

TCVN 8105 : 2009

ISO 20541 : 2008

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITRAT – PHƯƠNG PHÁP
KHỬ ENZYM VÀ ĐO PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ
SAU PHẢN ỨNG GRIESS**

*Milk and milk products – Determination of nitrate content –
Method by enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry
after Griess reaction*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8105 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 20541 : 2008;

TCVN 8105 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12
Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa và sản phẩm sữa – Xác định hàm lượng nitrat – Phương pháp khử enzym và đo phổ hấp thụ phân tử sau phản ứng Griess

Milk and milk products – Determination of nitrate content – Method by enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry after Griess reaction

CẢNH BÁO — Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể cần phải sử dụng các vật liệu, các thao tác và thiết bị nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn khi sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nitrat trong sữa và sản phẩm sữa bằng đo phổ hấp thụ phân tử sau phản ứng Griess (khử trước bằng enzym).

Phương pháp này có thể áp dụng cụ thể cho sữa bột nguyên chất, sữa bột tách một phần chất béo và sữa bột gầy, phomat cứng, phomat bán cứng và phomat mềm, phomat chế biến, whey phomat, casein, các muối caseinat, whey bột và protein sữa đậm đặc.

Phương pháp này có thể sử dụng ở hàm lượng tương ứng với nồng độ đo được trong dung dịch mẫu (đã trừ mẫu trắng) lớn hơn 0,2 mg/l.

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 2230 (ISO 565), *Sàng thử nghiệm – Lưới kim loại đan, tấm kim loại đột lỗ và lưới đột lỗ bằng điện – Kích thước lỗ danh nghĩa*.

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

TCVN 8105 : 2009

TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ.*

TCVN 7151 (ISO 648), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet một mức.*

TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Hàm lượng nitrit (nitrite content)

Phần khối lượng của các hợp chất nitrit xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

3.2

Hàm lượng nitrat (nitrate content)

Phần khối lượng của các hợp chất nitrat xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng nitrat được biểu thị theo phần khối lượng tính bằng miligam ion nitrat (NO_3^-) trên một kilogam sản phẩm.

4 Nguyên tắc

Phản mẫu thử được phân tán trong nước ấm. Chất béo và protein được loại ra bằng cách cho kết tủa sử dụng thuốc thử Carrez rồi lọc hoặc bằng siêu lọc li tâm với màng lọc hình nón (xem Chú thích 1 và 2). Nitrat trong phần dịch lọc được khử thành nitrit bằng enzym khử nitrat. Bổ sung sulfanilamit và *N*-(1-naphthyl)etylendiamin dihydroclorua để nhuộm azo đỏ-tím phần dịch lọc không khử (đối với nitrit) và dung dịch khử (đối với nitrat), và đo độ hấp thụ tại bước sóng 540 nm (hoặc Hg 546 nm). Hàm lượng nitrit của mẫu thử và hàm lượng nitrit tổng số sau khi khử nitrat được tính bằng cách so sánh các độ hấp thụ đo được với độ hấp thụ của một dãy các dung dịch hiệu chuẩn natri nitrit. Hàm lượng nitrat được tính theo sự chênh lệch hàm lượng nitrit tổng số sau khi khử và hàm lượng nitrit của mẫu thử.

CHÚ THÍCH 1 Hai quy trình khử chất béo và protein được nêu trong 9.2.1 và 9.2.2.

CHÚ THÍCH 2 Đối với whey bột, whey protein đậm đặc và các sản phẩm tương tự, nên dùng siêu lọc hơn là cho kết tủa Carrez vì việc kết tủa Carrez thường gây đục dung dịch và do đó làm giảm độ chụm.

CHÚ THÍCH 3 Mức nitrit nội sinh thấp chưa được ghi nhận nhưng cần được tính đến trong dung dịch không có chất nền.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích, không chứa nitrat và nitrit, nước ít nhất đạt tiêu chuẩn loại 3 của TCVN 4851 (ISO 3696), không chứa nitrat và nitrit, trừ khi có quy định khác. Nước sử dụng để chuẩn bị enzym hoặc dung dịch coenzym là nước mới cất hai lần hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

5.1 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

5.2 Dung dịch natri clorua, $c(\text{NaCl}) = 0,9 \text{ g/100 ml}$.

5.3 Axit clohydric, $\rho_{20}(\text{HCl}) = 1,19 \text{ g/ml}$.

5.4 Dung dịch axit clohydric, $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol/l}$.

Thêm cẩn thận 160 ml axit clohydric (5.3) vào khoảng 700 ml nước trong bình định mức một vạch dung tích 1 000 ml (6.4) trong vẫn khi xoay bình. Làm nguội dung dịch trong bình đến nhiệt độ phòng. Pha loãng đến vạch bằng nước và trộn kĩ.

5.5 Thuốc thử Carrez, chuẩn bị như sau:

5.5.1 Thuốc thử Carrez I: Dung dịch kali hexaxyanoferrat (II), $c(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}) = 150 \text{ g/l}$.

Hoà tan 15,0 g kali hexaxyanoferrat (II) ngâm ba phần từ nước trong nước đựng trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.4). Thêm nước đến vạch và trộn.

5.5.2 Thuốc thử Carrez II: Dung dịch kẽm sulfat, $c(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ g/l}$.

Hoà tan 30,0 g kẽm sulfat ngâm bảy phần từ nước trong nước đựng trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.4). Thêm nước đến vạch và trộn.

5.6 Dung dịch chuẩn, như sau:

5.6.1 Dung dịch gốc natri nitrit (NaNO_2)

Cân chính xác $(75,0 \pm 0,1)$ mg natri nitrit đã được sấy khô (ở 102°C trong 2 h) cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml. Hoà tan natri nitrit trong một lượng nước thích hợp. Thêm nước đến vạch và trộn. Dung dịch gốc nitrit thu được chứa 500 mg nitrit trên một lít.

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn bằng cách pha loãng dung dịch gốc với nước để thu được các dung dịch có nồng độ nitrit khác nhau trong dải từ 0,05 mg/l đến 5,0 mg/l.

Dung dịch gốc natri nitrit bền trong 1 ngày khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

5.6.2 Dung dịch gốc kali nitrat (KNO_3)

Cân chính xác $(81,5 \pm 0,1)$ mg kali nitrat đã được sấy khô (ở 102°C trong 2 h) cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml. Hoà tan kali nitrat trong một lượng nước thích hợp. Thêm nước đến vạch và trộn. Dung dịch gốc thu được này chứa 500 mg nitrat trên một lít.

TCVN 8105 : 2009

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn bằng cách pha loãng dung dịch gốc với nước để thu được các dung dịch có nồng độ nitrat khác nhau trong dải từ 0,05 mg/l đến 5,0 mg/l.

Dung dịch gốc kali nitrat bền trong 1 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

5.7 Dung dịch đệm kali phosphat, pH = 7,5

Cân chính xác ($57,6 \pm 0,1$) mg dikali hydro phosphat ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml. Hoà tan dikali hydro phosphat trong một lượng nước thích hợp. Thêm nước đến vạch và trộn.

Cân chính xác ($17,0 \pm 0,1$) mg kali dihydro phosphat ($KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$) vào bình định mức một vạch dung tích 50 ml. Hoà tan kali dihydro phosphat trong một lượng nước thích hợp. Thêm nước đến vạch và trộn.

Dùng dung dịch kali dihydro phosphat để chỉnh pH của dung dịch dikali hydro phosphat đến 7,5, sử dụng máy đo pH (6.18) để đo.

Dung dịch đệm kali phosphat bền trong 2 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

5.8 Dung dịch NADPH/FAD

Cân chính xác ($5,6 \pm 0,1$) mg muối tetranatri 3-nicotinamit-adenin dinucleotit phosphat (dạng khử) (β -NADPH- Na_4 , ít nhất là 98 % khối lượng) và ($80,0 \pm 0,1$) mg muối dinatri flavin-adenin dinucleotit (FAD- Na_2 , ít nhất là 88 % khối lượng) vào bình định mức một vạch dung tích 25 ml.

Hoà tan các phần trên trong một lượng dung dịch đệm kali phosphat (5.7) thích hợp. Pha loãng đến vạch bằng dung dịch đệm (5.7) và trộn.

Chuẩn bị dung dịch NADPH/FAD ngay trước khi sử dụng.

5.9 Dung dịch enzym khử nitrat (NR)

Cân 65 mg enzym khử nitrat (NR) từ *Aspergillus niger* (EC 1.6.6.2, chế phẩm đông khô chứa khoảng 0,4 U/mg) cho vào ống đóng 10 ml. Thêm 5 ml nước và trộn.

Dung dịch enzym khử nitrat bền trong 2 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

5.10 Thuốc thử nhuộm màu, như sau:

5.10.1 Dung dịch thuốc thử nhuộm màu I: Sulfanilamit ($NH_2C_6H_4SO_2NH_2$)

Cân 400 mg sulfanilamit vào bình định mức một vạch dung tích 50 ml (6.4). Hoà tan trong dung dịch axit clohydric (5.4) và đun nóng trên nồi cách thủy, nếu cần.

Làm nguội dung dịch đến nhiệt độ phòng. Pha loãng đến vạch bằng dung dịch axit clohydric (5.4) và trộn. Nếu cần, lọc dung dịch thuốc thử thu được.

Dung dịch thuốc thử nhuộm màu I bền trong 4 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

5.10.2 Dung dịch thuốc thử nhuộm màu II: *N*-(1-naphtyl)etylendiamin dihydroclorua

($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$)

Cân 50 mg *N*-(1-naphtyl)etylendiamin dihydroclorua vào bình định mức một vạch dung tích 50 ml (6.4). Hoà tan bằng một lượng nước thích hợp.

Pha loãng đến vạch 50 ml bằng nước và trộn. Nếu cần, lọc dung dịch thuốc thử thu được.

Dung dịch thuốc thử nhuộm màu II bền trong 4 tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C.

5.11 Các bộ kit thử cũng có bán sẵn trên thị trường. Khi sử dụng các bộ kit thử đó cần tuân thủ hướng dẫn trong tiêu chuẩn này (cụ thể trong trường hợp này là 5.8).

6 Thiết bị, dụng cụ

Rửa sạch tất cả dụng cụ thử nghiệm bằng thủy tinh và tráng bằng nước để đảm bảo các dụng cụ này không chứa nitrat và nitrit.

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

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

6.2 Hộp chứa mẫu, có nắp đậy kín khí.

6.3 Bình nón, dung tích 100 ml, 500 ml và 1 000 ml, có nắp đậy bằng thủy tinh mài.

6.4 Bình định mức một vạch, dung tích danh định 25 ml, 50 ml, 100 ml và 1 000 ml, đáp ứng yêu cầu loại A của TCVN 7153 (ISO 1042).

6.5 Pipet, có thể phân phối các thể tích 1 ml, 2 ml, 5 ml và 10 ml, đáp ứng yêu cầu cấp A của TCVN 7151 (ISO 648) hoặc đáp ứng yêu cầu của TCVN 7150 (ISO 835). Khi thích hợp, có thể sử dụng buret thay cho pipet.

6.6 Pipet chia độ, kiểu phân phối từng phần, dùng trong các phép thử enzym.

6.7 Ống đong chia độ, dung tích 20 ml và 50 ml.

6.8 Cốc có mỏ, dung tích 20 ml và 50 ml.

TCVN 8105 : 2009

6.9 Máy li tâm, có bộ phận làm nguội, có các ống li tâm (6.10) và phễu màng lọc (6.21) với gia tốc li tâm 3 000 g.

6.10 Ống li tâm, đường kính 15 mm.

6.11 Bộ lọc màng, kích thước lỗ 0,45 µm, sử dụng cùng với xyranh.

6.12 Phễu thủy tinh, có đường kính thích hợp.

6.13 Máy đo phổ, thích hợp để đo độ hấp thụ tại bước sóng 540 nm, hoặc **máy đo quang phổ vạch** có đèn thủy ngân và bộ lọc, thích hợp để đo độ hấp thụ tại bước sóng 546 nm.

6.14 Cuvet học, kiểu bán vi lượng (semi-micro) (cuvet sử dụng một lần hoặc cuvet thủy tinh), có chiều dài đường quang 1 cm.

6.15 Dụng cụ nghiền, thích hợp để nghiền mẫu thử, nếu cần. Để tránh thất thoát độ ẩm, thiết bị không được sinh nhiệt quá lớn.

6.16 Rây thử nghiệm, lưới kim loại đan, đường kính 200 mm, kích thước lỗ danh nghĩa 500 µm và hộp thu nhận phù hợp với yêu cầu của TCVN 2230 (ISO 565).

6.17 Que khuấy từ.

6.18 Dụng cụ đo pH, gồm máy đo pH và các điện cực thủy tinh/điện cực so sánh, có thể đo được ở nhiệt độ 20 °C.

6.19 Nồi cách thủy, có bộ phận lắc, có thể hoạt động ở $(70 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

6.20 Bếp điện.

6.21 Phễu màng lọc, MWCO 5 000 D, dung tích 4 ml, dùng cho siêu lọc li tâm dung dịch mẫu thử.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc không bị biến đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Mẫu phòng thử nghiệm được bảo quản sao cho tránh hư hỏng hoặc biến đổi thành phần.

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Sữa bột, whey bột và protein sữa đậm đặc

Chuyển mẫu thử và hộp chứa mẫu (6.2) có dung tích lớn gấp khoảng 2 lần thể tích mẫu thử. Đậy ngay nắp. Trộn kĩ mẫu thử bằng cách lắc và đảo chiều hộp chứa mẫu liên tục.

8.2 Casein và các muối caseinat

8.2.1 Chuyển tất cả vào hộp chứa mẫu (6.2) có dung tích phù hợp, sau đó trộn kĩ mẫu thử bằng cách lắc và đảo chiều hộp chứa mẫu liên tục, nếu cần.

8.2.2 Chuyển 50 g mẫu thử vào rây thử nghiệm (6.16). Nếu toàn bộ hoặc hầu hết 50 g phần mẫu thử này lọt qua rây thì chuyển toàn bộ mẫu thử đã trộn (xem 8.2.1) lên rây. Nếu mẫu thử không lọt hết qua rây thì nghiền trong máy nghiền (6.15) để cho mẫu thử có thể lọt hết qua rây.

Chuyển ngay mẫu thử đã lọt qua rây cho vào hộp chứa mẫu (6.2). Đóng nắp hộp và trộn kĩ. Trong quá trình này, tránh làm thay đổi hàm lượng nước của sản phẩm.

Sau khi mẫu thử đã chuẩn bị xong, chuẩn bị ngay phần mẫu thử (xem 9.1) càng sớm càng tốt.

8.3 Phomat

8.3.1 Trước khi phân tích, loại bỏ lớp vỏ hoặc lớp mốc trên bề mặt mẫu thử để thu được mẫu phomat đại diện như thường được sử dụng.

8.3.2 Nghiền mẫu thử bằng dụng cụ thích hợp (6.15). Trộn nhanh mẫu đã nghiền, nếu có thể thì nghiền lần thứ hai và lại trộn kĩ. Rửa sạch dụng cụ sau mỗi lần nghiền mẫu. Nếu mẫu thử không nghiền được, trộn kĩ bằng cách khuấy và nhào thật mạnh.

8.3.3 Ngay sau khi nghiền, chuyển mẫu thử vào hộp chứa mẫu (6.2) và tốt nhất là tiến hành xác định ngay. Nếu phải trì hoãn thì chú ý bảo quản mẫu thử không để nước ngưng tụ bên trong hộp chứa mẫu.

8.3.4 Không nghiền phomat khi thấy nấm mốc phát triển hoặc phomat bắt đầu bị hỏng.

8.4 Whey phomat

Chuẩn bị mẫu thử theo quy định trong 8.3.2.

9 Cách tiến hành

9.1 Chuẩn bị phần mẫu thử

9.1.1 Sữa

Cân khoảng 10 g đến 15 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg. Chuyển hết phần mẫu thử này vào bình nón dung tích 100 ml (6.3). Thêm từ từ 50 ml nước sôi.

Lắc hỗn hợp trên nồi cách thủy (6.19), duy trì nhiệt độ 70 °C trong 15 min.

9.1.2 Sữa bột, whey bột, casein, các muối caseinat và protein sữa đậm đặc

Cân khoảng 2,0 g đến 2,5 g mẫu thử (xem 8.1 hoặc 8.2), chính xác đến 0,1 mg. Chuyển hết phần mẫu thử vào bình nón dung tích 100 ml (6.3). Thêm từ từ 50 ml nước sôi.

Lắc hỗn hợp trên nồi cách thủy (6.19), duy trì nhiệt độ 70 °C trong 15 min.

9.1.3 Phomat, phomat chế biến và whey phomat

Cân khoảng 3 g mẫu thử (xem 8.3 hoặc 8.4), chính xác đến 0,1 mg. Trộn cẩn thận phần mẫu thử với 15 ml nước dùng đũa thủy tinh để khuấy để thu được hỗn hợp không vón cục. Chuyển hết phần mẫu thử vào bình nón dung tích 100 ml (6.3). Thêm từ từ 30 ml nước có nhiệt độ 70 °C.

Lắc hỗn hợp trên nồi cách thủy (6.19), duy trì nhiệt độ 70 °C trong 15 min.

9.2 Loại chất béo và protein

9.2.1 Làm kết tủa bằng thuốc thử Carrez và lọc

Làm nguội phần mẫu thử đã chuẩn bị (xem 9.1.1, 9.1.2 hoặc 9.1.3) về nhiệt độ phòng. Thêm theo thứ tự: 5 ml thuốc thử Carrez I (5.5.1) và 5 ml thuốc thử Carrez II (5.5.21), trong khi vẫn xoay hộp đựng mẫu hoặc khuấy bằng que khuấy từ (6.17) thật kĩ mỗi lần thêm thuốc thử. Điều chỉnh pH về $8,0 \pm 0,1$ bằng dung dịch natri hydroxit (5.1).

Chuyển hết huyền phù thu được vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.4). Pha loãng tới vạch bằng nước và trộn kĩ. Chuyển phần dịch này vào ống li tâm (6.10) và đặt ống li tâm vào máy li tâm (6.9). Cho li tâm ở gia tốc 3 000 g ở 20 °C trong 15 min.

Tráng rửa màng lọc (6.11) bằng 5 ml dung dịch natri clorua (5.2) và tiếp theo là 5 ml nước. Lọc phần chất lỏng phía trên thu được từ li tâm qua bộ lọc màng sạch (6.11). Loại bỏ vài mililit đầu tiên và dùng phần dịch lọc còn lại để xác định (xem 9.4).

Điều quan trọng là phải thu được dịch lọc trong với thời gian quy định. Nếu không thu được dịch lọc trong (ví dụ: khi phân tích phomat chín) thì dùng một thể tích lớn hơn các thuốc thử (5.5.1 và 5.5.2) và giảm cho phù hợp thể tích nước nóng dùng ở 9.1.

9.2.2 Siêu lọc bằng li tâm

Thay vì kết tủa chất béo và protein bằng các thuốc thử Carrez I và II (xem 9.2.1), có thể siêu lọc mẫu thử bằng phễu lọc màng trong máy li tâm để thu được dịch lọc trong dùng cho phép xác định (xem 9.4).

Làm nguội phần mẫu thử (xem 9.1.1, 9.1.2 hoặc 9.1.3) về nhiệt độ phòng. Chỉnh pH về $8,0 \pm 0,1$. Chuyển hết huyền phù thu được vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml (6.4). Pha loãng tới vạch bằng nước và trộn kĩ.

Tráng phễu lọc màng (6.21) bằng 4 ml dung dịch natri clorua (5.2) sau đó tráng lại bằng 4 ml nước. Chuyển phần mẫu vào phễu lọc màng sạch và đặt phễu này vào máy li tâm (6.9). Tiến hành li tâm ở gia tốc li tâm 3 000 g ở 20 °C trong 20 min.

CHÚ THÍCH 1 Các phễu lọc màng được sử dụng trong li tâm có thể có sẵn trên thị trường, ví dụ bộ cô ở đáy 4 ml sản phẩm Vivaspin¹⁾ 4 ml có màng polyetessulfon và khối lượng phân tử dưới 5 000 D là sản phẩm thích hợp.

CHÚ THÍCH 2 Không cần thiết phải lọc tất cả phần mẫu thử qua phễu lọc màng. Có thể lọc sơ bộ mẫu thử qua hệ lọc màng 5 µm (6.11) để tránh cho màng lọc bị tắc và tăng tốc độ lọc.

9.3 Phép thử trắng

Thực hiện phép thử trắng đồng thời với phép xác định (xem 9.4). Chuẩn bị dung dịch thử trắng theo 9.1 và 9.2, nhưng thay thế phần mẫu thử trong 9.1 bằng một thể tích nước tương đương.

9.4 Xác định

Dùng máy đo phổ (6.13) ở bước sóng 540 nm hoặc Hg 546 nm và cuvet bán vi lượng (6.14), để đo độ hấp thụ ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C.

Trước khi dùng pipet để chuyển dung dịch mẫu hoặc dung dịch thử trắng, tráng pipet bằng dung dịch mẫu hoặc dung dịch thử trắng tương ứng.

Có thể sử dụng pipet pittong để hút dung dịch thuốc thử. Đối với dung dịch mẫu thử và dung dịch thử trắng thì sử dụng kiểu pipet chia độ như đã dùng trong các phép thử enzym (6.6).

Để xác định nitrat và nitrit (nitrit tổng số), tiến hành theo hướng dẫn trong Bảng 1.

Bảng 1 – Quy trình xác định nitrat và nitrit (nitrit tổng số)

Thao tác	Dung dịch thử trắng ml	Dung dịch thử ml
Dùng pipet cho vào cuvet:		
Dung dịch mẫu thử (xem 9.2.1 hoặc 9.2.2)	–	0,500
Dung dịch thử trắng (xem 9.3)	0,500	–
Dung dịch NADPH/FAD (5.8)	0,250	0,250
Dung dịch enzym khử nitrat (5.9)	0,020	0,020
Trộn, ví dụ dùng thìa khuấy hoặc bằng cách lắc sau khi đã đậy nắp kín*, ủ trong 30 min ở nhiệt độ phòng, sau đó thêm:		
Dung dịch nhuộm màu I (5.10.1)	0,250	0,250
Dung dịch nhuộm màu II (5.10.2)	0,250	0,250
Trộn đều, ví dụ dùng thìa khuấy hoặc bằng cách lắc sau khi đã đậy nắp kín. Để yên cuvet nơi tối ở nhiệt độ phòng trong 15 min. Đọc giá trị độ hấp thụ, $A_{(ni+na)s}$ và $A_{(ni+na)bl}$, dựa vào không khí (dùng chùm tia sáng đối chứng không có cuvet) hoặc dựa vào nước. Nếu giá trị độ hấp thụ lớn hơn 1,7 thì pha loãng dung dịch mẫu thử và hệ số pha loãng được tính đến trong kết quả.		
* Có thể dùng Parafilm ²⁾ để làm kín cuvet.		

¹⁾ Vivaspin® là tên của một sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, ISO không ấn định phải sử dụng chúng.

Để xác định nitrit, tiến hành theo hướng dẫn trong Bảng 2.

Bảng 2 – Quy trình xác định nitrit (không có chất nền, xem Điều 4, Chú thích 3)

Thao tác	Dung dịch thử trắng ml	Dung dịch thử ml
Dùng pipet cho vào cuvet:		
Dung dịch mẫu thử (9.2.1 hoặc 9.2.2)	–	0,500
Dung dịch thử trắng (9.3)	0,500	–
Nước	0,270	0,270
Trộn đều, ví dụ dùng dao trộn hoặc bằng cách lắc sau khi đã đậy nắp kín ^a , sau đó thêm:		
Dung dịch nhuộm màu I (5.10.1)	0,250	0,250
Dung dịch nhuộm màu II (5.10.2)	0,250	0,250
Trộn đều, ví dụ dùng thìa khuấy hoặc bằng cách lắc sau khi đã đậy nắp kín. Để yên cuvet nơi tối ở nhiệt độ phòng trong 15 min. Đọc giá trị độ hấp thụ, A_{nis} và A_{nibl} , dựa vào không khí (dùng chùm tia sáng đối chừng không có cuvet) hoặc dựa vào nước. Nếu giá trị độ hấp thụ lớn hơn 1,7 thì pha loãng dung dịch mẫu thử và hệ số pha loãng được tính đến trong kết quả.		
^a Có thể dùng Parafilm ²⁾ để làm kín cuvet.		

Có thể dùng cuvet cỡ lớn loại thông thường để xác định. Trong trường hợp này, thể tích mẫu thử, mẫu trắng và thuốc thử cần được điều chỉnh tương ứng.

9.5 Đường chuẩn

Xây dựng đường chuẩn bằng cách dùng các dung dịch hiệu chuẩn đã được chuẩn bị theo 5.6.1 và 5.6.2, vẽ đồ thị của từng độ hấp thụ thu được trong 9.4 theo nồng độ tương ứng của nitrit hoặc nitrat, tính bằng miligam trên lít.

10 Tính toán và biểu thị kết quả

10.1 Hàm lượng nitrit (không có chất nền) (xem Điều 4, Chú thích 3)

10.1.1 Tính toán

Từ đường chuẩn sử dụng dung dịch đã chuẩn bị trong 5.6.1, đọc hoặc tính theo chênh lệch độ hấp thụ $\Delta A_{ni} = A_{nis} - A_{nibl}$ (xem Bảng 2), tương ứng với hàm lượng nitrit (không có chất nền) của dung dịch mẫu thử, c_{ni} . Tính hàm lượng nitrit của mẫu thử (không có chất nền), w_{ni} , theo công thức:

²⁾ Parafilm® là tên của một sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, ISO không ấn định phải sử dụng chúng.

$$w_{ni} = c_{ni} \times V \times \frac{d}{m}$$

trong đó

w_{ni} là hàm lượng nitrit của mẫu thử, tính bằng miligam nitrit trên kilogam;

c_{ni} là nồng độ tương ứng với độ hấp thụ đo được của dung dịch phần mẫu thử, đọc từ đường chuẩn, tính bằng miligam ion nitrit trên lít (xem 9.5);

m là khối lượng của phần mẫu thử (xem 9.1), tính bằng gam (g);

V là thể tích của phần mẫu thử (xem 9.2.1 hoặc 9.2.2), tính bằng mililit (ở đây $V = 100$ ml);

d là hệ số pha loãng (nếu không pha loãng thì $d = 1$).

10.1.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả thử đến một chữ số thập phân.

10.2 Hàm lượng nitrat/nitrit tổng số

10.2.1 Tính toán

Từ đường chuẩn có sử dụng dung dịch đã chuẩn bị trong 5.6.2, đọc hoặc tính theo chênh lệch độ hấp thụ $\Delta A_{ni+na} = A_{(ni+na)s} - A_{(ni+na)bl}$ (xem Bảng 1), tương ứng với nồng độ nitrit và nitrat (nitrit tổng số) của dung dịch mẫu thử (không có chất nền), c_{ni+na} .

Tính hàm lượng nitrit và nitrat (nitrit tổng số) của mẫu thử, w_{ni+na} , theo công thức:

$$w_{ni+na} = c_{ni+na} \times V \times \frac{d}{m}$$

trong đó

w_{ni+na} là hàm lượng nitrit và nitrat (nitrit tổng số) của mẫu thử, tính bằng miligam nitrit trên kilogam (mg/kg);

c_{ni+na} là nồng độ tương ứng với độ hấp thụ đo được của dung dịch phần mẫu thử, đọc được từ đường chuẩn, tính bằng miligam ion nitrit trên lít (mg/l) (xem 9.5);

m , V và d xem 10.1.1.

10.2.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả thử đến một chữ số thập phân.

10.3 Hàm lượng nitrat

10.3.1 Tính toán

Tính hàm lượng nitrat của mẫu thử, w_{na} , theo công thức:

$$w_{na} = 1,35 \times (w_{ni+na} - w_{ni})$$

trong đó

1,35 là tỉ lệ khối lượng phân tử của ion nitrat và ion nitrit.

10.3.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả theo số nguyên gần nhất.

10.3.3 Khả năng khử

Trong mỗi dãy đo, kiểm tra khả năng khử bằng cách so sánh kết quả thu được khi sử dụng các dung dịch chuẩn nitrat (xem 5.6.2) so với khi sử dụng các dung dịch chuẩn nitrit tương ứng (xem 5.6.1) có tính đến tỉ lệ khối lượng phân tử.

Khả năng khử phải đạt ít nhất 95 %.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị nhận được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền được sử dụng trong các phép thử.

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được từ các kết quả của các phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2).

Giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập đối với nitrat thu được từ một nghiên cứu của Đức tiến hành năm 1998 và một nghiên cứu quốc tế tiến hành năm 2004, cả hai kết quả này đều phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Phụ lục A cung cấp dữ liệu về các nghiên cứu trên. Không có số liệu về xác định nitrit.

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong cùng phòng thử nghiệm, do cùng một người thao tác và sử

dùng cùng một thiết bị trong cùng một khoảng thời gian ngắn như nhau, không quá 5 % trường hợp lớn hơn các giá trị sau đây:

đối với whey bột, whey protein đậm đặc và các sản phẩm tương tự, dùng kết tủa Carrez và lọc ở các hàm lượng từ 40 mg/kg đến 160 mg/kg: 30 mg/kg;

đối với các sản phẩm khác, dùng kết tủa Carrez/lọc: $(4 + 0,07w_{na})$ mg/kg;

đối với tất cả các sản phẩm, dùng siêu lọc li tâm: $(6 + 0,1w_{na})$ mg/kg.

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người thao tác khác nhau thực hiện và sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn các giá trị sau đây:

đối với whey bột, whey protein đậm đặc và các sản phẩm tương tự, dùng kết tủa Carrez và lọc ở các hàm lượng từ 40 mg/kg đến 160 mg/kg: 41 mg/kg;

đối với các sản phẩm khác, dùng kết tủa Carrez/lọc: $(6 + 0,2w_{na})$ mg/kg;

đối với tất cả các sản phẩm, dùng siêu lọc li tâm: $(10 + 0,1w_{na})$ mg/kg.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm ít nhất phải bao gồm các thông tin sau đây:

- mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được, hoặc kết quả trích dẫn cuối cùng thu được nếu kiểm tra độ lặp lại.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Các phép thử liên phòng thử nghiệm

A.1 Nghiên cứu quốc tế

Giới hạn độ lặp lại và giới hạn độ tái lập đối với nitrat thu được từ một nghiên cứu của Đức tiến hành năm 1998 (xem Điều A.2) và một nghiên cứu quốc tế tiến hành năm 2004. Các mẫu thử nghiệm sau đây được sử dụng trong nghiên cứu quốc tế năm 2004:

- 1) phomat chế biến, kí hiệu mẫu RM 63;
- 2) whey protein đậm đặc, kí hiệu mẫu 1/12;
- 3) sữa bột nguyên chất, kí hiệu mẫu 2/7;
- 4) phomat chế biến, kí hiệu mẫu 3/13;
- 5) whey bột, kí hiệu mẫu 4/11;
- 6) whey bột, kí hiệu mẫu 5/15;
- 7) phomat chế biến, kí hiệu mẫu 6/10;
- 8) phomat đông khô, kí hiệu mẫu 8/14;
- 9) sữa bột gầy, kí hiệu mẫu 9/16.

Các kết quả thu được từ nghiên cứu quốc tế nêu trên đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) và thu được các dữ liệu về độ chụm như trong Bảng A.1 đến A.3. Không có số liệu về xác định nitrit.

Bảng A.1 – Các kết quả sử dụng cả kết tủa Carrez và siêu lọc

Thông số	Mẫu thử								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Giá trị trung bình (mg/kg)	49,9	39,1	9,3	7,0	60,1	159,4	19,1	1,6	4,2
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (mg/kg)	3,4	10,3	2,9	1,6	13,0	9,1	2,9	1,8	2,5
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (mg/kg)	5,9	11,7	3,9	2,7	13,5	13,0	4,2	2,0	3,1
Hệ số biến thiên độ lặp lại [CV(r)] (%)	6,9	26,4	31,3	23,5	21,7	5,7	15,2	115	59,1
Hệ số biến thiên độ tái lập [CV(R)] (%)	11,8	30,0	42,3	38,4	22,4	8,2	21,8	125	73,4
Độ lặp lại, r (mg/kg)	9,6	28,9	8,2	4,6	36,5	25,5	8,2	5,2	7,0
Độ tái lập, R (mg/kg)	16,4	32,8	11,0	7,5	37,7	36,5	11,7	5,6	8,6
Độ lặp lại theo giá trị trung bình r_{rel} (%)	19,2	74	88	66	61	16,0	43	325	167
Độ tái lập theo giá trị trung bình R_{rel} (%)	32,9	84	118	107	63	22,9	61	350	205
CV(R) theo dự đoán Horwitz (%)	8,9	9,2	11,4	11,8	8,6	7,4	10,2	14,1	12,7
Giá trị HorRat	1,3	3,3	3,7	3,3	4,4	1,1	2,1	8,9	5,8
Số lượng tập hợp dữ liệu được xem xét	17	15	15	17	15	15	17	12	13
Số lượng tập hợp dữ liệu không được xem xét	5	3	5	5	7	7	5	9	6

Bảng A.2 – Các kết quả chỉ sử dụng kết tủa Carrez và lọc

Thông số	Mẫu thử								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Giá trị trung bình (mg/kg)	49,1	38,3	8,6	7,1	58,6	160,1	19,2	1,3	3,2
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (mg/kg)	2,7	12,5	3,2	1,3	16,4	9,8	1,7	1,8	1,9
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (mg/kg)	6,0	14,3	3,5	2,6	16,2	15,2	3,4	1,6	2,5
Hệ số biến thiên độ lặp lại [CV(r)] (%)	5,6	32,7	36,7	18,8	28,1	6,1	8,9	139	55
Hệ số biến thiên độ tái lập [CV(R)] (%)	12,2	37	40	36	28	9,4	18	128	79
Độ lặp lại, r (mg/kg)	8,1	35,1	8,8	3,7	47	26,9	4,8	5,0	4,9
Độ tái lập, R (mg/kg)	16,8	39,9	9,7	7,2	45	42,4	9,5	4,6	7,0
Độ lặp lại theo giá trị trung bình r_{rel} (%)	16,5	92	102	52	79	16,8	25	385	153
Độ tái lập theo giá trị trung bình R_{rel} (%)	34,2	104	113	101	78	26,5	49	353	219
CV(R) theo dự đoán Horwitz (%)	8,9	9,2	11,4	11,8	8,6	7,4	10,2	14,1	12,7
Giá trị HorRat	1,4	4,0	3,3	3,1	3,3	1,3	1,8	9,1	6,6
Số lượng tập hợp dữ liệu được xem xét	12	10	10	12	10	10	12	8	8
Số lượng tập hợp dữ liệu không được xem xét	5	3	5	5	7	7	5	9	6

Bảng A.3 – Các kết quả chỉ sử dụng siêu lọc

Thông số	Mẫu thử								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Giá trị trung bình (mg/kg)	51,6	40,6	10,9	6,9	63,2	155,7	20,7	2,0	5,3
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (mg/kg)	0,9	3,9	2,4	2,3	4,9	7,8	4,3	1,6	3,2
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (mg/kg)	4,6	5,2	4,7	3,0	6,6	8,2	4,5	2,5	3,8
Hệ số biến thiên độ lặp lại [CV(r)] (%)	1,8	9,5	22,3	33,2	7,7	5,0	20,6	81,1	59,4
Hệ số biến thiên độ tái lập [CV(R)] (%)	8,9	12,9	43,3	42,9	10,4	5,3	21,9	125	71,5
Độ lặp lại, r (mg/kg)	2,6	10,8	6,8	6,5	13,7	21,8	12,0	4,5	8,8
Độ tái lập, R (mg/kg)	12,9	14,6	13,2	8,3	18,5	23,1	12,7	6,9	10,6
Độ lặp lại theo giá trị trung bình r_{rel} (%)	5,0	26,6	62	94	22	14,0	58	225	166
Độ tái lập theo giá trị trung bình R_{rel} (%)	25,0	36,0	121	120	29	14,8	61	345	200
CV(R) theo dự đoán Horwitz (%)	8,9	9,2	11,4	11,8	8,6	7,4	10,2	14,1	12,7
Giá trị HorRat	1,0	1,4	3,8	2,8	1,2	0,7	2,1	8,9	5,6
Số lượng tập hợp dữ liệu được xem xét	5	5	5	5	5	5	5	4	5
Số lượng tập hợp dữ liệu không được xem xét	0	0	0	0	0	0	0	1	0

A.2 Kết quả nghiên cứu của Đức

Nghiên cứu của Đức năm 1998 sử dụng phương pháp được mô tả trong DIN 10476 : 2001 và trong German Official Method L 02.00-29 : 2002. Đây chính là phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn này, nhưng chỉ dùng kết quả của Carrez và lọc.

Trong nghiên cứu trên sử dụng các mẫu sau:

- 1) phomat chế biến, kí hiệu mẫu DE 1;
- 2) sữa bột gầy, kí hiệu mẫu DE 2;
- 3) whey bột, kí hiệu mẫu DE 3 (35/15);
- 4) phomat đông khô, kí hiệu mẫu DE 4.

Bảng A.4 – Kết quả nghiên cứu sử dụng DIN 10476

Thông số	Mẫu thử			
	1	2	3	4
Giá trị trung bình (mg/kg)	18,2	8,9	148	85,8
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (mg/kg)	1,0	1,2	3,9	3,8
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (mg/kg)	3,2	3,4	13,7	8,2
Hệ số biến thiên độ lặp lại [CV(r)] (%)	5,5	13,5	2,6	4,4
Hệ số biến thiên độ tái lập [CV(R)] (%)	17,6	38,2	9,3	9,6
Độ lặp lại, r (mg/kg)	2,7	3,4	11,0	10,7
Độ tái lập, R (mg/kg)	9,0	9,5	38,4	23,0
Độ lặp lại theo giá trị trung bình r_{rel} , (%)	15,0	38,2	7,4	12,5
Độ tái lập theo giá trị trung bình R_{rel} (%)	49,5	107	25,9	26,8
CV(R) theo dự đoán Horwitz (%)	10,3	11,5	7,5	8,2
Giá trị HorRat	1,7	3,3	1,2	1,2
Số lượng tập hợp dữ liệu được xem xét	11	14	13	13
Số lượng tập hợp dữ liệu không được xem xét	2	1	2	2

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu
 - [2] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn
 - [3] VON BEUTLER, H.O., WURST, B., FISCHER, S. Eine neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Nitrat in Lebensmitteln [A new method for the enzymatic determination of nitrate in foodstuffs]. *Deut. Lebensm. Rundsch.* 1986, 82, p. 283-289
 - [4] ARNETH, W., HEROLD, B. Nitrat/Nitrit-Bestimmung in Wurstwaren nach enzymatischer Reduktion [Nitrate/nitrite determination in sausage products after enzymatic reduction]. *Fleischwirtschaft*, 1988, 68, p. 761-764
 - [5] BACKMAN, C, CARL, M. *Bull. Int. Dairy Fed.* (in press)
 - [6] DIN 10476 : 2001, Bestimmung von Nitrit und Nitrat in Milchprodukten – Enzymatisches Verfahren (Farbtest)
 - [7] EN 12014-3, Foodstuffs — Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 3: Spectrometric determination of nitrate and nitrite content of meat products after enzymatic reduction of nitrate to nitrite
-