

TCVN 6471:2010

Xuất bản lần 2

**PHỤ GIA THỰC PHẨM – PHƯƠNG PHÁP THỬ
ĐỐI VỚI CÁC CHẤT TẠO HƯƠNG**

Food additives – Test methods for flavouring agent

HÀ NỘI – 2010

Lời nói đầu

TCVN 6471:2010 thay thế TCVN 6471:1998;

TCVN 6471:2010 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 (Tuyển tập quy định kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4: Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm và dung dịch phòng thử nghiệm được sử dụng và viện dẫn trong các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm)*;

TCVN 6471:2010 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F4 Phụ gia thực phẩm và các chất nhiễm bẩn biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Phụ gia thực phẩm – Phương pháp thử đối với các chất tạo hương

Food additives – Test methods for flavouring agents

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các phương pháp thử đối với các chất tạo hương.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6469: 2010, *Phụ gia thực phẩm – Phương pháp đánh giá ngoại quan và xác định các chỉ tiêu vật lý*;

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, Section on Analytical Techniques (Tuyển tập quy định kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4: Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm và dung dịch phòng thử nghiệm được sử dụng và viện dẫn trong các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Phần Các kỹ thuật phân tích)*.

3 Thuốc thử

Trong tiêu chuẩn này 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.

3.1 Dung dịch axit clohydric (HCl), nồng độ 1 N

Pha loãng 95 ml axit clohydric đặc bằng nước đến 1 000 ml. Chuẩn hoá dung dịch axit clohydric đã chuẩn bị bằng một trong các phương pháp sau:

TCVN 6471:2010

Phương pháp I: Hoà tan khoảng 1,5 g natri cacbonat (đã được làm khô trước ở nhiệt độ 270 °C trong 1 h) trong 100 ml nước, chuẩn độ bằng dung dịch axit clohydric đã chuẩn bị, sử dụng 2 giọt dung dịch xanh bromphenol làm chất chỉ thị. Gần đến điểm kết thúc, đun sôi để đuổi cacbon dioxit, làm nguội và tiếp tục chuẩn độ. Tính nồng độ của dung dịch axit clohydric.

Phương pháp II: Thêm 130 ml nước và 5 giọt axit nitric vào 20 ml dung dịch axit clohydric đã chuẩn bị. Vừa khuấy liên tục vừa thêm khoảng 40 ml dung dịch bạc nitrat (AgNO_3) nồng độ 10 % (khối lượng/thể tích) hoặc lớn hơn nếu cần, cho đến khi kết tủa hoàn toàn. Đun sôi nhẹ hỗn hợp trong 5 min, rồi để yên ở nơi tối cho đến khi kết tủa bạc clorua lắng xuống. Chuyển toàn bộ kết tủa vào chén nung Gooch đã biết khối lượng, sấy khô đến khối lượng không đổi ở 110 °C, sau đó rửa sạch với nước, axit hoá nhẹ với axit nitric cho đến khi nước rửa không còn phản ứng với bạc. Sấy khô đến khối lượng không đổi ở nhiệt độ 110 °C. Từ khối lượng bạc clorua thu được, tính nồng độ của dung dịch axit clohydric.

3.2 Dung dịch axit clohydric (HCl), nồng độ 0,5 N

Pha loãng 47,5 ml axit clohydric đặc bằng nước đến 1 000 ml. Chuẩn hoá dung dịch axit clohydric đã chuẩn bị theo 3.1.

3.3 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), nồng độ 1 N

Hòa tan 45 g natri hydroxit trong khoảng 950 ml nước và thêm dung dịch bari hydroxit bão hòa mới chuẩn bị, cho đến khi không tiếp tục hình thành kết tủa. Lắc kỹ hỗn hợp và để yên qua đêm trong bình có nắp đậy kín. Gạn phần chất lỏng phía trên hoặc lọc dung dịch và chuẩn hóa bằng một trong các phương pháp sau:

Phương pháp I: Pha loãng 25 ml dung dịch axit clohydric 1 N hoặc dung dịch axit sulfuric 1 N với 50 ml nước mới đun sôi và để nguội, chuẩn độ bằng dung dịch natri hydroxit đã chuẩn bị, dùng 2 giọt dung dịch phenolphthalein (3.8) làm chất chỉ thị.

Phương pháp II: Hòa tan khoảng 5 g kali biphtalat [$\text{KHC}_6\text{H}_4(\text{COO})_2$] (dạng bột, đã được sấy khô ở nhiệt độ 100 °C trong 3 h) trong 75 ml nước mới đun sôi và để nguội, chuẩn độ bằng dung dịch natri hydroxit đã chuẩn bị, dùng vài giọt dung dịch phenolphthalein làm chất chỉ thị. Mỗi mililit dung dịch natri hydroxit 1 N tương ứng với 204,2 mg kali biphtalat.

Bảo quản dung dịch natri hydroxit 1 N trong chai có nắp cao su đậy kín và chuẩn hóa thường xuyên.

3.4 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), nồng độ 0,2 N.

Pha loãng năm lần dung dịch natri hydroxit 1 N (3.3) bằng nước mới đun sôi và để nguội, hoặc dùng 9,0 g natri hydroxit và chuẩn bị theo 3.3. Chuẩn hoá dung dịch natri hydroxit đã chuẩn bị theo 3.3.

Bảo quản dung dịch natri hydroxit 0,2 N trong chai có nắp cao su đậy kín và chuẩn hóa thường xuyên.

3.5 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), nồng độ 0,1 N

Pha loãng hai lần dung dịch natri hydroxit 0,2 N (3.4) bằng nước mới đun sôi và để nguội, hoặc dùng 4,5 g natri hydroxit và chuẩn bị theo 3.3. Chuẩn hoá dung dịch natri hydroxit đã chuẩn bị theo 3.3.

Bảo quản dung dịch natri hydroxit 0,1 N trong chai có nắp cao su đậy kín và chuẩn hóa thường xuyên.

3.6 Dung dịch kali hydroxit (KOH) trong etanol, nồng độ 0,5 N

Hòa tan khoảng 35 g kali hydroxit trong 20 ml nước, thêm etanol đến 1 000 ml. Để yên dung dịch trong bình có nút đậy kín trong 24 h, sau đó gạn nhanh dung dịch ở phía trên vào bình kín thích hợp.

Chuẩn hóa nồng độ kali hydroxit trong dung dịch như sau: Cho 25 ml dung dịch axit clohydric 0,5 N (3.2) vào một bình cầu, pha loãng bằng 50 ml nước, thêm 2 giọt chất chỉ thị phenolphthalein (3.8) và chuẩn độ bằng dung dịch kali hydroxit trong etanol cho đến khi xuất hiện màu hồng nhạt, bền. Tính nồng độ của kali hydroxit trong dung dịch.

Bảo quản dung dịch trong bình kín, tránh sáng.

3.7 Dung dịch axit sulfuric (H₂SO₄), nồng độ 0,008 N.

3.8 Dung dịch phenolphthalein

Hoà tan 0,2 g phenolphthalein (C₂₀H₁₄O₄) trong 60 ml etanol 90 % và thêm nước đến 100 ml.

4 Phương pháp thử

4.1 Xác định khối lượng riêng, theo TCVN 6469:2010.

4.2 Xác định chỉ số khúc xạ, theo TCVN 6469:2010.

4.3 Xác định điểm nóng chảy (dải nóng chảy), theo TCVN 6469:2010.

4.4 Xác định điểm sôi, theo TCVN 6469:2010.

4.5 Xác định độ tan tổng số, theo TCVN 6469:2010.

4.6 Xác định độ tan trong etanol

4.6.1 Cách tiến hành

Cho 1 ml mẫu vào ống thủy tinh hình trụ dung tích 10 ml, có vạch chia 0,1 ml, đã được hiệu chuẩn, có nút đậy, trừ khi có quy định khác. Thêm từ từ các lượng nhỏ etanol với nồng độ và khối lượng được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể. Duy trì nhiệt độ ở 20 °C.

4.6.2 Biểu thị kết quả

Mẫu thử được coi là tan trong etanol nếu thu được dung dịch trong, không có tạp chất lạ.

4.7 Xác định trị số axit

4.7.1 Cách tiến hành

Hoà tan khoảng 10 g mẫu thử trong 50 ml etanol đã được trung hoà bằng dung dịch natri hydroxit 0,1 N (3.5) với chỉ thị phenolphthalein (3.8). Thêm 1 ml dung dịch phenolphthalein (3.8) và chuẩn độ bằng dung dịch natri hydroxit 0,1 N (3.5) cho đến khi dung dịch có màu hồng nhạt bền sau 10 s, trừ khi có quy định khác.

4.7.2 Tính kết quả

Trị số axit, AV, được tính theo công thức sau:

$$AV = \frac{5,61 \times S}{w}$$

trong đó:

S là thể tích dung dịch natri hydroxit 0,1 N đã dùng để chuẩn độ mẫu thử, tính bằng mililit (ml);

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

4.8 Xác định hàm lượng este

4.8.1 Cách tiến hành

Cân một lượng mẫu thử theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể, cho vào bình nón dung tích 125 ml có chứa vài viên bi trợ sôi. Thêm 25,0 ml dung dịch kali hydroxit 0,5 N trong etanol (3.6) vào bình. Nối bình nón với bộ ngưng tụ hồi lưu và đun nóng trên nồi hơi trong 1 h, trừ khi có quy định khác. Để cho hỗn hợp nguội, thêm 10 giọt dung dịch phenolphthalein (3.8) vào bình nón và chuẩn độ kiểm bằng dung dịch axit clohydric 0,5 N (3.2).

Tiến hành phép thử trắng không dùng mẫu thử.

4.8.2 Tính kết quả

Hàm lượng este của mẫu thử, E, được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$E = \frac{b - S}{w} \times e \times 100$$

trong đó:

- b là thể tích dung dịch axit clohydric 0,5 N (3.2) đã dùng để chuẩn độ mẫu trắng, tính bằng mililit (ml);
- S là thể tích dung dịch axit clohydric 0,5 N dùng để chuẩn độ mẫu thử, tính bằng mililit (ml);
- e là hệ số chuyển đổi (bằng số miligam este tương ứng với 1 mililit dung dịch axit clohydric 0,5 N), tính bằng miligam trên mililit (mg/ml), được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể;
- w là khối lượng mẫu thử, tính bằng miligam (mg).

4.9 Xác định hoạt chất chính

4.9.1 Xác định hoạt chất chính bằng sắc kí khí

Xác định hoạt chất chính của chất tạo hương bằng phương pháp sắc kí khí theo JECFA 2006, *Combined Compendium of Food Additive Specifications, Volume 4, Section on Analytical Techniques (Tuyển tập quy định kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4, Phần Các kỹ thuật phân tích)*.

4.9.2 Xác định hoạt chất chính bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao

4.9.2.1 Phạm vi áp dụng

Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) được áp dụng để xác định các chất tạo hương sau đây:

Axit 3-metyl-2-oxobutanoic (631);	Natri 3-metyl-2-oxobutanoat (631.1);
Axit 3-metyl-2-oxopentanoic (632);	Natri 3-metyl-2-oxopentanoat (632.1);
Axit 4-metyl-2-oxopentanoic (633);	Natri 4-metyl-2-oxopentanoat (633.1);
Axit 2-oxo-3-phenylpropionic (1478);	Natri 2-oxo-3-phenylpropionat (1479).

4.9.2.2 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

4.9.2.2.1 Hệ thống HPLC, được trang bị bơm, bơm tiêm và bộ xử lý dữ liệu.

4.9.2.2.1.1 Cột sắc kí, làm bằng thép không gỉ, kích thước 300 mm x 7,6 mm.

4.9.2.2.1.2 Pha tĩnh, Bio-Rad Aminex[®] HPX-87H hoặc loại tương đương.

4.9.2.2.1.3 Detector UV.

4.9.2.2.2 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

4.9.2.2.3 Bình định mức, dung tích 100 ml.

TCVN 6471:2010

4.9.2.3 Điều kiện sắc kí

- Nhiệt độ cột : 35 °C;
- Pha động : dung dịch axit sulfuric 0,008 N (3.7);
- Tốc độ dòng : 0,6 ml/min;
- Thể tích tiêm : 50 µl;
- Bước sóng : 210 nm;
- Thời gian chạy : 30 min.

Thời gian lưu của các hợp chất như sau:

- Axit 3-metyl-2-oxobutanoic : 13,0 min;
- Axit 3-metyl-2-oxopentanoic : 14,8 min;
- Axit 4-metyl-2-oxopentanoic : 16,7 min;
- Axit 2-oxo-3-phenylpropionic : 24,7 min.

4.9.2.4 Cách tiến hành

Cân khoảng 100 mg mẫu thử, hòa tan trong một lượng tối thiểu dung dịch natri hydroxit 0,2 N (3.4) trong bình định mức 100 ml (4.9.2.2.3) và thêm nước đến vạch. Thiết lập các điều kiện HPLC với pha động. Tiêm dung dịch mẫu thử và xác định hàm lượng hoạt chất có trong mẫu thông qua diện tích pic.

5 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) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
 - e) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.
-