dung dịch mẫu thử 0,5 %. Trong dung dịch không được xuất hiện kết tủa. (Phép thử này cho phép phân biệt các ether cellulose với natri carboxylmethyl cellulose, gelatin, gôm carob bean và gôm tragacanth).
6.2. Độ tinh khiết	
Tro sulfat	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Phương pháp I. - Cân 1 g mẫu.
Chì	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.
6.3. Định lượng	Xác định nhóm ethoxyl (có thể xác định riêng biệt ethoxyl và methoxyl bằng sắc ký khí (Cobler, Samsel and Beaver,

Talanta, 9, 473, 1962)).

Thiết bị

Thiết bị dùng để xác định nhóm hydroxypropoxy được mô tả ra trong hình vẽ dưới đây. Bình cất hai cổ (D), cổ cạnh được nối với cột Vigreaux được bọc bằng giấy nhôm (E) và cổ giữa nối với một ống sục khí chạy từ cổ tới đáy bình để dẫn hơi nước và nitrogen. Bộ phận tạo hơi nước (B), được nối với ống sục khí qua ống C. Sinh hàn (F), được nối với cột Vigreaux. Bình cất và bộ phận tạo hơi nước được đặt trong bể dầu (A), có gắn thiết bị điều nhiệt để duy trì nhiệt độ 155°C và tốc độ gia nhiệt mong muốn. Sản phẩm cất được thu vào bình 150 ml (G), hoặc một dụng cụ chứa phù hợp khác.



Tiến hành

Chuyển khoảng 100 mg (cân chính xác đến 0,1 mg) mẫu thử đã được sấy khô ở 105°C trong 2 giờ, vào bình cất. Thêm vào đó 10 ml dung dịch crom trioxyd (60 g trong 140 ml nước). Đặt bộ phận tạo hơi nước và bình đun vào bể dầu (tại nhiệt độ phòng) ngang vạch trên cùng của dung dịch crom trioxyd. Bắt đầu làm lạnh nước qua ống sinh hàn và sục khí nitrogen qua bình đun với tốc độ 1 bọt/giây. Nâng nhiệt độ bể dầu từ nhiệt độ phòng lên 155°C trong thời gian không ít hơn 30 phút, và duy trì nhiệt độ này đến khi xác định xong. Cất lấy khoảng 50 ml dịch cất. Tháo sinh hàn ra khỏi cột Vigreaux, rửa bằng nước, thu dịch rửa vào bình đựng dịch cất. Chuẩn độ dịch rửa và dịch cất bằng NaOH 0,02 N đến pH =7,0, sử dụng máy đo pH với thang đo mở rộng, (Ghi chú: Có thể sử dụng dung dịch phenolphtalein (TS) là chỉ thị cho phép chuẩn độ, trong trường hợp này sử dụng đồng thời đối với tất cả mẫu chuẩn và mẫu trắng).

Ghi lại thể tích dung dịch NaOH dùng để chuẩn độ, V_a.

Thêm 500 mg natri bicarbonat và 10 ml dung dịch acid sulfuric loãng (TS). Sau khi hết khí carbon dioxyd bay ra,

thêm một gam kali iodid. Đóng nắp bình, lắc đều rồi để yên trong bóng tối trong 5 phút. Chuẩn độ lượng iod tạo thành bằng dung dịch natri thiosulfat 0,02 N tới khi mất màu vàng, xác định điểm kết thúc chuẩn độ bằng cách thêm vài giọt dung dịch hồ tinh bột (TS). Ghi lại thể tích natri thiosulfat đã sử dụng, Y_a.

Tiến hành làm vài mẫu trắng (hóa chất), trong đó chỉ sử dụng dung dịch crom trioxyd trong quy trình trên. Tỷ số giữa thể tích natri hydroxyd (V_b) và thể tích natri thiosulfat (Y_b) dùng để chuẩn độ được gọi là tỷ số độ acid/độ oxi hóa $K=V_b/Y_b$, cho crom trioxyd trong quá trình cất phải là hằng số đối với tất cả các thí nghiệm.

Tiến hành làm vài mẫu trắng (chuẩn), trong đó thay mẫu thử bằng 100 mg methyl cellulose (không chứa tạp chất). Tỷ số giữa thể tích natri hydroxyd (V_m) và thể tích natri thiosulfat (Y_m).

Tính hàm lượng ethoxyl (mg) của mẫu thử, theo công thức sau:

$$45.0 \times [N_1(V_a - V_m) - kN_2(Y_a - Y_m)]$$

Trong đó

N_1 = Nồng độ chính xác của dung dịch natri hydroxyd 0,02N

N_2 = Nồng độ chính xác của dung dịch natri thiosulfat 0,02N

$k = V_bN_1/Y_bN_2$

Ghi lại phần trăm ethoxyl, B%.

<u>Xác định hàm lượng methoxyl</u>

Xác định hàm lượng methoxyl cộng ethoxyl (hàm lượng tổng alkoxyl) như hướng dẫn trong phần Xác định nhóm Ethoxyl và Methoxyl. Sau đó tính hàm lượng methoxyl như sau:

$$\%\,Methoxyl = \frac{31}{45} \times (A - B)$$

Trong đó

A = hàm lượng tổng alkoxyl, biểu diễn bằng % ethoxyl.

B = hàm lượng % ethoxyl, được xác định ở trên.

<u>Xác định hàm lượng tổng alkoxyl (theo methoxyl)</u>

Mỗi ml dung dịch natri thiosulfat 0,1N tiêu tốn trong quá trình xác định hàm lượng tổng alkoxyl tương đương với 0,517 mg alkoxyl, tính theo methoxyl.

Phụ lục 19

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI NATRI CARBOXYMETHYL CELLULOSE

1. Tên khác, chỉ số Sodium cellulose glucolate, NaCMC, CMC, gôm cellulose, natri CMC,
INS 466
ADI "không giới hạn"

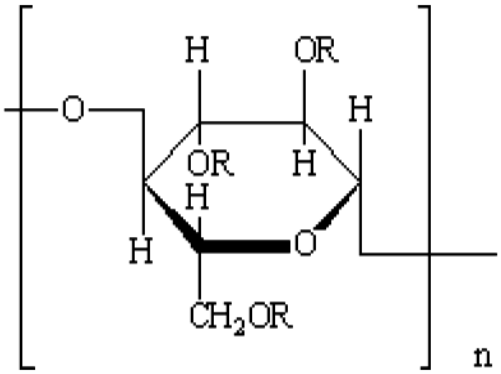
2. Định nghĩa Được sản xuất từ cellulose bằng cách xử lý với kiềm và acid monoclo acetic hoặc muối natri của nó. Sản phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.

Tên hóa học Muối natri của carboxymethyl ether của cellulose.

Mã số C.A.S 9004-32-4

Công thức hóa học $[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_2COONa)_y]_n$
trong đó
n là độ polyme hóa
x = 1,50 ÷ 2,80
y = 0,2 ÷ 1,50
x + y = 3,0 (y là độ thay thế)

Công thức cấu tạo



Trong đó R = H hoặc CH_2COONa

Khối lượng phân tử Một đơn vị cấu trúc có độ thay thế 0,2: 178,14
Một đơn vị cấu trúc có độ thay thế 1,5: 282,18
Đại phân tử: lớn hơn 17000 (n có giá trị khoảng 100)

3. Cảm quan Dạng hạt, bột mịn hoặc hình que nhỏ, có màu trắng hoặc hơi vàng. Dễ hút ẩm, gần như không có mùi.

4. Chức năng Chất làm dày, chất ổn định, tác nhân tạo huyền phù.

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Tạo dung dịch keo nhớt trong nước, không tan trong ethanol.
Tạo bọt	Phải có phản ứng tạo bọt đặc trưng.
Tạo kết tủa	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
Phản ứng màu	Phải có phản ứng màu đặc trưng.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi làm khô	Không được quá 12,0 % sau khi sấy (sấy tại 105°C đến khối lượng không đổi)
pH	6,0 ÷ 8,5 (dung dịch 1 trong 100).
Natri	Không được quá 12,4 % tính theo chế phẩm đã làm khô.
Natri clorid	Không được quá 0,5 % tính theo chế phẩm đã làm khô (mô tả trong phần Phương pháp thử).
Glycolat tự do	Không được quá 0,4 % tính theo natri glycolat tính theo chế phẩm đã làm khô (mô tả trong phần Phương pháp thử).
Độ thay thế	Không được nhỏ hơn 0,2 và không được quá 1,5 (mô tả trong phần Phương pháp thử).
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không thấp hơn 99,5% natri carboxymethyl cellulose, tính theo chế phẩm đã được làm khô.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo bọt	Lắc mạnh dung dịch mẫu 0,1%. Trong dung dịch không được xuất hiện lớp bọt. Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxylmethyl cellulose Với các ether cellulose khác, các alginat và các gôm tự nhiên.
Tạo kết tủa	Thêm 5 ml dung dịch đồng sulfat hoặc nhôm sulfat 5% vào 5 ml dung dịch mẫu thử 0,5% Trong dung dịch không được xuất hiện kết tủa. (Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxylmethyl cellulose với các ether cellulose khác, gelatin, gôm carob bean và tragacanth).
Phản ứng màu	Vừa thêm 0,5 g natri carboxylmethyl cellulose dạng bột vào 50 ml nước vừa khuấy đều để tạo sự phân tán đồng nhất. Tiếp tục khuấy cho đến khi tạo thành dung dịch trong. Lấy 1 ml dung dịch này vào một ống nghiệm nhỏ, pha loãng bằng nước với thể tích tương đương, thêm 5 giọt 1-naphtol (TS). Nghiêng ống nghiệm và cẩn thận thêm vào thành ống 2 ml acid sulfuric sao cho tạo thành một lớp mỏng nằm dưới. Màu tím đỏ phải xuất hiện ở mặt phân cách giữa hai lớp.

6.2. Độ tinh khiết

Natri clorid

Nung nóng nhẹ trên bếp 5g mẫu (cân chính xác đến 0,1 mg) trong chén platin hoặc chén sứ, đầu tiên trên ngọn lửa nhỏ để mẫu không bị nung, khi than hóa hoàn toàn tiếp tục nung mẫu trong lò điện 15 phút ở nhiệt độ 500°C. Làm nguội, nghiền nhỏ tro thu được và chiết vài lần bằng nước ấm. Lọc dịch chiết vào bình định mức 500 ml, acid hóa bằng acid nitric và định mức tới vạch. Xác định hàm lượng NaCl trong 100 ml dịch chiết này bằng phương pháp Volhard, sử dụng dung dịch bạc nitrat 0,02 N và amoni nitrat 0,02N.

Mỗi ml dung dịch bạc nitrat 0,02 N tương đương với 1,169 mg NaCl. Tính hàm lượng natri clorid theo công thức sau:

% natri glucolat = (a x 0,001169 x 5) / b

trong đó a = Thể tích (ml) dung dịch bạc nitrat 0,02 N đã dùng để chuẩn độ.

b = Khối lượng mẫu thử sau khi trừ đi hàm lượng nước (g).

Glycolat tự do

Cân 0,5g mẫu (chính xác đến 0,1 mg) rồi chuyển vào một cốc vại có mỏ dung tích 100 ml. Cẩn trọng thấm ướt mẫu bằng 5 ml acid acetic băng, sau đó bằng 5 ml nước rồi khuấy bằng đũa thủy tinh đến tan hoàn toàn (thường mất khoảng 15 phút). Vừa khuấy vừa thêm từ từ 50 ml aceton, sau đó thêm khoảng 1g natri sulfat. Tiếp tục khuấy thêm vài phút để đảm bảo toàn bộ carboxylmethy cellulose kết tủa hết. Lọc qua giấy lọc mềm, đã được thấm ướt trước đó bằng một lượng nhỏ aceton. Thu dịch lọc vào bình định mức 100 ml. Dùng 30 ml acetone để thúc đẩy quá trình lọc và để rửa kết tủa. Định mức tới vạch bằng aceton và lắc đều.

Chuẩn bị mẫu trắng gồm 5 ml nước, 5 ml acid acetic băng và aceton trong bình định mức 100 ml khác. Dùng pipet lấy 2 ml mẫu thử và 2 ml mẫu trắng vào 2 bình định mức 25 ml. Làm bay hơi aceton bằng cách đun cách thủy bình định mức, không đóng nút trong 20 phút. Làm nguội đến nhiệt độ phòng và thêm vào đó 5 ml dung dich naphthalendiol (TS), lắc kỹ, sau đó thêm tiếp vào 15 ml Dung dịch naphthalendiol (TS) và lắc đều. Đậy miệng bình bằng một mảnh giấy nhôm và đun cách thủy trong 20 phút. Làm nguội đến nhiệt độ phòng và định mức đến vạch bằng dung dịch naphthalendiol (TS).

Đo độ hấp thụ quang của dung dịch mẫu so với mẫu trắng tại bước sóng 540 nm sử dụng cuvet 1cm. Đọc số mg acid glycolic tương ứng từ đường chuẩn như sau:

Thêm 0; 1; 2; 3; và 4 ml dung dịch acid glycolic chuẩn (1 mg/ml, được pha như sau: cân chính xác 0,100g acid glycolic (đã được làm khô trong bình hút ẩm chân không ít nhất 16h), sau đó hòa tan vào 100 ml nước, không giữ dung dịch quá 30 ngày) vào 5 bình định mức 100 ml. Thêm nước vào mỗi bình đến thể tích 5 ml, sau đó thêm 5 ml acid acetic băng và định mức đến vạch bằng aceton và lắc đều. Dùng pipet lấy 2 ml của mỗi dung dịch (có chứa lần lượt 0; 1; 2; 3 và 4 mg acid glycolic trong 100 ml) vào 5 bình định mức 25 ml và tiến hành quy trình như miêu tả trong phần chuẩn bị dung dịch thử.

Dựng đường chuẩn bằng cách vẽ đồ thị biểu thị sự phụ thuộc giữa lượng acid glycolic (mg) trong 100 ml dung dịch ban đầu với độ hấp thụ quang. Tính hàm lượng natri glycolat (glycolat tự do) theo công thức:

$$\% \text{ natri glycolat} = (a \times 0{,}129) / b$$

trong đó

a = Lượng (mg) glycolic acid tính từ đường chuẩn

b = Khối lượng mẫu thử sau khi trừ đi hàm lượng nước (g).

Độ thay thế

Chuẩn bị mẫu

Cân 5g mẫu (chính xác đến 0,1 mg) và chuyển vào bình nón 500 ml. Thêm 350 ml methanol hoặc ethanol (80% theo thể tích). Lắc huyền phù trong 30 phút. Gạn qua phễu lọc thủy tinh đã cân bì, hút chân không nhẹ. Cuối quá trình lọc gạn tránh không để không khí bị hút qua phễu. Lặp lại quá trình trên với dung môi chiết cho đến khi thử ion clorid bằng dung dịch bạc nitrat (TS) cho kết quả âm tính. Thường cần xử lý khoảng 3 lần. Chuyển dung dịch natri carboxylmethyl cellulose vào chén. Loại bỏ dung môi chiết còn bám trên cặn bằng aceton. Sấy khô chén trong lò ở nhiệt độ 110°C đến khối lượng không đổi. Cân lần đầu sau 2 giờ. Mỗi lần cân phải làm nguội chén trong bình hút ẩm và trong khi cân cần lưu ý rằng natri carboxylmethyl cellulose hút ẩm nhẹ.

Tiến hành

Cân 2g mẫu khô (chính xác 0,1 mg), thu được từ quy trình chiết cồn trên vào chén sứ đã cân bì. Đầu tiên nung nóng nhẹ trên bếp để đốt cháy mẫu từ từ, sau đó tăng nhiệt độ nung nóng mạnh trong 10 phút. Làm nguội, sau đó thấm ướt tro còn lại bằng 3-5 ml acid sulfuric đặc. Cẩn thận nung cho tới khi hết khói bay ra. Sau khi làm nguội, thêm khoảng 1 g

amoni carbonat, dàn đều bột trong toàn bộ thể tích của chén. Nung nóng lại trên bếp, đầu tiên nhẹ nhàng cho đến khi hết khói, sau đó nung đến nóng đỏ thẫm trong 10 phút. Lặp lại quy trình xử lý với axid sulfuric và amoni carbonat nếu tro natri sulfat vẫn còn chứa carbon. Làm nguội chén trong bình hút ẩm và cân. Nếu không thêm amoni carbonat và nung trên bếp, có thể nung chén trong lò trong 1 giờ ở nhiệt độ khoảng 600°C.

Tính hàm lượng natri của mẫu chiết với cồn theo công thức sau:

% natri = (a X 32,28) / b

trong đó:

a = khối lượng của cặn natri sulfat

b = khối lượng cặn khô thu được sau giai đoạn chiết bằng cồn

Tính độ thay thế theo công thức sau:

Mức độ thay thế = (162 X % natri) / [2300-(80 X % natri)]

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

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

6.3. Định lượng Tính hàm lượng % natri carboxymethyl cellulose trong mẫu bằng cách lấy 100% trừ đi tổng % của natri clorid và natri glucolat (glucolat tự do), đã được xác định theo hướng dẫn ở trên.

Hàm lượng (%) = 100 - (% NaCl + % Na glycolat).

Phụ lục 20
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GELATIN THỰC PHẨM

1. Tên khác, chỉ số	Gelatin edible ADI "không giới hạn"
2. Định nghĩa	Gelatin thực phẩm được sản xuất bằng cách bán thủy phân collagen trong da, gân, dây chằng, xương… của động vật. Chế phẩm thương mại có thể được phân loại theo các tiêu chí như: độ bền của gel, giới hạn sắt, calci, lactose và các hóa chất khác; các giới hạn đối với vi sinh vật gây bệnh bao gồm *Salmonella, Staphylococcus aureus, Clostridium spp. và bào tử nấm mốc*. Các yêu cầu về giới hạn vi sinh vật dưới đây là tạm thời.
Chỉ số C.A.S.	9000-70-8
3. Cảm quan	Dạng phiến, vẩy, mảnh hoặc bột mịn, bột thô, màu vàng nhạt hoặc hổ phách, màu tủy theo kích thước tiểu phân, có mùi nhẹ giống mùi nước thịt; bền trong không khí khô nhưng trong khi hút ẩm hoặc trong dung dịch bị vi sinh vật làm hỏng.
4. Chức năng	Chất tạo gel, chất ổn định, chất nhũ hóa, chất kìm hãm cho quá trình kết tinh.
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước lạnh, nhưng trương nở và mềm ra đồng thời hút nước với khối lượng gấp 5-10 lần khi ngâm trong nước; tan trong nước nóng, khi nguội tạo thạch đông; tan trong acid acetic; không tan trong ethanol, cloroform và ether.
Tạo kết tủa	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
Tạo đục	Phải có phản ứng tạo đục đặc trưng.
Giải phóng amoniac	Khi đun nóng mẫu thử với soda vôi, khí amoniac sẽ được giải phóng.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi làm khô	Không được quá 18% (sấy tại 100 - 105° trong 6 giờ).
Các hợp chất không tan trong nước và có mùi	Dung dịch mẫu thử 1/40 nóng không được có mùi khó chịu. Khi quan sát lớp dày 2 cm, hầu như trong, chỉ được phép trắng đục như sữa rất nhẹ.
Lưu huỳnh dioxyd	Không được quá 40,0 mg/kg.

Tro	Không được quá 2,0%.
Arsen	Không được quá 1,0 mg/kg.
Chì	Không được quá 1,5 mg/kg.
Cadimi	Không được quá 0,5 mg/kg.
Thủy ngân	Không được quá 0,15 mg/kg.
5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật	
Tổng số vi sinh vật hiếu khí	$< 10^4$ /g
Enterobacteriaceae hoặc vi khuẩn nhóm coli-aerogens	< 10/g
Streptococci nhóm Lancefield D	$< 10^2$ / g

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo kết tủa	Pha dung dịch mẫu thử 1/100, thêm hỗn hợp gồm dung dịch trinitrophenol (TS) hoặc dung dịch kali dichromat 1/15 trộn với acid hydrocloric loãng (tỷ lệ trộn 5/1 - tt/tt), trong dung dịch xuất hiện kết tủa vàng. Pha dung dịch mẫu thử 1/100, thêm dung dịch thủy ngân (II) nitrat, trong dung dịch xuất hiện kết tủa trắng, khi đun nóng kết tủa này sẽ chuyển thành màu đỏ gạch.
Tạo đục	Pha dung dịch mẫu thử 1/5000, thêm dung dịch acid tannic (TS), dung dịch sẽ trở nên đục.

6.2. Độ tinh khiết

Arsen	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4. - Phương pháp II.
Chì	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.
Cadimi	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4. - Phương pháp II.
Thủy ngân	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4. - Phương pháp II.

QCVN 4 - 22: 2011/BYT

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT NHŨ HÓA

National technical regulation on Food Additive - Emulsifier

Lời nói đầu

QCVN 4-22: 2011/BYT do *Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến* biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT NHŨ HÓA

National technical regulation on Food Additive - Emulsifier

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

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

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

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

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

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt

3.1. Chất nhũ hóa: là phụ gia thực phẩm được bổ sung vào thực phẩm nhằm mục đích tạo ra hoặc duy trì dạng nhũ tương đồng nhất của hai hay nhiều thành phần của thực phẩm.

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

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

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

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

3.6. MTDI (Maximum tolerable daily intake): Lượng ăn vào hàng ngày tối đa chịu đựng được.

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

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

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

1.1.	Phụ lục 1:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với mono- và di-glycerid của acid béo
1.2.	Phụ lục 2:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của glycerol với acid lactic và acid béo
1.3.	Phụ lục 3:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của glycerol với acid citric và acid béo
1.4.	Phụ lục 4:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của glycerol với acid diacetyl tartric và acid béo
1.5.	Phụ lục 5:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sucroglycerid
1.6.	Phụ lục 6:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của polyglycerol với các acid béo
1.7.	Phụ lục 7:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với stearyl citrat
1.8.	Phụ lục 8:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với trikali ortho-phosphat
1.9.	Phụ lục 9:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với các muối amoni của acid phosphatidic
1.10.	Phụ lục 10:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sucrose acetat isobutyrat
1.11.	Phụ lục 11:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester glycerol của nhựa cây
1.12.	Phụ lục 12:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với dinatri diphosphat
1.13.	Phụ lục 13:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với calci polyphosphat
1.14.	Phụ lục 14:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với các muối của acid myristic, palmitic và stearic (Ca, Na, K, NH_4)
1.15.	Phụ lục 15:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với ester của sucrose với các acid béo
1.16.	Phụ lục 16:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với dioctyl natri sulphosucinat
1.17.	Phụ lục 17:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với stearyl tartrat
1.18.	Phụ lục 18:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan monostearat
1.19.	Phụ lục 19:	Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan tristearat

1.20. Phụ lục 20: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan monolaurat

1.21. Phụ lục 21: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan monooleat

1.22. Phụ lục 22: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với sorbitan monopalmitat

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

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư 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 nhũ hóa phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

1.2. Phương thức, trình tự, thủ tục công bố hợp quy được thực hiện theo Quy định về chứng nhận hợp chuẩn, chứng nhận hợp quy và công bố hợp chuẩn, công bố hợp quy ban hành kèm theo Quyết định số 24/2007/QĐ-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 nhũ hóa

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

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

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

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

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

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

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

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

Phụ lục 1

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI MONO VÀ DIGLYCERID CỦA CÁC ACID BÉO

1. Tên khác, chỉ số

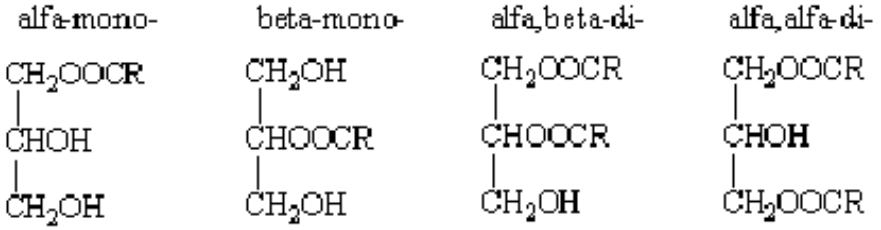
Glyceryl monostearate, glyceryl monopalmitate, glyceryl monooleate; monostearin, monopalmitin, monoolein; GMS (đối với glyceryl monostearate);

INS 471

2. Định nghĩa

Hỗn hợp các ester mono- và diglyceryl mạch dài với các acid béo bão hòa và không bão hòa có trong chất béo thực phẩm; có chứa hàm lượng alpha-monoglycerid không thấp hơn 30% và cũng có thể có chứa các monoglycerid đồng phân; cũng như di- và triglycerid, glycerol tự do, các acid béo tự do, sản phẩm xà phòng hóa và nước; thường được sản xuất bằng cách thủy phân tách glyceryl của các chất béo và dầu thực phẩm, nhưng cũng có thể được sản xuất bằng cách este hóa các acid béo với glycerol có hoặc không qua chưng cất phân tử.

Công thức cấu tạo



Trong đó -OCR là của acid béo

Khối lượng phân tử

Glyceryl monostearat: 358,6

Glyceryl distearat: 625,0

3. Cảm quan

Chất béo rắn dạng sáp có màu trắng hoặc kem hoặc dạng lỏng sánh

4. Chức năng

Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan — Không tan trong nước, tan trong ethanol, cloroform và benzen.

Hấp thụ hồng ngoại — Phải có phổ hồng ngoại đặc trưng của ester một phần của acid béo với polyol.

Acid béo — Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.

Glycerol — Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol.

5.2. Độ tinh khiết

Nước — Không được quá 2,0 % (phương pháp Karl Fischer)

Chỉ số acid	Không được quá 6.
Glycerol tự do	Không được quá 7%
Xà phòng	Không được quá 6%, tính theo natri oleat.
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

Xà phòng Thêm 10 g mẫu thử vào hỗn hợp gồm 60 ml aceton và 0,15 ml dung dịch xanh bromophenol (0,5%) đã được trung hòa trước bằng acid hydrocloric 0,1N hoặc natri hydroxyd 0,1N. Làm ấm từ từ trên cách thủy cho đến khi dung dịch tan hoàn toàn, chuẩn độ bằng acid hydrocloric 0,1N cho đến khi màu xanh biến mất. Để yên dung dịch trong 20 phút, làm ấm cho đến khi cặn được hòa tan và màu xanh tái xuất hiện, tiếp tục chuẩn độ đến mất màu xanh.

Mỗi ml acid hydrocloric 0,1N tương đương với 0,0304 g $C_{18}H_{33}O_2Na$.

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

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

Phụ lục 2
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA GLYCEROL VỚI ACID LACTIC VÀ ACID BÉO

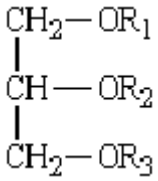
1. Tên khác, chỉ số Lactic acid esters of mono- and diglycerides; lactoglycerides

INS 472b

2. Định nghĩa Là hỗn hợp các ester của glycerol với acid lactic và acid béo trong chất béo thực phẩm.

Sản phẩm thương mại có thể chỉ rõ hàm lượng monglycerid, acid lactic, chỉ số acid, chỉ số xà phòng hóa, hàm lượng acid béo tự do, điểm đông đặc của các acid béo tự do, chỉ số iod, hàm lượng glycerol tự do và hàm lượng nước.

Công thức cấu tạo



Trong đó R_1, R_2 và R_3 là của acid béo, acid lactic hoặc hydrogen (theo thành phần)

3. Cảm quan Chất rắn dạng sáp

4. Chức năng Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Không tan trong nước lạnh nhưng có thể phân tán trong nước nóng.

Acid béo Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.

Acid lactic Phải có phản ứng đặc trưng của acid lactic.

Glycerol Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol.

5.2. Độ tinh khiết

Các acid Chỉ có acid béo và acid lactic.

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

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

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

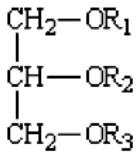
Phụ lục 3
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA GLYCEROL VỚI ACID CITRIC VÀ ACID BÉO

1. Tên khác, chỉ số Citric acid esters of mono- and di-glycerides, citroglycerides, CITREM;

INS 472c

2. Định nghĩa Thu được nhờ quá trình ester hóa glycerol với acid citric và acid béo thực phẩm hoặc nhờ phản ứng của hỗn hợp mono và diglycerid của acid béo với acid citric; chế phẩm bao gồm các ester hỗn hợp của acid citric và các acid béo với glycerol; có thể chứa lượng nhỏ các acid béo tự do, glycerol tự do, acid citric tự do và mono - và diglycerid; có thể được trung hòa hoàn toàn hoặc một phần bằng NaOH hoặc KOH (như được công bố trên nhãn mác).

Công thức cấu tạo



Trong đó: ít nhất một trong R_1, R_2 hoặc R_3 là của acid citric, một là của acid béo và R còn lại có thể là của acid citric, acid béo hoặc hydrogen.

3. Cảm quan Dạng dầu tới sáp, màu trắng đến trắng ngà

4. Chức năng Chất ổn định, chất nhũ hóa, chất chống oxy hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Không tan trong nước lạnh, có thể phân tán trong nước nóng; tan trong dầu và mỡ; không tan trong ethanol lạnh

Acid béo Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo .

Acid citric Phải có phản ứng đặc trưng của acid citric.

Glycerol Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol.

5.2. Độ tinh khiết

Tro sulfat Sản phẩm không được trung hòa: Không được quá 0,5%

Sản phẩm được trung hòa hoàn toàn hoặc một phần: Không được quá 10%

(Sử dụng 2 g mẫu thử, phương pháp I)

Glycerol tự do Không được quá 4%

Glycerol tổng số 8 - 33% (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Acid citric tổng số	13 - 50% (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Acid béo tổng số	37 - 81% (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

Độ tinh khiết

Glycerol tổng số

Cân chính xác 2 g mẫu và cho vào bình xà phòng hóa, thêm vào 50 ml dung dịch KOH 0,5 M trong ethanol, và đun sôi với sinh hàn ngược trong 30 phút. Thêm chính xác 99 ml (từ buret) chloroform và 25 ml acid acetic băng vào bình định mức dung tích 1 lít. Chuyển toàn lượng dịch trong bình xà phòng hóa vào bình định mức dung tích 1 lít, cho 3 lần 25 ml nước. Thêm vào 500 ml nước và lắc mạnh trong 1 phút. Pha đến thể tích 1 lít bằng nước, lắc đều và để yên cho tách thành các lớp.

Dùng pipet lấy 50 ml dung dịch acid acetic periodic TS vào trong các cốc dung tích 400 ml. Chuẩn bị 2 mẫu trắng bằng cách thêm 50 ml nước vào mỗi cốc. Dùng pipet lấy 50 ml dung dịch mẫu trong nước cho vào một trong các cốc chứa 50 ml acid acetic periodic TS, lắc nhẹ cho đều, đậy bằng tấm kính nhìn qua được và để yên trong 30 phút. Nhưng không được quá 1,5 giờ. Thêm 20 ml dung dịch KI 15%, lắc nhẹ cho đều và để yên ít nhất 1 phút nhưng không được quá 5 phút. Không được để dưới ánh sáng trực tiếp hoặc ánh sáng trắng. Bổ sung 100 ml nước và chuẩn độ bằng dung dịch natri thiosulfat 0,1 N. Sử dụng dụng máy khuấy để làm đều dung dịch. Tiếp tục chuẩn độ cho đến khi mất màu iod nâu trong dung dịch nước. Thêm 2 ml tinh bột TS và tiếp tục chuẩn độ cho đến khi mất màu iod trong lớp chloroform được tách ra trong quá trình chuẩn độ và mất màu xanh của tinh bột iodo trong dung dịch nước.

Kết quả: Glycerol tổng số (%):

$$= [(B - S) \times N \times 2.302]/W$$

Trong đó:

B: Lượng dung dịch natri thiosulfat dùng để chuẩn độ mẫu trắng chứa 50 ml nước

S: Lượng dung dịch natri thiosulfat dùng để chuẩn độ mẫu thử

N: Nồng độ dung dịch natri thiosulfat 0,1 N

W: Khối lượng mẫu thử được lấy bằng pipet đem chuẩn độ và được tính theo công thức:

$$W = [a \times 50]/900$$

Trong đó: a: Khối lượng mẫu (g) đem xà phòng hóa

Acid citric tổng số

Nguyên tắc:

Mẫu được xà phòng hóa bằng dung dịch KOH trong alcol và các acid béo được tách ra bằng trích ly. Acid citric được chuyển thành các dẫn suất trimethylsilyl (TMS) và được phân tích bằng *sắc ký khí lỏng*.

Xà phòng hóa:

Cân chính xác 1 g mẫu cho vào bình đáy tròn, thêm 25 ml dung dịch KOH 0,5M trong ethanol và đun sôi với sinh hàn ngược trong 30 phút. Acid hóa hỗn hợp bằng HCl và cho bốc hơi bằng máy cô quay hoặc bằng phương pháp thích hợp khác.

Trích ly:

Chuyển toàn lượng mẫu trong bình vào một bình gạn, sử dụng không quá 50 ml nước và trích ly bằng 3 lần 50 ml heptan, loại bỏ phần dịch chiết heptan tách ra. Chuyển lớp dung dịch nước vào bình định mức dung tích 100 ml, trung hòa pha tới thể tích 100 ml bằng nước và lắc đều.

Dẫn xuất hóa:

Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch pha được ở trên, 1 ml dung dịch acid tartric (1 mg/ml trong nước) cho vào bình đáy tròn có thể đậy nắp dung tích 10 ml và cô đến khô. Thêm 1 ml pyridin, 0,2 ml dung dịch trimethyl-chlorosilan (TMCS), 0,4 ml hexamethyl-disilazan (HMDS), 0,1 ml n-methyl-n-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (MSTFA). Đậy nắp chặt và lắc cẩn thận để được dung dịch tan hoàn toàn. Gia nhiệt bình trong tủ sấy ở 60^0C trong 1 giờ.

Sắc ký khí:

Bất kỳ sắc ký khí thích hợp có thể được dùng với detector ion hóa ngọn lửa và cột (thủy tinh, chiều dài 1,8 m và đường kính trong 2 mm), được nhồi bằng DC-200 10% trên chromosorb Q (80/100 mesh). Các điều kiện cho sắc ký khí: nhiệt độ lò cột 165^0C, nhiệt độ buồng tiêm 240^0C, nhiệt độ detector 240^0C; tốc độ dòng khí mang nitrogen 24 ml/phút.

Cách tiến hành:

Bơm 5 µl mẫu các dẫn xuất TMS. Thời gian lưu đối với acid tartric khoảng 12 phút và thời gian lưu tương đối của acid citric/acid tartric khoảng 2,3.

Lặp lại cách tiến hành được mô tả ở trên trong phần Dẫn xuất hóa và Sắc ký khí sử dụng 1 ml dung dịch đối chứng acid citric (3 mg/ml trong nước) thay thế 1 ml dung dịch mẫu thử.

Tính kết quả:

Đo diện tích mỗi pic bằng phương pháp thích hợp.

Acid citric tổng (%) =

$$[A_{CS} \times A_{TR} \times W_{CR} \times 100 \times 100]/[A_{TS} \times A_{CR} \times W]$$

Trong đó:

A_{CS}: Diện tích pic của acid citric (dung dịch mẫu)

A_{TS}: Diện tích pic của acid tartric (dung dịch mẫu)

A_{TR}: Diện tích pic của acid tartric (dung dịch đối chứng)

A_{CR}: Diện tích pic của acid citric (dung dịch đối chứng)

W_{CR}: Khối lượng (g) của acid citric trong 1 ml dung dịch đối chứng

W: Khối lượng (g) của mẫu ester glycerol với acid citric và acid béo.

Acid béo tổng số

Cân chính xác 5 g mẫu cho vào bình đáy tròn dung tích 250 ml, thêm vào 50 ml dung dịch KOH 1 N trong ethanol, và đun sôi với ống sinh hàn ngược trên nồi cách thủy trong 1 giờ.

Chuyển toàn lượng dung dịch trong bình xà phòng hóa vào phễu chiết dung tích 1.000 ml, cho 3 lần 25 ml nước và thêm 5 giọt da cam methyl TS.

Thêm cẩn thận dung dịch HCl đậm đặc cho đến khi màu của dung dịch chuyển sang màu đỏ rõ rệt và lắc đều để tách các acid béo.

Trích ly các acid béo tách được bằng ba lần 100 ml dung môi diethyl ether. Hòa chung các phần tách được và rửa mỗi lần bằng 50 ml dung dịch NaCl 10% cho đến khi dung dịch NaCl được rửa trở nên trung tính.

Làm khô dung dịch ether bằng Na_2SO_4 khan. Sau đó cô bốc hơi trên cách thủy ether, để thêm 10 phút nữa trên cách thủy và cân phần cặn.

Phụ lục 4
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA GLYCEROL VỚI ACID DIACETYL TARTRIC VÀ ACID BÉO

1. Tên khác, chỉ số

Diacetyltartric acid esters of mono- and diglycerides, DATEM; INS 472e

Tartric, acetic and fatty acid esters of glycerol, mixed; Mixed acetic and tartric acid esters of mono and diglycerides of fatty acids;

INS 472f

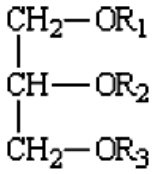
2. Định nghĩa

Sản phẩm gồm hỗn hợp các ester của glycerol với acid mono, diacetyltartric và các acid béo thực phẩm. Nó được tổng hợp bằng phản ứng giữa anhydrid diacetyltartric và mono, diglycerid của acid béo có mặt acid acetic, hoặc bằng cách tương tác giữa anhydrid acetic và mono, diglycerid của acid béo có mặt acid tartric.

Do trao đổi nhóm acyl trong nội phân tử hoặc giữa các phân tử, cả hai phương pháp sản xuất đều tạo ra các thành phần chính như nhau, việc tạo ra các thành phần chính phụ thuộc vào tỷ lệ tương đối của các nguyên liệu cơ bản, vào nhiệt độ và thời gian phản ứng. Sản phẩm này có thể chứa một lượng nhỏ glycerol tự do, các acid béo tự do, acid tartric và acid acetic tự do. Sản phẩm thương mại có thể được quy định các chỉ tiêu kỹ thuật rõ hơn như chỉ số acid, hàm lượng acid tartric tổng số, hàm lượng acid acetic tự do, chỉ số xà phòng hóa, chỉ số iod, hàm lượng acid béo tự do, điểm đông đặc của acid béo tự do.

Công thức cấu tạo

Các thành phần chính là:



Trong đó:

1) Một hoặc hai nhóm R là của acid béo

2) Nhóm R khác là của hoặc

- acid diacetylat tartric
- acid monoacetylat tartric
- acid tartric
- acid acetic
- hydrogen

3. Cảm quan Từ dạng lỏng, bột nhão đến dạng rắn giống sáp (vảy hoặc bột)

4. Chức năng Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Phân tán trong nước nóng và nước lạnh, tan trong methanol và ethanol.
1, 2- diol	Phải có phản ứng đặc trưng của 1,2-diol.
Acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo
Acid acetic	Phải có phản ứng đặc trưng của acid acetic
Acid tartric	Phải có phản ứng đặc trưng của acid tartric
Glycerol	Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol

5.2. Độ tinh khiết

Acid	Không phát hiện được các loại acid khác ngoài acid acetic, acid tartric và acid béo.
Tro sulfat	Không được quá 0,5% được xác định ở 800 ±25ºC
Acid béo tự do	Không được quá 3% tính theo acid oleic
Acid acetic tổng số	Không được nhỏ hơn 8% và không được quá 32% sau khi thủy phân (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Acid tartric tổng số	Không được nhỏ hơn 10% và không được quá 40% sau khi xà phòng hóa (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Glycerol tổng số	Không được nhỏ hơn 11% và không được quá 28% sau khi xà phòng hóa (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Glycerol tự do	Không được quá 2,0%
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

1, 2- diol	Cho vài giọt chì acetat TS vào dung dịch có 500 mg mẫu trong 10 ml methanol. Chất kết tủa vón, màu trắng không tan được hình thành.

6.2. Độ tinh khiết

Acid acetic tổng số

Dụng cụ:

Lắp ráp bộ dụng cụ chưng cất Hortvet - Sellier cải tiến như hình vẽ sau, sử dụng ống Sellier có kích thước bên trong đủ lớn (khoảng 38-x 203 mm) và bẫy chưng cất dung tích lớn.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 4 g mẫu và cho vào ống bên trong của bộ dụng cụ và lắp ống vào bình ngoài có chứa khoảng 300 ml nước nóng vừa đun sôi. Thêm 10 ml acid perchloric 4 N [35 ml (60 g) acid perchloric 70% trong 100 ml nước] vào mẫu thử, và nối ống bên trong với sinh hàn làm mát bằng nước qua bẫy chưng cất. Chưng cất bằng cách gia nhiệt bình phía ngoài để sao cho thu được 100 ml dung dịch cất trong khoảng 20 - 25 phút. Tập hợp các phần dịch cất được 100 ml và thêm phenolphthalein TS vào mỗi phần, chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,5 N. Tiếp tục chưng cất cho đến khi phần 100 ml dung dịch cất được cần

không quá 0,5 ml dung dịch NaOH 0,5N để trung hòa. (Chú ý: không được chưng cất đến cạn khô). Tính khối lượng (mg) acid bay hơi trong mẫu theo công thức V x e, trong đó V là tổng thể tích (ml) của dung dịch NaOH 0,5N đã dùng để chuẩn độ và e là hệ số đương lượng 30,03.

Acid tartric tổng số

Đường chuẩn:

Chuyển 100 mg acid tartric tinh khiết được cân chính xác vào bình định mức dung tích 100 ml, hòa tan acid tartric trong 90 ml nước và thêm nước đến thể tích 100 ml, lắc đều. Lấy các phần 3, 4, 5 và 6 ml cho vào các cuvet riêng biệt phù hợp (kích thước 19 x 150 mm), thêm lượng nước thích hợp để được dung dịch thể tích 10 ml. Cho vào mỗi cuvet 4 ml dung dịch natri metavanadat 5% vừa mới pha, 1 ml acid acetic. (Chú ý: sử dụng các dung dịch này trong vòng 10 phút sau khi màu tăng lên). Chuẩn bị mẫu trắng giống như cách trên, sử dụng 10 ml nước thay thế dung dịch acid tartric. Đặt thiết bị ở vị trí bằng 0 đối với mẫu trắng và sau đó đo độ hấp thụ của 4 dung dịch acid tartric tại bước sóng 520 nm với máy quang phổ thích hợp hoặc máy so màu quang điện được trang bị kính lọc 520 nm. Từ số liệu thu được, xây dựng đường chuẩn trên hệ trục toạ độ vuông góc với trục tung biểu diễn độ hấp thụ, trục hoành biểu diễn lượng acid tartric tương ứng (mg).

Chuẩn bị mẫu thử:

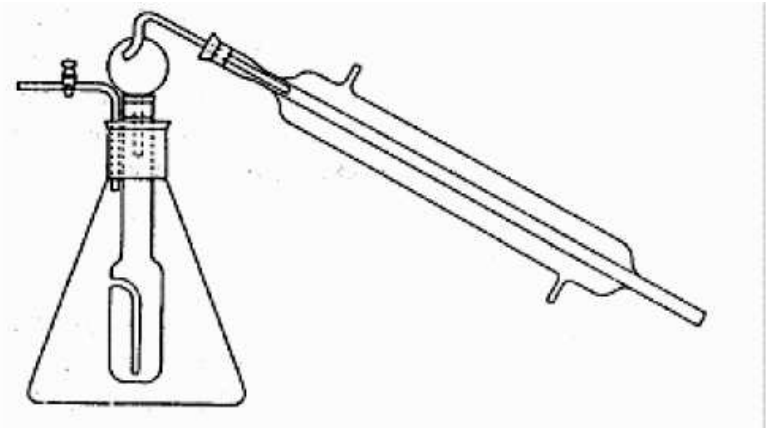
Cân chính xác 4 g mẫu cho vào bình Erlenmeyer dung tích 250 ml, thêm vào 80 ml dung dịch KOH 0,5N và 0,5 ml phenolphthalein TS. Nối bình với một sinh hàn không khí có chiều dài ít nhất 65 cm, gia nhiệt hỗn hợp trên tấm nhiệt trong 2,5 giờ. Thêm vào hỗn hợp nóng khoảng 10% acid phosphoric cho đến khi hỗn hợp có phản ứng acid rõ với giấy chỉ thị đỏ Congo. Nối lại bình với sinh hàn không khí và gia nhiệt cho đến khi acid béo được hóa lỏng và trong. Làm nguội và sau đó chuyển hỗn hợp vào một bình gạn dung tích 250 ml với sự hỗ trợ của các phần nhỏ nước và chloroform. Chiết các acid béo được giải phóng ra bằng 3 lần 25 ml nước liên tiếp và cho phần nước rửa vào bình gạn có chứa lớp nước. Chuyển toàn bộ hỗn hợp trong bình gạn đầu vào cốc dung tích 250 ml, gia nhiệt trên nồi cách thủy để loại bỏ các vết của chloroform, lọc qua giấy lọc mịn đã được rửa acid vào bình định mức dung tích 500 ml, và cuối cùng pha tới thể tích 500 ml bằng nước (Dung dịch I). Dùng pipet lấy 25 ml dung dịch này cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha tới thể tích 100 ml bằng nước (Dung dịch II). Giữ phần còn lại của Dung dịch I để xác định glycerol tổng số.

Cách tiến hành:

Cho 10 ml dung dịch II đã được chuẩn bị trong phần Chuẩn bị

mẫu thử vào cuvet 19 x 150 mm và tiếp tục làm theo hướng dẫn trong phần Đường chuẩn, bắt đầu với "cho vào mỗi cuvet 4 ml dung dịch metavanadat 5%". Từ đường chuẩn xác định khối lượng (mg) acid tartric trong pha loãng cuối cùng, sau đó nhân với 20 và chia kết quả cho khối lượng mẫu gốc để thu được % acid tartric.

Glycerol tổng số Chuyển 5 ml dung dịch I đã chuẩn bị trong phần xác định Acid tartric tổng số vào trong bình Erlenmeyer có nắp thủy tinh dung tích 250 ml hoặc bình iod. Thêm vào bình 15 ml acid acetic băng và 25 ml dung dịch acid periodic, được chuẩn bị bằng cách hòa tan 2,7 g acid periodic (H_5IO_6) trong 50 ml nước, thêm 950 ml acid acetic băng và lắc mạnh; bảo quản dung dịch này tránh ánh sáng. Lắc đều hỗn hợp trong 1 hoặc 2 phút, để yên trong 15 phút, thêm 15 ml dung dịch KI 15% và 15 ml nước, lắc xoáy, để yên trong 1 phút và sau đó chuẩn độ iod được giải phóng ra bằng dung dịch natri thiosulfat 0,1N, dùng tinh bột TS là chất chỉ thị. Thực hiện chuẩn độ mẫu trắng sử dụng nước thay thế mẫu thử. Thể tích thực là số ml dung dịch natri thiosulfat 0,1N dùng để chuẩn độ glycerol và acid tartric trong mẫu thử có 5 ml Dung dịch I. Từ % xác định được trong Phương pháp thử Acid tartric tính thể tích dung dịch natri thiosulfat 0,1N dùng để chuẩn độ acid tartric. Chênh lệch giữa thể tích thực và thể tích tính toán được dùng đối với acid tartric là số ml của dung dịch natri thiosulfat 0,1N đã tiêu thụ bởi glycerol trong mẫu. Một ml dung dịch natri thiosulfat 0,1N tương đương với 2,303 mg glycerol và 7,505 mg acid tartric.



Dụng cụ chưng cất Hortvet-Sellier cải tiến

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 SUCROGLYCERID

1. Tên khác, chỉ số	INS 474
2. Định nghĩa	Sucroglycerid thu được nhờ phản ứng giữa sucrose với chất béo hoặc dầu ăn có hoặc không có mặt của dung môi. Sản phẩm gồm có hỗn hợp mono- và di-ester của sucrose và acid béo kết hợp với mono-, di- và triglycerid từ chất béo hoặc dầu. Chỉ các dung môi sau đây có thể được sử dụng trong sản xuất: dimethyl formamid, cyclohexan, isobutanol, isopropanol và ethyl acetat.
3. Cảm quan	Không mùi, dạng mềm, dạng đặc, dạng bột có màu trắng đến trắng nhạt, hoặc dạng gel cứng.
4. Chức năng	Chất nhũ hóa
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước lạnh, tan trong ethanol.
Acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.
Đường	Phải có phản ứng đặc trưng của đường.
5.2. Độ tinh khiết	
Tro sulfat	Không được quá 2%. Thử 2 g mẫu (Phương pháp I)
Chỉ số acid	Không được quá 6.
Sucrose tự do	Không được quá 5% (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Dimethyl-formamid	Không được quá 1 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Cyclohexan và isobutanol	Không được quá 10 mg/kg, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Ethyl acetat và isopropanol	Không được quá 350 mg/kg, dạng đơn chất hoặc hợp chất
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không được nhỏ hơn 40% và không được lớn hơn 60% ester sucrose

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Acid béo Cho 1 ml ethanol vào 0,1 g mẫu, làm ấm và hòa tan, thêm 5 ml dung dịch H_2SO_4 loãng TS, gia nhiệt trong cách thủy trong 30 phút và làm nguội. Chất đặc màu trắng vàng hoặc dầu được hình thành, và được hòa tan khi thêm 3 ml diethyl ether.

Đường Cho vào 2 ml lớp dung dịch nước tách ra từ chất đặc hoặc dầu trong phép thử acid béo, 1 ml anthron TS vào trong ống thử, cho chảy cẩn thận vào thành ống thử; bề mặt ranh giới giữa hai lớp chuyển thành màu xanh da trời hoặc xanh lá cây.

6.2. Độ tinh khiết

Sucrose tự do Xác định bằng sắc ký khí lỏng (xem Quyển 4)

Hóa chất, thuốc thử:

- Dung dịch nội chuẩn: Dung dịch cholesterol trong chloroform 5 mg/ml hoặc tetracosan trong chloroform 10 mg/ml
- Pyridin (làm khô được qua rây phân tử)
- N, O- Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA)
- Trimethylchlorosilan (TMCS)

Cách tiến hành: Cân chính xác 20 - 50 mg mẫu cho vào bình silyl hóa, thêm 1 ml dung dịch nội chuẩn, 1 ml pyridin, 0,5 ml N, O-bis (trimethylsilyl) acetamid (BSA) và 0,5 ml trimethylchlorosilan (TMCS). Đậy nắp bình và gia nhiệt ở 70^0C trong 30 phút. Bơm 1µl vào thiết bị sắc ký khí lỏng.

Các điều kiện sắc ký:

Cột:

- Chiều dài 0,3 m
- Đường kính trong 4 mm
- Chất liệu: thủy tinh
- Được nhồi bằng dexil

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 40 ml/phút

Detector: FID

Chương trình nhiệt độ: giữ ở 160^0C trong 1 phút sau đó tăng đến 160 - 375^0C với tốc độ 15^0C/phút.

Đo các diện tích pic của sucrose và nội chuẩn. Hệ số đáp ứng (RF) được tính từ quá trình chạy sắc ký khí lỏng với các dung dịch chuẩn sucrose chứa nội chuẩn.

Kết quả:

$$RF = \frac{\text{mg nội chuẩn x diện tích pic sucrose}}{\text{Diện tích pic nội chuẩn x mg sucrose}}$$

và

$$\%\ \text{sucrose tự do} = \frac{\text{mg nội chuẩn x diện tích pic sucrose x 100}}{\text{RF x diện tích nội chuẩn x mg mẫu}}$$

Dimethyl-formamid

Xác định bằng sắc ký khí lỏng

Hóa chất, thuốc thử:

- Dimethyl formamid
- Dimethylamin hydrochlorid
- Methanol
- Ethanol
- HCl
- NaOH

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc dimethylaminhydroclorid trong ethanol 4,47 mg/ml (tương đương với 4,0 mg/ml dimethyl formamid) và chuẩn bị một loạt các dung dịch chuẩn tương ứng với 4; 2 và 1 µg/ml dimethylformamid bằng cách pha loãng dung dịch gốc với dung dịch NaOH 0,1% trong ethanol.

Chuẩn bị mẫu:

Bộ dụng cụ thủy phân được trình bày trong phần Phụ lục. Cân chính xác 40 g mẫu cho vào bình đáy tròn dung tích 1.000 ml. Thêm 500 ml dung dịch NaOH 5% trong methanol, và gắn bình vào bộ dụng cụ thủy phân. Đặt bình cất Erlenmeyer chứa 10 ml dung dịch HCl 1% trong methanol vào bộ dụng cụ thủy phân. Gia nhiệt bình đáy tròn và chưng cất với sinh hàn ngược có nước làm mát trong 1 giờ, sau đó cất lấy 50 ml dịch cất được thì dừng lại. Cô dịch cất được cho đến khô trong cách thủy sôi. Hòa tan phần cặn bằng một lượng nhỏ ethanol, thêm 2,5 ml dung dịch NaOH 5% trong ethanol và pha loãng đến thể tích 25 ml bằng ethanol để chuẩn bị một dung dịch mẫu.

Cách tiến hành:

Bơm 2 µl dung dịch mẫu vào thiết bị sắc ký khí lỏng với các điều kiện dưới đây.

Đường chuẩn:

Chuẩn bị đường chuẩn bằng cách bơm 2 µl các dung dịch chuẩn vào thiết bị sắc ký khí.

Các điều kiện sắc ký:

Cột:

- Dài: 2m
- Đường kính trong: 2 mm
- Chất liệu: thủy tinh
- Cột nhồi: 10% amin 220 và KOH 10% trên nền chromosorb W yếu 80/100 đã được rửa acid yếu
- Luyện cột: Gia nhiệt tới 130^0C qua đêm với tốc độ dòng nitrogen 5 ml/phút

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 17 ml/phút

Detector: FID

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 198 $\pm 5^0$C
- Cột: 60^0C.

Tính kết quả:

Nồng độ dimethylformamid (C_{DFA}) tính theo công thức sau:

$$C_{DFA}\ (mg/kg) = \frac{C\ (\mu g/ml) \times 25\ (ml)}{W\ (g)}$$

Trong đó:

C: Nồng độ dimethylformamid phát hiện được (µg/ml)

W: Khối lượng mẫu (g)

Cyclohexan và isobutanol

Xác định bằng sắc ký khí lỏng (xem Quyển 4) sử dụng các điều kiện sau:

Hóa chất, thuốc thử:

- Dimethylformamid (tinh khiết dùng cho GLC)
- Cyclohexan (dùng cho quang phổ UV)
- Isobutanol (dùng cho phân tích)

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc cyclohexan và isobutanol trong dimethylformamid bằng cách dùng pipet lấy 130 µl cyclohexan và 125 µl isobutanol cho vào dimethylformamid và làm đầy đến thể tích 10 ml.

Từ dung dịch gốc trên pha một loạt các dung dịch chuẩn pha loãng có 5, 10 và 20 mg/kg cyclohexan và isobutanol. Vẽ đường đáp ứng bằng cách bơm 5 µl các dung dịch chuẩn đã pha loãng vào thiết bị sắc ký khí với các điều kiện sau.

Chuẩn bị mẫu thử:

Cân 5 g mẫu chính xác đến 10 mg cho vào bình có nắp đậy thủy tinh, thêm vào 5 g dimethylformamid và làm ấm để hòa tan. Làm nguội và bơm 5 µl vào thiết bị sắc ký khí với các điều kiện sau.

Cột:

- Dài: 3m
- Đường kính trong: 4,5 mm
- Chất liệu: thép không rỉ
- Chất nhồi: 20% carbowax 20 M trên Chromosorb G 60/80

Khí mang: heli (áp suất 1,6 bar)

Detector: ion hóa ngọn lửa

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 130^0C
- Cột: 130^0C
- Detector: 200^0C

Xác định nồng độ cyclohexan và isobutanol trong dung dịch mẫu (50%) bằng cách so sánh với các dung dịch chuẩn và nhân nồng độ với 2 để chuyển các kết quả cho phù hợp với sucroglycerid gốc.

Isopropanol và ethyl acetat

Xác định bằng sắc ký khí (xem Quyển 4) có buồng lấy mẫu không gian hơi sử dụng các điều kiện sau:

Hóa chất, thuốc thử:

- Isopropanol
- Ethyl acetat

Dung dịch chuẩn:

Lấy 1 g mỗi loại isopropanol và ethyl acetat vào một bình định mức và thêm nước cho đến khi đạt thể tích 100 ml, và pha loãng dung dịch này để được các dung dịch có nồng độ 0,02 - 0,4 g/100 ml.

Nếu cần, chuẩn bị các dung dịch chuẩn chứa tới 7 g/100 ml isopropanol và ethyl acetat.

Cách tiến hành:

Cân 1 g chính xác đến 0,1 g bột mẫu cho vào lọ mẫu. Thêm 5 µl nước vào lọ mẫu và nắp kín nhanh bằng septum. Để lọ mẫu vào

thiết bị sắc ký khí đã đặt trước chương trình và bắt đầu phân tích theo các điều kiện đề cập dưới đây.

Đường chuẩn:

Lấy 1 g bột ester của sucrose với các acid béo, không chứa dung môi hoặc các dung môi tồn dư đã biết, cho vào lọ mẫu, thêm 5 µl dung dịch chuẩn và đậy kín bằng septum. Để lọ mẫu vào thiết bị sắc ký khí đã đặt trước chương trình và bắt đầu phân tích theo các điều kiện đề cập dưới đây và vẽ được đường chuẩn của mỗi dung môi.

Cột:

- Dài: 30 m
- Đường kính trong: 0,53 mm
- Chất liệu: mao quản silica
- Fim mỏng: 100% methyl polysiloxan
- Luyện cột: Gia nhiệt tới 60^0C trong 2 - 3 giờ với tốc độ khí nitrogen khoảng 10 ml/phút.

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 5 ml/phút

Detector: ion hóa ngọn lửa

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 110^0C
- Cột: 40^0C.
- Detector: 110^0C

Buồng không gian hơi:

- Lượng mẫu: 1 g ± 0,1 g + 5 µl
- Nhiệt độ gia nhiệt mẫu: 80^0C
- Thời gian gia nhiệt mẫu: 40 phút
- Nhiệt độ syringe: 85^0C
- Thể tích mẫu dạng hơi: 0,4 ml

Kết quả: được tính theo công thức:

$$C_i = A_i \times Cf_i \times 1000$$

Trong đó:

C_i: Nồng độ dung môi i (mg/kg);

A_i: Diện tích pic dung môi i (µv.giây.);

Cf_i: Hệ số chuyển đổi dung môi i (độ dốc của đường chuẩn) (µg/µv.giây).

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

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

6.2. Định lượng Xác định bằng sắc ký lỏng cao áp (xem Quyển 4) sử dụng các điều kiện sau:

Chuẩn bị mẫu:

Cân chính xác 250 mg mẫu cho vào bình định mức 50 ml. Pha tới thể tích 50 ml bằng tetrahydrofuran và lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,5 µm.

Cách tiến hành:

Bơm 100 µl mẫu vào thiết bị sắc ký lỏng cao áp đã ổn định trước.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: Styren-divinylbenzen copolymer đối với sắc ký thẩm thấu qua gel (TSK-GEL G2000 (Supelco) hoặc tương đương)

Pha động: tetrahydrofuran dùng cho HPLC đã đuổi khí

Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút

Detector: RI (chỉ số khúc xạ)

Nhiệt độ:

- Cột: 38^0C.

- Detector: 38^0C

Ghi sắc ký đồ trong khoảng 90 phút.

Tính % ester sucrose trong mẫu:

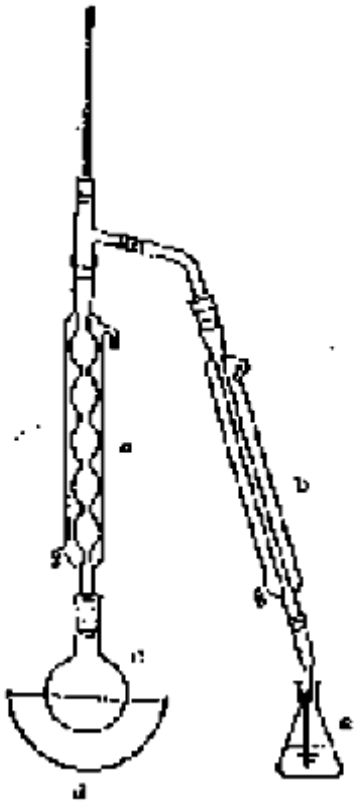
% ester sucrose = 100 A/T

Trong đó:

A: Tổng các diện tích pic đối với 3 thành phần chính, mono-, di- và tri-ester, rửa giải lần lượt ở khoảng 65, 68 và 73 phút.

T: Tổng diện tích tất cả các pic rửa giải trong khoảng 90 phút

Phụ lục:



Bộ dụng cụ thủy phân:

a: Sinh hàn ngược

b: Sinh hàn

c: Bình đáy tròn

d: Chậu nước

e: Bình Erlenmeyer

Phụ lục 6

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA POLYGLYCEROL VỚI CÁC ACID BÉO

1. Tên khác, chỉ số

Polyglycerol fatty acid esters, glyceryl fatty acid esters;

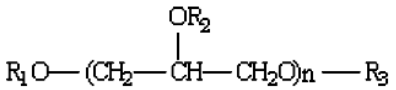
INS 475

2. Định nghĩa

Là các ester một phần hỗn hợp được tạo thành bằng phản ứng glycerol đã polymer hóa với mỡ và dầu ăn, hoặc với acid béo; có thể chứa một lượng nhỏ mono-, di- và triglyceride, glycerol tự do và polyglycerol, acid béo tự do và muối natri của các acid béo; độ polymer hóa có thể thay đổi và được chỉ ra bằng một con số (thí dụ là tri-, 3), đó là số trung bình nhóm (gốc) glycerol tính cho 1 phân tử polyglycerol. Một polyglycerol nhất định bao gồm một sự phân bố các mảnh phân tử đặc trưng cho độ polymer hóa danh định của nó. Bằng cách thay đổi tỷ lệ cũng như bản chất các chất béo hoặc acid béo phản ứng với polyglycerol, người ta thu được một nhóm lớn và đa dạng các sản phẩm ester này;

Các sản phẩm ester thương mại còn được đặc trưng với 1 số chỉ tiêu khác như chỉ số xà phòng hóa, điểm đông đặc của acid béo tự do, chỉ số iod, chỉ số hydroxyl và hàm lượng tro.

Công thức cấu tạo



Trong đó giá trị trung bình của n khoảng là 3 và mỗi R_1, R_2, R_3 có thể là của acid béo hoặc hydro.

3. Cảm quan

Dạng lỏng như dầu tới rất nhớt, có màu vàng sáng đến hổ phách; chất dẻo hoặc nhựa có màu vàng nhạt đến màu nâu; chất rắn hoặc chất sáp có màu vàng nhạt đến màu nâu.

4. Chức năng

Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Từ rất ưa nước tới rất ưa dầu, nhưng là một loại chất có xu hướng phân tán trong nước và hòa tan trong dung môi hữu cơ và các loại dầu.

Acid béo

Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.

Glycerol và polyglycerol

Phải có phản ứng đặc trưng của glycerol và polyglycerol.

5.2. Độ tinh khiết

Acid

Không phát hiện được acid nào ngoài acid béo.

Polyglycerol Phần polyglycerol gồm có không nhỏ hơn 70% di-, tri-, tetraglycerol và phải có không quá 10% polyglycerol bằng hoặc cao hơn heptaglycerol.

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Glycerol và polyglycerol Chấm 5 - 20 µl lớp dung dịch nước thu được trong phép thử acid béo Phép thử định tính các nhóm chức dọc theo các chấm đối chứng glycerol trên giấy Whatman số 3 và triển khai sắc ký đi xuống trong 36 giờ với hệ dung môi isopropanol: nước (90: 10). Vết glycerol di chuyển được 40 cm và tiếp sau là các polyglycerol được phát hiện lần lượt phía dưới sau glycerol khi giấy được phun hoặc permanganat trong aceton hoặc bạc nitrat trong amoniac.

6.2. Độ tinh khiết

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

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

Phụ lục 7
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI STEARYL CITRAT

1. Tên khác, chỉ số

INS 484

ADI = 0 - 50 mg/kg thể trọng, được thiết lập tại kỳ họp lần thứ 17 của JECFA (1973).

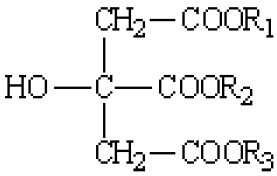
2. Định nghĩa

Được tổng hợp bằng cách ester hóa acid citric với cồn stearylic thương mại, có thể chứa n-octadecanol và đến 50% n-hexadecanol và đạt được các yêu cầu dưới đây.

Chế phẩm thương mại có thể được phân loại theo chỉ số xà phòng hóa; hàm lượng và thành phần của cồn stearylic; chỉ số iod; chỉ số acid và hàm lượng acid citric.

Công thức cấu tạo

Thành phần gần đúng



Trong đó R_1, R_2 và R_3 lần lượt có thể là $C_{18}H_{37}$ (stearyl), $C_{16}H_{33}$ (palmityl) hoặc H

3. Mô tả

Hợp chất nhờn, màu kem.

4. Chức năng

Chất tạo phức kim loại, chất nhũ hóa.

5. Tính chất

5.1. Định tính

Độ tan — Không tan trong nước và trong ethanol lạnh, tan trong ethanol nóng.

Cồn stearylic — Phải có phản ứng đặc trưng của cồn stearylic.

Citrat — Phải có phản ứng đặc trưng của citrat.

5.2. Độ tinh khiết

Các acid khắc và rượu khác — Không được có các acid khác ngoài acid citric và các rượu khác ngoài các rượu có mặt trong chế phẩm cồn stearylic thương mại.

Chất không tan trong cloroform — Không được quá 0,5% (mô tả trong phần Phương pháp thử).

Chì — Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Cồn stearylic — Thủy phân 2 g mẫu thử bằng cách đun hồi lưu trong 1 giờ với 50 ml dung dịch natri hydroxyd (TS) thu được dung dịch nước.

Làm mát và chiết với ether dầu hỏa. Lấy lớp ether dầu hỏa và cho bay hơi trên đĩa sứ hoặc thủy tinh. Phần không bay hơi phải có khoảng nóng chảy từ 43° đến 58°.

Citrat Lấy 5 ml dung dịch nước thu được trong phép thử cồn stearylic, thêm 1 ml dung dịch calci clorid (TS) và 3 giọt dung dịch xanh da trời bromothymol (TS), acid hóa nhẹ bằng dung dịch acid hydrocloric loãng (TS). Thêm dung dịch natri hydroxyd (TS) đến khi dung dịch chuyển thành màu xanh da trời sáng, sau đó đun sôi dung dịch trong 3 phút, lắc nhẹ trong khi đun. Trong dung dịch xuất hiện kết tủa trắng, kết tủa này không tan trong dung dịch natri hydroxyd (TS) nhưng tan trong dung dịch acid acetic (TS).

Lấy 10 ml dung dịch nước thu được trong phép thử cồn stearylic, thêm 1 ml dung dịch thủy ngân (II) sulfat (TS). Đun sôi hỗn hợp và thêm vài giọt dung dịch kali permanganat (TS). Trong dung dịch xuất hiện kết tủa trắng là muối thủy ngân của acid aceton dicarboxylic.

6.2. Độ tinh khiết

Chất không tan trong cloroform Hòa tan khoảng 50g (cân chính xác đến mg) mẫu trong 400 ml cloroform. Lọc dung dịch qua phễu lọc thủy tinh xốp số 3 đã cân bì (chính xác đến mg). Giữ phễu lọc còn ấm, rửa phần không tan bằng cloroform, sau đó sấy khô tại 100°.

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

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

Phụ lục 8
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI TRIKALI ortho-PHOSPHAT

1. Tên khác, chỉ số	Tripotassium phosphate; Tribasic potassium phosphate; Potassium phosphate. INS 340iii MTDI=70mg/kg thể trọng tính theo Phospho từ các nguồn thực phẩm
2. Định nghĩa	
Tên hóa học	Trikali phosphat; Trikali orthophosphat; Trikali monophosphat
Chỉ số C.A.S.	7778-53-2
Công thức hóa học	Dạng khan: K_3PO_4 Dạng hydrat: $K_3PO_4.xH_2O$
Khối lượng phân tử	212,27 (dạng khan)
3. Cảm quan	Dạng tinh thể hoặc hạt không màu hoặc màu trắng, không mùi; dạng hydrat gồm monohydrat và trihydrat
4. Chức năng	Đệm, chất nhũ hóa, chất tạo phức kim loại
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Dễ tan trong nước, không tan trong ethanol.
pH	11,5 - 12,5 (dung dịch 1/100).
Kali	Phải có phản ứng đặc trưng của kali.
Phosphat	Phải có phản ứng đặc trưng của phosphat.
ortho-phosphat	Phải có phản ứng đặc trưng của ortho-phosphat.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi nung	Dạng khan: Không được quá 3% (120°C trong 2 giờ, sau đó 800^{0}C trong 30 phút) Dạng hydrat: Không được quá 23% (120°C trong 2 giờ, sau đó 800°C trong 30 phút)
Các chất không tan trong nước	Không được quá 0,2%.
Fluorid	Không được quá 10,0 mg/kg.
Arsen	Không được quá 3,0 mg/kg (thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - phương pháp II).

Chì Không được quá 4,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng K_3PO_4 Không được thấp hơn 97,0% sau khi nung

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Kali Thêm 1 thể tích dung dịch natri hydrogen tartrat bão hòa và 1 thể tích dung dịch ethanol vào dung dịch mẫu thử (1/100) và lắc. Trong dung dịch phải xuất hiện kết tủa tinh thể trắng.

Phosphat Thêm 1ml dung dịch acid nitric và 5ml dung dịch nhôm molybdat (TS) vào 5ml dung dịch mẫu thử (1/100) và đun nóng. Trong dung dịch phải xuất hiện kết quả vàng nhạt.

ortho-phosphat Hòa tan 0,1g mẫu thử trong 10ml nước cất, acid hóa nhẹ dung dịch bằng acid acetic loãng (TS) và thêm 1ml bạc nitrat (TS). Trong dung dịch phải xuất hiện kết tủa màu vàng

6.2. Độ tinh khiết

Fluorid Cân 5 g mẫu thử cho vào một bình cầu cất 250 ml, thêm 25 ml nước, 50 ml acid percloric, 5 giọt dung dịch bạc nitrat (1 trong 2) và vài viên bi thủy tinh. Nối bình cầu với 1 sinh hàn có gắn nhiệt kế và một ống mao quản sục khí, đầu nhiệt kế và ống mao quản phải ngập trong dung dịch chứa trong bình. Gắn một phễu nhỏ giọt chứa nước hoặc bộ sinh hơi nước vào ống mao quản. Đặt bình trên tấm amiăng có lỗ sao cho 1/3 đáy bình tiếp xúc với ngọn lửa. Tiến hành cất đến khi nhiệt độ trong bình đạt 135°. Thêm nước từ phễu vào bình hoặc cho hơi nước qua bình để duy trì nhiệt độ trong bình luôn đạt 135°-140°. Tiếp tục cất đến khi thu được 225-240 ml dịch cất sau đó pha loãng dịch cất thu được với nước đến đủ 250 ml, lắc đều. Lấy 50 ml dung dịch này cho vào một ống Nessler 100 ml. Trong một ống Nessler tương tự khác lấy 50 ml làm mẫu chứng. Thêm vào mỗi ống 0,1 ml dung dịch natri alizarinsulfonat (1 trong 1000) đã lọc và 1 ml dung dịch hydroxylamin (1 trong 4000) mới pha, lắc đều. Thêm từng giọt dung dịch natri hydroxyd 0,05 N vào ống chứa dịch cất, vừa thêm vừa khuấy, đến khi màu ống chứa dịch cất giống với màu ống chứng là màu hồng nhạt. Sau đó thêm vào mỗi ống ống chính xác 1 ml dung dịch acid hydrocloric 0,1 N và lắc đều. Sử dụng buret chia vạch 0,05 ml thêm từ từ vừa đủ dung dịch thori nitrat (1 trong 4000) vào ống chứa dịch cất để sau khi lắc đều màu của dung dịch chuyển về màu hồng nhạt. Ghi thể tích dung dịch thori nitrat (1 trong 4000) đã sử dụng, thêm chính xác lượng dung dịch thori nitrat (1 trong 4000) như vậy vào ống

chứng, lắc đều. Dùng buret thêm dung dịch natri fluorid (TS) (10 µg F / ml) vào ống chứng để cho màu hai ống giống nhau sau khi pha loãng về cùng thể tích. Lắc đều, để yên cho bọt khí thoát hết trước khi so màu. Kiểm tra điểm tương đương bằng cách thêm 1-2 giọt dung dịch natri fluorid (TS) vào ống chứng. Sự thay đổi màu rõ rệt sẽ xảy ra. Ghi lại thể tích dung dịch natri fluorid (TS) đã sử dụng.

Thể tích dung dịch natri fluorid (TS) sử dụng không được quá 1 ml.

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

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

6.3. Định lượng Cân mẫu thử (chính xác đến mg), khối lượng tương đương với 8g K_3PO_4 khan, hòa tan vào trong 40 ml nước cất trong cốc 400ml. Thêm 100ml dung dịch acid hydrocloric 1N. Sục không khí đã khử carbon dioxyd vào dung dịch, chỉ sao cho bọt khí nhỏ, thời gian sục 30 phút để đuổi hết carbon dioxyd, đậy nhẹ cốc để tránh mất dung dịch trong khi sục. Rửa nắp và thành cốc bằng nước cất và cho điện cực của pH kế thích hợp vào dung dịch. Chuẩn độ dung dịch bằng dung dịch natri hydroxyd 1N đến điểm uốn tại pH~4, sau đó tính thể tích (A) dung dịch acid hydrocloric 1N đã sử dụng. Bảo vệ dung dịch để tránh hấp thụ carbon dioxyd từ không khí và tiếp tục chuẩn độ với dung dịch natri hydroxyd 1N đến điểm uốn tại pH~8,8. Tính thể tích (B) dung dịch natri hydroxyd 1N đã tiêu tốn trong chuẩn độ này.

Nếu (A) ≥ 2(B), mỗi ml natri hydroxyd 1N trong thể tích (B) tương đương với 212,3mg K_3PO_4.

Nếu (A) < 2(B), mỗi ml natri hydroxyd 1N trong hiệu thể tích (A)-(B) tương đương với 212,3mg K_3PO_4.

Phụ lục 9
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CÁC MUỐI AMONI CỦA ACID PHOSPHATIDIC

1. Tên khác, chỉ số

Ammonium phosphatides, Emulsifier YN, Mixed ammonium salts of phosphorylated glycerides;

INS 442

ADI = 0 -30 mg/kg thể trọng

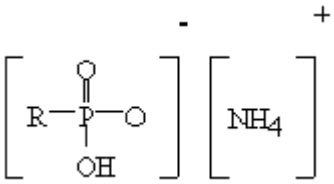
2. Định nghĩa

Chế phẩm này chủ yếu gồm hỗn hợp các hợp chất amoni của các acid phosphatidic bắt nguồn từ chất béo ăn được (thường là dầu hạt cải hydrogen hóa một phần). Là một mono- hoặc diglycerid có thể được gắn phosphor. Tuy nhiên, hai ester phosphor có thể liên kết với nhau ở dạng phosphatidyl phosphatid. Chế phẩm được sản xuất bằng cách phân hủy chất béo bằng glyceryl, sau đó phosphoryl hóa bằng phosphor pentoxyd, và trung tính hóa bằng amoniac.

Là mặt hàng thương mại có thể có quy định thêm những chi tiết cụ thể như hàm lượng nước, tạp chất không tan trong hexan, chất vô cơ không tan trong hexan, giá trị pH và hàm lượng triglycerid.

Công thức cấu tạo

(thành phần gần đúng)



Trong đó R có thể là một gốc mono- hoặc di-glycerid

3. Cảm quan Chất nửa rắn trơn nhờn.

4. Chức năng Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Không tan trong nước, tan một phần trong ethanol và aceton; tan trong chất béo.

Phosphat Phải có phản ứng đặc trưng của phosphat.

Acid béo Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.

Glyceryl Phải có phản ứng đặc trưng của glyceryl.

5.2. Độ tinh khiết

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng Hàm lượng phosphor không được nhỏ hơn 3,0% và không lớn hơn 3,4% theo khối lượng; hàm lượng nitrogen amoni không được nhỏ hơn 1,2% và không lớn hơn 1,5%.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Phosphat Nung 1 g mẫu thử với 2 g natri carbonat khan. Để nguội và hòa tan cắn trong 5 ml nước và 5 ml acid nitric. Thêm 5 ml amoni molybdat (TS) và đun tới sôi. Xuất hiện tủa màu vàng.

Acid béo Đun hồi lưu 1 g chế phẩm thử trong 1 giờ với 25 ml kali hydroxyd 0,5 N trong ethanol. Amoniac bay ra từ phía đầu của ống sinh hàn hồi lưu, nhận ra bằng mùi của nó và phản ứng trên giấy quy đỏ ẩm. Làm lạnh cắn tới 0^oC, tủa xà phòng kali tạo thành.

6.2. Độ tinh khiết

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

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

6.3. Định lượng

Phosphor <u>Phương pháp quang phổ hấp thụ</u>

<u>Thuốc thử và dung dịch làm việc</u>

Acid sulfuric: tỷ trọng tương đối 1,84

Acid nitric: tỷ trọng tương đối 1,42

Acid perchloric: 60%, tỷ trọng tương đối 1,54

Dung dịch vanadat-molybdat: hòa tan riêng trong nước 20 g amoni molybdat và 1 g amoni vanadat. Trộn hai dung dịch, thêm 140 ml acid nitric đặc và pha loãng tới 1000 ml bằng nước. Lắc đều.

Dung dịch phosphat chuẩn: Dung dịch gốc: hòa tan 3,8346 g kali dihydro phosphat, đã làm khô ở 110ºC, vào trong nước và pha loãng tới 1000 ml; 1 ml dung dịch này = 2,0 mg P_2O_5.

Dung dịch chuẩn làm việc phosphat: Chuyển 50,0 ml dung dịch phosphat chuẩn (1ml = 2,0 mg P_2O_5) vào bình định mức 500 ml và pha loãng tới vạch bằng nước và lắc đều. 1 ml dung dịch chuẩn làm việc phosphat = 0,2 mg P_2O_5.

<u>Tiến hành</u>

Cân chính xác 1,5 tới 1,6 g mẫu thử vào một bát thủy tinh nhỏ và cho vào trong bình Kjeldahl 300-ml chứa 5 ml acid sulfuric và 10 ml acid nitric. Đun nóng bình, đầu tiên đun nhẹ và lắc liên tục, sau đó đun mạnh hơn trên ngọn lửa trần. Thêm nhiều lần tại các thời điểm khác nhau mỗi lần một lượng acid nitric, làm nguội

bình trước khi thêm, và tiếp tục đun tới khi thu được dịch phân hủy trong và có màu vàng kim. Để nguội, thêm 5 ml acid percloric 60% và tiếp tục oxy hóa tới khi tạo thành khói acid trắng trong bình. Lại làm nguội và thêm 5 ml nước và tiếp tục đun tới khi hết khói trắng bay lên. Để nguội, pha loãng cẩn thận bằng nước, lại để nguội và chuyển toàn lượng sang bình định mức 500-ml. Pha loãng tới vạch bằng nước và lắc đều (Dung dịch thử).

Làm một mẫu trắng phân hủy đúng theo cách như trên nhưng không cho mẫu thử và sử dụng cùng thể tích acid như đã dùng để vô cơ hóa ướt mẫu thử (Dung dịch trắng phân hủy).

Cho vào các bình định mức 100-ml riêng, thêm từ buret:

(a) 25,0 ml dung dịch chuẩn làm việc phosphat (= 5,0 mg P_2O_5),

(b) 30,0 ml dung dịch chuẩn làm việc phosphat (= 6,0 mg P_2O_5),

(c) 25 ml dung dịch thử chứa từ 5 đến 6 mg P_2O_5

Cho vào mỗi bình chứa phosphor chuẩn, (a) và (b), một lượng dung dịch trắng phân hủy có cùng thể tích như dung dịch cho vào (c), để bù đối với vết phosphor có thể có do thuốc thử phân hủy acid mà nó có thể có trong dung dịch thử.

Cho vào mỗi bình 25 ml thuốc thử vanadat-molybdat, lắc đều, pha loãng bằng nước tới gần 100 ml, lắc đều, điều chỉnh nhiệt độ của dung dịch tới 20ºC, pha loãng tới vạch bằng nước và lắc đều.

Sau 10 phút, đo độ hấp thụ của cả dung dịch 6 mg P_2O_5 và dung dịch thử, mẫu trắng là dung dịch chứa 5 mg chất chuẩn. Dùng cốc đo 1 cm và đo ở bước sóng 420 nm, hoặc kính lọc Ilford 604 nếu dùng máy so màu quang điện.

Tính toán

$$\%\ \text{phosphor} = \left[5 + \frac{A_t}{A_{6mg}}\right] \times \frac{0,873}{m}$$

Trong đó:

A_t = hiệu độ hấp thụ giữa chuẩn 5 mg và dung dịch thử

$A_{6\,mg}$ = hiệu độ hấp thụ giữa chuẩn 6 mg và 5 mg

m = khối lượng mẫu thử (g)

Xác định nitrogen amoni

Thiết bị cất kéo hơi nước

Thiết bị gồm một bình 2-L đậy nút cao su, lắp xuyên qua nút có một ống thủy tinh khoảng 7,5 cm, được lắp sao cho đầu dưới của ống gần sát đáy bình, và một đoạn ống hình chữ L ngắn hơn lắp

sao cho ống chĩa ngang khoảng 6 mm bên dưới bề mặt của nút, để hoạt động như ống ra của luồng hơi nước. Bình được thêm nước cất đã acid hóa nhẹ bằng acid sulfuric loãng (TS) tới khoảng 2/3 thể tích bình và vài mảnh thủy tinh xốp để tránh trào khi hỗn hợp trong bình sôi mạnh. Bình này dùng làm nguồn cung cấp hơi nước. Có thể lắp một vòi vào bình nếu muốn dễ dàng bổ sung nước vào bình giữa các lần xác định.

Ống ra của hơi được nối qua một bẫy ngưng tới đầu vào của đầu cất hơi, nối vào một bình cầu đáy tròn cổ ngắn 1-L cổ bình cỡ B34. Đầu cất phải sao cho ống đầu vào của hơi gần chạm đáy bình 1-L và đầu ra phải nối với hai bẫy tránh bắn, một gần đỉnh của bình 1-L và cái kia gần đỉnh của một sinh hàn thẳng đứng, nối cỡ B19, nối với đầu cất. Sinh hàn thẳng phải lắp với ống đầu ra kéo dài, chạm tới đáy của một bình nón 500-ml.

Thuốc thử

Dung dịch acid boric 2% (kl/tt) trong nước

Dung dịch natri hydroxyd 40% (kl/tt) trong nước

Acid hydrocloric 0,02 N

Hỗn hợp chỉ thị: Trộn 5,0 ml dung dịch xanh lục bromocresol 0,1% (kl/tt) trong alcol và 2,0 ml dung dịch đỏ methyl 0,1% (kl/tt) trong alcol và pha loãng tới 30 ml bằng alcol 95%.

Dịch silicon 200/50 MS

Tiến hành

Lắp và cho hơi nước đi qua thiết bị. Cân chính xác khoảng 0,2 g mẫu thử muối amoni của acid phosphatidic trung tính vào trong một lọ thủy tinh nhỏ (đường kính khoảng 18 mm, sâu khoảng 12 mm). Chuyển lọ và mẫu thử đã cân vào bình cất và thêm khoảng 250 ml nước cất. Nối đầu cất và bẫy chống bắn với bình cất và sinh hàn đứng, lắp sinh hàn sao cho đầu ra ngập dưới bề mặt của 10 ml acid boric 2% và 1 ml hỗn hợp chỉ thị đựng trong bình nón 500-ml.

Thêm vào bình cất qua phễu gắn bằng một ống cao su ngắn vào ống dẫn hơi nước vào, 75 ml natri hydroxyd 40%, và rửa vào trong bằng nước cất. Bỏ phễu và nối ống vào của hơi với nguồn cung cấp hơi. (Có thể cho natri hydroxyd vào bình qua phễu có khóa, lắp với bình cất nếu muốn và rửa phía trong bằng nước cất. Nếu làm như vậy phải duy trì một lớp chất lỏng trên phễu trong suốt quá trình thêm và cất). Cất kéo mạnh bằng hơi nước hỗn hợp trong bình cất và thu lấy 200 ml dịch cất vào trong acid boric. Trong quá trình cất khuấy nhẹ bình cất nếu cần, để tránh

mẫu thử bị lắng đọng xung quanh bề mặt phía trên của bình. Khi đã thu đủ lượng dịch cất theo yêu cầu, hạ thấp bình hứng, ngừng cung cấp hơi nước và rửa phía trong của sinh hàn và bên ngoài đầu phía dưới với một lượng nhỏ nước cất, gộp dịch rửa vào bình hứng.

Chuẩn độ hỗn hợp trong bình hứng bằng acid hydrocloric 0,02 N. Làm ít nhất một mẫu trắng tiến hành theo cùng cách nhưng không có mẫu thử.

Trong quá trình cất có thể có bọt xuất hiện của hỗn hợp trong bình cất. Nếu có, thêm 2 giọt dịch silicon vào bình cất tại thời điểm cho mẫu thử; và một lượng tương tự được cho vào mẫu trắng.

Tính toán

Mỗi ml HCl 0,02 N = 0,2802 mg nitrogen.

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{V_t - V_o}{m_t} \times 28{,}02$$

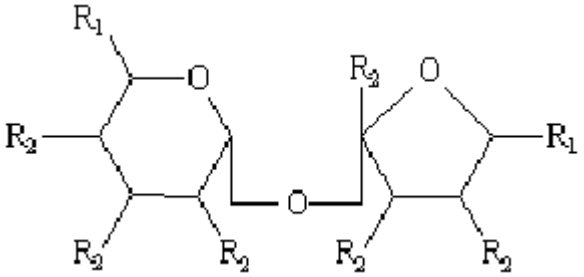
Trong đó

V_t = thể tích dung dịch HCl 0,02 N dùng chuẩn độ mẫu thử (ml)

V_o = thể tích dung dịch HCl 0,02 N dùng chuẩn độ mẫu trắng (ml)

m_t = khối lượng mẫu thử (mg).

Phụ lục 10
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SUCROSE ACETAT ISOBUTYRAT

1. Tên khác, chỉ số	SAIB INS 444
2. Định nghĩa	Hỗn hợp được tạo thành bằng cách este hóa sucrose thực phẩm với anhydrid acetic và anhydrid isobutyric và chưng cất. Hỗn hợp bao gồm tất cả các este với tỷ lệ phân tử của acetat và isobutyrat là khoảng 2:6
Tên hóa học	Sucrose diacetat hexaisobutyrat
Chỉ số C.A.S	137204-24-1; 27216-37-1; 126-13-6
Công thức hóa học	$C_{40}H_{62}O_{19}$ đối với sucrose diacetat hexaisobutyrat
Công thức cấu tạo	 Trong đó R_1 = $-CH_2OCOCH_3$ R_2 = $-CH_2OCOCH(CH_3)_2$, hoặc $-OCOCH(CH_3)_2$
Khối lượng phân tử	832 - 856 $C_{40}H_{62}O_{19}$ = 846,9
3. Cảm quan	Dạng lỏng màu vàng nhạt, không cặn và có mùi nhẹ
4. Chức năng	Chất nhũ hóa, chất điều chỉnh độ đậm đặc, chất tạo đục đối với đồ uống không cồn
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước, tan trong hầu hết dung môi hữu cơ.
Chỉ số khúc xạ	n (40, D): 1,4492 - 1,4504
Khối lượng riêng	d (25, 25): 1,141 - 1,151
Hấp thụ hồng ngoại	Phổ hồng ngoại của mẫu thử phân tán trong kali bromid tương ứng với phổ hồng ngoại chuẩn trong Phụ lục.

5.2. Độ tinh khiết

Chỉ số acid	Không được quá 0,2 (sử dụng 50 g mẫu thử).
Chỉ số xà phòng hóa	Giữa 524 và 540 (sử dụng 1 g mẫu thử)
Triacetin	Không được quá 0,1%.
Chì	Không được quá 2 mg/kg.
5.3. Hàm lượng $C_{40}H_{62}O_{19}$	Không được nhỏ hơn 98,8% và không được quá 101,9%.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Triacetin Sử dụng phương pháp sắc ký khí như sau:

<u>Dụng cụ, thiết bị:</u>

Máy sắc ký khí được trang bị detector ion hóa ngọn lửa

Cột: thép không rỉ, dài 1,5 m, đường kính trong là 3,2 mm.

<u>Chuẩn bị mẫu:</u>

Pha loãng mẫu thử bằng cách cho thêm một thể tích carbon disulfid tương đương.

<u>Điều kiện:</u>

Pha tĩnh: SE-30, 3%

Pha rắn: Chromosorb AW-DMCS, 80-100 mesh

Khí mang: Heli

Tốc độ khí: 20 ml/min

Nhiệt độ

- Cột: Chương trình nhiệt độ: ngay sau khi bơm mẫu, nhiệt độ cột tăng từ 100^0C lên đến 300^0C, tốc độ tăng 10^0C/phút.

- Nhiệt độ buồng bơm: 300^0C

Thể tích bơm mẫu: 1 µl

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

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

6.2. Định lượng

Sử dụng chỉ số xà phòng hóa, tính % $C_{40}H_{62}O_{19}$ theo công thức:

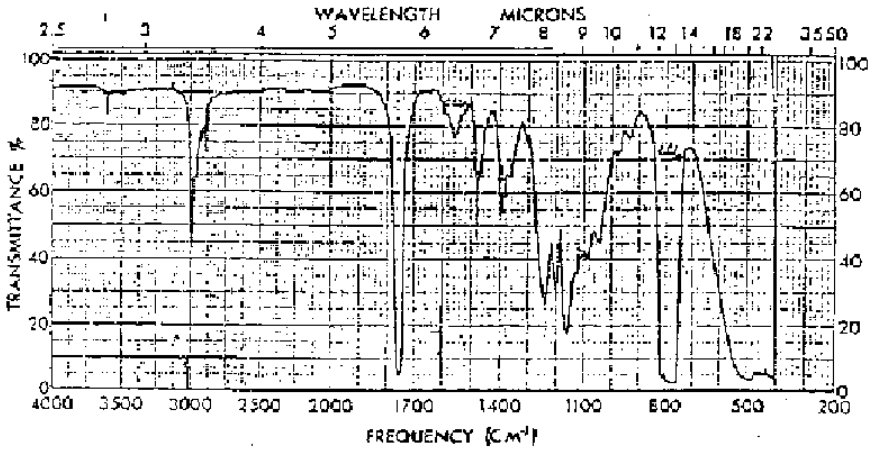
$$\frac{SV \times 0.10586}{56.1} \times 100$$

Trong đó

SV = chỉ số xà phòng hóa

Phổ hồng ngoại

Sucrose acetat isobutyrat



Phụ lục 11
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA GLYCEROL VỚI NHỰA CÂY

1. Tên khác, chỉ số	Ester gum; INS 445
2. Định nghĩa	Ester phức hợp của triglycerol và diglycerol với các acid từ nhựa gỗ thông thu được nhờ quá trình trích ly gốc cây thông lâu năm bằng dung môi sau đó được tinh chế trong hệ dung môi lỏng-lỏng. Loại trừ khỏi các yêu cầu kỹ thuật này là các dẫn xuất của gum nhựa, dịch tiết ra từ cây thông sống, nhựa dầu thông cao và sản phẩm phụ của quá trình sản xuất bột giấy. Sản phẩm cuối cùng gồm có 90% acid nhựa và 10% chất trung tính (chất không acid). Phần acid nhựa là một phức hợp của các đồng phân acid monocarboxylic diterpenoid có công thức thực nghiệm điển hình là $C_{20}H_{30}O_2$, trong đó thành phần chính là acid abietic. Glycerol ester của nhựa gỗ thông được tinh chế bằng phương pháp bốc hơi nước hoặc chưng cất ngược dòng.
Mã số C.A.S.	8050-30-4
3. Cảm quan	Chất rắn màu vàng đến màu hổ phách nhạt
4. Chức năng	Thành phần base trong kẹo cao su, chất nhũ hóa, chất ổn định, chất độn, chất điều chỉnh hương liệu trong đồ uống
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Không tan trong nước, tan trong aceton
Hấp thụ hồng ngoại	Phổ hồng ngoại của lớp mỏng mẫu được đặt trên tấm kali bromid tương ứng với phổ hồng ngoại điển hình dưới đây
Alcol nhựa và glycerol nhựa	Phải có phản ứng đặc trưng của alcol nhựa và glycerol nhựa.
5.2. Độ tinh khiết	
Không có mặt nhựa dầu cao (Lưu huỳnh)	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần phương pháp thử).
Tỷ trọng	d (20, 25): Không được nhỏ hơn 0,935 khi xác định trong dung dịch 50% trong d-limonen (97%, điểm sôi 175,5 - 176,0^{0}C, d (20, 4): 0,84)
Điểm nóng chảy	82 - 90^{0}C (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Chỉ số acid	3 - 9

Chỉ số hydroxyl 15 - 45 (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Alcol nhựa và glycerol nhựa Các nhóm ester phức tạp trong ester của glycerol nhựa gỗ thông được khử bằng phản ứng với một hydrid kim loại (natri bis (2-methoxy-ethoxy) nhôm dihydrid) trong dung dịch toluen để tạo thành một hỗn hợp của alcol nhựa và glycerol nhựa. Chất khử dư sau đó được thủy phân bằng dung dịch acid tạo thành hai pha. Sắc ký khí của pha toluen tạo ra một sắc ký đồ của alcol nhựa cấu thành ester nhựa gỗ thông và có thể phân biệt với các ester gum và ester nhựa dầu cao. Nhựa gỗ có thể phân biệt được với nhựa dầu cao dựa vào tỷ lệ của abietyl và dehydroabietyl alcol: trong nhựa gỗ abietyl chiếm ưu thế, trong khi nhựa dầu cao, dehydroabietyl chiếm ưu thế. Nhựa gỗ có thể phân biệt được với gum rosin dựa vào tỷ lệ của isopimaryl và palustryl alcol: trong nhựa gỗ isopimaryl chiếm ưu thế, trong khi gum rosin, palustryl chiếm ưu thế. Sắc ký của pha trung tính trong nước trên cột khác kiểm tra sự xuất hiện của glycerol.

Thiết bị, dụng cụ:

- Sắc ký khí được trang bị detector ion hóa ngọn lửa
- Cột sắc ký I: Column I: DB-1 methyl silicon (ngoại quan và liên kết chéo), cột mao quản dài 15 m, đường kính trong 0,53 mm, dày 1,5 µm, dải nhiệt độ 60 - 300/320^{0}C (Ví dụ: J & W Scientific Inc,. Cat. No. 125-1012). Có đường dẫn bơm hơi nhanh, trực tiếp.
- Cột sắc ký II:: DB-Wax polyethyleneglycol (ngoại quan và liên kết chéo), cột mao quản dài 15 m, đường kính trong 0,53 mm, dày 1,0 µm, dải nhiệt độ 20 - 230^{0}C (Ví dụ: J & W Scientific Inc,. Cat. No. 125-7012).
- Bộ ghi: 0 - 1V
- Syringe: 1 µl
- Pipet: 3,0 ml; 5,0 ml
- Bình Erlenmeyer: 25 ml
- Lọ: 17 ml
- Cân phân tích: cân chính xác đến 0,001 g
- Ống ly tâm có vạch định mức: 15 ml
- Máy ly tâm: có thể đạt tốc độ 3.200 vòng/phút
- Thanh khuấy: được bao bằng Teflon, kích thước 1 inch

- Máy khuấy từ

Hóa chất, thuốc thử:

- Toluen tinh khiết

- Natri Vitride ™ [natri bis (2-methoxyethoxy) nhôm dihydrid, thường xấp xỉ 70% trong toluen (khoảng 3,5 mol/l)] (Tập đoàn hóa chất Fluka ., Hauppage, NY, Mỹ). Lấy 10 ml cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Pha đến thể tích 100 ml bằng toluen và lắc đều.

- Dung dịch thủy phân: Thêm từ từ 50 ml dung dịch H_2SO_4 đậm đặc, tinh khiết vào 200 ml nước cất đồng thời khuấy trong chậu nước đá. Làm nguội tới nhiệt độ phòng.

- Dung dịch phenolphthalein: 1% trong ethanol.

- Dung dịch NaOH: hòa tan 16 g NaOH trong 70 - 80 ml nước cất và làm nguội tới nhiệt độ phòng. Pha tới 100 ml bằng nước cất và lắc đều. Để trong bình polyethylen.

- 1, 4- Butandiol: 99%

- Glycerol: 99%

- Dung dịch nội chuẩn: Cân 0,1 g 1, 4- butandiol cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Pha tới thể tích 100 ml bằng nước cất và lắc đều.

- Dung dịch glycerol: Cân 0,1 g 1, 4- butandiol và 0,1 g glycerol cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Pha tới thể tích 100 ml bằng nước cất và lắc đều.

<u>Điều kiện chạy sắc ký khí:</u>

I (alcol nhựa)

Nhiệt độ:

- Cột: 190^0C, đẳng nhiệt
- Đầu vào: 250^0C
- Detector: 250^0C

Tốc độ dòng:

- Khí mang (He): 30 ml/phút tại 63 psi
- H_2: 30 ml/phút
- Không khí: 240 ml/phút

II (glycerol)

Nhiệt độ:

- Cột: đặt theo chương trình, 120 - 200^0C với tốc độ 6^0C/phút
- Đầu vào: 250^0C
- Detector: 250^0C

Tốc độ dòng:

- Khí mang (He): 30 ml/phút tại 63 psi
- H_2: 30 ml/phút
- Không khí: 240 ml/phút

Cách tiến hành I (đối với nhựa):

Cân 250 - 300 mg mẫu cho vào bình Erlenmeyer dung tích 25 ml có thanh khuấy từ. Dùng pipet lấy 5,0 ml toluen cho vào bình và khuấy từ cho đến khi mẫu được hòa tan. Lấy 5,0 ml Natri Vitride™ cho vào bình, đậy nắp bình và khuấy trong 30 phút. Mở nắp ra đồng thời khuấy, dùng pipet lấy 3,0 ml dung dịch thủy phân cho vào bình. Tiếp tục khuấy trong 3 phút. Chuyển hỗn hợp trong bình vào ống li tâm, đậy nắp và lắc đều. Cho thoát khí và ly tâm với tốc độ 2.800 - 3.200 vòng/phút trong 5 phút. Bơm 0,5 µl lớp trên vào thiết bị sắc ký khí với các điều kiện kỹ thuật đã đặt và ghi sắc ký đồ. So sánh với các sắc ký đồ được biểu thị phía dưới để xác nhận thứ tự thời gian lưu của các alcol nhựa.

Cách tiến hành II (đối với glycerol)

Dùng pipet hoặc syringe hypodermic, loại bỏ lớp toluen và một phần dung dịch nước và để lại khoảng 2 ml dung dịch nước trong ống ly tâm. Thêm 1 giọt dung dịch phenolphthalein và trung hòa bằng dung dịch NaOH. Các muối nhôm sẽ kết tủa. Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch nội chuẩn cho vào ống, pha đến 15 ml bằng nước cất, đậy nắp, lắc và ly tâm với tốc độ 2.800 - 3.200 vòng/phút trong 5 phút. Bơm 1 µl dịch trong trên bề mặt vào thiết bị sắc ký khí với các điều kiện kỹ thuật đã đặt và ghi sắc ký đồ. Bơm 1 µl dung dịch glycerol và ghi sắc ký đồ. Đo các thời gian lưu của bất kỳ các pic so với 1,4- butandiol. So sánh các thời gian lưu với thời gian lưu của glycerol.

6.2. Độ tinh khiết

Không có nhựa dầu cao (Lưu huỳnh)

Khi các hợp chất hữu cơ có chứa lưu huỳnh được gia nhiệt với sự có mặt của natri format, lưu huỳnh chuyển hóa thành hydrogen sulfid được phát hiện bằng cách sử dụng giấy chì acetat. Phép thử dương tính cho thấy việc sử dụng nhựa dầu cao thay cho nhựa gỗ.

Thiết bị, dụng cụ:

- Ống thử: loại tiêu chuẩn, kích thước 10 x 70 mm, làm bằng thủy tinh chịu nhiệt.
- Đèn Bunsen: Thường dùng cỡ nhỏ dạng ngọn lửa nhỏ

Hóa chất, thuốc thử:

- Dung dịch natri format: hòa tan 20 g natri format tinh khiết (NaOOCH) trong 100 ml nước cất.
- Giấy thử chì acetat: dạng thương mại có sẵn của hầu hết các nhà cung cấp hóa chất.

Cách tiến hành:

Cân 40 - 50 mg mẫu cho vào ống thử và thêm 1 -2 giọt dung dịch natri format 20% (khối lượng/thể tích). Để dải giấy thử chì acetat trên miệng ống thử. Gia nhiệt ống thử bằng ngọn lửa cho đến khi khói được hình thành và tiếp xúc với giấy thử. Tiếp tục gia nhiệt trong 2 - 5 phút. Không được có đốm đen của chì sulfid hình thành, nếu có đốm đen thì chứng tỏ sự có mặt của các hợp chất chứa lưu huỳnh. (Giới hạn phát hiện: 50 mg/kg lưu huỳnh).

Điểm nóng chảy

Điểm nóng chảy được định nghĩa là nhiệt độ tại đó một đĩa mẫu được giữ bên trong một chiếc nhẫn nằm ngang giảm xuống một khoảng 25,4 mm dưới trọng lượng của một cầu thép khi mẫu được gia nhiệt với tốc độ quy định trong chậu cách thủy hoặc cách glycerol.

Thiết bị:

Thiết bị được minh họa trong Hình 1 và Hình 2 gồm có các bộ phận được mô tả trong các phần dưới đây.

Chiếc nhẫn: được làm bằng đồng thau phù hợp với kích thước trình bày trong Hình 1a. Nếu cần, vòng có thể được gắn bằng cách hàn hoặc cách khác thuận tiện với một dây đồng thau loại 13 B&S (đường kính 0,06 - 0,08 inch hoặc 1,52 - 2,03 mm) được trình bày ở Hình 2a.

Quả cầu: thường dùng quả cầu được làm bằng thép có đường kính 3/8 inch (9,53 mm), khối lượng 3,45 - 3,55 g.

Hướng dẫn chỉnh tâm quả cầu: Hướng dẫn chỉnh tâm quả cầu được làm đồng thau và có hình dạng, kích thước chung được minh họa trong Hình 1c, có thể được sử dụng nếu muốn.

Dụng cụ chứa:

Sử dụng bình thủy tinh chịu nhiệt như cốc Griffin dạng lùn dung tích 800 ml, đường kính không được nhỏ hơn 3,34 inch (8,5 cm) và chiều sâu tính từ đáy đến phần loe ra không được nhỏ hơn 5 inch (12,7 cm).

Dụng cụ giữ chiếc nhẫn và nhiệt kế:

Bất kỳ dụng cụ hữu hiệu nào phù hợp với các yêu cầu sau dùng để giữ vòng và nhiệt kế đều có thể được sử dụng: (1) Vòng nhẫn có thể được giữ ở vị trí nằm ngang; (2) khi sử dụng thiết bị mô tả trong Hình 1d, đáy của vòng tròn nằm trên và cách tấm nằm ngang phía dưới 1 inch (25,4 mm), bề mặt đáy của tấm nằm ngang cách ít nhất 0,5 inch (13 mm) và không được quá 0,75 inch (18 mm) so với đáy của dụng cụ chứa ở bên trên, chiều sâu

của dịch lỏng trong dụng cụ chứa không được nhỏ hơn 4,0 inch (10,2 cm); (3) khi sử dụng thiết bị đưa ra ở Hình 1e, đáy của vòng tròn cách 1 inch (25,4 mm) so với đáy của dụng cụ chứa ở phía trên, với điểm dưới cùng của thanh nghỉ đặt trên đáy của dụng cụ chứa và chiều sâu của dịch lỏng trong dụng cụ chứa không được nhỏ hơn 4,0 inch (10,2 cm) như mô tả ở Hình 1 a, b và c; (4) trong cả hai dụng cụ, nhiệt kế được treo lên sao cho khoảng cách từ đáy của bầu nhiệt kế đến đáy của chiếc nhẫn khoảng 0,5 inch (13 mm) nhưng không được chạm vào nhẫn.

Nhiệt kế thủy ngân:

Phụ thuộc vào điểm nóng chảy của mẫu, sử dụng hoặc nhiệt kế ASTM 15C (-2 đến 80^{0}C) đối với loại có điểm nóng chảy thấp hoặc nhiệt kế ASTM 16C (30 - 200^{0}C) đối với loại có điểm nóng chảy cao.

Máy khuấy:

Sử dụng máy khuấy thích hợp với tốc độ 500 - 700 vòng/phút. Để đảm bảo phân tán nhiệt đều trong môi trường nóng, hướng của trục quay nên đẩy dịch lỏng lên phía trên. (Xem Hình 2d).

Chuẩn bị mẫu:

Lấy mẫu đại diện gồm các mảnh vừa mới bị vỡ có bề mặt chưa bị oxy hóa. Nạo lớp trên bề mặt mẫu để thu các mảnh vỡ ngay trước khi sử dụng, tránh bao gồm các bột mịn hoặc bụi. Lượng mẫu lấy thường ít nhất gấp đôi lượng cần để đủ cho số chiếc nhẫn yêu cầu nhưng không được nhỏ hơn 40 g. Ngay sau đó làm nóng chảy mẫu trong dụng cụ chứa sạch, sử dụng tủ sấy, tấm gia nhiệt hoặc cách cát hoặc cách dầu để ngăn quá nhiệt cục bộ. Tránh hình thành bọt khí trong mẫu nóng chảy, không được gia nhiệt trên nhiệt độ cần thiết để đổ mẫu dễ dàng mà không bao gồm bọt khí. Thời gian tính từ lúc bắt đầu gia nhiệt cho đến lúc đổ mẫu không quá 15 phút. Ngay trước khi đổ đầy các chiếc nhẫn, gia nhiệt mẫu trước đến nhiệt độ tại đó mẫu được rót. Trong khi rót, các vòng tròn được giữ trên tấm đồng thau. Rót mẫu vào các vòng tròn để thừa cho nguội. Làm nguội ít nhất 30 phút và sau đó cắt bỏ phần mẫu thừa bằng dao đã hơ nóng hoặc dao bay. Sử dụng dụng cụ chứa sạch và một mẫu mới nếu phép thử được lặp lại.

<u>Cách tiến hành:</u>

Mẫu có điểm nóng chảy trên 80^{0}C: Rót glycerol vào bình thủy tinh tới độ sâu không được nhỏ hơn 4 inch (10,2 cm) và không được quá 4,25 inch (10,8 cm). Nhiệt độ ban đầu của chậu là 32^{0}C. Đối với nhựa thông (gồm cả nhựa gỗ), glycerol cần được

làm nguội đến nhiệt độ không được nhỏ hơn 45^0C dưới điểm nóng chảy dự đoán trước nhưng không được thấp hơn 35^0C. Vị trí trục của trục khuấy gần thành sau của dụng cụ chứa, với các lưỡi dao không chạm vào thành và phần dưới của cánh dao cách đỉnh của vòng 0,75 in (18 mm). Trừ khi có hướng dẫn chỉnh tâm cầu được sử dụng, làm lõm nhẹ ở trung tâm của mẫu bằng cách nhấn quả cầu hoặc một que tròn đã được hơ nóng dùng cho mẫu cứng, vào mẫu tại thời điểm này. Treo vòng tròn có chứa các mẫu trong chậu glycerol để bề mặt dưới của vòng tròn đầy cách bề mặt của tấm ngang thấp hơn là 1,0 inch (25,4 mm) (xem Hình 1d), ít nhất 0,5 inch (13 mm) và không quá 0,75 inch (18 mm) ở trên so với đáy của bình thủy tinh, hoặc 1,0 inch (25,4 mm) trên so với đáy của dụng cụ chứa (xem Hình 2e). Đặt quả cầu trong glycerol nhưng không được đặt lên trên mẫu thử. Treo nhiệt kế ASTM 16C trong glycerol sao cho đáy bầu của nhiệt kế cách đáy chiếc nhẫn khoảng 0,5 inch (13 mm) nhưng không được chạm vào chiếc nhẫn. Duy trì nhiệt độ ban đầu của glycerol trong 15 phút và sau đó dùng kẹp thích hợp để đặt quả cầu vào trung tâm bề mặt trên của mẫu trong chiếc nhẫn. Bắt đầu khuấy và tiếp tục khuấy với tốc độ 500 - 700 vòng/phút cho đến khi hoàn tất việc xác định. Gia nhiệt theo tốc độ tăng nhiệt độ của glycerol 5^0C/phút, tránh ảnh hưởng của cặn bằng cách sử dụng các tấm chắn nếu cần thiết.

[Chú ý: Tốc độ tăng nhiệt sẽ không đổi và sẽ không được tính theo giá trị trung bình trong toàn bộ quá trình thử. Loại bỏ tất cả các phép thử trong đó tốc độ tăng nhiệt vượt quá ± 0.5ºC cho bất kỳ quá trình nào sau 3 phút đầu].

Ghi lại điểm nóng chảy, chính là nhiệt độ trên nhiệt kế tại đó mẫu chạm vào tấm nằm ngang phía dưới (xem Hình 1d) hoặc đáy của dụng cụ chứa (xem Hình 2e). Không hiệu chỉnh thân nhiệt kế.

Mẫu có điểm nóng chảy dưới 80^0C: thực hiện theo cách tiến hành trên, ngoại trừ sử dụng nhiệt kế ASTM 15C và sử dụng nước vừa đun sôi được làm mát tới 5^0C tạo môi trường nhiệt. Đối với nhựa thông (gồm cả nhựa gỗ), sử dụng nước được làm nguội đến nhiệt độ không được nhỏ hơn 45^0C dưới điểm nóng chảy dự đoán trước nhưng không được thấp hơn 5^0C.

Chỉ số hydroxyl

Chỉ số hydroxyl được định nghĩa là số mg KOH dùng để trung Hòa carbamat sulfonyl có khả năng kết hợp với các nhóm hydroxyl trong 1 g mẫu. Các nhóm hydroxyl trong hợp chất hữu cơ phản ứng nhanh với p - toluensulfonyl isocyanat dư (p - TSI) trong dung môi trơ để tạo thành carbamat sulfonyl. Sau phản ứng

của thuốc thử dư với nước tạo thành p - toluensulfonamid, carbamat sulfonyl có tính acid được chuẩn độ bằng trực quan hoặc thiết bị chuẩn độ bằng dung dịch KOH trong methanol, phát triển điểm tương đương bằng đo thế hoặc bằng chỉ thị màu. Các hiệu chỉnh được thực hiện đối với mẫu trắng và sự có mặt của bất kỳ các hợp chất có tính acid.

Thiết bị, dụng cụ:

- Thiết bị chuẩn độ tự động: sử dụng thang đo pH 0 - 14, đặt ở tốc độ 4 (khoảng 2 ml/phút) và một buret 20 ml.

- Điện cực thủy tinh

- Điện cực calomel

- Bình Erlenmeyer: dung tích 250 ml có khớp nối thủy tinh hình tròn

- Sinh hàn Allihn: dài 300 mm có khớp nối thủy tinh hình tròn khớp với bình Erlenmeyer.

Hóa chất, thuốc thử:

- Acid benzoic, đạt tiêu chuẩn chất chuẩn gốc

- Methanol, tinh khiết, dạng khan

- Toluen, tinh khiết, đã sấy khô qua rây phân tử 3 Å

- KOH 0,1 N pha trong methanol: hòa tan 7 g KOH trong 1 lít methanol.

Chuẩn hóa bằng cách cân chính xác đến 0,0001 g, khoảng 0,12 g acid benzoic vào cốc dung tích 150 ml. Cho thanh khuấy từ và 80 ml hỗn hợp toluen/methanol theo tỷ lệ 1/1. Khuấy đều dung dịch trong khi chuẩn độ với dung dịch KOH trong methanol. Dung dịch KOH cần phải cho xuống dưới bề mặt của dung dịch, cách xa điện cực. Tính toán nồng độ dung dich KOH trong methanol dựa theo phương trình tính toán được biểu thị dưới đây.

- Tetrahydrofuran (THF): sấy qua đêm và cho qua rây phân tử 3 Å

- p-Toluenesulfonyl isocyanat (p-TSI)

- Dung dịch p-Toluenesulfonyl isocyanat: khoảng 0,22 M hoặc 4,5 mEq/20 ml dung dịch. Dùng pipet lấy 15 ml p-Toluenesulfonyl isocyanat (p-TSI) cho vào 500 ml tetrahydrofuran (THF) khô và lắc đều.

Chú ý:

Vì isocyanat có bản chất rất độc nên khi chuẩn bị và sử dụng dung dịch isocyanat phải được tiến hành trong tủ hốt. Cần phải đeo găng tay khi cầm vào isocyanat và dung dịch của isocyanat để tránh tiếp xúc với da.

- Dung dịch chỉ thị bromocresol đỏ tía: cho 0,1 g bromocresol đỏ tía vào 18,5 ml dung dịch NaOH 0,1 N và pha tới thể tích 250 ml bằng nước cất.

Cách tiến hành:

Cân 1 - 1,5 g mẫu chính xác đến 0,0001 g cho vào bình Erlenmeyer khô dung tích 250 ml được nối với khớp nối thủy tinh hình tròn. Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch THF khô cho vào bình và hòa tan mẫu. Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch p - TSI cho vào bình và lắc đều. Cho vài hạt đá bọt, nối với sinh hàn và để bình trên tấm gia nhiệt. Gia nhiệt đến khi sôi với sinh hàn ngược trong 10 phút. Trong quá trình chưng cất bổ sung thêm nước thích hợp qua sinh hàn:

Mẫu trắng

Mẫu thử

Chuẩn độ với chỉ thị màu

2

2

Chuẩn độ bằng đo thế

1

1

Lấy bình và sinh hàn ra khỏi tấm gia nhiệt và để nguội tới nhiệt độ phòng. Rửa sinh hàn bằng 5 ml THF. Tháo sinh hàn ra khỏi bình và chuyển toàn bộ phần dịch trong bình vào cốc dung tích 150 ml với sự trợ giúp của 50 ml THF. Cho thanh khuấy từ và nhúng các điện cực vào hoặc thêm 20 giọt dung dịch chỉ thị. Vừa khuấy vừa chuẩn độ bằng thiết bị chuẩn độ đo thế hoặc chuẩn độ với chỉ thị màu trực quan với dung dịch KOH trong methanol. Dung dịch KOH cần phải cho xuống dưới bề mặt của dung dịch cách xa điện cực. Xác định thể tích dung dịch KOH đã dùng để chuẩn độ mẫu thử và chuẩn độ mẫu trắng được thực hiện qua tất cả các bước tiến hành trên.

Tính kết quả:

Nồng độ của dung dịch KOH trong methanol (N):

$$N = \frac{W \times 1000}{122.1 \times KOH}$$

Trong đó:

W: Khối lượng acid benzoic

122,1: Đương lượng của acid benzoic

KOH: Số ml dung dịch KOH trong methanol dùng để chuẩn

Chỉ số hydroxyl trong mẫu:

$$= \frac{(A - B) \times N \times 56.1}{g\ sample} - AV$$

Trong đó:

A: Số ml dung dịch KOH dùng để chuẩn độ mẫu thử

B: Số ml dung dịch KOH dùng để chuẩn độ mẫu trắng

N: Nồng độ dung dịch KOH trong alcol

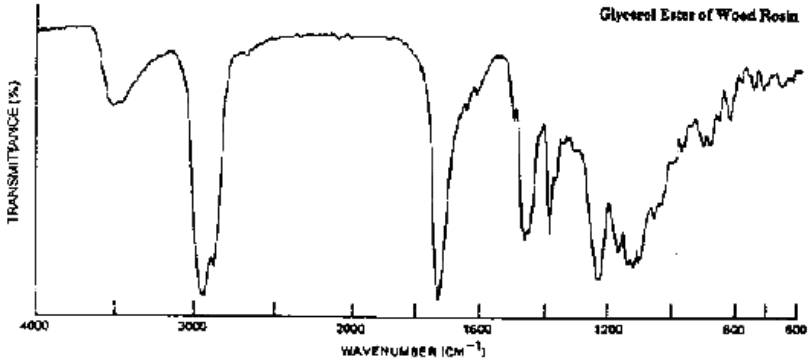
56,1: Số mg KOH/mEq

AV: Chỉ số acid

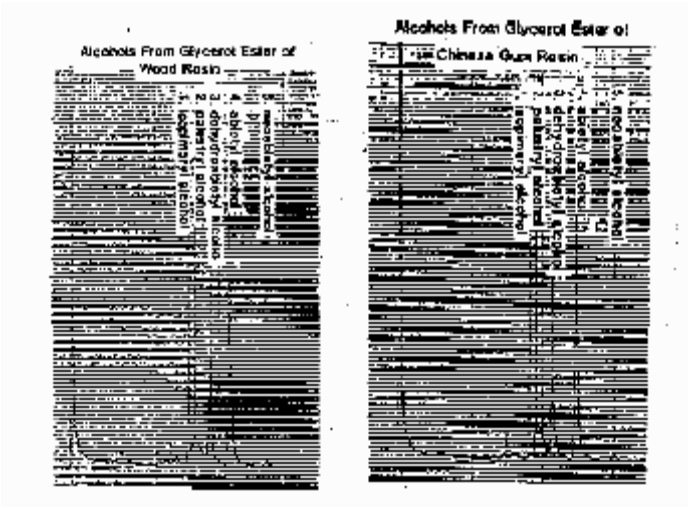
Asen Chuẩn bị dung dịch mẫu như sau: Cân chính xác 1 g mẫu và cho vào bình Kjeldahl, đặt đầu mút ống của bình trong quả bầu bốc hơi được gắn với máy hút nước, thêm 5 ml dung dịch H_2SO_4 và 4 ml dung dịch hydrogen peroxyd 30% và phá mẫu trên ngọn lửa nhỏ. Tiếp tục thêm 2 ml peroxyd trong 2 lần, để phản ứng lắng cặn giữa hai lần thêm cho đến khi tất cả chất hữu cơ bị phá huỷ, khói của acid H_2SO_4 bốc ra mạnh và dung dịch trở lên không màu. Duy trì các điều kiện ôxy hóa tại tất cả các thời điểm trong quá trình phá mẫu bằng cách bổ sung peroxyd mỗi khi hỗn hợp chuyển màu nâu hoặc tối màu. (Lượng peroxyd cần để phá hoàn toàn mẫu sẽ thay đổi nhưng trong một số trường hợp mức tối đa có thể là 200 ml, điều này phụ thuộc vào trạng thái tự nhiên của mẫu). Làm nguội, chú ý thêm 10 ml nước, lại cho bốc hơi đến khi tạo thành khói mạnh và làm nguội. Chuyển dung dịch tới bình tạo arsin, rửa bình Kjeldahl và quả bầu bằng nước, thêm nước rửa vào bình và pha tới 35 ml bằng nước. Dung dịch này phải đáp ứng được các yêu cầu của Giới hạn thử arsenic.

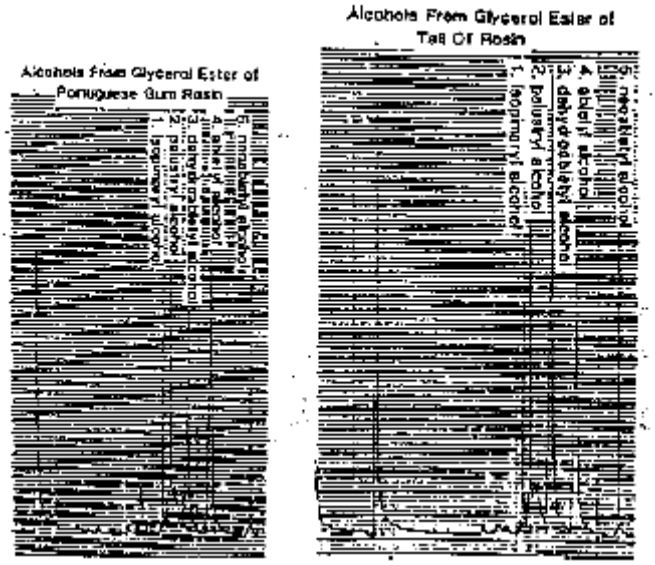
Chì Cân chính xác 5 g mẫu và cho vào đĩa sứ hoặc bát sứ, đun trên tấm gia nhiệt cho đến khi than hóa hoàn toàn, sau đó gia nhiệt trong lò nung ở 480^0C 8 giờ hoặc qua đêm, để nguội. Thêm cẩn thận 5 ml acid nitric, làm bay hơi đến khô trên tấm gia nhiệt, sau đó nung trong lò nung ở 480^0C trong 15 phút, và làm nguội. Trích ly tro trong 10 ml nước trong 2 lần, lọc mỗi phần dịch chiết vào một bình gạn. Lọc qua bất kỳ chất không tan trên dụng cụ lọc bằng 6 ml dung dịch amoni citrat TS, 2 ml hydroxylamin hydrochlorid TS và 5 ml nước, thêm nước rửa đã được lọc vào bình gạn. Tiếp tục theo hướng dẫn trong phần Cách tiến hành trong thử Giới hạn, bắt đầu với "Thêm 2 giọt phenol đỏ TS .... vào bình gạn", sử dụng 10 µg ion chì (Pb) trong mẫu đối chứng.

Phổ hồng ngoại Glycerol của nhựa gỗ thông



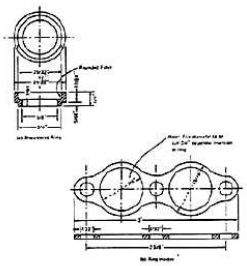
Sắc ký khí của các alcol nhựa thông





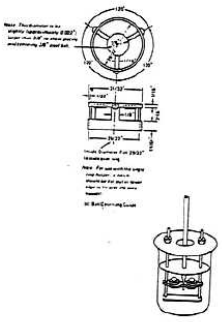
Thiết bị, dụng cụ - Điểm nóng chảy

(a)Shouldered Ring



(b)Ring Holder

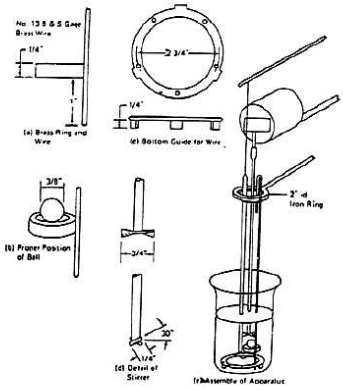
(c)Bell Centering Guide



(d)Assembly Apparatus with Two Rings

Hình 1

(a)Brass Ring and Wire



(b)Proper Position of Ball

(c)Bottom Guide for Wire

(e)Assembly of Apparatus

(d)Detail of Stirrer

Hình 2

Phụ lục 12
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI DINATRI DIPHOSPHAT

1. Tên khác, chỉ số	Disodium pyrophosphate; Disodium dihydrogen diphosphate; acid sodium pyrophosphate. INS 450i MTDI=70mg/kg thể trọng tính cho Phospho từ các nguồn thực phẩm
2. Định nghĩa	
Tên hóa học	Disodium dihydrogen diphosphate; Disodium dihydrogen pyrophosphate
Chỉ số C.A.S.	7758-16-9
Công thức hóa học	Dạng khan: $Na_2H_2P_2O_7$
Khối lượng phân tử	221,94
3. Cảm quan	Dạng tinh thể hoặc hạt màu trắng.
4. Chức năng	Chất nhũ hóa, đệm, chất tạo phức kim loại, chất tạo xốp
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Tan trong nước.
pH	3,7-5,0 (dung dịch 1/100).
Natri	Phải có phản ứng đặc trưng của natri.
Phosphat	Phải có phản ứng đặc trưng của phosphat.
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi sấy khô	Không được quá 0,5% (105°C trong 4 giờ)
Các chất không tan trong nước	Không được quá 1%.
Fluorid	Không được quá 10,0 mg/kg
Arsen	Không được quá 3,0 mg/kg
Chì	Không được quá 4,0 mg/kg
5.3. Hàm lượng	Không thấp hơn 95,0%.
6. Phương pháp thử	
6.1. Độ tinh khiết	

Các chất không tan trong nước

Hòa tan 10 g mẫu thử trong 100 ml nước nóng. Lọc qua một chén lọc đã cân bì. Rửa cặn không tan trên chén lọc bằng nước nóng. Sấy khô tại (105°C trong 2 giờ). Để nguội và cân.

6.2. Định lượng

Cân 400mg (chính xác đến mg) mẫu thử đã được sấy khô trước tại (105°C trong 4 giờ), hòa tan trong 100 ml nước trong cốc 400 ml. Chỉnh pH dung dịch về 3,8 bằng dung dịch acid hydrocloric loãng (TS) hoặc dung dịch natri hydroxyd (TS), dùng pH kế để xác định pH dung dịch. Sau đó thêm 50 ml dung dịch kẽm sulfat (125 g $ZnSO_4.7H_2O$ hòa tan trong nước, pha loãng đến đủ 1000ml, lọc và chỉnh pH về 3,8), để yên trong khoảng 2 phút. Chuẩn độ acid được giải phóng bằng dung dịch natri hydroxyd 0,1 N đến khi pH dung dịch lại trở về 3,8. Sau mỗi lần thêm natri hydroxyd gần đến điểm tương đương, cần để một thời gian để nếu có kết tủa kẽm hydroxyd thì kết tủa có thể tan hết.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,1 N tương đương với 11,10mg $Na_2H_2P_2O_7$.

Phụ lục 13
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CALCI POLYPHOSPHAT

1. Tên khác, chỉ số	INS 452iv MTDI=70mg/kg thể trọng tính cho phospho từ các nguồn thực phẩm
2. Định nghĩa	Hỗn hợp dị thể của các muối calci của acid polyphosphoric có công thức chung là $H_{n+2}P_nO_{n+1}$.
3. Cảm quan	Tinh thể hoặc bột không mùi, không màu.
4. Chức năng	Chất nhũ hóa, Chất giữ ẩm, chất tạo phức kim loại, chất tạo kết cấu.

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Thường không tan hoàn toàn trong nước, tan trong môi trường acid.
Phosphat	Phải có phản ứng đặc trưng của phosphat.
Calci	Phải có phản ứng đặc trưng của calci (Dịch thử chuẩn bị như trong phần thử phosphat)

5.2. Độ tinh khiết

Giảm khối lượng khi nung	Không được quá 2%. Sấy tại 105° trong 4 giờ sau đó nung tại 550° trong 30 phút.
Phosphat vòng	Không được quá 8% tính theo hàm lượng P_2O_5.
Fluorid	Không được quá 10,0 mg/kg.
Arsen	Không được quá 3,0 mg/kg.
Chì	Không được quá 4,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng P_2O_5	Không được thấp hơn 50,0% và không được quá 71,0% P_2O_5 tính theo chế phẩm sau khi nung.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Phosphat	Cân 0,5g mẫu, trộn với 10ml acid nitric và 50ml nước. Đun sôi trong 30 phút và làm mát. Dung dịch này được sử dụng làm dịch thử.

6.2. Độ tinh khiết

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

- Hòa tan 1 g mẫu thử trong 15 ml dung dịch acid hydrocloric loãng (TS), thêm 20 ml nước, dung dịch này được sử dụng làm dịch thử).

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

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

6.3. Định lượng Cân khoảng 300 mg mẫu thử, chính xác đến mg, hòa tan trong 15 ml acid nitric và 30 ml nước cất. Đun sôi trong khoảng 30 phút, pha loãng với nước đến 100 ml. Đun nóng đến 60°C, thêm lượng dư dung dịch amoni molybdat (TS) và đun ở 50°C trong 30 phút. Lọc và rửa tủa bằng acid nitric loãng (dung dịch 1/36), tiếp theo bằng dung dịch kali nitrat (1/100) đến khi dịch rửa không còn acid với quỳ tím. Hòa tan tủa trong 50 ml dung dịch natri hydroxyd 1N, thêm dung dịch phenolphtalein (TS) và chuẩn độ lượng natri hydroxyd dư bằng acid sulfuric 1N.

Mỗi ml dung dịch natri hydroxyd 1 N tương đương với 3,086mg P_2O_5.

Phụ lục 14
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CÁC MUỐI CỦA CÁC ACID BÉO

1. Tên khác, chỉ số	Salts of fatty acids INS 470 ADI "không giới hạn"
2. Định nghĩa	Các sản phẩm này chứa muối calci, kali và natri của các acid myristic, oleic, palmitic, stearic hoặc hỗn hợp các acid này thu được từ mỡ và dầu ăn. Sản phẩm thương mại còn được phân loại dựa trên: - Chỉ số xà phòng hóa; - Điểm đông đặc của các acid béo thu được từ mẫu thử; - Chỉ số iod; - Cặn còn lại sau khi nung bao gồm cả hàm lượng các cation; - Độ ẩm.
3. Cảm quan	Tinh thể rắn hoặc nửa rắn, bóng, màu trắng hoặc vàng nhạt, hoặc bột màu trắng hoặc trắng vàng.
4. Chức năng	Chất chống đông vón, Chất nhũ hóa.

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Các muối kali và natri tan trong nước và ethanol, các muối calci không tan trong nước, ethanol và ether.
Cation	Phải có phản ứng đặc trưng của cation.
Thành phần acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần acid béo

5.2. Độ tinh khiết

Các acid béo tự do	Không được quá 3%
Các chất không xà phòng hóa	Không được quá 2 %.
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không thấp hơn 95 % tổng các muối acid béo, tính theo khối lượng khô.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Cation Đun nóng 1 g mẫu thử với hỗn hợp gồm 25 ml nước và 5 ml acid hydrocloric. Các acid béo tạo thành nổi trên bề mặt thành một lớp rắn hoặc dầu, tan trong hexan. Sau khi làm nguội, gạn lấy lớp nước và cho bay hơi đến khô. hòa tan chất rắn còn lại trong nước và thử các cation thích hợp.

Thành phần acid béo Sử dụng phương pháp định lượng để định tính riêng các acid béo có trong thành phần của mẫu. Các acid béo chiếm lượng lớn nhất phải phù hợp với các acid được đưa ra trên nhãn sản phẩm.

6.2. Độ tinh khiết

Các acid béo tự do Xác định các acid béo tự do theo hướng dẫn trong phần Phương pháp xác định Acid béo tự do. Tính hàm lượng acid béo tự do, sử dụng hệ số tương đương (e) tương đương với 1/10 khối lượng phân tử của muối.

Các chất không xà phòng hóa Các chất không xà phòng hóa là toàn bộ lượng sản phẩm có mặt trong các chất béo sau khi được xà phòng hóa với các hydroxyd kim loại kiềm và chiết bằng một dung môi nhất định, vẫn không bay hơi trong các điều kiện xác định của phép thử.

Các chất này bao gồm các lipid có nguồn gốc tự nhiên như các sterol, các rượu no mạch dài hơn, các phẩm màu và các hydrocarbon cũng như bất kỳ một tạp chất không bay hơi nào ở 103^0C có mặt trong sản phẩm.

Cân khoảng 5 g mẫu thử (chính xác đến 0,01g) đã được trộn đều vào bình cầu đáy tròn 250 ml. Thêm 50 ml dung dịch kali hydroxyd ~ 0,5 N và thêm một ít đá bọt. Gắn bình vào sinh hàn hồi lưu, đun sôi nhẹ trong 1 giờ. Ngừng đun. Thêm 100 ml nước cất qua đầu sinh hàn và lắc.

Sau khi làm mát, chuyển dung dịch vào phễu tách. Tráng rửa bình và đá bọt vài lần bằng diethyl ether (dùng khoảng 100 ml) và đổ dịch rửa vào phễu tách. Đóng nút và lắc mạnh trong 1 phút, đều đặn xả áp suất bằng cách lật ngược phễu tách và mở khóa vòi.

Để yên phễu tách cho đến khi 2 pha hoàn toàn tách lớp. Sau đó rút lấy càng triệt để càng tốt dung dịch xà phòng vào phễu tách thứ 2.

Chiết dung dịch xà phòng trong ethanol thêm hai lần nữa, mỗi lần với 100 ml diethyl ether theo cách trên. Gộp 3 dịch chiết ether vào 1 phễu tách có sẵn 40 ml nước.

Nhẹ nhàng quay tròn phễu tách chứa dịch chiết và 40 ml nước. Nếu lắc quá mạnh trong giai đoạn này, nhũ tương có thể hình thành. Để hỗn hợp tách lớp hoàn toàn và rút bỏ lớp nước ở dưới. Rửa lớp ether hai lần nữa với 40 ml nước, lắc đều và loại bỏ lớp

nước ở dưới sau khi hỗn hợp đã phân lớp. Với mỗi dung dịch rửa rút ra đến khi chỉ còn khoảng 2 ml, sau đó quay tròn phễu tách quanh trục, đợi vài phút, rút bỏ phần tách ra, đóng khóa vòi khi ether bắt đầu chảy qua lỗ của khóa vòi.

Rửa dung dịch ether nhiều lần bằng 40 ml dung dịch kali hydroxyd, 40 ml nước, rửa thêm một lần bằng 40 ml dung dịch kali hydroxyd, sau đó rửa ít nhất 2 lần nữa bằng 40 ml nước. Liên tục rửa bằng nước cho đến khi dung dịch hết màu hồng khi thử bằng chỉ thị là dung dịch phenophthalein.

Chuyển toàn lượng từng ít một dung dịch ether qua cuống của phễu tách vào bình cầu khô và đã cân bì khối lượng chính xác đến 0,0001 g.

Làm bay hơi dung môi bằng cách cất trong bể cách thủy. Thêm 5 ml aceton và loại bỏ hoàn toàn dung môi bay hơi băng cách thổi không khí nhẹ, nghiêng bình cầu khi quay trong bể cách thủy.

Sấy khô phần cặn còn lại ở nhiệt độ 103±2°C trong 15 phút, đặt bình cầu theo phương gần như nằm ngang. Làm nguội trong bình hút ẩm và cân (chính xác đến 0,0001 g). Lặp lại quá trình sấy trong mỗi 15 phút liên tiếp cho đến khi chênh lệch giữa 2 lần cân liên tiếp nhỏ hơn 0,0015g.

Chú ý: Nếu không thu được khối lượng không đổi sau 3 lần sấy khô, các chất không xà phòng hóa có thể đã bị nhiễm bẩn.

Sau khi đã cân, hòa tan phần cặn trong 4 ml diethyl ether, thêm 20 ml ethanol đã được trung hòa (dung dịch có màu hồng khi thêm chỉ thị là dung dịch phenolphthalein(TS). Chuẩn độ bằng dung dịch kali hydroxyd trong ethanol 0,1 N đã chuẩn hóa (pha dung dịch kali hydroxyd trong ethanol có nồng độ gần đúng 1 N bằng cách hòa tan 60 g kali hydroxyd trong 50 ml nước và pha loãng thành 1 L bằng ethanol; pha loãng dung dịch này 1:10 bằng ethanol) đến khi dung dịch có màu phớt hồng.

Hiệu chuẩn khối lượng cặn còn lại bằng cách trừ đi hàm lượng acid tự do. Tính hàm lượng chất không xà phòng hóa, theo % (kl/kl) bằng công thức sau:

$$\frac{100 \times (m_1 - 0.281 \times T \times V)}{m}$$

trong đó:

m = khối lượng (g), của phần mẫu thử,

m_1 = khối lượng (g), của cặn còn lại.

V = thể tích dung dịch kali hydroxyd đã chuẩn hóa nồng độ dùng để chuẩn độ.

T = Nồng độ chính xác của dung dịch kali hydroxyd dùng để chuẩn độ.

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

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

6.2. Định lượng Nguyên tắc:

Xà phòng hóa các muối và ester hóa các acid béo bằng methanol, có mặt bo trifluorid, methanol kiềm. Tiến hành sắc ký lỏng khí các ester methyl của acid béo.

Phần A - Chuẩn bị các ester methyl của acid béo

Thiết bị

- Bình đáy tròn cổ nhám 50 và 100 ml.
- Sinh hàn hồi lưu, chiều dài hiệu dụng 20 to 30 cm, có khớp nối nhám tương thích với bình cầu.
- Các phễu tách 250 ml.
- Đường ống vào dẫn khí nitrogen.
- Ống nghiệm có nút thủy tinh nhám.
- Pipet chia độ, có thể tích ít nhất là 10 ml, có gắn quả bóp cao su, hoặc pipet tự động.

Thuốc thử

- Heptan, dùng cho sắc ký *(Chú ý 2 và 4)*
- Dầu nhẹ đã được cất lại (nhiệt độ sôi từ 40-60°), chỉ số brom < 1, không có cặn, hoặc hexan (Chú ý 2)
- Natri sulfat khan
- Dung dịch Natri hydroxyd trong methanol ~ 0.5 N: hòa tan 2g natri hydroxyd trong 100 ml methanol chứa không quá 0.5% (kl/kl) nước. Nếu giữ dung dịch tương đối lâu có thể tạo thành một lượng nhỏ kết tủa màu trắng của natri. Điều này không ảnh hưởng đến kết quả điều chế methyl ester.
- Dung dịch bo trifluorid trong methanol, 12 đến 25% (kl/kl) . Chế phẩm thương mại sẵn có là dung dịch 14 và 50% *(chú ý 2)*

Cảnh báo: Bo trifluorid độc. Vì vậy thử nghiệm viên không nên pha dung dịch bo trifluorid trong methanol từ methanol và boron trifluorid. (chú ý 3).

- Dung dịch bão hòa natri clorid trong nước.
- Methyl đỏ, dung dịch 1 g/l trong ethanol 60% (tt/tt)
- Nitrogen, có hàm lượng oxy < 5 mg/kg

Tiến hành

Do bo trifluorid độc, các thí nghiệm sau tốt nhất nên tiến hành trong tủ hút. Các dụng cụ thủy tinh phải được rửa bằng nước ngay sau khi sử dụng.

Sấy khô mẫu ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi, cứ 2 giờ thì kiểm tra khối lượng 1 lần. Cân khoảng 350mg (chính xác đến mg) mẫu đã sấy khô. Có thể lấy lượng mẫu lớn hoặc nhỏ hơn 350 mg, tuy nhiên, thể tích của bình cầu và lượng thuốc thử sử dụng phải phù hợp với số liệu trong bảng sau:

Khối lượng mẫu (mg)	Thể tích bình (ml)	NaOH 0.5 N (ml)	Dung dịch BF3 trong methanol (ml)
100-250	50	4	5
250-500	50	6	7
500-700	100	8	9
750-1000	100	10	12

Cho lượng acid béo đã định vào bình cầu phù hợp. Thêm với lượng phù hợp dung dịch bo trifluorid trong methanol. Đun sôi trong vòng 2 phút.

Thêm 2 đến 5 ml heptan *(chú ý 4)* (lượng chính xác không ảnh hưởng đến phản ứng) qua đầu trên của sinh hàn vào hỗn hợp đang sôi và tiếp tục đun sôi trong 1 phút.

Ngắt nguồn nhiệt, lấy sinh hàn ra. Thêm lượng nhỏ dung dịch natri clorid bão hòa và lắc nhẹ bình bằng cách quay tròn bình vài lần.

Thêm dung dịch natri clorid bão hòa vào bình cầu sao cho mức chất lỏng ngang cổ bình. Để yên cho hỗn hợp tách lớp và chuyển khoảng 1 ml lớp trên (lớp heptan) vào ống nghiệm cổ nhám và thêm vào một lượng nhỏ natri sulfat khan để loại hết nước. Nếu lượng mẫu lấy là 350 mg, dung dịch này chứa khoảng 7-17% methyl ester và có thể bơm trực tiếp vào cột sắc kí khí-lỏng. Nếu không thì pha loãng dung dịch bằng heptan để đạt được nồng độ methyl ester là 5-10% *(chú ý 5)*.

Để thu hồi toàn bộ lượng ester khô, chuyển dung dịch muối và lớp heptan vào phễu tách. Tách riêng các lớp. Chiết phần dung dịch

muối 2 lần bằng 50 ml dầu nhẹ. Gộp dịch chiết dầu nhẹ thu được vào phần dung dịch heptan, rửa bằng 20 ml nước đến khi hết acid (thử bằng chỉ thị đỏ methyl). Làm khô bằng natri sulfat khan, lọc và cho bay hơi dung môi trong bể cách thủy và thổi khí nitrogen *(chú ý 6 và 7)*. Với các mẫu có khối lượng nhỏ hơn 500 mg phải giảm thể tích dung môi và nước sử dụng theo tỷ lệ tương ứng.

Bên cạnh phương pháp trên còn có một số phương pháp khác không sử dụng đến bo trifluorid. Nhìn chung có thể thay các thuốc thử methyl hóa, dung dịch natri hydroxyd 0,5N trong methanol và dung dịch bo trifluorid 12 - 25 %, trong methanol bằng các chất sau:

- Kali hydroxyd 1 N trong methanol, (phản ứng với chất béo khi có mặt lượng dư methanol có hàm lượng nước nhỏ);

- Dung dịch natri methylat (điều chế bằng cách hòa tan 1 g natri kim loại trong 100 ml methanol có hàm lượng nước nhỏ).

Chú ý

1. Nếu các chất không xà phòng hóa gây cản trở, pha loãng dung dịch xà phòng hóa với nước và loại bỏ các chất không xà phòng hóa bằng cách chiết với diethyl ether hoặc hexan. Acid hóa dung dịch nước xà phòng và tách lấy các acid béo. Điều chế các methyl ester từ các acid béo theo hướng dẫn.

2. Khi đo sắc ký khí lỏng của các methyl ester, một số thuốc thử, đặc biệt là bo trifluorid trong methanol có thể tạo nên các peak ngẫu nhiên trên sắc đồ (trong vùng các ester có mạch C_{20}-C_{22} nếu dùng bo trifluorid trong methanol). Do vậy cần phải kiểm tra lại mỗi đợt thuốc thử mới bằng cách điều chế các methyl ester của acid oleic tinh khiết, và đo sắc ký. Nếu xuất hiện peak ngẫu nhiên, phải bỏ không dùng thuốc thử. Các thuốc thử khác nhau không được phép cho peak gây nhiễu đến các peak của các methyl ester của các acid béo trong quá trình chạy sắc ký.

Dung dịch bo trifluorid trong methanol phải được bảo quản trong tủ lạnh.

3. Nếu bắt buộc phải điều chế dung dịch bo trifluorid từ bo trifluorid khí, nên dùng phương pháp sau: Cân khối lượng của bình cầu 2 L chứa 1 L methanol. Làm lạnh trong bể đá. Vẫn giữ nguyên bình trong bể đá, sục khí BF_3 từ chai khí (cylinder) qua ống dẫn thủy tinh vào dung dịch methanol cho đến khi hấp thụ được 125 g BF_3. Tiến hành thí nghiệm trong tủ hút. Phải cho BF_3 chạy qua ống thủy tinh trước khi đặt ống vào và rút ống ra khỏi methanol để tránh trường hợp chất lỏng bị hút vào hệ thống van

của chai khí. Không được cho khí chạy nhanh quá để có hơi khí trắng ra khỏi bình. Thuốc thử pha theo cách này bền trong 2 năm.

4. Nếu các acid béo chứa 20 hoặc nhiều hơn 20 nguyên tử carbon không có mặt, nên thay heptan bằng hexan (hỗn hợp của các đồng phân C_7 tinh khiết có thể được kiểm tra bằng sắc ký khí lỏng)

5. Nếu không có đủ lượng mẫu như yêu cầu, có thể lấy 10 mg, thậm chí ít hơn, miễn là lượng thuốc thử và kích cỡ của các dụng cụ thủy tinh được giảm theo tỷ lệ tương ứng.

6. Các dung dịch methyl ester nên được phân tích càng sớm càng tốt. Nếu cần, bảo quản dung dịch heptan chứa các methyl ester trong môi trường khí trơ trong tủ lạnh. Nếu cần phải bảo quản trong thời gian dài, nên bảo vệ các methyl ester khỏi sự oxy hóa bằng cách thêm vào dung dịch các chất chống oxy hóa ở nồng độ không ảnh hưởng đến kết quả phân tích, ví dụ như 0,05 g/L EHT (2,6-di-tertbutyl-4-methyl phenol).

Trong trường hợp cần thiết, có thể bảo quản các methyl ester khô sạch dung môi trong khí trơ trong tủ lạnh trong 24 giờ, hoặc có thể bảo quản lâu hơn nếu giữ đông lạnh sâu trong ống kín trong chân không.

7. *Một phần các methyl ester dễ bay hơi nhất có thể bị mất nếu thời gian bay hơi dung môi kéo dài, hoặc nếu dòng khí nitrogen quá mạnh,*

Để đo phổ hồng ngoại, phải loại bỏ dung môi càng triệt để càng tốt.

Để đo sắc ký khí lỏng, loại bỏ hoàn toàn dung môi.

Phần B - Sắc ký khí lỏng của các ester methyl acid béo

Thiết bị

Thiết bị thông thường dùng cho sắc ký khí lỏng, dùng cột nhồi và detector ion hóa ngọn lửa (chú ý 1). Bất kỳ một thiết bị nào cho hiệu quả và độ phân giải cao với chất béo cần xác định đều phù hợp.

Sắc ký khí lỏng

Hệ thống bơm mẫu: Hệ thống bơm mẫu phải có không gian chết nhỏ nhất có thể. Nếu được, phải nâng được nhiệt độ cao hơn nhiệt độ cột từ 20 đến 50°C.

Lò: Lò phải cung cấp cho cột nhiệt độ ít nhất là 220° và phải duy trì được nhiệt độ cần thiết trong khoảng ± 1°C.

Nếu dùng chương trình đặt nhiệt độ, nên dùng thiết bị có cột đôi.

Cột nhồi:

- Cột: Cột phải được làm từ loại vật liệu trơ với chất cần phân tích: thủy tinh hoặc nếu không thì dùng thép không rỉ *(chú ý 2)*. Chiều dài: 1 đến 3 m, nên dùng cột tương đối ngắn nếu có các acid mạch dài (C_{20+}). Để xác định các acid béo C_4 và C_6, nên dùng cột 2 m; đường kính trong từ 2 đến 4 mm.

Nhồi cột

- Chất mang: Diatomid rửa acid và đã được silan hóa, hoặc các chất mang trơ phù hợp khác có khoảng biến thiên đường kính hẹp (25µm) trong khoảng đường kính cỡ hạt từ 125-200 µm, cỡ hạt trung bình phải tương quan với đường kính trong và chiều dài cột.

- Pha tĩnh: Dạng polyester của một chất lỏng phân cực (ví dụ diethylen glycol polysuccinat, butandiol polysuccinat, ethylen glycol polyadipat ...) hoặc bất kỳ chất lỏng nào khác (ví dụ cyanosilicon ...) thỏa mãn các điều kiện dưới đây. Pha tĩnh phải chiếm 5 đến 20 % khối lượng nhồi. Có thể dùng một pha tĩnh không phân cực, tùy theo từng phép tách cụ thể.

- Luyện cột mới chế tạo: Tách cột ra khỏi detector. Nếu có thể, từ từ nung lò đến 185°C và dẫn dòng khí trơ qua cột với tốc độ 20 - 60 ml/phút trong ít nhất là 16 giờ tại nhiệt độ này, và thêm 2 giờ nữa tại 195°C.

Detector: Các vận hành dưới đây tương ứng với detector ion hóa ngọn lửa *(chú ý 1)*

Syring: Syring, có dung tích tối đa là 10 µl, chia độ đến 0.1 µl.

Máy ghi:

Nếu sử dụng đường ghi để tính thành phần hỗn hợp phân tích, phải dùng một máy ghi điện tử có độ chính xác cao. Máy ghi phải tương thích với thiết bị đo. Các đặc trưng của máy ghi phải như sau:

- Tốc độ đáp ứng dưới 1,5 giây, tốt nhất là dưới 1 giây (tốc độ đáp ứng là thời gian cần để bút ghi chạy từ 0 đến 90 % theo 100 % tín hiệu)

- Độ rộng của giấy: tối thiểu là 25 cm

- Tốc độ giấy: 25-100 cm/giờ.

Bộ tích phân Integrator hoặc máy tính (tùy chọn)

Có thể tính một cách nhanh và chính xác nếu dùng bộ tích phân điện tử hoặc máy tính. Trong trường hợp này phải tạo được tín hiệu tuyến tính với độ nhạy phù hợp, và phần hiệu chỉnh cho sự lệch đường nền phải thỏa đáng.

Hóa chất

- Khí mang: Khí trơ (nitrogen, heli, argon ...) khô, và chứa ít hơn 10 mg/kg oxy.

- Khí phụ trợ: Hydrogen (tinh khiết tối thiểu 99.9%) không có các tạp chất hữu cơ, không khí hoặc oxygen.

- Các chất chuẩn so sánh: Hỗn hợp của các methyl ester, hoặc các methyl ester của một chất dầu đã biết trước thành phần, tốt nhất là tương tự với chất béo cần phân tích.

Tiến hành

Điều kiện thử

Xác định các điều kiện vận hành tối ưu: Các giá trị cho trong bảng 1 và 2 cho dưới đây về nguyên tắc có thể cho các kết quả mong muốn:

Bảng 1

Đường kính trong của cột	Khí mang cung cấp
2 mm	15-25 ml/phút
3 mm	20-40 ml/phút
4 mm	40-60 ml/phút

Bảng 2

Nồng độ của pha tĩnh	Nhiệt độ
5%	175°
10%	180°
15%	180°
20%	185°

Nếu được, injector phải ở nhiệt độ khoảng 200^oC và detector phải ở nhiệt độ bằng hoặc cao hơn nhiệt độ cột.

Về nguyên tắc dòng khí hydrogen cung cấp cho detector ion hóa ngọn lửa phải có tốc độ bằng một nửa tốc độ khí mang, và tốc độ khí oxygen phải bằng khoảng 5 đến 10 lần tốc độ khí hydrogen.

Xác định hiệu suất và độ phân giải (tùy chọn)

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn methyl stearat. Lựa chọn cỡ mẫu, nhiệt độ cột tách và tốc độ khí mang sao cho peak của methyl stearat xuất hiện 15 phút sau peak dung môi và cao khoảng 3/4 tín hiệu toàn thang.

- Phân tích:

Dùng mẫu kiểm tra là 0,1 đến 2 µl dung dịch heptan của methyl esters,

pha theo hướng dẫn trong phần A. Trong trường hợp không có các ester trong dung dịch, chuẩn bị dung dịch có nồng độ khoảng 10% trong heptan và bơm 0,1 đến 1 µl dung dịch này.

Các điều kiện tiến hành được cho dưới đây. Tuy nhiên, có thể làm việc với nhiệt độ cột thấp hơn nếu xác định các acid có mạch carbon dưới C_{12} hoặc ở nhiệt độ cao hơn nếu xác định các acid béo trên C_{20}.

Đôi khi có thể sử dụng chương trình đặt nhiệt độ cho cả 2 trường hợp trên. Nếu mẫu có chứa các methyl ester của các acid béo dưới C_{12}, phải bơm mẫu ở nhiệt độ 100°C (hoặc ở nhiệt độ từ 50 - 60°C nếu có acid butyric) và ngay lập tức tăng nhiệt độ với tốc độ tăng nhiệt từ 4 - 8 °C/phút cho đến nhiệt độ tối ưu. Trong một số trường hợp có thể gộp cả 2 quy trình lại: sau khi tăng nhiệt, tiếp tục rửa giải tại nhiệt độ không đổi cho đến khi tất cả các hợp phần được rửa giải ra. Nếu thiết bị không vận hành với chương trình nhiệt độ, làm việc tại 2 nhiệt độ cố định trong khoảng từ 100 đến 195°C.

Biểu thị kết quả

Phân tích định tính

Phân tích hỗn hợp chất chuẩn so sánh có thành phần đã biết trong các điều kiện sử dụng để đo mẫu thử. Đo khoảng cách lưu (hoặc thời gian lưu) cho các ester béo tương ứng. Dùng giấy bán logarit, vẽ đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của logarit khoảng cách lưu (hoặc thời gian lưu) vào số nguyên tử carbon của các acid; trong điều kiện đẳng nhiệt đồ thị của các ester mạch thẳng có cùng độ không bão Hòa (no) phải là các đường thẳng. gần như song song với nhau.

Nhận dạng các peak của mẫu thử từ các đồ thị này, nếu cần thì dùng phép nội suy. Phải tránh các điều kiện đo làm xuất hiện các "peak bị che phủ (masked peaks)", có nghĩa là độ phân giải không đủ lớn để tách được 2 hợp phần.

Phân tích định lượng

Xác định thành phần

Trừ các trường hợp đặc biệt, sử dụng phương pháp chuẩn hóa diện tích, có nghĩa là giả thiết rằng toàn bộ các hợp phần đều được biểu diễn trên sắc đồ, sao cho tổng diện tích các peak biểu diễn 100 % các hợp phần (tổng rửa giải).

Bằng một qui trình chuẩn hóa phù hợp (dùng hỗn hợp chuẩn so sánh hoặc dùng chất chuẩn nội), xác định tổng khối lượng của các acid béo trong mẫu khô. Tính hàm lượng muối của các acid

béo với các cation đặc trưng trong mẫu. Tổng hàm lượng Muối Acid Béo không được lớn hơn 95% khối lượng mẫu khô. Ngoài ra, nếu có các chỉ tiêu cho hàm lượng của mỗi acid béo ghi trên nhãn sản phẩm, mẫu phải thỏa mãn được các chỉ tiêu này.

Chú ý

1. Có thể sự dụng máy sắc ký khí - lỏng dùng thiết bị đo độ dẫn nhiệt của khí (catharometer) (làm việc trên nguyên tắc đo sự thay đổi độ dẫn nhiệt). Các điều kiện đo khi đó được thay đổi như sau:

Cột

- Chiều dài: 2 đến 4 m

- Đường kính trong: 4 mm

- Chất mang: đường kính hạt trong khoảng 160 đến 200 µm

- Pha tĩnh: 15 đến 25%

Khí mang: heli, nếu không thì dùng hydrogen, có hàm lượng oxygen càng nhỏ càng tốt. Không dùng khí phụ trợ

- Tốc độ khí: thường trong khoảng từ 60 đến 80 ml/phút

Nhiệt độ

Injector: cao hơn từ 40° đến 60^oC so với nhiệt độ cột

Cột: 180° to 200^oC

Phân tích định lượng: phải hiệu chỉnh theo các hệ số thu được khi phân tích hỗn hợp so sánh của các ester có thành phần đã biết trong cùng điều kiện đo với mẫu thử.

2. Nếu trong mẫu có các thành phần chứa nhiều hơn 3 nối đôi, chúng có thể bị phân hủy trên cột thép không rỉ.

Phụ lục 15

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI ESTER CỦA SUCROSE VỚI CÁC ACID BÉO

1. Tên khác, chỉ số	Sucrose fatty acid esters; INS 473
2. Định nghĩa	Mono, di, tri ester của sucrose với các acid béo thực phẩm, được điều chế từ sucrose và methyl, ethyl ester của các acid béo thực phẩm bằng cách ester hóa với sự có mặt của chất xúc tác, hoặc tách từ sucroglycerid. Chỉ các dung môi sau có thể được sử dụng để sản xuất: dimethylformamid, dimethyl sulfoxid, ethyl acetat, isopropanol, propylen glycol, isobutanol và methyl ethyl keton.
3. Cảm quan	Dạng gel cứng, dạng chất đặc mềm hoặc dạng bột có màu trắng đến trắng hơi xám
4. Chức năng	Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Ít tan trong nước, tan trong ethanol.
Acid béo	Phải có phản ứng đặc trưng của acid béo.
Đường	Phải có phản ứng đặc trưng của đường.

5.2. Độ tinh khiết

Tro sulfat	Không được quá 2% Thử 1 g mẫu (Phương pháp I)
Chỉ số acid	Không được quá 6
Sucrose tự do	Không được quá 5% (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Dimethyl-formamid	Không được quá 1,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Dimethyl sulfoxid	Không được quá 2,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Ethyl acetat, isopropanol và propylen glycol	Không được quá 350,0 mg/kg, dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Isobutanol	Không được quá 10,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Methanol	Không được quá 10,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Methyl ethyl keton	Không được quá 10,0 mg/kg (mô tả trong phần Phương pháp thử

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng Không được nhỏ hơn 80,0% ester sucrose

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Acid béo Cho 1 ml ethanol vào 0,1 g mẫu, làm ấm và hòa tan, thêm 5 ml dung dịch H_2SO_4 loãng TS, gia nhiệt trong cách thủy trong 30 phút và làm nguội. Chất đặc hoặc dầu màu trắng vàng được hình thành, không có mùi của acid isobutyric và được hòa tan khi thêm 3 ml diethyl ether. Sử dụng lớp dung dịch nước tách khỏi từ diethyl ether cho Phép thử đường.

Đường Cho vào 2 ml lớp dung dịch nước tách khỏi diethyl ether trong phép thử acid béo, 1 ml anthron TS vào trong ống thử, cho cẩn thận theo thành ống nghiệm; bề mặt ranh giới giữa hai lớp chuyển thành màu xanh da trời hoặc xanh lá cây.

6.2. Độ tinh khiết

Sucrose tự do Xác định bằng sắc ký khí lỏng (Quyển 4)

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc chứa 5 mg/ml sucrose trong N, N- dimethylformamid. Chuẩn bị một loạt các dung dịch chuẩn chứa 0,5; 1,25 và 2,5 mg/ml sucrose bằng cách pha loãng dung dịch gốc với pyridin.

Dung dịch nội chuẩn:

Cân chính xác 0,25 g octacosan cho vào bình định mức dung tích 50 ml, thêm vào 25 ml tetrahydrofuran để hòa tan octacosan, và định mức đến thể tích 50 ml bằng pyridin.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: 2% Dexsil 300GC trên Uniport HP 80/100 mesh (ít phân cực, 2,1 m x 3.2 mm đường kính trong) hoặc tương đương

Khí mang: nitrogen

Detector: FID

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 280^0C
- Cột: giữ ở 160^0C trong 1 phút sau đó tăng từ 160 đến 300^0C với tốc độ 15^0C/phút, giữ trong 60 phút ở 300^0C.
- Detector: 320^0C

Thời gian lưu lần lượt của sucrose và octacosan đo được với các điều kiện trên xấp xỉ 8,2 và 9,8 phút.

Cách tiến hành: Cân chính xác 20 - 50 mg mẫu cho vào ống ly tâm, thêm 1 ml dung dịch nội chuẩn, 1 ml pyridin, 0,4 ml N, O-bis (trimethylsilyl) acetamid (BSA) và 0,2 ml trimethyl-chlorosilan (TMCS). Sau khi đậy nắp ống, lắc và để yên trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Bơm 1µl vào thiết bị sắc ký khí lỏng.

Đường chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch chuẩn silylat theo cách tiến hành như nhau sử dụng 1 ml mỗi loại dung dịch chuẩn thay thế mẫu và pyridin. Vẽ đường chuẩn trên đồ thị lượng sucrose (mg) trong 1 ml dung dịch chuẩn (biểu thị trên trục X) so với tỷ lệ diện tích pic của sucrose/nội chuẩn (biểu thị trên trục Y).

Đo diện tích pic đối với sucrose và nội chuẩn. Tính tỷ lệ diện tích các pic của chúng, và tính được hàm lượng sucrose trong mẫu dựa vào đường chuẩn.

$$\% \text{ sucrose} = \frac{\text{Lượng sucrose phát hiện được (mg)}}{\text{Khối lượng mẫu (mg)}} \times 100$$

Dimethyl-formamid

Xác định bằng sắc ký khí lỏng

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc chứa 1 mg/ml dimethylformamid trong tetrahydrofuran. Chuẩn bị một loạt các dung dịch chuẩn chứa 0,05; 0,1 và 0,2 µg/ml dimethylformamid bằng cách pha loãng dung dịch gốc với tetrahydrofuran.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: polyethylen glycol (dài 30 m x 0,32 mm đường kính trong với độ dày lớp phim mỏng 0,5 µm)

Khí mang: heli

Áp suất: 150 kPa (áp suất không đổi)

Detector: detector nitrogen phosphor (NPD) [(tên khác: Detector nhiệt ion ngọn lửa (FTD)]

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 180^0C

- Cột: giữ ở 40^0C trong 2 phút sau đó tăng từ 40 đến 160^0C với tốc độ 20^0C/phút, giữ trong 2 phút ở 160^0C.

- Detector: 325^0C

Phương pháp tiêm mẫu: Tiêm không chia dòng 1,0 µl mẫu bằng bơm tự động, sau đó bắt đầu làm sạch sau 1 phút.

Thời gian lưu của dimethylformamid đo được với các điều kiện trên xấp xỉ 6,4 phút.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 2 g mẫu cho vào bình định mức dung tích 20 ml, thêm vào 10 ml tetrahydrofuran để hòa tan mẫu, thêm tetrahydrofuran vào bình đến thể tích 20 ml và lắc đều dung dịch. Bơm 1,0 µl dung dịch mẫu vào thiết bị sắc ký.

Đường chuẩn:

Chuẩn bị hàng ngày bằng cách bơm 1,0 µl mỗi dung dịch chuẩn vào thiết bị sắc ký.

Tính nồng độ dimethylformamid (C_{DFA}) theo công thức sau:

$$C_{DFA}\ (mg/kg) = [C\ (\mu g/ml) \times 20\ (ml)] / W\ (g)$$

Trong đó:

C: Nồng độ dimethylformamid phát hiện được (µg/ml)

W: Khối lượng mẫu (g)

Lưu ý: Detector nitrogen phosphor không nhạy với các thành phần không chứa N hoặc P. Vì thế, cột mao quản có thể tắc với các hợp chất bay hơi thấp, mặc dù đường nền của sắc ký ổn định. Do đó, cột phải được luyện thường xuyên. Luyện qua đêm (dòng khí mang theo hướng ngược ở 180^0C) được thực hiện sau khoảng mỗi đợt 15 mẫu.

Dimethyl sulfoxid

Xác định bằng sắc ký khí lỏng

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch gốc 0,25 mg/ml dimethyl sulfoxid trong tetrahydrofuran. Chuẩn bị một loạt các dung dịch chuẩn chứa 0,5; 1 và 5 µg/ml dimethyl sulfoxid bằng cách pha loãng dung dịch gốc với tetrahydrofuran.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: 10% PEG 20M và 3% KOH trên Gas Chrom Z (chiều dài 2 m x 3 mm đường kính trong). Tăng nhiệt độ lò tới 180^0C với tốc độ 10^0C/phút và để ổn định 24 - 48 giờ với điều kiện tốc độ dòng khí nitrogen 30 - 40 ml/phút để luyện cột.

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 50 ml/phút

Detector: detector trắc quang ngọn lửa (sử dụng bộ lọc lưu huỳnh 394 nm)

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 210^0C

- Cột: 160^0C.

Thời gian lưu của dimethyl sulfoxid đo được với các điều kiện trên xấp xỉ 3,4 phút.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 5 g mẫu cho vào bình định mức dung tích 25 ml, thêm vào 10 ml tetrahydrofuran để hòa tan mẫu, thêm tetrahydrofuran vào bình đến thể tích 20 ml và lắc đều dung dịch. Bơm 3 µl dung dịch mẫu vào thiết bị sắc ký.

Đường chuẩn:

Chuẩn bị hàng ngày bằng cách bơm 3 µl mỗi dung dịch chuẩn vào thiết bị sắc ký.

Tính nồng độ dimethyl sulfoxid (C_{DMSO}) theo công thức sau:

$$C_{DMSO}\ (mg/kg) = [C\ (\mu g/ml) \times 25\ (ml)] / W\ (g)$$

Trong đó:

C: Nồng độ dimethyl sulfoxid phát hiện được (µg/ml)

W: Khối lượng mẫu (g)

Propylen glycol Xác định bằng sắc ký khí lỏng

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch 500 µg/ml của ethylen glycol trong pyridin

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch 50 µg/ml của propylen glycol trong pyridin

Các điều kiện sắc ký:

Cột: Polydimethylsiloxan (chiều dài 30 m x 0,32 mm đường kính trong với độ dày lớp phim mỏng 0,25 µm)

Khí mang: heli

Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút (dòng không đổi)

Detector: FID

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 230^0C

- Cột: giữ ở 60^0C trong 5 phút sau đó tăng từ 60 đến 250^0C với tốc độ 20^0C/phút, giữ trong 5 phút ở 250^0C.

- Detector: 250^0C

Thời gian lưu lần lượt của dẫn xuất ethylen glycol và dẫn xuất propylen glycol xấp xỉ 7,7 phút và 7,9 phút.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 1 g mẫu cho vào bình định mức dung tích 10 ml, thêm vào 100 µl dung dịch nội chuẩn. hòa tan và định mức đến thể tích 10 ml bằng pyridin. Lấy 0,5 ml dung dịch mẫu cho vào ống li tâm, và thêm 0,25 ml 1,1,1,3,3,3 - hexamethyldisilazan (HMDS) và 0,1 ml trimethylchlorosilan

(TMCS). Sau khi đậy chặt nắp ống, lắc mạnh, để yên trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm. Bơm 1 µl dung dịch nổi trên mặt ống sau ly tâm vào thiết bị sắc ký.

Đường chuẩn:

Tiến hành sắc ký như trên, trong đó dùng 0,05; 0,2; 0,5 và 1ml dung dịch chuẩn thay thế cho dung dịch mẫu thử.

Tính nồng độ propylen glycol (C_{PG}) theo công thức sau:

$$C_{PG}\ (mg/kg) = [C\ (\mu g/ml) \times 10\ (ml)] / W\ (g)$$

Trong đó:

C: Nồng độ propylen glycol phát hiện được (µg/ml)

W: Khối lượng mẫu (g)

Lưu ý: Nhất thiết phải làm sạch cổng bơm mẫu và luyện cột ở 300^0C sau mỗi đợt 20 mẫu phân tích, bởi cột bị nhiễm bẩn.

Methanol, isopropanol, isobutanol, ethyl acetat và methyl ethyl keton

Xác định bằng sắc ký khí có buồng lấy mẫu không gian hơi.

Dung dịch chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch chuẩn A chứa 4.000 mg/l mỗi loại methanol, isopropanol, isobutanol, ethyl acetat và methyl ethyl keton bằng cách cân chính xác 0,2 g mỗi dung môi và cho vào bình định mức dung tích 50 ml chứa khoảng 20 ml nước, sau đó thêm nước vào đến thể tích 50 ml. Chuẩn bị các dung dịch chứa 2.000 mg/l (dung dịch chuẩn B) và 1.000 mg/l (dung dịch chuẩn C) bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn A.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 4 g mẫu cho vào 4 lọ (mỗi lọ 1 g mẫu). Cho 5 µl nước vào lọ thứ nhất, cho lần lượt vào lọ thứ hai, thứ ba, thứ bốn dung dịch chuẩn A, B và C; đậy nhanh septum. (Nồng độ của mỗi dung môi sau khi thêm 5 µl dung dịch chuẩn A, B, C vào 1 g mẫu tương đương lần lượt bằng 20, 10 và 5 mg/kg mẫu). Để lọ mẫu trong buồng lấy mẫu không gian hơi và phân tích với các điều kiện sau:

Cột: 100% Polydimethylsiloxan (chiều dài 30 m x 0,53 mm đường kính trong với độ dày màng phim mỏng 1,5 µm), ví dụ: DB - 1 được sản xuất bởi Công ty TNHH J & W)

Khí mang: nitrogen

Tốc độ dòng: 3,5 ml/phút

Detector: FID

Nhiệt độ:

- Buồng bơm mẫu: 110^0C
- Cột: 40^0C.
- Detector: 110^0C

Buồng lấy mẫu không gian hơi:

- Nhiệt độ cách nhiệt mẫu: 80^0C
- Thời kỳ cách nhiệt mẫu: 40 phút
- Nhiệt độ syringe: 85^0C
- Bơm mẫu dạng khí: 1,0 ml

Kết quả:

Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa lượng thêm vào với diện tích pic đối với mỗi dung môi sử dụng các kết quả phân tích. Mối tương quan phải tuyến tính ($R^2 > 0,99$). Ngoại suy và xác định x phần bị chặn, w_i, và tính nồng độ dung môi C_i (mg/kg) trong mẫu:

$$C_i = w_i / W$$

Trong đó:

w_i: Phần bị chặn của đường thẳng tương quan sử dụng phương pháp thêm chuẩn (µg)

W: Khối lượng mẫu (g)

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

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

6.3. Định lượng Xác định bằng HPLC sử dụng các điều kiện sau:

Cách tiến hành:

Cân chính xác 250 mg mẫu và cho vào bình định mức dung tích 50 ml. Pha tới thể tích 50 ml bằng tetrahydrofuran và lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,5 µm. Bơm 100 µl mẫu vào thiết bị sắc ký đã ổn định trước.

Các điều kiện sắc ký:

Cột: Styren-divinylbenzen copolymer đối với sắc ký thẩm thấu qua gel (TSK-GEL G2000 (Tosoh) hoặc tương đương)

Pha động: tetrahydrofuran dùng cho HPLC đã bài khí

Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút

Detector: RI

Nhiệt độ:

- Cột: 38^0C.
- Detector: 38^0C

Ghi sắc ký đồ trong khoảng 90 phút.

Tính % ester sucrose trong mẫu:

$$\% \text{ ester sucrose} = 100\ A/T$$

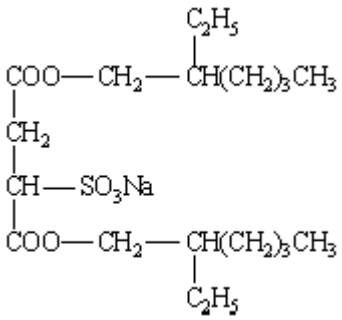
Trong đó:

A: Tổng các diện tích pic đối với 3 thành phần chính, mono-, di- và tri-ester, rửa giải lần lượt ở khoảng 65, 68 và 73 phút.

T: Tổng diện tích tất cả các pic rửa giải trong khoảng 90 phút

Phụ lục 16

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI DIOTYL NATRI SULFOSUCINAT

1. Tên khác, chỉ số	DSS, natri docusat, INS 480 ADI = 0 - 0,1 mg/kg thể trọng
2. Định nghĩa	
Tên hóa học	Natri1,4-bis-(2-ethylhexyl)-sulfosuccinat; Muối natri của acid ester sulfo-1,4-bis-(2-ethylhexyl) butanedioic; dioctyl natri sulfosuccinat
Số C.A.S.	577-11-7
Công thức hóa học	$C_{20}H_{37}NaO_7S$
Công thức cấu tạo	
Khối lượng phân tử	444,56
3. Cảm quan	Chất rắn dạng dẻo, giống sáp, màu trắng có mùi đặc trưng giống octanol, nhưng không có mùi của các dung môi khác.
4. Chức năng	Chất nhũ hóa, chất làm ẩm
5. Yêu cầu kỹ thuật	
5.1. Định tính	
Độ tan	Ít tan trong nước, dễ tan trong ethanol và glycerol
Phổ hồng ngoại	Phổ hồng ngoại của mẫu phân tán trong kali bromid tương ứng với phổ của mẫu chuẩn đối chiếu (Chuẩn đối chiếu USP dioctyl sulfosuccinate có ở công ty United States Pharmacopoeia, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Md 20852, USA)
pH	5.8 - 6.9 (dung dịch 1/100)
5.2. Độ tinh khiết	
Giảm khối lượng khi làm khô	Không được quá 2 % (105°C trong 2 giờ)
Độ trong của dung dịch	Hòa tan 25 g mẫu thử vào 94 ml ethanol. Dung dịch không được vẩn đục sau 24 giờ.

Tro sulfat	Trong khoảng từ 15,5 % đến 16,2 %. (thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4; Phương pháp I, cân 1 g mẫu)
Bis-(2-ethylhexyl)-maleat	Không được quá 0,4 %.
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không thấp hơn 98,5 % tính theo khối lượng khô.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Bis-(2-ethylhexyl)-maleat

Thuốc thử

- Chất điện giải hỗ trợ: hòa tan 21,2 g lithi perchlorat ($LiClO_4$) khan vào 175 ml nước trong cốc 250 ml. Điều chỉnh pH của dung dịch này đến 3,0 bằng cách thêm từng giọt acid acetic băng (khoảng 1 đến 2 giọt là đủ), dùng một máy đo pH phù hợp. Chuyển toàn lượng dung dịch vào bình định mức 200 ml, pha loãng đến vạch bằng nước, và trộn đều.

- Dung dịch chuẩn: Chuyển 100 - 110 mg (cân chính xác) bis-(2-ethyl-hexyl)-maleat, (bis-(2-ethylhexyl)-maleat với độ tinh khiết phù hợp có tên khác là OT-35 của Công ty American Cyanamid, Pine Chemicals Department, Pearl River, New York 10965, USA), vào bình 100 ml. Ghi lại khối lượng chính xác, chính xác đến 0,1 mg, Wa. Pha loãng đến vạch bằng nước, trộn đều.

- Dung dịch mẫu thử gốc: Chuyển 12,5 g mẫu thử, đã được cân chính xác, vào cốc 150 ml. Ghi lại khối lượng chính xác, Ws, chính xác đến 10 mg. Thêm 80-90 ml isopropanol, khuấy bằng đũa thủy tinh đến khi mẫu tan hoàn toàn. Chuyển toàn lượng dung dịch này vào bình định mức 250 ml bằng isopropanol. Pha loãng đến vạch bằng isopropanol, trộn đều.

- Dung dịch thử A: Dùng pipet lấy 50.0 ml "Dung dịch mẫu thử gốc" và 20,0 ml "Dung dịch điện giải hỗ trợ " vào bình định mức 100 ml. Pha loãng với isopropanol đến khoảng dưới vạch định mức 15 mm, đậy nút, lắc đều và để trong 2 phút. Pha loãng tiếp bằng isopropanol đến vạch, đậy nút, lắc đều. Phải thu được dung dịch tuyệt đối trong.

- Dung dịch thử B: Dùng pipet lấy 50,0 ml "Dung dịch mẫu thử gốc", 10,0 ml "Dung dịch chuẩn", và 20,0 ml “Dung dịch điện giải hỗ trợ" vào bình định mức 100 ml, và tiếp tục qui trình như miêu tả trong phần “Dung dịch thử A”

- Mẫu trắng: Dùng pipet lấy 20,0 ml "Dung dịch điện giải hỗ trợ" vào bình định mức 100-ml, pha loãng đến vạch bằng isopropanol, trộn đều.

Tiến hành

Rửa bình cực phổ H-cell vài lần bằng từng lượng nhỏ "Dung dịch thử A", sau đó đổ đầy một nửa bình bằng dung dịch này, đặt một mẩu giấy thấm lên miệng bình và cho dòng khí nitrogen chạy từ từ qua dung dịch trong 15 phút (Chú ý: Trước hết phải bão hòa nitrogen bằng cách cho chạy qua bình sục phù hợp có chứa isopropanol). Sau 15 phút, hướng dòng nitrogen lên bề mặt dung dịch và lấy giấy ra khỏi bình. Với một cực phổ kế phù hợp đã được hiệu chuẩn trước (như cực phổ kế Metrohm Polacord E-261, hoặc tương đương đặt một thế phân cực ở -1,3V. Điều chỉnh độ nhạy dòng tới thang thấp nhất (nhạy nhất) mà tại đó các dao động dòng vẫn nằm trong thang. Ghi lại cực phổ đồ tại độ nhạy này, quét thế trong khoảng từ -0,9 đến -1,5 V, dùng điện cực so sánh là điện cực calomel bão hòa . Ghi lại dao động trung bình A tại thế -1,3 V, và dao động trung bình B, tại thế -1,0 V, theo mm. (Chú ý: nếu sử dụng cực phổ kế không tự động, ghi lại các dao động dòng khuếch tán trung bình của dung dịch tương ứng tại -1,3 V và -1,0V). Lặp lại toàn bộ quá trình với dung dịch thử B, ghi lại giá trị dao động dòng khuếch tán trung bình, D, tại -1,3 V và E, tại - 1,0 V.

Làm tương tự với mẫu trắng, ghi lại giá trị dao động dòng khuếch tán trung bình, G, tại -1,3V và H, tại -1 V.

Tính toán:

Trước hết tính các gía trị sau (theo mA):

$$C = (A - B) \times S_1$$

Trong đó

C là cường độ dòng khuếch tán của "Dung dịch thử A" và

S_1 là độ nhạy dòng khi đo "Dung dịch thử A"

$$F = (D - E) \times S_2$$

Trong đó

F là cường độ khuếch tán của "Dung dịch thử B" và

S_2 là độ nhạy dòng khi đo "Dung dịch thử B"

$$I = (G - H) \times S_3$$

Trong đó

I là cường độ dòng khuếch tán của "Mẫu trắng" và

S_3 là độ nhạy dòng khi đo "Mẫu trắng"

$$J = F - C$$

Trong đó

J là dòng khuếch tán gây ra do thêm maleat từ Dung dịch chuẩn vào Dung dịch thử B.

$$K = C - I$$

Trong đó

K dòng khuếch tán gây ra do maleat có trong Dung dịch thử A.

Cuối cùng, tính phần trăm của bis-(2-ethylhexyl)-maleat có trong mẫu ban đầu theo công thức sau:

$$\frac{K \times 50 W_A}{J \times W_S}$$

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

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

6.2. Định lượng

Các dung dịch

- Dung dịch mẫu: Chuyển khoảng 3,8 g mẫu thử, trước đó đã được sấy khô ở 105°C trong 2 giờ và đã được cân chính xác, vào bình định mức 500 ml, hòa tan trong cloroform. Pha loãng đến vạch bằng dung môi trên, trộn đều.

- Dung dịch tetra-n-butylamoni iodid: Chuyển 1,250 g tetra-n-butylamoni iodid vào bình định mức 500 ml, pha loãng đến vạch bằng nước, trộn đều.

- Dung dịch muối: hòa tan 100 g natri sulfat khan và 10 g natri carbonat vào một lượng nước vừa đủ để có được thể tích cuối cùng là 1000 ml.

Tiến hành

Dùng pipet lấy 10,0 ml "Dung dịch mẫu" vào bình định mức 250 ml, thêm vào đó 40 ml cloroform, 50 ml "Dung dịch muối", 10 giọt dunh dịch xanh bromophenol (TS). Chuẩn độ bằng "Dung dịch tetra-n-butylamoni iodid" đến khi bắt đầu xuất hiện màu xanh trong lớp cloroform sau khi lắc mạnh dung dịch. Tính hàm lượng (%) $C_{20}H_{37}NaO_7S$ theo công thức:

$$\frac{V \times 1.250 \times 444.6 \times 10}{W \times 369.4}$$

trong đó

V = thể tích (ml) của dung dịch tetra-n-butylamoni iodid dùng để chuẩn độ.

444,6 = khối lượng phân tử của dioctyl natri sulfosuccinat

W = khối lượng (g) của mẫu thử

369,4 = khối lượng phân tử của tetra-n-butylamoni iodid.

Phụ lục 17
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI STEARYL TARTRAT

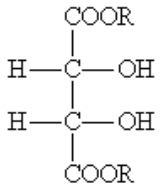
1. Tên khác, chỉ số Stearyl palmityl tartrat;
INS 483

2. Định nghĩa Sản phẩm của quá trình ester hóa acid tartric với cồn stearylic thương mại, về cơ bản gồm cồn stearylic và palmitylic; gồm thành phần chính là diester, với lượng nhỏ monoester và các nguyên liệu ban đầu không thay đổi.

Tên hóa học Các thành phần chính là distearyl tartrat, dipalmityl tartrat và stearylpalmityl tartrat.

Công thức hóa học Distearyl tartrat: $C_{40}H_{78}O_6$
Dipalmityl tartrat: $C_{36}H_{70}O_6$
Stearylpalmityl tartrat: $C_{38}H_{74}O_6$

Công thức cấu tạo



Trong đó R là $(CH_2)_{17}CH_3$ hoặc $(CH_2)_{15}CH_3$

Khối lượng phân tử Distearyl tartrat: 655,06
Dipalmityl tartrat: 598,95
Stearylpalmityl tartrat: 627

3. Cảm quan Chất nhờn có màu kem

4. Chức năng Chất nhũ hóa, chất xử lý bột

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Không tan trong nước, không tan trong ethanol lạnh, tan trong ethanol nóng.

Nhiệt độ nóng chảy 67 - 77^{0}C

Chỉ số hydroxyl 200 - 220

Tartrat Phải có phản ứng đặc trưng của tartrat.

5.2. Độ tinh khiết

Tro sulfat Không được quá 0,5% (Thử trên 2 g mẫu, phương pháp I)

Acid tartric tổng số Không được nhỏ hơn 18% và không được quá 35% (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chất không xà phòng hóa	Không được nhỏ hơn 77% và không được quá 83% (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Chỉ số acid	Không được quá 6 (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Không được nhỏ hơn 90% hàm lượng ester tổng số tương ứng với chỉ số ester trong khoảng 163 - 180.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Acid tartric tổng số

Đường chuẩn:

Cân 100 mg acid tartric tinh khiết cho vào bình định mức dung tích 100 ml, hòa tan trong khoảng 90 ml nước, thêm nước vào cho đến khi đạt thể tích 100 ml và lắc đều. Chuyển các phần tách biệt 3, 4, 5, 6 ml vào trong các cuvet phù hợp 19 x 150 mm, thêm lượng nước vừa đủ đến 10 ml. Thêm vào 4 ml dung dịch natri metavanadat 5% vừa chuẩn bị và 1 ml acid acetic vào mỗi cuvet. (Chú ý: sử dụng các dung dịch này trong 10 phút sau khi xuất hiện màu). Chuẩn bị mẫu trắng theo cách tương tự, sử dụng 10 ml nước thay thế dung dịch acid tartric. Đặt trên thiết bị độ hấp thụ bằng 0 đối với mẫu trắng, sau đó đo độ hấp thụ của 4 dung dịch acid tartric ở bước sóng 520 nm với máy quang phổ thích hợp hoặc máy so màu quang điện được trang bị kính lọc 520 nm. Từ các kết quả thu được, vẽ đường chuẩn trên hệ toạ độ vuông góc với trục tung biểu diễn độ hấp thụ và trục hoành biểu diễn hàm lượng acid tartric (mg).

Chuẩn bị mẫu thử:

Cân chính xác 4 g mẫu cho vào bình Erlenmeyer dung tích 250 ml và thêm vào 80 ml dung dịch KOH 0,5N và 0,5 ml phenolphthalein TS. Nối bình với một sinh hàn không khí có chiều dài ít nhất 65 cm và gia nhiệt hỗn hợp trên tấm bản nóng trong 2,5 giờ. Thêm vào hỗn hợp nóng acid phosphoric 10% cho đến khi có phản ứng acid rõ rệt phát hiện được bằng giấy thử đỏ congo. Lại kết nối sinh hàn khí và gia nhiệt cho đến khi acid béo hóa lỏng và trong. Làm nguội và chuyển hỗn hợp vào một phễu chiết dung tích 250 ml bằng các phần nhỏ nước và chloroform. Chiết tách các acid béo được giải phóng ra bằng 3 lần liên tiếp 25 ml nước và cho phần nước rửa vào phễu chiết chứa lớp nước. Chuyển các thành phần có trong phễu chiết thứ nhất vào cốc 250 ml, gia nhiệt trên chậu hơi nước để loại các vệt chloroform, lọc qua giấy lọc mịn vào bình định mức dung tích 500 ml và cuối cùng pha tới thể tích 500 ml bằng nước (Dung dịch I). Dùng pipet lấy 25 ml dung dịch này cho

vào bình định mức dung tích 100 ml và pha tới thể tích 100 ml bằng nước (Dung dịch II).

Cách tiến hành:

Chuyển 10 ml dung dịch II đã được chuẩn bị trong phần Chuẩn bị mẫu thử vào cuvet 19 x 150. Thêm vào 4 ml dung dịch natri metavanadat 5% vừa chuẩn bị và 1 ml acid acetic. (Chú ý: sử dụng các dung dịch này trong 10 phút sau khi xuất hiện màu). Chuẩn bị mẫu trắng theo cách tương tự, sử dụng 10 ml nước thay thế dung dịch acid tartric. Đặt trên thiết bị đo độ hấp thụ bằng 0 đối với mẫu trắng, sau đó đo độ hấp thụ của 4 dung dịch acid tartric ở bước sóng 520 nm với máy quang phổ thích hợp hoặc máy so màu quang điện được trang bị kính lọc 520 nm. Từ đường chuẩn xác định hàm lượng acid tartric (mg) trong dung dịch pha cuối cùng, nhân hàm lượng acid tartric xác định được với 20 và chia cho trọng lượng mẫu ban đầu để thu được % acid tartric.

Chất không xà phòng hóa

Cách tiến hành này xác định những chất hòa tan trong chất béo mà không được xà phòng hóa bởi kiềm nhưng được hòa tan trong dung môi chất béo thông thường.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 5 g mẫu cho vào bình dung tích 250 ml, thêm dung dịch có 2 g KOH trong 40 ml alcol và đun sôi nhẹ có sinh hàn ngược trong 1 giờ. Chuyển toàn bộ hỗn hợp chứa trong bình vào ống đong có nắp đậy thủy tinh (chiều cao khoảng 30 cm, đường kính 3,5 cm và có vạch định mức 40, 80 và 130 ml). Rửa bình bằng alcol phù hợp đến thể tích 40 ml trong ống đong, thêm nước ấm, sau đó bằng nước lạnh cho đến khi tổng thể tích đạt 80 ml. Cuối cùng rửa bình bằng vài ml ether dầu hỏa, cho phần dung môi rửa vào ống đong, làm mát hỗn hợp trong ống đong đến nhiệt độ phòng và thêm 50 ml ether dầu hỏa.

Đậy nắp, lắc ống đong mạnh ít nhất trong 1 phút, để hai lớp tách ra trong. Hút lớp bên trên hoàn toàn nếu có thể mà không hút bất kỳ một chút dịch nào của lớp dưới, lấy phần ether cho vào trong một phễu tách dung tích 500 ml. Lặp lại quá trình trích ly và hút dịch ít nhất 6 lần bằng các phần 50 ml ether dầu hỏa, lắc mạnh mỗi lần. Rửa hỗn hợp phần trích ly bằng các phần 25 ml alcol 10% và lắc mạnh cho đến khi nước rửa được trung Hòa sử dụng chất chỉ thị phenolphthalein, và loại bỏ phần nước rửa. Chuyển phần ether tách được vào cốc đã biết khối lượng và rửa phễu tách bằng 10 ml ether, sau đó cho nước rửa vào cốc.

Cô ether trong cách thủy đến khô và làm khô phần cặn đến khối lượng không đổi, tốt nhất 75 - 80^{0}C ở áp suất chân không không quá 200 mm Hg, hoặc ở 100^{0}C ở áp suất thường trong 30 phút. Làm mát trong bình hút ẩm và cân để thu được khối lượng chưa hiệu chỉnh của chất không xà phòng.

Xác định hàm lượng acid béo trong cặn bằng cách sau: hòa tan cặn trong 50 ml alcol ấm (chứa phenolphthalein TS và trước đó được trung hòa bằng NaOH tới màu hồng nhạt), chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,02N cho đến khi xuất hiện màu hồng nhạt. Mỗi ml dung dịch NaOH 0,02N tương ứng với 5,659 mg acid béo, tính theo acid oleic. Hiệu số khối lượng chưa hiệu chỉnh của chất không xà phòng và khối lượng acid béo tính được từ phép chuẩn độ trên là khối lượng chất không xà phòng hóa trong mẫu thử.

Chỉ số acid Cân chính xác 1 g mẫu và hòa tan trong 20 ml ethanol 95% nóng, trước đó đã được trung hòa có sử dụng 0,5 ml chất chỉ thị phenolphthalein TS. Làm nguội dung dịch sau đó trung hòa bằng cách chuẩn độ với dung dịch KOH 0,01N trong ethanol.

$$\text{Chỉ số acid} = \frac{0{,}561 \times \text{thể tích dung dịch KOH dùng để chuẩn độ (ml)}}{\text{Khối lượng mẫu (g)}}$$

Giữ lại dung dịch đã được trung hòa cho phần Định lượng.

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

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

6.2. Định lượng Thêm chính xác 50 ml dung dịch KOH 0,1N trong ethanol vào dung dịch đã được trung hòa ở trên từ phần xác định chỉ số acid và đun sôi đều trong 2 phút. Làm nguội dung dịch và chuẩn độ dư KOH bằng B ml dung dịch HCl 0,1N. Thực hiện xác định với mẫu trắng (bằng A ml dung dịch HCl 0,1N).

$$\text{Chỉ số ester} = \frac{5{,}611 \times (A - B)}{\text{Khối lượng mẫu (g)}}$$

Phụ lục 18
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAL MONOSTEARAT

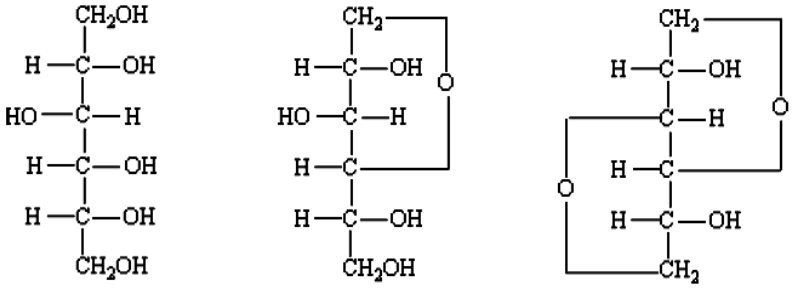
1. Tên khác, chỉ số INS 491

ADI=0-25mg/kg thể trọng

2. Định nghĩa Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid stearic thực phẩm.

Chỉ số C.A.S 1338-41-6

Công thức cấu tạo Gồm acid palmitic este hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol 1,4-Sorbitan Isosorbid

3. Cảm quan Hạt hay mảnh có màu kem nhạt đến vàng nâu hoặc dạng sáp rắn, có mùi nhẹ đặc trưng.

4. Chức năng Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Tại nhiệt độ cao hơn điểm chảy, tan trong toluen, dioxan, carbon tetraclorid, ether, methanol, ethanolvà anilin; không tan trong ether dầu hỏa và aceton, không tan trong nước lạnh nhưng có thể phân tán trong nước ấm.Tại nhiệt độ trên 50°C tan dạng sương mù trong dầu khoáng và ethyl acetat.

Khoảng nhiệt độ đông đặc 50-52°C.

Hấp thụ hồng ngoại Phổ hồng ngoại của mẫu thử đặc trưng cho este một phần của acid béo với polyol

5.2. Độ tinh khiết

Nước Không được quá 1,5% (phương pháp Karl Fischer).

Chỉ số acid Không được thấp hơn 5 và không được quá 10.

Chỉ số xà phòng hóa Không được thấp hơn 147 và không được quá 157.

Chỉ số Hydroxyl	Không được thấp hơn 235 và không được quá 260.
Chì	Không được quá 2,0 mg/kg.
5.3. Hàm lượng	Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được khoảng 31,5g polyol và 73g acid béo. Hàm lượng polyol không được thấp hơn 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Chì	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.
6.2. Định lượng	Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định hàm lượng sorbitan ester (JECFA monograph 1 - Vol.4).

Phụ lục 19
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAN TRISTEARAT

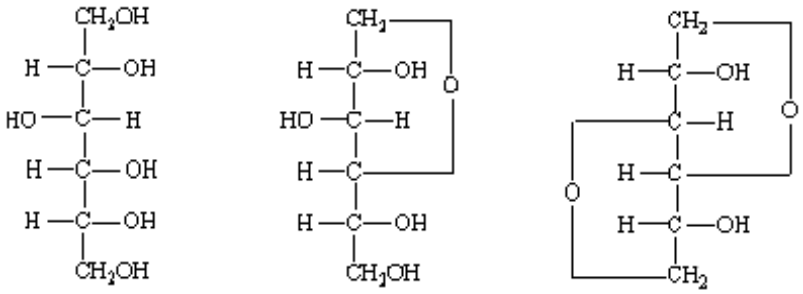
1. Tên khác, chỉ số INS 492

ADI=0-25mg/kg thể trọng

2. Định nghĩa Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid stearic thực phẩm.

Chỉ số C.A.S 26658-19-5

Công thức cấu tạo Gồm acid stearic este hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol 1,4-Sorbitan Isosorbid

3. Cảm quan Hạt hay mảnh có màu kem nhạt đến vàng nâu hoặc dạng sáp rắn

4. Chức năng Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Khó tan trong toluen, ether, carbon tetraclorid, ethyl acetat; có thể phân tán trong ether dầu hỏa, dầu khoáng, dầu thực vật, aceton và dioxan; không tan trong nước, methanol và ethanol (thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4).

Khoảng nhiệt độ đông đặc 47-50°C.

5.2. Độ tinh khiết

Nước Không được quá 1,5% (phương pháp Karl Fischer).

Tro sulfat Không được quá 0,5%.

Chỉ số acid Không được quá 15.

Chỉ số xà phòng hóa Không được thấp hơn 176 và không được quá 188.

Chỉ số Hydroxyl Không được thấp hơn 66 và không được quá 80.

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được không thấp hơn 14g và không được quá 21g polyol và không thấp hơn 85g và không được quá 92g acid béo. Hàm lượng polyol không được thấp hơn 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

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

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

6.2. Định lượng Cân 25g mẫu thử, chính xác đến mg, chuyển vào bình cầu đáy tròn 500 ml, thêm 250 ml cồn và 7,5g kali hydroxyd và trộn đều. Lắp bình cầu với sinh hàn thích hợp, đun hồi lưu hỗn hợp trong từ 1-2 giờ sau đó chuyển hỗn hợp sang cốc 800 ml, tráng sạch bình bằng 100 ml nước cất và gộp dịch rửa vào cốc. Cho bay hơi hết cồn trên bể cách thủy, thỉnh thoảng thêm nước để thay thế lượng cồn đã bay hơi. Dừng quá trình đuổi cồn khi không còn mùi cồn bay ra. Hiệu chỉnh thể tích cuối cùng cho đủ 250 ml bằng nước nóng. Trung hòa dung dịch xà phòng với acid sulfuric loãng (1/2), thêm 10% dư và đun nóng, khuấy đều cho đến khi acid béo tách lớp. Chuyển lớp acid béo sang phễu chiết 500 ml, rửa 3 hoặc 4 lần, mỗi lần với 20 ml nước nóng để loại hết các polyol, gộp dịch rửa với pha nước chứa polyol thu được từ quá trình xà phòng hóa. Chiết pha nước này 3 lần 20 ml ether dầu hoả/lần, lấy lớp ether dầu hỏa gộp với phần acid béo, cho bay hơi tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân.

Trung hòa dung dịch chứa polyol bằng dung dịch kali hydroxyd 1/10 tới pH = 7, sử dụng pH kế thích hợp. Cho bay hơi dung dịch này tới gần cạn, tách phần polyol khỏi các muối bằng cách chiết vài lần với cồn nóng. Cho bay hơi dịch chiết cồn trên bể cách thủy tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân. Tránh khô quá trong quá trình đun nóng.

Tiến hành định lượng một mẫu khác (25g) theo hướng dẫn chuyên luận xác định hàm lượng ester sorbitan để xác định % ester sorbitan.

Phụ lục 20
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAN MONOLAURAT

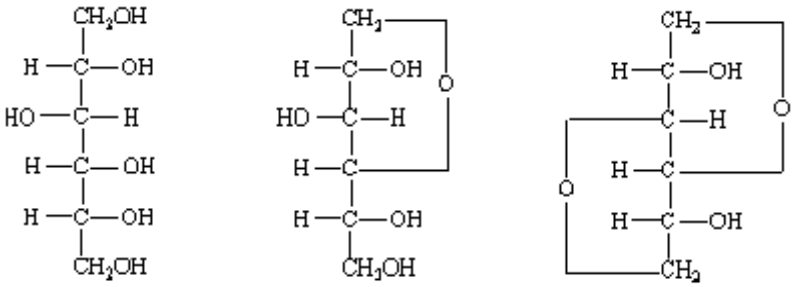
1. Tên khác, chỉ số INS 493

ADI=0-25mg/kg thể trọng

2. Định nghĩa Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid lauric thực phẩm.

Chỉ số C.A.S 1338-39-2

Công thức cấu tạo Gồm acid lauric este hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol 1,4-Sorbitan Isosorbid

3. Cảm quan Dạng lỏng nhớt sánh có màu hổ phách, dạng hạt hay mảnh có màu kem nhạt đến vàng nâu hoặc dạng sáp rắn, có mùi nhẹ đặc trưng.

4. Chức năng Chất nhũ hóa, chất ổn định

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Có thể phân tán được trong nước nóng và nước lạnh.

5.2. Độ tinh khiết

Nước Không được quá 2,0% (phương pháp Karl Fischer).

Tro sulfat Không được quá 0,5%.

Chỉ số acid Không được quá 7.

Chỉ số xà phòng hóa Không được thấp hơn 155 và không được quá 170.

Chỉ số Hydroxyl Không được thấp hơn 330 và không được quá 358.

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được không thấp hơn 36g và không được quá 49g polyol, không thấp hơn 56g và không được quá 68g acid béo. Hàm lượng polyol không được thấp hơn 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

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

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

6.2. Định lượng Cân 25g mẫu thử, chính xác đến mg, chuyển vào bình cầu đáy tròn 500 ml, thêm 250 ml cồn và 7,5g kali hydroxyd và trộn đều. Lắp bình cầu với sinh hàn thích hợp, đun hồi lưu hỗn hợp trong từ 1-2 giờ sau đó chuyển hỗn hợp sang cốc 800 ml, tráng sạch bình bằng 100 ml nước cất và gộp dịch rửa vào cốc. Cho bay hơi hết cồn trên bể cách thủy, thỉnh thoảng thêm nước để thay thế lượng cồn đã bay hơi. Dừng quá trình đuổi cồn khi không còn mùi cồn bay ra. Hiệu chỉnh thể tích cuối cùng cho đủ 250 ml bằng nước nóng.

Trung hòa dung dịch xà phòng với acid sulfuric loãng (1/2), thêm 10% dư và đun nóng, khuấy đều cho đến khi acid béo tách lớp. Chuyển lớp acid béo sang phễu chiết 500 ml, rửa 3 hoặc 4 lần, mỗi lần với 20 ml nước nóng để loại hết các polyol, gộp dịch rửa với pha nước chứa polyol thu được từ quá trình xà phòng hóa. Chiết pha nước này 3 lần 20 ml ether dầu hỏa/lần, lấy lớp ether dầu hỏa gộp với phần acid béo, cho bay hơi tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân.

Trung hòa dung dịch chứa polyol bằng dung dịch kali hydroxyd 1/10 tới pH = 7, sử dụng pH kế thích hợp. Cho bay hơi dung dịch này tới gần cạn, tách phần polyol khỏi các muối bằng cách chiết vài lần với cồn nóng. Cho bay hơi dịch chiết cồn trên bể cách thủy tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân. Tránh khô quá trong quá trình đun nóng.

Phụ lục 21
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAN MONOOLEAT

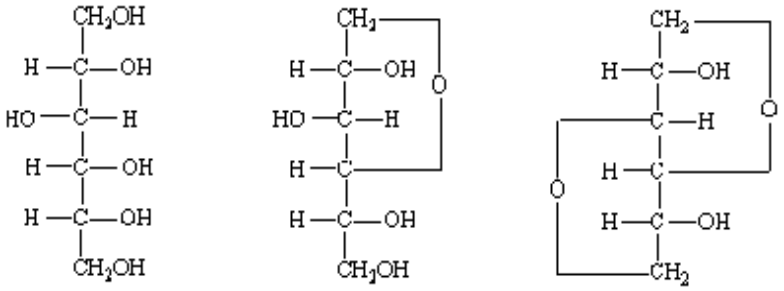
1. Tên khác, chỉ số INS 494

ADI=0-25mg/kg thể trọng

2. Định nghĩa Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid oleic thực phẩm (R). Thành phần lớn nhất là 1,4-Sorbitan monooleat, thành phần ít hơn là isosorbid monooleat, sorbitan dioleat và sorbitan trioleat.

Chỉ số C.A.S 1338-43-8

Công thức cấu tạo Gồm acid oleic este hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol 1,4-Sorbitan Isosorbid

3. Cảm quan Dạng sệt sánh màu hổ phách, dạng hạt hay mảnh có màu kem nhạt đến vàng nâu hoặc dạng sáp rắn, có mùi nhẹ.

4. Chức năng Chất nhũ hóa, chất ổn định

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Tại nhiệt độ cao hơn điểm chảy, tan trong ethanol, ether, ethylacetat, anilin, toluen, dioxan, ether dầu hỏa, carbon tetraclorid; không tan trong nước lạnh nhưng có thể phân tán trong nước ấm.

Chỉ số iod Phần acid oleic thu được bằng cách xà phòng hóa sorbitan monooleat trong quá trình định lượng có chỉ số iod từ 80 đến 100.

5.2. Độ tinh khiết

Nước Không được quá 2% (phương pháp Karl Fischer).

Tro sulfat Không được quá 0,5%.

Chỉ số acid Không được quá 8.

Chỉ số xà phòng hóa Không được thấp hơn 145 và không được quá 160.

Chỉ số Hydroxyl Không được thấp hơn 193 và không được quá 210.

Chì Không được quá 2,0 mg/kg

5.3. Hàm lượng Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được không thấp hơn 28g và không được quá 32g polyol, không thấp hơn 73g và không được quá 77g acid béo. Hàm lượng polyol không được thấp hơn 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

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

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

6.2. Định lượng Cân 25g mẫu thử, chính xác đến mg, chuyển vào bình cầu đáy tròn 500 ml, thêm 250 ml cồn và 7,5g kali hydroxyd và trộn đều. Lắp bình cầu với sinh hàn thích hợp, đun hồi lưu hỗn hợp trong từ 1-2 giờ sau đó chuyển hỗn hợp sang cốc 800 ml, tráng sạch bình bằng 100 ml nước cất và gộp dịch rửa vào cốc. Cho bay hơi hết cồn trên bể cách thủy, thỉnh thoảng thêm nước để thay thế lượng cồn đã bay hơi. Dừng quá trình đuổi cồn khi không còn mùi cồn bay ra. Hiệu chỉnh thể tích cuối cùng cho đủ 250 ml bằng nước nóng. Trung hòa dung dịch xà phòng với acid sulfuric loãng (1/2), thêm 10% dư và đun nóng, khuấy đều cho đến khi acid béo tách lớp. Chuyển lớp acid béo sang phễu chiết 500 ml, rửa 3 hoặc 4 lần, mỗi lần với 20 ml nước nóng để loại hết các polyol, gộp dịch rửa với pha nước chứa polyol thu được từ quá trình xà phòng hóa. Chiết pha nước này 3 lần 20 ml ether dầu hoả/lần, lấy lớp ether dầu hoả gộp với phần acid béo, cho bay hơi tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân.

Trung hòa dung dịch chứa polyol bằng dung dịch kali hydroxyd 1/10 tới pH = 7, sử dụng pH kế thích hợp. Cho bay hơi dung dịch này tới gần cạn, tách phần polyol khỏi các muối bằng cách chiết vài lần với cồn nóng. Cho bay hơi dịch chiết cồn trên bể cách thủy tới khô trong một đĩa đã xác định bì, để nguội và cân. Tránh khô quá trong quá trình đun nóng.

Tiến hành định lượng một mẫu khác (25g) theo hướng dẫn chuyên luận xác định hàm lượng sorbitan ester để xác định % sorbitan ester.

Phụ lục 22

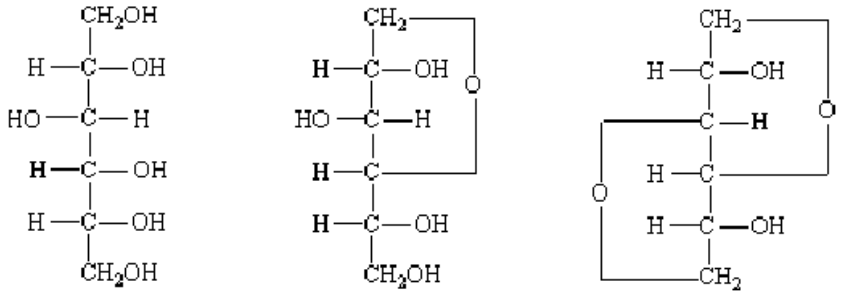
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI SORBITAN MONOPALMITAT

1. Tên khác, chỉ số INS 495

2. Định nghĩa Hỗn hợp bao gồm các ester một phần của sorbitol và các dẫn chất mono- và dianhydrid của nó với acid palmitic thực phẩm

Chỉ số C.A.S 26266-57-9

Công thức cấu tạo Gồm acid palmitic ester hóa với polyol dẫn xuất từ sorbitol bao gồm các loại sau:



Sorbitol 1,4-Sorbitan Isosorbid

3. Cảm quan Dạng sáp rắn có màu kem nhạt đến vàng nâu, có mùi nhẹ.

4. Chức năng Chất nhũ hóa

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan Tại nhiệt độ cao hơn điểm chảy, tan trong methanol, ether, ethylacetat, anilin, toluen, dioxan, ether dầu hỏa, carbon tetraclorid; không tan trong nước lạnh nhưng có thể phân tán trong nước ấm.

Độ đông đặc 45 - 47^0

Hấp thụ hồng ngoại Phải có phổ hồng ngoại đặc trưng của ester của acid béo với polyol

5.2. Độ tinh khiết

Nước Không được quá 1,5% (phương pháp Karl Fischer).

Chỉ số acid Không được thấp hơn 4 và không đươc quá 7,5.

Chỉ số xà phòng hóa Không được thấp hơn 140 và không được quá 150.

Chỉ số Hydroxyl Không được thấp hơn 270 và không được quá 305.

Chì	Không được quá 2,0 mg/kg
5.3. Hàm lượng	Xà phòng hóa 100g mẫu phải thu được khoảng 37 g polyol và 65 g acid béo. Hàm lượng polyol phải vào khoảng 95% trong hỗn hợp sorbitol, 1,4-sorbitan và isosorbid.

6. Phương pháp thử

6.1. Độ tinh khiết

Chì	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.
6.2. Định lượng	Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định hàm lượng sorbitan ester (JECFA monograph 1 - Vol.4).

QCVN 4 - 23: 2011/BYT

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT TẠO BỌT

National technical regulation on Food Additive - Foaming agents

Lời nói đầu

QCVN 4-23: 2011/BYT do *Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến* biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT TẠO BỌT

National technical regulation on Food Additive - Foaming agent

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

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

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

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

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

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt

3.1. Chất tạo bọt: là phụ gia thực phẩm được cho vào thực phẩm nhằm tạo ra hoặc duy trì sự phân tán đồng nhất của pha khí trong thực phẩm dạng lỏng hoặc dạng rắn.

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

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

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

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

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

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

1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với chất chiết xuất từ Quillaia sử dụng làm chất tạo bọt được quy định tại phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này.

2. Các yêu cầu kỹ thuật quy định trong Quy chuẩn này được thử theo JECFA monograph 1 - Vol. 4, ngoại trừ một số phép thử riêng được mô tả trong phụ lục.

Các phương pháp thử được hướng dẫn trong Quy chuẩn này không bắt buộc phải áp dụng, có thể sử dụng các phương pháp thử khác tương đương.

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư 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. Chất tạo bọt phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

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

2. Kiểm tra đối với chất tạo bọt

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

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

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

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

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

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

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

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

Phụ lục
YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CHẤT CHIẾT XUẤT TỪ QUILLAIA (DẠNG 1)

1. Tên khác, chỉ số	Quillaja extract, Soapbark extract, Quillay bark extract, Bois de Panama, Panama bark extract, Quillai extract. ADI: 0 - 1mg/kg thể trọng (tính cho cả dạng 1 và 2) INS 999i
2. Định nghĩa	Chất chiết xuất từ quillaia (dạng 1) thu được từ quá trình chiết với nước vỏ hoặc gỗ của thân và cành *Quillaja saponaria* Molina (họ *Rosaceae*). Chế phẩm chứa saponin triterpenoid trong đó chủ yếu là glycosid của acid quillaic. Polyphenol và tanin là những thành phần chính, ngoài ra còn có một vài loại đường và calci oxalat. Chế phẩm chiết xuất từ quillaia (dạng 1) thương mại ở dạng lỏng hoặc bột sấy phun có chất mang như lactose, maltitol hoặc maltodextrin. Sản phẩm dạng lỏng thường được bảo quản bằng natri benzoat hoặc ethanol.
Tên hóa học	Saponin triterpenoid (quillaia saponin), glycosid của acid quillaic
Mã số C.A.S.	68990-67-0
Khối lượng phân tử	Các saponin dạng monomer có khối lượng phân tử khoảng 1.800 - 2.300, phù hợp với một triterpen gồm 8 - 10 monosaccharid.
3. Cảm quan	Dạng lỏng màu nâu đỏ hoặc dạng bột màu nâu sáng có ánh hồng
4. Chức năng	Chất nhũ hóa, chất tạo bọt

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan	Tan tốt trong nước; không tan trong ethanol, aceton, methanol và butanol.
Tạo bọt	Phải có phản ứng tạo bọt đặc trưng.
Sắc ký	Thời gian lưu của pic chính của mẫu tương ứng với pic saponin chính (QS-18) của chuẩn (mô tả trong phần Phương pháp thử)
Màu sắc và độ đục	Phải có màu sắc và độ đục đặc trưng.

5.2. Độ tinh khiết

Nước	Dạng bột: Không được quá 6% (theo phương pháp Karl Fischer)
Giảm khối lượng khi sấy khô	Dạng lỏng: 50 - 80% (sấy 2 g mẫu ở nhiệt độ 105^0C trong 5 giờ)
pH	3,7 - 5,5 (đối với nồng độ dung dịch 4%)

Tro Không được quá 14% theo chế phẩm khô (dùng 1 g mẫu đối với dạng bột; đối với mẫu dạng lỏng sử dụng phần còn lại sau khi sấy khô)

Tanin Không được quá 8% theo chế phẩm khô (mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chì Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Hàm lượng Hàm lượng saponin: không được thấp hơn 20% và không được quá 26% tính theo chế phẩm khô.

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Tạo bọt Hòa tan 0,5 g mẫu dạng bột trong 9,5 g nước hoặc 1 ml mẫu dạng lỏng trong 9 ml nước. Cho 1 ml hỗn hợp và 350 ml nước vào trong ống đong loại 1.000 ml. Bịt kín ống đong và lắc mạnh 30 lần, để yên. Ghi lại mức bọt (ml) sau 30 phút. Bình thường mức bọt đạt khoảng 150 ml bọt.

Màu sắc và độ đục Đối với dạng bột: hòa tan 0,5 g mẫu trong 9,5 g nước. Dung dịch không đục. Độ hấp thụ của dung dịch so với nước ở bước sóng 520 nm phải nhỏ hơn 1,2.

6.2. Độ tinh khiết

Tanin Cân 3,0 g mẫu dạng bột hoặc lượng mẫu dạng lỏng tương đương tính theo lượng chế phẩm khô sau khi sấy. Hòa tan mẫu trong 250 ml nước. Điều chỉnh pH = 3,5 bằng acid acetic. Sấy 25 ml dung dịch thu được ở nhiệt độ 105^0C trong thời gian 5 giờ và xác định khối lượng chất khô theo đơn vị g (W_i). Trộn 50 ml dung dịch trên với 360 mg polyvinyl polypyrrolidon, sau đó khuấy trong 30 phút ở nhiệt độ phòng; ly tâm với tốc độ 8.000 vòng/phút. Lấy phần dung dịch trong ở phía trên, sấy ở nhiệt độ 105^0C, thời gian 5 giờ. Cân phần chất khô thu được (W_f, đơn vị tính g). Hàm lượng tanin (%) trong mẫu được tính như sau:

$$\% \text{ Tanin (theo chế phẩm khô)} = 100 \times (W_i - W_f/2)/W_i$$

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

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

6.3. Định lượng

Nguyên tắc:

Saponin QS-7,QS-17, QS-18 và QS-21 được tách bằng HPLC pha đảo, kết quả định lượng được xem là tổng hàm lượng saponin có trong chất chiết xuất từ Quillaia (dạng 1)

Chuẩn bị mẫu:

Đối với mẫu dạng bột: Cân 0,5 g mẫu và hòa tan trong 9,5 g nước. Lọc qua bộ lọc cỡ 0,2 µm.

Dịch chiết nước (khoảng 550 mg chất khô/ml): Cân 1 g mẫu và pha với 9 g nước. Lọc qua bộ lọc cỡ 0,2 µm.

Trong cả hai trường hợp trên, thể tích mẫu khoảng 10 ml.

Chuẩn bị mẫu chuẩn:

Cân 1,5 g saponin tinh sạch (của các hãng SuperSap, Natural Response, Chilê; Quil-A, Superfos, Đan Mạch hoặc tương đương, đã biết hàm lượng saponin), hòa tan trong 100 ml nước. Lọc qua bộ lọc cỡ 0,2 µm.

Điều kiện HPLC:

- Cột: Vydac 214TP54 (dài 4,6 x 250 mm, lỗ 5 µm) hoặc loại tương ứng
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng
- Bơm: đặt chế độ gradient
- Dung môi A: 0,15% TFA (acid trifloroacetic) trong nước dùng cho HPLC
- Dung môi B: 0,15% TFA (acid trifloroacetic) trong acetonitril dùng cho HPLC
- Gradient:

Thời gian (phút)	% Dung môi A	% Dung môi B
0	70	30
40	55	45
45	70	30

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Bước sóng phát hiện: 220 nm
- Thể tích bơm mẫu: 20 µl

Tính kết quả: Nồng độ saponin (mg/ml) trong dung dịch được chuẩn bị như trên là:

$$C_{mẫu} = (A_{mẫu}/A_{chuẩn})C_{chuẩn}$$

Trong đó:

- $C_{mẫu}$: Nồng độ saponin (mg/ml) trong mẫu thử
- $C_{chuẩn}$: Nồng độ saponin chuẩn (mg/ml) được bơm vào (ví dụ: $C_{chuẩn}$ = 13,5 mg/ml nếu hàm lượng saponin của 1,5 g mẫu chuẩn là 90%)
- $A_{mẫu}$ và $A_{chuẩn}$: Tổng diện tích các pic tương ứng với 4 loại saponin chính (QS-7,QS-17, QS-18, QS-21) có trong mẫu cần

phân tích và mẫu chuẩn. (Tanin và polyphenol được tách giải trước saponin. Các pic của saponin xuất hiện sau pic chính của polyphenol - xem hình ở phụ lục).

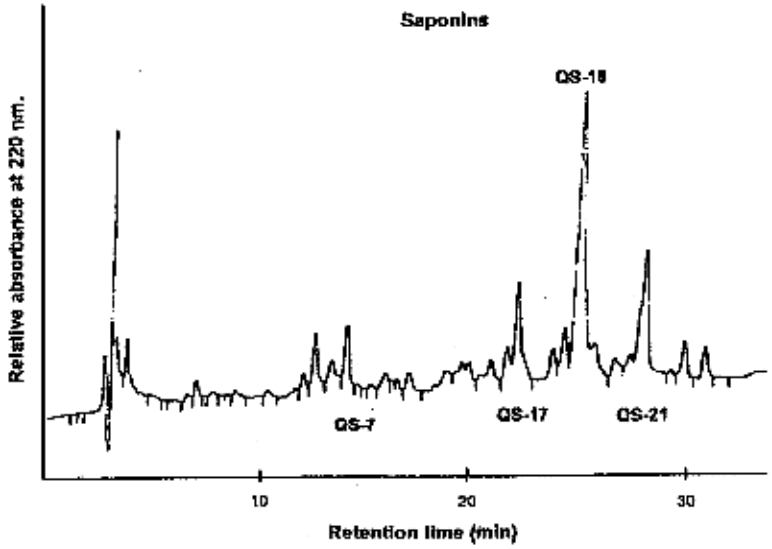
% Saponin có trong mẫu thử được tính như sau:

$$\% \text{ Saponin} = 100 \times C_{mẫu}/(0{,}1\ W_{mẫu})$$

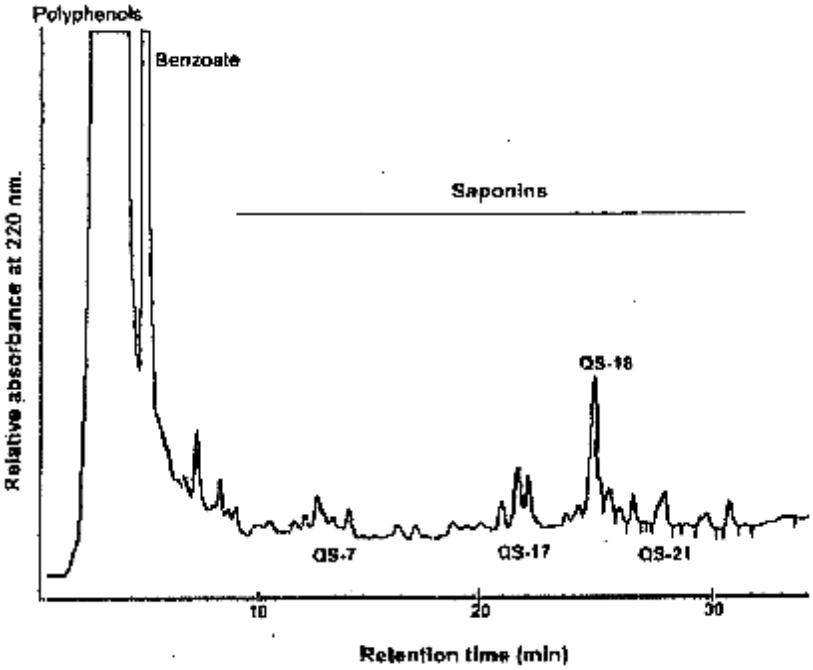
Trong đó:

- $W_{mẫu}$: Khối lượng mẫu (mg) được lấy để chuẩn bị mẫu và 0,1 là nghịch đảo của thể tích mẫu (10 ml).

Sắc ký đồ của chất chuẩn (15 mg chất khô/ml tương ứng với 13,5 mg saponin/ml)



Sắc ký đồ của chất chiết xuất từ Quillaia (dạng 1) (55 mg chất khô/ml)



- Hết -

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