

**TCVN 8160-5:2010
EN 12014-5:1997**

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
NITRAT VÀ/HOẶC NITRIT –
PHẦN 5: XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITRAT TRONG
THỰC PHẨM CHỨA RAU DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH
VÀ TRẺ NHỎ BẰNG PHƯƠNG PHÁP ENZYM**

Foodstuffs – Determination of nitrate and/or nitrite content

*Part 5: Enzymatic determination of nitrate content of vegetable-
containing food for babies and infants*

Lời nói đầu

TCVN 8160-5:2010 hoàn toàn tương đương với EN 12014-5:1997;

TCVN 8160-5:2010 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN *Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit* bao gồm các phần sau:

- TCVN 7814:2007 (EN 12014-2:1997), *Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit – Xác định hàm lượng nitrat trong rau và sản phẩm rau bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao/trao đổi ion*;
- TCVN 8160-3:2010 (EN 12014-3:2005), *Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit – Phần 3: Xác định hàm lượng nitrat và nitrit trong sản phẩm thịt bằng đo phổ sau khi khử nitrat thành nitrit bằng enzym*;
- TCVN 8160-4:2009 (EN 12014-4:2005), *Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit – Phần 4: Phương pháp xác định hàm lượng nitrat và nitrit trong sản phẩm thịt bằng sắc ký trao đổi ion*;
- TCVN 8160-5:2010 (EN 12014-5:1997), *Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit – Phần 5: Xác định hàm lượng nitrat trong thực phẩm chứa rau dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ bằng phương pháp enzym*;
- TCVN 8160-7:2010 (EN 12014-7:1998), *Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit – Phần 4: Xác định hàm lượng nitrat trong rau và sản phẩm rau bằng phương pháp phân tích dòng liên tục sau khi khử bằng cadimi*.

Bộ tiêu chuẩn EN 12014 còn có phần sau:

- EN 12014-1, *Foodstuffs – Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 1: General considerations (Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit – Phần 1: Xem xét chung)*.

Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit – Phần 5: Xác định hàm lượng nitrat trong thực phẩm chứa rau dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ bằng phương pháp enzym

Foodstuffs – Determination of nitrate and/or nitrite content

*Part 5. Enzymatic determination of nitrate content of vegetable-
containing food for babies and infants*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp enzym để xác định hàm lượng nitrat trong thực phẩm có chứa rau dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ [1], [2]. Phương pháp này có thể dùng để xác định hàm lượng nitrat trong dải nồng độ từ 50 mg/kg đến 200 mg/kg.

2 Tài liệu viện dẫn

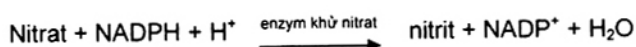
Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

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

EN 12014-1, *Foodstuffs – Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 1: General considerations (Thực phẩm – Xác định hàm lượng nitrat và/hoặc nitrit – Phần 1: Xem xét chung)*

3 Nguyên tắc

Hàm lượng nitrat trong dịch chiết mẫu được xác định bằng phương pháp enzym bằng cách đo lượng NADPH sử dụng hết theo phương trình phản ứng dưới đây:



trong đó lượng NADPH được sử dụng hết là tương đương với lượng nitrat.

4 Thuốc thử

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

4.1 Dung dịch Carrez số 1

Hoà tan 150 g kali hexaxyanoferrat (II) ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) trong nước và pha loãng bằng nước đến 1 000 ml. Bảo quản dung dịch này trong chai màu nâu và cứ sau hai tháng lại thay dung dịch mới.

4.2 Dung dịch Carrez số 2

Hoà tan trong nước 300 g kẽm sulfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) và thêm nước đến 1 000 ml.

4.3 Dung dịch natri hydroxit, $c^{1)}$ ($NaOH$) = 2 mol/l

4.4 Dung dịch đệm imidazol, pH = 7,3

Hòa tan 0,68 g imidazol ($C_3H_4N_2$) trong 80 ml nước, chỉnh pH đến 7,3 bằng dung dịch axit clohydric 2 mol/l và pha loãng bằng nước đến 100 ml. Nếu bảo quản ở 4 °C dung dịch này có thể bền một năm.

4.5 Dung dịch FAD²⁾

Chuẩn bị dung dịch 0,17 mg muối dinatri của flavin adenine dinucleotide, FAD- Na_2 trên mililit bằng cách sử dụng FAD- Na_2 có hàm lượng không nhỏ hơn 88 %. Khi được bảo quản ở 4 °C thì dung dịch này có thể bền được một ngày.

4.6 Dung dịch NADPH²⁾

Chuẩn bị dung dịch 5,6 mg muối tetranatri của β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphat dạng khử, β -NADPH- Na_4 trên mililit bằng cách sử dụng β -NADPH- Na_4 có hàm lượng không nhỏ hơn 98 %. Nếu bảo quản ở 4 °C thì dung dịch này có thể bền được một ngày, còn khi để ở nhiệt độ phòng thì có thể bền được 2 h.

4.7 Dung dịch enzym khử nitrat (nitrat reductaza)²⁾

Hoà tan 65 mg nitrat reductaza đã được làm đông khô, có hoạt độ khoảng 0,4 U/mg³⁾ thu được từ các loài *Aspergillus* (EC 1.6.6.2) [4] trong 5 ml nước. Khi được bảo quản ở 4 °C thì dung dịch này có thể bền được đến hai tuần.

¹⁾ c là nồng độ chất.

²⁾ Những bộ thuốc thử này có bán sẵn trên thị trường. Khi sử dụng nên theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

³⁾ Đơn vị U (là đơn vị quốc tế hay đơn vị chuẩn) được xác định là lượng enzym xúc tác quá trình chuyển hóa 1 μ mol chất nền mỗi phút dưới điều kiện chuẩn.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Bộ đồng hoá (bộ phân phối, máy trộn dùng điện hoặc loại tương tự).

Phải đảm bảo rằng thiết bị này làm phân tán đều mẫu hoặc đồng hóa kỹ mẫu và không làm thôi nhiễm kim loại đến mức làm ức chế các enzym được sử dụng.

5.2 Bếp điện cùng với máy khuấy từ.

5.3 Giấy lọc gấp nếp.

5.4 Pipet chia độ, dùng cho phân tích enzym, bộ phân phối từng phần 0,05 ml, 0,1 ml, 1 ml và 2 ml hoặc các pipet dạng pittông.

5.5 Cuvet thủy tinh hoặc cuvet chất dẻo có chiều dài đường quang 1 cm và không hấp thụ đáng kể tại bước sóng 334 nm, 340 nm hoặc 365 nm.

5.6 Máy đo phổ, để đo ở bước sóng 340 nm, có chiều rộng phổ không quá ± 5 nm.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng các máy đo quang có bộ lọc phổ có gần đèn hơi thủy ngân, đo được ở 365 nm hoặc 334 nm.

5.7 Máy ly tâm, có thể tạo gia tốc hướng tâm 2900 g tại đáy ống ly tâm (5.8), tùy chọn.

5.8 Máy ly tâm, có dung tích thích hợp.

5.9 Tủ lạnh, có thể duy trì nhiệt độ ở 4 °C.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu

Đưa mẫu được bảo quản lạnh về nhiệt độ phòng. Trộn toàn bộ mẫu trong vật chứa bằng máy trộn thích hợp (5.1), nghiền và đồng hóa mẫu, nếu cần. Đảm bảo rằng nhiệt độ của mẫu không quá 60 °C.

Đối với các mẫu dạng lỏng, pha loãng mẫu cần phân tích cho đến khi hàm lượng nitrat nằm trong khoảng từ 30 mg/l đến 300 mg/l, nếu cần. Dung dịch mẫu thử thu được có thể dùng ngay để phân tích mà không cần phải xử lý thêm kể cả khi dung dịch có màu, lấy một thể tích 0,1 ml (V_2) để phân tích.

6.2 Phương pháp xác định

6.2.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu

Cân khoảng 5 g hoặc một lượng thích hợp khác của mẫu đã được chuẩn bị theo 6.1, chính xác đến miligam cho vào bình nón 100 ml, thêm 50 ml nước sôi. Đậy nắp bình bằng mặt kính đồng hồ, đặt bình

TCVN 8160-5:2010

vào nồi cách thủy (ví dụ: cốc thủy tinh có mỏ) trong khoảng từ 20 min đến 30 min, khuấy để tránh bị vón cục (xem 5.2).

Tránh để quá nhiệt tại đáy bình nón bằng cách không để đáy bình tiếp xúc với đáy nồi cách thủy.

Lấy que khuấy từ ra, thêm 5,0 ml dung dịch Carrez số 1 (4.1) và lắc hỗn hợp trong 5 s đến 10 s. Sau đó thêm 5,0 ml dung dịch Carrez số 2 (4.2) và lắc lại trong khoảng từ 5 s đến 10 s. Chỉnh pH của hỗn hợp đến giá trị từ 8 đến 9 (không để vượt quá 9) bằng dung dịch natri hydroxit (4.3) và lắc lại.

Làm nguội lượng chứa trong bình nón đến nhiệt độ phòng và lọc cho vào bình định mức 100 ml, thu được V_1 , tráng bình bằng nước rồi thêm nước đến vạch.

Nếu khối lượng mẫu ban đầu cao, ví dụ trên 10 g, thì cần phải ly tâm hỗn hợp mẫu đã làm sạch trong 10 min ở 2900 g trước khi lọc sang bình định mức 100 ml. Rửa chất lắng hai lần với nước và ly tâm một lần nữa, thu lấy phần nổi phía trên vào bình định mức 100 ml và pha loãng dung dịch bằng nước đến vạch.

Lắc bình định mức và đặt bình vào tủ lạnh (5.9) ở nhiệt độ khoảng 4 °C trong 30 min để tách hết chất béo. Sau đó lọc lượng chứa trong bình qua giấy lọc gấp nếp (5.3), loại bỏ vài mililit dịch lọc đầu tiên.

Thu lấy phần dịch lọc (dung dịch mẫu) vào bình nón có nút đáy bằng thủy tinh mài. Dùng 1,0 ml (V_2) dung dịch mẫu để xác định hàm lượng nitrat.

Dung dịch có màu hơi đục thường sẽ không gây nhiều đến phép thử.

6.2.2 Đo phản ứng enzym

Tiến hành xác định ở nhiệt độ khoảng 20 °C.

Độ hấp thụ cực đại của NADPH là ở bước sóng 340 nm. Nếu sử dụng máy đo phổ (5.6), thì thực hiện các phép đo chỉ ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại, nhưng khi sử dụng máy đo quang có bộ lọc phổ dùng đèn hơi thủy ngân thì đo ở bước sóng 365 nm hoặc 334 nm.

Sự chênh lệch (giảm) độ hấp thụ của dung dịch thử ($A_1 - A_2$)_{dung dịch thử} nên nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,5. Nếu chênh lệch độ hấp thụ quá nhỏ thì có thể tăng lượng dung dịch mẫu trong cuvet (đến 2,00 ml). Trong các trường hợp này, giảm lượng nước được sử dụng sao cho lượng mẫu thử và lượng mẫu trắng trong các cuvet bằng nhau. Nếu chênh lệch độ hấp thụ quá lớn, thì pha loãng dung dịch mẫu. Nếu các bước này là cần thiết thì phải tính đến hệ số pha loãng (F) trong phần tính kết quả.

Chỉ cần một mẫu trắng cho một dãy mẫu thử.

Bảng 1 – Phương án dùng pipet

Dung dịch được hút bằng pipet cho vào cuvet	Mẫu trắng	Dung dịch thử
Dung dịch đệm (4.4)	1,00 ml	1,00 ml
Dung dịch FAD (4.5)	0,05 ml	0,05 ml
Dung dịch NADPH (4.6)	0,10 ml	0,10 ml
Dung dịch mẫu (6.2.1)	-	1,00 ml
Nước	2,00 ml	1,00 ml
Trộn và sau khoảng 5 min đo độ hấp thụ (A_1) không dùng cuvet so sánh (5.5), sau đó bắt đầu cho phản ứng bằng cách thêm như sau:		
Dung dịch nitrat reductaza (4.7)	0,05 ml	0,05 ml
Trộn và sau 40 min đo nhanh liên tiếp các độ hấp thụ (A_2) của các dung dịch, không dùng cuvet so sánh. Lập lại phép đo này sau 20 min tiếp theo thu được độ hấp thụ (A_3).		

7 Tính kết quả

Trong phản ứng hình thành cơ sở của phép xác định này là đường tuyến tính thể hiện mối quan hệ giữa lượng NADPH sử dụng hết và chênh lệch độ hấp thụ với nồng độ nitrat.

Tính chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trắng $\Delta A_{\text{mẫu trắng}}$ theo công thức (1):

$$\Delta A_{\text{mẫu trắng}} = (A_1 - A_2)_{\text{mẫu trắng}} - 2 \times (A_2 - A_3)_{\text{mẫu trắng}} \quad (1)$$

Tính chênh lệch độ hấp thụ của dung dịch thử $\Delta A_{\text{dung dịch thử}}$ theo công thức (2):

$$\Delta A_{\text{dung dịch thử}} = (A_1 - A_2)_{\text{dung dịch thử}} - 2 \times (A_2 - A_3)_{\text{dung dịch thử}} \quad (2)$$

Tính chênh lệch độ hấp thụ của mẫu trắng ΔA cho giá trị trắng theo công thức (3):

$$\Delta A = \Delta A_{\text{dung dịch thử}} - \Delta A_{\text{mẫu trắng}} \quad (3)$$

Tính nồng độ chất trong dung dịch đã pha loãng dùng các phép đo hấp thụ quang theo định luật Beer-Lambert.

Tính phần khối lượng w , của nitrat, bằng miligam trên kilogam mẫu, theo công thức (4):

$$w = \frac{\Delta A \times M \times V_1 \times V_3 \times F \times 1000}{\varepsilon \times d \times V_2 \times m} \quad (4)$$

trong đó

ΔA là chênh lệch độ hấp thụ trong công thức (3);

M là khối lượng phân tử tương đối của ion nitrat ($M = 62,0$ g/mol);

V_1 là tổng thể tích dung dịch mẫu (6.2.1) ($V_1 = 100$ ml), tính bằng mililit (ml);

V_2 là thể tích dung dịch mẫu dùng để chuẩn bị dung dịch thử (6.2.2) ($V_2 = 1,0$ ml), tính bằng mililit (ml);

V_3 là tổng thể tích dung dịch thử (6.2.2) ($V_3 = 3,20$ ml), tính bằng mililit (ml);

F là hệ số pha loãng ($F = 1$);

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

ε là độ hấp thụ phân tử của NADPH, nghĩa là $6,3 \times 10^3$ l.mol⁻¹.cm⁻¹ ở 340 nm, $3,5 \times 10^3$ l.mol⁻¹.cm⁻¹ ở 365 nm (Hg), $6,18 \times 10^3$ l.mol⁻¹.cm⁻¹ ở 334 nm (Hg);

δ là chiều dài đường quang của cuvet (1 cm), tính bằng centimet (cm).

Nếu dùng phương án theo Bảng 1 và dung dịch mẫu không phải pha loãng, thì tính phần khối lượng w của nitrat, bằng miligam trên kilogam mẫu, theo công thức (5):

$$w = \frac{\Delta A \times 19840000}{\varepsilon \times m} \quad (5)$$

trong đó:

ΔA xem công thức (3);

ε và m xem công thức (4).

Báo cáo kết quả theo miligam trên kilogam hoặc miligam trên lít theo số nguyên và ghi theo qui định hiện hành.

8 Độ chụm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm của phương pháp này được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ của chất phân tích và chất nền khác với các dải nồng độ của chất phân tích và chất nền đã nêu.

8.1 Độ lặp lại

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

Các giá trị đó là:

Sản phẩm rau chân vịt (spinach)	$\bar{x} = 64 \text{ mg/kg}$	$r = 15,5 \text{ mg/kg}$
Nước cà rốt	$\bar{x} = 200 \text{ mg/l}$	$r = 12,2 \text{ mg/l}$

8.2 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ độc lập, thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, do hai phòng thử nghiệm khác nhau thực hiện, trong không quá 5 % trường hợp vượt quá giá trị tái lập R sau đây:

Các giá trị đó là:

Sản phẩm rau chân vịt (spinach)	$\bar{x} = 64 \text{ mg/kg}$	$R = 24,5 \text{ mg/kg}$
Nước cà rốt	$\bar{x} = 200 \text{ mg/l}$	$R = 17,7 \text{ mg/l}$

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin nêu trong EN 12014-1.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các thông số sau đây đã thu được trong hai phép thử liên phòng thử nghiệm [1], [2] phù hợp với ISO 5725:1986 [5]*. Các phép thử này do Max von Pettenkofer-Institute thuộc Cơ quan Y tế Liên bang, Cục Hoá chất Thực phẩm, Berlin, Đức thực hiện.

Bảng A.1 – Dữ liệu về độ chụm

	Rau chân vịt	Nước ép cà rốt
Năm thử nghiệm	1988	1992
Số lượng mẫu	1	1
Số lượng phòng thử nghiệm	19	9
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	16	7
Số lượng ngoại lệ	3	2
Số lượng kết quả chấp nhận	80	35
Giá trị trung bình $\bar{x}$	64 mg/kg	200 mg/kg
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	5,5 mg/kg	4 mg/l
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r	8,7 %	2,1 %
Giới hạn lặp lại, r	15,5 mg/kg	12,2 mg/l
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	8,7 mg/kg	6 mg/l
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R	13,6 %	3,3 %
Giới hạn tái lập, R	24,5 mg/kg	17,7 mg/l

* ISO 5725:1986 hiện nay đã hủy.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Nitrat in Gemüsesäften: L 26.26-2 1088-06 (Food Analysis: Determination of nitrate in vegetable Juices: L 26.26-21988-05) in: *Amtliche Sammlung von Untersuchungungsverfahren nach § 35LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen und Bedarfsgegenstandsamt* (In: *Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of Sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office*) Loseblattaussgabe, Stand Aug. 1993 Bd 1 (Loose leaf edition, as of 1993-08 Vol.1) Berlin, Kohl Beuth Verlag GmbH.
- [2] Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Nitrat in Gemüsebrei für Säuglinge und Kleinkinder L 48.03.05-11988-05 (Food Analysis Determination of nitrate in mashed vegetables for babies and infants: L 48.03.05-11988-05) in: *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35LMBG: Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/Bundesgesundheitsamt* (In: *Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of Sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office*) Loseblattaussgabe, Stand Aug. 1993 Bd. 1 (Loose leaf edition, as of 1993-08 Vol 1.) Berlin, Kohl Beuth Verlag GmbH.
- [3] Beutler, H.-O., Wurst, B., and Fischer, S.: Eine neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Nitrat in Lebensmitteln (A new method for the enzymatic determination of nitrate in foodstuffs), In: *DL Lebensm. Bundsch.* 82,1986,283-289
- [4] Enzyme commission (EC): Classification System. *Enzyme Handbook*, Springer Berlin 1969.
- [5] ISO 5725:1986 *Precision of test methods — Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.*