

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8472 : 2010

EN 12857 : 1999

THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH CYCLAMATE – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Foodstuffs – Determination of cyclamate – High performance liquid chromatographic method

Lời nói đầu

TCVN 8472 : 2010 hoàn toàn tương đương với EN 12857 : 1999;

TCVN 8472 : 2010 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH CYCLAMATE – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Foodstuffs – Determination of cyclamate – High performance liquid chromatographic method

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định natri cyclamate trong thực phẩm, xem [1], [2], [3]. Phương pháp này đã được xác nhận trong một phép thử liên phòng thử nghiệm theo ISO 5725 : 1986 [4] được tiến hành trên nước chanh, đồ uống có chứa nước cam, sữa chua trái cây và cream sậy phun.

Ngoài các chất nền đã được nghiên cứu trong phép thử liên phòng thử nghiệm, kinh nghiệm cho thấy rằng phương pháp này cũng có thể áp dụng được cho các loại thực phẩm khác nhau như dưa chuột, quả anh đào chua đóng hộp, dưa, nectar cam, mút mơ, mút quả mâm xôi, nectar anh đào, kẹo cứng, sữa chua trái cây hỗn hợp, sữa chua dâu tây, quark trái cây, bánh có quả nho khô, bột làm bánh có socola, bột kem vani làm bánh có cream, kem vani và kem có chứa cam [2], [3].

2. Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 4851 (ISO 3696), Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

3. Nguyên tắc

Natri cyclamate được chiết ra khỏi mẫu bằng nước, rồi chuyển thành N,N-dichlorocyclohexylamine và được xác định bằng HPLC trên cột pha đảo sử dụng detector tử ngoại ở bước sóng 314 nm.

4. Thuốc thử

Các thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích dùng cho phân tích HPLC và nước được sử dụng phải là loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Khi chuẩn bị các dung dịch, phải tính đến độ tinh khiết của các thuốc thử.

4.1. Metanol

4.2. n-heptan.

4.3. Dầu nhẹ, có dải sôi từ 40 °C đến 60 °C.

4.4. Natri sulfat, dạng khan. Rửa bằng n-heptan để loại bỏ các chất nhiễm bẩn hút mỡ, nếu cần.

4.5. Dung dịch natri cacbonat, $\rho(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 50 \text{ g/l}^{(1)}$

4.6. Dung dịch natri hypoclorit (1,7 % clo hoạt động)

Pha loãng dung dịch natri hypoclorit có bán sẵn trên thị trường có chứa trên 1,7 % clo hoạt động với nước để có được phần khối lượng 1,7 % clo hoạt động. Kiểm tra hàm lượng clo hoạt động của dung dịch natri hypoclorit thường xuyên, ví dụ: sử dụng các quy trình mô tả trong Phụ lục A.

4.7. Axit sulfuric, $w(\text{H}_2\text{SO}_4) = 50 \text{ \%}^{(2)}$

4.8. Dung dịch chuẩn natri cyclamate

¹⁾ ρ là nồng độ khối lượng

²⁾ w là phần khối lượng

Cân khoảng 898 mg natri cyclamate, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 200 ml và pha loãng bằng nước đến vạch, $\rho(\text{axit cyclohexylsulfamic}) = 800 \text{ mg}/200 \text{ ml}^{(3)}$. Dùng pipet lấy 0,25 ml, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml và 20 ml dung dịch này cho vào bình định mức 100 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Nồng độ axit cyclohexylsulfamic của các dung dịch này là 10 mg/l, 40 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 400 mg/l và 800 mg/l.

4.9. Dung dịch Carrez I

Hòa tan trong nước 15 g kali hexacyanoferrat (II) ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ít nhất 99 % phần khối lượng và thêm nước đến 100 ml.

4.10. Dung dịch Carrez II

Hòa tan trong nước 30 g kẽm sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) có độ tinh khiết ít nhất 99,5 % phần khối lượng và thêm nước đến 100 ml.

4.11. Pha động

Trộn 80 phần thể tích metanol (4.1) với 20 phần thể tích nước, lọc qua bộ lọc màng thích hợp, ví dụ: có cỡ lỗ 0,45 μm và khử khí 5 min trong thiết bị siêu âm.

Tỷ lệ metanol với nước trong pha động có thể điều chỉnh đôi chút để đạt được kết quả phù hợp với cột được sử dụng, nếu cần.

4.12. Dung dịch ổn định cho HPLC, dung dịch EDTA, $\rho(\text{EDTA}) = 10 \text{ g/l}$, lọc qua bộ lọc màng thích hợp, ví dụ: có cỡ lỗ 0,45 μm và khử khí 5 min trong thiết bị siêu âm.

4.13. Xenluloza, dạng bột, có ít nhất 99,9 % phần khối lượng, được rửa bằng axit.

5. Thiết bị, dụng cụ

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

5.1. Thiết bị HPLC, gồm các bộ phận sau đây:

5.1.1. Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao, gồm có bơm, bộ bơm mẫu, máy đo quang phổ tử ngoại (UV) (khả năng hoạt động ở bước sóng 314 nm, tốt nhất là detector mảng diot), có máy ghi và/hoặc máy tích phân cho phép đo chiều cao pic và diện tích pic.

5.1.2. Cột pha đảo, ví dụ: có

- pha tĩnh của cột pha đảo C 18 cỡ hạt 5 μm ;
- chiều dài 250 mm;
- đường kính trong 4 mm;
- cột bảo vệ, C 18 pha đảo (tùy chọn, nhưng thường được khuyến nghị đặc biệt cho tất cả các mẫu dạng rắn).

Các tiêu chí tính năng đối với các cột phân tích thích hợp là độ phân dải nền của pic cyclamate.

Khi đo bằng detector mảng diot hoặc khi đo tại bước sóng thứ hai thấy có nhiễu, thì cần phải chọn điều kiện sắc ký khác để xác định cyclamate

5.2. Thiết bị siêu âm

5.3. Bộ lọc màng, kích thước lỗ thích hợp, ví dụ: 0,45 μm .

5.4. Bộ lọc, có giá đỡ màng lọc và pha động khử khí (4.11) và dung dịch ổn định (4.12).

5.5. Bộ đồng hóa

5.6. Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở 60°C.

5.7. Máy li tâm, có khả năng tạo gia tốc li tâm nhỏ nhất tại đáy ống (5.8) là 1400g.

5.8. Ống li tâm, tốt nhất là bằng thủy tinh, có dung tích thích hợp, ví dụ: 50 ml, có thể đậy kín được.

5.9. Phễu chiết, có dung tích thích hợp, ví dụ: 50 ml và 100 ml.

5.10. Giấy lọc gấp nếp, loại nhanh trung bình.

5.11. Bộ lọc tách pha (tùy chọn).

6. Cách tiến hành

6.1. Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

³⁾ Hệ số chuyển đổi từ natri cyclamate thành axit cyclohexylsulfamic là 0,890 g

6.1.1. Các sản phẩm dạng lỏng và sản phẩm tạo dung dịch trong (ví dụ: nước quả trong, nước muối dưa chuột đã lọc, kẹo cứng)

Pha loãng các sản phẩm dạng lỏng, lọc với nước để có hàm lượng cyclamate khoảng 400 mg/l, nếu cần hoặc lấy sản phẩm dạng lỏng trực tiếp để tạo dẫn xuất. Hòa tan các sản phẩm dạng rắn trong nước để tạo ra dung dịch trong có hàm lượng cyclamate khoảng 400 mg/l.

6.1.2. Sản phẩm nửa rắn (ví dụ: sản phẩm sữa, món tráng miệng, cream sấy phun, nước quả đục, mứt, mứt cam)

Đồng hóa kỹ mẫu trong 1 min. Cân khoảng 15 g mẫu, chính xác đến 1 mg, cho vào bình định mức 100 ml, thêm 80 ml nước và để bình trong thiết bị siêu âm (5.2) khoảng 10 min. Có thể chọn một lượng mẫu khác để có được hàm lượng cyclamate không vượt quá 400 mg/l trong bình định mức 100 ml. Thêm từ 1 ml đến 2 ml dung dịch Carrez I (4.9), trộn và thêm cùng một lượng dung dịch Carrez II (4.10). Trộn, rồi pha loãng bằng nước đến vạch. Lọc qua giấy lọc gấp nếp, loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu tiên.

Để tính đến thể tích chất kết tủa, nếu chất không hòa tan không chứa chất béo có trong khối lượng mẫu ban đầu vượt quá khoảng 3 g, thì nên li tâm hỗn hợp mẫu đã làm trong ở gia tốc 1400 g khoảng 10 min trước khi lọc sang bình định mức 100 ml. Rửa phần chất lắng hai lần với nước và li tâm lại, thu lấy từng phần nổi phía trên sang bình định mức 100 ml rồi pha loãng bằng nước đến vạch. Nếu lượng chất không hòa tan nhỏ hơn 3 g thì cũng có thể thực hiện quy trình này.

Lấy 20 ml dung dịch này để tạo dẫn xuất (xem 6.2).

6.1.3. Socola và sản phẩm liên quan

Cân khoảng 15 g mẫu, chính xác đến 1 mg, cho vào ống li tâm (5.8) và để yên ống li tâm trong nồi cách thủy ở 60 °C cho đến khi mẫu tan chảy hoàn toàn. Thêm cẩn thận và từ từ 25 ml dầu nhẹ (4.3), trộn kỹ, đậy kín ống li tâm và đặt trong thiết bị siêu âm 30 s và trộn lại. Li tâm các ống li tâm kín ở gia tốc 1 400 g khoảng 10 min. Gạn lớp dầu nhẹ và lặp lại việc chiết bằng 25 ml dầu nhẹ, gạn lại lớp dầu nhẹ. Cho bay hơi lượng dầu nhẹ còn lại bằng cách đặt ống li tâm 15 min trong nồi cách thủy ở 60 °C và trộn. Thêm 30 ml nước và trộn kỹ. Để yên ống li tâm 5 min trong thiết bị siêu âm. Dùng khoảng 40 ml nước để chuyển dung dịch sang bình định mức 100 ml, thêm 1 ml dung dịch Carrez I (4.9), trộn, thêm 1 ml dung dịch Carrez II (4.10) và trộn kỹ. Đưa nhiệt độ của dung dịch về 20 °C, pha loãng bằng nước đến vạch. Lọc qua giấy lọc gấp nếp, loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu tiên.

Để tính đến thể tích chất kết tủa, nếu chất không hòa tan không chứa chất béo có trong khối lượng mẫu ban đầu vượt quá khoảng 3 g, thì nên li tâm hỗn hợp mẫu đã làm trong ở gia tốc 1400 g khoảng 10 min trước khi lọc sang bình định mức 100 ml. Rửa phần chất lắng hai lần với nước và li tâm lại, thu lấy từng phần nổi phía trên sang bình định mức 100 ml rồi pha loãng bằng nước đến vạch. Nếu lượng chất không hòa tan nhỏ hơn 3 g thì cũng có thể thực hiện quy trình này.

Lấy 20 ml dung dịch này để tạo dẫn xuất (xem 6.2).

6.1.4. Chất béo dạng nhũ tương và các sản phẩm chứa nhũ tương (ví dụ: mayonnaise)

Đồng hóa kỹ mẫu. Cân khoảng 15 g mayonnaise đã đồng hóa, chính xác đến 1 mg, cho vào ống li tâm (5.8). Thêm 2,5 g bột xelluloza (4.13) và trộn. Thêm 25 ml dầu nhẹ (4.3) và trộn. Đậy kín ống li tâm và đặt vào thiết bị siêu âm 30 s và trộn lại. Li tâm khoảng 10 min ở gia tốc 1 400 g.

Gạn lớp dầu nhẹ và lặp lại việc chiết bằng 25 ml dầu nhẹ, gạn lại lớp dầu nhẹ. Cho bay hơi lượng dầu nhẹ còn lại bằng cách đặt ống li tâm 15 min trong nồi cách thủy ở 60 °C và trộn. Thêm 40 ml nước và trộn kỹ. Siêu âm ống li tâm 10 min trong thiết bị siêu âm.

Dùng khoảng 30 ml nước để chuyển dung dịch sang bình định mức 100ml. Đưa nhiệt độ của dung dịch về 20 °C, thêm 1 ml dung dịch Carrez I (4.9), trộn, thêm 1 ml của dung dịch Carrez II (4.10), trộn kỹ và pha loãng bằng nước đến vạch. Lọc qua giấy lọc gấp nếp, loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu tiên.

Để tính đến thể tích chất kết tủa, nếu chất không hòa tan không chứa chất béo có trong khối lượng mẫu ban đầu vượt quá khoảng 3 g, thì nên li tâm hỗn hợp mẫu đã làm trong ở gia tốc 1400 g khoảng 10 min trước khi lọc sang bình định mức 100 ml. Rửa phần chất lắng hai lần với nước và li tâm lại, thu lấy từng phần nổi phía trên sang bình định mức 100 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Nếu lượng chất không hòa tan nhỏ hơn 3 g thì cũng có thể thực hiện quy trình này.

Lấy 20 ml dung dịch này để tạo dẫn xuất (xem 6.2).

6.2. Tạo dẫn xuất

CẢNH BÁO: Do có tạo ra khí clo, nên thực hiện tạo dẫn xuất trong tủ hút khói tốt.

Để có được dung dịch mẫu thử hoặc dung dịch thử nghiệm chuẩn, dùng pipet lấy 20 ml các dung dịch mẫu thu được trong 6.1.1 đến 6.1.4 hoặc các dung dịch chuẩn (4.8) cho vào phễu chiết riêng rẽ (5.9) và thêm 1 ml axit sulfuric (4.7), 10,0 ml n-heptan (4.2) và 2,5 ml dung dịch natri hypochlorit (4.6) và lắc mạnh trong 1 min. Để tách pha. Gạn bỏ lớp nước phía dưới. Lớp nhũ tương khó xử lý được xử lý giống như lớp n-heptan. Rửa lớp n-heptan với 25 ml dung dịch natri cacbonat (4.5) bằng cách lắc

mạnh trong 30 s. Loại bỏ pha nước phía dưới. Nếu các pha tách biệt rõ, thì làm khô lớp n-heptan bằng 1 g natri sulfat (4.4) và lọc qua giấy lọc gấp nếp. Nếu lớp nhũ tương không bị vỡ, thì làm khô pha n-heptan bằng khoảng 7 g natri sulfat và lọc qua giấy lọc gấp nếp, hoặc sử dụng bộ lọc tách pha (5.11).

Các dung dịch dẫn xuất có thể bền trong 24 h ở nhiệt độ + 4 °C.

6.3. Nhận biết

Nhận biết cyclamate có trong dung dịch mẫu thử bằng cách so sánh thời gian lưu của chất phân tích trong dung dịch mẫu với thời gian lưu của chất chuẩn, hoặc bằng cách bơm đồng thời dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử, hoặc bằng cách thêm dung dịch chuẩn vào dung dịch mẫu thử và ghi lại đường hấp thụ trong dải bước sóng có liên quan.

Bơm các thể tích bằng nhau của dung dịch mẫu thử và dung dịch thử chuẩn. Khoảng thời gian giữa các lần bơm kế tiếp của các dung dịch chuẩn không được nhỏ hơn 15 min. Để giảm thiểu nguy cơ các chất bị rửa giải từ lần bơm trước đó bị lẫn với các thành phần từ các mẫu bơm tiếp sau, thì việc bơm liên tiếp các dung dịch mẫu thử cần được thực hiện tại các khoảng thời gian đủ dài (ví dụ: 30 min).

Nếu sử dụng cột quy định trong 5.1.2 thì các điều kiện kí sau đây cho thấy đáp ứng được các yêu cầu:

Pha động	như trong 4.11;
Tốc độ dòng:	1,0 ml/min;
Thể tích bơm:	20µl;
Detector (UV)	314 nm.

Để ổn định, mỗi ngày trước khi bắt đầu phân tích cần tráng rửa cột bằng nước trong 10 min, bằng dung dịch ổn định (4.12) trong 30 min và tráng lại bằng nước trong 10 min.

Mẫu sắc phổ điển hình dùng để tham khảo được nêu trong Phụ lục B.

6.4. Xác định

Để xác định theo phương pháp ngoại chuẩn, thì tích phân các diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic và so sánh các kết quả với các giá trị tương ứng của chất chuẩn có diện tích pic/chiều cao pic gần nhất hoặc sử dụng đường chuẩn.

Để chuẩn bị đường chuẩn, bơm một lượng thích hợp các dung dịch chuẩn có các nồng độ khối lượng thích hợp. Vẽ các chiều cao pic hoặc diện tích pic của các dung dịch natri cyclamate chuẩn tương ứng với nồng độ khối lượng của axit cyclohexylsulfamic tương ứng, tính bằng miligam trên lít. Kiểm tra độ tuyến tính của đường chuẩn.

Ngoài ra, việc hiệu chuẩn cũng có thể được đánh giá bằng hồi quy toán học. Kiểm tra độ tuyến tính của đường hồi quy.

7. Tính kết quả

7.1. Phương pháp ngoại chuẩn

Tính phần khối lượng của axit cyclohexylsulfamic, w, bằng miligam trên kilogam, hoặc nồng độ khối lượng ρ, bằng miligam trên lít, tính theo công thức (1):

$$w \text{ hoặc } \rho = \frac{A_1 \times V_1 \times m_1 \times F}{A_2 \times V_2 \times m_0} \times 1000 \quad (1)$$

Trong đó:

A_1 là diện tích pic của cyclamate thu được với dung dịch mẫu thử;

A_2 là diện tích pic của cyclamate thu được với dung dịch mẫu thử chuẩn;

V_1 là thể tích của dung dịch mẫu (ở đây là 100 ml), tính bằng mililit (ml);

V_2 là thể tích của dung dịch chuẩn (ở đây là 100 ml), tính bằng mililit (ml);

m_1 là khối lượng của cyclamate trong dung dịch chuẩn (V_2), tính bằng miligam (mg);

m_0 là khối lượng của phần mẫu thử, tính bằng gam (g) hoặc mililit (ml);

F là hệ số pha loãng dùng trong quá trình phân tích, nếu có.

7.2. Đường chuẩn

Tính phần khối lượng của axit cyclohexylsulfamic, w, bằng miligam trên kilogam hoặc bằng nồng độ khối lượng, ρ, tính bằng miligam trên lít, theo công thức (2)

$$w \text{ hoặc } \rho = \frac{\rho_{cs} \times V_1 \times F}{m_0} \quad (2)$$

trong đó:

ρ_{cs} là nồng độ khối lượng của axit cyclohexylsulfamic có trong dung dịch mẫu thử, đọc được từ đường chuẩn hoặc đường hồi quy, tính bằng miligam trên lít (mg/l);

V_1 , m_0 , F xem công thức (1).

7.3. Biểu thị kết quả

Báo cáo kết quả đến số nguyên.

CHÚ THÍCH: Hệ số chuyển đổi từ natri cyclamate sang axit cyclohexylsulfamic là 0,890 6.

8. Độ chụm

8.1. Khái quát

Chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp phù hợp với ISO 5725:1986 [4] được thống kê trong Phụ lục C. Các giá trị thu được từ phép thử nghiệm liên phòng này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ chất phân tích và chất nền khác với các giá trị nêu trong Phụ lục C.

8.2. Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả của hai phép thử đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn nhất, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r .

Các giá trị đó là:

nước chanh	$\bar{x} = 435,9 \text{ mg/l}$	$r = 16,7 \text{ mg/l}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 178,3 \text{ mg/l}$	$r = 15,4 \text{ mg/l}$
cream sậy phun	$\bar{x} = 280,9 \text{ mg/kg}$	$r = 26,0 \text{ mg/kg}$
sữa chua trái cây	$\bar{x} = 647,6 \text{ mg/kg}$	$r = 42,4 \text{ mg/kg}$

8.3. Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau do hai phòng thử nghiệm khác nhau thực hiện, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R .

Các giá trị đó là:

nước chanh	$\bar{x} = 435,9 \text{ mg/l}$	$R = 38,1 \text{ mg/l}$
đồ uống có chứa nước cam	$\bar{x} = 178,3 \text{ mg/l}$	$R = 24,4 \text{ mg/l}$
cream sậy phun	$\bar{x} = 280,9 \text{ mg/kg}$	$R = 49,7 \text{ mg/kg}$
sữa chua trái cây	$\bar{x} = 647,6 \text{ mg/kg}$	$R = 168,4 \text{ mg/kg}$

9. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- tất cả các thông tin cần thiết để nhận biết về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp lấy mẫu được sử dụng;
- ngày và thời gian lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- kết quả và đơn vị biểu thị kết quả;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy ý mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Xác định hàm lượng clo trong các dung dịch hypoclorit

A.1. Thuốc thử

A.1.1. Dung dịch kali iodua, $\rho(\text{KI}) = 5 \text{ g}/100\text{ml}$.

A.1.2. Dung dịch axit clohydric, $w(\text{HCl}) = 10 \%$.

A.1.3. Dung dịch natri thiosulfat, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$.

A.1.4. Dung dịch tinh bột, 1g/100 g phần khối lượng.

A.1.5. Canxi cacbonat, dạng bột.

A.2. Cách tiến hành

Pha loãng 1,0 ml dung dịch hypoclorit (nên chứa khoảng 2 % clo hoạt động, pha loãng, nếu cần) vào trong bình nón 100 ml nước và thêm 10 ml dung dịch kali iodua (A.1.1). Axit hóa bằng 5 ml axit clohydric (A.1.2), thêm một thìa đầy canxi cacbonat (để giải phóng CO_2). Thêm dung dịch natri thiosulfat (A.1.3) từ buret cho đến khi màu sắc thay đổi màu nâu đến gần như không màu. Thêm 0,5 ml dung dịch tinh bột (chất chỉ thị), trộn và cẩn thận thêm natri thiosulfat từ buret cho đến khi đổi màu từ màu xanh nhạt đến không màu.

A.3. Tính toán

Tính nồng độ khối lượng clo hoạt động, ρ_{ac} , bằng gam trên 100 ml theo công thức (A.1):

$$\rho_{ac} = \frac{V_T \times 3,546 \times F_T \times F_V \times 100}{V_H \times 1000} \quad (\text{A.1})$$

Trong đó:

V_T là thể tích của dung dịch natri thiosulfat được sử dụng, tính bằng mililit (ml);

F_T là hệ số của dung dịch natri thiosulfat;

F_V là hệ số pha loãng;

V_H là thể tích của dung dịch hypoclorit (ở đây là 1,0 ml), tính bằng mililit (ml).

CHÚ THÍCH: 1 ml của dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 mol/l

= 3,546 mg clo hoạt động Cl

= 2,623 mg axit hypochlorous HClO

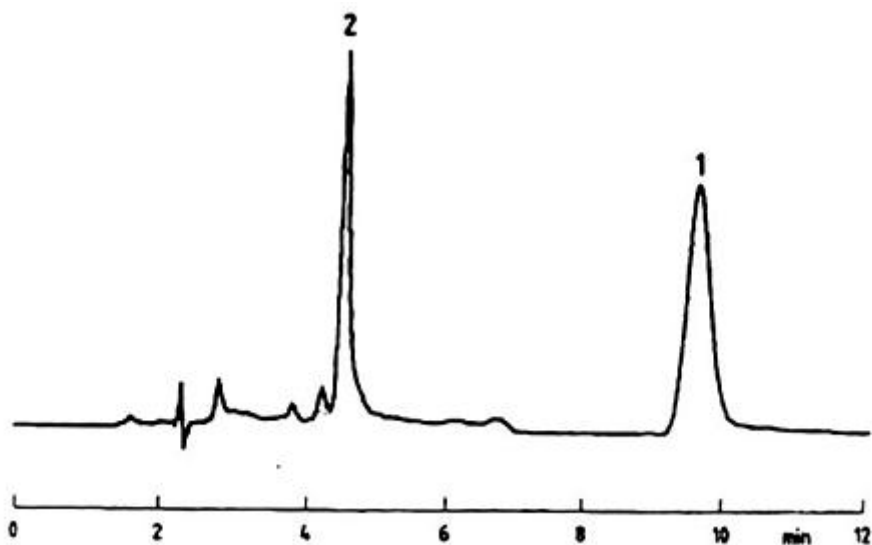
= 3,7221 mg natri hypochlorous NaClO

= 0,7999 mg oxy hoạt động O

Phụ lục B

(Tham khảo)

Hình vẽ



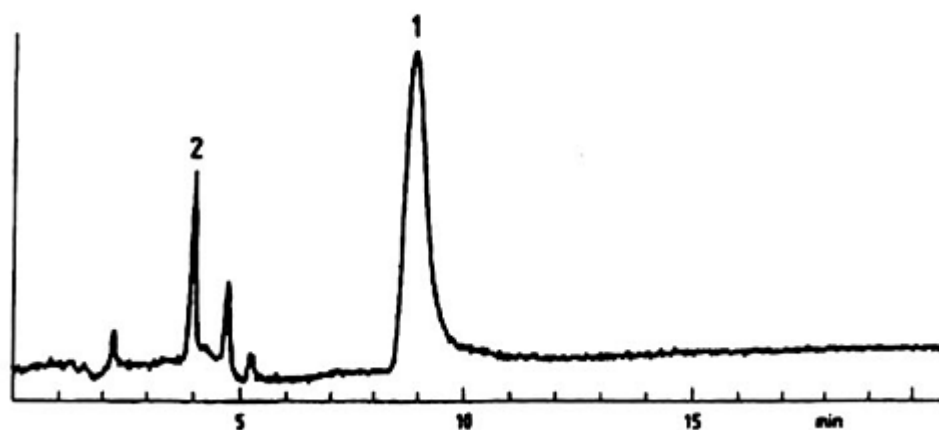
CHÚ DẪN

1 sản phẩm phản ứng cyclamate

2 thuốc thử dẫn xuất

Dung dịch mẫu chứa	Cyclamate
Cột tách	Nucleosil C 18,5 μm
Đường kính	4 mm
Chiều dài	250 mm
Cột bảo vệ	Nucleosil C 18,5 μm
Pha động	Metanol + nước (80 + 20 phần thể tích)
Tốc độ vòng	1,0 ml/min
Thể tích bơm	20 μl

Hình B.1 – Tách dung dịch mẫu thử (đồ uống từ quả anh đào chua) bằng HPLC



CHÚ DẪN

1 sản phẩm phản ứng cyclamate

2 thuốc thử dẫn xuất

Dung dịch mẫu chứa	Cyclamate
Cột tách	Lichrospher 60 RP-lựa chọn B, 5 μm
Đường kính	4 mm
Chiều dài	250 mm
Cột bảo vệ	Lichrospher 60 RP-lựa chọn B, 5 μm
Pha động	Metanol + nước (80 + 20 phần thể tích)

Tốc độ vòng	1,0 ml/min
Thể tích bơm	20 μ l

Hình B.2 – Tách dung dịch mẫu thử (sữa chua dâu) bằng HPLC

Phụ lục C

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các dữ liệu sau đây thu được trong các phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725:1986 [4] do Netherlands thực hiện trên nước chanh và Max von Pettenkofer-Tổ chức Y tế Liên bang, Cục Hóa thực phẩm, Berlin, Đức [1] thực hiện trên đồ uống có chứa nước cam, cream sấy phun và sữa chua trái cây.

Bảng C.1

Cyclamate	Nước chanh	Đồ uống nước cam	Cream sấy phun	Sữa chua trái cây
Năm thử nghiệm liên phòng	1992	1992	1994	1993
Số lượng các phòng thử nghiệm	4	10	10	10
Số lượng mẫu	1	1	1	1
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ ngoại lệ	4	9	9	9
Số ngoại lệ (các phòng thử nghiệm)	0	1	1	1
Số lượng các kết quả được chấp nhận	8	48	48	48
Giá trị trung bình, \bar{x}	435,9 mg/l	178,3 mg/l	280,9 mg/kg	647,6 mg/kg
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	6,0 mg/l	5,5 mg/l	9,2 mg/kg	15,2 mg/kg
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD_r , %	1,4	3,1	3,3	2,3
Giới hạn lặp lại, r	16,7 mg/l	15,4 mg/l	26,0 mg/kg	42,4 mg/kg
Độ lệch chuẩn tái lập, S_R	13,6 mg/l	8,6 mg/l	17,6 mg/kg	59,5 mg/kg
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD_R , %	3,1	4,9	6,3	9,3
Giới hạn tái lập, R	38,1 mg/l	24,4 mg/l	49,7 mg/kg	168,4 mg/kg
Giá trị Horrat	0,5	0,7	0,9	1,5

THƯ MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Natriumcyclamat: L 00.00-29 1996-02 (Food Analysis: Determination of Cyclamate in foodstuffs L 00.00-29 1996-02) in: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/Bundesgesundheitsamt (In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal commodity Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office) Loseblattausgabe, Stand Februar 1996 Bd. 1 (Loose leaf edition, as of 1996 – 02 Vol. I.) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH.
- [2] Lehr, M, and Schmid, W.: Simple and specific HPLC procedure for determination of cyclamate in fruit juice beverage after conversion to N,N-dichlorocyclohexylamine. (Einfaches und spezifisches HPLC-Verfahren zur Bestimmung von Cyclamat in fruchtsafthaltigen Getränken nach Derivatisierung zu N N-Di-chlorcyclohexylamin) In: Z Lebensm Unters Forsch (1991), 192, pp, 335-338.
- [3] Lehr, M, and Schmid, W.: Application of solid phase extraction for the determination of intense sweeteners in foodstuffs by HPLC. (Anwendung der Festphasenextraktion bei der Bestimmung von Süßstoffen in Lebensmitteln mittels HPLC) in: Dtsch. Lebensm. Rdsch. (1993), 89, Heft 2; pp 43 – 45.

[4] ISO 5725:1986 ⁴⁾, Precision of test method – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.

⁴⁾ ISO 5725: 1986 hiện nay đã hủy