

Lời nói đầu

TCVN 7991:2009 và TCVN 7992:2009 thay thế TCVN 5247-90;

TCVN 7991:2009 hoàn toàn tương đương với ISO 3091:1975;

TCVN 7991:2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F8
Thịt và sản phẩm thịt biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất
lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

(Reference method)

Thịt và sản phẩm thịt – Xác định hàm lượng nitrat – (Phương pháp chuẩn)

*Meat and meat products – Determination of nitrate content –
(Reference method)*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuẩn để xác định hàm lượng nitrat trong thịt và sản phẩm thịt.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là 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.

TCVN 7992:2009 (ISO 2918:1975), Thịt và sản phẩm thịt – Xác định hàm lượng nitrit (Phương pháp chuẩn)

TCVN 4833-1 (ISO 3100-1)¹, Thịt và sản phẩm thịt – Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử – Phần 1: Lấy mẫu.

3 Định nghĩa

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

Hàm lượng nitrat trong thịt và sản phẩm thịt (nitrate content of meat and meat products)

Hàm lượng nitrat xác định được bằng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này được biểu thị bằng miligam kali nitrat trên kilogram (phần triệu).

¹ TCVN 4833-1 (ISO 3100-1) đến nay đã huỷ và được thay thế bằng TCVN 7925:2009 (ISO 17604:2003).

4 Nguyên tắc

Chiết phần mẫu thử bằng nước nóng, cho kết tủa protein và lọc.

Dùng cadimi kim loại để khử nitrat về nitrit. Cho hiện màu đỏ bằng cách thêm sulphanilamid và *N*-1-naphthylethylenđiamin dihydro clorua vào dịch lọc và đo quang ở bước sóng 538 nm.

5 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử được sử dụng phải đạt chất lượng tinh khiết phân tích. Nước được sử dụng phải là nước cất hoặc ít nhất nước có độ tinh khiết tương đương.

5.1 Thanh kềm, dài khoảng 15 cm và đường kính từ 5 mm đến 7 mm.

5.2 Dung dịch làm kết tủa các protein

5.2.1 Thuốc thử I

Hoà tan 106 g kali feroxyanua ngậm ba phân tử nước $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$ trong nước và thêm nước đến 1000 ml.

5.2.2 Thuốc thử II

Hoà tan 220 g kẽm axetat ngậm hai phân tử nước $[Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O]$ và 30 ml axit axetic băng trong nước và thêm nước đến 1000 ml.

5.2.3 Borax, dung dịch bão hoà

Hoà tan 50 g dinatri tetraborat ngậm mười phân tử nước $(Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O)$ trong 1000 ml nước ấm và để nguội đến nhiệt độ phòng.

5.3 Dung dịch cadimi sulfat, 30 g/l

Hoà tan 37 g cadimi sulfat $(3CdSO_4 \cdot 8H_2O)$ trong nước và thêm nước đến 1000 ml.

5.4 Dung dịch axit clohydric, nồng độ khoảng 0,1 N

Pha loãng 8 ml dung dịch axit clohydric đậm đặc ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml) bằng nước đến 1000 ml.

5.5 Dung dịch đệm amoni, pH từ 9,6 đến 9,7

Pha loãng 20 ml dung dịch axit clohydric đậm đặc ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml) bằng 500 ml nước. Sau khi trộn, thêm 10 g muối dinatri axit tetraaxetic etylenđiamin ngậm hai phân tử nước $[CH_2N(CH_2COOH)CH_2COONa]_2 \cdot 2H_2O$, và 55 ml amoni đậm đặc ($\rho_{20} = 0,88$ g/ml). Thêm nước đến 1000 ml và trộn. Kiểm tra lại pH.

5.6 Dung dịch chuẩn natri nitrit

Hoà tan 1,000g natri nitrit (NaNO_2) trong nước và pha loãng đến 100 ml đựng trong bình định mức một vạch. Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch này cho vào bình định mức một vạch 1000 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch.

Chuẩn bị một dãy các dung dịch chuẩn bằng cách dùng pipet lấy 5 ml, 10 ml và 20 ml dung dịch này cho vào các bình định mức một vạch 100 ml và pha loãng bằng nước đến vạch. Các dung dịch chuẩn này chứa tương ứng 2,5 μg , 5,0 μg , và 10,0 μg natri nitrit trên mililit.

Các dung dịch chuẩn và dung dịch natri nitrit loãng (0,05 g/l) phải được chuẩn bị trong ngày sử dụng.

5.7 Dung dịch hiện màu

5.7.1 Dung dịch I

Hoà tan 2,0 g sulphanilamid ($\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$) trong 800 ml nước để trên nổi cách thủy. Để nguội, lọc, nếu cần, và thêm 100 ml dung dịch axit clohydric đậm đặc ($\rho_{20} = 1,19 \text{ g/l}$), trong khi vẫn khuấy. Pha loãng bằng nước đến 1000 ml.

5.7.2 Dung dịch II

Hoà tan 0,25 g *N*-1-naphtyletylendiamin dihydroclorua ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$) trong nước. Pha loãng bằng nước đến 250 ml.

Bảo quản dung dịch này trong bình màu nâu có nắp đậy kín. Cần giữ trong tủ lạnh, không để quá một tuần.

5.7.3 Dung dịch III

Hoà tan 445 ml dung dịch axit clohydric đậm đặc ($\rho_{20} = 1,19 \text{ g/l}$) bằng nước đến 1000 ml.

5.8 Dung dịch chuẩn kali nitrat

Hoà tan 1,465 g kali nitrat (KNO_3) trong nước và pha loãng đến 100 ml trong bình định mức một vạch. Dùng pipet lấy 5 ml dung dịch cho vào bình định mức 1000 ml và pha loãng đến vạch.

Dung dịch này chứa 73,25 $\mu\text{g/ml}$ kali nitrat.

Dung dịch chuẩn này phải được chuẩn bị trong ngày sử dụng.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Máy xay thịt bằng cơ học, cỡ phòng thử nghiệm, được gắn với đĩa có đục các lỗ với đường kính không quá 4 mm.

6.2 Cân phân tích.

6.3 Bình định mức một vạch, dung tích 100 ml, 200 ml và 1000 ml, phù hợp với loại B của TCVN 7153 (ISO/R 1042).

6.4 Pipet một vạch, dung tích 10 ml, 20 ml, và dung tích khác tùy thuộc vào phần dịch lọc (8.8.1), nếu cần, phù hợp với loại A của TCVN 7151 (ISO 648).

6.5 Nồi cách thủy.

6.6 Giấy lọc gấp nếp, đường kính khoảng 15 cm, không chứa nitrat và nitrit.

6.7 Dụng cụ thủy tinh để khử nitrat (xem hình vẽ).

6.8 Máy đo màu bằng quang điện hoặc **máy đo quang phổ**, có các cuvet 1 cm.

6.9 Bình nón, dung tích 300 ml.

7 Lấy mẫu

7.1 Lấy mẫu đại diện ít nhất là 200 g. Xem TCVN 4833-1 (ISO 3100-1).¹⁾

7.2 Chuẩn bị ngay mẫu thử (8.1), hoặc nếu chưa thực hiện được ngay thì bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C không quá 4 ngày.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hoá mẫu bằng cách cho mẫu đi qua máy xay thịt (6.1) hai lần và trộn. Giữ mẫu trong vật chứa được điện đầy kín khí, đậy kín và bảo quản lạnh.

Phân tích mẫu càng sớm càng tốt khi có thể, nhưng phải trong thời gian 24 h.

CHÚ THÍCH Đối với các sản phẩm chưa nấu chín, thì phân tích ngay sau khi đồng hoá mẫu.

¹⁾ TCVN 4833-1 (ISO 3100-1) đến nay đã huỷ và được thay thế bằng TCVN 7925:2009 (ISO 17604:2003).

8.2 Chuẩn bị cột cadimi

8.2.1 Cho từ 3 đến 5 thỏi kẽm (5.1) vào dung dịch cadimi sulfat (5.3) đựng trong cốc có mỏ (1 l dung dịch cadimi sulfat là đủ để chuẩn bị một cột cadimi).

8.2.2 Cứ sau 1 h hoặc 2 h loại lớp bột xốp cadimi kim loại ra khỏi các thỏi kẽm bằng cách xoay chúng trong dung dịch hoặc cọ xát các thỏi này với nhau.

8.2.3 Cuối cùng, sau từ 6 h đến 8 h, gạn lớp dung dịch và rửa phần lắng hai lần với 1 l nước, chú ý rằng cadimi liên tục bị che phủ bằng lớp chất lỏng.

8.2.4 Dùng 400 ml dung dịch axit clohydric (5.4) để chuyển phần lắng cadimi vào máy trộn phòng thử nghiệm và trộn trong 10 s.

Chuyển lượng chứa trong máy trộn vào cốc có mỏ.

8.2.5 Thỉnh thoảng dùng đũa thủy tinh khuấy phần lắng cadimi. Sau khi để yên qua đêm trong dung dịch axit clohydric, khuấy lần nữa để loại bỏ tất cả bọt khí ra khỏi cadimi.

8.2.6 Gạn bỏ dung dịch và rửa cadimi hai lần, mỗi lần bằng 1 l nước.

8.2.7 Lắp nút bông thủy tinh vào đáy cột để giữ cadimi (xem Hình vẽ).

8.2.8 Rửa cadimi bằng nước vào cột thủy tinh cho đến khi chiều cao của cadimi ở khoảng 17 cm. Thỉnh thoảng tháo cột trong quá trình diễn đầy, chú ý không để cho mức chất lỏng thấp hơn đỉnh của lớp cadimi. Loại bỏ khí (ví dụ: dùng kim). Tốc độ chảy của chất lỏng không được vượt quá 3 ml/min.

8.3 Phần mẫu thử

Cân 10 g mẫu thử, chính xác đến 0,001 g.

8.4 Khử protein

8.4.1 Chuyển phần mẫu thử sang bình nón (6.9) và thêm lần lượt 5 ml dung dịch borax bão hoà (5.2.3) và 100 ml nước ở nhiệt độ không dưới 70 °C.

8.4.2 Làm nóng bình và lượng chứa bên trong 15 min trên nồi cách thủy (6.5) và lắc nhiều lần.

8.4.3 Để bình và lượng chứa bên trong nguội đến nhiệt độ phòng, thêm tiếp 2 ml thuốc thử I (5.2.1) và 2 ml thuốc thử II (5.2.2). Trộn kỹ sau mỗi lần thêm.

8.4.4 Chuyển lượng chứa trong bình sang bình định mức một vạch (6.3) dung tích 200 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn. Để yên trong 30 min ở nhiệt độ phòng.

8.4.5 Gạn cẩn thận phần chất lỏng phía trên và lọc qua giấy lọc gấp nếp (6.6) sao cho thu được dung dịch trong suốt.

CHÚ THÍCH Nếu cần xác định cả hàm lượng nitrat và nitrit trên cùng mẫu thử, thì sử dụng cùng một phần dịch lọc đã khử protein cho cả hai phép xác định.

8.5 Chuẩn bị sơ bộ cột cadimi

Rửa cột cadimi liên tiếp bằng 25 ml dung dịch axit clohydric (5.4), 50 ml nước và 25 ml dung dịch đệm aminiac loãng 1+9 (5.5). Không để mức của chất lỏng trong phễu thấp hơn đỉnh của ống mao dẫn của cột cadimi.

8.6 Kiểm tra khả năng khử của cột cadimi

8.6.1 Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch chuẩn kali nitrat (5.8) và thêm tiếp 5 ml dung dịch đệm amoniac (5.5), cho vào đỉnh cột cadimi. Thu lấy phần rửa giải vào bình định mức một vạch 100 ml (6.3).

8.6.2 Khi bình gần cạn, rửa thành bình bằng 15 ml nước, lặp lại việc xử lý đó bằng 15 ml nước khác.

Sau khi phần nước đã chảy vào cột, đổ đầy nước vào bình.

8.6.3 Sau khi thu được gần 100 ml dịch rửa giải, tháo bình phía dưới cột và pha loãng bằng nước đến vạch.

8.6.4 Dùng pipet lấy 10 ml dịch rửa giải cho vào bình định mức một vạch dung tích 100 ml và tiến hành theo qui định trong 8.8.2 đến 8.8.4.

8.6.5 Nếu nồng độ nitrat của dịch rửa giải được xác định theo đường chuẩn (xem 8.10) thấp hơn 0,9 µg natri nitrit trên mililit (nghĩa là 90 % giá trị tính theo lý thuyết), thì cần loại bỏ cột.

8.7 Khử nitrat về nitrit

8.7.1 Dùng pipet lấy 20 ml dung dịch nitrat (8.4.5) cho vào bình chứa trên đỉnh cột lọc và thêm tiếp 5 ml dung dịch đệm amoniac (5.5).

Thu lấy dịch rửa giải từ cột vào bình định mức một vạch (6.3) dung tích 100 ml.

8.7.2 Tiến hành theo quy định trong 8.6.2 và 8.6.3.

8.8 Đo màu

8.8.1 Dùng pipet lấy một phần dịch rửa giải (V ml), nhưng không quá 25 ml cho vào bình định mức một vạch (6.3) dung tích 100 ml và thêm nước để có được thể tích khoảng 60 ml.

8.8.2 Thêm 10 ml dung dịch I (5.7.1), thêm tiếp 6 ml dung dịch III (5.7.3), trộn và để yên dung dịch 5 min ở nhiệt độ phòng, nơi tối.

8.8.3 Thêm 2 ml dung dịch II (5.7.2), trộn và để yên dung dịch khoảng 3 min đến 10 min ở nhiệt độ phòng, nơi tối. Pha loãng bằng nước đến vạch.

8.8.4 Đo độ hấp thụ của dung dịch trong cuvet 1 cm bằng máy đo màu quang điện hoặc máy đo quang phổ (6.8) ở bước sóng 538 nm.

CHÚ THÍCH Nếu độ hấp thụ của dung dịch màu thu được từ phần mẫu thử vượt quá độ hấp thụ thu được từ dung dịch chuẩn có nồng độ cao nhất thì lặp lại phép xác định theo 8.8, giảm lượng dịch rửa giải được lấy trong 8.8.1.

8.9 Số lần xác định

Tiến hành hai lần xác định độc lập, bắt đầu với các phần mẫu thử khác được lấy từ cùng một mẫu thử.

8.10 Đường chuẩn

8.10.1 Dùng pipet lấy 10 ml nước và ba dung dịch chuẩn natri nitrit (5.6), có chứa 2,5 µg, 5,0 µg và 10,0 µg nitrit/ml, mỗi dung dịch 10 ml cho vào bốn bình định mức một vạch (6.3) dung tích 100 ml.

8.10.2 Thêm nước vào mỗi bình để thu được thể tích khoảng 60 ml và tiến hành theo 8.8.2 đến 8.8.4.

8.10.3 Dụng đường chuẩn theo các độ hấp thụ thu được với các nồng độ của các dung dịch chuẩn natri nitrit, tính bằng microgam trên mililit.

9 Biểu thị kết quả

9.1 Phương pháp tính và công thức

Tính hàm lượng nitrat của mẫu, biểu thị bằng miligam kali nitrat trên kilogram, theo công thức sau đây:

$$\text{KNO}_3 = 1,465 \left(c \times \frac{10000}{m \times V} - \text{NaNO}_2 \right)$$

trong đó

m là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam;

V là thể tích của phần dịch rửa giải xem (8.8.1), tính bằng mililit;

c là nồng độ của natri nitrit, tính bằng microgam trên mililit, đọc được từ đường chuẩn, ứng với độ hấp thụ của dung dịch phần mẫu thử (xem 8.8.4);

NaNO_2 là hàm lượng nitrit trong mẫu, được biểu thị bằng miligam natri nitrit trên kilogram và xác định được theo TCVN 7992 (ISO 2918).

Lấy kết quả là trung bình của các kết quả từ hai phép xác định, với điều kiện đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại (xem 9.2). Ghi kết quả chính xác đến 1 mg trên kilogram sản phẩm.

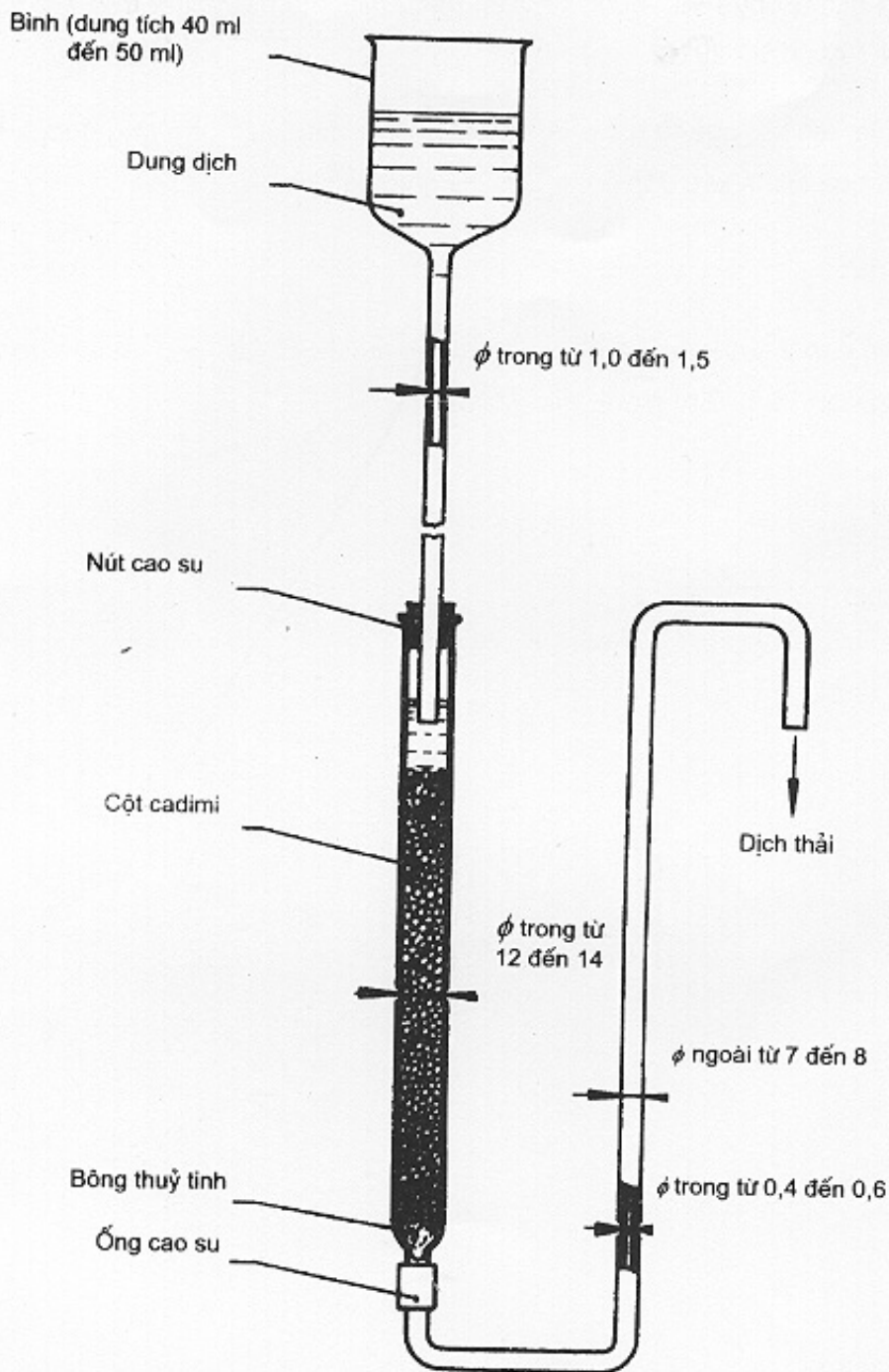
9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch giữa các kết quả của 2 lần xác định tiến hành đồng thời hoặc liên tiếp nhanh, do cùng một người thực hiện, không được vượt quá 10 % giá trị trung bình.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ phương pháp lấy mẫu đã sử dụng và kết quả thu được; đồng thời báo cáo thử nghiệm cũng phải nêu mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Báo cáo thử nghiệm cũng phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.



CHÚ THÍCH Có thể sử dụng đoạn ống nối mềm giữa đáy cột và ống mao dẫn nhánh, để điều chỉnh chiều cao của ống mao dẫn và tốc độ dòng.

Hình – Thiết bị khử nitrat