

**TCVN 6470:2010**

Xuất bản lần 2

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

*Food additives – Test methods for food colours*

HÀ NỘI – 2010

## Mục lục

	Trang
1 Phạm vi áp dụng.....	5
2 Tài liệu viện dẫn.....	5
3 Phương pháp thử.....	5
3.1 Quy định chung.....	5
3.2 Phương pháp nhận biết chất màu.....	6
3.2.1 Phương pháp nhận biết bằng sắc kí.....	6
3.2.2 Phương pháp nhận biết bằng đo quang phổ.....	10
3.2.3 Các phương pháp nhận biết khác.....	11
3.3 Phương pháp xác định tổng hàm lượng chất màu.....	11
3.3.1 Phương pháp xác định tổng hàm lượng chất màu bằng đo quang phổ.....	11
3.3.2 Phương pháp xác định tổng hàm lượng chất màu bằng chuẩn độ với titan trichlorua.....	14
3.4 Phương pháp xác định hàm lượng chất màu phụ.....	18
3.5 Phương pháp xác định chất không tan trong nước.....	21
3.6 Phương pháp xác định các chất chiết được bằng ete.....	22
3.7 Phương pháp xác định hàm lượng chất không tan trong axit clohydric của màu muối kim loại.....	24
3.8 Phương pháp xác định chất không tan trong cloroform.....	25
3.9 Phương pháp xác định các amin thơm không sulfonat hoá.....	26
3.10 Phương pháp xác định hàm lượng bazơ leuco trong các chất màu triarylmethan đã sulfonat hoá.....	28
3.11 Phương pháp xác định các hợp chất hữu cơ không phải là chất màu.....	30
3.11.1 Phương pháp xác định bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao.....	30
3.11.2 Phương pháp xác định bằng sắc kí cột.....	32
3.12 Phương pháp xác định hàm lượng clorua.....	34
3.13 Phương pháp xác định hàm lượng sulfat.....	35
3.14 Phương pháp xác định clorua và sulfat tan trong nước có trong màu muối nhôm.....	36
3.15 Phương pháp xác định hàm lượng nước (hao hụt khối lượng khi sấy).....	37
4 Báo cáo thử nghiệm.....	37

## Lời nói đầu

TCVN 6470:2010 thay thế TCVN 6470:1998;

TCVN 6470:2010 được xây dựng trên cơ sở JECFA 2006, *Combined Compendium of Food Additive Specifications, Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications* (Tuyển tập quy định kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4: Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm và dung dịch phòng thử nghiệm được sử dụng và viện dẫn trong các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm);

TCVN 6470:2010 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F4 Phụ gia thực phẩm và các chất nhiễm bẩn biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

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

*Food additives – Test methods for food colours*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các phương pháp thử đối với các chất tạo màu được sử dụng làm phụ gia thực phẩm.

### 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).

JECFA 2006, *Combined Compendium of Food Additive Specifications, Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications, Section on Analytical Techniques* (Tuyển tập quy định kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4: Các phương pháp phân tích, quy trình thử nghiệm và dung dịch phòng thử nghiệm được sử dụng và viện dẫn trong các yêu cầu kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Phần Các kỹ thuật phân tích).

### 3 Phương pháp thử

#### 3.1 Quy định chung

- Trong tiêu chuẩn này chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng, trừ khi có quy định khác.
- Trong tiêu chuẩn này sử dụng thiết bị và dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường.



### 3.2 Phương pháp nhận biết chất màu

#### 3.2.1 Phương pháp nhận biết bằng sắc kí

Xem JECFA 2006, *Combined Compendium of Food Additive Specifications, Volume 4, Section on Analytical Techniques* (Tuyển tập quy định kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4, Phần Các kỹ thuật phân tích).

Giá trị của hệ số lưu  $R_f$  của một chất nói chung không thể định lượng được chính xác do nhiều yếu tố, bao gồm: thành phần và thời hạn của hỗn hợp dung môi, nồng độ của dung môi bay hơi trong không khí, chất lượng của giấy sắc kí, hướng seo giấy, kiểu loại và chất lượng của các chất màu phụ, nồng độ, giá trị pH của dung dịch và nhiệt độ. Do đó, cần so sánh mẫu thử với các chất màu chuẩn bằng cách cho chạy đồng thời vài chất màu có nồng độ tương tự để loại bỏ một số yếu tố này.

Bảng 1 đưa ra các ví dụ về giá trị  $R_f$  dự kiến khi dung dịch 1 % các chất màu khác nhau được triển khai trên sắc kí lớp mỏng trên silica gel G trong hệ thống 10 dung môi được nêu dưới đây:

1. Iso propanol : amoniac (tỉ trọng 0,880) : nước (7 : 2 : 1)
2. Iso butanol : etanol : nước : amoniac (tỉ trọng 0,880) (10 : 20 : 10 : 1)
3. Dung dịch kali nitrat bão hoà trong nước
4. Phenol : nước (4 : 1) (phần khối lượng/thể tích)
5. Axit clohydric (tỉ trọng 1,18) : nước (23 : 77)
6. Trinatri xitrat : amoniac (tỉ trọng 0,880) : nước (2 g : 15 ml : 85 ml)
7. Axeton : 2-butanon : amoniac (tỉ trọng 0,880) : nước (60 : 140 : 1 : 60)
8. n-Butanol : etanol : pyridin : nước (2 : 1 : 1 : 2)
9. Iso propanol : amoniac (tỉ trọng 0,880) (4 : 1)
10. n-Butanol : axetic axit (băng) : nước (10 : 5 : 6).

CHÚ THÍCH: Thành phần của các hệ dung môi này phải được chuẩn bị mới.

Việc đánh giá chất tạo màu cần thực hiện khi sắc đồ vẫn còn ẩm dung môi, và đánh giá lại sau khi khô. Màu sắc cần được đánh giá dưới ánh sáng tới và xuyên qua, cũng như dưới ánh sáng tử ngoại (UV) vì khi đó sẽ thấy nhiều chất màu thay đổi về đặc tính màu. Ngoài ra, ánh sáng tử ngoại thường được dùng để nhận biết sự có mặt của các tạp chất huỳnh quang không màu. Nếu có thể, sử dụng hai bức xạ UV có chiều dài bước sóng khác nhau; một đèn phát xạ ở bước sóng khoảng 250 nm.

Nên tiến hành các phép thử với axit, kiềm và các thuốc thử thích hợp khác, để khẳng định kết quả. Tất cả các phép thử có thể được tiến hành với pipet mao quản trên mỗi vết màu.

Khi nhận biết các chất tạo màu bằng cách so sánh với chất màu chuẩn thì phải đáp ứng được các yêu cầu sau đây:

- khoảng di chuyển bằng nhau trong vài hệ dung môi;
- màu sắc như nhau dưới ánh sáng thường và ánh sáng tử ngoại;
- sự thay đổi màu như nhau với thuốc thử.

Bảng 1 – Giá trị R<sub>i</sub> của một số chất tạo màu tan trong nước

Chất tạo màu	Số C.I.	Số INS	Hệ thống dung môi									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Màu đỏ</b>												
Ponceau 4R hoặc Cochineal Red A	16255	124	0,66 (0,85)	0,75	0,88	0,03	0,95	1,00	0,60	0,90	0,11	0,52 0,00-0,57
Carmosine hoặc Azorubine	14720	122	0,65 (0,77)	0,81	0,00-0,42	0,16	0,00 (0,00- 0,32)	1,00	0,65	0,88	0,34 (0,46)	0,63 (0,11- 0,70)
Amaranth	16185	123	0,62 (0,48; 0,76)	0,75 (0,83)	1,00 (0,00- 1,00)	0,04 (0,16)	1,00	1,00	0,40 (0,64; 0,66)	0,90	0,10 (0,41)	0,39; 0,67
Erythrosine RS	45430	127	0,85 (0,68; 0,79)	0,91 (0,86; 0,74; 0,81)	0,00, 0,10	0,00-0,90 (0,41)	0,00	0,00-0,95	0,64, 0,66 (0,58)	0,89	0,66 (0,57; 0,43)	1,00
Red2G	18050	—	0,68	0,680	0,37	0,12	0,00-0,71	0,90	0,64	0,90	0,36	0,68
<b>Màu vàng cam</b>												
Orange G	16230	—	0,71 (0,67; 0,88)	0,80 (0,75)	0,64 (1,00; 0,35)	0,23; 0,15; 0,04	0,73	1,00	0,64 (0,62; 0,50, 0,67)	0,91	0,36 (0,32; 0,17)	0,69 (0,46; 0,82)
Orange RN	15970	—	0,83 (0,62)	0,88 (0,78)	0,00 (0,00- 0,42)	0,42 (0,13)	0,13 (0,38)	0,76 (1,00)	0,68 (0,65)	0,92	0,64 (0,29)	0,82; 0,71
Sunset Yellow FCF hoặc Orange Yellow S	15985	110	0,75 (0,68)	0,82 (0,74)	1,00 (0,00- 1,00)	0,17, 0,03	1,00	1,00	0,65 (0,48)	0,90	0,34 (0,10; 0,22)	0,67 (0,46)

Chất tạo màu	Số C.I.	Số INS	Hệ thống dung môi									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Màu vàng</b>												
Tartrazine	19140	102	0,66	0,77	0,46-1,00	0,08	0,930	0,930	0,52	0,93	0,14	0,50
Yellow 2G	18965	—	0,63	0,80	0,77	0,21	0,74	0,620	0,62	0,92	0,21	0,75
Quinoline Yellow	47005	104	0,83; 0,88	0,88 (0,82)	0,00-1,00	0,65 (0,21)	0,26-1,00; 0,00-0,38	0,95 (0,35)	0,54 (0,68)	0,88	0,00- 0,31; 0,64	0,11-0,75 (0,83)
Fast Yellow AB	13015	—	0,77	0,81	0,560	0,14	0,97	0,560	0,56	0,93	0,36	0,66
<b>Màu xanh và màu tím</b>												
Green S hoặc Acid Brilliant- Green BS hoặc Lissamine Green	44090	142	0,44 (0,52; 0,68; 0,74)	0,61 (0,67; 0,75; 0,81; 0,84)	0,49 (0,24)	0,53 (0,05; 0,36; 1,00)	0,29 (0,43)	1,00	0,46 (0,56; 0,71)	0,75 (0,89; 0,92)	0,07	0,55
Indigo Carmine hoặc Indigotin	73015	132	0,56 (0,70)	0,50-0,76 (0,78)	0,00 (0,05; 0,90; 1,00)	0,09,0,18 (0,52)	0,92	0,94	0,66 (0,71; 0,73)	0,89; 0,84	0,37 (0,00- 0,34)	0,00-0,63
Indanthrene Blue hoặc Solanthrene Blue RS hoặc Anthragen Blue	69800	—	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Brilliant Blue FCF	42090	—	0,64 (0,73)	0,78	0,05	0,45 (0,68)	0,10	0,00-1,00	0,61 (0,68)	0,88	0,30 (0,49, 0,00-0,23)	0,53 (0,64)
Patent Blue V	42051	131	0,34- 0,60	0,68	0,05	0,55	0,15	0,95	0,69 (0,72)	0,84 (0,92)	0,00-0,10	0,59
Violet 6B	42640	—	0,73 (0,67)	0,80 (0,72)	0,00 (0,00-	0,62 (0,51-	0,00-0,37	0,00-1,00	0,67	0,89 (0,62)	0,37; 0,45	0,64 (0,71)

Chất tạo màu	Số C.I.	Số INS	Hệ thống dung môi									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Methyl Violet	42535	—	0,91) 0,91 (0,80)	0,56; 0,81; 0,90	0,48) 0,00 (0,00- 0,31)	1,00) 0,79-1,00	0,00-0,80	0,00 (0,00- 0,53)	0,00-0,68 (0,11; 0,28; 0,53; 1,00)	0,11 (0,90)	0,70; 0,76 0,94; 0,87 (0,00- 0,83)	0,75; 0,79 (0,00- 0,70)
<b>Màu nâu và màu đen</b>												
Brown FK	—	—	0,78; 0,71; 0,66	0,79; 0,86	1,00 (0,00- 1,00)	0,69; 0,27; 0,15,0,00	0,00-0,77	1,00	0,59; 0,64; 0,53 (0,37)	0,93	0,34 (0,26; 0,53)	0,00-0,73
Chocolate Brown FB	—	—	0,00- 0,69	0,00-0,75	0,00-0,82	0,00 (0,00- 0,23)	0,00-1,00	0,00-1,00	0,36; 0,51; 0,62	0,87	0,00-0,38	0,00-0,75
Chocolate Brown HT	20285	—	0,00- 0,63	0,74	0,00-1,00	0,00 (0,00- 0,16)	0,00-1,00	0,00-1,00	0,34; 0,43; 0,62	0,88	0,00-0,32	0,00-0,73
Black PN hoặc Brilliant- Black BN	28440	151	0,66 (0,47)	0,75	0,00 (0,00- 1,00)	0,00	1,00	1,00	0,38 (0,61)	0,85	0,05	0,00-0,43
Black 7984	27755	152	0,62	0,75	1,00	0,1,00	1,00	1,00	0,38 (0,61)	0,85	0,09	0,00-0,45

#### CHÚ DẪN

Số C.I.: chỉ số của chất màu;

Số trong ngoặc đơn, ( ), chỉ các vết phụ có cường độ màu thấp hơn;

"0.xx-0.yy": vạch giữa các vết;

### 3.2.2 Phương pháp nhận biết bằng đo quang phổ

Xem JECFA 2006, *Combined Compendium of Food Additive Specifications, Volume 4, Section on Analytical Techniques* (Tuyển tập quy định kỹ thuật đối với phụ gia thực phẩm, Tập 4, Phần Các kỹ thuật phân tích).

Phương pháp quang phổ có thể áp dụng cho các vùng tử ngoại, hồng ngoại và vùng ánh sáng nhìn thấy của các phổ điện từ.

Vùng nhìn thấy của quang phổ thông thường được kiểm tra như là bước đầu tiên trong việc thử nhận biết một chất màu chưa biết. Có nhiều chất màu cho dải hấp thụ đặc trưng trong vùng nhìn thấy. Phổ trong vùng tử ngoại cũng có thể được sử dụng, nên thu nhận kết quả này cùng với kết quả từ phổ nhìn thấy, nếu có thể.

Trong ứng dụng về phép đo quang phổ UV-VIS, phổ thu được từ nhiều hơn một dung môi, hoặc nếu từ một dung môi riêng lẻ, thì phải dưới những điều kiện khác nhau. Phổ của dung dịch nước cần thu được trong những điều kiện trung tính (được đệm bằng amoni axetat), axit (axit clohydric 0,1 N), và kiềm (natri hydroxit 0,1 N).

Phổ hấp thụ trong vùng UV-VIS thông thường được thể hiện bằng đồ thị của độ hấp thụ và bước sóng. Cùng với bước sóng có độ hấp thụ cực đại, các đặc tính hữu ích và đặc trưng nhất của phổ hấp thụ có thể là "đoạn uốn" hay các điểm uốn trên đường phổ. Các đặc tính này thường có thể phân biệt được giữa hai hoặc nhiều các chất màu có độ hấp thụ cực đại ở cùng bước sóng. Nhiều chất màu có thể được xác định bằng việc quan sát phạm vi mà độ hấp thụ cực đại và các đặc tính khác của đường cong hấp thụ bị thay đổi theo sự thay đổi pH khác nhau hoặc do thay đổi dung môi.

Phổ hấp thụ hồng ngoại cũng là một biện pháp hữu ích khác để nhận biết các hợp chất. Ví dụ, trong khi phổ hấp thụ trong vùng UV-VIS của các chất màu Sunset Yellow và Orange GGN gần như là đồng nhất thì phổ hồng ngoại của chúng lại khác nhau hoàn toàn trong vùng phổ mà tại đó các nhóm axit sulfonic hấp thụ rất mạnh.

Phổ hồng ngoại của các chất có thể thu được bằng cách dùng các chế phẩm mẫu khác nhau; những chế phẩm thông dụng là:

- dung dịch vật liệu thử trong các dung môi thích hợp;
- huyền phù của vật liệu thử trong một chất lỏng thích hợp.
- viên kali bromua (trong kỹ thuật này, một lượng nhỏ chất màu, thường từ 1 mg đến 3 mg được trộn kĩ với kali bromua khô, tinh khiết, hỗn hợp này được đưa vào khuôn thích hợp và được nén thành những viên mỏng bởi lực nén từ 700 kg/cm<sup>2</sup> đến 1400 kg/cm<sup>2</sup>).

Phổ thường được biểu thị bằng % độ truyền theo số sóng (cm<sup>-1</sup>). Các phần lồi của phổ là cường độ của pic hấp thụ và hình dạng của chúng.

Cần chú ý để nhận biết được dải hấp thụ do các chất nhiễm bẩn. Tất cả các vật liệu cần được kiểm tra để chắc chắn rằng không còn nước hoặc dung môi khác trước khi thu được phổ hồng ngoại bởi vì nước và tất cả các dung môi hữu cơ đều hấp thụ bức xạ hồng ngoại. Các chất màu tan trong nước thường được xử lý để phân tích bằng cách hoà tan mẫu trong nước, thêm một ít axit axetic, làm bay hơi đến gần khô, và sau đó làm khô ở khoảng 100 °C để loại hết nước sót. Nên thu nhận phổ hồng ngoại của mẫu ở dạng chất rắn khô cũng như mẫu trắng.

### 3.2.3 Các phương pháp nhận biết khác

Để nhận biết các chất màu, có thể khử chất màu hoặc phân huỷ và nhận biết các sản phẩm tạo thành. Phương pháp này đặc biệt được áp dụng để nhận biết các chất màu azo. Các hợp chất amin tạo ra từ phản ứng khử có thể được nhận biết dễ dàng bằng các kĩ thuật sắc kí và đo quang phổ.

Các chất màu có cấu trúc tinh thể xác định và có thể được nhận biết bằng biểu đồ nhiễu xạ tia X hoặc bằng tinh thể học tia X. Một số chất màu có thể được chuyển thành dạng dẫn xuất tinh thể và được nhận biết theo cách tương tự.

## 3.3 Phương pháp xác định tổng hàm lượng chất màu

### 3.3.1 Phương pháp xác định tổng hàm lượng chất màu bằng đo quang phổ

#### 3.3.1.1 Nguyên tắc

Độ hấp thụ của dung dịch chất màu được xác định tại bước sóng hấp thụ cực đại và tổng hàm lượng chất màu tính được bằng cách sử dụng giá trị độ hấp thụ của chất chuẩn.

Độ hấp thụ của các chất màu có trong mẫu thử hấp thụ trong cùng một vùng như chất màu chính được dùng để tính kết quả.

#### 3.3.1.2 Thiết bị, dụng cụ

**3.3.1.2.1 Máy đo quang phổ trong dải UV-VIS**, có thể đo độ hấp thụ chính xác đến  $\pm 1\%$  hoặc chính xác hơn, trong dải bước sóng từ 350 nm đến 700 nm với độ rộng khe hiệu quả nhỏ hơn hoặc bằng 10 nm.

**3.3.1.2.2 Cuvet quang phổ**, có chiều dài đường quang 1 cm.

### 3.3.1.3 Quy trình 1 – Phương pháp xác định hàm lượng chất màu tan trong nước

#### 3.3.1.3.1 Cách tiến hành

Cân 0,25 g  $\pm$  0,02 g mẫu thử (*m*), chuyển vào bình định mức 1 lit. Thêm nước vừa mới được cất hoặc dung môi được chỉ định trong tiêu chuẩn yêu cầu kỹ thuật và xoay bình để hoà tan. Thêm nước đến vạch và trộn đều. Pha loãng thành một dung dịch có nồng độ thích hợp theo quy định chi tiết trong tiêu chuẩn yêu cầu kỹ thuật. Đo độ hấp thụ (*A*) tại bước sóng có độ hấp thụ cực đại, sử dụng máy đo quang phổ (3.3.1.2.1), trong cuvet 1 cm (3.3.1.2.2), dùng nước hoặc dung môi được chỉ định làm mẫu trắng.

3.3.1.3.2 Tính kết quả

Hàm lượng các chất màu tổng số của mẫu thử, X, được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức sau:

$$X = \frac{A \times V_0 \times F}{a \times r \times m} \times 100 \quad (1a)$$

hoặc:

$$X = \frac{A}{A_{1cm}^{1\%}} \times \frac{F}{m} \times 100 \quad (1b)$$

trong đó

A là độ hấp thụ của dung dịch mẫu tại bước sóng hấp thụ cực đại;

$A_{1cm}^{1\%}$  là độ hấp thụ riêng của chất chuẩn;

a là độ hấp thụ của chất chuẩn, tính bằng l/(g.cm);

$V_0$  là dung tích bình định mức, tính bằng lít ( $V_0 = 1$  lít);

r là chiều dài của cuvet (3.3.1.2.2), tính bằng centimet ( $r = 1$  cm);

F là hệ số pha loãng (thể tích pha loãng trên thể tích đong);

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

3.3.1.4 Quy trình 2 – Phương pháp xác định hàm lượng chất màu tan trong dung môi hữu cơ

3.3.1.4.1 Thuốc thử

3.3.1.4.1.1 Cloroform, không chứa axit.

3.3.1.4.1.2 Xyclohexan.

3.3.1.4.2 Cách tiến hành

Cân khoảng 0,08 g ± 0,01 g mẫu thử (m), cho vào bình định mức 100 ml ( $V_1$ ). Thêm 20 ml cloroform (3.3.1.4.1.1) và hoà tan bằng cách xoay mạnh bình. Cân chắc chắn rằng dung dịch trong suốt. Thêm xyclohexan (3.3.1.4.1.2) đến vạch và trộn. Dùng pipet lấy 5,0 ml dung dịch ( $v_1$ ) cho vào bình định mức 100 ml thứ hai ( $V_2$ ) và định mức bằng xyclohexan đến vạch. Dùng pipet lấy 5,0 ml dung dịch đã pha loãng này ( $v_2$ ) cho vào bình định mức 100 ml thứ ba ( $V_3$ ) và thêm xyclohexan đến vạch. Đo độ hấp thụ (A) của dung dịch đã pha loãng hai lần tại bước sóng hấp thụ cực đại, sử dụng máy đo quang phổ (3.3.1.3.1) trong cuvet 1 cm (3.3.1.3.2), dùng xyclohexan làm mẫu trắng.

Thực hiện ngay quy trình này, tránh tiếp xúc với không khí đến mức có thể và thực hiện tất cả các bước trong điều kiện tránh ánh sáng trực tiếp của mặt trời.

### 3.3.1.4.3 Tính kết quả

Hàm lượng các chất màu tổng số của mẫu thử,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức sau:

$$X = \frac{A \times V_1 \times V_2 \times V_3}{a \times 10^{-3} \times v_1 \times v_2 \times m} \times 100 \quad (2a)$$

hoặc:

$$X = \frac{A \times V_1 \times V_2 \times V_3}{v_1 \times v_2 \times m \times A_{1cm}^{1\%}} \quad (2b)$$

trong đó

$A$  là độ hấp thụ của dung dịch mẫu tại bước sóng hấp thụ cực đại;

$A_{1cm}^{1\%}$  là độ hấp thụ riêng của chất chuẩn được quy định trong tiêu chuẩn yêu cầu kỹ thuật;

$a$  là độ hấp thụ của chất chuẩn, tính bằng  $l/(g \cdot cm)$ ;

$V_1, V_2, V_3$  là dung tích các bình định mức, tính bằng mililit (mỗi bình là 100 ml);

$v_1, v_2$  là các thể tích được lấy bằng pipet, tính bằng mililit (mỗi lần lấy 5 ml);

$10^{-3}$  là hệ số chuyển đổi, tính bằng mililit trên lít (ml/l);

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

### 3.3.1.5 Quy trình 3 – Phương pháp xác định hàm lượng chất màu trong màu muối kim loại (lake)

#### 3.3.1.5.1 Thuộc thử

##### 3.3.1.5.1.1 Axit clohydric.

##### 3.3.1.5.1.2 Dung dịch đệm phosphat, pH = 7, chuẩn bị như sau:

Cân 13,61 g kali dihydro phosphat cho vào cốc có mỏ dung tích 2 000 ml, hoà tan trong 200 ml nước và pha loãng đến 1 000 ml. Thêm khoảng 90 ml dung dịch natri hydroxit 1 N. Xác định pH bằng máy đo pH và chỉnh pH đến 7,0 bằng dung dịch natri hydroxit 0,1 N hoặc axit phosphoric loãng.

##### 3.3.1.5.2 Cách tiến hành

Cân chính xác một lượng màu muối kim loại có độ hấp thụ gần bằng độ hấp thụ của dung dịch màu gốc khi dung dịch này được thử nghiệm theo 3.3.1.3. Chuyển lượng cân như trên vào cốc có mỏ dung tích 250 ml có chứa 10 ml axit clohydric (3.3.1.5.1.1) đã pha loãng với nước đến khoảng 50 ml. Vừa đun vừa khuấy để hoà tan màu muối kim loại, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng. Chuyển sang bình định mức 1 lít, thêm dung dịch đệm phosphat pH 7 (3.3.1.5.1.2) đến vạch và trộn. Tiến hành theo quy trình 3.3.1.3 và theo quy định trong tiêu chuẩn yêu cầu kỹ thuật, dùng dung dịch đệm phosphat có pH 7 để làm mẫu trắng đo quang phổ.



### 3.3.2 Phương pháp xác định tổng hàm lượng chất màu bằng chuẩn độ với titan trichlorua

#### 3.3.2.1 Nguyên tắc

Titan clorua (titan trichlorua,  $TiCl_3$ ) khử chất màu thành các sản phẩm khử có thể chuẩn độ được. Phương pháp này giả định rằng các đồng phân và các chất màu phụ có cùng đương lượng titan trichlorua như chất màu chính.

#### 3.3.2.2 Thuốc thử và vật liệu

##### 3.3.2.2.1 Dung dịch titan trichlorua, nồng độ 0,1 N

###### 3.3.2.2.1.1 Chuẩn bị dung dịch titan trichlorua 0,1 N

Đong 800 ml nước cho mỗi lít dung dịch yêu cầu, vào cốc có mỏ có dung tích thích hợp. Đun sôi mạnh nước trên bếp điện (3.3.2.3.2) trong 1 min, đậy bằng mặt kính đồng hồ rồi để cho nguội đến nhiệt độ phòng. Dùng ống đong chia vạch thêm 90 ml axit clohydric (3.3.2.2.2), khuấy và thêm 100 ml dung dịch titan trichlorua 20 % cho mỗi lít dung dịch yêu cầu (không được chuyển bất cứ lượng kết tủa trắng nào từ bình đựng thuốc thử titan trichlorua sang), thực hiện trong tủ hút. Trộn dung dịch và chuyển sang bình chuẩn độ (3.3.2.3.1.1). Gắn buret (3.3.2.3.1.2) vào và nối với nguồn khí argon. Cho khí argon (3.3.2.2.10) đi qua dung dịch trong 1 h đến 2 h qua nhánh bên có khoá của bình mở để duy trì áp suất khí quyển. Trong khi duy trì tốc độ dòng khí thấp, hút chất chuẩn độ vào buret. Tháo buret, loại bỏ chất chuẩn độ rồi đổ đầy lại. Làm ráo buret, loại bỏ chất chuẩn độ rồi lại đổ đầy buret. Tiếp tục làm ráo rồi lại đổ đầy buret thêm hai lần nữa. Ngừng cấp khí, khoá nhánh bên của bình và bảo quản dung dịch trong ít nhất 72 h trước khi sử dụng.

###### 3.3.2.2.1.2 Chuẩn hoá dung dịch titan trichlorua 0,1 N

Làm ráo buret sau đó đổ đầy titan trichlorua 0,1 N (3.3.2.2.1) vào buret. Sử dụng trong vòng 1 h.

Cân  $3,0 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$  sắt(II) amoni sulfat (3.3.2.2.3), cho vào bình nón 500 ml. Thêm 200 ml nước. Dùng ống đong chia độ thêm 25 ml axit sulfuric 10 N (3.3.2.2.4). Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch chuẩn kali dicromat 0,100 N (3.3.2.2.5) cho vào bình nón. Xoay bình để trộn. Nối kín bình nón với bộ nút (3.3.2.3.1.5) (nút cao su được gắn que khuấy, ống dẫn khí vào và ống thoát khí, đầu tip buret và que khuấy thủy tinh). Đẩy nhẹ khí argon (3.3.2.2.10) vào bình. Bật bộ khuấy (3.3.2.3.1.4) và tăng nhẹ tốc độ cho đến khi dung dịch sôi mạnh mà không bị bắn tung toé. Đợi 1 min trước khi bắt đầu chuẩn độ và vẫn tiếp tục khuấy trong toàn bộ quá trình.

Sau khi thêm từng giọt từ 15 ml đến 17 ml dung dịch titan trichlorua 0,1 N trong vòng 2 min, ngừng dòng chất chuẩn độ và giảm dòng khí argon. Lấy que khuấy thủy tinh ra khỏi bộ nút và dùng pipet lấy 10 ml dung dịch chất chỉ thị amoni thioxyanat 50 % (3.3.2.2.6) cho vào bình. Màu của dung dịch sẽ chuyển sang đỏ nâu. Lấy pipet ra, đưa que khuấy thủy tinh trở lại và phục hồi dòng khí argon. Thêm từng giọt titan trichlorua 0,1 N, dừng lại từ 2 s đến 3 s sau mỗi giọt, cho đến khi quan sát được dung dịch đổi màu rõ từ đỏ nâu sang xanh nhạt. Điểm kết thúc chuẩn độ (từ 20 ml đến 21 ml) đạt được khi dung dịch trở

lại màu xanh lá cây nhạt ban đầu và bền trong 20 s. Ngắt dòng khí argon và từ từ tắt dụng cụ khuấy. Ghi lại thể tích ( $V$ ) của dung dịch titan trichlorua 0,1 N đã dùng, chính xác đến 0,05 ml. Thực hiện chuẩn độ lặp lại ba lần.

Xác định với mẫu trắng không có chất chỉ thị bằng cách lặp lại quy trình nêu trên mà không dùng kali dicromat 0,100 N (3.3.2.2.5). Việc xác định mẫu trắng cần ít hơn 0,5 ml dung dịch titan trichlorua 0,1 N (3.3.2.2.1). Ghi lại thể tích đã dùng, chính xác đến 0,05 ml.

Đối với mỗi lần chuẩn độ, nồng độ của dung dịch titan trichlorua bằng:

$$\frac{N \times 20}{V - V_0}$$

trong đó:

$N$  là nồng độ của dung dịch kali dicromat chuẩn;

20 là thể tích của dung dịch kali dicromat, tính bằng mililit (ml);

$V$  là thể tích của dung dịch titan trichlorua cần để chuẩn độ phần thể tích của dung dịch chuẩn kali dicromat, tính bằng mililit (ml);

$V_0$  là thể tích của dung dịch titan trichlorua đã dùng trong phép thử trắng, tính bằng mililit (ml).

Tính nồng độ của dung dịch chuẩn titan trichlorua là kết quả trung bình các kết quả của ba lần chuẩn độ.

Chuẩn hoá lại dung dịch hàng tuần bằng cách thực hiện một phép chuẩn độ dung dịch kali dicromat 0,100 N và xác định một mẫu trắng không có chất chỉ thị.

### 3.3.2.2.2 Axit clohydric.

### 3.3.2.2.3 Sắt(II) amoni sulfat [ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ].

### 3.3.2.2.4 Dung dịch axit sulfuric, nồng độ 10 N.

### 3.3.2.2.5 Dung dịch chuẩn kali dicromat, nồng độ 0,100 N.

### 3.3.2.2.6 Dung dịch chất chỉ thị amoni thioxyanat, nồng độ 50 %.

### 3.3.2.2.7 Natri xitrat.

### 3.3.2.2.8 Natri hydrotartrat.

### 3.3.2.2.9 Viên trợ sôi.

3.3.2.2.10 Khí argon, dạng khí nén UHP (cũng có thể sử dụng cacbon dioxit sinh ra từ thiết bị Kipp, khí nitơ nén có thể được sử dụng với điều kiện là đã loại bỏ lượng oxi dư).

## 3.3.2.3 Thiết bị, dụng cụ

### 3.3.2.3.1 Thiết bị chuẩn độ (ví dụ xem Hình 1), bao gồm:

## TCVN 6470:2010

**3.3.2.3.1.1 Bình chuẩn độ**, bằng thủy tinh bosilicat (có thể có thể tích đến 5 lít, nếu cần), với cổ thủy tinh mài 29/42 (đối với buret), một nhánh bên để đưa ống dẫn khí vào, một nhánh có khoá (để thoát khí) và một nhánh có nắp thủy tinh để bổ sung chất chuẩn độ vào bình.

CHÚ THÍCH 1: Bình chuẩn độ có thể được chế tạo thủ công.

CHÚ THÍCH 2: Nên đặt một bộ sục nước giữa nguồn khí argon và thiết bị chuẩn độ.

**3.3.2.3.1.2 Buret điện tử**, dung tích 25 ml, Brinkmann Digital Burette II™ hoặc tương đương

**3.3.2.3.1.3 Bình nón**, dung tích 500 ml, có thể đậy kín bằng các nút cao su số 10.

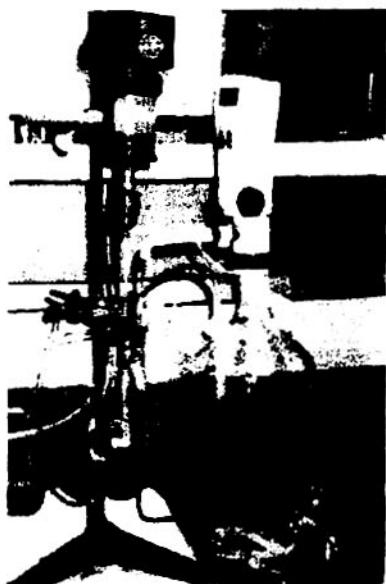
**3.3.2.3.1.4 Bộ khuấy gắn phía trên.**

**3.3.2.3.1.5 Bộ nút**, gồm nút cao su số 10, có năm lỗ dùng cho que khuấy, đầu tip của buret phân phối, nguồn khí argon, ống thoát khí và pipet có dung tích 10 ml.

**3.3.2.3.1.6 Nút thủy tinh dùng cho cổng pipet.**

**3.3.2.3.1.7 Ống nối**, bằng thủy tinh và cao su đàn hồi.

**3.3.2.3.2 Bếp điện.**



Hình 1 – Thiết bị chuẩn độ titan trichlorua

### 3.3.2.4 Cách tiến hành

#### 3.3.2.4.1 Xác định tổng hàm lượng chất màu

Cân chính xác một lượng mẫu thử ( $m$ , tính theo miligam), được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể, cho vào bình nón dung tích 500 ml. Thêm 10 g natri xitrat (3.3.2.2.7) hoặc 15 g natri hydrotartrat (3.3.2.2.8), theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể, vài hạt trợ sôi (3.3.2.2.9) và 150 ml nước. Rửa thành bình nón

bằng nước, đẩy bình bằng mặt kính đồng hồ và xoay nhẹ bình để hoà tan. Đặt bình vào tủ hút, đun dung dịch trên bếp điện (3.3.2.3.2) đến sôi. Cho dung dịch sôi mạnh trong ít nhất 10 s để tách oxit hoà tan (cho dung dịch sôi không quá 2 min để tránh làm phân huỷ mẫu). Dùng gang tay lấy bình nón ra khỏi bếp điện. Trong vòng từ 2 min đến 4 min sau khi lấy bình nón ra, bỏ mặt kính đồng hồ và nối kín bình với bộ nút (3.3.2.3.1.5) (bình nón có thể vẫn còn nóng). Đẩy nhẹ khí argon (3.3.2.2.10) vào trong bình. Bật bộ khuấy (3.3.2.3.1.4) và tăng nhẹ tốc độ cho đến khi dung dịch sôi mạnh mà không bị bắn tung toé. Đợi 1 min trước khi bắt đầu chuẩn độ, và tiếp tục khuấy trong toàn bộ quy trình. Màu của dung dịch sẽ biến đổi theo màu của chất chỉ thị trừ khi có quy định khác nêu trong các tiêu chuẩn yêu cầu kỹ thuật tương ứng.

Thêm nhanh từng giọt dung dịch titan trichlorua 0,1 N (3.3.2.2.1) đã chuẩn hoá vào đến khi bắt đầu biến đổi màu của dung dịch, sau đó dừng khoảng 15 s đến 20 s. Tiếp tục thêm từng giọt chất chuẩn độ, dừng từ 1 s đến 2 s sau mỗi giọt. Khi dung dịch gần giống màu cuối cùng thì dừng trong 20 s. Tiếp tục thêm từng giọt dung dịch titan trichlorua 0,1 N, sau mỗi giọt dừng từ 5 s đến 10 s, cho đến khi quan sát được màu cuối cùng. Điểm kết thúc chuẩn độ đạt được khi màu cuối cùng bền trong 20 s. Ngắt dòng khí argon và tắt dụng cụ khuấy từ từ. Ghi lại thể tích dung dịch titan trichlorua 0,1 N đã dùng, chính xác đến 0,05 ml.

#### 3.3.2.4.2 Xác định hàm lượng chất màu trong màu muối kim loại (lake)

Cho 150 ml nước vào bình nón dung tích 500 ml và sử dụng chất đệm được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể cho chất màu gốc. Cân chính xác một lượng màu muối kim loại tương đương với 35 ml đến 40 ml dung dịch titan trichlorua 0,1 N (3.3.2.2.1) và chuyển vào bình nón. Thêm vài viên trợ sôi (3.3.2.2.9), rửa thành bình nón bằng nước và đẩy bằng kính đồng hồ. Đưa bình nón vào tủ hút và đun hỗn hợp đến sôi hoặc đến khi màu muối kim loại được tan hoàn toàn. Dùng gang tay lấy bình nón ra khỏi bếp điện. Chuẩn độ bằng dung dịch titan trichlorua 0,1 N đã chuẩn hoá, theo phương pháp mô tả trong 3.3.2.4.1.

#### 3.3.2.4.3 Tính kết quả

Tổng hàm lượng chất màu trong mẫu thử,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \frac{V \times F \times N}{m} \times 100 \quad (3)$$

trong đó:

$V$  là thể tích dung dịch titan trichlorua (3.3.2.2.1) đã chuẩn hoá cần dùng, tính bằng mililit (ml);

$m$  là khối lượng mẫu thử, tính bằng miligam (mg);

$N$  là nồng độ của dung dịch titan trichlorua (3.3.2.2.1) đã chuẩn hoá, tính bằng mili đương lượng trên mililit (meq/ml);

$F$  là hệ số, tính bằng miligam trên mili đương lượng (mg/meq);

$$F = \frac{D}{1,00 \text{ ml} \times 0,1 \text{ meq/ml}}$$

trong đó:

$D$  là khối lượng của chất màu tương đương với 1,00 ml dung dịch titan triclorea 0,1 N, được quy định trong từng tiêu chuẩn yêu cầu kỹ thuật, tính bằng miligam (mg).

### 3.4 Phương pháp xác định hàm lượng chất màu phụ

#### 3.4.1 Nguyên tắc

Các chất màu phụ được tách ra khỏi chất màu chính bằng cách cho chạy sắc kí giấy và được chiết tách riêng trên giấy sắc kí. Độ hấp thụ của mỗi chất chiết được đo ở bước sóng hấp thụ cực đại của nó trong vùng phổ nhìn thấy.

Do việc nhận biết từng chất màu phụ trong mỗi chất tạo màu thực phẩm là không thực tế, và do các chất màu phụ thường là những thành phần nhỏ trong màu thực phẩm nên phương pháp này giả định rằng độ hấp thụ riêng của mỗi chất màu phụ bằng độ hấp thụ riêng của chất màu chính. Hàm lượng các chất màu phụ được tính bằng cách cộng thêm độ hấp thụ của các chất chiết vào tổng hàm lượng chất màu của mẫu.

#### 3.4.2 Thuốc thử

##### 3.4.2.1 Dung môi sắc kí

- nước : amoniac (tỉ trọng 0,880) : trinatri xitrat (theo tỉ lệ 95 ml : 5 ml : 2 g)
- n-butanol : nước : etanol : amoniac (tỉ trọng 0,880) (theo tỉ lệ 600 : 264 : 135 : 6)
- 2-butanon : axeton : nước (theo tỉ lệ 7 : 3 : 3)
- 2-butanon : axeton : nước : amoniac (tỉ trọng 0,880) (theo tỉ lệ 700 : 300 : 300 : 2)
- 2-butanon : axeton : nước : amoniac (tỉ trọng 0,880) (theo tỉ lệ 700 : 160 : 300 : 2)
- n-butanol : axit axetic băng : nước (theo tỉ lệ 4 : 1 : 5)

Lắc trong 2 min rồi để yên cho tách lớp. Sử dụng lớp phía trên làm dung môi sắc kí.

##### 3.4.2.2 Axeton.

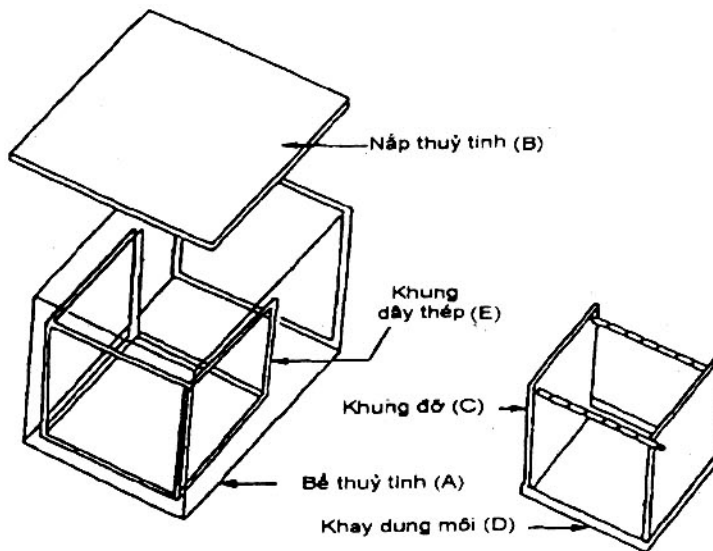
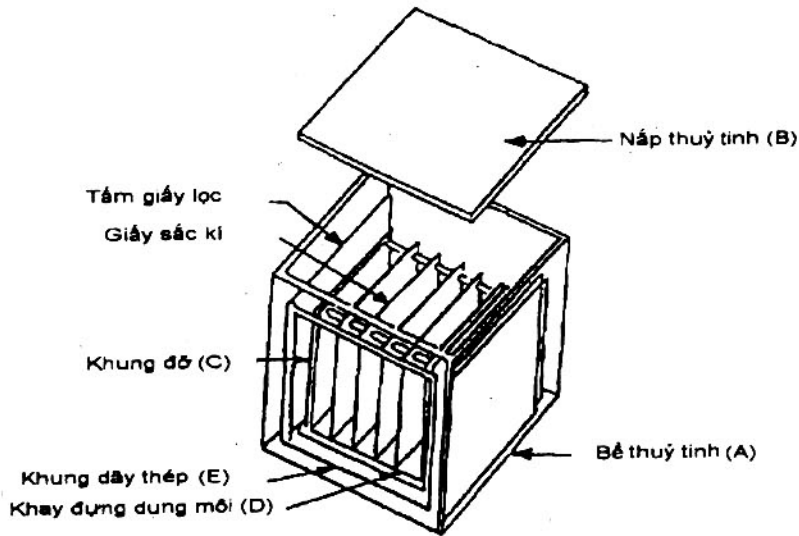
##### 3.4.2.3 Dung dịch natri hydro cacbonat, nồng độ 0.05 N.

#### 3.4.3 Thiết bị, dụng cụ

##### 3.4.3.1 Bể sắc kí và thiết bị phụ trợ (Hình 2) hoặc loại tương đương, bao gồm:

- Bể thủy tinh (A) và nắp đậy (B).
- Khung đỡ (C) để giữ giấy sắc kí;

- khay đựng dung môi (D).
- Khung thứ hai (E) để đỡ các "tám" giấy lọc.



Hình 2 – Bộ sắc kí

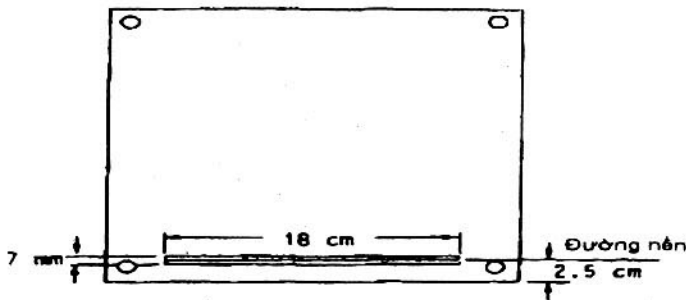
- 3.4.3.2 Microxyranh, có thể phân phối thể tích 0,1 ml với dung sai  $\pm 0,002$  ml.
- 3.4.3.3 Máy đo quang phổ trong vùng nhìn thấy.
- 3.4.3.4 Cuvet dùng đo quang phổ, kin, chiều dài đường quang 40 mm.
- 3.4.3.5 Ống nghiệm.
- 3.4.3.6 Giấy sắc kí Whatman số 1 hoặc loại tương đương, kích thước mỗi tờ 20 cm x 20 cm.
- 3.4.3.7 Giấy lọc thô, kích thước 9 cm, có lỗ xóp.

3.4.3.8 Tủ sấy, có thể hoạt động trong dải nhiệt độ từ 50 °C đến 60 °C.

3.4.4 Cách tiến hành

Trước khi tiến hành phép thử ít nhất 2 h, xếp các lớp giấy lọc (3.4.3.7) vào bể thủy tinh và rót lên các lớp giấy này một lượng dung môi sắc kí (3.4.2.1) đủ để phủ lên đáy bình một lớp dày khoảng 1 cm. Đặt khay đựng dung môi vào vị trí và đậy nắp bể.

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử có nồng độ 1,0 %. Đánh dấu lên tờ giấy sắc kí (3.4.3.6) như trong Hình 3 Chấm 0, 10 ml dung dịch mẫu, càng đều càng tốt trong phạm vi hình chữ nhật kích thước 18 cm x 7 mm, giữ chắc chắn đầu microxyranh (3.4.3.2) khi chạm vào giấy. Để giấy khô ở nhiệt độ phòng trong khoảng từ 1 h đến 2 h, hoặc 5 min trong tủ sấy ở 50 °C, sau đó giữ 15 min ở nhiệt độ phòng. Lắp tờ sắc kí đã khô, cùng với một tờ giấy sắc kí (3.4.3.6) không chấm để làm mẫu trắng vào khung. (Nếu cần, có thể tiến hành đồng thời trên một số tờ giấy sắc kí).



Hình 3 – Phương pháp dùng giấy sắc kí

Rót một lượng dung môi sắc kí (3.4.2.1) vừa đủ vào khay, sao cho bề mặt lớp dung môi này thấp hơn đường nền của giấy sắc kí (3.4.3.6) khoảng 1 cm. Thể tích dung môi cần dùng phụ thuộc vào kích thước bình khai triển và cần được xác định trước. Đặt khung đỡ vào vị trí và đậy nắp bình. Để cho dung môi chạy lên phía trước đến khoảng cách đã định phía trên đường nền, sau đó nhắc khung đỡ ra và đưa vào tủ làm khô ở 50 °C đến 60 °C trong 10 min đến 15 min. Lấy giấy đã chạy sắc kí ra khỏi khung đỡ.

Cắt từng dải giấy sắc kí (3.4.3.6) ra thành từng dải băng màu phụ, và cắt lấy một dải giấy tương đương từ vị trí tương ứng trên tấm giấy đối chứng. Đặt mỗi dải, đã chia thành một số phần phù hợp, xấp xỉ nhau, vào ống nghiệm riêng rẽ (3.4.3.5). Thêm 5,0 ml hỗn hợp nước : axeton (tỉ lệ 1 : 1 theo thể tích) vào mỗi ống nghiệm, xoay ống từ 2 min đến 3 min, thêm 15,0 ml dung dịch natri hydro cacbonat 0,05 N (3.4.2.3) và lắc ống để trộn đều. Lọc các dịch chiết có màu và mẫu trắng qua giấy lọc đường kính 9 cm (3.4.3.7) vào các ống nghiệm (3.4.3.5) sạch và xác định độ hấp phụ của dịch chiết màu này ở bước sóng hấp thụ cực đại của chúng, sử dụng cuvet 40 mm (3.4.3.4) kin, so sánh với 5,0 ml hỗn hợp đã lọc nước : axeton (tỉ lệ 1 : 1 theo thể tích) và 15,0 ml dung dịch natri hydro cacbonat 0,05 N. Đo các độ hấp thụ của

các dịch chiết từ dải mẫu trắng ở cùng bước sóng đã đo dịch chiết màu và hiệu chỉnh độ hấp thụ của các dịch chiết màu với các giá trị đo mẫu trắng.

Từ dung dịch mẫu thử nồng độ 1 %, chuẩn bị dung dịch chuẩn tương ứng với  $L/100$  %, trong đó  $L$  là giới hạn các chất màu phụ được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể. Chấm 0,10 ml dung dịch này lên một tấm giấy sắc kí bằng kĩ thuật đã mô tả ở trên, cho chạy sắc đồ của mẫu thử và mẫu trắng, sau đó làm khô từ 10 min đến 15 min ở 50 °C đến 60 °C. Cắt tấm giấy này thành một dải và cắt một dải tương tự từ một tấm giấy trắng. Tiến hành các bước như trên và xác định độ hấp thụ tổng số ( $A_s$ ) của chất chuẩn đã hiệu chuẩn theo giá trị mẫu trắng.

### 3.4.5 Tính kết quả

Hàm lượng các chất màu phụ trong mẫu thử,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \frac{(A_a + A_b + A_c + \dots + A_n)}{A_s} \times L \times D \times 100 \quad (4)$$

trong đó

$L$  là giới hạn các chất màu phụ được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể;

$D$  là tổng hàm lượng của các chất màu trong mẫu thử.

$A_a + A_b + A_c + \dots + A_n$  là tổng độ hấp thụ của các chất màu phụ được hiệu chỉnh theo giá trị mẫu trắng;

$A_s$  là độ hấp thụ của dung dịch chuẩn.

## 3.5 Phương pháp xác định chất không tan trong nước

### 3.5.1 Thiết bị, dụng cụ

3.5.1.1 Tủ sấy, có thể hoạt động trong dải nhiệt độ từ 0 °C đến 200 °C.

3.5.1.2 Chén lọc, bằng sứ.

3.5.1.3 Đĩa lọc sợi thủy tinh, kiểu Whatman GF/C hoặc loại tương đương.

3.5.1.4 Bình hút ẩm.

### 3.5.2 Cách tiến hành

Cân từ 4,5 g đến 5,5 g mẫu thử ( $m$ ), cho vào một cốc có mô dung tích 250 ml. Thêm khoảng 200 ml nước nóng (từ 80 °C đến 90 °C), khuấy để hoà tan, để cho dung dịch nguội đến nhiệt độ phòng. Lọc dung dịch này qua đĩa lọc (3.5.1.3) vào chén lọc bằng sứ (3.5.1.2) đã biết khối lượng và rửa bằng nước lạnh cho đến khi dịch rửa không còn màu. Sấy khô chén lọc và cặn ở 135 °C cho đến khi thu được khối lượng không đổi. Làm nguội chén chứa cặn trong bình hút ẩm (3.5.1.4) trước mỗi lần cân.



## 3.5.3 Tính kết quả

Hàm lượng các chất không tan trong nước,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \frac{m_R}{m_S} \times 100 \quad (5)$$

trong đó:

$m_R$  là khối lượng phần cặn còn lại, tính bằng gam (g);

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

## 3.6 Phương pháp xác định các chất chiết được bằng ete

## 3.6.1 Phương pháp I

## 3.6.1.1 Thuốc thử

3.6.1.1.1 Nhôm ôxit, dạng bột, dùng cho sắc kí.

3.6.1.1.2 Dung dịch natri hydroxit, nồng độ 2 N và 0,1 N.

3.6.1.1.3 Dung dịch axit clohydric, nồng độ 3 N và 0,1 N.

3.6.1.1.4 Etyl ete hoặc isopropyl ete, mới được chưng cất hoặc đã được ổn định, được tinh sạch như sau:

Ngay trước khi sử dụng, ete mới được chưng cất cần cho đi qua cột nhôm oxit cao 30 cm, để loại bỏ các peroxit và các chất gây ức chế.

Thử để đảm bảo là đã hết peroxit như sau:

Chuẩn bị dung dịch sắt(II) thioxyanat không màu bằng cách trộn các thể tích bằng nhau của dung dịch sắt(II) sulfat 0,1 N và dung dịch amoni thioxyanat 0,1 N. Cần thận làm mất màu đỏ của ion sắt(III) bằng dung dịch chuẩn titan trichlorua 0,1 N. Thêm 10 ml ete vào 50 ml dung dịch này và lắc hỗn hợp thật mạnh trong 2 min đến 3 min. Không được có màu đỏ xuất hiện.

## 3.6.1.2 Thiết bị, dụng cụ

3.6.1.2.1 Bộ chiết lỏng-lỏng, kiểu dịch chuyển lên, có bộ phận phân phối bằng thủy tinh xóp, dung tích làm việc là 500 ml, có một mẫu dây đồng thau được cho vào qua bộ ngưng.

3.6.1.2.2 Bình chưng cất, dung tích 250 ml và 500 ml, bên trong có cuộn dây đồng nhỏ (0,5 g).

3.6.1.2.3 Tủ sấy, có thể hoạt động trong dải nhiệt độ từ 0 °C đến 200 °C.

3.6.1.2.4 Bình hút ẩm.

### 3.6.1.3 Cách tiến hành

#### 3.6.1.3.1 Chiết ete kiềm

Cân chính xác khoảng 5,0 g mẫu thử ( $m$ ) (đối với các chất màu có độ hòa tan nhỏ hơn 5 g/150 ml, dùng lượng nhỏ hơn, theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể). Hoà tan mẫu trong 150 ml nước, thêm 2,5 ml dung dịch NaOH 2 N (3.6.1.1.2) và chuyển dung dịch này vào bình chưng cất dung tích 500 ml (3.6.1.2.2), thêm nước đến khoảng 200 ml. Thêm 200 ml ete (3.6.1.1.4) vào bình chưng cất và chiết trong 2 h với tốc độ hồi lưu khoảng 15 ml/min. Giữ lại dung dịch màu. Chuyển dịch chiết ete này vào một phễu chiết và rửa dịch chiết ete 2 lần mỗi lần dùng 25 ml dung dịch NaOH 0,1 N (3.6.1.1.2) và sau đó rửa bằng nước. Chuyển vào bình chưng cất dung tích 250 ml (3.6.1.2.2) đã được cân trước ( $m_1$ ), có chứa cuộn dây đồng sạch và chưng cất từng phần ete, giảm thể tích đến khoảng 5 ml.

#### 3.6.1.3.2 Chiết ete axit

Thêm 5 ml axit clohydric 3 N (3.6.1.1.3) vào dung dịch màu được giữ lại từ 3.6.1.3.1, trộn và chiết bằng một lượng ete như trong 3.6.1.3.1. Rửa dịch chiết ete 2 lần mỗi lần dùng 25 ml clohydric 0,1 N (3.6.1.1.3) và sau đó rửa bằng nước. Chuyển từng phần vào bình chứa dịch chiết kiềm (xem 3.6.1.3.1) đã làm bay hơi và cẩn thận cho bay hơi hết ete. Làm khô hoàn toàn trong tủ sấy (3.6.1.2.3) ở 85 °C trong 20 min, sau đó để nguội bình trong bình hút ẩm 30 min rồi đem cân. Lặp lại quá trình làm khô và để nguội cho đến khi thu được khối lượng không đổi ( $m_2$ ).

#### 3.6.1.4 Tính kết quả

Hàm lượng chất chiết được trong ete,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (6)$$

trong đó:

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

$m_1$  là khối lượng bình chưng cất dung tích 150 ml cùng với dịch chiết ete bằng kiềm (xem 3.6.1.3.1), tính bằng gam (g);

$m_2$  là khối lượng bình chưng cất cùng với dịch chiết ete bằng axit sau khi sấy (xem 3.6.1.3.2), tính bằng gam (g).

### 3.6.2 Phương pháp II

#### 3.6.2.1 Thuốc thử

**3.6.2.1.1 Etyl ete hoặc isopropyl ete**, mới được chưng cất hoặc đã được ổn định, đã được tinh sạch và kiểm tra để đảm bảo không còn peroxit theo 3.6.1.1.4.

## TCVN 6470:2010

### 3.6.2.2 Thiết bị, dụng cụ

3.6.2.2.1 Bộ chiết Soxhlet, có một đoạn dây đồng thau được cho vào qua bộ ngưng và một cuộn dây đồng nhỏ (0,5 g) được cho vào bình chưng cất.

3.6.2.2.2 Đĩa làm bay hơi.

3.6.2.2.3 Nồi cách thủy.

3.6.2.2.4 Tủ sấy, có thể hoạt động trong dải nhiệt độ từ 0 °C đến 200 °C.

### 3.6.2.3 Cách tiến hành

Cân chính xác khoảng 2 g mẫu thử ( $m$ ). Chuyển vào ống chiết Soxhlet (3.6.2.2.1) và chiết bằng 150 ml ete (3.6.2.1.1) trong 5 h. Cô đặc dịch chiết ete trên nồi hơi đến khi còn khoảng 5 ml. Làm khô phần cặn này trong đĩa làm bay hơi (3.6.2.2.2) đã biết khối lượng ( $m_1$ ), trên nồi cách thủy, sau đó làm khô ở 105 °C đến khi thu được khối lượng không đổi ( $m_2$ ).

### 3.6.2.4 Tính kết quả

Hàm lượng chất chiết được trong ete,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (7)$$

trong đó:

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

$m_1$  là khối lượng đĩa làm bay hơi (3.6.2.2.2), tính bằng gam (g);

$m_2$  là khối lượng cùng với dịch chiết ete sau khi sấy (xem 3.6.2.3), tính bằng gam (g).

## 3.7 Phương pháp xác định hàm lượng chất không tan trong axit clohydric của màu muối kim loại

### 3.7.1 Thuốc thử

3.7.1.1 Axit clohydric đậm đặc.

3.7.1.2 Axit clohydric, nồng độ 0,5 % (phần thể tích).

### 3.7.2 Thiết bị, dụng cụ

3.7.2.1 Tủ sấy, có thể hoạt động trong dải nhiệt độ từ 0 °C đến 200 °C.

3.7.2.2 Chén nung, bằng thủy tinh thiêu kết, số 4.

3.7.2.3 Bình hút ẩm.

### 3.7.3 Cách tiến hành

Cân chính xác khoảng 5 g màu muối kim loại (lake) ( $m$ ) cho vào một cốc có mỏ dung tích 500 ml. Thêm 250 ml nước và 60 ml axit clohydric đậm đặc (3.7.1.1). Đun sôi cho đến khi hoà tan toàn bộ chất màu và alumin. Lọc qua phễu lọc vào chén nung thủy tinh (3.7.2.2) đã biết khối lượng ( $m_1$ ). Rửa phễu lọc này bằng axit clohydric nóng nồng độ 0,5 % (3.7.1.2) cho đến khi nước rửa không còn màu. Sấy khô cốc ở 135 °C cho đến khi thu được khối lượng không đổi ( $m_2$ ). Làm nguội trong bình hút ẩm trước khi cân.

### 3.7.4 Tính kết quả

Hàm lượng chất không tan trong axit clohydric của màu muối kim loại,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (8)$$

trong đó:

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

$m_1$  là khối lượng chén nung bằng thủy tinh, tính bằng gam (g);

$m_2$  là khối lượng chén nung cùng với mẫu sau khi sấy, tính bằng gam (g).

## 3.8 Phương pháp xác định chất không tan trong cloroform

### 3.8.1 Thuốc thử

3.8.1.1 Cloroform, nhiệt độ sôi 61,1 °C.

### 3.8.2 Thiết bị, dụng cụ

3.8.2.1 Tủ sấy, có thể hoạt động trong dải nhiệt độ từ 0 °C đến 200 °C.

3.8.2.2 Bếp điện.

3.8.2.3 Chén nung, có đĩa lọc bằng bông thủy tinh.

3.8.2.4 Bình chân không hoặc máy hút chân không.

3.8.2.5 Bình hút ẩm.

3.8.2.6 Cốc có mỏ, dung tích 250 ml.

### 3.8.3 Cách tiến hành

Cân chính xác lượng mẫu thử ( $m_1$ ) được quy định đối với từng chất tạo màu, cho vào cốc có mỏ dung tích 250 ml (3.8.2.6). Trộn cùng với 100 ml cloroform (3.8.1.1). Khuấy và đun đến sôi trên bếp điện (3.8.2.2) đặt trong tủ hút. Lọc chân không dung dịch nóng trên vào một chén nung (3.8.2.3) đã biết khối

## TCVN 6470:2010

lượng ( $m_2$ ). Dùng cloroform chuyển phần cặn trong cốc có mỡ vào chén nung. Rửa cặn trong chén nung với từng phần 10 ml cloroform cho đến khi nước rửa không màu. Đặt chén nung này vào tủ sấy (3.8.2.1) và sấy ở 100 °C đến 150 °C trong 3 h; để nguội chén nung trong bình hút ẩm (3.8.2.5). Cân chén nung cùng với mẫu thử đã nguội ( $m_3$ ).

### 3.8.4 Tính kết quả

Hàm lượng chất không tan trong cloroform có trong mẫu thử,  $X$ , tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức sau:

$$X = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (9)$$

trong đó:

$m_1$  là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

$m_2$  là khối lượng chén nung, tính bằng gam (g);

$m_3$  là khối lượng chén nung cùng với mẫu sau khi sấy và để nguội, tính bằng gam (g).

## 3.9 Phương pháp xác định các amin thơm không sulfonat hoá

### 3.9.1 Nguyên tắc

Các amin thơm không sulfonat hoá được chiết trong toluen từ dung dịch mẫu thử đã kiềm hoá rồi được chiết lại trong axit và sau đó được đo bằng máy đo quang phổ, sau khi đã diazo hoá và ghép lại. Các sản phẩm này được thể hiện theo anilin, trừ khi đã biết trước là dạng amin nào đó khác.

CHÚ THÍCH: Phương pháp này không đủ nhạy để xác định anilin ở mức thấp hơn hoặc bằng 1 mg/kg.

### 3.9.2 Thuốc thử

#### 3.9.2.1 Toluen.

3.9.2.2 Dung dịch axit clohydric, nồng độ 1 N.

3.9.2.3 Dung dịch axit clohydric, nồng độ 3 N.

3.9.2.4 Dung dịch kali bromua, nồng độ 50 %.

3.9.2.5 Dung dịch natri cacbonat, nồng độ 2 N.

3.9.2.6 Dung dịch natri hydroxit, nồng độ 1 N.

3.9.2.7 Dung dịch natri hydroxit, nồng độ 0,1 N;

3.9.2.8 Dung dịch muối R (muối dinatri của axit 2-naphtol-3,6 disulfonic), nồng độ 0,05 N.

3.9.2.9 Dung dịch natri nitrit, nồng độ 0,5 N.

### 3.9.2.10 Dung dịch chuẩn anilin, chuẩn bị như sau:

Cân 0,100 g anilin mới được chưng cất lại, cho vào cốc có mỏ rồi chuyển sang bình định mức 100 ml, tráng cốc vài lần bằng nước. Thêm 30 ml dung dịch axit clohydric 3 N (3.9.2.3) và pha nước đến vạch, ở nhiệt độ phòng. Đem pha loãng 10,0 ml dung dịch bằng nước đến 100 ml trong bình định mức, và trộn kỹ; 1 ml dung dịch này tương đương với 0,0001 g anilin (3.9.2.1). Chuẩn bị dung dịch chuẩn anilin ngay trước khi sử dụng.

### 3.9.3 Thiết bị, dụng cụ

3.9.3.1 Máy đo quang phổ, đo trong dải nhìn thấy.

3.9.3.2 Cuvet đo phổ, chiều dài đường quang 40 mm.

### 3.9.4 Cách tiến hành

#### 3.9.4.1 Dụng đồ thị chuẩn

Đong các thể tích dung dịch chuẩn anilin sau đây, cho vào một dãy các bình định mức 100 ml : 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml và 25 ml.

Pha loãng đến 100 ml bằng dung dịch axit clohydric 1 N (3.9.2.2) và trộn kỹ. Dùng pipet lấy 10 ml từ mỗi dung dịch này cho vào các ống nghiệm khô, sạch và làm nguội trong 10 min bằng cách ngâm trong cốc nước đá. Cho vào mỗi ống nghiệm 1 ml dung dịch kali bromua (3.9.2.4) và 0,05 ml dung dịch natri nitrit (3.9.2.9). Trộn và để yên trong 10 min trong cốc nước đá. Cho vào 5 bình định mức 25 ml, mỗi bình 1 ml dung dịch muối R (3.9.2.8) và 10 ml dung dịch natri cacbonat (3.9.2.5). Rót mỗi dung dịch anilin đã xử lý vào một bình riêng có chứa dung dịch muối R và dung dịch natri cacbonat, tráng các ống nghiệm bằng một ít nước. Pha loãng bằng nước đến vạch, đậy nắp bình, trộn kỹ dung dịch trong bình và để yên 15 min ở nơi tối.

Đo độ hấp thụ của mỗi cặp dung dịch ở bước sóng 510 nm, dùng các cuvet 40 mm. Sử dụng mẫu so sánh là một hỗn hợp gồm 10,0 ml dung dịch axit clohydric 1 N (3.9.2.1), 10,0 ml dung dịch natri cacbonat (3.9.2.5), 2,0 ml dung dịch muối R (3.9.2.8), pha loãng đến 25,0 ml nước. Dụng đồ thị về tương quan giữa độ hấp thụ và khối lượng của anilin trong từng 100 ml dung dịch anilin.

#### 3.9.4.2 Chuẩn bị và kiểm tra dung dịch thử

Cân khoảng 2,0 g mẫu thử (*m*), chính xác đến 0,01 g. Cho vào 1 phễu chiết có chứa 100 ml nước, tráng thành của phễu bằng 50 ml nước, xoay phễu để hoà tan mẫu thử, thêm 5 ml dung dịch natri hydroxit 1 N (3.9.2.6). Chiết với hai lần, mỗi lần 50 ml toluen (3.9.2.1) và rửa dịch chiết toluen đã gộp lại bằng các lượng 10 ml dung dịch natri hydroxit 0,1 N (3.9.2.6) để loại hết các vết màu. Chiết phần toluen đã rửa bằng ba lần, mỗi lần 10 ml dung dịch axit clohydric 3 N (3.9.2.3) và pha loãng bằng nước phần dịch chiết đã gộp chung đến 100 ml. Trộn kỹ. Dung dịch này được gọi là dung dịch T.

Dùng pipet lấy 10,0 ml dung dịch T cho vào một ống nghiệm khô, sạch làm nguội trong 10 min bằng cách ngâm trong một cốc đựng nước đá, thêm 1 ml dung dịch kali bromua (3.9.2.4) và tiến hành tiếp

## TCVN 6470:2010

như đã mô tả ở trên để dựng đường chuẩn, bắt đầu bằng việc thêm 0,05 ml dung dịch natri nitrit (3.9.2.9).

Đo độ hấp thụ của cặp dung dịch thử ở bước sóng 510 nm, trong cuvet 40 mm (3.9.3.2), sử dụng dung dịch so sánh được chuẩn bị từ 10,0 ml dung dịch T, 10 ml dung dịch natri cacbonat (3.9.2.5) và 2,0 ml dung dịch R (3.9.2.8), pha loãng bằng nước đến 25 ml.

Đọc khối lượng anilin ( $m_a$ ) tương ứng với độ hấp thụ quan sát được từ dung dịch mẫu thử trên đồ thị chuẩn.

### 3.9.5 Tính kết quả

Hàm lượng các amin thơm không sulfonat hoá, X, được tính bằng phần trăm khối lượng anilin (%) theo công thức:

$$X = \frac{m_a}{m} \times 100 \quad (10)$$

trong đó:

$m_a$  là khối lượng anilin đọc được, tính bằng gam (g);

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

## 3.10 Phương pháp xác định hàm lượng bazơ leuco trong các chất màu triarylmethan đã sulfonat hoá

### 3.10.1 Nguyên tắc

Không khí được thổi qua dung dịch có chứa chất tạo màu, đồng(II) clorua, dimetylformamit và dung dịch được phân tích bằng quang phổ. Trong các điều kiện này, bazơ leuco (hợp chất vô sắc) được oxi hoá thành các chất màu tương ứng và làm tăng khả năng hấp thụ tương ứng với lượng bazơ leuco có trong mẫu thử.

### 3.10.2 Thuốc thử

#### 3.10.2.1 Đồng(II) clorua [ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ].

#### 3.10.2.2 Dimetylformamit (DMF).

### 3.10.3 Thiết bị, dụng cụ

#### 3.10.3.1 Máy đo quang phổ trong dải nhìn thấy.

#### 3.10.3.2 Cuvet, có chiều dài đường quang 1 cm (cuvet dòng chảy là tùy chọn).

### 3.10.4 Cách tiến hành

LƯU Ý: Thực hiện quy trình càng nhanh càng tốt.

### 3.10.4.1 Chuẩn bị các dung dịch

#### 3.10.4.1.1 Dung dịch A

Cân 10,0 g đồng(II) clorua (3.10.2.1) và hoà tan trong 200 ml DMF (3.10.2.2). Chuyển vào bình định mức 1 lít và thêm DMF (3.10.2.2) đến vạch.

#### 3.10.4.1.2 Dung dịch B

Cân chính xác một lượng mẫu thử ( $m$ ), tính theo miligam, theo quy định trong tiêu chuẩn cụ thể. Hoà tan trong khoảng 100 ml nước, chuyển vào bình định mức 1 lít và thêm nước đến vạch.

#### 3.10.4.1.3 Dung dịch a

Dùng pipet lấy 50 ml DMF (3.10.2.2) cho vào bình định mức 250 ml. Đậy bằng màng Parafilm™ (hoặc loại tương đương) và đặt ở nơi tối.

#### 3.10.4.1.4 Dung dịch b

Dùng pipet lấy chính xác 10 ml dung dịch B cho vào bình định mức 250 ml. Thêm 50 ml DMF (3.10.2.2). Đậy bằng màng Parafilm™ (hoặc loại tương đương) và đặt ở nơi tối.

#### 3.10.4.1.5 Dung dịch c

Dùng pipet lấy 50 ml dung dịch A vào bình định mức 250 ml. Cho sục khí qua dung dịch này trong 30 min theo cách sau:

Luồn pipet 5 ml vào ống nổi dẻo được gắn với nguồn không khí thổi. Cho không khí thổi qua từ từ vào dung dịch trong bình qua pipet và điều chỉnh dòng khí với tốc độ nhanh nhưng kiểm soát được. Sau 30 min, tháo pipet ra khỏi dung dịch và tráng, rửa các thành pipet bằng nước vào bình, sử dụng chai rửa. Sau đó, ngắt dòng không khí.

#### 3.10.4.1.6 Các dung dịch $d_1$ và $d_2$ (các lần lặp lại)

Dùng pipet lấy chính xác 10 ml dung dịch B cho vào hai bình định mức riêng rẽ, dung tích 250 ml. Thêm vào mỗi bình 50 ml dung dịch A. Sục không khí qua các dung dịch này trong 30 min, sử dụng phương pháp nêu trên đối với dung dịch c.

Sau khi ngừng sục khí, dùng nước pha loãng các dung dịch a, b, c,  $d_1$ ,  $d_2$  trong năm bình cùng dung tích và đặt trong nồi cách thủy cho nguội đến nhiệt độ phòng, vì khi DMF và nước được trộn với nhau sẽ có phát nhiệt. Không giữ các bình lâu hơn mức cần thiết; thông thường từ 5 min đến 10 min là đủ. Thêm nước đến vạch. Đo ngay độ hấp thụ của các dung dịch này bằng máy đo quang phổ.

### 3.10.4.2 Xác định bằng đo quang phổ

Dựa theo Bảng 2 dưới đây, dựng các đường hấp thụ đối với các dung dịch a, b, c,  $d_1$ ,  $d_2$  tại bước sóng từ 500 nm đến 700 nm, dùng dung dịch a và dung dịch c làm mẫu trắng. Tráng kĩ các cuvet bằng các dung dịch mẫu thử giữa các lần đo. Khi dùng cuvet dòng chảy, tráng ba lần, mỗi lần dùng ít nhất 40 ml dung dịch mẫu thử.



Bảng 2 – Các đường hấp thụ

Đường cong	Mẫu trắng	Dung dịch	Nhận xét
1	a	a	Đặt điểm zero ở bước sóng 700 nm, cho chạy; ghi lại độ hấp thụ ở bước sóng hấp thụ cực đại đối với chất màu chuẩn
2	a	b	Cho chạy đường cong không điều chỉnh lại điểm zero; ghi lại độ hấp thụ ở bước sóng hấp thụ cực đại.
3	c	c	Đặt điểm zero ở 700 nm; ghi độ hấp thụ ở bước sóng hấp thụ cực đại đối với chất màu chuẩn.
4a	c	d <sub>1</sub>	Chạy đường cong không điều chỉnh lại điểm zero; ghi lại độ hấp thụ ở bước sóng hấp thụ cực đại.
4b	c	d <sub>2</sub>	Chạy đường cong không điều chỉnh lại điểm zero; ghi độ hấp thụ ở bước sóng hấp thụ cực đại.

### 3.10.5 Tính kết quả

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

$$X = [(A_4 - A_3) - (A_2 - A_1)] \times V_0 \times \frac{F}{a \times b \times m \times R} \times 100 \quad (11)$$

trong đó:

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub> là độ hấp thụ cực đại ghi được ghi tương ứng của các cuvet 1, 2, 3 và 4.

V<sub>0</sub> là thể tích bình định mức, tính bằng lít (V<sub>0</sub> = 1 lít);

F là hệ số pha loãng: F = 250 ml/10 ml;

a là khả năng hấp thụ của các chất màu 100 %, tính bằng l/(mg.cm);

b là chiều dài đường quang của cuvet, tính bằng centimet (cm) (b = 1 cm);

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

R là tỉ số của khối lượng phân tử của chất màu và khối lượng phân tử của bazơ leuco (được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể).

## 3.11 Phương pháp xác định các hợp chất hữu cơ không phải là chất màu

### 3.11.1 Phương pháp xác định bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao

#### 3.11.1.1 Nguyên tắc

Các hợp chất hữu cơ không phải là chất màu được tách ra bằng HPLC, sử dụng rửa giải gradient và được định lượng bằng cách so sánh diện tích pic của chúng với diện tích pic thu được từ các dung

dịch chuẩn. Các điều kiện mô tả ở đây được dùng làm hướng dẫn và có thể phải sửa đổi chút ít để tách được tốt. Các sai lệch so với các điều kiện quy định, như khác về chiều dài cột, kiểu nhồi cột và hệ dung môi và sử dụng quy trình ion cặp đôi, có thể cho các sai lệch rửa giải so với trong các điều kiện đã định, như trật tự rửa giải và phân giải.

**CHÚ THÍCH:** Để tách và xác định các hợp chất hữu cơ không phải là chất màu (ví dụ: tạp chất không màu, như là các chất trung gian) thì phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) có một vài ưu thế hơn so với các kỹ thuật sắc kí khác, đó là cải thiện được quá trình tách, nhanh (có thể tự động hoá) và chính xác. Khi xác định các hợp chất hữu cơ cụ thể, phải có các chất chuẩn cho mỗi hợp chất trước khi phân tích bất kì một mẫu cụ thể nào.

Thông thường các phương pháp HPLC được mô tả chi tiết hơn. Các vật liệu nhồi cột, các cột mao quản, kiểu và độ nhạy của các detector phải được chọn để tách được tối đa và định lượng được các tạp chất nêu trong các tiêu chuẩn yêu cầu kỹ thuật của chất tạo màu, cũng như các tạp chất khác.

### 3.11.1.2 Thuốc thử

#### 3.11.1.2.1 Metanol.

#### 3.11.1.2.2 Dung dịch amoni axetat, nồng độ 0,2 N.

#### 3.11.1.2.3 Các chất chuẩn theo yêu cầu.

### 3.11.1.3 Thiết bị, dụng cụ

Các điều kiện để tiến hành sắc kí được cho dưới đây:

#### 3.11.1.3.1 Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao, có gradient rửa giải, được trang bị:

- bộ điều khiển/bộ tích phân;
- bơm, tốc độ dòng 1 ml/min;
- bộ lấy mẫu tự động, có bơm dung tích 20 µl;
- detector, có thể đo độ hấp thụ trong vùng UV-VIS;
- máy in/vẽ đồ thị.

#### 3.11.1.3.2 Cột sắc kí, C18 trên silica gel, cỡ hạt 5 µm, kích thước cột 250 mm x 4,6 mm.

#### 3.11.1.3.3 Cột bảo vệ, C18 trên silica gel, cỡ hạt 5 µm, kích thước cột 15 mm x 4,6 mm.

### 3.11.1.4 Cách tiến hành

#### 3.11.1.4.1 Các thông số của thiết bị

- thể tích bơm: 20 µl;
- chất rửa giải
  - + A: amoni axetat 0,2 N (3.11.1.2.2);
  - + B: metanol (3.11.1.2.1).

## TCVN 6470:2010

– gradient

+ 0,0 (bơm mẫu);

+ từ 0 min đến 35 min: 0 % đến 40 % B (phân tích);

+ từ 35 min đến 41 min: 100 % B (rửa);

+ từ 41,1 min đến 55 min: từ 100 % đến 0 % B (quay về thành phần gradient ban đầu và cột cân bằng).

– tốc độ dòng: 1,0 ml/min.

– nhiệt độ: môi trường.

– áp suất bơm: nhỏ nhất 300 psi (2,07 MPa), lớn nhất 4 000 psi (27,58 MPa).

– bước sóng detector: theo yêu cầu.

– tích phân: diện tích pic.

### 3.11.1.4.2 Phương pháp xác định

Chuẩn bị các dung dịch mẫu của chất tạo màu nồng độ 0,5 % (phần khối lượng) trong amoni axetat 0,02 M. Chuẩn bị các dung dịch hiệu chuẩn từ các chất chuẩn của các tạp chất được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể.

Tiến hành phân tích theo hướng dẫn đối với HPLC và detector.

### 3.11.2 Phương pháp xác định bằng sắc kí cột

#### 3.11.2.1 Nguyên tắc

Thu thập các dịch rửa giải phân đoạn, sử dụng đo phổ hấp thụ tử ngoại để nhận biết các hợp chất có mặt trong từng phân đoạn và để tính nồng độ các chất này.

#### 3.11.2.2 Thuốc thử

3.11.2.2.1 Xenluloza dạng bột, Whatman hoặc xenluloza có hàm lượng sắt thấp tương đương.

3.11.2.2.2 Amoni sulfat, có hàm lượng sắt rất thấp.

3.11.2.2.3 Dung dịch amoni sulfat, nồng độ 25 %, được chuẩn bị từ amoni sulfat (3.11.2.2.2).

#### 3.11.2.3 Thiết bị, dụng cụ

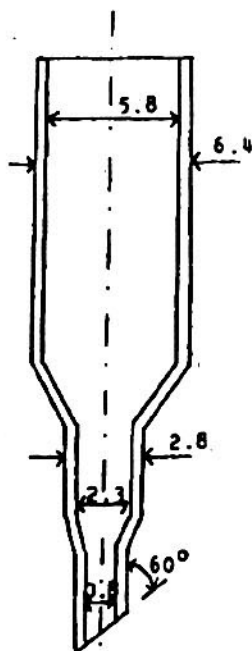
3.11.2.3.1 Cột sắc kí (xem Hình 4), được chuẩn bị như sau:

Chuẩn bị dung dịch nhão từ bột xenluloza trong dung dịch amoni sulfat 25 % (3.11.2.2.3), dùng khoảng 75 g xenluloza (3.11.2.2.1) cho 500 ml chất lỏng. Đặt một đĩa nhỏ bằng lưới thép không rỉ vào chỗ thắt trên đỉnh cột sắc kí. Rót một thể tích vừa đủ dung dịch nhão vào cột sắc kí đến cách miệng cột khoảng

5 cm. Thỉnh thoảng vỗ nhẹ vào cột sắc kí để đảm bảo cột được nhồi chặt. Rửa cột bằng 200 ml chất rửa giải là dung dịch amoni sulfat 25 % (3.11.2.2.3)

Kiểm tra cột bằng cách cho 200 ml dung dịch amoni sulfat 25 % đi qua cột và đo độ hấp thụ UV của dung dịch bằng máy đo quang phổ. Độ hấp thụ phải đủ thấp để tránh gây nhiễu cho phép phân tích.

Kích thước tính bằng centimet



Hình 4 – Cột sắc kí

**3.11.2.3.2 Máy đo quang phổ**, có thể đo trong vùng tử ngoại.

**3.11.2.3.3 Cuvet đo phổ**, chiều dài đường quang 1 cm.

#### 3.11.2.4 Cách tiến hành

Cân 0,200 g mẫu thử (*m*) cho vào cốc có mỏ 150 ml và hoà tan trong 20 ml nước. Thêm khoảng 5 g bột xenluloza (3.11.2.2.1) rồi thêm 50 g amoni sulfat (3.11.2.2.2). Chuyển hỗn hợp này vào cột sắc kí (3.11.2.3.1), tráng cốc bằng dung dịch amoni sulfat 25 % (3.11.2.2.2) và cho nước tráng này vào cột sắc kí. Làm ráo cột cho đến khi nước ngừng hoặc gần như ngừng chảy.

Cho dung dịch amoni sulfat (3.11.2.2.2) vào cột ở tốc độ tương đương với tốc độ dòng chảy qua cột. Thu lấy các phân chiết phân đoạn 100 ml. Tiếp tục cho đến khi thu được 12 phân chiết như trên. Giữ lại cột và các chất trong cột cho đến khi phân chiết cuối cùng được kiểm tra bằng đo quang phổ.

Trộn kĩ từng phân dịch chiết được và đo phổ hấp thụ tử ngoại của mỗi dung dịch ở bước sóng từ 220 nm đến 400 nm, dùng chất rửa giải làm mẫu trắng. Nếu phổ hấp thụ của phân đoạn thứ 12 cho thấy có mặt của một hợp chất bất kì thì tiếp tục thu các phân chiết từ cột cho đến khi các hợp chất được rửa giải hết.

Khả năng hấp thụ của các hợp chất hữu cơ, như các chất trung gian thu được trong các phân đoạn và dự kiến có mặt như mong muốn trong các chất tạo màu được dùng để tính hàm lượng các hợp chất hữu cơ không phải là chất màu có trong mẫu thử và có thể được quy định trong tiêu chuẩn cụ thể.

**CHÚ THÍCH**

Thông thường chỉ một hợp chất có mặt trong mỗi phân đoạn rửa giải. Khi có trên một hợp chất, với một lượng đáng kể có trong bất kì dịch chiết phân đoạn nào, các số liệu đo quang phổ sẽ chỉ ra điều đó. Trong trường hợp này, khối lượng các hợp chất khác nhau đó cần được xác định bằng phương pháp đo phổ thông thường đối với các hỗn hợp chất hấp thụ.

Một vài mẫu thử có chứa lượng nhỏ các chất khác nhau, đặc biệt là các muối vô cơ, sẽ cho "độ hấp thụ nền". Việc hiệu chỉnh được tiến hành như sau: Xác định lượng chất hấp thụ nền ở phân đoạn thu được từ cột ngay trước và ngay sau các phân đoạn. Lấy độ hấp thụ quan sát được của các phân đoạn có chứa các hợp chất hữu cơ trừ đi một nửa (1/2) của tổng hai độ hấp thụ này. Phần còn lại được lấy làm độ hấp thụ của muối vô cơ.

**3.11.2.5 Tính kết quả**

Hàm lượng các hợp chất hữu cơ không phải là chất màu có trong mẫu thử,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \frac{A \times V_1}{a \times b \times m} \times 100 \quad (12)$$

trong đó:

- $A$  là độ hấp thụ tổng số của các phân đoạn rửa giải đã hiệu chỉnh về độ hấp thụ của mẫu trắng;
- $V_1$  là thể tích của một phân đoạn ( $V_1 = 0,100$  lít);
- $a$  là khả năng hấp thụ trong 1 lít, tính bằng  $\text{lit}/(\text{g.cm})$ ;
- $b$  là chiều dài đường quang của cuvet, tính bằng centimet (cm) ( $b = 1$  cm);
- $m$  là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g).

**3.12 Phương pháp xác định hàm lượng clorua**

**CHÚ THÍCH:** Phương pháp này được tiến hành kết hợp với việc xác định hàm lượng nước (hao hụt khối lượng khi sấy) (3.15) và kết quả xác định hàm lượng clorua được dùng để tính hàm lượng nước.

**3.12.1 Thuốc thử**

**3.12.1.1 Dung dịch axit nitric, nồng độ 1,5 N.**

**3.12.1.2 Dung dịch chuẩn bạc nitrat, nồng độ 0,1 N.**

**3.12.2 Thiết bị, dụng cụ**

**3.12.2.1 Thiết bị chuẩn độ điện thế.**

**3.12.2.2 Điện cực chỉ thị bạc.**

**3.12.2.3 Điện cực so sánh calomel, có thân bằng thủy tinh hoặc có cầu nổi là dung dịch kali sulfat.**

### 3.12.3 Cách tiến hành

Cân chính xác từ 0,5 g đến 1,0 g mẫu thử ( $m$ ), hoà tan trong 100 ml nước và axit hóa bằng 5 ml dung dịch axit nitric 1,5 N (3.12.1.1). Đặt điện cực bạc (3.12.2.2) và điện cực calomel có thân bằng thủy tinh (3.12.2.3) vào dung dịch màu. Nếu chỉ có điện cực so sánh calomel chuẩn thì nối điện cực này với dung dịch bằng cầu nối kali sulfat bão hoà (dùng điện cực thủy tinh làm điện cực so sánh thì sẽ không cần đến cầu nối kali sulfat bão hoà; điều này làm đơn giản thiết bị một cách đáng kể và điện cực thủy tinh này đủ ổn định để được sử dụng như điện cực so sánh cho kiểu chuẩn độ này).

Chuẩn độ dung dịch màu bằng dung dịch bạc nitrat 0,1 N.

### 3.12.4 Tính kết quả

Hàm lượng clorua trong mẫu thử,  $X$ , tính bằng phần trăm khối lượng (%) của natri clorua theo công thức:

$$X = \frac{V_1 \times 0,00585}{m} \times 100 \quad (13)$$

trong đó:

$V_1$  là thể tích dung dịch bạc nitrat 0,1 N dùng để chuẩn độ, tính bằng mililit (ml);

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

0,00585 là khối lượng của natri clorua tương ứng với 1 ml dung dịch bạc nitrat 0,1 N, tính bằng gam (g).

## 3.13 Phương pháp xác định hàm lượng sulfat

CHÚ THÍCH: Phương pháp này được tiến hành kết hợp với việc xác định hàm lượng nước (hao hụt khối lượng khi sấy) (3.15) và kết quả xác định hàm lượng sulfat được dùng để tính hàm lượng nước.

### 3.13.1 Thuốc thử

3.13.1.1 Natri clorua, không chứa sulfat.

3.13.1.2 Axit clohydric.

3.13.1.3 Dung dịch bari clorua, nồng độ 0,25 N.

### 3.13.2 Cách tiến hành

Cân 5,0 g mẫu thử, cho vào bình nón dung tích 250 ml và hoà tan trong khoảng 100 ml nước bằng cách hâm nóng trên nồi cách thủy. Thêm 35 g natri clorua không chứa sulfat (3.13.1.1). Đậy nắp bình và thỉnh thoảng xoay bình trong vòng 1 h. Làm nguội bình, chuyển lượng chứa trong bình sang bình định mức 250 ml bằng dung dịch natri clorua bão hoà, để dung dịch nguội đến 20 °C rồi pha loãng đến vạch. Lắc bình, lọc dung dịch qua giấy lọc khô.

Dùng pipet lấy 100 ml dịch lọc cho vào cốc có mỏ dung tích 500 ml, pha loãng đến 300 ml bằng nước và axit hoá bằng axit clohydric (3.13.1.2), thêm 1 ml dư. Đun dung dịch đến sôi và thêm một lượng dư

## TCVN 6470:2010

của dung dịch bari clorua 0,25 N (3.13.1.3), vừa thêm từng giọt một vừa khuấy. Để yên hỗn hợp này trên bếp điện trong 4 h, hoặc để qua đêm ở nhiệt độ phòng. Gia nhiệt đến khoảng 80 °C và để cho kết tủa lắng xuống. Lọc bỏ kết tủa bari sulfat, rửa bằng nước nóng và làm nóng chảy ở độ nóng tạo màu đỏ đậm, trong chén nung đã biết khối lượng, cho đến khi thu được khối lượng không đổi. Tiến hành phép thử trắng, sử dụng cùng quy trình nêu trên và hiệu chỉnh khối lượng bari sulfat tìm được.

### 3.13.3 Tính kết quả

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

$$X = \frac{2,5 \times m_1 \times 0,6086}{m} \times 100 \quad (14)$$

trong đó:

$m_1$  là khối lượng bari sulfat đã hiệu chỉnh, tính bằng gam (g);

$m$  là khối lượng mẫu, tính bằng gam (g);

2,5 là tỉ số giữa thể tích dung dịch mẫu thử đã được định mức và thể tích dịch lọc được lấy để axit hoá.

0,6086 là tỉ số của khối lượng phân tử của natri sulfat và khối lượng phân tử của bari sulfat.

## 3.14 Phương pháp xác định clorua và sulfat tan trong nước có trong mẫu muối nhôm

### 3.14.1 Thuộc thử

3.14.1.1 Dung dịch axit nitric, nồng độ 1,5 N.

3.14.1.2 Dung dịch axit clohydric.

3.14.1.3 Dung dịch bari clorua, nồng độ 0,25 N.

### 3.14.2 Cách tiến hành

Cân chính xác 10 g mẫu thử cho vào cốc có mỏ dung tích 400 ml. Thêm 250 ml nước. Khuấy để hoà tan mẫu thử, sau đó thỉnh thoảng khuấy trong vòng 30 min. Lọc dung dịch.

Đong 50 ml dịch lọc, thêm 50 ml nước nữa và axit hoá bằng 5 ml dung dịch axit nitric 1,5 N (3.14.1.1). Xác định hàm lượng clorua bằng phương pháp chuẩn độ điện thế sử dụng cho các chất tạo màu tan được (xem 3.12).

Đong lấy 50 ml dịch lọc, pha loãng đến 300 ml bằng nước và axit hoá bằng axit clohydric (3.14.1.2), thêm 1 ml dư. Đun dung dịch đến sôi và thêm một lượng dư dung dịch bari clorua 0,25 N (3.14.1.3), vừa thêm từng giọt một vừa khuấy. Tiến hành phân tích bằng cách phân huỷ, lọc và nung kết tủa như quy định trong phương pháp xác định hàm lượng sulfat sử dụng cho các chất tạo màu tan được (xem 3.13)

### 3.15 Phương pháp xác định hàm lượng nước (hao hụt khối lượng khi sấy)

#### 3.15.1 Thiết bị, dụng cụ

3.15.1.1 Tủ sấy, có thể hoạt động trong dải nhiệt độ từ 0 °C đến 200 °C.

3.15.1.2 Bình cân, đường kính 50 mm, cao 30 mm, có nút thủy tinh mài.

#### 3.15.2 Cách tiến hành

Cân từ 2,0 g đến 3,0 g mẫu thử ( $m$ ) trong bình cân (3.15.2.2) cùng với nắp đậy đã biết khối lượng. Sấy bình cân đã mở nắp trong tủ sấy (3.15.2.1) ở nhiệt độ quy định trong tiêu chuẩn cụ thể ( $\pm 5$  °C) cho đến khi thu được khối lượng không đổi, làm nguội trong bình hút ẩm trước mỗi lần cân.

#### 3.15.3 Tính kết quả

Hao hụt khối lượng khi sấy mẫu,  $X$ , được tính bằng phần trăm khối lượng (%) theo công thức:

$$X = \left(1 - \frac{m_2}{m_1}\right) \times 100 \quad (15)$$

trong đó:

$m_1$  là khối lượng mẫu thử, tính bằng gam (g);

$m_2$  là khối lượng mẫu thử đã sấy khô, tính bằng gam (g).

CHÚ THÍCH 1: Kết quả xác định hao hụt khối lượng khi sấy bao gồm cả hàm lượng clorua (xác định theo 3.12) và hàm lượng sulfat (xác định theo 3.13), cần lưu ý khi công bố hàm lượng nước của mẫu thử.

CHÚ THÍCH 2: Các chất tạo màu có chứa các nhóm  $-SO_3Na$  hay  $-COONa$  thường hút ẩm, lượng nước được giữ lại sẽ có mặt trong chất tạo màu ở dạng hydrat. Khi những chất tạo màu này được sấy ở 135 °C thì hao hụt khối lượng có thể tương đương với tổng hàm lượng nước, nhưng điều này không phải đúng cho mọi trường hợp. Ví dụ, Erytrosin và Ponceau 4 R, mỗi loại giữ một phần tử nước dạng kết tinh ở 135 °C và cần lưu ý khi tính tổng hàm lượng các chất chính có mặt trong mẫu thử.

## 4 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.