

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA
QCVN 4-18:2011/BYT

VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM – CHẾ PHẨM TINH BỘT

National technical regulation on Food Additive – Modified starches

HÀ NỘI - 2011

Lời nói đầu

QCVN 4-18:2011/BYT do Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA

VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM – CHẾ PHẨM TINH BỘT

National technical regulation on Food Additive – Modified starches

I. QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh

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

2. Đối tượng áp dụng

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

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

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

3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:

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

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

3.3. TS (test solution): Dung dịch thuốc thử.

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

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

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

1. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với:

- Dextrin, tinh bột rang
- Tinh bột xử lý bằng acid
- Tinh bột xử lý bằng kiềm
- Tinh bột tẩy màu
- Tinh bột oxy hoá
- Tinh bột xử lý bằng enzym
- Monostarch phosphat

- Distarch phosphat
- Distarch phosphat đã phosphat hoá
- Distarch phosphat acetylat
- Tinh bột acetat
- Distarch adipat acetylat
- Tinh bột hydroxypropyl
- Distarch phosphat hydroxypropyl
- Tinh bột natri octenylsuccinat

sử dụng làm chế phẩm tinh bột được quy định tại phụ lục ban hành kèm theo Quy chuẩn này.

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

3. Lấy mẫu theo hướng dẫn tại Thông tư 16/2009/TT-BKHCN ngày 02 tháng 6 năm 2009 của Bộ Khoa học và Công nghệ về hướng dẫn kiểm tra nhà nước về chất lượng hàng hóa lưu thông trên thị trường và các quy định khác của pháp luật có liên quan.

III. YÊU CẦU QUẢN LÝ

1. Công bố hợp quy

1.1. Các chế phẩm tinh bột phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

1.2. Phương thức, trình tự, thủ tục công bố hợp quy được thực hiện theo Quy định về chứng nhận hợp chuẩn, chứng nhận hợp quy và công bố hợp chuẩn, công bố hợp quy ban hành kèm theo Quyết định số 24/2007/QĐ-BKHCN ngày 28 tháng 9 năm 2007 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ và các quy định của pháp luật.

2. Kiểm tra đối với chế phẩm tinh bột

Việc kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn đối với các chế phẩm tinh bột phải thực hiện theo các quy định của pháp luật.

IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

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

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

V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

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

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

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

PHỤ LỤC

YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CHẾ PHẨM TINH BỘT

- | | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| 1. Tên khác, chỉ số | Dextrin, tinh bột rang: INS 1400 |
| | Tinh bột xử lý bằng acid: INS 1401 |
| | Tinh bột xử lý bằng kiềm: INS 1402 |
| | Tinh bột tẩy màu: INS 1403 |
| | Tinh bột oxy hoá: INS 1404 |
| | Tinh bột xử lý bằng enzym: INS 1405 |
| | Monostarch phosphat: INS 1410 |

Distarch phosphat: INS 1412
Distarch phosphat đã phosphat hoá: INS 1413
Distarch phosphat acetylát: INS 1414
Tinh bột acetat: INS 1420
Distarch adipat acetylát: INS 1422
Tinh bột hydroxypropyl: INS 1440
Distarch phosphat hydroxypropyl: INS 1442
Tinh bột natri octenylsucinát: INS 1450

2. Định nghĩa

Các tinh bột thực phẩm có một hoặc vài thuộc tính gốc đã được thay đổi do xử lý phù hợp với GMP, theo một số quy trình nhất định

Mã số C.A.S.

Tinh bột acetat : 9045-28-7
Distarch adipat acetylát: 68130-14-3
Tinh bột hydroxypropyl: 9049-76-7
Distarch phosphat hydroxypropyl: 53124-00-8
Tinh bột oxy hoá acetylát: 68187-08-6

3. Cảm quan

Hầu hết chế phẩm tinh bột dạng bột không mùi, màu trắng hoặc trắng nhạt. Tùy thuộc vào phương pháp sấy, các bột này có thể gồm các hạt tinh bột nguyên dạng gốc hoặc các khối gồm nhiều hạt (dạng quả lê, dạng mặt) hoặc nếu hồ hoá trước sẽ gồm dạng vảy, bột vô định hình hoặc dạng hạt thô.

4. Chức năng

Chế phẩm tinh bột, chất làm dày, chất ổn định, chất độn, chất nhũ hoá

5. Yêu cầu kỹ thuật

5.1. Định tính

Độ tan

Không tan trong nước lạnh (nếu không hồ hoá trước), tạo thành dung dịch keo nhớt điển hình trong nước nóng; không tan trong ethanol.

Cấu trúc hiển vi

Xem mô tả trong phần Phương pháp thử

Nhuộm màu iod

Phải có phản ứng nhuộm màu iod đặc trưng.

Khử đồng

Phải có phản ứng khử đồng đặc trưng.

Tính khác biệt

Xem phần thử đối với dạng tinh bột.

Xem mô tả trong phần Phương pháp thử đối với :

- Tinh bột oxy hoá hypoclorid
- Phản ứng đặc trưng đối với các nhóm acetyl
- Thử dương tính đối với các nhóm ester

5.2. Độ tinh khiết

Lưu huỳnh dioxyd (SO₂)

- Không được quá 50,0 mg/kg đối với chế phẩm tinh bột từ ngũ cốc
- Không được quá 10,0 mg/kg đối với các loại chế phẩm tinh bột khác trừ khi được ghi rõ trong bảng 1
(xem mô tả trong phần Phương pháp thử)

Chì

- Không được quá 2,0 mg/kg.
- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.
 - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

Các độ tinh khiết bổ sung đối với từng loại chế phẩm tinh bột hoá học

- Xem ở cột 3 bảng 1
- Xem mô tả trong phần Phương pháp thử

6. Phương pháp thử

6.1. Định tính

Soi kính hiển vi

Các dạng chế phẩm tinh bột không được hồ hoá trước vẫn giữ nguyên cấu trúc hạt có thể xác định là tinh bột nhờ quan sát bằng kính hiển vi. Hình dạng, kích thước và đôi khi sự sắp xếp các sọc hoặc đường vân là đặc trưng của nguồn gốc thực vật. Dưới ánh sáng phân cực qua lăng kính nicol, góc cắt phân cực điển có thể quan sát được.

Nhuộm màu iod

Cho một vài giọt kali tri-iodid 0,1N vào hỗn dịch trong nước của mẫu. Các tinh bột này nhuộm màu iod giống như nhuộm màu với tinh bột tự nhiên. Màu có thể từ màu xanh đậm đến đỏ.

Khử đồng

Cho 2,5 g mẫu trước đó đã được rửa bằng nước vào bình chịu nhiệt, thêm 10 ml dung dịch HCl loãng 3% và 70 ml nước, lắc đều, đun với sinh hàn ngược trong 3 giờ và làm nguội. Thêm 0,5 ml dung dịch thu được vào 5 ml dung dịch kiềm nóng đồng (II) tartrat (TS). Kết tủa màu đỏ thẫm được hình thành.

Tính khác biệt

Để phân biệt giữa các loại tinh bột được xử lý khác nhau, tiến hành các phép thử sau:

- Thử đối với tinh bột oxy hoá bằng hypochlorit (không thử đối với tinh bột khoai tây oxy hoá nhẹ)

Nguyên tắc :

Vì trong thành phần có chứa nhóm carboxyl, tinh bột oxy hoá bằng hypochlorit có thuộc tính anion. Nó có thể được nhuộm bằng các thuốc nhuộm tích điện dương như xanh methylen.

Cách thực hiện:

Giữ hỗn dịch gồm 50 mg mẫu thử trong 25 ml dung dịch nước thuốc nhuộm 1% trong 5 – 10 phút và thỉnh thoảng khuấy. Sau khi tách dung dịch dư, tinh bột được rửa bằng nước cất. Kiểm tra bằng kính hiển vi cho màu rõ, nếu mẫu là tinh bột oxy hoá hypochlorit. Do vậy, phép thử này cho phép phân biệt được tinh bột oxy hóa bằng hypochlorit với tinh bột tự nhiên hay chế phẩm tinh bột bằng acid có cùng nguồn gốc thực vật.

- Phản ứng đặc trưng của các nhóm acetyl :

Nguyên tắc : Acetat được giải phóng nhờ quá trình xà phòng hoá tinh bột acetylát. Sau khi làm giàu acetat được chuyển thành aceton bằng cách gia nhiệt với $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Nhờ đó aceton tạo thành nhuộm thành màu xanh bằng ortho-nitrobenzaldehyd.

Cách tiến hành : Tạo hỗn dịch gồm 10 g mẫu trong 25 ml nước và thêm vào 20 ml dung dịch NaOH 0,4N. Sau khi lắc trong 1 giờ tinh bột được lọc ra và phần dịch lọc thu được cô trong lò ở 110°C . Cặn được hoà tan trong một vài giọt nước và được chuyển sang ống thử. Thêm $\text{Ca}(\text{OH})_2$ và gia nhiệt ống thử. Nếu mẫu là tinh bột acetylát, hơi aceton được hình thành. Hơi này tạo thành màu xanh trên mảnh giấy tẩm dung dịch bão hoà o-nitrobenzaldehyd trong NaOH 2N. Màu xanh rất dễ nhận thấy khi màu vàng gốc của các thuốc thử biến mất khi nhỏ 1 giọt dung dịch HCl 10%.

- Thử dương tính đối với các nhóm ester :

Phổ hồng ngoại tấm film mỏng cho thấy một dải hấp thụ điển hình ở khoảng 1.720 cm^{-1} biểu thị sự có mặt của các nhóm ester. Giới hạn phát hiện là khoảng 0,5% các nhóm acetyl, adipyl hoặc succinyl trong sản phẩm.

6.2. Độ tinh khiết

Lưu huỳnh dioxyd (SO_2)

Phạm vi áp dụng:

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

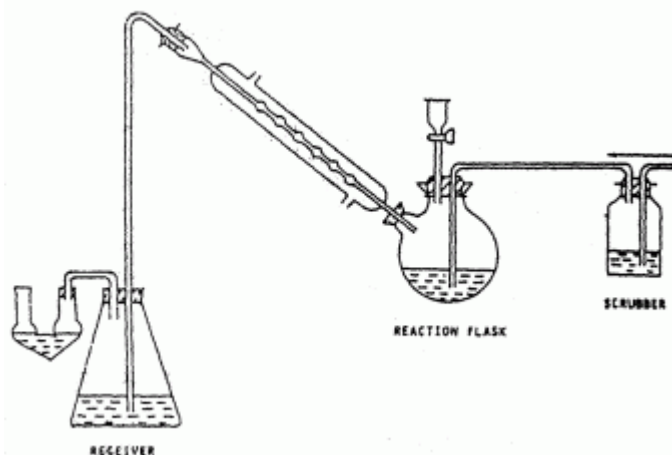
Nguyên tắc:

SO_2 được giải phóng ra từ mẫu trong môi trường acid đun sôi và tách

khí SO_2 ra bằng dòng khí CO_2 . Khí tách ra được dẫn vào dung dịch hydrogen peroxid loãng nơi nó bị oxy hóa thành H_2SO_4 và được chuẩn độ bằng dung dịch kiềm tiêu chuẩn. Một cách khác, H_2SO_4 có thể được định lượng bằng BaSO_4 .

Dụng cụ:

Bộ dụng cụ "Monier-Williams" để định lượng acid sulfurơ, được cấu tạo bằng các kết nối thủy tinh thon tiêu chuẩn, có thể mua được các cửa hàng bán dụng cụ thủy tinh phục vụ nghiên cứu khoa học đáng tin cậy. Tuy nhiên, dụng cụ này thường được tự lắp từ các dụng cụ thủy tinh thí nghiệm tiêu chuẩn có các kết nối có nắp (xem Hình 1).



Hình 1

Bộ dụng cụ gồm bình đun hai cổ tròn dung tích 1.000 ml nối với một ống khí vào, một phễu nhỏ giọt dung tích 60 ml có van khóa kích thước lỗ 2 mm, sinh hàn ngược nghiêng Allihn. Một ống dẫn nối với phần trên cùng của sinh hàn tới đáy của bình nhận hình nón dung tích 250 ml, bình này được nối ống Peligot.

Trong quá trình vận hành, lượng khí CO_2 thoát ra được dẫn qua bình bẫy và tạo thành bọt khí cho qua hỗn hợp phản ứng nóng, dẫn SO_2 qua bình ngưng và vào các bình nhận, nơi nó được hút định lượng.

Chuẩn bị dung dịch:

Dung dịch Na_2CO_3 : Hoà tan khoảng 15 g Na_2CO_3 hoặc 40 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ trong nước cất và pha tới thể tích 100 ml.

Dung dịch hydrogen peroxyd 3%: Pha 10 ml hydrogen peroxyd trung tính 30% (hoá chất tinh khiết) với nước cất cho đến thể tích 100 ml.

Cách tiến hành:

Cho CO_2 từ máy sinh CO_2 hoặc bình khí nén CO_2 qua dung dịch bẫy Na_2CO_3 để loại clor, từ đó cho vào ống dẫn khí vào của bình đun. Cho 15 ml dung dịch hydrogen peroxyd 3% vào bình nhận và 5 ml vào ống Peligot. Lắp bộ dụng cụ, cho 300 ml nước cất và 20 ml dung dịch HCl đậm đặc vào bình đun bằng phễu nhỏ giọt. Đun sôi hỗn hợp trong khoảng 10 phút có sục khí CO_2 . Cân 100 g mẫu chính xác đến từng g và phân tán mẫu trong khoảng 300 ml nước cất vừa đun sôi. Chuyển phần bùn nhão vào bình đun bằng phễu nhỏ giọt, điều chỉnh tốc độ mẫu thêm vào và tốc độ dòng khí qua dụng cụ nhằm ngăn sự quay trở lại của hydrogen peroxyd, kể cả không khí, hoặc mùi khét của mẫu. Đun sôi nhẹ hỗn hợp trong 1 giờ có sục chậm dòng khí CO_2 . Ngừng dòng nước trong sinh hàn trước khi kết thúc chưng cất. Khi ống dẫn ở ngay bên trên bình nhận trở nên nóng, tháo ống từ sinh hàn ra ngay lập tức. Rửa các thành phần trong ống dẫn và ống Peligot vào trong bình nhận, và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N, sử dụng chất chỉ thị xanh bromphenol (xem phần Chú ý).

Thực hiện thử đối với mẫu trắng, kết quả được tính theo công thức sau:

$$(S - B) \times 0,0032 \times 100$$

$$\% \text{SO}_2 = \frac{\text{---}}{\text{---}}$$

W

Trong đó:

S: Số ml dung dịch NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ mẫu thử

B: Số ml dung dịch NaOH 0,1N dùng để chuẩn độ mẫu trắng

W: Khối lượng mẫu thử (g)

Chú ý: Phân tích định lượng bằng phương pháp cân có thể được tiến hành sau khi chuẩn độ. Acid hoá bằng HCl, kết tủa bằng BaCl₂, để ổn định, lọc, rửa, đốt cháy và cân tính theo BaSO₄.

Bảng 1. Các yêu cầu kỹ thuật về độ tinh khiết bổ sung đối với từng loại chế phẩm tinh bột biến tính bằng hoá học

Loại tinh bột biến tính	Tóm lược phương pháp	Yêu cầu kỹ thuật đối với sản phẩm cuối cùng
Dextrin, tinh bột rang	Xử lý nhiệt khô với acid HCl hoặc acid ortho-H ₃ PO ₄	pH = 2,5 – 7,0
Tinh bột xử lý bằng acid	Xử lý bằng acid HCl hoặc ortho-H ₃ PO ₄ hoặc H ₂ SO ₄	pH = 4,8 – 7,0
Tinh bột xử lý bằng kiềm	Xử lý bằng NaOH hoặc KOH	pH = 5,0 – 7,5
Tinh bột tẩy màu	Xử lý bằng acid peracetic và hoặc hydrogen peroxid, hoặc natri hypochlorit, hoặc NaCl, hoặc SO ₂ hoặc các dạng được cho phép khác của sulfit, hoặc kali permanganat hoặc amoni persulfat	Nhóm carbonyl thêm vào không được quá 0,1%; Không có dư lượng hoá chất; Dư lượng SO ₂ không được quá 50 mg/kg; Dư lượng mangan không được quá 50 mg/kg.
Tinh bột xử lý bằng enzym	Xử lý trong dung dịch nước ở nhiệt độ dưới điểm tạo keo với một hoặc nhiều enzym thủy phân tinh bột dành cho thực phẩm	Dư lượng SO ₂ không được quá 50 mg/kg
Tinh bột oxy hoá	Xử lý bằng natri hypochlorit	Các nhóm carboxyl không được quá 1,1%; Dư lượng SO ₂ không được quá 50 mg/kg
Monostarch phosphat	Ester hoá bằng acid ortho-H ₃ PO ₄ , hoặc natri hoặc kali ortho-phosphat, hoặc natri tripolyphosphat	Hàm lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,5% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và không được quá 0,4% đối với tinh bột khác.
Distarch phosphat	Ester hoá bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxychlorid	Hàm lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,5% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và không được quá 0,4% đối với tinh bột khác.

Distarch phosphat đã phosphat hoá	Kết hợp các xử lý đối với Monostarch phosphat và Distarch phosphat	Hàm lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,5% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và không được quá 0,4% đối với tinh bột khác.
Distarch phosphat acetylat	Ester hoá bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxychlorid kết hợp với ester hoá bằng anhydrid acetic hoặc vinyl acetat	Các nhóm acetyl không được quá 2,5%; hàm lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,14% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và không được quá 0,04% đối với tinh bột khác; và vinyl acetat không được quá 0,1 mg/kg
Tinh bột acetat	Ester hoá bằng anhydrid acetic hoặc vinyl acetat	Các nhóm acetyl không được quá 2,5%
Distarch adipat acetylat	Ester hoá bằng anhydrid acetic và anhydrid adipic	Các nhóm acetyl không được quá 2,5% và các nhóm adipat không được quá 0,135%
Tinh bột hydroxypropyl	Ester hoá bằng propylen oxyd	Các nhóm hydroxypropyl không được quá 7,0%; propylen chlorohydrin không được quá 1 mg/kg
Distarch phosphat hydroxypropyl	Ester hoá bằng natri trimetaphosphat hoặc phospho oxychlorid kết hợp với ester hoá bằng propylen oxyd	Các nhóm hydroxypropyl không được quá 7,0%; propylen chlorohydrin không được quá 1 mg/kg và dư lượng phosphat tính theo phosphor không được quá 0,14% đối với tinh bột khoai tây hoặc bột mì, và không được quá 0,04% đối với tinh bột khác
Tinh bột natri octenylsuccinat	Ester hoá bằng anhydrid octenylsuccinic	Các nhóm octenylsuccinyl không được quá 3%; và dư lượng acid octenylsuccinic không được quá 0,3%
Tinh bột oxy hoá acetylat	Xử lý bằng natri hypochlorit sau đó ester hoá bằng anhydrid acetic	Các nhóm acetyl không được quá 2,5% và các nhóm carboxyl không được quá 1,3%

Chi

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

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

pH

- Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

- Hòa 20 g mẫu với 80 ml nước. Khuấy liên tục ở tốc độ trung bình trong 5 phút (Trong trường hợp mẫu là tinh bột đã keo hóa sơ bộ, cần 3 g hòa với 97 ml nước).

Nhóm carboxyl

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Nguyên tắc:

Tinh bột có chứa carboxyl được cân bằng với acid vô cơ để chuyển các muối carboxyl thành dạng acid. Các cation và acid dư được loại bỏ bằng cách rửa với nước. Mẫu đã rửa được hoà tan trong nước và được chuẩn độ bằng dung dịch kiềm chuẩn.

Chú ý: Các nhóm phosphat tự nhiên có mặt trong tinh bột

khoai tây làm tăng độ chuẩn được tìm thấy trong phương

pháp này (Xem ghi chú 6).

Hoá chất, thuốc thử:

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

Dung dịch NaOH 0,1N: Được chuẩn hoá

Dung dịch chỉ thị phenolphthalein 1%

Cách tiến hành:

Nếu cần thiết, nghiền mẫu hoàn toàn nhờ máy nghiền cát thí nghiệm cho qua rây 20 mesh hoặc mịn hơn, để phòng ngừa bất kỳ sự thay đổi có ý nghĩa nào về độ ẩm và trộn đều.

Cân chính xác một mẫu chứa không quá 0,25 mili đương lượng carboxyl (Ghi chú 1), và chuyển lượng mẫu vào cốc dung tích 150 ml. Thêm vào 25 ml dung dịch HCl 0,1N và thỉnh thoảng khuấy trên 30 phút. Lọc chân không lớp bột nhão qua một phễu thủy tinh xốp có lỗ xốp trung bình hoặc phễu nhỏ, sử dụng dòng nước nhỏ từ bình rửa để giúp chuyển toàn bộ lượng mẫu. Rửa mẫu bằng nước cất (thường là đủ 300 ml) cho đến khi phần dịch lọc được xác định không có clorid bằng phép thử AgNO_3 (Ghi chú 2).

Chuyển mẫu đã khử khoáng toàn lượng vào cốc dung tích 600 ml cùng với nước cất và chuyển mẫu thành bột nhão trong 300 ml nước cất. Gia nhiệt hỗn dịch mẫu trong cách thủy sôi hoặc trên cách thủy sôi (Ghi chú 3), khuấy liên tục cho đến khi tinh bột hóa hồ và tiếp tục gia nhiệt trong 15 phút để đảm bảo tinh bột hóa hồ hoàn toàn (Ghi chú 4).

Lấy mẫu ra khỏi cách thủy và chuẩn độ khi còn nóng bằng dung dịch NaOH 0,1N điểm kết thúc với chỉ thị phenolphthalein. Điểm kết thúc cũng có thể phát hiện bằng đo điện tại pH = 8,3. Xác định mẫu trắng được tiến hành giống mẫu thử để hiệu chỉnh các acid tự nhiên (Ghi chú 5). Cân cùng một lượng tinh bột như lấy chuẩn độ carboxyl và trộn lẫn với 10 ml nước cất. Khuấy đều khoảng 5 phút mỗi lần trong 30 phút. Lọc chân không bột nhão định lượng qua một phễu thủy tinh xốp có lỗ xốp trung bình hoặc phễu nhỏ, và rửa mẫu bằng 200 ml nước cất. Chuyển, làm hồ hóa và chuẩn độ mẫu bằng dung dịch NaOH 0,1N giống như cách làm đối với mẫu đã khử khoáng.

Kết quả:

(Thể tích NaOH chuẩn mẫu thử - mẫu trắng) x 0,0045 x 100

Các nhóm carboxyl (%) = -----

Khối lượng mẫu (g)

Chú ý và phòng ngừa:

Lượng mẫu không nên vượt quá 5,0 g đối với tinh bột oxy hoá trung bình hoặc nhỏ hơn 0,15 g đối với tinh bột thương mại oxy hoá cao.

Thêm 1 ml dung dịch AgNO_3 1% pha trong nước vào 5 ml dịch lọc. Xuất hiện kết tủa hoặc đục trong vòng 1 phút nếu có mặt của clorid.

Không nên gia nhiệt trên đĩa nóng hoặc trên đèn đốt Bunsen. Sự quá nhiệt hoặc quá nóng đối với lượng mẫu nhỏ sẽ làm phân hủy mẫu và kết quả carboxyl cao giả tạo.

Hồ hóa mẫu triệt để tạo điều kiện chuẩn độ nhanh chóng và phát hiện điểm kết thúc chính xác.

Chuẩn độ mẫu trắng được tiến hành trên mẫu đã được rửa bằng nước để hiệu chỉnh các thành phần acid không được đưa vào để oxy hoá hoặc chuyển hoá. Các acid béo tự do kết hợp với amylose trong tinh bột ngô thường là những chất có đóng góp chính đối với chuẩn độ mẫu trắng.

Hiệu chỉnh hàm lượng phosphat trong tinh bột khoai tây (qui đổi) nên được tiến hành sau khi xác định hàm lượng phospho của mẫu thử.

Qui đổi được tính theo công thức sau:

$$\frac{2 \times 45.02 \times P}{30.97} = 2.907 \times P$$

Trong đó: P là hàm lượng phospho (%)

Mangan

Được mô tả trong Cột 3 Bảng 1

Thiết bị:

Thiết bị quang phổ hấp thụ nguyên tử với đèn cathod rỗng mangan

Chuẩn bị dung dịch:

Dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch 0,5 mg mangan/lít.

Dung dịch mẫu thử: Chuyển 10 g mẫu vào bình định mức Kohlrausch dung tích 200 ml trước đó được rửa bằng dung dịch HCl 0,5N, thêm 140 ml dung dịch HCl 0,5N và lắc mạnh trong 15 phút, thích hợp nhất dùng máy lắc. Pha tới thể tích 200 ml bằng dung dịch HCl 0,5N và lắc. Li tâm khoảng 100 ml hỗn hợp trong ống ly tâm có thành dày hoặc lọ ở tốc độ 650 xg trong 5 phút và lấy dung dịch lỏng trên bề mặt. Dung dịch này là "dung dịch mẫu thử".

Cách tiến hành:

Thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất cho vận hành của thiết bị quang phổ hấp thụ nguyên tử và hút nước cất thông qua đèn khí acetylen trong 5 phút để được một đường nền tại bước sóng 279,5 nm. Trong cùng một cách, hút một phần của "dung dịch chuẩn" và lưu kết quả. Cuối cùng, hút "dung dịch mẫu" và so sánh kết quả với kết quả của "dung dịch chuẩn", và nhân giá trị này với 20 để có được nồng độ tính bằng mg mangan/kg mẫu ban đầu được lấy để phân tích.

Phosphor

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Hoá chất, thuốc thử:

Dung dịch amoni molybdat 5%: Hoà 50 g amoni molybdat tetrahydrat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, trong 900 ml nước ấm, làm nguội tới nhiệt độ phòng, pha loãng tới 1000 ml bằng nước và lắc đều.

Dung dịch amoni Vanadat 0,25%: Hoà 2,5 g amoni metavanadat, NH_4VO_3 , trong 600 ml nước sôi, làm nguội tới 60 – 70°C và thêm vào 20 ml dung dịch acid nitric. Làm nguội tới nhiệt độ phòng, pha loãng tới 1000 ml bằng nước và lắc đều.

Dung dịch kẽm acetat 10%: Hoà 120 g kẽm acetat dihydrat, $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, trong 880 ml nước và lọc qua giấy lọc Whatman số 2V hoặc giấy lọc tương đương trước khi sử dụng.

Dung dịch acid nitric 29%: Thêm 300 ml dung dịch acid nitric (tỷ trọng 1,42) vào 600 ml nước và lắc đều.

Dung dịch phosphor chuẩn (100 µg P/ml): Hoà 438,7 mg KH_2PO_4 trong nước trong bình định mức 1000 ml, pha tới 1000 ml bằng nước và lắc đều.

Đường chuẩn:

Dùng pipet hút 5; 10 và 15 ml dung dịch phosphor chuẩn cho vào các bình định mức riêng biệt dung tích 100 ml. Thêm vào mỗi bình và bình mẫu trắng thứ tư lần lượt theo thứ tự 10 ml dung dịch acid nitric, 10 ml dung dịch amoni Vanadat và 10 ml dung dịch amoni molybdat, lắc mạnh sau mỗi khi thêm. Pha tới thể tích 100 ml bằng nước, lắc đều và để yên trong 10 phút. Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch chuẩn trong ống đo 1 cm ở bước sóng 460 nm bằng thiết bị quang phổ thích hợp, sử dụng mẫu trắng để đặt giá trị

độ hấp thụ trên thiết bị bằng 0. Vẽ đường chuẩn trên đồ thị biểu diễn độ hấp thụ với nồng độ từng dung dịch (mg P/100 ml).

Xử lý mẫu sơ bộ:

Cho 20 – 25 g mẫu tinh bột vào cốc dung tích 250 ml; thêm vào 200 ml hỗn hợp methanol/nước (7/3), phân tán mẫu và lắc bằng máy trong 15 phút. Thu hồi tinh bột bằng cách lọc chân không vào phễu thủy tinh xốp có lỗ xốp trung bình dung tích 150 ml hoặc phễu Buchner, và rửa bánh tinh bột ẩm bằng 200 ml hỗn hợp methanol/nước. Lại chuyển bánh tinh bột ẩm thành bột nhão trong dung môi, rửa lần hai theo cách tương tự. Sấy bánh tinh bột lọc trong tủ sấy ở nhiệt độ nhỏ hơn 50°C, sau đó nghiền mẫu qua rây 20 mesh hoặc mịn hơn và trộn đều. Xác định hàm lượng chất khô bằng cách sấy một phần 5 g trong tủ sấy chân không, không quá 100 mmHg, ở 120°C trong 5 giờ. (Chú ý: xử lý được đưa ra ở trên phù hợp với các sản phẩm tinh bột không tan trong nước lạnh. Đối với tinh bột đã được hồ hóa trước và các loại tinh bột tan trong nước khác, chuẩn bị dung dịch bột nhão 1 – 2% trong nước, sau đó cho vào ống cellophan và thẩm tách nước cất liên tục trong 30 – 40 giờ. Kết tủa tinh bột bằng cách đổ dung dịch vào 4 phần thể tích aceton/1 phần thể tích dung dịch bột nhão đồng thời khuấy. Thu hồi tinh bột bằng cách lọc chân không vào phễu thủy tinh xốp có lỗ xốp trung bình hoặc phễu Buchner, rửa bánh lọc bằng ethanol tuyệt đối. Sấy bánh lọc và xác định hàm lượng chất khô theo hướng dẫn đối với các tinh bột không tan trong nước.

Chuẩn bị mẫu:

Cân chính xác 10 g mẫu đã xử lý sơ bộ, tính theo chất khô, cho vào đĩa Vycor và thêm vào 10 ml dung dịch kẽm acetat, phân tán dung dịch đều trong mẫu. Cô đến khô trên tấm gia nhiệt sau đó tăng nhiệt và carbon hoá mẫu trên tấm gia nhiệt hoặc trên ngọn lửa gas. Đốt cháy trong lò nung ở 550°C cho đến khi tro không còn carbon (khoảng 1 – 2 giờ), làm nguội. Làm ẩm tro bằng 15 ml nước và rửa chậm xuống thành đĩa bằng 5 ml dung dịch acid nitric. Gia nhiệt đến sôi, làm nguội và chuyển toàn lượng hỗn hợp vào bình định mức dung tích 200 ml, rửa đĩa bằng ba phần 20 ml nước và cho nước rửa vào bình. Pha tới thể tích 200 ml bằng nước và lắc đều. Chuyển một lượng chính xác (V ml) của dung dịch này, chứa không được quá 1,5 mg P, vào trong bình định mức dung tích 100 ml và thêm vào 10 ml dung dịch acid nitric, 10 ml dung dịch amoni Vanadat và 10 ml dung dịch amoni molybdat, lắc đều sau mỗi lần thêm. Pha tới thể tích 100 ml bằng nước, lắc đều và để yên trong 10 phút.

Cách tiến hành:

Đo độ hấp thụ của dung dịch ở mục Chuẩn bị mẫu trong công đo 1 cm ở bước sóng 460 nm bằng thiết bị quang phổ phù hợp, sử dụng mẫu trắng để cài đặt thiết bị ở 0. Từ đường chuẩn, xác định số mg phosphor trong lượng mẫu lấy, ghi lại giá trị này là a. Tính hàm lượng mg P/kg mẫu gốc theo công thức sau:

$$\frac{a \times 200 \times 1000}{V \times W}$$

Trong đó:

W: Khối lượng mẫu thử (g)

Các nhóm acetyl

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Cân chính xác 5 g mẫu và cho vào bình nón dung tích 250 ml. Tạo hỗn dịch trong 50 ml nước, thêm vào vài giọt phenolphthalein TS và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt. Thêm 25 ml dung dịch NaOH 0,45N, đậy nắp bình và lắc mạnh trong 30 phút, thích hợp nhất là lắc bằng máy. (Chú ý: Nhiệt độ không được quá 30°C, nếu không một vài loại tinh bột có thể bị hồ hóa). Tháo nắp đậy, rửa nắp và thành bình bằng một vài ml nước và chuẩn độ kiềm dư bằng dung dịch HCl 0,2N cho đến khi mất màu hồng. Ghi lại thể tích dung dịch HCl 0,2N dùng để chuẩn độ (S ml). Thực hiện chuẩn độ mẫu trắng trên 25 ml dung dịch NaOH 0,45N và ghi lại thể tích của dung dịch HCl 0,2N (B ml)

$$(B - S) \times N \times 0,043 \times 100$$

$$\% \text{ các nhóm acetyl} = \frac{\text{-----}}{W}$$

W

Trong đó:

N: Nồng độ đương lượng của dung dịch HCl

W: Khối lượng mẫu (g)

Vinyl acetat

Xác định bằng phương pháp sắc ký khí không gian hơi.

Sử dụng thiết bị sắc ký khí được trang bị cột thủy tinh nhồi Porapak Q 80 – 100 mesh (hoặc tương đương) có chiều dài 2 m, đường kính trong 2 mm; detector ion hoá ngọn lửa; thực hiện với các điều kiện sau:

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

Chuẩn bị chuẩn: Cân chính xác 150 mg vinyl acetat (tinh khiết) cho vào bình định mức dung tích 100 ml. Hoà tan và định mức đến thể tích 100 ml bằng nước cất. Cho 1 ml dung dịch này vào bình định mức dung tích 10 ml và định mức tới 10 ml bằng nước cất. Thêm 1 ml dung dịch loãng này vào 30 g tinh bột chưa biến tính của cùng nguồn gốc thực vật như là chất thử trong bình dung tích 100 ml có nắp gioăng. Đóng kín bình ngay lập tức bằng nắp gioăng. Cách làm này thu được tinh bột chuẩn với hàm lượng vinyl acetat 5 mg/kg.

Cách tiến hành:

Cân 30 g chất thử cho vào trong bình định mức dung tích 100 ml có nắp gioăng. Đóng kín bình. Để bình có chứa chất thử và bình có chứa tinh bột chuẩn ở chậu nước có nhiệt độ không đổi 70°C trong 30 phút. Lấy 2 ml từ thể tích khí trong bình chứa chuẩn, sử dụng syringe (xylanh) kín, bơm trực tiếp vào cổng bơm của thiết bị sắc ký khí và ghi chiều cao pick của sắc phổ. Tương tự bơm 2 ml thể tích khí từ bình chứa chất thử vào thiết bị sắc ký. Tính hàm lượng vinyl acetat trong chất thử từ việc so sánh chiều cao các pick của hai sắc ký đồ.

Các nhóm adipat

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Hoá chất và dung dịch:

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

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

Dung dịch acid adipic: Hoà tan 1 g acid adipic (UCB, Brussels, Bỉ hoặc tương đương) trong 900 ml nước ấm, làm nguội đến nhiệt độ phòng, pha tới 1.000 ml và lắc đều.

Dụng cụ, thiết bị:

Thiết bị sắc ký khí Hewlett-Packard Model 7620A hoặc tương đương được trang bị detector ion hoá ngọn lửa và Thiết bị phân tích Model 3370A.

Các thông số cột: làm bằng thép không rỉ có chiều dài 2 m, đường kính trong 1,83 mm, được nhồi bằng OV-17 5% trên Chromosorb GAW-DMCS 80 - 100 mesh (Alltech Europe, Inc., B 9731 Eke, Bỉ); luyện cột ở 350°C trong 24 giờ với tốc độ khí mang nitrogen 40 ml/phút. Các tốc độ dòng khí hoạt động (ml/phút): khí mang nitrogen là 30, hydrogen là 40, không khí là 400. Nhiệt độ: buồng bơm mẫu 280°C, detector 250°C, cột 140°C. Các thời gian lưu (phút): acid glutaric là 2,83; acid adipic là 4,5.

Hiệu chuẩn:

Cân và cho vào 4 bình bình tam giác dung tích 250 ml (1 g tinh bột ngô dạng sếp/bình). Thêm vào mỗi bình 50 ml nước và 1 ml dung dịch nước chứa 1 mg acid glutaric/ml. Thêm vào bình một 0,25 ml dung dịch nước chứa 1 mg acid adipic/ml, thêm vào 3 bình còn lại lần lượt 0,5; 0,75 và 1 ml. Mỗi bình sau đó chứa 1 mg acid glutaric và lần lượt là 0,25; 0,5; 0,75 và 1 mg acid adipic. Lắc mạnh các bình bằng tay để phân tán hoàn toàn tinh bột và thêm 50 ml dung dịch NaOH 4N. Tiếp tục lắc mạnh trong 5 phút, để mỗi bình trong chậu nước ở nhiệt độ môi trường và thêm cẩn thận 20 ml dung dịch HCl 12N cho mỗi bình. Khi mỗi bình nguội, chuyển toàn lượng hỗn hợp trong bình vào phễu chiết dung tích 250 ml. Chiết với 100 ml ethyl acetat tinh khiết. Rút lớp nước ở dưới vào một cốc vại; tập trung lớp dung môi hữu cơ phía trên vào một bình bình tam giác dung tích 500 ml chứa 20 g Na₂SO₄ khan. Chuyển phần tan trong nước quay trở lại phễu chiết và lặp lại chiết bằng ethyl acetat hai lần nữa. Lắc các bình định kỳ trong 10 phút và sau đó lọc qua giấy lọc Whatman số 1 vào trong các bình đáy tròn dung tích 1 lít. Rửa các bình và các cặn không hoà tan được lọc 2 lần bằng 50 ml ethyl acetat. Cô toàn bộ phần chiết hữu cơ và nước rửa của mỗi bình ở nhiệt độ không quá 40°C, áp suất chân không (50 mgHg) cho đến khi khô hoàn toàn.

Cô ethyl acetat nên được thực hiện càng nhanh càng tốt bởi vì dễ xảy ra các phản ứng thủy phân trong quá trình thực hiện. Các sản phẩm thủy phân làm giảm độ phân giải của acid adipic trong phân tách sắc ký.

Thêm lần lượt 2 ml pyridin và 1 ml N,N-Bis-trimethylsilyltrifluoroacetamid vào các thành phần khô. Đậy nắp từng bình đáy tròn và rửa bề mặt bên trong thật kỹ bằng cách lắc xoáy. Để yên các bình trong 1 giờ sau đó chuyển khoảng 2 ml từ mỗi bình vào các lọ thủy tinh nhỏ và đậy kín ngay lập tức. Bơm 4 µl vào thiết bị sắc ký khí.

Tính kết quả:

Xác định các thời gian lưu đối với mỗi acid và xác định chiều cao pic đối với acid glutaric và đối với mỗi nồng độ acid adipic. Vẽ đồ thị biểu diễn quan hệ

tuyến tính giữa tỷ lệ chiều cao pic của acid adipic/chiều cao pic của acid glutaric với hàm lượng acid adipic. Đường hiệu chuẩn này có thể được sử dụng nhưng đơn giản hơn sử dụng một hệ số đáp ứng (RF):

$$RF = \frac{H_1 \times W_s}{H_s}$$

Trong đó:

H_s và H_1 : Các chiều cao lần lượt của acid adipic chuẩn và acid glutaric;

W_s : Khối lượng acid adipic chuẩn

RF nên được kiểm tra mỗi tuần một lần.

Adipat tổng số:

Cân chính xác 1 g mẫu cho vào bình tam giác dung tích 250 ml, thêm vào 50 ml nước và 1 ml dung dịch tan trong nước có 1 mg acid glutaric/ml. Tiến hành như trong phần Hiệu chuẩn, bắt đầu "Lắc các bình bằng tay...".

Acid adipic tự do:

Cân chính xác 5 g mẫu cho bình tam giác dung tích 250 ml, thêm vào 100 ml nước và 1 ml dung dịch acid glutaric. Lắc mạnh trong 1 giờ, lọc qua dụng cụ lọc Milipore 0,45 μ m, thêm 1 ml dung dịch HCl đậm đặc vào phần lọc được và chuyển toàn lượng vào phễu chiết dung tích 250 ml. Tiến hành như trong phần Hiệu chuẩn, bắt đầu "Chiết với 100 ml...".

Tính kết quả:

Đối với cả hai phép định lượng ("Hàm lượng adipat tổng" và "Hàm lượng acid adipic tự do") ghi chiều cao các pic đối với acid adipic và acid glutaric (nội chuẩn). Tính hàm lượng lần lượt adipat tổng số và acid adipic tự do có trong mẫu theo công thức sau:

$$A = \frac{H_x \times RF}{H_{ix} \times S \times 10}$$

Trong đó:

A: Hàm lượng adipat tổng số hoặc acid adipic tự do (%)

H_x : Chiều cao pic của acid adipic trong dung dịch mẫu thực

H_{ix} : Chiều cao pic của acid glutaric trong dung dịch mẫu thực

RF: Hệ số đáp ứng đối với acid adipic

S: Khối lượng mẫu trong dung dịch mẫu thực (g)

Các nhóm adipat (%) = Hàm lượng adipat tổng số (%) – hàm lượng acid adipic tự do (%)

Các nhóm hydroxypropyl Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Thuốc thử Ninhydrin:

Dung dịch 3% tinh thể 1,2,3,-triketohydrinden trong dung dịch natri bisulfite 5% trong nước.

Cách tiến hành:

Cân chính xác 50 – 100 mg mẫu cho vào trong bình định mức dung tích 100 ml và thêm 25 ml dung dịch H₂SO₄ 1N. Chuẩn bị một mẫu tinh bột chưa biến tính có cùng nguồn gốc (tức là ngô hoặc khoai tây) trong cùng cách thực hiện. Đặt các bình trong cách thủy sôi và gia nhiệt cho đến khi các mẫu tạo thành dung dịch. Làm nguội và pha tới thể tích 100 ml bằng nước. Nếu cần thiết pha loãng mẫu hơn đảm bảo không được quá 4 mg nhóm hydroxypropyl/100 ml, sau đó pha mẫu trắng tinh bột tương ứng. Dùng pipet lấy 1 ml các dung dịch cho vào các ống thử định mức 25 ml có các nắp thủy tinh được ngâm trong nước lạnh, thêm từng giọt 8 ml dung dịch H₂SO₄ đậm đặc vào mỗi ống. Lắc đều và đặt các ống trong cách thủy sôi chính xác 3 phút. Chuyển ngay lập tức các ống vào chậu đá cho đến khi dung dịch lạnh. Thêm 0,6 ml ninhydrin, cẩn thận để cho thuốc thử chảy xuống theo thành của các ống thử. Lắc đều ngay lập tức và đặt các ống trong chậu nước 25°C trong 100 phút. Điều chỉnh thể tích trong mỗi ống tới 25 ml bằng acid H₂SO₄ và lắc ngược các ống vài lần. (Không được lắc). Ngay lập tức chuyển các phần của các dung dịch vào các công đo 1 cm và sau chính xác 5 phút đo độ hấp thụ (A) ở bước sóng 590 nm, sử dụng mẫu trắng tinh bột như là mẫu đối chứng. Chuẩn bị đường chuẩn bằng các phần 1 ml của các dung dịch chuẩn tan trong nước có 10, 20, 30, 40 và 50 µg propylen glycol/ml.

Tính kết quả:

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

Trong đó:

C: Hàm lượng propylen glycol trong dung dịch mẫu tính được dựa vào đường chuẩn (µg/ml)

F: Hệ số pha loãng (nếu cần một pha loãng hơn)

W: Khối lượng mẫu (mg)

Propylen clorhydrin

Được mô tả trong Cột 3 của Bảng 1.

Thiết bị sắc ký khí:

Sử dụng thiết bị Hewlett-Packard Model 5750 hoặc tương đương. Một thiết bị cột kép được trang bị detector ion hoá ngọn lửa. Một thiết bị tích phân là một phần của hệ thống ghi.

Cột sắc ký khí: Sử dụng cột thép không rỉ, dài 3 m, đường kính ngoài 3,2 mm, được nhồi 10% Carbowax 20M trên 80/100 mesh Gas Chrom 2, hoặc tương đương. Sau khi nhồi, trước khi sử dụng, luyện cột qua đêm trong điều kiện nhiệt độ 200°C, sử dụng dòng khí heli với tốc độ 25 ml/phút.

Dụng cụ cô đặc: Sử dụng dụng cụ cô đặc Kuderna-Danish có một bình dung tích 500 ml, có sẵn của Công ty Kontes Glass,.. Vineland, N.J., Mỹ, (Catalog số K-57000), hoặc tương đương.

Các bình áp lực: Sử dụng các bình áp lực dung tích 200 ml, có gioăng Neoprene, nắp đậy thủy tinh và gắn với một cái kẹp kim loại, có sẵn của Công ty Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, Mỹ. (Vitro 400, catalog số 3 – 100). hoặc tương đương.

Hoá chất, thuốc thử:

Diethyl ether: Sử dụng diethyl ether khan, tinh khiết dành cho phân tích.

Florisil: Sử dụng vật liệu 60/100 mesh, có sẵn của Công ty Floridin, 3 Penn Center, PA 15235, Mỹ, hoặc sản phẩm tương đương.

Propylen chlorohydrin: Sử dụng Eastman số P1325 1-Chloro-2-propanol thích hợp, chứa 25% 2-chloro-1-propanol, có sẵn của Công ty Eastman

Kodak, Rochester, N.Y.14650, Mỹ hoặc tương đương.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn: Lấy 25 μl hỗn hợp các đồng phân propylen chlorohydrin chứa 75% 1-chloro-2-propanol và 25% 2-chloro-1-propanol cho vào syringe (xylanh) dung tích 50 μl . Cân chính xác syringe và bơm một phần vào bình định mức dung tích 500 ml, đã chứa một phần nước. Cân lại syringe và ghi trọng lượng các chlorohydrin đã lấy. Pha tới thể tích 500 ml bằng nước và lắc đều. Dung dịch này chứa khoảng 27,5 mg hỗn hợp các chlorohydrin, hoặc khoảng 55 $\mu\text{g/ml}$. Chuẩn bị dung dịch này mới trong ngày sử dụng.

Chuẩn bị mẫu thử:

Cho 50 g mẫu đại diện đã được trộn vào Bình áp lực và thêm vào 125 ml dung dịch H_2SO_4 2N. Kẹp vị trí phía trên bình và lắc xoáy hỗn hợp cho đến khi mẫu được phân tán hoàn toàn. Đặt bình trong cách thủy sôi, gia nhiệt trong 10 phút sau đó lắc xoáy bình để trộn các thành phần, và gia nhiệt trong cách thủy thêm 15 phút nữa. Làm nguội trong không khí tới nhiệt độ phòng sau đó trung hoà mẫu thủy phân tới pH = 7 bằng dung dịch NaOH 25% và lọc qua giấy lọc Whatman số 1, hoặc tương đương, vào phễu Buchner, sử dụng lọc hút. Rửa bình và giấy lọc bằng 25 ml nước và tập hợp các nước rửa với phần lọc được. Thêm vào 30 g Na_2SO_4 khan và khuấy bằng máy khuấy từ trong 5 – 10 phút, hoặc cho đến khi Na_2SO_4 được hoà tan hoàn toàn. Chuyển dung dịch này vào một phễu tách dung tích 500 ml được trang bị với khoá teflon, rửa bình bằng 25 ml nước và tập hợp các nước rửa với dung dịch mẫu. Chiết với 5 phần x 50 ml diethyl ether, để ít nhất 5 phút trong mỗi quá trình chiết để tách pha hoàn toàn. Chuyển các phần dịch chiết ether vào dụng cụ cô đặc, đặt bình hứng chia độ của dụng cụ cô đặc trong cách thủy duy trì ở 50 – 55°C và cô đặc dịch chiết tới thể tích 4 ml.

(Chú ý: Dịch chiết ether của mẫu có thể chứa tạp chất lạ gây trở ngại đến phân tích và/hoặc biện giải ở các sắc đồ. Các tạp chất này là các sản phẩm được sinh ra trong quá trình thủy phân. Các khó khăn phân tích tạo ra bởi sự xuất hiện của các tạp chất đó có thể tránh được thông qua việc sử dụng biện pháp xử lý làm sạch sau:

Cô đặc dịch chiết ether tới 8 ml, thay vì 4 ml như đã đề cập ở trên. Thêm vào 10 g Florisil, trước đó được gia nhiệt đến 130°C trong 16 giờ ngay trước khi dùng, vào cột sắc ký có kích thước thích hợp, sau đó vỗ nhẹ và thêm vào 1 g Na_2SO_4 khan vào đỉnh trên của cột. Làm ẩm cột bằng 25 ml diethyl ether và chuyển toàn lượng dịch chiết cô đặc vào cột với sự trợ giúp của các phần nhỏ ether. Rửa giải bằng 3 phần x 25 ml ether, lấy tất cả phần rửa giải chuyển vào dụng cụ cô đặc và cô đặc đến 4 ml).

Làm nguội dịch chiết tới nhiệt độ phòng, chuyển toàn lượng vào bình định mức dung tích 5 ml với sự hỗ trợ của các phần nhỏ diethyl ether, pha tới thể tích 5 ml bằng ether và lắc đều.

Chuẩn bị mẫu đối chứng:

Chuyển các phần 50 g tinh bột ngô dạng sáp chưa biến tính (chưa được chuyển hoá) vào 5 bình áp lực riêng biệt và thêm vào mỗi bình 125 ml dung dịch H_2SO_4 2N. Thêm 0; 0,5; 1; 2 và 5 ml dung dịch chuẩn lần lượt vào các bình, để có được các nồng độ propylen chlorohydrin so với tinh bột lần lượt là 0; 0,5; 1; 2 và 5 mg/kg. Tính nồng độ chính xác trong mỗi bình từ trọng lượng các propylen chlorohydrin đã sử dụng trong cách làm Chuẩn bị dung dịch chuẩn. Kẹp vào vị trí đầu bình, lắc xoáy cho đến khi các chất trong mỗi bình được hoà tan hoàn toàn, tiến hành thủy phân, trung hoà, lọc, chiết, cô phần dịch chiết và cuối cùng pha như hướng dẫn trong phần Chuẩn bị mẫu thử.

Cách tiến hành:

Các điều kiện vận hành có thể khác nhau phụ thuộc vào thiết bị cụ thể sử dụng, nhưng sắc đồ phù hợp thu được bằng thiết bị Hewlett-Packard Model 5750 sử dụng nhiệt độ cột 110°C đẳng nhiệt; nhiệt độ cổng bơm 210°C; nhiệt độ detector 240°C; tốc độ dòng khí hydrogen 30 ml/phút; tốc độ dòng khí heli 25 ml/phút, hoặc tốc độ không khí 350 ml/phút như khí mang. Có bộ ghi đến 1 mV; tốc độ sắp xếp, làm loãng và giấy ghi được lựa chọn để tối ưu hoá các đặc tính tín hiệu. Bơm các phần 2 μl của mỗi dịch chiết cô đặc được chuẩn bị theo hướng dẫn trong phần Chuẩn bị mẫu đối chứng, để thời

gian đủ giữa các lần bơm đối với các pic tín hiệu tương ứng với hai đồng phân chlorohydrin ghi được (và tích phân được) và cột được làm sạch. Ghi và tính tổng các diện tích tín hiệu (thiết bị phân tích tín hiệu ra) từ hai đồng phân chlorohydrin đối với mỗi mẫu đối chứng. Sử dụng các điều kiện hoạt động thống nhất, bơm 2 μ l phần chiết cô đặc chuẩn bị theo hướng dẫn trong phần Chuẩn bị mẫu thử, ghi và tính tổng các diện tích tín hiệu (thiết bị phân tích tín hiệu ra) từ mẫu thử.

Tính kết quả:

Chuẩn bị đồ thị đường chuẩn trên giấy bằng cách vẽ các diện tích tín hiệu tổng của mỗi mẫu đối chứng với các nồng độ propylen chlorohydrin (mg/kg), xuất phát từ trọng lượng thực của đồng phân chlorohydrin sử dụng. Sử dụng các diện tích tín hiệu tổng tương ứng với 1-chloro-2-propanol và 2-chloro-1-propanol từ mẫu thử, xác định nồng độ của hỗn hợp các propylen chlorohydrin (mg/kg) trong mẫu thử liên quan tới đồ thị đường chuẩn xuất phát từ các mẫu đối chứng. Sau khi có được kinh nghiệm về cách tiến hành và biểu thị được đồ thị đường chuẩn từ các mẫu đối chứng tuyến tính và lặp lại, số mẫu đối chứng có thể được giảm đến một mẫu có chứa khoảng 5 mg/kg hỗn hợp các đồng phân propylen chlorohydrin. Hàm lượng propylen chlorohydrin trong mẫu khi đó có thể được tính theo công thức sau:

$$\text{Propylene chlorohydrins (mg / kg)} = \frac{C \times a}{A}$$

Trong đó:

C: Nồng độ (mg/kg) của các propylen chlorohydrin (tổng của các đồng phân) trong mẫu đối chứng

a: Tổng diện tích tín hiệu được tạo ra bởi các đồng phân propylen chlorohydrin trong mẫu thử

A: Tổng diện tích tín hiệu được tạo ra bởi các đồng phân propylen chlorohydrin trong đối chứng

Độ ester hóa của natri octenyl succinat tinh bột

Nguyên tắc:

Độ ester hóa được xác định bởi lượng kiềm tiêu thụ sau khi acid hoá và rửa kỹ monoester của acid octenylsuccinic với tinh bột.

Cách tiến hành:

Cân và cho 5 g mẫu vào cốc dung tích 150 ml. Làm ẩm bằng một vài ml isopropyl alcol tinh khiết. Dùng pipet thêm vào 25 ml dung dịch HCl 2,5N trong isopropanol, dùng acid để rửa mẫu bám trên thành cốc. Khuấy trong 30 phút bằng máy khuấy từ. Thêm vào 100 ml isopropanol 90% từ ống đong chia độ. Khuấy trong 10 phút. Lọc mẫu qua phễu Buchner và rửa bánh lọc bằng isopropanol 90% cho đến khi dịch lọc thu được không còn ion clorid. Sử dụng AgNO₃ 0,1N để kiểm tra các ion clorid. Chuyển bánh lọc vào cốc dung tích 600 ml và rửa nhẹ phễu Buchner để rửa tinh bột trong cốc. Thêm nước cất vào cho đến thể tích 300 ml. Đặt trong cách thủy sôi có khuấy trong 10 phút. Chuẩn độ trong khi còn nóng bằng dung dịch NaOH 0,1N cho đến điểm kết thúc được phát hiện bằng phenolphthalein.

Kết quả:

$$\text{Độ ester hóa (DS)} = \frac{0,162 \times A}{1 - 0,210 \times A}$$

Trong đó:

A: số mili đương lượng của NaOH sử dụng/g octenyl succinat tinh bột

Dư lượng acid octenyl succinic trong natri octenyl succinat tinh bột

Chiết xuất và chuẩn bị dung dịch mẫu:

Chiết xuất khoảng 500 mg tinh bột với 15 ml methanol qua đêm với lắc thường xuyên (cân chính xác lượng tinh bột). Lọc hỗn hợp chiết. Rửa tinh bột trên dụng cụ lọc bằng 7 ml methanol. Lặp lại 3 lần. Tập hợp các phần dịch lọc (khoảng 80% dư lượng được chiết xuất bởi cách làm này). Thêm vào các phần dịch chiết thu được 1 ml KOH 0,16N trong methanol. Làm khô các phần dịch chiết thu được bằng thiết bị cô nhanh ở 30°C. Hoà tan cạn thu được trong 2 ml methanol. Lấy 0,5 ml dung dịch cạn cho vào lọ phản ứng. Thêm vào lọ phản ứng 0,5 ml thuốc thử tạo dẫn xuất (2,8 g 2-p-dibromoacetophenon và 0,28 g 18-Crown-6 trong 50 ml CH₃CN). Thêm 2 ml CH₃CN vào lọ phản ứng. Đậy nắp kín lọ phản ứng và gia nhiệt ở 80°C trong 30 phút. Làm nguội dung dịch phản ứng đến nhiệt độ phòng (sử dụng trong 24 giờ).

Phân tích sắc ký lỏng:

- Cột: Micro-Bondapark C₁₈ (Waters) hoặc tương đương

- Pha động: rửa giải Gradient methanol 70% trong nước đến methanol 80% trong nước trong 5 phút. Đường 6 (thiết bị lập trình dung môi Waters 660).

Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút

Detector: UV tại bước sóng 254 nm, độ tắt dần 0,16 AUFS

Thể tích bơm: 5 µl

Chuẩn bị đường chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch natri octenyl succinat 0,5 M (Dung dịch A). Lấy 0,25 ml Dung dịch A bằng syringe cho vào bình định mức dung tích 25 ml. Pha tới 25 ml bằng methanol (Dung dịch B). Chuẩn bị ba chuẩn hiệu chuẩn bằng cách lấy 0,5; 1 và 2 ml Dung dịch B cho vào 3 bình đáy tròn dung tích 50 ml. Thêm vào mỗi bình 1 ml dung dịch KOH 0,16N trong methanol. Làm khô mỗi dung dịch bằng thiết bị cô nhanh ở 30°C. Hoà tan cạn thu được trong 2 ml methanol (Dung dịch C₁, C₂ và C₃). Cho 0,5 ml dung dịch cạn vào lọ phản ứng. Thêm 0,5 ml thuốc thử tạo dẫn xuất (2,8 g 2-p-dibromoacetophenon và 0,28 g 18-Crown-6 trong 50 ml CH₃CN) vào lọ phản ứng. Thêm vào 2 ml CH₃CN. Đậy nắp kín và gia nhiệt tới 80°C trong 30 phút. Làm nguội dung dịch phản ứng đến nhiệt độ phòng (chất dẫn xuất nên được chuẩn bị khi cần và sử dụng ngay). Bơm 5 µl vào thiết bị sắc ký lỏng. Hàm lượng chất tồn dư trong mỗi lần bơm 5 µl như sau:

Đối với Dung dịch C₁ 0,2375 µg

Đối với Dung dịch C₂ 0,4750 µg

Đối với Dung dịch C₃ 0,9500 µg

Vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa chiều cao pic thu được từ trên sắc ký đồ với µg chất tồn dư/5 ml dung dịch.

Tính kết quả:

Chuẩn bị đường chuẩn dựa vào cách tiến hành. Sử dụng chiều cao pic của mẫu chưa biết từ sắc ký đồ, xác định hàm lượng chất tồn dư (tính theo acid octenyl succinic) trong thể tích bơm từ đường chuẩn.

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

Ghi chú: Công thức này được hiệu chỉnh về độ thu hồi 100% bằng cách chia cho 0,80; do vậy $240/0,80 = 300$.