Giấy cuốn điếu thuốc lá – Xác định xitrat

Cigarette paper – Determination of citrate

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng xitrat trong tất cả các loại giấy cuốn điếu thuốc lá.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

ISO 187: 1990 Paper, board and pulps – Standard atmosphere for conditioning and testing and procedure for monitoring the test atmosphere and conditioning of samples (Giấy, cactông và bột giấy – Môi trường chuẩn để điều hoà và thử nghiệm).

ISO 287 : 1985 Paper and board – Determination of moiture content – Oven-drying method (Giấy và cactông – Xác định độ ẩm – Phương pháp dùng tủ sấy).

3 Định nghĩa

Xitrat trong giấy cuốn điếu thuốc lá ảnh hưởng đến tốc độ cháy của giấy và do đó ảnh hưởng đến số hơi hút của điếu thuốc lá. Xitrat thường được bổ sung vào giấy cuốn điếu thuốc lá dưới dạng muối trinatri, muối trikali hoặc hỗn hợp của hai muối trinatri và trikali.

4 Nguyên tắc

Axit xitric (xitrat) được chuyển đổi thành oxaloaxetat và axetat trong phản ứng xúc tác bằng enzym xitrat lyaza (CL) (1).

$$\text{Xitrat} \xrightarrow{\text{CL}} \text{oxaloaxetat} + \text{axetat} \qquad (1)$$

Với sự có mặt của các enzym malat dehydrogenaza (MDH) và L-lactat dehydrogenaza (L-LDH), oxaloaxetat và sản phẩm pyruvat đã khử cacboxyl của chúng bị nicotinamid-adenin dinucleotit (NADH) khử thành L-malat và L-lactat, theo phương trình (2) (3) sau đây :

$$\text{Oxaloaxetat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L-malat} + NAD^+ \qquad (2)$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{L-LDH}} \text{L-lactat} + NAD^+ \qquad (3)$$

Dựa vào lượng NADH bị ôxy hoá trong các phản ứng (2) và (3) để tính lượng xitrat. NADH xác định được bằng cách đo độ hấp thụ của nó ở bước sóng 340 nm.

5 Thiết bị, dụng cụ và thuốc thử

5.1 Thiết bị, dụng cụ

- Pipet, dung tích 10,0 ml , 5,0 ml, 2,50 ml, 1,00 ml;
- Micropipet 0,200 ml.
- Máy so màu phân quang UV, hai chùm tia.
- Cuvet thuỷ tinh, dung tích 5 ml, chiều dài đường quang 10 mm.
- Bể siêu âm.
- Cân phân tích.

5.2 Thuốc thử

Nên sử dụng bộ thuốc thử để xác định xitrat enzym. Các bộ thuốc thử này có sẵn từ nhiều hãng cung cấp khác nhau (thí dụ BOEHRINGER, Mannheim).

Các bộ thuốc thử bao gồm:

- một chai chứa 1,4 g lyophilisat gồm: chất đệm glyxilglixin, pH 7,8; malat dehydrogenaza, 136 đơn vị; L-lactat dehydrogenaza, 280 đơn vị; NADH, 6 mg; chất ổn định (chai 1).
- một chai chứa 50 mg lyophilisat xitrat lyaza, 12 đơn vị (chai 2).

- Axit xitric ngậm một phân tử nước, loại tinh khiết phân tích.
- Nước cất.
- Bình nón, dung tích 250 ml.
- Bình định mức, dung tích 1 000 ml, 100 ml.
- Phễu lọc, đường kính 8 cm.
- Giấy lọc gấp nếp, đường kính 125 mm.

6 Dung dịch tiêu chuẩn

Để hiệu chuẩn phương pháp, sử dụng các dung dịch tiêu chuẩn chứa 50 ppm, 25 ppm và 12,5 ppm axit xitric, ngậm một phân tử nước loại tinh khiết phân tích, pha trong nước cất.

7 Cách tiến hành

Phải hết sức cẩn thận khi dùng pipet để hút các dịch chiết của mẫu.

7.1 Chuẩn bị các dung dịch thuốc thử (dùng cho 10 lần xác định).

– Hoà tan lượng chứa trong chai 1 của bộ thuốc thử vào 12 ml nước cất (dung dịch 1).

– Hoà tan lượng chứa trong chai 2 của bộ thuốc thử vào 0,3 ml nước cất (dung dịch 2).

Dung dịch 1 ổn định trong 2 tuần ở +4 °C hoặc trong 4 tuần ở –20 °C. Dung dịch 1 cần được đưa về nhiệt độ 20°C– 25°C trước khi sử dụng. Dung dịch 2 ổn định 1 tuần ở + 4 °C hoặc trong 4 tuần ở –20 °C.

Toàn bộ các hoạt tính của các hệ enzym phải đạt 100 % ± 5 %.

7.2 Chuẩn bị mẫu

Chiết 1,000 g giấy cuốn điếu đã cắt nhỏ (đã được bảo ôn theo ISO 187) trong 100 ml nước cất hai lần trong bình nón dung tích 250 ml, đặt trong bể siêu âm trong 30 phút. Lọc dịch chiết của giấy qua giấy lọc gấp nếp. Chuẩn bị các dung dịch phản ứng với nước cất (để thử mẫu trắng), với các dung dịch tiêu chuẩn và dịch chiết của giấy theo cách sau:

Dùng pipet cho vào cuvet	Thử mẫu trắng	Mẫu và chất chuẩn
Dung dịch 1	1,00 ml	1,00 ml
Nước cất	2,00 ml	1,80 ml
Dịch chiết của giấy hoặc dung dịch tiêu chuẩn	–	0,20 ml
Trộn đều và sau khoảng 5 phút ghi độ hấp thụ của các dung dịch (A_1) và cho phản ứng xảy ra bằng cách thêm:		
Dung dịch 2	0,02 ml	0,02 ml
Trộn đều, chờ cho đến khi phản ứng kết thúc (khoảng 5 phút), ghi độ hấp thụ của các dung dịch (A_2).		

Các thông số của máy so màu phân quang UV:

Bước sóng: 340 nm

Cuvet: Thuỷ tinh, dung tích 5 ml, chiều dài đường quang 10 mm

Nhiệt độ : 20 °C – 25 °C

Thể tích cuối cùng : 3,02 ml

Đọc độ truyền quang so sánh với đường truyền quang trong không khí (không có cuvet trong đường truyền quang) hoặc so sánh với đường truyền quang trong cuvet chứa nước cất.

Xác định mức chênh lệch độ hấp thụ ($A_1 - A_2$) đối với mẫu trắng và mẫu thử. Lấy mức chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trừ đi mức chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trắng.

$$A = \delta A_{mẫu} - \delta A_{mẫu\ trắng}$$

Đôi khi $(A_1 - A_2)_{mẫu\ trắng}$ thu được là giá trị âm. Khi đó, giá trị này sẽ được cộng vào $(A_1 - A_2)_{mẫu}$ theo công thức tính.

Chênh lệch của độ hấp thụ đo được, tính đến tối thiểu 0,100 đơn vị hấp thụ để đạt được các kết quả đủ chính xác. Nếu chênh lệch độ hấp thụ của mẫu ($\delta A_{mẫu}$) cao hơn 0,850 (đo ở bước sóng 340 nm), thì nồng độ axit xitric trong dung dịch mẫu là quá cao. Dung dịch mẫu cần phải pha loãng để nồng độ axit xitric trong cuvet thấp hơn 80 µg.

Chênh lệch độ hấp thụ nên trong khoảng từ 0,2 đến 0,4.

8 Tính toán kết quả

Theo công thức tổng quát để tính nồng độ:

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \delta A [g/l]$$

trong đó

V là thể tích cuối cùng, tính bằng mililit;

v là thể tích mẫu, tính bằng mililit;

MW là phân tử lượng của chất cần phân tích, tính bằng gam trên mol;

d là chiều dài đường quang, tính bằng xentimet;

ϵ là hệ số hấp thụ của NADH ở bước sóng 340 nm = 6,3 [$l \times mmol^{-1} \times cm^{-1}$]

Tính tiếp axit xitric (tính theo axit khan):

$$C = \frac{3,02 \times 192,1}{6,3 \times 0,2 \times 1000} \times \delta A = \frac{2,90}{6,3} \times \delta A$$

C = [g axit xitric / l dung dịch mẫu]

Tính tiếp axit xitric (tính theo axit xitric ngậm 1 phân tử nước):

$$c = \frac{3,02 \times 210,1}{6,3 \times 0,2 \times 1000} \times \delta A = \frac{3,17}{6,3} \times \delta A$$

c = [g axit xitric ngậm 1 phân tử nước / l dung dịch mẫu]

Nếu trong quá trình chuẩn bị mẫu được pha loãng tiếp, thì kết quả phải nhân với hệ số pha loãng F.

Nếu 1,000 g giấy cuốn điếu được chiết trong 100 ml nước cất, thì số đọc "c" sẽ tương ứng với % axit axetic ngậm 1 phân tử nước hoặc axit xitric trong giấy cuốn điếu ở độ ẩm cân bằng.

9 Đặc trưng và chất lượng của phương pháp

Phương pháp này đặc trưng cho axit xitric. Trong các thử nghiệm cộng tác, do Ban chuyên nghiên cứu về khói thuốc của Trung tâm Hợp tác Nghiên cứu khoa học về thuốc lá (CORESTA): "Các phương pháp phân tích giấy cuốn điếu thuốc lá, đã xác định được tương ứng là : độ lệch chuẩn là 0,021 % và hệ số biến động là 5,8% (0,37 % axit xitric ngậm 1 phân tử nước trong giấy cuốn điếu thuốc lá) và độ lệch chuẩn 0,105% và hệ số biến động 4,0% (2,57% axit xitric ngậm 1 phân tử nước trong giấy cuốn điếu thuốc lá).

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải gồm:

- Tên nhãn của giấy;
- Tên của nhà sản xuất hoặc nhà cung cấp giấy;
- Các chi tiết của qui trình lấy mẫu;
- Các chi tiết về việc bảo ôn ;
- Ngày thử nghiệm;
- Nhiệt độ phòng và độ ẩm tương đối trong phòng thử nghiệm;
- Độ ẩm của giấy (ISO 287);
- % axit xitric ngậm 1 phân tử nước trong giấy ở độ ẩm cân bằng.

Khi mẫu giấy được lấy từ điếu thuốc lá thì kết quả có thể bị ảnh hưởng bởi các tham số bên ngoài (ví dụ như các chất phụ gia để phối trộn thuốc lá).