TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9052 : 2012

Xuất bản lần 1

PHỤ GIA THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH CÁC THÀNH PHẦN HỮU CƠ

Food additives – Determination of organic components

HÀ NỘI - 2012

Mục lục

Trang

Lời nói đầu 4

1 Phạm vi áp dụng 5

2 Phương pháp thử 5

2.1 Quy định chung 5

2.2 Phép thử giới hạn các hợp chất clo hữu cơ 5

2.3 Cyclohexylamin trong cyclamat 6

2.4 Dicyclohexylamin trong cyclamat 8

2.5 1,4-Dioxan và etylen oxit 10

2.6 Axit fumaric và axit maleic 12

2.7 Định tính các thành phần của gôm 14

2.8 Norbixin 15

2.9 Phép thử giới hạn oxalat 17

2.10 Xác định polyol bằng sắc kí lớp mỏng 18

2.11 Axit pyrolidon carboxylic 19

2.12 Các chất dễ carbon hóa 20

2.13 Các chất khử (tính theo glucoza) 21

2.14 Tạp chất trong chất điều vị 24

2.15 Dư lượng dung môi 24

2.16 Các toluen sulfonamid trong sacarin 29

2.17 Triphenylphosphin oxit 32

3 Báo cáo thử nghiệm 33

Thư mục tài liệu tham khảo 34

Lời nói đầu

TCVN 9052:2012 được xây dựng trên cơ sở JECFA 2006, *Combined compendium of food additive specifications, Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications*;

TCVN 9052:2012 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Phụ gia thực phẩm – Xác định các thành phần hữu cơ

Food additives – Determination of organic components

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định các thành phần hữu cơ trong phụ gia thực phẩm.

2 Phương pháp thử

2.1 Quy định chung

– Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng, trừ khi có quy định khác.

– Sử dụng các thiết bị, dụng cụ khác của phòng thử nghiệm thông thường và sử dụng cân có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

– Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Mẫu được gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện, không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình bảo quản và vận chuyển.

2.2 Phép thử giới hạn các hợp chất clo hữu cơ

2.2.1 Thuốc thử

2.2.1.1 Axit nitric đậm đặc, d = 1,40 g/ml.

2.2.1.2 Dung dịch axit nitric, 10 % (khối lượng/thể tích)

Pha loãng 105 ml axit nitric 70 % bằng nước trong bình định mức dung tích 1 000 ml, sau đó thêm nước đến vạch.

2.2.1.3 Canxi cacbonat.

2.2.1.4 Dung dịch bạc nitrat, 0,1 N.

2.2.1.5 Dung dịch so sánh

Thêm 0,5 ml dung dịch bạc nitrat 0,1 N vào 20 ml axit nitric 10 % chứa một thể tích dung dịch axit clohydric 0,01 N theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể có liên quan.

2.2.2 Cách tiến hành

Cân khoảng 0,25 g mẫu thử, chính xác đến 0,001 g, hòa tan trong 10 ml nước. Axit hóa bằng axit nitric (2.2.1.1), lọc. Trộn kết tủa thu được với 0,5 g canxi cacbonat (2.2.1.3), sấy khô và nung. Hòa tan cặn trong 20 ml axit nitric 10 % (2.2.1.2) và lọc. Thêm 0,5 ml dung dịch bạc nitrat 0,1 N (2.2.1.4) vào dịch lọc.

Dung dịch thu được không được đục hơn so với dung dịch so sánh (2.2.1.5).

2.3 Cyclohexylamin trong cyclamat

2.3.1 Thuốc thử

2.3.1.1 Dung dịch da cam metyl - axit boric

Hòa tan 200 mg da cam metyl và 3,5 g axit boric trong 100 ml nước, đun nóng trên nồi cách thủy để hòa tan. Để yên ít nhất 24 h và lọc trước khi dùng.

2.3.1.2 Dung dịch chuẩn

2.3.1.2.1 Dung dịch chuẩn gốc cyclohexylamin, 1 mg/ml

Cân 100 mg cyclohexylamin, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong 50 ml nước và 0,5 ml dung dịch axit clohydric 10 % (khối lượng/thể tích), thêm nước đến vạch và trộn.

2.3.1.2.2 Dung dịch chuẩn trung gian cyclohexylamin, 50 µg/ml

Cho 5 ml dung dịch chuẩn gốc cyclohexylamin vào bình định mức 100 ml, thêm nước đến vạch và trộn.

2.3.1.2.3 Dung dịch chuẩn làm việc cyclohexylamin, 2,5 µg/ml

Cho 5 ml dung dịch chuẩn làm việc cyclohexylamin vào bình định mức 100 ml, thêm nước đến vạch và trộn.

2.3.1.2.4 Dung dịch dinatri etylendiamintetraaxetat

Cho 10 g dinatri etylendiamintetraaxetat và 3,4 g natri hydroxit vào bình định mức 100 ml, thêm nước đến vạch và trộn.

2.3.1.2.5 Cloroform.

2.3.1.2.6 n-Butanol.

2.3.1.2.7 Metanol.

2.3.1.2.8 Natri sulfat, khan.

2.3.1.2.9 Axit sulfuric, 94,5 % đến 95,5 %.

2.3.2 Thiết bị, dụng cụ

2.3.2.1 Máy li tâm.

2.3.2.2 Ống li tâm, bằng thủy tinh, có nút mài, dung tích 50 ml.

2.3.2.3 Thiết bị đo phổ, có thể hoạt động ở bước sóng 520 nm, được trang bị cuvet 1 cm.

2.3.2.4 Bình định mức, dung tích 100 ml.

2.3.3 Cách tiến hành

2.3.3.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Chuyển 25 g mẫu thử vào bình định mức 100 ml (2.3.2.4), hòa tan trong nước rồi thêm nước đến vạch và trộn.

2.3.3.2 Xác định

Chuyển 10 ml dung dịch mẫu thử và 10 ml dung dịch chuẩn làm việc cyclohexylamin (2.3.1.2.3) vào hai ống li tâm (2.3.2.2) riêng biệt và 10 ml nước vào một ống li tâm thứ ba (mẫu trắng). Thêm vào mỗi ống 3,0 ml dung dịch dinatri etylendiamintetraaxetat (2.3.1.2.4) và 15 ml hỗn hợp cloroform (2.3.1.2.5) : n-butanol (2.3.1.2.6) (tỉ lệ 20 : 1), lắc các ống này trong 2 min và li tâm.

Loại bỏ lớp nước ở mỗi ống, lấy từ mỗi ống 10 ml dung dịch cloroform cho vào một ống li tâm khác. Thêm vào mỗi ống 2 ml dung dịch da cam metyl - axit boric (2.3.1.1), lắc trong 2 min và li tâm. Loại bỏ lớp nước ở mỗi ống và thêm vào mỗi ống 1 g natri sulfat khan (2.3.1.2.8), lắc kĩ rồi để lắng.

Chuyển 5 ml của mỗi lớp dung dịch cloroform trong suốt ở mỗi ống vào một ống nghiệm khác và thêm vào mỗi ống 0,5 ml hỗn hợp metanol (2.3.1.2.7) và axit sulfuric (2.3.1.2.9) (tỉ lệ 50 : 1) rồi trộn.

Đo độ hấp thụ của các dung dịch này, dùng cuvet 1 cm đo ở bước sóng 520 nm bằng thiết bị đo phổ (2.3.2.3) thích hợp, dùng mẫu trắng để chỉnh điểm 0. Độ hấp thụ của dung dịch mẫu thử phải không lớn hơn độ hấp thụ của dung dịch chuẩn (2.3.1.2.3).

2.4 Dicyclohexylamin trong cyclamat

CHÚ THÍCH: Quy trình này dành cho sắc kí khí dùng cột nhồi. Nếu không có sẵn cột nhồi cho sắc kí khí, có thể dùng cột mao quản cho sắc kí khí kiểu không phân dòng. Cần phải thiết lập điều kiện sắc kí.

2.4.1 Thuốc thử

2.4.1.1 Dung dịch chuẩn

2.4.1.1.1 Dung dịch chuẩn gốc dicyclohexylamin, 1,0 mg/ml

Cân chính xác 100 mg dicyclohexylamin ($C_{12}H_{23}N$, có chỉ số khúc xạ của vạch D ở 25 °C từ 1,480 đến 1,488, tỉ trọng tương đối d_{25}^{25} từ 0,905 đến 0,915, điểm sôi từ 254 °C đến 256 °C) vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong cloroform và pha loãng đến vạch bằng cloroform, trộn đều.

2.4.1.1.2 Dung dịch chuẩn trung gian dicyclohexylamin, 100 µg/ml

Cho 10 ml dung dịch chuẩn gốc dicyclohexylamin (2.4.1.1) vào bình định mức 100 ml, thêm cloroform đến vạch, trộn đều.

2.4.1.1.3 Dung dịch chuẩn làm việc dicyclohexylamin, 10,0; 20,0; 40,0; 60,0 và 80,0 µg/ml

Cho lần lượt 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 và 8,0 ml dung dịch chuẩn trung gian dicyclohexylamin (2.4.1.2) vào một dãy các bình định mức 10 ml. Thêm cloroform đến vạch, trộn đều.

2.4.1.2 Dung dịch chuẩn nội nitrobenzen, 100 mg/500 ml cloroform.

2.4.1.3 Dung dịch natri hydroxit, 1 M.

2.4.1.4 Cloroform.

2.4.1.5 Dung dịch polyetylenglycol 6000 trong cloroform.

2.4.1.6 Kali cacbonat, dạng khan.

2.4.1.7 Khí nitơ hoặc khí heli.

2.4.2 Thiết bị, dụng cụ

2.4.2.1 Thiết bị sắc kí khí, được trang bị detector ion hóa ngọn lửa.

2.4.2.2 Cột sắc kí khí, bằng thép không gỉ, dài 1,5 m, đường kính trong từ 3 mm đến 4 mm, được nhồi diatomit (loại dùng cho sắc kí khí) kích thước từ 60 mesh đến 80 mesh trong dung dịch kali hydroxit trong metanol. Nồng độ kali hydroxit phải khoảng 3 % so với nền diatomit.

2.4.2.3 Thiết bị cất quay chân không.

2.4.2.4 Phễu chiết.

2.4.2.5 Bình định mức, dung tích 2 ml.

2.4.3 Cách tiến hành

2.4.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

Hòa tan 50 g mẫu thử trong 300 ml nước, thêm 3 ml dung dịch natri hydroxit (2.4.1.3), chiết lần lượt với 50 ml và 30 ml cloroform (2.4.1.4). Gộp dịch chiết, thêm vào đó 2 g kali cacbonat khan (2.4.1.6) và lọc. Rửa bình đựng dịch chiết và cặn trên giấy lọc vài lần, mỗi lần dùng 5 ml cloroform (2.4.1.4). Gộp dịch rửa và dịch lọc, đem cất quay chân không ở 30 °C đến khi còn lại khoảng 0,5 ml và chuyển toàn bộ phần dịch này vào bình định mức 2 ml (2.4.2.5), cho bay hơi dung môi trong bình định mức bằng luồng khí nitơ (2.4.1.7) đến khi còn khoảng 0,5 ml rồi thêm 1 ml dung dịch chuẩn nội nitrobenzen (2.4.1.2), thêm cloroform (2.4.1.4) đến vạch.

2.4.3.2 Điều kiện sắc kí khí

– Cột: cột sắc kí (2.4.2.2).

Cho bay hơi metanol, thêm dung dịch polyetylenglycol 6000 trong cloroform (2.4.1.5) rồi cho bay hơi cloroform. Lượng polyetyleneglycol 6000 phải đạt khoảng 10 % so với diatomit;

– Khí mang: nitơ hoặc heli (2.4.1.7), lưu lượng dòng phải đặt sao cho thời gian lưu của nitrobenzen khoảng 7 min;

– Nhiệt độ của bộ bơm mẫu: 225 °C;

– Nhiệt độ cột: từ 130 °C đến 140 °C;

– Nhiệt độ detector: 250 °C.

2.4.3.3 Dựng đường chuẩn

Trộn 1 ml từng dung dịch chuẩn làm việc (2.4.1.3) với 1 ml dung dịch chuẩn nội (2.4.1.2) và phân tích bằng thiết bị sắc kí khí với detector ion hóa ngọn lửa (2.4.2.1). Dựng đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của tỉ số diện tích pic dicyclohexylamin chia cho pic chuẩn nội vào nồng độ dicyclohexylamin (µg/ml).

2.4.3.4 Xác định

Bơm dung dịch mẫu thử (2.4.3.1) vào thiết bị sắc kí khí (2.4.2.1) và vận hành thiết bị. Tính nồng độ dicyclohexylamin (µg/ml) trong dung dịch mẫu thử dựa vào đường chuẩn (2.4.3.3).

2.4.4 Tính kết quả

Hàm lượng dicyclohexylamin trong mẫu thử, *X*, được tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg) theo công thức sau:

$$X = C \times 0{,}02$$

Trong đó:

C là nồng độ dicyclohexylamin trong dung dịch mẫu thử (2.4.3.1), tính bằng microgam trên mililit (µg/ml);

0,02 là hệ số pha loãng mẫu thử, tính bằng mililit trên gam (ml/g).

2.5 1,4-Dioxan và etylen oxit

2.5.1 Thuốc thử

2.5.1.1 Dung dịch chuẩn

CẢNH BÁO: Etylen oxit và 1,4-dioxan là chất độc và dễ cháy. Chuẩn bị các dung dịch chuẩn trong tủ hút khói được thông gió tốt.

Thêm một lượng thích hợp 1,4-dioxan vào một lượng xác định của nước không chứa chất hữu cơ đựng trong một lọ đựng mẫu có thể đậy kín. Xác định khối lượng thêm vào bằng chênh lệch khối lượng giữa hai lần cân.

CHÚ THÍCH: Etylen oxit ở nhiệt độ phòng thường ở dạng khí và thường được bảo quản trong chai khí cỡ nhỏ hoặc trong bơm khí nén nhỏ bằng kim loại. Làm lạnh chai khí trong tủ lạnh trước khi dùng.

Chuyển khoảng 5 ml etylen oxit lỏng vào bình nút mài 100 ml được làm lạnh trong nước đá. Dùng một bơm kín hơi dùng cho sắc kí khí đã được để trong tủ lạnh để chuyển một lượng thích hợp etylen oxit lỏng vào hỗn hợp. Đậy kín ngay ống mẫu và lắc. Xác định lượng thêm vào bằng chênh lệch khối lượng giữa hai lần cân.

2.5.1.2 Khí nitơ.

2.5.1.3 Heli.

2.5.2 Thiết bị, dụng cụ

2.5.2.1 Thiết bị sắc kí khí, được trang bị:

– bộ bơm mẫu không gian hơi tự động cân bằng áp suất và detector ion hóa ngọn lửa;

– cột mao quản silica nung chảy, kích thước 50 m × 0,32 mm (hoặc tương đương), được bao bằng lớp màng 5 µm gồm 5 % phenyl và 95 % etylsiloxan (hoặc tương đương).

2.5.2.2 Lọ không gian hơi, dung tích 22 ml.

2.5.2.3 Bình cầu đáy tròn bốn cổ, dung tích 5 000 ml.

2.5.2.4 Bơm chân không.

2.5.3 Cách tiến hành

2.5.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cho 10 g ± 0,01 g mẫu thử vào một lọ không gian hơi 22 ml (2.5.2.2) có áp suất, đậy lọ bằng tấm đệm silicon, lò xo hình sao và đai nhôm an toàn chịu áp, kẹp chặt đai vào nắp bằng kìm đóng nắp. Lắc trong 2 min.

2.5.3.2 Chuẩn bị mẫu loại khí

Cho 3 000 g mẫu thử vào bình cầu đáy tròn bốn cổ dung tích 5 000 ml (2.5.2.3) có lắp một máy khuấy, một nhiệt kế, một ống phân tán khí, một bẫy đá khô, một vòi nối chân không và một bộ đốt. Ở nhiệt độ phòng, hút chân không trong bình cẩn thận đến khi đạt áp suất dưới 1 mmHg, tiến hành chậm để tránh lẫn bọt khí. Nếu có sủi thì sau khi đã hết bọt khí, sục bằng nitơ (2.5.1.2), để áp suất tăng lên đến 10 mmHg.

Đun nóng bình đến 60 °C, khi đó áp suất tăng đến 60 mmHg. Tiếp tục cất trong 4 h, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng. Đóng bơm chân không (2.5.2.4) và để áp suất trở về mức bình thường, trong khi vẫn sục nitơ. Tháo ống sục ra trước, sau đó mới ngắt luồng khí thổi. Chuyển mẫu loại khí sang lọ đựng thích hợp chứa đầy nitơ.

2.5.3.3 Điều kiện vận hành thiết bị

Nhiệt độ cột:	Tăng từ 70 °C đến 250 °C với tốc độ 10 °C/min
Nhiệt độ đường truyền:	140 °C
Nhiệt độ detector:	250 °C
Khí mang:	Heli (2.5.1.3)
Tốc độ dòng:	Khoảng 0,8 ml/min
Yêu cầu:	Trên hai đường chuẩn, không điểm nào lệch hơn 10 %.

2.5.3.4 Dựng đường chuẩn

Pha loãng hỗn hợp dung dịch chuẩn (2.5.1.1) bằng mẫu loại khí (xem 2.5.3.2) với tỉ lệ thích hợp để được 4 dung dịch có nồng độ của hai chất thêm vào nền mẫu thử nằm trong khoảng 1 mg/kg đến 20 mg/kg (ví dụ: 5, 10, 15 và 20 mg/kg). Chuyển 10 ml mỗi dung dịch vào các lọ không gian hơi 22 ml (2.5.2.2) có áp suất, đậy lọ bằng tấm đệm silicon, lò xo hình sao và đai nhôm an toàn chịu áp, kẹp chặt đai vào nắp bằng kìm đóng nắp. Lắc trong 2 min.

Đặt các lọ dung dịch chuẩn nêu trên vào bộ bơm mẫu tự động, đặt chương trình sao cho mẫu được giữ nóng ở 50 °C trong 30 min trước khi bơm phần không gian hơi vào hệ thống sắc kí (2.5.2.1). Đặt chế độ bơm mẫu tự động: thời gian rút kim ra là 0,3 min, thời gian nén áp suất 1 min, thời gian bơm mẫu 0,08 min và áp suất của lọ đựng mẫu là 22 psig [1)], khi mở thông được lưu thông khí. Lấy diện tích pic của etylen dioxit và 1,4-dioxan tại thời điểm có thời gian lưu tương đối lần lượt là 1,0 và 3,1.

Dựng đồ thị tuyến tính của giá trị diện tích pic theo hàm lượng 1,4-dioxan và etylen oxit (mg/kg) trong mẫu chuẩn.

2.5.3.5 Xác định

Đặt lọ đựng mẫu thử (xem 2.5.3.1) vào bộ bơm mẫu tự động, tiến hành sắc kí không gian hơi theo quy định tại 2.5.3.4.

Từ diện tích pic thu được của etylen oxit và 1,4-dioxan, xác định trực tiếp nồng độ của chúng từ đồ thị.

2.6 Axit fumaric và axit maleic

2.6.1 Thuốc thử

2.6.1.1 Dung dịch chuẩn

Cân chính xác 5 mg chất chuẩn axit fumaric và 2 mg chất chuẩn axit maleic, cho vào bình định mức 1 000 ml, thêm pha động (2.6.1.2) đến vạch và trộn.

CHÚ THÍCH: Bảo quản các chất chuẩn trong lọ đậy nắp kín tránh sáng và không sấy khô trước khi dùng. Xác định lượng nước của chất chuẩn axit fumaric bằng phương pháp chuẩn độ trước khi dùng, cần điều chỉnh khi pha dung dịch chuẩn.

2.6.1.2 Dung môi pha động

Dung dịch axit sulfuric 0,01 N, đã lọc và loại khí.

[1)] 1 psig = 108,22 MPa.

2.6.2 Thiết bị, dụng cụ

2.6.2.1 Thiết bị HPLC, được trang bị:

– cột có kích thước 30 cm × 6,5 mm (đường kính trong), hoặc tương đương, được nhồi hạt trao đổi cation axit mạnh là styren-divinylbenzen copolyme sulfonat hóa ở dạng hydro (Polypore H của Brownlee Lab, hoặc tương đương);

– detector UV, hoạt động ở bước sóng 210 nm.

2.6.2.2 Bình định mức, dung tích 100 ml và 1 000 ml.

2.6.3 Cách tiến hành

2.6.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác khoảng 100 mg mẫu thử vào bình định mức 100 ml (2.6.2.2), thêm pha động (2.6.1.2) đến vạch và trộn.

2.6.3.2 Điều kiện vận hành sắc kí

Pha động:	Dung dịch axit sulfuric 0,01 N (2.6.1.2)
Bước sóng phát hiện:	210 nm
Nhiệt độ cột	37 °C ± 1 °C
Lưu lượng dòng	Khoảng 0,6 ml/min.

2.6.3.3 Kiểm tra hiệu năng

Chuẩn bị dung dịch xác định độ phân giải bằng cách cân chính xác 1 g mẫu thử, 10 mg chất chuẩn axit fumaric và 4 mg chất chuẩn axit maleic vào bình định mức 1 000 ml, thêm pha động (2.6.1.2) đến vạch và trộn.

Bơm dung dịch trên vào hệ thống HPLC (2.6.2.1) để thu được sắc đồ. Độ phân giải giữa pic axit maleic và pic mẫu thử không được nhỏ hơn 2,5; độ phân giải giữa pic axit fumaric và pic mẫu thử không được nhỏ hơn 7,0 và độ lệch chuẩn tương đối thu được từ các lần bơm lặp lại dung dịch mẫu thử không được lớn hơn 2,0 %.

2.6.3.4 Xác định

Bơm riêng rẽ khoảng 20 µl dung dịch mẫu thử (2.6.3.1) và dung dịch chuẩn (2.6.1.1) vào hệ thống HPLC (2.6.2.1), ghi lại sắc đồ. Thời gian lưu tương đối của axit maleic là khoảng 0,6 min, của axit maleic là khoảng 1,0 min và của axit fumaric là khoảng 1,5 min.

2.6.4 Tính kết quả

Hàm lượng của axit maleic và axit fumaric trong mẫu thử, X, được tính bằng miligam trên gam theo công thức:

$$X = \frac{C \times V}{w} \times \frac{r_U}{r_S}$$

Trong đó:

C là nồng độ của chất chuẩn trong dung dịch chuẩn (2.6.1.1), tính bằng miligam trên mililit (mg/ml);

V là dung tích bình định mức dùng để chuẩn bị mẫu thử, tính bằng mililit (ml). Trong trường hợp này, V = 100 ml;

w là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g);

r_U và r_S lần lượt là đáp ứng của pic của chất chuẩn tương ứng trong dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn.

2.7 Định tính các thành phần của gôm

2.7.1 Thuốc thử

2.7.1.1 Dung dịch axit sulfuric, 10 %.

2.7.1.2 Bari cacbonat.

2.7.1.3 Dung dịch metanol, 40 %.

2.7.1.4 Dung môi sắc kí A

Hỗn hợp axit formic, metyl etyl xeton, tert-butanol và nước theo tỉ lệ 15 : 30 : 40 : 15 (thể tích).

2.7.1.5 Dung môi sắc kí B

Hỗn hợp axit axetic băng, cloroform và nước theo tỉ lệ 74 : 65 : 11 (thể tích).

2.7.1.6 Dung dịch hiện màu

Dung dịch gồm 1,23 g anisidin và 1,66 g axit phtalic trong 100 ml etanol.

2.7.1.7 Chất chuẩn, được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể có liên quan.

2.7.2 Thiết bị, dụng cụ

2.7.2.1 Bản mỏng silica gel G.

2.7.2.2 Máy cất quay chân không.

2.7.2.3 Máy khuấy từ.

2.7.2.4 Bộ lọc.

2.7.3 Cách tiến hành

Đun sôi hỗn hợp gồm 200 mg mẫu thử và 20 ml dung dịch axit sulfuric 10 % (2.7.1.1) trong 3 h. Để nguội và thêm một lượng dư bari cacbonat (2.7.1.2), vừa thêm vừa khuấy bằng máy khuấy từ (2.7.2.3) đến khi pH của dung dịch đạt đến 7 thì đem lọc trong bộ lọc (2.7.2.4). Cô dịch lọc bằng máy cất quay chân không (2.7.2.2) ở 30 °C đến 50 °C cho đến khi thu được cặn kết tinh (hoặc đặc sánh). Hòa tan trong 10 ml metanol 40 % (2.7.1.3), thu được dịch thủy phân.

Chấm các vết với thể tích từ 1 µl đến 5 µl dịch thủy phân lên vạch xuất phát của hai bản mỏng silica gel G (2.7.2.1). Trên cùng bản mỏng đó, chấm từ 1 µg đến 10 µg chất chuẩn (2.7.1.7).

Triển khai một bản mỏng trong dung môi A (2.7.1.4) và một bản trong dung môi B (2.7.1.5).

Sau khi triển khai, phun dung dịch hiện màu (2.7.1.6) và sấy bản mỏng ở 100 °C trong 10 min. Xuất hiện màu vàng xanh với các hexoza, màu đỏ với pentoza và màu nâu với các axit uronic. So sánh các vết của dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn đối chiếu và định tính các thành phần chỉ ra trong tiêu chuẩn cụ thể có liên quan.

2.8 Norbixin

2.8.1 Thuốc thử

2.8.1.1 Dung dịch chuẩn norbixin

Cân chính xác khoảng 25 mg đến 50 mg norbixin (độ tinh khiết không nhỏ hơn 99 %) và hòa tan trong 5 ml dung dịch NaOH 0,1 M. Chuyển toàn bộ vào bình định mức 50 ml và thêm metanol đến vạch.

2.8.1.2 Dimetylformamid.

2.8.1.3 Axetonitril, loại dùng cho HPLC.

2.8.1.4 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), 0,1 M.

2.8.1.5 Metanol, loại dùng cho HPLC.

2.8.1.6 Dung dịch axit axetic, 2 % (thể tích).

2.8.2 Thiết bị, dụng cụ

2.8.2.1 Thiết bị HPLC, được trang bị bơm, bộ bơm mẫu, detector UV/VIS và bộ ghi hoặc máy tích phân.

2.8.3 Cách tiến hành

2.8.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

2.8.3.1.1 Mẫu thử tan trong dầu

Cân chính xác khoảng từ 25 mg đến 50 mg mẫu thử và hòa tan trong khoảng từ 3 ml đến 5 ml dimetylformamid (2.8.1.2). Chuyển toàn bộ vào bình định mức 50 ml và thêm axetonitril (2.8.1.3) đến vạch.

2.8.3.1.2 Mẫu chất tan trong nước

Cân chính xác khoảng từ 25 mg đến 50 mg mẫu thử và hòa tan trong 5 ml dung dịch NaOH 0,1 M (2.8.1.4). Chuyển toàn bộ vào bình định mức 50 ml và thêm metanol (2.8.1.5) đến vạch.

2.8.3.2 Điều kiện vận hành sắc kí

Cột:	Thép không gỉ; 250 × 4,6 mm
Pha tĩnh:	Pha liên kết hỗn hợp C8 và C18; 5 µm hoặc tương tự
Detector:	UV/VIS
Nhiệt độ cột:	35 °C
Pha động:	Đẳng dòng, hỗn hợp 65 % dung dịch axetonitril (2.8.1.3) và 35 % dung dịch axit axetic 2 % (2.8.1.6)
Lưu lượng dòng:	1,0 ml/min
Thể tích bơm mẫu:	10 µl
Bước sóng phát hiện:	460 nm
Thời gian chạy:	40 min

CHÚ THÍCH: Thời gian lưu của norbixin xấp xỉ 10 min.

2.8.3.3 Xác định

Bơm dung dịch mẫu thử (2.8.3.1) vào hệ thống sắc kí và tiến hành theo các điều kiện quy định tại 2.8.3.2.

2.8.4 Tính kết quả

Hàm lượng norbixin có trong mẫu thử, *X*, được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức sau:

$$X = \frac{A \times w_s \times P_s}{A_s \times w} \times 100$$

Trong đó:

A là diện tích pic của dung dịch mẫu thử;

A_s là diện tích pic của dung dịch chuẩn;

P_s là độ tinh khiết của chất chuẩn, được biểu diễn bằng phần khối lượng norbixin trong norbixin chuẩn (ví dụ 0,99 nếu chất chuẩn có độ tinh khiết 99 %);

w_s là khối lượng của mẫu chuẩn, tính bằng miligam (mg);

w là khối lượng của mẫu thử, tính bằng miligam (mg).

2.9 Phép thử giới hạn oxalat

2.9.1 Thuốc thử

2.9.1.1 Axit clohydric, đậm đặc.

2.9.1.2 Dung dịch phenylhydrazin hydroclorua, 1 %.

2.9.1.3 Dung dịch kali hexacyanoferat (III), 5 %.

2.9.1.4 Dung dịch axit oxalic, 0,005 %.

2.9.2 Thiết bị, dụng cụ

2.9.2.1 Nồi cách thủy.

2.9.2.2 Ống đong, có nút mài.

2.9.3 Cách tiến hành

Hòa tan 0,5 g mẫu thử trong 4 ml nước, thêm 3 ml axit clohydric đậm đặc (2.9.1.1) và thêm tiếp 1 g kẽm hạt. Làm nóng 1 min trong nồi cách thủy (2.9.2.1) đang sôi. Để yên 2 min ở nhiệt độ phòng, gạn lớp dung dịch phía trên vào ống nghiệm chứa 0,25 ml dung dịch phenylhydrazin hydroclorua 1 % (2.9.1.2). Trộn đều, đun đến sôi và làm nguội ngay. Chuyển dung dịch này vào ống đong có nút mài (2.9.2.2) và thêm 3 ml dung dịch axit clohydric đậm đặc (2.9.1.1). Thêm 0,25 ml dung dịch kali

hexacyanoferat (III) 5 % (2.9.1.3), trộn và để yên 30 min.

Màu của dung dịch tạo thành không được đậm hơn màu của dung dịch so sánh được pha tương tự như trên, nhưng thay mẫu thử bằng 4,0 ml dung dịch axit oxalic 0,005 % (2.9.1.4).

2.10 Xác định polyol bằng sắc kí lớp mỏng

2.10.1 Thuốc thử

2.10.1.1 Dung dịch axit 4-aminobenzoic

Hòa tan 1 g axit 4-aminobenzoic trong hỗn hợp dung môi gồm 18 ml axit axetic, 20 ml nước và 1 ml axit phosphoric.

Chuẩn bị thuốc thử này ngay trước khi dùng.

2.10.1.2 Dung dịch natri periodat, 0,2 % (khối lượng/thể tích).

2.10.1.3 Dung môi pha động

Hỗn hợp gồm propanol, etyl axetat và nước theo tỉ lệ 70 : 20 : 10.

2.10.1.4 Axeton.

2.10.1.5 Dung dịch chuẩn polyol, được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể có liên quan.

2.10.2 Thiết bị, dụng cụ

2.10.2.1 Bản mỏng silica gel.

2.10.3 Cách tiến hành

2.10.3.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể có liên quan.

2.10.3.2 Xác định

Chấm riêng 2 µl của dung dịch mẫu thử (xem 2.10.3.1) và 2 µl dung dịch chuẩn (2.10.1.5) lên bản sắc kí. Triển khai sắc đồ một đoạn hơn 17 cm với pha động (2.10.1.3). Để bản mỏng khô ngoài không khí và phun hỗn hợp gồm dung dịch axit 4-aminobenzoic (2.10.1.1) và axeton (2.10.1.4) theo tỉ lệ 2 : 3. Sấy bản mỏng ở 100 °C trong 15 min. Phun dung dịch natri periodat (2.10.1.2). Sấy bản mỏng ở 100 °C trong 15 min.

Vết chính thu được trên sắc đồ của dung dịch mẫu thử phải tương ứng về vị trí, màu sắc và kích thước với vết thu được từ dung dịch chuẩn.

2.11 Axit pyrolidon carboxylic

2.11.1 Thuốc thử

2.11.1.1 Dung dịch chuẩn

Dung dịch mononatri L-glutamat 0,5 % chứa axit pyrolidon carboxylic với hàm lượng 1,25 mg/µl.

2.11.1.2 Dung dịch kali iodua-tinh bột

Khuấy và đun nóng 0,5 g tinh bột trong khoảng 50 ml nước đến khi hồ hóa, để nguội rồi thêm 0,5 g kali iodua và nước đến 100 ml.

2.11.1.3 Dung môi pha động

Hỗn hợp gồm n-butanol, axit axetic băng và nước theo tỉ lệ thể tích 2 : 1 : 1.

2.11.1.4 Silica gel.

2.11.1.5 Natri hypoclorua.

2.11.1.6 Axit clohydric, đậm đặc.

2.11.1.7 Etanol.

2.11.2 Thiết bị, dụng cụ

2.11.2.1 Bản mỏng sắc kí.

2.11.2.2 Cốc có mỏ, dung tích 50 ml.

2.11.3 Cách tiến hành

2.11.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử 0,5 %.

2.11.3.2 Xác định

Tiến hành sắc kí bản mỏng với 2 µl dung dịch mẫu thử (xem 2.11.3.1) và 2 µl dung dịch chuẩn (2.11.1.1), sử dụng chất hấp phụ silica gel (2.11.1.4).

Triển khai dung môi (2.11.1.3) một đoạn khoảng 10 cm kể từ vị trí chấm sắc kí, để khô bản mỏng ngoài không khí trong 30 min.

Cùng thời gian đó, chuẩn bị một bình sắc kí tương tự, trong bình đặt một cốc có mỏ 50 ml (2.11.2.2) chứa khoảng 3 g natri hypoclorua (2.11.1.5); thêm từ từ 1 ml axit clohydric (2.11.1.6) vào cốc để tạo khí clo; đậy nắp bình và để yên trong 30 s để bão hòa hơi clo. Đặt bản mỏng khô vào bình này, đậy nắp bình và để yên trong 20 min. Lấy bản mỏng ra, để 10 min trong không khí và phun etanol (2.11.1.7). Sau khi khô, phun dung dịch kali iodua-tinh bột (2.11.1.2) và quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường ngay sau khi vết chuẩn xuất hiện.

Phép thử âm tính nếu không có vết tương ứng với axit pyrrolidon carboxylic chuẩn được phát hiện trong mẫu thử (độ nhạy 0,2 %).

2.12 Các chất dễ carbon hóa

2.12.1 Thuốc thử

2.12.1.1 Dung dịch màu chuẩn

Một dãy 20 dung dịch màu mẫu được dùng làm chuẩn, mỗi dung dịch được kí hiệu bằng một chữ cái và thành phần của dung dịch được quy định trong Bảng 1. Để pha dung dịch màu mẫu theo quy định, lấy một thể tích dung dịch thử màu (TSC) và nước theo quy định vào các ống so màu và trộn.

2.12.1.2 Dung dịch axit sulfuric, nồng độ khoảng từ 94,5 % đến 95,5 %.

2.12.2 Thiết bị, dụng cụ

2.12.2.1 Ống so màu, làm bằng thủy tinh không màu chịu được axit sulfuric.

2.12.3 Cách tiến hành

Thêm một lượng chất thử theo quy định tại tiêu chuẩn cụ thể, đã được nghiền thành bột mịn nếu là chất rắn, vào một ống so màu bằng thủy tinh không màu chịu được axit sulfuric (2.12.2.1) và có chứa một thể tích axit sulfuric (2.12.1.2) theo quy định.

Khuấy hỗn hợp bằng đũa thủy tinh đến khi tan hoàn toàn, để yên trong 15 min nếu không có quy định khác và so sánh màu của dung dịch này với dung dịch màu chuẩn (2.12.1.1) được chỉ định. Dung dịch màu chuẩn cũng được đựng trong ống so màu bằng thủy tinh không màu và có đường kính trong bằng đường kính của ống so màu đựng dung dịch mẫu thử. Quan sát màu theo chiều ngang trên nền sứ trắng hoặc thủy tinh trắng.

Nếu cần đun nóng để hòa tan đến chất thử trong axit sulfuric (2.12.1.2) thì trộn mẫu thử và axit sulfuric

trong ống nghiệm, đun nóng theo quy định tại tiêu chuẩn cụ thể, để nguội rồi mới chuyển dung dịch sang ống so màu.

Bảng 1 – Thành phần của các dung dịch màu chuẩn

Dung dịch mẫu	Phần coban (II) clorua TSC	Phần sắt (II) clorua TSC	Phần đồng (II) sulfat TSC	Phần nước
A	0,1	0,4	0,1	4,4
B	0,3	0,9	0,3	8,5
C	0,1	0,6	0,1	4,2
D	0,3	0,6	0,4	3,7
E	0,4	1,2	0,3	3,1
F	0,3	1,2	0,0	3,5
G	0,5	1,2	0,2	3,1
H	0,2	1,5	0,0	3,3
I	0,4	2,2	0,1	2,3
J	0,4	3,5	0,1	1,0
K	0,5	4,5	0,0	0,0
L	0,8	3,8	0,1	0,3
M	0,1	2,0	0,1	2,8
N	0,0	4,9	0,1	0,0
0	0,1	4,8	0,1	0,0
P	0,2	0,4	0,1	4,3
Q	0,2	0,3	0,1	4,4
R	0,3	0,4	0,2	4,1
S	0,2	0,1	0,0	4,7
T	0,5	0,5	0,4	3,6
CHÚ THÍCH: Các dung dịch từ A đến D có màu vàng nâu nhạt, các dung dịch từ E đến L có màu vàng đến vàng đỏ, các dung dịch từ M đến O có màu vàng lục và các dung dịch từ P đến T có màu hồng tươi.				

2.13 Các chất khử (tính theo glucoza)

2.13.1 Phương pháp thể tích

2.13.1.1 Thuốc thử

2.13.1.1.1 Dung dịch đồng (II) xitrat kiềm

Đun nhẹ để hòa tan 173 g natri xitrat ngậm hai phân tử nước ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) và 117 g natri carbonat ngậm một phân tử nước ($Na_2CO_3.H_2O$) trong khoảng 700 ml nước, lọc qua giấy lọc, nếu cần.

Hòa tan riêng 17,3 g đồng (II) sulfat ngậm năm phân tử nước ($CuSO_4.5H_2O$) trong khoảng 100 ml nước. Vừa khuấy đều vừa thêm từ từ dung dịch đồng (II) sulfat vào dung dịch muối natri ban đầu. Để cho dung dịch nguội rồi pha loãng bằng nước đến 1 000 ml và trộn.

2.13.1.1.2 Dung dịch axit axetic, 10 %.

2.13.1.1.3 Dung dịch iot, 0,1 N.

2.13.1.1.4 Dung dịch axit clohydric, 10 % (khối lượng/thể tích).

2.13.1.1.5 Dung dịch natri thiosulfat, 0,1 N.

2.13.1.1.6 Hồ tinh bột

Khuấy 1 g tinh bột trong 10 ml nước lạnh, sau đó vừa khuấy đều vừa rót vào 200 ml nước sôi. Đun sôi cho đến khi thu được chất lỏng loãng và trong suốt (nếu đun quá mức cần thiết, hồ tinh bột sẽ giảm độ nhạy). Để lắng, gạn phần lỏng phía trên để sử dụng.

Chuẩn bị mới dung dịch trước khi dùng.

2.13.1.2 Thiết bị, dụng cụ

2.13.1.2.1 Bình nón, dung tích 250 ml.

2.13.1.2.2 Buret.

2.13.1.2.3 Pipet.

2.13.1.3 Cách tiến hành

Cân chính xác khoảng 1 g mẫu thử vào bình nón 250 ml (2.13.1.2.1), hòa tan trong 10 ml nước, thêm 25 ml dung dịch đồng (II) xitrat kiềm (2.13.1.1.1) và đậy bình bằng một cốc có mỏ nhỏ. Đun sôi nhẹ trong đúng 5 min và làm nguội nhanh đến nhiệt độ phòng. Thêm 25 ml dung dịch axit axetic 10 % (2.13.1.1.2), 10,0 ml dung dịch iot 0,1 N (2.13.1.1.3), 10 ml axit clohydric loãng (2.13.1.1.4) và 3 ml hồ tinh bột (2.13.1.1.6), chuẩn độ bằng dung dịch natri thiosulfat 0,1 N (2.13.1.1.5) đến khi mất màu xanh.

2.13.1.4 Tính kết quả

Hàm lượng các chất khử tính theo D-glucoza, X, được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \frac{(V_1 \times N_1 - V_2 \times N_2) \times 2,7}{w}$$

Trong đó:

V_1 là thể tích của dung dịch iot, tính bằng mililit (ml);

N_1 là nồng độ đương lượng của dung dịch iot, tính bằng đương lượng mol trên lít (eq/l);

V_2 là thể tích của dung dịch natri thiosulfat đã dùng để chuẩn độ, tính bằng mililit (ml);

N_2 là nồng độ đương lượng của dung dịch natri thiosulfat, tính bằng đương lượng mol trên lít (eq/l);

2,7 là hệ số chuyển đổi ra D-glucoza, được xác định bằng thực nghiệm;

w là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g).

2.13.2 Phương pháp khối lượng

2.13.2.1 Thuốc thử

2.13.2.1.1 Dung dịch đồng (II) sulfat, 12,5 % (khối lượng/thể tích).

2.13.2.1.2 Dung dịch tartrat kiềm

Hòa tan 34,6 g kali natri tartrat (muối Rochelle) và 10 g natri hydroxit trong nước, pha loãng đến 100 ml, để yên trong 2 ngày và lọc qua bông thủy tinh.

2.13.2.2 Thiết bị, dụng cụ

2.13.2.2.1 Bình nón, dung tích 400 ml.

2.13.2.2.2 Chén lọc Gooch, bằng sứ.

2.13.2.3 Cách tiến hành

Hòa tan 7 g mẫu thử trong 35 ml nước trong bình nón 400 ml (2.13.2.2.1) và trộn. Thêm 25 ml đồng (II) sulfat (2.13.2.1.1) và 25 ml tartrat kiềm (2.13.2.1.2). Đậy nắp bình, đun nóng với tốc độ sao cho hỗn hợp sôi sau khoảng 4 min và để sôi trong đúng 2 min. Lọc kết tủa đồng (I) oxit qua chén lọc Gooch sứ (2.13.2.2.2) đã biết trước khối lượng, chén lọc này được rửa bằng nước nóng, etanol và ete, sấy ở 100 °C trong 30 min. Rửa kĩ đồng (I) oxit thu được bằng nước nóng, sau đó bằng 10 ml etanol và cuối cùng bằng 10 ml ete, sấy ở 100 °C trong 30 min.

Khối lượng đồng (I) oxit không được lớn hơn giới hạn quy định trong tiêu chuẩn cụ thể có liên quan.

2.14 Tạp chất trong chất điều vị

2.14.1 Thuốc thử

2.14.1.1 Dung môi khai triển

Hỗn hợp gồm dung dịch amoni sulfat bão hòa, dung dịch natri axetat 13,6 % (khối lượng/thể tích) và isopropanol theo tỉ lệ thể tích 80 : 18 : 2.

2.14.1.2 Xenluloza vi tinh thể.

2.14.2 Cách tiến hành

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể có liên quan. Tiến hành sắc kí lớp mỏng với dung môi khai triển là hỗn hợp gồm dung dịch amoni sulfat bão hòa, dung dịch natri axetat 13,6 % (khối lượng/thể tích) và isopropanol (2.14.1.1), chất hấp phụ là xenluloza vi tinh thể (2.14.1.2).

Triển khai sắc đồ một đoạn khoảng 10 cm tính từ vết chấm sắc kí, để bản mỏng khô ngoài không khí và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại (254 nm) ở nơi tối.

Phép thử đạt yêu cầu nếu chỉ phát hiện một vết axit 5'-guanylic hoặc axit 5'-inosinic.

2.15 Dư lượng dung môi

2.15.1 Phương pháp I (tiến hành trong nước)

2.15.1.1 Thuốc thử

2.15.1.1.1 Dung dịch chuẩn nội

Cho 50,0 ml nước vào lọ đựng mẫu 50 ml, đậy nắp. Cân lọ đựng mẫu, chính xác đến 0,01 mg, rồi bơm vào ống 15 µl 3-metyl-2-pentanon qua tấm đệm và cân lại lọ đựng mẫu.

2.15.1.1.2 Heli.

2.15.1.2 Thiết bị, dụng cụ

2.15.1.2.1 Thiết bị sắc kí khí, sử dụng bộ lấy mẫu không gian hơi.

2.15.1.2.2 Cột silica nung chảy, dài 0,8 m, đường kính trong 0,53 mm, DB-wax, lớp màng dày 1 µm, hoặc tương đương.

2.15.1.2.3 Cột silica nung chảy, dài 30 m, đường kính trong 0,53 mm, DB-1, lớp màng dày 5 µm, hoặc tương đương.

2.15.1.2.4 Lọ đựng mẫu, dung tích 50 ml.

2.15.1.3 Cách tiến hành

2.15.1.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác 0,20 g mẫu thử vào lọ đựng mẫu (2.15.1.2.4). Thêm 5,0 ml nước và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội (2.15.1.1.1). Làm nóng ở 60 °C trong 10 min và lắc mạnh trong 10 s.

2.15.1.3.2 Dung dịch mẫu trắng

Cân chính xác 0,20 g mẫu trắng (có hàm lượng dung môi rất thấp) vào lọ đựng mẫu (2.15.1.2.4). Thêm 5,0 ml nước và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội (2.15.1.1.1). Làm nóng ở 60 °C trong 10 min và lắc mạnh trong 10 s.

2.15.1.3.3 Dung dịch hiệu chuẩn

Cân chính xác 0,20 g mẫu trắng (có hàm lượng dung môi rất thấp) vào lọ đựng mẫu (2.15.1.2.4). Thêm 5,0 ml nước và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội (2.15.1.1.1). Cân lọ đựng mẫu, chính xác đến 0,01 mg. Bơm một thể tích xác định của thành phần cần phân tích qua tấm đệm và cân lại lọ đựng mẫu. Làm nóng ở 60 °C trong 10 min và lắc mạnh trong 10 s.

2.15.1.3.4 Điều kiện vận hành

Khí mang:	Heli (2.15.1.1.2)
Tốc độ dòng:	5 ml/min ở áp suất 208 kPa
Detector:	FID
Cột:	cột silica nung chảy (2.15.1.2.2) nối với cột silica nung chảy (2.15.1.2.3)
Nhiệt độ	
Bơm mẫu:	140 °C
Điều kiện lò:	35 °C trong 5 min, sau đó tăng nhiệt độ với tốc độ 5 °C/min đến 90 °C và giữ trong 6 min ở 90 °C
Detector:	300 °C
Nhiệt độ làm nóng mẫu:	60 °C
Thời gian làm nóng mẫu:	10 min

Nhiệt độ của bơm: 70 °C

Nhiệt độ đường truyền: 80 °C

Bơm mẫu khí: 1,0 ml kiểu phân dòng

CHÚ THÍCH: Các dung môi được liệt kê trong bảng sau có thể được xác định bằng phương pháp sắc kí khí không gian hơi. Cũng có thể sử dụng phương pháp này để xác định isobutyl axetat và metyl axetat. Tuy nhiên, chưa xác định được khoảng thời gian lưu của hai chất này.

Dung môi	Thời gian lưu, min	Dung môi	Thời gian lưu, min
Etanal	2,81	Etyl axetat	10,05
Metanol	2,93	Cloroform	10,33
Etanol	4,09	2-Metyl-1-propanol	11,05
Etannitril	4,55	1-Butanol	12,79
Propanon	4,76	Hexametyldisiloxan	14,42
2-Propanol	5,23	Propyl axetat	14,97
Ethoxyetan	5,67	4-Metyl-2-pentanon	16,18
2-Metyl-2-propanol	6,21	Pyridin	16,39
Diclometan	6,45	3-Metyl-2-pentanon	16,90
1-Propanol	7,78	Toluen	18,25
Trimetylsilanol	8,41	Butyl axetat	20,61
2-Butanol	9,61		

2.15.1.3.5 Xác định

Đặt các dung dịch mẫu thử (2.15.1.3.1), dung dịch mẫu trắng (2.15.1.3.2) và dung dịch hiệu chuẩn (2.15.1.3.3) vào khay mẫu của hệ thống sắc kí khí không gian hơi FID (2.15.1.2.1). Bơm mẫu không gian hơi.

2.15.1.4 Tính kết quả

Dư lượng của mỗi dung môi có trong mẫu thử, X, được tính bằng miligam trên gam (mg/g) theo công thức sau:

$$X = \frac{A \times w_1 \times C}{50 \times w}$$

Trong đó:

A là diện tích pic tương đối của dung môi cần phân tích;

w_1 là khối lượng của chất chuẩn nội, tính bằng miligam (mg);

w là khối lượng mẫu thử được đưa vào lọ đựng mẫu, tính bằng gam (g);

50 là dung tích của lọ đựng mẫu, tính bằng mililit (ml);

C là hệ số hiệu chuẩn (xem 2.15.1.3.3), được tính như sau:

$$C = \frac{w_S \times 50}{w_{1S} \times (F - G)}$$

Trong đó:

w_S là khối lượng của thành phần cần phân tích sử dụng để hiệu chuẩn, tính bằng miligam (mg);

w_{1S} là khối lượng chất chuẩn nội sử dụng để hiệu chuẩn, tính bằng miligam (mg);

F là diện tích pic tương đối của thành phần cần phân tích trong dung dịch hiệu chuẩn;

G là diện tích pic tương đối của cùng thành phần cần phân tích trong dung dịch mẫu trắng.

2.15.2 Phương pháp II (tiến hành trong metanol)

2.15.2.1 Thuốc thử

2.15.2.1.1 Dung dịch chuẩn nội

Cho 50,0 ml metanol vào lọ đựng mẫu có dung tích 50 ml, đậy nắp. Cân lọ đựng mẫu, chính xác đến 0,01 mg và bơm vào 15 µl 3-metyl-2-pentanon qua tấm đệm cao su. Cân lại lọ đựng mẫu và trộn.

2.15.2.1.2 Dung dịch A

Cho 50,0 ml metanol vào lọ đựng mẫu có dung tích 50 ml, đậy nắp. Cân lọ đựng mẫu, chính xác đến 0,01 mg và bơm vào 50 µl thành phần cần phân tích qua tấm đệm cao su. Cân lại lọ đựng mẫu và trộn.

2.15.2.1.3 Metanol.

2.15.2.1.4 Heli.

2.15.2.2 Thiết bị, dụng cụ

Xem 2.15.1.2.

2.15.2.3 Cách tiến hành

2.15.2.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác 0,20 g mẫu thử vào lọ đựng mẫu (2.15.1.2.4). Thêm 5,0 ml metanol (2.15.2.1.3) và

1,0 ml dung dịch chuẩn nội (2.15.2.1.1). Làm nóng ở 60 °C trong 10 min và lắc mạnh trong 10 s.

2.15.2.3.2 Dung dịch mẫu trắng

Cân chính xác 0,20 g mẫu trắng (có hàm lượng dung môi rất thấp) vào lọ đựng mẫu (2.15.1.2.4). Thêm 5,0 ml metanol (2.15.2.1.3) và 1,0 ml dung dịch chuẩn nội (2.15.2.1.1). Làm nóng ở 60 °C trong 10 min và lắc mạnh trong 10 s.

2.15.2.3.3 Dung dịch hiệu chuẩn

Cân chính xác 0,20 g mẫu trắng (có hàm lượng dung môi rất thấp) vào lọ đựng mẫu (2.15.1.2.4). Thêm 4,9 ml metanol (2.15.2.1.3), 1,0 ml dung dịch chuẩn nội (2.15.2.1.1) và 0,1 ml dung dịch A (2.15.2.1.2). Trộn đều và làm nóng ở 60 °C trong 10 min và lắc mạnh trong 10 s.

2.15.2.3.4 Điều kiện vận hành

Xem 2.15.1.3.4.

2.15.2.3.5 Xác định

Xem 2.15.1.3.5.

2.15.2.4 Tính kết quả

Dư lượng của mỗi dung môi có trong mẫu thử, X, được tính bằng miligam trên gam (mg/g) theo công thức sau:

$$X = \frac{A \times w_1 \times C}{50 \times w}$$

Trong đó:

A là diện tích pic tương đối của dung môi cần phân tích;

w_1 là khối lượng của chất chuẩn nội, tính bằng miligam (mg);

w là khối lượng mẫu thử được đưa vào lọ đựng mẫu, tính bằng gam (g);

50 là dung tích của lọ đựng mẫu, tính bằng mililit (ml);

C là hệ số hiệu chuẩn (xem 2.15.2.3.3), được tính như sau:

$$C = \frac{w_S}{w_{1S} \times (F - G) \times 10}$$

Trong đó:

w_S là khối lượng của thành phần cần phân tích sử dụng để hiệu chuẩn, tính bằng miligam (mg);

w_{IS} là khối lượng chất chuẩn nội sử dụng để hiệu chuẩn, tính bằng miligam (mg);

F là diện tích pic tương đối của thành phần cần phân tích trong dung dịch chuẩn;

G là diện tích pic tương đối của thành phần cần phân tích trong dung dịch mẫu trắng.

2.16 Các toluen sulfonamid trong sacarin

2.16.1 Thuốc thử

2.16.1.1 Metylen clorua (diclometan).

CHÚ THÍCH: Sử dụng thuốc thử loại tinh khiết sắc kí hoặc dung môi tinh khiết được cất bằng dụng cụ toàn thủy tinh.

2.16.1.2 Dung dịch chuẩn nội

Cân chính xác khoảng 100 mg n-tricosan 95 % vào bình định mức 10 ml, hòa tan trong n-heptan, pha loãng đến vạch bằng n-heptan và trộn.

2.16.1.3 Dung dịch chuẩn gốc

Cân chính xác khoảng 20 mg mỗi chất o-toluen sulfonamid và p-toluen sulfonamid vào bình định mức 10 ml, hòa tan trong metylen clorua (2.16.1.1), pha loãng đến vạch bằng metylen clorua và trộn.

2.16.1.4 Dung dịch chuẩn làm việc

Dùng pipet lấy vào 5 bình định mức dung tích 10 ml lần lượt 0,1; 0,25; 1,0; 2,5 và 5 ml dung dịch chuẩn gốc (2.16.1.3). Lấy 0,25 ml dung dịch chuẩn nội (2.16.1.2) cho vào mỗi bình, pha loãng đến vạch bằng metylen clorua và trộn. Các dung dịch này chứa 250 µg n-tricosan và có thêm lần lượt 20, 50, 200, 500 và 1 000 µg/ml mỗi loại toluen sulfonamid.

2.16.1.5 Dung dịch natri cacbonat, 10,6 % (khối lượng/thể tích).

2.16.1.6 Diatomit, loại dùng cho sắc kí (Celite 545 hoặc tương đương).

2.16.2 Thiết bị, dụng cụ

2.16.2.1 Hệ thống sắc kí khí, được trang bị detector ion hóa ngọn lửa và cột thủy tinh dài khoảng 3 m và đường kính trong 2 mm được nhồi metyl phenyl silicon 3 % trong silica diatomit đã nung và

silan hóa loại từ 100 mesh đến 120 mesh.

2.16.2.2 Cột tách, loại cột nhồi kích thước 25 mm × 250 mm hoặc tương đương.

2.16.2.3 Ống cô đặc, được nối với một cột Snyder cải tiến, dùng bếp đốt nóng ống, kiểu Kontes và duy trì nhiệt độ ở 90 °C.

2.16.3 Cách tiến hành

2.16.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

Hòa tan 2 g mẫu thử trong 8,0 ml natri cacbonat (2.16.1.5). Trộn dung dịch này với 10 g diatomit (2.16.1.6). Chuyển hỗn hợp này vào cột tách (2.16.2.2) có một đĩa xốp thủy tinh và khóa teflon ở đầu dưới và bình chứa ở đầu cột. Nhồi cột bằng cách gõ cột trên một mặt phẳng có đệm, rồi nén chặt chất nhồi từ trên miệng cột.

Cho 100 ml metylen clorua (2.16.1.1) vào bình chứa và điều chỉnh khóa sao cho thu được 50 ml dịch rửa giải trong thời gian từ 20 min đến 30 min. Cho 25 µl dung dịch chuẩn nội (2.16.1.2) vào dịch rửa giải. Trộn đều, sau đó cô đặc dung dịch này còn 1 ml trong ống cô đặc thích hợp (2.16.2.3).

2.16.3.2 Điều kiện vận hành sắc kí

Khí mang:	heli
Tốc độ dòng khí mang:	30 ml/min
Nhiệt độ của bộ bơm mẫu:	225 °C
Nhiệt độ của cột:	180 °C
Nhiệt độ của detector:	250 °C

Độ nhạy của thiết bị được đặt sao cho khi bơm 2,5 µl dung dịch chuẩn làm việc (2.16.1.4) chứa 200 µg/ml toluen sulfonamid, thu được pic ở mức 40 % đến 80 % độ cao toàn thang.

Thời gian lưu của o-toluen sulfonamid, p-toluen sulfonamid và chuẩn nội n-tricosan lần lượt là khoảng 5; 6 và 15 min.

2.16.3.3 Dựng đường chuẩn

CẢNH BÁO: Cột thủy tinh phải kéo dài đến bộ bơm mẫu để có thể bơm mẫu lên cột và đến nền detector, tránh tiếp xúc với kim loại.

Bơm 2,5 µl mỗi dung dịch chuẩn làm việc (2.16.1.4) vào hệ thống sắc kí khí thích hợp (2.16.2.1) nối với detector ion hóa ngọn lửa.

Tính diện tích các pic o-toluen sulfonamid, p-toluen sulfonamid và chuẩn nội n-tricosan thu được từ sắc đồ của các dung dịch này. Từ các giá trị thu được, dựng đường chuẩn biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ của mỗi loại toluen sulfonamid, tính theo µg/ml và tỉ lệ diện tích pic của toluen sulfonamid so với n-tricosan.

2.16.3.4 Xác định

Bơm 2,5 µl dung dịch mẫu thử (2.16.3.1) vào hệ thống sắc kí khí thích hợp (2.16.2.1) nối với detector ion hóa ngọn lửa.

Ghi sắc đồ, tính diện tích các pic o-toluen sulfonamid, p-toluen sulfonamid và chuẩn nội n-tricosan.

Xác định nồng độ của từng toluen sulfonamid trong dung dịch mẫu thử dựa trên đường chuẩn (2.16.3.3).

CHÚ THÍCH: Nếu hàm lượng toluen sulfonamid trong mẫu thử lớn hơn khoảng 500 mg/kg, tạp chất này có thể kết tinh tách khỏi dịch cô metylen clorua (xem 2.16.3.1). Mặc dù mức tạp chất này vượt quá giới hạn cho phép trong tiêu chuẩn, có thể tiếp tục phép thử bằng cách pha loãng dịch cô (thường 1 : 10 là đủ) bằng metylen clorua chứa 250 µg/ml n-tricosan và thêm hệ số pha loãng vào công thức tính kết quả. Chú ý hòa tan hoàn toàn toluen sulfonamid kết tinh để thu được dung dịch đồng nhất.

2.16.4 Tính kết quả

Hàm lượng các toluen sulfonami có trong mẫu thử, X, tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg), được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{C \times V}{w}$$

Trong đó:

C là nồng độ của từng toluen sulfonamid trong dung dịch mẫu thử, xác định từ đường chuẩn, tính bằng microgam trên mililit (µg/ml);

V là thể tích dung dịch mẫu thử đã cô đặc (xem 2.16.3.1), tính bằng mililit (ml). Trong trường hợp này, V = 1 ml;

w là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g). Trong trường hợp này, w = 2 g.

2.17 Triphenylphosphin oxit

2.17.1 Thuốc thử

2.17.1.1 Dung dịch chuẩn triphenylphosphin oxit

Cân chính xác khoảng 10 mg triphenylphosphin oxit (TPPO) chuẩn (độ tinh khiết không nhỏ hơn 99 %), hòa tan trong tetrahydrofuran (THF) và chuyển toàn bộ vào bình định mức 1 000 ml, thêm THF đến vạch.

2.17.1.2 Hexan.

2.17.1.3 Isopropanol.

2.17.1.4 Tetrahydrofuran (THF).

2.17.2 Thiết bị, dụng cụ

2.17.2.1 Hệ thống HPLC, được trang bị bơm, bộ bơm mẫu và máy tích phân thích hợp.

2.17.2.2 Bình định mức, dung tích 100 ml và 1 000 ml.

2.17.3 Cách tiến hành

2.17.3.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác khoảng 1 000 mg mẫu thử, hòa tan trong THF (2.17.1.4) và chuyển toàn bộ vào bình định mức 100 ml (2.17.2.2), thêm THF đến vạch.

2.17.3.2 Điều kiện vận hành sắc kí

Cột:	Thép không gỉ, kích thước 150 mm × 4,6 mm, cột nhồi Supelcosil LC-Si, 5 µm hoặc tương đương
Detector:	UV
Nhiệt độ cột:	20 °C
Pha động:	Isopropanol (2.17.1.3) : hexan (2.17.1.2) = 1 : 24 (thể tích)
Lưu lượng dòng:	1,5 ml/min
Thể tích bơm mẫu:	50 µl
Bước sóng phát hiện:	210 nm
Thời gian chạy:	10 min

CHÚ THÍCH: Thời gian lưu của TPPO xấp xỉ 8,1 min.

2.17.3.3 Cách tiến hành

Tiến hành HPLC đối với dung dịch mẫu thử theo các điều kiện vận hành (2.17.3.2).

2.17.4 Tính kết quả

Hàm lượng TPPO có trong mẫu thử, X, được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức sau:

$$X = \frac{A_S \times w_{St} \times P_{St} \times 100}{A_{St} \times w_S \times 1000} \times 100$$

Trong đó:

A_S là diện tích pic của dung dịch mẫu thử;

A_{St} là diện tích pic của dung dịch chuẩn;

P_{St} là độ tinh khiết của chất chuẩn, tính bằng phần TPPO trong TPPO chuẩn (ví dụ 0,99 nếu chất chuẩn có độ tinh khiết 99 %);

100 là dung tích bình định mức dùng để chuẩn bị dung dịch mẫu thử (2.17.3.1), tính bằng mililit (ml);

1 000 là dung tích bình định mức dùng để chuẩn bị dung dịch chuẩn (2.17.1.1), tính bằng mililit (ml);

w_{St} là khối lượng chất chuẩn, tính bằng miligam (mg);

w_S là khối lượng mẫu thử, tính bằng miligam (mg).

3 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

a) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;

b) phương pháp thử đã dùng (viện dẫn tiêu chuẩn này);

c) kết quả thử nghiệm thu được;

d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tuỳ chọn cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;

e) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] FAO Food and Nutrition Paper 52 (FNP 52), *Compendium of Food Additive Specifications, Sodium cyclamate*, Add.4 (1996)

[2] FAO Food and Nutrition Paper 52 (FNP 52), *Compendium of Food Additive Specifications, Calcium cyclamate*, Add.4 (1996)