



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

**QCVN 4 - 21: 2011/BYT**

**QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA  
VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT LÀM DÀY**

*National technical regulation on Food Additive – Thickeners*

**HÀ NỘI - 2011**

**Lời nói đầu**

QCVN 4-21:2011/BYT do *Ban soạn thảo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về Phụ gia thực phẩm và chất hỗ trợ chế biến* biên soạn, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm trình duyệt và được ban hành theo Thông tư số 01/2011/TT-BYT ngày 13 tháng 01 năm 2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế.

# **QUY CHUẨN KỸ THUẬT QUỐC GIA VỀ PHỤ GIA THỰC PHẨM - CHẤT LÀM DÀY**

## ***National technical regulation on Food Additive – Thickeners***

### **I. QUY ĐỊNH CHUNG**

#### **1. Phạm vi điều chỉnh**

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

#### **2. Đối tượng áp dụng**

Quy chuẩn này áp dụng đối với:

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

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

#### **3. Giải thích từ ngữ và chữ viết tắt:**

3.1. Chất làm dày: là phụ gia thực phẩm được sử dụng để làm tăng độ nhớt của thực phẩm.

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

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

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

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

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

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

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

- 1.1. Phụ lục 1: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với acid alginic
- 1.2. Phụ lục 2: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với kali alginat
- 1.3. Phụ lục 3 : Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với amoni alginat
- 1.4. Phụ lục 4: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với calci alginat
- 1.5. Phụ lục 5: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với propylen glycol alginat
- 1.6. Phụ lục 6: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với agar
- 1.7. Phụ lục 7: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với carrageenan và muối Na, K, NH<sub>4</sub> của nó
- 1.8. Phụ lục 8: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm đậu Carob
- 1.9. Phụ lục 9: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm guar
- 1.10. Phụ lục 10: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm tragacanth
- 1.11. Phụ lục 11: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm arabic
- 1.12. Phụ lục 12: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm xanthan
- 1.13. Phụ lục 13: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm karaya
- 1.14. Phụ lục 14: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm tara
- 1.15. Phụ lục 15: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gôm gellan
- 1.16. Phụ lục 16: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với pectin
- 1.17. Phụ lục 17: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với methyl cellulose
- 1.18. Phụ lục 18: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với methyl ethyl cellulose
- 1.19. Phụ lục 19: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với natri carboxymethyl cellulose

1.20. Phụ lục 20: Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử đối với gelatin thực phẩm

2. Các yêu cầu kỹ thuật quy định trong Quy chuẩn này được thử theo JECFA monograph 1 - Vol. 4, ngoại trừ một số phép thử riêng được mô tả trong các phụ lục. Các phương pháp thử được hướng dẫn trong Quy chuẩn này không bắt buộc phải áp dụng, có thể sử dụng các phương pháp thử khác có giá trị 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 chất làm dày phải được công bố phù hợp với các quy định tại Quy chuẩn này.

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

#### 2. Kiểm tra đối với chất làm dày

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

### IV. TRÁCH NHIỆM CỦA TỔ CHỨC, CÁ NHÂN

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

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

## **V. TỔ CHỨC THỰC HIỆN**

- 1.** Giao Cục An toàn vệ sinh thực phẩm chủ trì, phối hợp với các cơ quan chức năng có liên quan hướng dẫn triển khai và tổ chức việc thực hiện Quy chuẩn này.
- 2.** Căn cứ vào yêu cầu quản lý, Cục An toàn vệ sinh thực phẩm có trách nhiệm kiến nghị Bộ Y tế sửa đổi, bổ sung Quy chuẩn này.
- 3.** Trường hợp hướng dẫn của quốc tế về phương pháp thử và các quy định của pháp luật viện dẫn trong Quy chuẩn này được sửa đổi, bổ sung hoặc thay thế thì áp dụng theo văn bản mới.

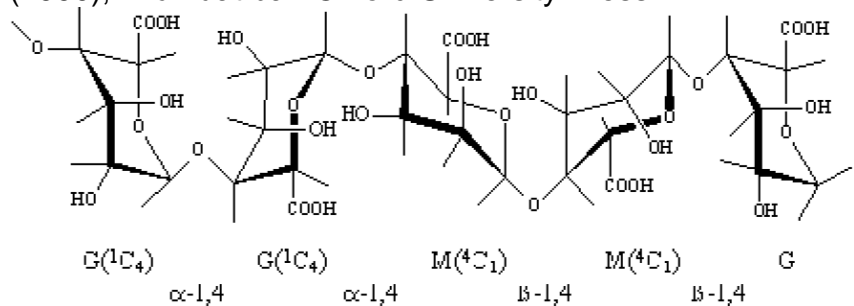
**Phụ lục 1**  
**YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ**  
**ĐỐI VỚI ACID ALGINIC**

- 1. Tên khác, chỉ số** Alginic acid  
INS 400  
ADI "Không giới hạn"
- 2. Định nghĩa** Acid alginic tự nhiên thu được bằng cách thủy phân keo polysaccharid từ các loài rong biển nâu (*Phaeophyceae*). Nó là một polymer mạch thẳng gồm chủ yếu các monomer của acid  $\beta$ -1,4-D-mannuronic và acid  $\alpha$ -1,4-L-glucuronic. Các monomer này thường được sắp xếp thành các khối homopolymer cách nhau bởi các vùng 2 monomer acid tuần tự xen kẽ nhau.

Chỉ số C.A.S. 9005-32-7

Công thức hóa học  $(C_6H_8O_6)_n$

Công thức cấu tạo do Phillips, Wedlock and Williams công bố trong Gums and Stabilizers for the Food Industry 5 (1990), nhà xuất bản Oxford University Press.



Số lượng và thứ tự của các phần mannuronat và gluconat có thể thay đổi trong alginat tự nhiên. Công thức trên chưa thể hiện sự kết hợp với nước.

Khối lượng phân tử Đơn vị cấu trúc: 176,13 (lý thuyết); 200 (trung bình thực tế).  
Đại phân tử: 10.000-600.000 (trung bình điển hình)

**3. Cảm quan** Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.

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

**5. Yêu cầu kỹ thuật**

5.1. Định tính

*pH* Huyền phù mẫu thử 0,3/10 có pH trong khoảng 2,0 - 3,5.

*Tạo kết tủa với amoni sulfat* Phải có phản ứng tạo kết tủa với amoni sulfat đặc trưng.

*Alginat* Phải có phản ứng đặc trưng của alginat.

5.2. Độ tinh khiết

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15% (Sấy tại 105° trong 4 giờ).
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 8% tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Chất không tan trong natri hydroxyd</i>	Không được quá 2% tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Arsen</i>	Không được quá 3,0 mg/kg.
<i>Chì</i>	Không được quá 5,0 mg/kg.
<b>5.3 Các yêu cầu về vi sinh vật</b>	
<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10 <sup>-1</sup> bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng hóa bằng máy nghiền cao tốc.
<i>Tổng số nấm men-mốc</i>	Không được quá 500 khuẩn lạc/g
<i>Coliforms</i>	Âm tính
<i>Salmonella</i>	Âm tính
<b>5.4. Hàm lượng</b> (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Chế phẩm khan chứa không thấp hơn 20,0% và không được quá 23,0% CO <sub>2</sub> tương đương với không thấp hơn 91,0% và không được quá 104,5% acid alginic (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> .
<b>6. Phương pháp thử</b>	
<b>6.1. Định tính</b>	
<i>Tạo kết tủa với amoni sulfat</i>	Thêm dung dịch amoni sulfat bão hòa vào dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/2 thể tích dịch thử. Không được có kết tủa. Phép thử này phân biệt acid alginic với thạch, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gôm carob bean, methyl cellulose, pectin de-ester hóa, tinh bột.
<i>Alginat</i>	Hòa tan 0,1 g mẫu thử với 0,15 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N. Thêm 1 ml dung dịch sắt (III) sulfat (TS). Trong 5 phút, màu đỏ anh đào sẽ xuất hiện và đậm dần thành màu tím sẫm.
<b>6.2. Độ tinh khiết</b>	
<i>Chất không tan trong natri hydroxyd</i>	Cân khoảng 1 g (chính xác đến mg) mẫu thử, hòa tan trong 100 ml dung dịch natri hydroxyd (TS), ly tâm, gạn lấy phần không tan. Rửa cặn 5 lần bằng nước, ly tâm hoặc gạn bỏ nước rửa. Dùng nước chuyển phần không tan vào phễu lọc thủy tinh đã cân bì, sấy tại 105° trong 1 giờ, để nguội và cân. Tính hàm lượng % theo khối lượng chế phẩm đã được làm khô.



*Arsen*

Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. (phương pháp II)

*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.

### 6.3. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25 N sử dụng tương đương với 5,5 mg carbon dioxyd hoặc 25 mg acid alginic (tương đương khối lượng 200).

**Phụ lục 2**  
**YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ**  
**ĐỐI VỚI KALI ALGINAT**

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	INS 402 ADI "Không giới hạn"
<b>2. Định nghĩa</b>	Muối Kali của acid alginic
<i>Chỉ số C.A.S.</i>	9005-36-1
<i>Công thức hóa học</i>	$(C_6H_7KO_6)_n$
<i>Công thức cấu tạo</i>	Công thức cấu tạo do Phillips, Wedlock and Williams công bố trong <i>Goms and Stabilizers for the Food Industry 5</i> (1990), nhà xuất bản Oxford University Press.
	<p style="text-align: center;"> <math>\text{--- G}^{(1C_4)} \text{---}_{\alpha-1,4} \text{G}^{(1C_4)} \text{---}_{\alpha-1,4} \text{M}^{(4C_1)} \text{---}_{\beta-1,4} \text{M}^{(4C_1)} \text{---}_{\beta-1,4} \text{G}</math> </p>
	Số lượng và thứ tự của các phần mannuronat và gluconat có thể thay đổi trong alginat tự nhiên. Công thức trên chưa thể hiện sự kết hợp với nước.
<i>Khối lượng phân tử</i>	Đơn vị cấu trúc : 214,22 (lý thuyết); 238 (trung bình thực tế). Đại phân tử: 10000-600000 (trung bình điển hình)
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.
<b>4. Chức năng</b>	Chất ổn định, chất làm dày, chất tạo gel, chất nhũ hóa
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Tan chậm trong nước, tạo ra dung dịch nhớt. Không tan trong ethanol và ether.
<i>Tạo kết tủa với calci clorid</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với calci clorid đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa với amoni sulfat</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với amoni sulfat đặc trưng.
<i>Alginat</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của alginat.
<i>Kali</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của kali.
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Giảm khối lượng khi sấy</i>	Không được quá 15% (Sấy tại 105° trong 4 giờ).

*khô*

*Chất không tan trong nước* Không được quá 2% tính theo chế phẩm đã làm khô.

*Arsen* Không được quá 3,0 mg/kg.

*Chì* Không được quá 5,0 mg/kg

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

*Tổng số vi sinh vật hiếu khí* Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng  $10^{-1}$  bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.

*Tổng số nấm men-mốc* Không được quá 500 khuẩn lạc/g

*Coliforms* Âm tính

*Salmonella* Âm tính

5.4. Hàm lượng  $(C_6H_7KO_6)_n$  Chế phẩm khan chứa không thấp hơn 16,5% và không được quá 19,5%  $CO_2$  tương đương với không thấp hơn 89,2% và không được quá 105,5% kali alginat  $(C_6H_7KO_6)_n$ .

## 6. Phương pháp thử

### 6.1. Định tính

*Tạo kết tủa với calci clorid* Thêm dung dịch calci clorid 2,5% vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/5 thể tích dịch thử. Xuất hiện tủa khối lớn dạng keo. Phép thử này phân biệt calci alginat với gôm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gôm ghatti, gôm karaya, gôm carob bean, methyl cellulose, gôm tragacanth.

*Tạo kết tủa với amoni sulfat* Thêm dung dịch amoni sulfat bão hòa vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/2 thể tích dịch thử. Không được xuất hiện tủa. Phép thử này phân biệt calci alginat với thạch, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, pectin de-este hóa, gelatin, gôm carob bean, methyl cellulose và tinh bột.

*Alginat* Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

*Kali* Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

### 6.2. Độ tinh khiết

*Chất không tan trong nước* Cân 2 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu, phân tán vào 800 ml nước trong bình 2000 ml. Trung hòa tới pH 7 bằng dung dịch natri hydroxyd (TS) và thêm dư 3 ml. Thêm 40 ml dung dịch hydrogen peroxyd 30% (kl/kl), đậy bình và đun trong khoảng

1 giờ, khuấy thường xuyên. Lọc nóng qua một chén lọc Gooch có màng lọc bằng xơ thủy tinh đã cân bì (2,4 cm, No 934 AH, Reeve Angel & Co, Clifton, N.Y., USA hoặc tương đương). Nếu quá trình lọc bị chậm do dung dịch mẫu có độ nhớt cao, đun sôi đến khi độ nhớt giảm đến mức có thể lọc được. Rửa chén lọc bằng nước nóng, sấy chén lọc và phần không tan tại 105° trong 1 giờ, để nguội và cân. Tính hàm lượng % của phần không tan đã sấy khô.

*Arsen*

Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 (phương pháp II).

*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.

6.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4.

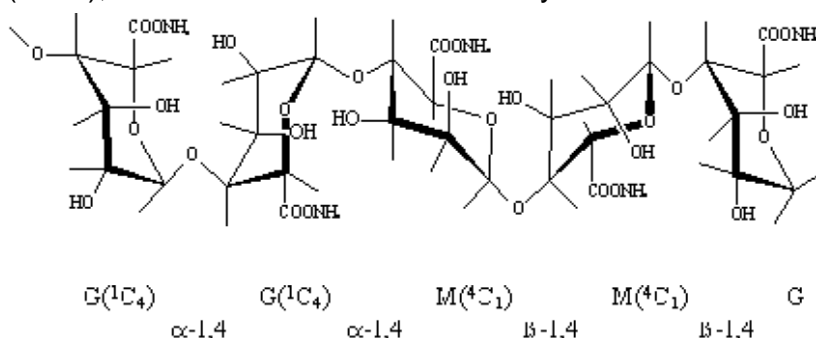
6.4. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25 N sử dụng tương đương với 5,5 mg carbon dioxyd hoặc 29,75 mg kali alginat (tương đương khối lượng 238).

**Phụ lục 3**  
**YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ**  
**ĐỐI VỚI AMONI ALGINAT**

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	INS 403 ADI "Không giới hạn"
<b>2. Định nghĩa</b>	Muối Amoni của acid alginic
<i>Chỉ số C.A.S.</i>	9005-34-9
<i>Công thức hóa học</i>	$(C_6H_{11}NO_6)_n$
<i>Công thức cấu tạo</i>	Công thức cấu tạo do Phillips, Wedlock and Williams công bố trong <i>Gums and Stabilizers for the Food Industry 5</i> (1990), nhà xuất bản Oxford University Press.



Số lượng và thứ tự của các phần mannuronat và gluconat có thể thay đổi trong alginat tự nhiên. Công thức trên chưa thể hiện sự kết hợp với nước.

<i>Khối lượng phân tử</i>	Đơn vị cấu trúc : 193,16 (lý thuyết); 217 (trung bình thực tế). Đại phân tử: 10000-600000 (trung bình điển hình)
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.
<b>4. Chức năng</b>	Chất ổn định, chất làm dày, chất tạo gel, chất nhũ hóa
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Tan chậm trong nước, tạo ra dung dịch nhớt. Không tan trong ethanol và ether.
<i>Tạo kết tủa với calci clorid</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với calci clorid đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa với amoni sulfat</i>	Phải có phản ứng tạo kết quả với amoni sulfat đặc trưng.
<i>Alginat</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của alginat.
<i>Amoni</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của amoni.
5.2. Độ tinh khiết	

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15% (Sấy tại 105° trong 4 giờ).
<i>Chất không tan trong nước</i>	Không được quá 2% tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 7,0% tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
<b>5.3 Các yêu cầu về vi sinh vật</b>	
<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10 <sup>-1</sup> bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.
<i>Tổng số nấm men-mốc</i>	Không được quá 500 khuẩn lạc/g
<i>Coliforms</i>	Âm tính
<i>Salmonella</i>	Âm tính
<b>5.4. Hàm lượng (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>6</sub>)<sub>n</sub></b>	Chế phẩm đã làm khô chứa không thấp hơn 18% và không được quá 21% CO <sub>2</sub> tương đương với không thấp hơn 88,7% và không được quá 103,6% amoni alginat (C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> .

## **6. Phương pháp thử**

### **6.1. Định tính**

<i>Tạo kết tủa với calci clorid</i>	Thêm dung dịch calci clorid 2,5% vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/5 thể tích dịch thử. Xuất hiện tủa khối lớn dạng keo. Phép thử này phân biệt calci alginat với gôm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gôm ghatti, gôm karaya, gôm carob bean, methyl cellulose, gôm tragacanth.
<i>Tạo kết tủa với amoni sulfat</i>	Thêm dung dịch amoni sulfat bão hòa vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/2 thể tích dịch thử. Không được xuất hiện tủa. Phép thử này phân biệt calci alginat với thạch, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, pectin de-este hóa, gelatin, gôm carob bean, methyl cellulose và tinh bột.
<i>Alginat</i>	Hòa tan 0,1 g mẫu thử với 0,15 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N, lắc kỹ để mẫu thử tan càng nhiều càng tốt. Thêm 1 ml dung dịch sắt(III) sulfat (TS). Trong 5 phút, màu đỏ hồng anh đào sẽ xuất hiện và đậm dần thành màu tím sẫm.
<i>Amoni</i>	Thử theo hướng dẫn tại <i>JECFA monograph 1 - Vol.4</i> .

### **6.2. Độ tinh khiết**

*Chất không tan trong nước*

Cân 2 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu, phân tán vào 800 ml nước trong bình dung tích 2000 ml. Trung hòa tới pH 7 bằng dung dịch natri hydroxyd (TS) và thêm dư 3 ml. Thêm 40 ml dung dịch hydrogen peroxyd 30% (kl/kl), đậy bình và đun trong khoảng 1 giờ, khuấy thường xuyên. Lọc nóng qua một chén lọc Gooch có màng lọc bằng xơ thủy tinh đã cân bì (2,4 cm, Nò 934 AH, Reeve Angel & Co, Clifton, N.Y., USA hoặc tương đương). Nếu quá trình lọc bị chậm do dung dịch mẫu có độ nhớt cao, đun sôi đến khi độ nhớt giảm đến mức có thể lọc được. Rửa chén lọc bằng nước nóng, sấy chén lọc và phần không tan tại 105° trong 1 giờ, để nguội và cân. Tính hàm lượng % của phần cặn không tan đã sấy khô.

*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.

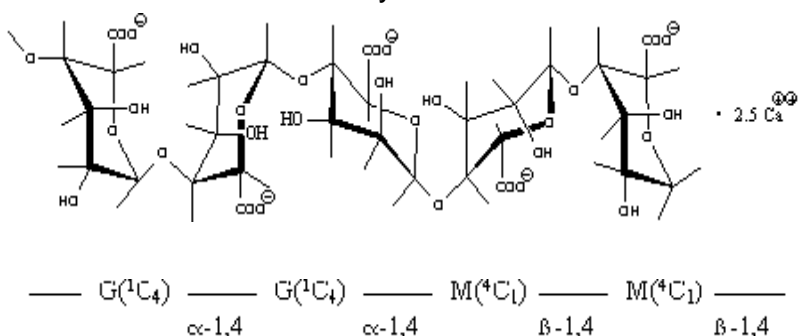
### 6.3. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25 N sử dụng tương đương với 5,5 mg carbon dioxyd.

**Phụ lục 4**  
**YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ**  
**ĐỐI VỚI CALCI ALGINAT**

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	INS 404 ADI "Không giới hạn"
<b>2. Định nghĩa</b>	Muối calci của acid alginic
<i>Chỉ số C.A.S.</i>	9005-35-0
<i>Công thức hóa học</i>	$(C_6H_7Ca_{1/2}O_6)_n$
<i>Công thức cấu tạo</i>	Công thức cấu tạo do Phillips, Wedlock and Williams công bố trong Gôm and Stabilizers for the Food Industry 5 (1990), nhà xuất bản Oxford University Press.



Số lượng và thứ tự của các phần mannuronat và gluconat có thể thay đổi trong alginat tự nhiên. Công thức trên chưa thể hiện sự kết hợp với nước.

<b>Khối lượng phân tử</b>	Đơn vị cấu trúc : 195,16 (lý thuyết); 219 (trung bình thực tế). Đại phân tử: 10.000-600.000 (trung bình điển hình)
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.
<b>4. Chức năng</b>	Chất ổn định, chất làm dày, chất tạo gel, chất nhũ hóa
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Không tan trong nước và ether. Ít tan trong ethanol, tan chậm trong dung dịch natri polyphosphat, natri carbonat và các chất kết hợp với ion calci
<i>Tạo kết tủa với calci clorid</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với calci clorid đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa với amoni sulfat</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với amoni sulfat đặc trưng.
<i>Alginat</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của alginat.
<i>Calci</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của calci.
5.2. Độ tinh khiết	



<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15% (Sấy tại 105° trong 4 giờ).
<i>Arsen</i>	Không được quá 3,0 mg/kg. (thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - phương pháp II).
<i>Chì</i>	Không được quá 5,0 mg/kg.
<b>5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật</b>	
<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng 10 <sup>-1</sup> bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.
<i>Tổng số nấm men-mốc</i>	Không được quá 500 khuẩn lạc/g

*Coliforms* Âm tính

*Salmonella* Âm tính

**5.4. Hàm lượng**  
(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>Ca<sub>1/2</sub>O<sub>6</sub>)<sub>n</sub> Không thấp hơn 18,0% và không được quá 21,0% CO<sub>2</sub> tương đương với không thấp hơn 89,6% và không được quá 104,5% calci alginat (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>Ca<sub>1/2</sub>O<sub>6</sub>)<sub>n</sub> tính theo chế phẩm khan.

## **6. Phương pháp thử**

### **6.1. Định tính**

*Tạo kết tủa với calci clorid* Thêm dung dịch calci clorid 2,5% vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/5 thể tích dịch thử. Xuất hiện tủa khối lớn dạng keo. Phép thử này phân biệt calci alginat với gồm arabic, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, gelatin, gồm ghatti, gồm karaya, gồm carob bean, methyl cellulose, gồm tragacanth.

*Tạo kết tủa với amoni sulfat* Thêm dung dịch amoni sulfat bão hòa vào dịch thử là dung dịch mẫu thử 0,5% trong dung dịch natri hydroxyd (TS), với thể tích bằng 1/2 thể tích dịch thử. Không được xuất hiện tủa. Phép thử này phân biệt calci alginat với thạch, natri carboxymethyl cellulose, carragenan, pectin de-este hóa, gelatin, gồm carob bean, methyl cellulose và tinh bột.

*Alginat* Hòa tan 0,1 g mẫu thử với 0,15 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N, lắc kỹ để mẫu thử tan càng nhiều càng tốt. Thêm 1 ml dung dịch sắt(III) sulfat (TS). Trong 5 phút, màu đỏ hồng anh đào sẽ xuất hiện và đậm dần thành màu tím sẫm.

*Calci* Thử theo hướng dẫn tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

### **6.2. Độ tinh khiết**

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

*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.

### 6.3. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25 N sử dụng tương đương với 5,5 mg carbon dioxyd hoặc 27,38 mg calci alginat (tương đương khối lượng 219).

## Phụ lục 5

**YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ  
ĐỐI VỚI PROPYLEN GLYCOL ALGINAT**

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	Ester của acid alginic với 1,2-propan-diol; Hydroxylpropyl alginat; Propan-1,2-diol alginat INS 405 ADI "không giới hạn"
<b>2. Định nghĩa</b>	Là ester của acid alginic, trong đó một số nhóm carboxyl bị ester hóa với propylen glycol, một số khác trung hòa với kiềm còn lại là tự do.
<i>Chỉ số C.A.S.</i>	9005-37-2
<i>Công thức hóa học</i>	$(C_9H_{14}O_7)_n$ (đã ester hóa)
<i>Khối lượng phân tử</i>	Đơn vị cấu trúc: 234,21 (lý thuyết). Đại phân tử: 10000-600000 (trung bình điển hình)
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng hạt, bột hoặc sợi mảnh màu trắng đến vàng nâu.
<b>4. Chức năng</b>	Chất ổn định, chất làm dày, chất nhũ hóa.
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Tan trong nước, tạo ra dung dịch nhớt, keo. Tan trong hỗn hợp dung môi ethanol/nước đến 60% tùy thuộc mức độ ester hóa.
<i>Tạo kết tủa với acid sulfuric</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với acid sulfuric đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa với chì acetat</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với chì acetat đặc trưng.
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 20% (Thử theo hướng dẫn trong <i>JECFA monograph 1 - Vol.4 - Sấy tại 105° trong 4 giờ</i> ).
<i>Chất không tan trong nước</i>	Không được quá 2% tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Tổng propylen glycol</i>	Không thấp hơn 15% và không được quá 45%
<i>Propylen glycol tự do</i>	Không được quá 15%
<i>Arsen</i>	Không được quá 3,0 mg/kg.
<i>Chì</i>	Không được quá 5,0 mg/kg.
5.3. Các yêu cầu về vi	

sinh vật

*Tổng số vi sinh vật hiếu khí* Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng  $10^{-1}$  bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.

*Tổng số nấm men-mốc* Không được quá 500 khuẩn lạc/g

*Coliforms* Âm tính

*Salmonella* Âm tính

5.3. Hàm lượng CO<sub>2</sub> Chế phẩm khan chứa không thấp hơn 16% và không được quá 20% CO<sub>2</sub>

## 6. Phương pháp thử

### 6.1. Định tính

*Tạo kết tủa với acid sulfuric* Lấy 10 ml dung dịch mẫu thử 1%, thêm 1 ml dung dịch natri hydroxyd (TS). Đun nóng trong bể cách thủy nước sôi trong 5 phút, làm nguội và thêm 1 ml dung dịch acid sulfuric loãng (TS). Xuất hiện kết tủa dạng keo.

*Tạo kết tủa với chì acetat* Lấy 5 ml dung dịch mẫu thử 1%, thêm 1 ml dung dịch chì acetat (TS). Xuất hiện kết tủa dạng keo.

### 6.2. Độ tinh khiết

*Giảm khối lượng khi sấy khô* - Thử theo hướng dẫn trong *JECFA monograph 1 - Vol.4*  
- Sấy tại 105°C trong 4 giờ.

*Chất không tan trong nước* Cân 2 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu, phân tán vào 800 ml nước trong bình 2000 ml. Trung hòa tới pH 7 bằng dung dịch natri hydroxyd (TS) và thêm dư 3 ml. Thêm 40 ml dung dịch hydrogen peroxyd 30% (kl/kl), đậy bình và đun trong khoảng 1 giờ, khuấy thường xuyên. Lọc nóng qua một chén lọc Gooch có màng lọc bằng xơ thủy tinh đã cân bì (2,4 cm, No 934 AH, Reeve Angel & Co, Clifton, N.Y., USA hoặc tương đương). Nếu quá trình lọc bị chậm do dung dịch mẫu có độ nhớt cao, đun sôi đến khi độ nhớt giảm đến mức có thể lọc được. Rửa chén lọc bằng nước nóng, sấy chén lọc và phần không tan tại 105°C trong 1 giờ, để nguội và cân. Tính hàm lượng % của phần không tan đã sấy khô.

*Tổng propylen glycol*

Dịch thử:

Cân 1 g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu thử đã được làm khô, hòa tan trong 100 ml nước cất trong cốc 400 ml. Sau khi đã tan hoàn toàn thêm 50 ml dung dịch natri hydroxyd 0,1 N và khuấy đều trong 30 phút, cuối cùng trung hòa bằng acid hydrochloric 0,1 N và rửa gôm bằng 25 ml dung dịch natri clorid 5%. Lọc dung dịch, sử dụng giấy lọc nhanh, thu dịch lọc vào bình định mức 250 ml, rửa rửa vài lần bằng nước cất, gộp dịch rửa vào dịch lọc và pha loãng đến vạch bằng nước cất.

Acid periodic 0,029 M:

Cho 5,500 g acid periodic và 200 ml nước cất vào bình định mức 1000 ml. Pha loãng đến vạch bằng acid acetic băng.

Tiến hành thử:

Dùng pipét hút 25 ml dịch thử và 25 ml dung dịch Acid periodic 0,029 M vào 1 bình nón, lắc đều và để yên trong 30 phút. Cuối cùng thêm ~ 2 g kali iodid và chuẩn độ với dung dịch natri thiosulfat 0,1 N sử dụng chỉ thị là dung dịch hồ tinh bột 1%. Tiến hành làm 1 mẫu trắng song song, sử dụng 50 ml nước cất thay cho dịch thử. Tính hàm lượng tổng propylen glycol theo công thức sau:

$$\% \text{ propylen glycol} = \frac{3,8 \times (A - B)}{W}$$

Trong đó:

A = thể tích natri thiosulfat 0,1 N chuẩn độ mẫu trắng (ml)

B = thể tích natri thiosulfat 0,1 N chuẩn độ mẫu thử (ml)

W = Khối lượng mẫu thử (g)

*Propylen glycol tự do*

Xác định hàm lượng % của propylen glycol tự do trong mẫu bằng cách chiết (đun hồi lưu trong 2 giờ) 2 g mẫu thử với 80 ml propan-2-ol. Để nguội về nhiệt độ phòng, sau đó xác định lượng propylen glycol tự do bằng cách chuẩn độ với Acid periodic 0,029 M như hướng dẫn xác định tổng propylen glycol.

*Arsen*

Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 (phương pháp II).

*Chì*

- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.

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

## 6.3. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận xác định carbon dioxyd bằng phương pháp decarboxyl hóa tại *JECFA monograph 1 - Vol.4*.

Mỗi ml natri hydroxyd 0,25N sử dụng tương đương với 5,5mg carbon dioxyd.

**Phụ lục 6****YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI AGAR**

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	Agar; Agar-Agar; gelose; Japan Agar; Bengal; Ceylon; Chinese or Japanese isinglass; Laylor Carang INS 406 ADI “không giới hạn”
<b>2. Định nghĩa</b>	Thạch là hợp chất keo khô ưa nước chiết xuất từ loài tảo biển thuộc lớp <i>Rhodophyceae</i> . Nó là một polysaccharid gồm các tiểu phân D- và L-galactose. Cứ khoảng 10 tiểu phân D-galactopyranose có một nhóm ester sulfat. Cation calci, magnesi, kali, natri cũng có thể liên kết với polysaccharid này.
<i>Chỉ số C.A.S.</i>	9002-18-0
<b>3. Cảm quan</b>	Không mùi hoặc có mùi đặc trưng nhẹ. Thạch thô không tán thường là hỗn hợp nhiều dạng màng mỏng, dính; hoặc bột, hạt dạng vảy, miếng. Có thể có màu cam vàng nhạt hoặc vàng xám đến vàng nhạt hoặc không màu. Dai khi hút ẩm và ròn khi khô. Bột thạch có màu trắng, trắng vàng, vàng nhạt.
<b>4. Chức năng</b>	Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hóa.
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Không tan trong nước lạnh, tan trong nước nóng.
<i>Tạo gel với nước</i>	Phải có phản ứng tạo gel với nước đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa với dung dịch amoni sulfat</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với dung dịch amoni sulfat đặc trưng.
<i>Tạo kết tủa với dung dịch chì acetat</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa với dung dịch chì acetat đặc trưng.
<i>Kiểm tra hiển vi</i>	Đặt một vài mảnh thạch chưa nghiền hoặc một ít bột thạch trên lam kính, thêm vài giọt nước hoặc dung dịch cloral hydrat (TS). Soi dưới kính hiển vi, thạch trong nước có dạng hạt xen lẫn dạng sợi., thạch trong dung dịch cloral hydrat (TS) trong hơn thạch trong nước.
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Hấp thụ nước</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử).
<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 22%.
<i>Tro toàn phần</i>	Không được quá 6,5% tính theo chế phẩm đã làm khô.
<i>Tro không tan trong acid</i>	Không được quá 0,5% tính theo chế phẩm đã làm khô.

<i>Các tạp chất ngoại lai không tan trong nước</i>	Không được quá 1,0%.
<i>Tinh bột và dextrin</i>	Không phát hiện được.
<i>Gelatin và các protein khác</i>	Không phát hiện được.
<i>Arsen</i>	Không được quá 3,0 mg/kg.
<i>Chì</i>	Không được quá 5,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không được quá 5000 khuẩn lạc/g. Ban đầu chuẩn bị đậm độ pha loãng $10^{-1}$ bằng cách thêm 50g mẫu vào 450ml nước pha loãng đệm phosphat Butterfield và đồng nhất hóa bằng máy nghiền cao tốc.
<i>Tổng số nấm men-mốc</i>	Không được quá 500 khuẩn lạc/g
<i>Coliforms</i>	Âm tính
<i>Salmonella</i>	Âm tính
5.4. Hàm lượng	Ngưỡng nồng độ gel không được quá 0,25%.

**6. Phương pháp thử**

6.1. Định tính

<i>Tạo gel với nước</i>	Pha dung dịch mẫu thử 1% trong nước sôi, cho vào bình, đặt bình trong bể cách thủy $30^{\circ}$ trong 15 phút. Tạo thành gel rắn và bền. Đặt bình trong bể cách thủy $70^{\circ}$ trong 1 giờ. Gel không bị chảy. Khi gia nhiệt đến $> 95^{\circ}$ , gel bị chảy tạo thành dung dịch trong.
<i>Tạo kết tủa với dung dịch amoni sulfat</i>	Dung dịch mẫu thử 0,5% (ấm khoảng $40^{\circ}$ ) tạo kết tủa khi thêm dung dịch amoni sulfat (ấm khoảng $40^{\circ}$ ) với thể tích bằng 1/2 thể tích dung dịch mẫu thử. Phép thử này phân biệt thạch với các alginat, gôm arabic, gôm ghatti, gôm karaya, pectin và tragacanth.
<i>Tạo kết tủa với dung dịch chì acetat</i>	Dung dịch mẫu thử 0,5% (ấm) tạo kết tủa khi thêm dung dịch chì acetat (ấm) với thể tích bằng 1/5 thể tích dung dịch mẫu thử. Phép thử này phân biệt thạch với methyl cellulose.

6.2. Độ tinh khiết

<i>Hấp thụ nước</i>	Cho 5 g mẫu thử vào trong một ống đong 100 ml, cho nước đến vạch, khuấy đều, để yên tại $25^{\circ}$ trong 24 giờ. Rót dung dịch qua bông thủy tinh đã thấm nước, thu nước chảy ra vào một ống đong khác. Lượng nước chảy ra thu được không được quá 75 ml.
---------------------	---

<i>Giảm khối lượng khi làm khô</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4. - Sau khi sấy tại 105° đến khi sự chênh lệch khối lượng giữa 2 lần cân không quá 1 mg (thời gian sấy khoảng 5 giờ); thạch thô chưa nghiền cần được cắt nhỏ thành từng miếng 2-5 mm <sup>2</sup> trước khi sấy).
<i>Các tạp chất ngoại lai không tan trong nước</i>	Đun sôi, hồi lưu 5 g mẫu thử với 500 ml nước và 12 ml acid sulfuric. Để nguội và lọc qua một phễu thủy tinh xốp, lỗ mịn, đã cân bì. Tráng bình và lọc bằng 50 ml nước, sấy tại 105° đến khối lượng không đổi và cân. Tính hàm lượng %.
<i>Tinh bột và dextrin</i>	Thêm vào dung dịch mẫu thử 0,5% (ấm khoảng 40°) 2 giọt dung dịch iod (TS). Khi vừa nhỏ thuốc thử vào dung dịch thì có màu tím đỏ nhưng sau khi khuấy trộn đều dung dịch có màu nâu vàng không phải màu xanh hoặc màu đỏ.
<i>Gelatin và các protein khác</i>	Thêm vào dung dịch mẫu thử 0,5% (ấm khoảng 40°) dung dịch acid picric (TS) (ấm khoảng 40°). Sau 10 phút dung dịch không được đục.
<i>Arsen</i>	Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 (phương pháp II).
<i>Chì</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

### 6.3. Định lượng

#### Ngưỡng nồng độ gel:

Pha một loạt dung dịch mẫu thử chứa hàm lượng mẫu thử rắn 0,15%; 0,20%; 0,25%..., cho vào các ống nghiệm kích thước dài 150 mm, đường kính trong 16 mm. Nút ống nghiệm và làm mát trong 1 giờ tại 20 - 25°. Đổ cột gel từ các ống nghiệm lên trên 1 bề mặt phẳng. Nồng độ thấp nhất chịu được trọng lực trong 5 - 30 giây mà không bị gãy vỡ là ngưỡng nồng độ gel của mẫu thử.



## Phụ lục 7

## YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI CARRAGEENAN

- 1. Tên khác, chỉ số** Thạch trắng từ rong biển Ailen ( từ loài *Chondrus spp.*); Eucheuman (từ loài *Eucheuma spp.* ); Iridophycan (từ loài *Iridaea spp.*); Hypnean (từ loài *Hypnea spp.*); Furcellaran hoặc agar Đan Mạch (từ loài *Furcellaria fastigiata*);  
INS 407
- 2. Định nghĩa** Sản phẩm có tính keo ưa nước thu được từ một số loài thuộc lớp tảo biển đỏ *Rhodophyceae*.  
Carrageenan được lấy chủ yếu từ các họ và loài của lớp tảo biển đỏ *Rhodophyceae* gồm:  
*Furcellariaceae* như *Furcellaria*  
*Gigartinaceae* như *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*  
*Hypnaeaceae* như *Hypnea*  
*Phyllophoraceae* như *Phyllophora*, *Gymnogongrus*, *Ahnfeltia*  
*Solieriaceae* như *Eucheuma*, *Anatheca*, *Meristotheca*.  
Carrageenan là chất keo ưa nước gồm các thành phần chính là các ester của đường galactose và 3,6-anhydrogalactose polysaccharide với  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  và  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Các đường hexoza này có liên kết  $\alpha$ -1,3 và  $\beta$ -1,4 trong copolymer. Tỷ lệ tương đối giữa các cation tồn tại trong carrageenan có thể thay đổi trong quá trình chế biến khi một cation chiếm phần chính.  
Các polysaccharid phổ biến trong carrageenan là kappa-, iota- và lambda-carrageenan. Kappa-carrageenan thường ở dạng polymer của D-galactose-4-sulfat và 3,6-anhydro-D-galactose; iota-carrageenan cũng tương tự như vậy, ngoại trừ 3,6-anhydrogalactose được sulfat hoá ở vị trí cacbon số 2. Giữa kappa-carrageenan và iota-carrageenan có một hợp phần trung gian khác nhau về mức độ sulfat hoá ở vị trí cacbon số 2. Đối với lambda-carrageenan, các đơn vị đồng phân chủ yếu là D-galactose-2-sulfat (liên kết 1,3) và D-galactose-2,6-disulfat (liên kết 1,4).  
Carrageenan thu được từ quá trình chiết tảo biển bằng nước hoặc dung dịch kiềm loãng. Thu hồi carrageenan trong dịch chiết bằng phương pháp kết tủa cồn hoặc phương pháp kết tủa với dung dịch kali clorid và làm lạnh đông. Chỉ sử dụng methanol, ethanol và isopropanol để thu hồi và tinh chế. Ngoài ra, chế phẩm thương mại có thể có thể chứa đường (để chuẩn hoá), muối (để làm dày và keo hoá).
- Mã số C.A.S. 9000-07-1
- 3. Cảm quan** Dạng bột thô tới mịn, màu hơi vàng hoặc màu nâu vàng tới trắng, hầu như không mùi

<b>4. Chức năng</b>	Chất làm dày, chất tạo gel, chất ổn định, chất nhũ hoá
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Không tan trong ethanol ; tan trong nước ở nhiệt độ khoảng 80 <sup>0</sup> C, tạo dung dịch nhớt trong hoặc hơi trắng sữa chảy dễ dàng ; tan trong nước dễ dàng hơn nếu trước đó được làm ẩm bằng cồn, glycerol hoặc dung dịch bão hoà của glucose hoặc sucrose trong nước.
<i>Sulfat</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của sulfat.
<i>Galactose và anhydrogalactose</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của galactose và anhydrogalactose.
<i>Keo ưa nước và chất đồng trùng hợp điển hình</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của keo ưa nước và chất đồng trùng hợp điển hình.
<i>Hấp thụ tia hồng ngoại</i>	Phải có phản ứng hấp thụ tia hồng ngoại đặc trưng.
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 12% (nhiệt độ sấy 105 <sup>0</sup> C đến trọng lượng không đổi).
<i>pH</i>	8 – 11 (thể rắn 1%)
<i>Độ nhớt</i>	Không được nhỏ hơn 5 cP ở 75 <sup>0</sup> C (dung dịch 1,5%)
<i>Sulfat</i>	Không được nhỏ hơn 15,0% và không được quá 40,0% (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) tính theo trọng lượng khô.
<i>Hàm lượng tro toàn phần</i>	Không được nhỏ hơn 15,0% và không được quá 40,0% theo trọng lượng khô
<i>Tro không tan trong acid</i>	Không được quá 1,0%
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 2,0% Sử dụng 2 g thu được từ phần (a) của Cách tiến hành xác định sulfat
<i>Dư lượng dung môi</i>	Không được quá 0,1% ethanol, isopropanol, hoặc methanol, dạng mỗi chất hay cộng hợp các chất. Xác định theo mô tả trong phần Phương pháp thử - Định lượng

<i>Arsen</i>	Không được quá 3,0 mg/kg (Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử H <sup>+</sup> đối với 3 g mẫu).
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
<i>Cadmi</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
<i>Thủy ngân</i>	Không được quá 1,0 mg/kg.

### 5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	Không được quá 5.000 cfu/g
<i>Salmonella spp.</i>	Âm tính
<i>E.coli</i>	Âm tính/1 g

## 6. Phương pháp thử

### 6.1. Định tính

<i>Sulfat</i>	Hoà tan 100 mg mẫu trong 20 ml nước (gia nhiệt nếu cần), thêm 3 ml dung dịch BaCl <sub>2</sub> TS và 5 ml dung dịch acid HCl loãng; lọc nếu có kết tủa. Đun sôi dung dịch hoặc phần dịch được lọc ra trong 5 phút. Xuất hiện kết tủa tinh thể trắng.
<i>Galactose và anhydrogalactose</i>	Tiến hành theo chỉ dẫn dưới phần Định tính các thành phần gồm (Quyển 4) sử dụng các chất chuẩn sau đây làm đối chiếu: galactose, rhamnose, acid galacturonic, 3,6 anhydrogalactose, mannose, xylose và arabinose. Galactose và 3,6 anhydrogalactose cần phải hiện diện.
<i>Keo ưa nước và chất đông trùng hợp điển hình</i>	<p>Cho 4 g mẫu vào 200 ml nước và gia nhiệt hỗn hợp trong chậu nước ở 80<sup>0</sup>C, khuấy với tốc độ nhất định cho đến khi hoà tan. Bổ sung lượng nước mất đi do quá trình bay hơi và làm nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng. Dung dịch sẽ trở nên nhớt và tạo gel. Thêm 200 mg KCl vào 50 ml dung dịch hoặc gel, sau đó lại gia nhiệt, khuấy đều và làm nguội.</p> <p>Gel giòn, dễ vỡ chỉ ra carrageenan chiếm ưu thế ở dạng kappa ; và gel mềm dẻo, đàn hồi chỉ ra carrageenan chiếm ưu thế ở dạng iota. Nếu dung dịch không tạo gel, carrageenan chiếm ưu thế ở dạng lambda.</p>

*Hấp thụ tia hồng ngoại*

Ghi phổ hấp thụ tia hồng ngoại trên các phần gel và phần không gel của mẫu theo cách sau:

Hoà đều 2 g mẫu trong 200 ml dung dịch KCl 2,5%, khuấy trong 1 giờ. Để qua đêm, khuấy lại trong 1 giờ và chuyển vào một ống li tâm (nếu không chuyển được vì hệ phân tán quá nhớt, pha loãng với 200 ml dung dịch KCl). Li tâm khoảng 1.000 xg trong 15 phút .

Bỏ phần trong trên bề mặt, hoà tan phần cặn thu được trong 200 ml dung dịch KCl 2,5%, li tâm lại. Làm đông tụ phần nổi trên bề mặt bằng cách thêm gấp 2 lần thể tích ethanol 85% hoặc isopropanol (Lưu ý: giữ lại phần lắng xuống sử dụng theo cách làm sau). Thu hồi phần đông tụ và rửa bằng 250 ml cồn. Ép dịch lỏng của phần đông tụ ra ngoài và sấy khô ở 60°C trong 2 giờ. Sản phẩm thu được là phần không gel (lambda-carrageenan).

Hoà đều phần lắng xuống (đã được giữ lại ở trên) trong 250 ml nước lạnh, gia nhiệt ở 90°C trong 10 phút, làm nguội tới 60°C. Làm đông tụ hỗn hợp và sau đó thu hồi, rửa và sấy phần đông tụ theo cách làm trên. Sản phẩm thu được là phần gel (kappa và iota-carrageenan).

Chuẩn bị một dung dịch nước 0,2% cho mỗi phần, soi phim có độ dày 0,5 mm (khi sấy) trên bề mặt không dính như Teflon và thu được phổ hấp thụ tia hồng ngoại của mỗi phim (Ngoài ra, phổ hấp thụ có thể thu được nhờ kỹ thuật soi phim trên tấm kính phủ kali bromid nếu việc thực hiện tránh được ẩm).

Carrageenan có phổ hấp thụ rộng và mạnh, đặc trưng của tất cả polysaccharid trong vùng từ 1.000 đến 1.100 cm<sup>-1</sup>. Hấp thụ tối đa là 1.065 và 1.020 cm<sup>-1</sup> đối với dạng gel và dạng không gel. Các dải hấp thụ đặc trưng khác và cường độ hấp thụ tương ứng với hấp thụ tại 1.050 cm<sup>-1</sup> như sau:

Số sóng (cm <sup>-1</sup> )	Phân tử	Độ hấp thụ tương ứng với 1.050 cm <sup>-1</sup>		
		Kappa	Iota	Lambda
1.220-1.260	Ester sulfat	0,2-1,2	1,2-1,6	1,4-2,0
928-933	3,6-anhydro galactose	0,2-0,6	0,2-0,4	0-0,2
840-850	Galactose-4-sulfat	0,1-0,5	0,2-0,4	-
825-830	Galactose-2-sulfat	-	-	0,2-0,4
810-820	Galactose-6-sulfat	-	-	0,1-0,3

800- 805	3,6-anhydro galactose-2- sulfat	0-0,2	0,2-0,4	-
-------------	---------------------------------------	-------	---------	---

## 6.2. Độ tinh khiết

*Sulfat*

Nguyên tắc: Các nhóm sulfat thủy phân được kết tủa dưới dạng  $BaSO_4$

Cách tiến hành:

(a) Hoà tan chính xác 8 g mẫu sản phẩm thương mại trong 400 ml hỗn hợp isopropanol/nước 60% (theo khối lượng) ở nhiệt độ phòng. Khuấy nhẹ nhàng trong 4 giờ. Lọc bằng giấy lọc không tro. Loại bỏ phần dịch lọc được. Rửa phần còn lại trên giấy lọc 2 lần bằng 10 ml hỗn hợp isopropanol/nước 60%. Sấy đến trọng lượng không đổi ở  $105^{\circ}C$ .

Phần (b) dùng khoảng 1 g chất khô. Phần còn lại được giữ lại để xác định hàm lượng tro toàn phần và hàm lượng chất không tan trong dung dịch acid.

(b) Cân chính xác 1 g mẫu ( $W_1$ ) thu được ở phần (a) cho vào bình đáy tròn cổ dài dung tích 100 ml. Thêm 50 ml dung dịch acid HCl. Nối bình trên với một sinh hàn có ít nhất 5 bầu ngưng và đun sôi với sinh hàn ngược trong 1 giờ. Thêm 25 ml dung dịch hydrogen peroxyd và tiếp tục đun sôi với sinh hàn ngược trong khoảng 5 giờ hoặc cho đến khi dung dịch trong suốt hoàn toàn. Chuyển dung dịch vào cốc thủy tinh dung tích 600 ml, đun sôi và thêm 10 ml dung dịch  $BaCl_2$  theo từng giọt. Gia nhiệt hỗn hợp phản ứng trong 2 giờ bằng cách thủy sôi. Lọc hỗn hợp qua giấy lọc không tro. Rửa bằng nước cất đun sôi cho đến khi dịch lọc không còn clorid. Sấy giấy lọc và các chất trong tủ sấy. Đốt ở  $800^{\circ}C$  trong chén sứ hoặc chén silica cho đến khi tro chuyển thành màu trắng. Để nguội trong bình hút ẩm.

Cân chén có tro. Tính % sulfat từ khối lượng gam ( $W_2$ ) của tro ( $BaSO_4$ ) sử dụng công thức:  $(W_2/W_1) \times 100 \times 0,4116$

*Hàm lượng tro toàn phần*

Cho chính xác 2 g mẫu khô ( $W_1$ ) thu được từ phần (a) trong cách tiến hành xác định sulfat ở trên vào chén silica hoặc nồi platin. Gia nhiệt mẫu bằng đèn hồng ngoại thích hợp, tăng cường độ dần dần cho đến khi mẫu hoàn toàn bị than hoá; tiếp tục gia nhiệt thêm khoảng 30 phút. Chuyển chén trên có chứa mẫu đã than hoá vào lò kín và nung ở  $550^{\circ}C$  trong 1 giờ. Làm nguội trong bình hút ẩm và cân. Làm lại việc nung trong lò kín cho đến khi đạt được khối lượng không đổi ( $W_2$ ). Nếu tro không còn carbon không thu được sau lần nung thứ nhất, làm ẩm phần được than hoá bằng dung dịch  $NH_4NO_3$  và sấy bằng đèn hồng ngoại. Làm lại bước nung.

Tính % tro toàn phần trong mẫu:  $(W_2/W_1) \times 100$

Giữ lại tro cho định lượng tro không tan trong acid.

*Độ nhớt*

Cho 7,5 g mẫu và 450 ml nước đã khử ion vào cốc Berzelius dung tích 600 ml, khuấy từ 10 – 20 phút. Thêm vào lượng nước cần thiết để đạt khối lượng cuối cùng 500 g, khuấy và gia nhiệt trong cách thủy cho đến khi nhiệt độ đạt 80<sup>0</sup>C (khoảng 20 – 30 phút). Cho nước thêm vào để bù vào lượng nước mất đi do bốc hơi, làm nguội tới 76 – 77<sup>0</sup>C, gia nhiệt trong cách thủy ở nhiệt độ không đổi 75<sup>0</sup>C. Gia nhiệt trước phao và bộ phận bảo vệ của nhớt kế Brookfield LVF hoặc LVT khoảng 75<sup>0</sup>C trong nước. Sấy phao và bộ phận bảo vệ và lắp chúng vào nhớt kế đã được trang bị trục quay số 1 (đường kính 19 mm, chiều dài khoảng 65 mm) có khả năng quay 30 vòng/phút. Điều chỉnh độ cao của phao trong dung dịch mẫu, bắt đầu quay nhớt kế 30 vòng/phút và sau sáu vòng quay của nhớt kế, lấy nhớt kế đọc ở mức 0 – 100.

Nếu độ nhớt rất thấp, độ chính xác tăng lên có thể thu được bằng cách sử dụng UL Brookfield (cực thấp) bộ tiếp hợp hoặc tương đương. (Lưu ý: mẫu của một vài dạng carrageenan có thể quá nhớt để đọc khi sử dụng trục quay số 1). Những mẫu như vậy rõ ràng là vượt qua các đặc điểm kỹ thuật, nhưng nếu đọc độ nhớt mong muốn vì các lý do khác, sử dụng trục quay số 2 và đọc ở mức 0 - 100 hoặc ở mức 0 - 500).

Ghi lại các kết quả (đơn vị cP) thu được bằng cách đọc trên nhớt kế theo hệ số được đưa ra bởi nhà sản xuất Brookfield.

*Dư lượng dung môi*Dung dịch alcol chuẩn:

Cho 500 mg mỗi loại methanol, ethanol và isopropanol có chất lượng dùng cho sắc ký vào bình định mức dung tích 50 ml, pha loãng bằng nước cho đủ thể tích 50 ml, lắc đều. Dùng pipet lấy 10 ml của dung dịch trên vào bình định mức 100 ml, pha loãng bằng nước cho đủ thể tích 100 ml, lắc đều.

Dung dịch TBA chuẩn:

Cho 500 mg tertiary-butyl alcol có chất lượng dùng cho sắc ký vào bình định mức dung tích 50 ml, pha loãng bằng nước cho đủ thể tích 50 ml, lắc đều. Dùng pipet lấy 10 ml của dung dịch trên vào bình định mức 100 ml, pha loãng bằng nước cho đủ thể tích 100 ml, lắc đều.

Hỗn hợp dung dịch chuẩn:

Dùng pipet lấy 4 ml mỗi loại dung dịch alcol chuẩn và dung dịch TBA chuẩn cho vào bình Erlenmeyer dung tích 125 ml, pha loãng đến thể tích khoảng 100 ml bằng nước và lắc đều. Dung dịch này chứa khoảng 40 µg mỗi alcol/ml.

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử:

Hoà tan 1 ml nhũ tương chống bọt thích hợp như Dow-Corning G-10 hoặc tương đương trong 200 ml nước đựng trong bình chưng cất đáy tròn 24/40 dung tích 1.000 ml. Thêm vào 5 g mẫu và lắc bằng máy lắc trong 1 giờ. Nối bình chưng cất với cột phân đoạn và chưng cất khoảng 100 ml, điều chỉnh nhiệt để bọt không được vào trong cột. Thêm 4,0 ml dung dịch chuẩn TBA vào phần chưng cất được để được dung dịch mẫu thử.

Cách tiến hành:

Bơm 5 µl hỗn hợp dung dịch chuẩn vào sắc ký khí thích hợp được trang bị detector ion hoá ngọn lửa và cột thép không rỉ 1,8-m x 3,2-mm được nhồi bằng Porapak QS 80/100-mesh hoặc tương đương. Chất mang là khí heli với tốc độ dòng 80 ml/phút. Nhiệt độ buồng bơm mẫu 200<sup>0</sup>C, nhiệt độ cột 165<sup>0</sup>C và nhiệt độ detector 200<sup>0</sup>C. Thời gian lưu của isopropanol khoảng 2 phút và thời gian lưu của tertiary-butyl alcol khoảng 3 phút.

Tính diện tích pic của methanol, ethanol, isopropanol và TBA. Tính hệ số đáp ứng của mỗi loại  $f_i$  theo công thức  $A_i/A_{TBA}$ , trong đó  $A_i$  là diện tích pic của mỗi alcol ( $i$  = methanol, ethanol hoặc isopropanol).

Tương tự, bơm 5 µl dung dịch mẫu thử và tính các diện tích pic, ghi diện tích của mỗi pic alcol là  $A_i$  và diện tích pic của tertiary-butyl alcol là  $A_{TBA}$ .

Tính hàm lượng từng alcol (mg/kg) có trong mẫu theo công thức:

$$A_i \cdot 4000 / f_i \cdot A_{TBA} \cdot W$$

Trong đó: W là khối lượng mẫu lấy (g)



**Chì****Nguyên tắc:**

Mẫu được tro hoá, làm ẩm bằng các acid nitric, acid perchloric và được phân tích bằng cách đo phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa (Quyển 4).

**Thiết bị:**

Máy đo phổ hấp thụ nguyên tử

**Hoá chất:**

- Acid nitric, đậm đặc, tinh khiết
- Acid perchloric, đậm đặc, tinh khiết
- Acid hydrochloric, đậm đặc, tinh khiết
- Dung dịch chuẩn chì (đã công bố)

**Dung dịch:**

- Dung dịch gốc (1mg/ml): Pha một thể tích thích hợp của dung dịch chuẩn chì đã công bố với nước cất và đã khử ion (D/D nước) để được 1 lít dung dịch.
- Dung dịch trung gian: (a) 100 µg/ml: Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch gốc cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước. (b) 10 µg/ml. Dùng pipet lấy 10 ml của dung dịch 100 µg/ml cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước.
- Dung dịch chuẩn: Lấy 4 bình định mức dung tích 100 ml và chuyển vào chúng lần lượt 1, 5, 10, 20 ml dung dịch chì trung gian (b). Pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước để tạo các dung dịch có nồng độ là 0,1; 0,5; 1 và 2 µg Pb/ml.

**Chuẩn bị mẫu:** (Chú ý: cách làm này sử dụng các acid oxy hoá đậm đặc và dẫn đến bay hơi của các khí độc. Phải thực hiện trong tủ hút).

Cân chính xác 7,5 g mẫu thử dạng bột khô đại diện cho vào bình Erlenmeyer dung tích 250 ml. Làm mẫu trắng và thực hiện các bước tương tự như với mẫu thử. Làm ẩm mẫu thử bằng khoảng 10 ml D/D nước và thêm 25 ml dung dịch acid nitric. Gia nhiệt nhẹ nhàng trên tấm gia nhiệt (100 – 150<sup>o</sup>C) cho đến khi hầu hết khói đen thoát ra (khoảng 1 giờ); thỉnh thoảng lắc bình. Làm nguội và thêm 5 ml dung dịch acid perchloric; ở giai đoạn này các cấu tử trở nên dễ nhìn thấy. Gia nhiệt nhẹ nhàng (bằng tấm gia nhiệt, 100 – 150<sup>o</sup>C) để cô cho đến khi dung dịch chuyển sang màu hơi vàng hoặc không màu (khoảng 1 giờ). Ở giữa quá trình gia nhiệt nếu dung dịch sẫm màu, thêm từ từ mấy lần 2 – 3 ml dung dịch acid nitric nếu cần thiết cho đến khi đạt được màu mong muốn; không được để dung dịch cạn. Làm nguội phần đã gia nhiệt và rửa thành bình bằng khoảng 5 ml D/D nước và lắc xoáy. Bổ sung 2 ml dung dịch acid hydrochloric. Gia nhiệt lại cho đến khi tất cả khói màu nâu được thoát ra và dung dịch có màu trắng tới vàng nhạt. Không được để dung dịch cạn. Làm nguội dung dịch và rửa thành bình bằng khoảng 10 ml D/D nước. Chuyển dung dịch hơi nhớt vào bình định mức dung tích 50 ml và pha đến thể tích 50 ml

bằng D/D nước. Lọc bằng giấy lọc 2 lớp (Whatman số 5 hoặc loại tương đương).

Định lượng:

Cho vào máy đo phổ hấp thụ nguyên tử trước đó đã thiết lập các điều kiện tối ưu ở bước sóng 283,3 nm sử dụng không khí/acetylen oxy hoá ngọn lửa. Đo độ hấp thụ của mẫu thử, mẫu trắng và dung dịch chuẩn. Vẽ đường chuẩn trên đồ thị độ hấp thụ với nồng độ chì ( $\mu\text{g Pb/ml}$ ) của mẫu trắng và dung dịch chuẩn. Định lượng nồng độ chì trong dung dịch mẫu thử từ đường chuẩn.

Nồng độ chì trong mẫu thử (mg Pb/kg):

$$[\text{Pb}] = F \times A/B$$

Trong đó: A là nồng độ chì trong dung dịch mẫu ( $\mu\text{g/ml}$ )

B là khối lượng mẫu thử (g)

F là hệ số pha loãng (50 ml)

*Cadmi*

Thực hiện như hướng dẫn trên đối với định lượng chì, sử dụng bước sóng phân tích 228,8 nm. Dung dịch trung gian và dung dịch mẫu được chuẩn bị từ dung dịch chuẩn cadmi đã công bố:

- Dung dịch trung gian: (a) 100 µg/ml: Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch gốc (1 mg/ml) cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước. (b) 10 µg/ml: Dùng pipet lấy 10 ml của dung dịch (a) cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước. (c) 1 µg/ml: Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch (a) cho vào bình định mức 100 ml, pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước.

- Dung dịch chuẩn: Lấy 5 bình định mức dung tích 50 ml và chuyển vào chúng lần lượt 0,5; 2,5; 5, 10, 20 ml dung dịch trung gian (c). Pha đến thể tích 50 ml bằng D/D nước để tạo các dung dịch có nồng độ là 0,01; 0,05; 0,1; 0,2 và 0,4 µg Cd/ml.

Nồng độ cadmi trong mẫu thử (mg Cd/kg):

$$[\text{Cd}] = F \times A/B$$

Trong đó: A là nồng độ cadmi trong dung dịch mẫu (µg/ml)

B là khối lượng mẫu thử (g)

F là hệ số pha loãng (50 ml)

*Thủy ngân*Nguyên tắc:

Mẫu được tro hoá, làm ẩm bằng các acid nitric, acid perchloric và được phân tích bằng cách đo phổ hấp thụ nguyên tử  $\text{H}^+$  (Quyển 4)

Thiết bị:

Máy đo phổ hấp thụ nguyên tử được trang bị với thiết bị tạo hơi hydrogen. Không thể thiếu ống phản ứng hoặc cuộn dây và bơm pittông với các kênh ống kép: một kênh dành cho dung dịch mẫu và một kênh dành cho 2 ống dung dịch hoá chất. Kiểm soát dòng chảy được xác định bởi cỡ ống và đầu nối ống. Tốc độ dòng được đo ở đường ra của thiết bị tạo khí hydrogen.

Hoá chất:

- Acid nitric, đậm đặc, tinh khiết
- Acid perchloric, đậm đặc, tinh khiết
- Acid hydrochloric, đậm đặc, tinh khiết
- Natri borohydrid, > 98%
- Natri hydroxyd, tinh khiết
- Dung dịch chuẩn thuỷ ngân (đã công bố)

Dung dịch:

- Hỗn hợp dung dịch acid nitric và acid perchloric (1 : 1): Trộn theo tỷ lệ thể tích như nhau của hai acid.
- Dung dịch acid HCl 5M: Pha 417 ml dung dịch acid HCl đậm đặc đến thể tích 1 lít bằng nước đã khử ion.
- Dung dịch natri borohydrid 0,4% (chuẩn bị ngay trước khi dùng): Trước tiên, hoà tan 2,5 g NaOH trong nước đã khử ion. Sau đó, thêm và hoà tan 2,0 g natri borohydrid. Pha tới thể tích 500 ml.
- Dung dịch gốc (1 mg/ml): Pha một thể tích thích hợp dung dịch chuẩn thuỷ ngân đã công bố bằng nước cất và đã khử ion (D/D nước) tới thể tích 1 lít.
- Dung dịch trung gian: (a) 10.000 µg/l: Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch gốc cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước. (b) 100 µg/l: Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch 10.000 µg/l cho vào bình định mức dung tích 100 ml và pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước.
- Dung dịch chuẩn: Lấy 5 bình định mức dung tích 100 ml và chuyển vào chúng lần lượt 1; 5, 10, 15 và 20 ml dung dịch trung gian (b). Mỗi bình bổ sung 10 ml hỗn hợp dung dịch acid nitric và acid perchloric (1:1). Pha đến thể tích 100 ml bằng D/D nước để tạo các dung dịch có nồng độ là 1; 5; 10; 15 và 20 µg Hg/l.

Chuẩn bị mẫu: (Chú ý: cách làm này sử dụng các acid oxy hoá đậm đặc và dẫn đến bay hơi của các khí độc. Phải thực hiện trong tủ hút).

Cân chính xác 5 g mẫu thử dạng bột khô đại diện cho vào bình Erlenmeyer dung tích 250 ml. Làm mẫu trắng và thực hiện các bước tương tự như với mẫu thử. Làm ẩm mẫu thử bằng 5 ml D/D nước và thêm 10 ml hỗn hợp dung dịch acid nitric và acid perchloric (1:1). Gia nhiệt nhẹ nhàng trên tấm gia nhiệt (100 – 150<sup>0</sup>C) cho đến khi hầu hết khói đen thoát ra và dung dịch chuyển sang màu vàng nhạt hoặc không màu; Thỉnh thoảng lắc bình. Không được để dung dịch cạn. Làm nguội và rửa thành bình bằng lượng nhỏ D/D nước. (Một vài cấu tử có thể nhìn thấy được). Đặt bình nhẹ nhàng. Để dung dịch nhớt không đáng kể qua đêm. Chuyển dung dịch vào bình định mức dung tích 50 ml và pha đến thể tích 50 ml bằng D/D nước. Lọc vào bình Erlenmeyer bằng giấy lọc 2 lớp (Whatman số 5 hoặc loại tương đương).

Nhúng bình vào chậu siêu âm và bật chế độ rung siêu âm trong 10 phút hoặc cho đến khi bọt không được tạo thành trên bề mặt dung dịch.

**Định lượng:** Hiệu chỉnh (sử dụng nước) máy bơm pittông để đưa ra tốc độ dòng của dung dịch mẫu 8 ml/phút và tốc độ dòng kết hợp của hai dung dịch (Natri borohydrid và acid hydrochloric 5M) 2 ml/phút. (Tốc độ dòng kết hợp được thực hiện với một thiết lập bơm duy nhất).

Đặt mẫu vào máy quang phổ trước đó đã thiết lập các điều kiện tối ưu ở bước sóng đèn đối với thủy ngân 253,7 nm.

Chuyển lượng thích hợp của hai dung dịch hoá chất vào các ống đong có chia vạch định mức riêng biệt. Đặt ống hút riêng biệt từ bơm pittông vào mỗi dung dịch hoá chất và bình chứa mẫu. Bắt đầu dòng của khí mang argon (áp suất đầu ra của thùng chứa:  $3,2 \pm 0,2 \text{ kg/cm}^2$ ) thông qua thiết bị tạo hơi hydrogen của máy quang phổ. Khởi động bơm để bắt đầu dòng của ba dung dịch trong ống góp của thiết bị tạo hydrogen. Tại ống góp các dung dịch được trộn đều với nhau và chảy trong ống xoắn ruột gà để tạo ra thủy ngân nguyên tử và thủy ngân nguyên tử được mang đến buồng hấp thụ của máy quang phổ hấp thụ. Đo độ hấp thụ cho mẫu. Lặp lại đối với dung dịch mẫu trắng và mỗi dung dịch chuẩn.

Vẽ đường chuẩn trên đồ thị độ hấp thụ với nồng độ thủy ngân ( $\mu\text{g Hg/l}$ ) của mẫu trắng và dung dịch chuẩn. Định lượng nồng độ thủy ngân trong dung dịch mẫu thử từ đường chuẩn.

Nồng độ thủy ngân trong mẫu thử (mg Hg/kg):

$$[\text{Hg}] = F \times A/1000B$$

Trong đó: A là nồng độ thủy ngân trong dung dịch mẫu ( $\mu\text{g/l}$ )

B là khối lượng mẫu thử (g)

F là hệ số pha loãng (50 ml)

### 5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

Thêm 50 g mẫu vào 450 ml dung dịch pha loãng phosphat đệm của Butterfield và đồng hoá hỗn hợp trong một máy trộn tốc độ cao.



**Phụ lục 8****YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM ĐẬU CAROB**

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	Locust bean gôm, carob gôm INS 410
<b>2. Định nghĩa</b>	Xuất xứ là nội nhũ được nghiền của các hạt từ <i>Ceratonia siliqua</i> (L) Taub. (Fam. <i>leguminosae</i> ) chủ yếu bao gồm khối lượng phân tử cao (khoảng 50.000 – 3.000.000) các polysaccharid gồm có các galactomannan. Các hạt được tách vỏ ngoài bằng cách xử lý nhân hạt với acid sulfuric loãng ở nhiệt độ cao hoặc rang nhân hạt, tiếp theo là xay và sàng hạt để có được những nội nhũ. Gôm được làm sạch bằng cách rửa với ethanol hoặc isopropanol hoặc hoà trong nước sôi, sau đó lọc, làm bốc hơi dung môi và sấy khô.
<i>Mã số C.A.S.</i>	9000-40-2
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng bột màu trắng đến màu trắng hơi vàng, gần như không có mùi
<b>4. Chức năng</b>	Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hoá
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Không tan trong ethanol
<i>Tạo gel</i>	Phải có phản ứng tạo gel đặc trưng.
<i>Độ nhớt</i>	Phải có phép thử đặc trưng của độ nhớt.
<i>Thành phần gôm</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần gôm.
<i>Kiểm tra hiển vi</i>	Phân tán mẫu gôm trong dung dịch nước chứa 0,5% iod và 1% kali iodid trải lên tiêu bản kính và soi bằng kính hiển vi. Gôm đậu carob chứa các tế bào dạng ống cứng dài, tách biệt hoặc hơi đan xen nhau. Các thành phần của gôm đậu carob có màu nâu được hình thành ít thường xuyên hơn ở gôm Guar. (Gôm Guar cho thấy các nhóm tế bào dạng hình tròn tới dạng quả lê. Các thành phần của gôm Guar có màu vàng tới màu nâu).
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 14,0% (nhiệt độ sấy 105 <sup>0</sup> C trong 5 giờ).
<i>Tro tổng số</i>	Không được quá 1,2% (nhiệt độ sấy 800 <sup>0</sup> C trong 3 – 4 giờ).
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 4,0% (Thử với chính xác 1,5 g mẫu thử)
<i>Protein</i>	Không được quá 7,0%.

<i>Tinh bột</i>	Không phát hiện được.
<i>Ethanol và isopropanol</i>	Không được quá 1%, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả ở phần Phương pháp thử)
<i>Chì</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

**5.3 Các yêu cầu về vi sinh vật**

<i>Tổng số vi sinh vật</i>	Không được quá 5.000 CFU/g
<i>E.coli</i>	Âm tính đối với mẫu thử
<i>Salmonella</i>	Âm tính đối với mẫu thử
<i>Nấm men và nấm mốc</i>	Không được quá 500 CFU/g

**6. Phương pháp thử**

**6.1. Định tính**

*Tạo gel* Thêm lượng nhỏ dung dịch natri borat TS vào dung dịch mẫu đã được phân tán bằng nước; gel được hình thành.

*Độ nhớt* Cho 2 g mẫu vào trong cốc dung tích 400 ml và làm ẩm hoàn toàn bằng 4 ml isopropanol. Bổ sung 200 ml nước và khuấy mạnh, tiếp tục khuấy cho đến khi gôm được phân tán đều hoàn toàn. Một dung dịch hơi nhớt màu trắng sữa được hình thành. Chuyển 100 ml dung dịch này vào một cốc khác dung tích 400 ml. Gia nhiệt hỗn hợp trong cách thủy sôi trong 10 phút và làm nguội tới nhiệt độ phòng. Có sự tăng độ nhớt đáng kể (đây là sự khác biệt giữa gôm đậu carob với gôm Guar).

*Thành phần gôm* Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định tính thành gôm (Vol. 4) sử dụng 100 mg mẫu thay thế cho 200 mg và 1 – 10 µl hydrolysat thay thế cho 1 – 5 µl. Sử dụng galactose và mannose như là chất chuẩn đối chứng. Các thành phần này luôn có mặt.

**6.2. Độ tinh khiết**

*Protein* Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định lượng nitrogen (Phương pháp Kjeldahl). % protein trong mẫu bằng % nitrogen định lượng được nhân với 6,25.

*Tinh bột* Thêm một vài giọt iod TS vào dung dịch mẫu 1/10. Không được xuất hiện màu xanh.



*Ethanol và isopropanol* Nguyên tắc:

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

Chuẩn bị mẫu:

Hoà tan 100 mg mẫu trong 10 ml nước sử dụng NaCl như là chất làm phân tán nếu cần.

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l n – propanol

Dung dịch alcol chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l mỗi loại ethanol và isopropanol

Cách tiến hành:

Cân 200 mg ure cho vào một lọ sẫm màu dung tích 25 ml (Reacti-flasks, Pierce, Rockford, IL, USA, hoặc tương đương). Làm trong bằng nitrogen trong 5 phút và sau đó thêm 1 ml dung dịch acid oxalic bão hoà, đóng bằng nút cao su và lắc xoáy. Thêm 1 ml dung dịch mẫu, 1 ml dung dịch nội chuẩn và đồng thời bắt đầu bấm giờ (T = 0). Lắc xoáy lọ và đậy nút lại bằng nút xoáy có đệm cao su silicon. Lắc xoáy cho đến khi T = 30 giây. Tại thời điểm T = 45 giây, bơm qua đệm cao su silicon 0,5 ml dung dịch natri nitrit (250 g/l). Lắc mạnh cho đến khi T = 70 giây và ở T = 150 giây hút qua đệm cao su silicon 1 ml không gian hơi sử dụng syringe khoá áp (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, Louisiana, USA, hoặc tương đương).

Sắc ký khí:

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

Sử dụng các điều kiện sau:

- Cột: thuỷ tinh (đường kính trong 4 mm, chiều dài 90 cm)
- Chất nhồi: 15 cm đầu được nhồi bằng chrompack (hoặc tương đương) và phần còn lại được nhồi bằng Porapak R 120 -150 mesh (hoặc tương đương)
- Khí mang: nitrogen (tốc độ dòng: 80 ml/phút)
- Detector: ion hoá ngọn lửa
- Nhiệt độ: cổng bơm 250<sup>0</sup>C, cột 150<sup>0</sup>C đẳng nhiệt

Tính kết quả:

Định lượng ethanol và isopropanol có mặt trong mẫu bằng cách so sánh các diện tích pic với các pic thu được nhờ sắc ký khí không gian hơi được hình thành do thay thế 1 ml dung dịch chuẩn alcol cho 1 ml dung dịch mẫu trong Cách tiến hành nêu ở trên.

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.

### 6.3. Chỉ tiêu vi sinh vật

#### Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ vào mỗi đĩa petri khoảng 12 – 15 ml agar PCA trước đó đã được làm nguội đến 44 – 46<sup>0</sup>C. Trộn đều bằng cách quay đảo lượt di chuyển trước, sau các đĩa, để cho agar đông đặc. Lật ngược các đĩa petri và ủ trong 48 ±2 giờ ở 35 ±1<sup>0</sup>C.

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

#### *E.coli*

Sử dụng cellulase để phân giải mẫu gôm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gôm trong suốt quá trình thêm gôm vào canh thang tăng sinh. Chuẩn bị dung dịch cellulase 1% (1 g cellulase trong 99 ml nước) và tiệt trùng bằng cách lọc qua màng 0,45 µm (Dung dịch cellulase có thể bảo quản ở 2 – 5<sup>0</sup>C trong 2 tuần). Cho vào ống tiệt trùng có chứa 9 ml canh trường có lauryl sulfat tryptose (LST), thêm vào 0,1 ml dung dịch cellulase 1% đã tiệt trùng. Bổ sung 1 g mẫu gôm vào ống và lắc mạnh bằng máy lắc Vortex để phân tán mẫu. Ủ ống trong 24 – 48 giờ ở 35 ±1 oC. Sau 24 giờ, lắc nhẹ ống và kiểm tra sự tạo khí, tức là sự sủi bọt. Lại ủ thêm 24 giờ nếu quan sát không thấy khí thoát ra. Kiểm tra khí lần 2. Thực hiện kiểm tra xác nhận kết quả được cho là dương tính như sau :

Lắc nhẹ ống LST có thoát khí và lấy chuyển một que cấy của thể rắn vào một ống chứa 10 ml canh trường EC và một lọ lên men (Durham). Ủ ống EC trong 24 – 48 giờ ở 45,5 ±2 oC. Sau 24 giờ kiểm tra sự tạo khí; nếu âm tính, kiểm tra lại sau 48 giờ. Dùng que cấy lấy một vệt của thể rắn từ ống có sinh khí cho lên trên agar L-EMB. Quan trọng là một phần của mặt thạch xuất hiện những khuẩn lạc tách biệt. Ủ trong 18 – 24 giờ ở 35<sup>0</sup>C. Kiểm tra các đĩa đối với các khuẩn lạc điển hình của *E.coli* tức là hướng tâm màu thẫm có hoặc không có ánh kim loại. Chọn hai khuẩn lạc được cho là dương tính và chuyển chúng vào thạch nghiêng PCA để kiểm tra hoá sinh và hình thái học. Ủ thạch nghiêng PCA trong 18 – 24 giờ ở 35 ±1 oC, sau đó nhuộm màu Gram trên chủng nuôi cấy. Nếu môi trường Gram âm

(dạng hình que ngắn) thực hiện một trong hai sơ đồ thử hoá sinh sau đây:

Sơ đồ 1.A. Thử hoạt tính hoá sinh IMViC:

a. Tính sinh indol: Cấy vào một ống canh trường trypton và ủ trong 24 giờ ở 35<sup>0</sup>C. Thử indol bằng cách thêm 0,2 - 0,3 ml hóa chất Kovacs. Mẫu thử dương tính nếu xuất hiện màu đỏ khác biệt ở lớp chấ lỏng phía trên.

b. Hợp chất phản ứng Voges-Proskauer: Cấy vào một ống canh trường MR-VP và ủ trong 48 giờ ở 35<sup>0</sup>C. Chuyển 1 ml vào 1 ống cỡ 13x100 mm. Thêm 0,6 ml dung dịch alpha-naphthol và 0,2 ml dung dịch KOH 40%, lắc đều. Thêm vài tinh thể creatin. Lắc và để yên 2 giờ. Mẫu thử dương tính nếu màu hồng eosin lan trong môi trường.

c. Hợp chất phản ứng đỏ methyl: Ủ ống MR-VP từ phép thử Voges-Proskauer thêm 48 giờ ở 35<sup>0</sup>C. Thêm 5 giọt dung dịch đỏ methyl vào mỗi ống. Mẫu thử dương tính nếu có màu đỏ khác biệt. Mẫu thử âm tính nếu có màu vàng xuất hiện.

d. Khả năng sử dụng citrat: Cấy nhẹ nhàng vào một ống canh trường Koser citrat; tránh làm đục. Ủ ở 35<sup>0</sup>C trong 96 giờ. Phản ứng dương tính khi độ đục khác biệt tăng lên.

Sơ đồ 1.B. Sử dụng chủng cấy mọc trên thạch nghiêng PCA, cấy chuyển vào 1 ống canh trường LST có chứa lọ Durham và ủ ở 35<sup>0</sup>C trong 48 giờ để kiểm tra sự phân lập có khả năng tạo acid và khí từ quá trình lên men lactose.

Nội suy: Các chủng cấy (a) sinh khí là kết quả của quá trình cấy canh trường LST và tiếp sau ủ trong 24 – 28 giờ ở 35<sup>0</sup>C, (b) xuất hiện như là Gram âm dạng que không sinh bào tử và (c) đưa các dạng IMViC – (typ sinh học 1) hoặc -+- (typ sinh học 2) được xem là E.coli.

Sơ đồ 2. Phân tán bất kỳ khuẩn lạc đang phát triển vào một thể tích nhỏ nước muối 0,85%. Kháng định tính sự phát triển của vi khuẩn bởi các xét nghiệm hóa học được thực hiện thuận tiện bằng cách sử dụng API 20E hoặc dải Micro ID hoặc các hệ thống tương đương. Sau khi hoàn thành các thử nghiệm, xác định định tính các sinh vật từ Sách chỉ dẫn định tính của hệ thống sử dụng và ghi lại kết quả cuối cùng.

*Salmonella*

Sử dụng cellulase để phân rã mẫu gôm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gôm trong suốt quá trình thêm gôm vào canh thang tăng sinh. Chuẩn bị dung dịch cellulase 1% (1 g cellulase trong 99 ml nước) và tiệt trùng bằng cách lọc qua màng 0,45  $\mu\text{m}$  (Dung dịch cellulase có thể bảo quản ở 2 – 5 $^{\circ}\text{C}$  trong 2 tuần). Bổ sung 25 g mẫu gôm vào cốc vô trùng dung tích 250 ml hoặc dụng cụ chứa khác thích hợp. Cho vào 1 lọ nắp xoáy miệng rộng vô trùng hoặc 1 dụng cụ chia khác thích hợp 225 ml canh trường lactose tiệt trùng và 2,25 ml dung dịch cellulase 1% tiệt trùng. Trong khi khuấy canh trường cellulase/lactose bằng máy khuấy từ cho nhanh 25 g mẫu qua phễu thủy tinh vô trùng vào canh trường cellulase/lactose. Đậy nắp dụng cụ chứa chắc chắn và để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng. Nới lỏng nắp đậy và ủ dụng cụ chứa ở 35  $\pm$ 1 oC trong 24  $\pm$ 2 giờ. Siết chặt nắp đậy và lắc nhẹ hỗn hợp mẫu đã ủ; chuyển 1 ml hỗn hợp vào 10 ml canh trường selenit cystin (SC) và 1 ml khác của hỗn hợp cho vào 10 ml canh trường tetrathionat (TT). Ủ trong 24  $\pm$ 2 giờ ở 35oC. Lắc (bằng máy Vortex nếu sử dụng ống) và ria 1 vòng que cấy 3 mm canh trường TT đã ủ trên agar bismuth sulfit (BS), agar xylose lysin desoxycholat (XLD) và agar Hektoen enteric (HE). (Chuẩn bị các đĩa BS một ngày trước khi ria cấy và bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ phòng). Lặp lại đối với canh trường SC với 1 vòng 3 mm của que cấy. Ủ trong 24  $\pm$ 2 giờ ở 35oC. Tiếp tục như được chỉ ra ở Quyển 4, "Kiểm tra các đĩa về sự hiện diện của khuẩn lạc".

*Nấm men và nấm mốc*

Cân 25 g mẫu và thêm vào 2.475 ml nước pepton 0,1% đã tiệt trùng (được chuẩn bị bằng cách cho 1 g pepton vào 1 lít nước cất, khuấy đều cho pepton tan hoàn toàn và hấp tiệt trùng ở 121<sup>0</sup>C trong 15 phút) trong khi khuấy mạnh bằng máy khuấy từ. Khuấy cho đến khi mẫu được tan hoàn toàn. Tỷ lệ pha loãng 1 : 1.000. Dùng pipet đã tiệt trùng lấy 0,1 ml cho vào 10 đĩa CCPDA-D đặc đã được làm trước đó mỗi tấm 0,1 ml (xem dưới đây). Dàn đều lên bề mặt của các đĩa, sử dụng que thủy tinh vô trùng. Ủ đĩa thẳng đứng trong 5 ngày ở 25<sup>0</sup>C, để yên, không dao động.

Sau khi ủ, đếm khuẩn lạc phát triển trên mỗi đĩa sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc và ghi tổng số khuẩn lạc có trên 10 đĩa. Tách nấm men ra khỏi nấm mốc dựa vào hình thái của chúng và đếm riêng. Lấy tổng số khuẩn lạc có trong cả 10 đĩa nhân với 100 để có được CFU/g mẫu. Nếu không có khuẩn lạc nào trên đĩa thì biểu diễn kết quả nhỏ hơn 100 CFU/g.

Môi trường CCPDA-D: Trước tiên chuẩn bị dung dịch gốc dichloran 2% (2,6-dichloran-4-nitroanilin) trong ethanol 95%. Sau đó, thêm một lượng dung dịch gốc dichloran đủ vào PDA để đạt được nồng độ 2,5 mg/l. Thêm chloramphenicol cho đến nồng độ 50 mg/l và hấp tiệt trùng ở 121<sup>0</sup>C trong 15 phút. Làm nguội môi trường đến khoảng 50<sup>0</sup>C trước khi rót đĩa, thêm chlortetracyclin đã được lọc và tiệt trùng đủ để có nồng độ 50 mg/l.

**Phụ lục 9****YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM GUAR**

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	Gôm cyamopsis, guar flour INS 412
<b>2. Định nghĩa</b>	Xuất xứ là nội nhũ được nghiền của các hạt từ cây <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (L) Taub. (Fam. <i>Leguminosae</i> ) chủ yếu bao gồm polysaccharid có trọng lượng phân tử cao (khoảng 50.000 – 8.000.000) gồm có các galactomannan; tỷ lệ mannose: galactose là 2 : 1. Gôm được làm sạch bằng cách rửa với ethanol hoặc isopropanol hoặc hoà trong nước sôi, sau đó lọc, cô và sấy khô.
<i>Mã số C.A.S.</i>	9000-30-0
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng bột rời màu trắng đến màu trắng vàng, gần như không có mùi
<b>4. Chức năng</b>	Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hoá
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Tạo gel</i>	Thêm lượng nhỏ dung dịch natri borat TS vào dung dịch mẫu được làm phân tán bằng nước; gel được hình thành.
<i>Độ nhớt</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của độ nhớt.
<i>Thành phần gồm</i>	Phải có phản ứng đặc trưng của thành phần gồm.
<i>Kiểm tra hiển vi</i>	Nghiền mẫu với dung dịch nước chứa 0,5% iod và 1% kali iodid, phết lên tiêu bản kính và soi bằng kính hiển vi.  Gôm guar chứa các tế bào dạng hạt hình tròn hoặc hình trái lê, tụ thành đám, bên trong chứa các chất có màu vàng đến nâu. (Gôm đậu carob gồm có các nhóm tế bào dạng ống căng dài, tách biệt hoặc có khoảng trống nhỏ. Các thành phần bên trong của gôm đậu carob có màu nâu được hình thành ít hơn so với trong gôm Guar).
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15,0% (nhiệt độ sấy 105 <sup>0</sup> C trong 5 giờ).
<i>Borat</i>	Không phát hiện được.
<i>Tro toàn phần</i>	Không được quá 1,5%
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 7,0%
<i>Protein</i>	Không được quá 10,0%.

*Ethanol và isopropanol* Không được quá 1%, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất (mô tả trong phần Phương pháp thử)

*Chì* Không được quá 2,0 mg/kg.

### 5.3 Các yêu cầu về vi sinh vật

*Tổng số vi sinh vật* Không được quá 5.000 CFU/g

*E. coli* Âm tính đối với mẫu thử

*Salmonella* Âm tính đối với mẫu thử

*Nấm men và nấm mốc* Không được quá 500 CFU/g

## 6. Phương pháp thử

### 6.1. Định tính

*Độ nhớt* Cho 2 g mẫu vào trong cốc dung tích 400 ml và làm ẩm hoàn toàn bằng 4 ml isopropanol. Bổ sung 200 ml nước và khuấy mạnh, tiếp tục khuấy cho đến khi gôm được phân tán đều hoàn toàn. Một dung dịch hơi nhớt màu trắng sữa được hình thành. Chuyển 100 ml dung dịch này vào một cốc khác dung tích 400 ml. Gia nhiệt hỗn hợp trong cách thủy sôi trong 10 phút và làm nguội tới nhiệt độ phòng. Không có sự tăng độ nhớt đáng kể (đây là sự khác biệt giữa gôm guar với gôm đậu carob).

*Thành phần gôm* Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định tính thành phần gôm (FNP 5) sử dụng 100 mg mẫu thay thế cho 200 mg và 1 – 10 µl chất thủy phân thay thế cho 1 – 5 µl. Sử dụng galactose và mannose như là chất chuẩn đối chứng. Các thành phần này cần phải có mặt.

### 6.2. Độ tinh khiết

*Borat* Hoà tan 1 g mẫu trong 100 ml nước. Dung dịch phải giữ được ở dạng lỏng và không tạo gel khi để yên. Trộn vào 10 ml dung dịch acid HCl loãng và cho một giọt hỗn hợp vừa trộn lên trên giấy nghệ. Không được tạo thành đốm nâu đậm dần trong khi sấy và thay đổi thành màu đen lục khi làm ẩm bằng dung dịch ammoniac TS.

*Protein* Tiến hành như hướng dẫn ở phần Định lượng nitrogen (Phương pháp Kjeldahl; FNP5). % protein trong mẫu bằng % nitrogen trong mẫu nhân với 6,25.

*Ethanol và isopropanol*Nguyên tắc:

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

Chuẩn bị mẫu:

Hoà tan 100 mg mẫu trong 10 ml nước sử dụng NaCl như là chất làm phân tán nếu cần.

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l n - propanol

Dung dịch alcol chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l mỗi loại ethanol và isopropanol

Cách tiến hành:

Cân 200 mg ure cho vào một lọ sẫm màu dung tích 25 ml Reacti-flasks, Pierce, Rockford, IL, USA, hoặc tương đương). Làm trong bằng nitrogen trong 5 phút và sau đó thêm 1 ml dung dịch acid oxalic bão hoà, đóng bằng nút cao su và lắc xoáy. Thêm 1 ml dung dịch mẫu, 1 ml dung dịch nội chuẩn và đồng thời bắt đầu bấm giờ (T = 0). Lắc xoáy lọ và đậy nút lại bằng nút xoáy có đệm cao su silicon. Lắc xoáy cho đến khi T = 30 giây. Tại thời điểm T = 45 giây, bơm qua đệm cao su silicon 0,5 ml dung dịch natri nitrit (250 g/l). Lắc mạnh cho đến khi T = 70 giây và ở T = 150 giây hút qua đệm cao su silicon 1 ml không gian hơi sử dụng syringe khoá áp (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, Louisiana, USA, hoặc tương đương).

Sắc ký khí:

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

Sử dụng các điều kiện sau:

- Cột: thuỷ tinh (đường kính trong 4 mm, chiều dài 90 cm)
- Chất nhồi: 15 cm đầu được nhồi bằng chrompack (hoặc tương đương) và phần còn lại được nhồi bằng Porapak R 120 -150 mesh (hoặc tương đương)
- Khí mang: nitrogen (tốc độ dòng: 80 ml/phút)
- Detector: ion hoá ngọn lửa
- Nhiệt độ: cổng bơm 250<sup>0</sup>C, cột 150<sup>0</sup>C đẳng nhiệt

Tính kết quả:

Định lượng ethanol và isopropanol có mặt trong mẫu bằng cách so sánh các diện tích pic với các pic thu được nhờ sắc ký khí không gian hơi được hình thành do thay thế 1 ml dung dịch chuẩn alcol cho 1 ml dung dịch mẫu trong cách tiến hành nêu ở trên.



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.

### 5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

#### Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ vào mỗi đĩa petri 12 – 15 ml agar trước đó được làm nguội đến 44 – 46<sup>0</sup>C. Trộn đều bằng cách quay lần lượt và di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông đặc. Đảo ngược các đĩa và ủ trong 48 ±2 giờ ở 35 ±1 °C.

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

#### *E. coli*

Sử dụng cellulase để phân giải mẫu gôm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gôm trong suốt quá trình thêm gôm vào canh trường tăng sinh. Chuẩn bị dung dịch cellulase 1% (1 g cellulase trong 99 ml nước) và tiệt trùng bằng cách lọc qua màng 0,45 µm (Dung dịch cellulase có thể bảo quản ở 2 – 5<sup>0</sup>C trong 2 tuần) cho vào ống tiệt trùng có chứa 9 ml canh trường có lauryl sulfat tryptose (LST) vô trùng, thêm vào 0,1 ml dung dịch cellulase 1% tiệt trùng. Bổ sung 1 g mẫu gôm vào ống và lắc mạnh bằng máy lắc Vortex để phân tán đều mẫu. Ủ ống trong 24 – 48 giờ ở 35 ±1 °C. Sau 24 giờ, lắc nhẹ ống và kiểm tra sự tạo khí tức là sự sủi bọt. Lại ủ thêm 24 giờ nếu quan sát không thấy khí thoát ra. Kiểm tra khí lần 2. Thực hiện kiểm tra xác nhận kết quả được cho là dương tính (khi có khí được sinh ra) như sau:

Lắc nhẹ ống LST có bọt khí và chuyển lấy một que cấy của thể rắn vào một ống chứa 10 ml canh trường EC và một lọ lên men (Durham). Ủ ống EC trong 24 – 48 giờ ở 45,5 ±2 °C. Sau 24 giờ kiểm tra sự tạo khí; nếu âm tính, kiểm tra lại sau 48 giờ. Dùng que cấy lấy một vệt của thể rắn từ ống có sinh khí ria trên agar L-EMB. Quan trọng là một phần của mặt thạch xuất hiện những khuẩn lạc tách biệt. Ủ trong 18 – 24 giờ ở 35<sup>0</sup>C. Kiểm tra các đĩa đối với các khuẩn lạc điển hình của *E.coli* tức là hướng tâm màu sẫm có hoặc không có ánh kim loại. Chọn hai khuẩn lạc được cho là dương tính và chuyển chúng vào thạch nghiêng PCA để kiểm tra hoá sinh và hình thái học. Ủ thạch nghiêng PCA trong 18 – 24

giờ ở  $35 \pm 1$  °C, sau đó nhuộm màu Gram chủng đã cấy. Nếu chủng cấy Gram âm (dạng hình que ngắn) thực hiện một trong hai sơ đồ thử hoá sinh sau đây:

Sơ đồ 1.1. Thử hoạt tính hoá sinh IMViC:

a. Tạo indol: Cấy vào một ống canh trường trypton và ủ trong 24 giờ ở  $35^{\circ}\text{C}$ . Thử indol bằng cách thêm 0,2 - 0,3 ml hóa chất Kovacs. Mẫu thử dương tính nếu xuất hiện màu đỏ khác biệt ở lớp chất lỏng phía trên.

b. Hợp chất phản ứng Voges-Proskauer: Cấy vào một ống canh trường MR-VP và ủ trong 48 giờ ở  $35^{\circ}\text{C}$ . Chuyển 1 ml tới ống 13x100 mm. Thêm 0,6 ml dung dịch alpha-naphthol và 0,2 ml dung dịch KOH 40%, lắc đều. Thêm vài tinh thể creatin. Lắc và để yên 2 giờ. Mẫu thử dương tính nếu màu hồng eosin lan trong môi trường.

c. Hợp chất phản ứng đỏ methyl: Ủ ống MR-VP từ phép thử Voges-Proskauer thêm 48 giờ ở  $35^{\circ}\text{C}$ . Thêm 5 giọt dung dịch đỏ methyl vào mỗi ống. Mẫu thử dương tính nếu có màu đỏ khác biệt. Mẫu thử âm tính nếu có màu vàng xuất hiện.

d. Khả năng sử dụng citrat: Cấy nhẹ nhàng một ống canh trường Koser citrat; tránh làm đục. Ủ ở  $35^{\circ}\text{C}$  trong 96 giờ. Phản ứng dương tính khi độ đục khác biệt tăng lên.

Phương án 1.2. Sử dụng chủng cấy lên thạch nghiêng PCA, cấy lại ống canh trường LST có chứa lọ Durham và ủ ở  $35^{\circ}\text{C}$  trong 48 giờ để kiểm tra chủng phân lập có khả năng tạo acid và khí từ quá trình lên men lactose.

Nội suy: Các chủng cấy (a) sinh khí là kết quả của quá trình cấy canh trường LST và sau ủ trong 24 – 28 giờ ở  $35^{\circ}\text{C}$ , (b) xuất hiện như là Gram âm dạng que không sinh bào tử và (c) cho các dạng IMViC – (typ sinh học 1) hoặc +- (typ sinh học 2) được xem là *E.coli*.

Sơ đồ 2. Phân tán bất kỳ khuẩn lạc đang phát triển vào một thể tích nhỏ nước muối 0,85%. Khẳng định định tính các vi khuẩn mọc bởi các xét nghiệm hóa học được thực hiện thuận tiện bằng cách sử dụng API 20E hoặc dải Micro ID hoặc các hệ thống tương đương. Sau khi hoàn thành các thử nghiệm, xác định định tính các sinh vật từ Sách chỉ dẫn định tính của hệ thống sử dụng và ghi lại kết quả cuối cùng.

### *Salmonella*

Sử dụng cellulase để phân rã mẫu gồm trước khi phân tích là cần thiết để tránh tạo gel của gồm trong suốt quá trình thêm gồm vào canh thang tăng sinh. Chuẩn bị dung dịch cellulase 1% (1 g cellulase trong 99 ml nước) và tiệt trùng bằng cách lọc qua màng 0,45  $\mu\text{m}$  (Dung dịch cellulase có thể bảo quản ở  $2 - 5^{\circ}\text{C}$  trong 2 tuần). Bổ sung 25 g mẫu gồm vào cốc vô trùng dung tích 250 ml hoặc dụng cụ chứa khác thích hợp. Cho 225 ml canh trường lactose tiệt trùng và 2,25 ml dung dịch cellulase 1% tiệt trùng vào 1 lọ nắp xoáy, miệng rộng dung tích 500 ml vô trùng. Trong khi khuấy mạnh canh trường cellulase/lactose bằng máy khuấy

từ, cho nhanh 25 g mẫu qua phễu thủy tinh vô trùng vào canh trường cellulase/lactose này. Đậy chặt nắp lọ chứa chắc chắn và để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng. Nới lỏng nắp đậy và ủ lọ chứa ở  $35 \pm 1$  °C trong  $24 \pm 2$  giờ. Siết chặt nắp đậy và lắc nhẹ hỗn hợp mẫu đã ủ; chuyển 1 ml hỗn hợp vào 10 ml canh trường selenit cystin (SC) và 1 ml khác của hỗn hợp cho vào 10 ml canh trường tetrathionat (TT). Ủ trong  $24 \pm 2$  giờ ở  $35^\circ\text{C}$ . Lắc (bằng máy Vortex, nếu sử dụng ống) và ria cấy 1 vòng que cấy (3 mm) canh trường TT đã ủ lên thạch agar bismuth sulfit (BS), agar xylose lysin desoxycholat (XLD) và agar Hektoen enteric (HE). (Chuẩn bị các đĩa BS một ngày trước khi ria cấy và bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ phòng). Lặp lại đối với canh trường SC bằng cách ria một vòng cấy 3 mm. Ủ trong  $24 \pm 2$  giờ ở  $35^\circ\text{C}$ . Tiếp tục như được chỉ dẫn ở trang 221 – 226 của Sách hướng dẫn kỹ thuật, "FAO Food and Nutrition Paper" số 5 tái bản lần 2, Rome 1991, "Kiểm tra các đĩa về sự hiện diện các khuẩn lạc".

#### *Nấm men và nấm mốc*

Cân 25 g mẫu và thêm vào 2.475 ml nước pepton 0,1% tiệt trùng (được chuẩn bị bằng cách cho 1 g pepton vào 1 lít nước cất, khuấy đều cho pepton tan hoàn toàn và hấp tiệt trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 15 phút) trong khi khuấy mạnh bằng máy khuấy từ. Khuấy cho đến khi mẫu được tan hoàn toàn. Tỷ lệ pha loãng là 1 : 1.00. Dùng pipet đã tiệt trùng lấy 0,1 ml cho vào 10 đĩa CCPDA-D đặc đã được làm trước đó mỗi đĩa 0,1 ml (xem dưới đây). Dàn đều lên bề mặt của các đĩa, sử dụng que thủy tinh vô trùng. Ủ đĩa thẳng đứng trong 5 ngày ở  $25^\circ\text{C}$ , để yên.

Sau khi ủ, đếm khuẩn lạc phát triển trên mỗi đĩa sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc và ghi tổng số khuẩn lạc có trên 10 đĩa. Tách nấm men ra khỏi nấm mốc dựa vào hình thái của chúng và đếm chúng riêng. Lấy tổng số khuẩn lạc có trong cả 10 đĩa nhân với 100 để có số CFU/g mẫu. Nếu không có khuẩn lạc nào trên các đĩa thì biểu diễn kết quả nhỏ hơn 100 CFU/g.

Môi trường CCPDA-D: Trước tiên chuẩn bị dung dịch gốc dichloran 2% (2,6-dichloran-4-nitroanilin) trong ethanol 95%. Sau đó, thêm một lượng dung dịch gốc dichloran vừa đủ vào PDA để đạt được nồng độ 2,5 mg/l. Thêm chloramphenicol cho đến nồng độ 50 mg/l và hấp tiệt trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 15 phút. Làm nguội môi trường đến khoảng  $50^\circ\text{C}$  trước khi rót đĩa, thêm chlortetracyclin đã được lọc và tiệt trùng đủ để có nồng độ 50 mg/l.

**Phụ lục 10****YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM TRAGACANTH**

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	INS 413
<b>2. Định nghĩa</b>	Thu được từ việc sấy khô dịch tiết ra của thân và cành cây <i>Astragalus gummifer</i> Labillardiere và các loài thuộc Châu Á khác của <i>Astragalus</i> (Fam. <i>Leguminosae</i> ); chủ yếu bao gồm các polysaccharid có khối lượng phân tử cao (galactoarban và polysaccharid có tính acid), Gôm Tragacanth thủy phân tạo ra acid galacturonic, galactose, arabinose, xylose và fucose; một lượng nhỏ rhamnose và glucose (được chuyển hoá từ các vết tinh bột hoặc cellulose).
<i>Mã số C.A.S.</i>	9000-65-1
<b>3. Cảm quan</b>	Gôm không nghiền ở dạng mảnh dẹt, lá, phẳng hoặc cong hoặc dạng mảnh xoắn có độ dày 0,5 – 2,5 mm và dài tới 3 cm; màu trắng tới vàng nhạt, nhưng một số mảnh có thể có màu đỏ nhạt; các mảnh cứng, dễ gãy nhỏ; không mùi. Gôm dạng bột màu trắng cho đến vàng nhạt hoặc màu nâu hơi hồng (màu nâu vàng nhạt). Các chế phẩm thương mại có thể chứa các vật lạ như mảnh vỏ cây thì phải loại bỏ trước khi sử dụng cho thực phẩm. Các mẫu không nghiền phải được tạo thành bột và cho qua rây số 45 (335 M) và trộn đều trước khi tiến hành bất kỳ một phép thử nào sau đây.
<b>4. Chức năng</b>	Chất nhũ hoá, chất ổn định, chất làm dày
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	1 g mẫu trong 50 ml nước tương nở tạo thành dịch đặc nhầy, trơn, màu trắng đục; không tan trong ethanol và không tương nở trong ethanol 60% (w/v).
<i>Kiểm tra hiển vi</i>	Xác định bằng kính hiển vi huyền phù của mẫu pha trong nước. Nhiều mảnh góc cạnh với các dạng lá mỏng không đều hoặc tròn, các hạt tinh bột đường kính tới 15 µm và các màng tế bào phân tầng chuyển thành màu tím nhìn thấy được bằng cách thêm dung dịch kẽm clorid có chứa iod.
<i>Tạo kết tủa</i>	Các mẫu tạo ra phản ứng kết tủa với dung dịch đồng (II) acetat bão hoà trong nước.
<i>Thành phần gôm</i>	Định tính arabinose, xylose, fucose, galactose và acid galacturonic bằng cách sau : Tiến hành như hướng dẫn ở phần « Định tính thành phần gôm » sử dụng các chất chuẩn đối chứng : arabinose, mannose, galactose, xylose, fucose, acid galacturonic và acid glucuronic. Arabinose, xylose, fucose, galactose và acid galacturonic cần phải có trong mẫu và mannose và acid glucuronic cần phải không hiện diện.
5.2. Độ tinh khiết	

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 16% (nhiệt độ sấy 105 <sup>0</sup> C trong 5 giờ).
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 4%
<i>Tro không tan trong acid</i>	Không được quá 0,5%.
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 2%.
<i>Gôm acacia và các gôm tan khác</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Agar</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Dextrin</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Gôm karaya</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Chi</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Salmonella spp.</i>	Âm tính trong 1 g mẫu thử
<i>E. coli</i>	Âm tính trong 1 g mẫu thử

**6. Phương pháp thử**

**Độ tinh khiết**

<i>Tro không tan trong acid</i>	Đun sôi tro thu được theo hướng dẫn Tro sulfat ở trên với 25 ml dung dịch acid HCL 3M trong 5 phút, thu lấy phần chất không tan lên trên một chén lọc đã cân bì hoặc giấy lọc không tro đã biết trọng lượng, rửa bằng nước nóng, đốt và cân. Tính phần trăm tro không tan trong acid theo khối lượng mẫu.
<i>Chất không tan trong acid</i>	Cho 2 g gôm tragacanth và 95 ml methanol vào 1 bình đáy tròn dung tích 250 ml. Làm ẩm bột bằng cách lắc xoáy và thêm 80 ml dung dịch acid HCl. Thêm vài hạt thủy tinh chống bọt có đường kính khoảng 4 mm và đun hồi lưu trong cách thủy trong 3 giờ. Loại các hạt thủy tinh chống bọt ra và lọc hút chân không trong khi nóng qua phễu lọc thủy tinh xốp đã biết trọng lượng. Rửa bình bằng một lượng nhỏ nước và cho phần nước rửa đó qua phễu lọc. Rửa phần cặn trên phễu lọc bằng 40 ml methanol và sấy khô ở 110 <sup>0</sup> C tới trọng lượng không đổi. Để nguội trong bình hút ẩm và cân. Tính phần trăm chất không tan trong acid theo khối lượng mẫu.
<i>Gôm acacia và các gôm tan khác</i>	Cho 10 ml dung dịch Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> vào 20 ml dung dịch mẫu 0,25% (khối lượng/thể tích) trong nước mới đun sôi để

	<p>ngươi. Kết tủa thành cụm được tạo thành. Lọc và thêm 10 ml dung dịch <math>\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{Pb}(\text{OH})_2</math> vào dịch lọc. Dung dịch có thể bị vẩn đục nhẹ mà không tạo thành kết tủa.</p>
<i>Agar</i>	<p>Cho 0,5 ml dung dịch acid HCl vào 4 ml dung dịch mẫu 0,5% (khối lượng/thể tích) trong nước và gia nhiệt trong cách thủy sôi trong 30 phút. Thêm vài giọt dung dịch <math>\text{BaCl}_2</math> 3,65% (khối lượng/thể tích). Không có kết tủa được hình thành.</p>
<i>Dextrin</i>	<p>Tạo mẫu trong dung dịch nước glycerol và kiểm tra dưới kính hiển vi. Bổ sung 1% dung dịch iod, không phát hiện các hạt màu vàng nâu hoặc đỏ tía.</p>
<i>Gôm karaya</i>	<p>(a) Đun sôi 1 g mẫu với 20 ml nước cho đến khi dịch nhầy được hình thành. Thêm 5 ml dung dịch acid HCl và lại đun sôi trong 5 phút. Không có màu hồng hoặc màu đỏ bèn lộ rõ.</p> <p>(b) Lắc 0,2 g mẫu với 10 ml ethanol 60% trong 1 ống đong đầy nắp dung tích 10 ml có vạch chia độ 0,1 ml. Bất kỳ gel nào được hình thành cũng không được vượt quá 1,5 ml.</p> <p>(c) Lắc 1 g mẫu với 99 ml nước. Chuẩn độ dịch nhầy được hình thành bằng dung dịch NaOH 0,01M, sử dụng dung dịch đỏ methyl làm chất chỉ thị. Không quá 5,0 ml dung dịch NaOH 0,01M được dùng để làm thay đổi màu của dung dịch.</p>
<i>Chi</i>	<p>- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4.</p> <p>- 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.</p>

## Phụ lục 11

## YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM ARABIC

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	Gôm arabic ( <i>Acacia senegal</i> ), gôm arabic ( <i>Acacia seyal</i> ), Acacia gum, arabic gum, INS 414
<b>2. Định nghĩa</b>	Thu được từ việc sấy khô dịch tiết ra của thân và cành cây <i>Acacia senegal</i> (L) Willdenow hoặc <i>Acacia seyal</i> (fam. Leguminosae). Gôm arabic chủ yếu bao gồm các polysaccharid có trọng lượng phân tử cao và các muối Ca, Mg, K của chúng, khi thủy phân tạo ra arabinose, galactose, rhamnose và acid glucuronic. Các chế phẩm thương mại có thể gồm cả các chất lạ như cát và các mảnh vỏ cây, các chất này phải được loại bỏ trước khi cho vào thực phẩm.
<i>Mã số C.A.S.</i>	9000-01-5
<b>3. Cảm quan</b>	Gôm arabic ( <i>Acacia senegal</i> ) là chất rắn có màu trắng nhạt đến nâu da cam, khi bẻ gãy tạo các khe gãy trong. Dạng tốt nhất là dạng hạt hình cầu có các kích cỡ khác nhau với kết cấu bề mặt sần sùi. Khi nghiền, các mảnh có màu trắng nhạt hơn và xuất hiện màu trắng trong. Gôm arabic ( <i>Acacia seyal</i> ) giòn hơn gôm arabic ( <i>Acacia senegal</i> ) có các hạt dạng hình cầu. Gôm arabic có sẵn trên thị trường ở dạng vảy màu trắng đến trắng ngà, dạng hạt, dạng bột, dạng ống hoặc dạng nguyên liệu được sấy phun. Dung dịch nước 1 g trong 2 ml chảy dễ dàng và có tính acid khi thử bằng quỳ.
<b>4. Chức năng</b>	Chất nhũ hoá, chất ổn định, chất làm dày
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	1 g hoà tan trong 2 ml nước; không tan trong ethanol
<i>Thành phần gôm</i>	Tiến hành như hướng dẫn ở phần « Định tính thành phần gôm » (FNP 5) sử dụng các chất chuẩn đối chứng : arabinose, galactose, mannose, rhamnose, acid galacturonic, acid glucuronic và xylose. Phải có arabinose, galactose, rhamnose và acid glucuronic; không có các vết phụ tương ứng với mannose, xylose và acid galacturonic.
<i>Quay quang học</i>	Gôm từ <i>A. senegal</i> : dung dịch tan trong nước quay trái Gôm từ <i>A. seyal</i> : dung dịch tan trong nước quay phải Thử một dung dịch mẫu, chuẩn bị bằng cách cho 10 g mẫu (chế phẩm khô) vào 100 ml nước (nếu cần thiết, trước đó lọc qua giấy lọc số 42 hoặc phễu lọc có kích thước lỗ 0,8 µm), sử dụng ống có chiều dài 200 mm.
5.2. Độ tinh khiết	

<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15% (nhiệt độ sấy 105 <sup>0</sup> C trong 5 giờ) đối với dạng hạt và không được quá 10% (nhiệt độ sấy 105 <sup>0</sup> C trong 4 giờ) đối với dạng chế phẩm sấy phun. Các mẫu chưa nghiền cần phải nghiền thành bột và qua rây số 40, trộn đều trước khi cân.
<i>Tro toàn phần</i>	Không vượt quá 4,0%
<i>Tro không tan trong acid</i>	Không được quá 0,5%
<i>Chất không tan trong acid</i>	Không được quá 1,0%
<i>Tinh bột hoặc dextrin</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Gôm có tanin</i>	Đạt yêu cầu (mô tả trong phần Phương pháp thử)
<i>Chi</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.

5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Salmonella spp.</i>	Âm tính đối với mẫu thử
<i>E. coli</i>	Âm tính trong 1 g mẫu thử

**6. Phương pháp thử**

<i>Tinh bột hoặc dextrin</i>	Đun sôi dung dịch mẫu 2%, làm nguội và thêm vài giọt iod TS. Không có màu ánh xanh hoặc ánh đỏ được hình thành.
<i>Gôm có tanin</i>	Thêm 0,1 ml dung dịch sắt (III) clorid TS vào 10 ml dung dịch mẫu 2%. Không nhuộm màu đen hoặc tạo kết tủa đen.
<i>Chi</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.



## Phụ lục 12

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

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	INS 415
<b>2. Định nghĩa</b>	Gôm xanthan là polysaccharid có khối lượng phân tử cao được sản xuất bởi quá trình lên men cacbonhydrat với chủng vi khuẩn thuần khiết <i>Xanthomonas campestris</i> , làm sạch bằng cách thu hồi với ethanol hoặc isopropanol, sấy khô và nghiền; có chứa D – glucose và D – mannose là các đơn vị hexose chiếm ưu thế, cùng với acid D – glucuronic và acid pyruvic, và được xử lý như muối Na, K hoặc Ca; các dung dịch của gôm xanthan trung tính.
<i>Mã số C.A.S.</i>	11138-66-2
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng bột màu kem.
<b>4. Chức năng</b>	Chất làm dày, chất ổn định, chất nhũ hoá, chất tạo bọt
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Tan trong nước; không tan trong ethanol
<i>Tạo gel</i>	Phải có phản ứng tạo gel đặc trưng.
5.2. Độ tinh khiết	
<i>Giảm khối lượng khi sấy khô</i>	Không được quá 15% (nhiệt độ sấy 105 <sup>0</sup> C trong 2,5 giờ).
<i>Tro toàn phần</i>	Không được quá 16% sau khi sấy
<i>Acid pyruvic</i>	Không được nhỏ hơn 1,5% Xem mô tả trong phần Phương pháp thử - Định tính
<i>Nitrogen</i>	Không được quá 1,5% Tiến hành theo phương pháp Kjeldahl
<i>Ethanol và isopropanol</i>	Không được quá 500 mg/kg, ở dạng đơn chất hoặc hợp chất Xác định theo mô tả ở phần Phương pháp thử - Định tính
<i>Chì</i>	Không được quá 2 mg/kg. Xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử phù hợp với từng mức độ. Lựa chọn lượng mẫu và phương pháp xử lý mẫu dựa vào các nguyên tắc của phương pháp được mô tả trong Quyển 4, « Các phương pháp công cụ»
5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật	
<i>Tổng số vi sinh vật</i>	Không được quá 5.000 CFU/g

<i>E.coli</i>	Âm tính đối với mẫu thử
<i>Salmonella</i>	Âm tính đối với mẫu thử
<i>Nấm men và nấm mốc</i>	Không được quá 500 CFU/g Xem mô tả dưới phần Phương pháp thử - Định tính
5.4. Hàm lượng	Hàm lượng tính theo chế phẩm khô, không được nhỏ hơn 4,2% và không được quá 5,4% CO <sub>2</sub> , tương ứng với 91,0% – 117,0% gồm xanthan.

## 6. Phương pháp thử

### 6.1. Định tính

#### *Tạo gel*

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

### 6.2. Độ tinh khiết

*Acid pyruvic*

## Chuẩn bị mẫu :

Cân 600 mg mẫu chính xác đến 0,1 mg và hoà tan với lượng nước đủ đến 100 ml. Chuyển 10 ml dung dịch vào 1 bình thủy tinh có nút mài dung tích 50 ml. Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch HCl N cho vào bình, cân bình và gia nhiệt để đun sôi với sinh hàn ngược trong 3 giờ, chú ý để ngăn tổn thất do bay hơi. Làm nguội tới nhiệt độ phòng và thêm nước cho bù lượng bị tổn thất trong quá trình đun. Dùng pipet lấy 1 ml dung dịch 2,4-dinitrophenylhydrazin 0,5% trong acid HCl 2N cho vào phễu tách dung tích 30 ml, sau đó thêm 2 ml dung dịch mẫu, khuấy đều và để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Chiết hỗn hợp bằng 5 ml ethyl acetat và loại bỏ lớp nước. Chiết hydrazon từ ethyl acetat bằng ba phần 5 ml dung dịch  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  TS, lấy phần chiết được cho vào bình định mức dung tích 50 ml. Pha tới thể tích 50 ml bằng dung dịch  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  TS và lắc đều.

Chuẩn bị chuẩn:

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

## Cách tiến hành :

Đo độ hấp thụ của mỗi dung dịch với máy quang phổ trong các ống đo 1 cm ở bước sóng có hấp thụ cực đại 375 nm, sử dụng  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  TS cho mẫu trắng. Độ hấp thụ của « Dung dịch mẫu » bằng hoặc lớn độ hấp thụ của « Dung dịch chuẩn ».

*Ethanol và isopropanol*Nguyên tắc:

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

Chuẩn bị mẫu:

Hoà tan 100 mg mẫu trong 10 ml nước sử dụng NaCl như là chất làm phân tán nếu cần.

Dung dịch nội chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l n - propanol

Dung dịch alcol chuẩn:

Chuẩn bị dung dịch nước chứa 50 mg/l mỗi loại ethanol và isopropanol

Cách tiến hành:

Cân 200 mg ure cho vào lọ sẫm màu dung tích 25 ml Reacti-flasks, Pierce, Rockford, IL, USA, hoặc tương đương). Làm trong bằng nitrogen trong 5 phút và sau đó thêm 1 ml dung dịch acid oxalic bão hoà, đóng bằng nút cao su và lắc xoáy. Thêm 1 ml dung dịch mẫu, 1 ml dung dịch nội chuẩn và đồng thời bắt đầu bấm giờ (T = 0). Lắc xoáy lọ và đẩy nút lại bằng nút xoáy có đệm cao su silicon. Lắc xoáy cho đến khi T = 30 giây. Tại thời điểm T = 45 giây, bơm qua đệm cao su silicon 0,5 ml dung dịch natri nitrit pha trong nước (250 g/l). Lắc mạnh cho đến khi T = 70 giây và ở T = 150 giây hút qua đệm cao su silicon 1 ml từ không gian hơi sử dụng syringe khoá áp (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, Louisiana, USA, hoặc tương đương).

Sắc ký khí:

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

Sử dụng các điều kiện sau:

- Cột: thuỷ tinh (đường kính trong 4 mm, chiều dài 90 cm)
- Chất nhồi: 15 cm đầu được nhồi bằng chrompack (hoặc tương đương) và phần còn lại được nhồi bằng Porapak R 120 -150 mesh (hoặc tương đương)
- Khí mang: nitrogen (tốc độ dòng: 80 ml/phút)
- Detector: ion hoá ngọn lửa
- Nhiệt độ: cổng bơm 250<sup>0</sup>C, cột 150<sup>0</sup>C đẳng nhiệt

Tính kết quả:

Định lượng ethanol và isopropanol có mặt trong mẫu bằng cách so sánh các diện tích pic với các pic tương ứng thu được từ sắc đồ không gian hơi được hình thành do thay thế 1 ml dung dịch chuẩn alcol cho 1 ml dung dịch mẫu trong cách tiến hành nêu ở trên.

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.

### 6.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

#### Tổng số vi sinh vật

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch trên cho vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ vào mỗi đĩa petri 12 – 15 ml thạch PCA trước đó được làm nguội đến 44 – 46<sup>o</sup>C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông lại. Lật ngược các đĩa và ủ trong 48 ±2 giờ ở 35 ±1 °C.

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

#### *E.coli*

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

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

Các môi trường nuôi cấy

## Canh trường GN (Canh trường Gram âm)

Pepton 20 g

Dextrose 1,0 g

Mannitol 2,0 g

Natri citrat 5,0 g

Natri deoxycholat 0,5 g

Dikali phosphat (hai bazơ) 4,0 g

Monokali phosphat (một bazơ) 1,5 g

Natri chlorid 5,0 g

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

*Salmonella*

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

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

*Nấm men và nấm mốc*

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

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

6.4. Định lượng

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

## Phụ lục 13

## YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM KARAYA

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



## 5.2. Độ tinh khiết

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

## 5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Salmonella spp.</i>	Âm tính trong 1g mẫu
<i>E.coli</i>	Không được có trong 1g mẫu

## 6. Phương pháp thử

## 6.1. Định tính

<i>Tạo kết tủa</i>	Lắc 1g mẫu thử với 80ml nước trong 24 giờ. Đun sôi 4ml dịch nhầy thu được với 0,5ml acid hydrocloric đặc, thêm 1ml dung dịch natri hydroxyd 5M, lọc. Lấy dịch lọc, thêm 3ml dung dịch kali đồng tartrat, đun nóng. Phải xuất hiện kết tủa đỏ.
<i>Phản ứng màu</i>	Đun 1g mẫu thử với 20ml nước đến khi tạo nhầy, thêm 5ml acid hydrocloric, tiếp tục đun hỗn hợp trong 5 phút, phải xuất hiện màu đỏ hoặc hồng bèn. Làm ấm 0,5g mẫu thử với 2ml natri hydroxyd 5M, phải xuất hiện màu nâu.

## 6.2. Độ tinh khiết

<i>Tro không tan trong acid</i>	Cân 3g (chính xác đến 0,1 mg) mẫu thử trong một chén nung đã cân bì. Nung tại nhiệt độ thấp (khoảng 550°), không được nung quá lửa, đến khi tro hóa hoàn toàn, để nguội trong bình hút ẩm và cân. Nếu tro chưa sạch carbon, tầm ướt tro, lọc lấy phần không tan trên giấy lọc không tro, cho cả giấy lọc và cặn vào chén nung, nung đến khi thu được tro trắng hoặc gần trắng. Gộp tro với phần dịch lọc và cho bay hơi đến khô rồi nung đến độ đỏ thẫm. Nếu tro vẫn không sạch carbon, để nguội chén nung, thêm 15ml ethanol, dùng đũa thủy tinh phá vỡ khối tro, đốt hết ethanol và lại nung đến độ đỏ thẫm, sau đó để nguội. Đun sôi tro thu được với 25ml acid hydrocloric loãng (TS) trong 5 phút. Lọc lấy phần không tan trên phễu Gooch đã cân bì hoặc giấy lọc không tro, rửa
---------------------------------	---

cặn bằng nước nóng, nung, để nguội và cân. Tính hàm lượng % tro không tan trong acid theo khối lượng mẫu đã cân.

*Chất không tan trong acid*

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

*Acid bay hơi*

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

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

*Tinh bột*

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

*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.

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

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

<i>Độ nhớt</i>	Cân 2 g mẫu thử vào cốc 400 ml, tẩm ướt bằng khoảng 4 ml isopropanol. Thêm 200 ml nước, vừa thêm vừa khuấy mạnh đến khi gôm phân tán hoàn toàn tạo thành dung dịch có độ nhớt trung bình, đục như sữa (độ nhớt của dung dịch này kém dung dịch gôm guar nhưng nhớt hơn dung dịch gôm đậu carob khi chuẩn bị cùng trong điều kiện như trên). Chuyển 100 ml dung dịch này sang cốc 400 ml khác, đun nóng hỗn hợp trong bể cách thủy nước sôi trong 10 phút và làm mát đến nhiệt độ phòng. Độ nhớt của dung dịch tăng một cách rõ rệt.
<i>Các thành phần của gôm</i>	Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận định tính xác thành phần của gôm, sử dụng galactose và mannose làm chuẩn. Phải phát hiện thấy galactose và mannose.
<i>Kiểm tra vi phẫu</i>	Cho một ít bột mẫu vào trong dung dịch chứa 0,5% iod và 1% kali iodid trên một lam kính, tiến hành soi dưới kính hiển vi. Gôm tara chứa các nhóm tế bào hình trái lê hoặc tròn có màu vàng đến nâu. (các tế bào gôm guar có hình dạng tương tự nhưng kích thước lớn hơn. Trong khi đó tế bào của gôm đậu carob hình ống dài, tách rời nhau hoặc giữa chúng có khe nhỏ rất dễ phân biệt với gôm tara.
<b>6.2. Độ tinh khiết</b>	
<i>Protein</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Tiến hành theo hướng dẫn trong chuyên luận Xác định nitrogen (phương pháp Kjeldahl). - Hàm lượng % của nitrogen xác định được nhân với 5,7 để thu được hàm lượng % protein trong mẫu thử.
<i>Tinh bột</i>	Thêm vào dung dịch mẫu thử (1/10) vài giọt dung dịch iod (TS) . Dung dịch không được xuất hiện màu xanh lam.
<i>Chi</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.



**Phụ lục 15****YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI GÔM GELLAN**

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

<i>Nấm men và nấm mốc</i>	Không được quá 400 khuẩn lạc/g
5.4. Hàm lượng	Không được nhỏ hơn 3,3% và không được quá 6,8% CO <sub>2</sub> tính theo chế phẩm khô.

## 6. Phương pháp thử

### 6.1. Định tính

*Tạo gel với ion calci* Cho 1,0 g mẫu vào 99 ml nước và khuấy trong 2 giờ, sử dụng máy khuấy có cánh khuấy kiểu chân vịt. Dùng pipet lấy một lượng nhỏ dung dịch này cho vào dung dịch CaCl<sub>2</sub> 10%. Gel dạng sợi dai được hình thành ngay lập tức.

*Tạo gel với ion natri* Cho 1,0 g mẫu vào 99 ml nước và khuấy trong 2 giờ, sử dụng máy khuấy có cánh khuấy kiểu chân vịt. Thêm 0,5 g NaCl, gia nhiệt đến 80<sup>0</sup>C đồng thời khuấy, và giữ ở 80<sup>0</sup>C trong 1 phút. Để dung dịch nguội đến nhiệt độ phòng. Gel cứng chắc được hình thành.

### 6.2. Độ tinh khiết

*Isopropyl alcol*Dung dịch chuẩn isopropyl alcol (IPA):

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

Dung dịch chuẩn tert - butyl alcol (TBA):

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

Dung dịch hỗn hợp chuẩn:

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

Chuẩn bị mẫu:

Cho 1 ml nhũ tương chống tạo bọt thích hợp như Dow-Corning G-10 hoặc loại tương đương vào 200 ml nước được đựng trong bình chưng cất đáy tròn dung tích 1.000 ml. Thêm vào 5 g mẫu và lắc bình trong 1 giờ trên máy lắc có xoáy. Nối bình với cột phân đoạn và cắt khoảng 100 ml; điều chỉnh nhiệt để bọt không trào vào cột. Thêm 4,0 ml dung dịch chuẩn TBA vào dịch cất để có được Dung dịch mẫu thử.

Cách tiến hành:

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

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

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

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

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

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



*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.

### 6.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

#### *Tổng số vi sinh vật*

Dùng kỹ thuật vô trùng, pha 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy để hoà tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri riêng biệt, cặp đôi và đánh dấu thích hợp. Đổ lên dịch mẫu trong mỗi đĩa petri 12 – 15 ml agar trước đó được làm nguội đến 44 – 46<sup>0</sup>C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều đi chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông lại. Lật ngược các đĩa và ủ trong 48 ±2 giờ ở 35 ±1 °C.

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

*E.coli*

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

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

Các môi trường

Canh trường GN (Canh trường Gram âm)

Pepton 20 g

Dextrose 1,0 g

Mannitol 2,0 g

Natri citrat 5,0 g

Natri deoxycholat 0,5 g

Dikali phosphat 4,0 g

Monokali phosphat 1,5 g

Natri chlorid 5,0 g

Pha thành 1 l bằng nước khử ion, pH =  $7,0 \pm 0,2$  ở 25°C

*Salmonella*

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

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

*Nấm men và nấm mốc*

Sử dụng kỹ thuật vô trùng, phân tán 1 g mẫu trong 99 ml dung dịch đệm phosphat và dùng Stomacher, máy lắc hoặc máy khuấy cho đến khi tan hoàn toàn. Giới hạn thời gian

hoà tan khoảng 10 phút và sau đó dùng pipet lấy 1 ml dung dịch vào các đĩa petri tách biệt, cặp đôi, đánh dấu tương ứng. Đổ lên dịch mẫu trong mỗi đĩa petri 15 – 20 ml Potato dextrose agar (hoặc đã acid hoá hoặc chứa chất kháng sinh) trước đó đã khồng chế đến 44 – 46<sup>0</sup>C. Trộn đều bằng cách quay đảo chiều di chuyển về phía trước, phía sau các đĩa, để cho agar đông đặc. Lật ngược các đĩa và ủ trong 5 ngày ở 20 – 25<sup>0</sup>C.

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

#### 6.4. Định lượng

Tiến hành theo hướng dẫn trong phần thử đối với Xác định CO<sub>2</sub> bằng cách khử carboxyl trong “Các phương pháp chung”, (Vol. 4), sử dụng chính xác 1,2 g mẫu.

## Phụ lục 16

## YÊU CẦU KỸ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP THỬ ĐỐI VỚI PECTIN

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

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

## 6. Phương pháp thử

### 6.1. Định tính

#### *Pectin*

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

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

<sup>\*)</sup> Hoà tan 6,055 g tris (hydroxymethyl) aminomethane (ví dụ: TRIZMA Base, Sigma) và 0,147 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O trong 1 lít nước. Điều chỉnh pH đến 7,0 bằng acid HCl 1 mol/l.

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

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

Kết quả:

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

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

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

*Nhóm amid*

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

## 6.2. Độ tinh khiết

SO<sub>2</sub>

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

*Dư lượng dung môi*

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

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

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

Dung dịch trắng: Không định lượng mẫu trắng

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

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

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

Cách tiến hành:

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

Tính kết quả:

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

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

Trong đó:

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

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

$W_{\text{mẫu}}$  là khối lượng mẫu (g)

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

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

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

*Tổng số chất không tan*

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

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

Sấy giấy lọc cùng với cặn ở 105<sup>0</sup>C trong 1 giờ. Chuyển vào bình hút ẩm chứa silicagel và để nguội. Cân giấy (M<sub>2</sub>). Tính % tổng số chất không tan:

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



*Acid galacturonic và  
mức độ amid hoá*

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

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

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

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

Thực hiện định lượng mẫu trắng trên 20 ml nước cất. Ghi lại thể tích đã dùng A<sub>0</sub> (ml). Độ chuẩn ester acetat là (A - A<sub>0</sub>).

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

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

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

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

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

Chú ý 1: Nếu pectin được biết là loại không được amid hoá, chỉ cần xác định V<sub>1</sub> và V<sub>2</sub>, còn B - S được coi là bằng 0.

Chú ý 2: Đối với pectin từ quả táo hoặc quả có múi (citrus) thì hiệu số A - A<sub>0</sub> không có ý nghĩa trong tính toán hàm lượng acid galacturonic và mức độ amid hoá.

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

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

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

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

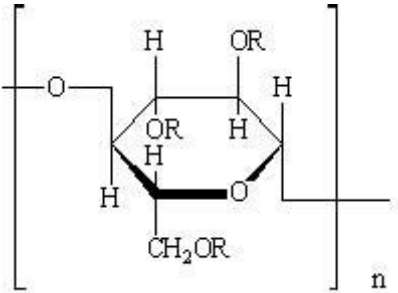
Chi

- 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.

**Phụ lục 17**

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

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	Cellulose methyl ether; INS 461 ADI “không giới hạn”
<b>2. Định nghĩa</b>	Ether methyl của cellulose, được sản xuất từ bột gỗ hoặc bông bằng cách xử lý với kiềm, và methyl hóa cellulose kiềm bằng methyl clorid. Chế phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.
<i>Tên hóa học</i>	Methyl ether của cellulose; Cellulose methyl ether
<i>Mã số C.A.S.</i>	9004-67-5
<i>Công thức hóa học</i>	$[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_3)_y]_n$ trong đó x = 1,00 đến 1,55 y = 2,00 đến 1,45 x+y = 3,00 (y = độ thay thế)
<i>Công thức cấu tạo</i>	 <p>trong đó R = H hoặc CH<sub>3</sub></p>
<i>Khối lượng phân tử</i>	Đơn vị cấu trúc không thế: 162,14 Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế là 1,45: 182 Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế là 2,00: 190 Đại phân tử: từ khoảng 20000 (n khoảng 100) đến khoảng 380000 (n có giá trị khoảng 2000)
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng hạt mịn, sợi nhỏ, hoặc bột, màu trắng hoặc trắng nhạt, không có mùi, hút ẩm.
<b>4. Chức năng</b>	Chất nhũ hóa, chất ổn định, chất làm dày.
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Trương nở trong nước, tạo dung dịch từ trong đến trắng đục, nhớt, keo; không tan trong ethanol, ether và cloroform; tan trong acid acetic băng.
<i>Tạo bột</i>	Phải có phản ứng tạo bột đặc trưng.

<i>Tạo kết tủa</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
<b>5.2. Độ tinh khiết</b>	
<i>Giảm khối lượng khi làm khô</i>	Không được quá 10,0% (sấy tại 105°C, trong 3 giờ).
<i>pH</i>	5,0 - 8,0 (dung dịch 1/100).
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 1,5 %. (Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Phương pháp I, cân 1 g mẫu).
<i>Chi</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
<b>5.3. Hàm lượng</b>	Không được thấp hơn 25% và không được quá 33% nhóm methoxyl

## **6. Phương pháp thử**

### **6.1. Định tính**

<i>Tạo bột</i>	Lắc mạnh dung dịch mẫu thử 0,1%. Cần xuất hiện một lớp bột. (Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxymethyl cellulose với các ether cellulose khác.
<i>Tạo kết tủa</i>	Thêm 5 ml dung dịch đồng sulfat hoặc nhôm sulfat 5% vào 5 ml dung dịch mẫu thử 0,5%. Trong dung dịch không được xuất hiện kết tủa. Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxymethyl cellulose với các ether cellulose khác.

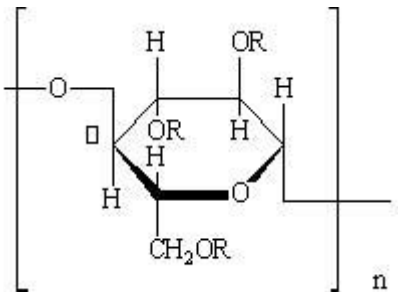
### **6.2. Độ tinh khiết**

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

### **6.3. Định lượng**

Xác định hàm lượng nhóm methoxyl bằng phương pháp Xác định nhóm Ethoxyl và Methoxyl (xem JECFA monograph 1 - Vol.4 )

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

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	MEC; INS 465 ADI “không giới hạn”
<b>2. Định nghĩa</b>	Hỗn hợp ether của cellulose, được sản xuất từ cellulose bằng cách xử lý với kiềm, dimethyl sulfat và ethyl clorid; cả hai nhóm methyl và ethyl được gắn với các tiểu phân anhydroglucose bằng liên kết ether. Sản phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.
<i>Tên hóa học</i>	Ethyl methyl ete của cellulose.
<i>Mã số C.A.S.</i>	9004-69-7
<i>Công thức hóa học</i>	$[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_3)_y(OC_2H_5)_z]_n$ trong đó $z = 0,57 \div 0,8$ $y = 0,2 \div 0,4$ $x = 3 - (y + z)$ ( $y + z =$ độ thay thế)
<i>Công thức cấu tạo</i>	 <p>Trong đó R = H hoặc CH<sub>2</sub> hoặc C<sub>2</sub>H<sub>5</sub></p>
<i>Khối lượng phân tử</i>	Đơn vị cấu trúc không thế: 162,14 Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế 0,77: 181 Đơn vị cấu trúc có tổng độ thay thế 1,2: 190 Đại phân tử: 30000 đến 40000 (n ~ 200)
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng bột mịn hoặc hình que, màu hơi vàng, không mùi và dễ hút ẩm.
<b>4. Chức năng</b>	Chất nhũ hóa, chất ổn định, chất làm dày, chất tạo bọt.
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Trương nở trong nước, tạo dung dịch từ trong đến trắng đục, nhớt, keo; không tan trong ethanol.
<i>Tạo bọt</i>	Phải có phản ứng tạo bọt đặc trưng.

<i>Tạo kết tủa</i>	Phải có phản ứng tạo kết tủa đặc trưng.
<i>Mức độ thay thế</i>	Xác định mức độ thay thế bằng sắc ký khí.
<b>5.2. Độ tinh khiết</b>	
<i>Giảm khối lượng khi làm khô</i>	Không được quá 15% đối với dạng que, không được quá 10% đối với dạng bột. (sấy đến khối lượng không đổi).
<i>Tro sulfat</i>	Không được quá 0,6 %.
<i>Chi</i>	Không được quá 2,0 mg/kg.
<b>5.3. Hàm lượng</b>	Không được thấp hơn 3,5% và không được quá 6,5% nhóm methoxyl (-OCH <sub>3</sub> ), không được thấp hơn 14,5% và không được quá 19,0% nhóm ethoxyl (-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), không thấp hơn 13,2% và không được quá 19,6% tổng các nhóm alkoxy, tính theo methoxyl (theo lượng khô).

## **6. Phương pháp thử**

### **6.1. Định tính**

<i>Tạo bột</i>	Lắc mạnh dung dịch mẫu thử 0,1%. Cần xuất hiện một lớp bột. (Phép thử này cho phép phân biệt natri carboxymethyl cellulose với các ether cellulose khác, các alginat và các gồm tự nhiên.
<i>Tạo kết tủa</i>	Thêm 5 ml dung dịch đồng sulfat hoặc nhôm sulfat 5 % vào 5 ml dung dịch mẫu thử 0,5 %. Trong dung dịch không được xuất hiện kết tủa. (Phép thử này cho phép phân biệt các ether cellulose với natri carboxymethyl cellulose, gelatin, gồm carob bean và gồm tragacanth).

### **6.2. Độ tinh khiết**

<i>Tro sulfat</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4 - Phương pháp I. - Cân 1 g mẫu.
<i>Chi</i>	- Thử theo JECFA monograph 1 - Vol.4. - Xác định bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử thích hợp cho hàm lượng quy định. Lựa chọn cỡ mẫu thử và phương pháp chuẩn bị mẫu dựa trên nguyên tắc của phương pháp mô tả trong JECFA monograph 1 - Vol.4 phần các phương pháp phân tích công cụ.

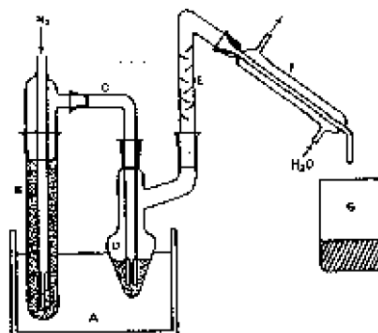
### **6.3. Định lượng**

Xác định nhóm ethoxyl (có thể xác định riêng biệt ethoxyl và methoxyl bằng sắc ký khí (Cobler, Samsel and Beaver, Talanta, 9, 473, 1962)).

#### Thiết bị

Thiết bị dùng để xác định nhóm hydroxypropoxy được mô tả ra trong hình vẽ dưới đây. Bình cất hai cổ (D), cổ cạnh được nối với cột Vigreux được bọc bằng giấy nhôm (E) và cổ giữa nối với một ống sục khí chạy từ cổ tới đáy bình để dẫn hơi

nước và nitrogen. Bộ phận tạo hơi nước (B), được nối với ống sục khí qua ống C. Sinh hàn (F), được nối với cột Vigreux. Bình cất và bộ phận tạo hơi nước được đặt trong bể dầu (A), có gắn thiết bị điều nhiệt để duy trì nhiệt độ 155°C và tốc độ gia nhiệt mong muốn. Sản phẩm cất được thu vào bình 150 ml (G), hoặc một dụng cụ chứa phù hợp khác.



### Tiến hành

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

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

Thêm 500 mg natri bicarbonat và 10 ml dung dịch acid sulfuric loãng (TS). Sau khi hết khí carbon dioxyd bay ra, thêm một gam kali iodid. Đóng nắp bình, lắc đều rồi để yên trong bóng tối trong 5 phút. Chuẩn độ lượng iod tạo thành bằng dung dịch natri thiosulfat 0,02 N tới khi mất màu vàng, xác định điểm kết thúc chuẩn độ bằng cách thêm vài giọt dung dịch hồ tinh bột (TS). Ghi lại thể tích natri thiosulfat đã sử dụng,  $Y_a$ .

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

Tiến hành làm vài mẫu trắng (chuẩn), trong đó thay mẫu thử bằng 100 mg methyl cellulose (không chứa tạp chất). Tỷ số

giữa thể tích natri hydroxyd ( $V_m$ ) và thể tích natri thiosulfat ( $Y_m$ ).

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

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

trong đó

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

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

$k = V_b N_1 / Y_b N_2$

Ghi lại phần trăm ethoxyl, B%.

#### Xác định hàm lượng methoxyl

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

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

trong đó

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

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

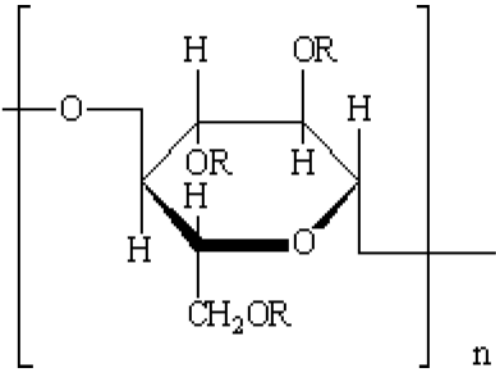
#### Xác định hàm lượng tổng alkoxy (theo methoxyl)

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



**Phụ lục 19**

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

<b>1. Tên khác, chỉ số</b>	Sodium cellulose glucolate, NaCMC, CMC, gồm cellulose, natri CMC, INS 466 ADI “không giới hạn”
<b>2. Định nghĩa</b>	Được sản xuất từ cellulose bằng cách xử lý với kiềm và acid monoclo acetic hoặc muối natri của nó. Sản phẩm thương mại có thể được phân loại qua độ nhớt.
<i>Tên hóa học</i>	Muối natri của carboxymethyl ether của cellulose.
<i>Mã số C.A.S.</i>	9004-32-4
<i>Công thức hóa học</i>	$[C_6H_7O_2(OH)_x(OCH_2COONa)_y]_n$ trong đó n là độ polyme hóa $x = 1,50 \div 2,80$ $y = 0,2 \div 1,50$ $x + y = 3,0$ (y là độ thay thế)
<i>Công thức cấu tạo</i>	 <p>Trong đó R = H hoặc CH<sub>2</sub>COONa</p>
<i>Khối lượng phân tử</i>	Một đơn vị cấu trúc có độ thay thế 0,2: 178,14 Một đơn vị cấu trúc có độ thay thế 1,5: 282,18 Đại phân tử: lớn hơn 17000 (n có giá trị khoảng 100)
<b>3. Cảm quan</b>	Dạng hạt, bột mịn hoặc hình que nhỏ, có màu trắng hoặc hơi vàng. Dễ hút ẩm, gần như không có mùi.
<b>4. Chức năng</b>	Chất làm dày, chất ổn định, tác nhân tạo huyền phù.
<b>5. Yêu cầu kỹ thuật</b>	
5.1. Định tính	
<i>Độ tan</i>	Tạo dung dịch keo nhớt trong nước, không tan trong ethanol.

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

## **6. Phương pháp thử**

### **6.1. Định tính**

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

### **6.2. Độ tinh khiết**

<i>Natri clorid</i>	Nung nóng nhẹ trên bếp 5g mẫu (cân chính xác đến 0,1 mg) trong chén platin hoặc chén sứ, đầu tiên trên ngọn lửa nhỏ để mẫu không bị nung, khi than hóa hoàn toàn tiếp tục nung
---------------------	--

mẫu trong lò điện 15 phút ở nhiệt độ 500°C. Làm nguội, nghiền nhỏ tro thu được và chiết vài lần bằng nước ấm. Lọc dịch chiết vào bình định mức 500 ml, acid hóa bằng acid nitric và định mức tới vạch. Xác định hàm lượng NaCl trong 100 ml dịch chiết này bằng phương pháp Volhard, sử dụng dung dịch bạc nitrat 0,02 N và amoni nitrat 0,02N.

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

$$\% \text{ natri glucolat} = (a \times 0,001169 \times 5) / b$$

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

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

*Glycolat tự do*

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

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

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

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

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

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

trong đó

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

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

*Độ thay thế*Chuẩn bị mẫu

Cân 5g mẫu (chính xác đến 0,1 mg) và chuyển vào bình nón 500 ml. Thêm 350 ml methanol hoặc ethanol (80% theo thể tích). Lắc huyền phù trong 30 phút. Gạn qua phễu lọc Thủy tinh đã cân bì, hút chân không nhẹ. Cuối quá trình lọc gạn

tránh không để không khí bị hút qua phễu. Lặp lại quá trình trên với dung môi chiết cho đến khi thử ion clorid bằng dung dịch bạc nitrat (TS) cho kết quả âm tính. Thường cần xử lý khoảng 3 lần. Chuyển dung dịch natri carboxymethyl cellulose vào chén. Loại bỏ dung môi chiết còn bám trên chén bằng aceton. Sấy khô chén trong lò ở nhiệt độ 110°C đến khối lượng không đổi. Cân lần đầu sau 2 giờ. Mỗi lần cân phải làm nguội chén trong bình hút ẩm và trong khi cân cần lưu ý rằng natri carboxymethyl cellulose hút ẩm nhẹ.

#### Tiến hành

Cân 2g mẫu khô (chính xác 0,1 mg), thu được từ qui trình chiết còn trên vào chén sứ đã cân bì. Đầu tiên nung nóng nhẹ trên bếp để đốt cháy mẫu từ từ, sau đó tăng nhiệt độ nung nóng mạnh trong 10 phút. Làm nguội, sau đó thấm ướt tro còn lại bằng 3-5 ml acid sulfuric đặc. Cần thận nung cho tới khi hết khói bay ra. Sau khi làm nguội, thêm khoảng 1 g amoni carbonat, dàn đều bột trong toàn bộ thể tích của chén. Nung nóng lại trên bếp, đầu tiên nhẹ nhàng cho đến khi hết khói, sau đó nung đến nóng đỏ thấm trong 10 phút. Lặp lại qui trình xử lý với acid sulfuric và amoni carbonat nếu tro natri sulfat vẫn còn chứa carbon. Làm nguội chén trong bình hút ẩm và cân. Nếu không thêm amoni carbonat và nung trên bếp, có thể nung chén trong lò trong 1 giờ ở nhiệt độ khoảng 600°C.

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

$$\% \text{ natri} = (a \times 32,28) / b$$

trong đó:

a = khối lượng của chén natri sulfat

b = khối lượng chén khô thu được sau giai đoạn chiết bằng còn

Tính độ thay thế theo công thức sau:

$$\text{Mức độ thay thế} = (162 \times \% \text{ natri}) / [2300 - (80 \times \% \text{ natri})]$$

*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.

6.3. Định lượng

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

$$\text{Hàm lượng (\%)} = 100 - (\% \text{ NaCl} + \% \text{ Na glycolat})$$

## Phụ lục 20

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

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

<i>Arsen</i>	Không được quá 1,0 mg/kg.
<i>Chì</i>	Không được quá 1,5 mg/kg.
<i>Cadimi</i>	Không được quá 0,5 mg/kg.
<i>Thủy ngân</i>	Không được quá 0,15 mg/kg.

### 5.3. Các yêu cầu về vi sinh vật

<i>Tổng số vi sinh vật hiếu khí</i>	< 10 <sup>4</sup> /g
<i>Enterobacteriaceae hoặc vi khuẩn nhóm coli-aerogens</i>	< 10/g
<i>Streptococci nhóm Lancefield D</i>	< 10 <sup>2</sup> / g

## 6. Phương pháp thử

### 6.1. Định tính

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

### 6.2. Độ tinh khiết

<i>Arsen</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4. - Phương pháp II.
<i>Chì</i>	- 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.
<i>Cadimi</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4. - Phương pháp II.
<i>Thủy ngân</i>	- Thử theo hướng dẫn tại JECFA monograph 1 - Vol.4. - Phương pháp II.