

[illegible]

| | | |
|--|--------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.112 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 2/7 |
|--|--------------------------------|---|

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định nitrate và nitrite trong thịt và sản phẩm từ thịt.

II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: *TCVN 7991:2009& 7992:2009*

III. Nguyên tắc

Chiết mẫu thử bằng nước nóng, cho kết tủa protein và lọc. Nitrite xác định trực tiếp bằng cách cho thêm sulphanilamide và N-1-naphthylendiamin dihydrochlorua vào dịch lọc, khi có mặt nitrite thì dung dịch thử có màu đỏ và đo quang ở bước sóng 538nm. Còn nitrate được xác định bằng cách dùng cadimi kim loại khử về nitrite để xác định tổng nitrite, sau đó trừ ra hàm lượng nitrite có trong mẫu, ta được hàm lượng nitrate cần xác định.

IV. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần phải được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, tủ hút, găng tay, khẩu trang, kính bảo hộ lao động khi cần thiết.
- Các hóa chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ phân tích

1. Thiết bị và dụng cụ cơ bản

- Cân phân tích, độ chính xác 0,0001g; 0.001g
- Máy pH
- Máy so màu

| | | |
|--|--------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.112 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 3/7 |
|--|--------------------------------|---|

- d. Bếp đun cách thủy
- e. Bình định mức 50, 100mL, 200mL, 1000mL.
- f. Pipet 1mL, 2mL, 5mL, 10mL.
- g. Bình nón 250mL, bercher...

2. Thiết bị phân tích

Hệ thống so màu UV-2401PC.

II. Hóa chất và dung dịch thử

1. Hóa chất và chất chuẩn

- a. $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$
- b. $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$
- c. $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$
- d. HCldd
- e. Cd kim loại
- f. Sulfanilamide $[NH_2C_6H_4SO_2NH_2]$
- g. N-1-Naphthylendiamine dihydro chlorua $[C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl]$
- h. Dinatri axit tetraacetic etylendiamin ngậm 2 nước
 $[CH_2N(CH_2COOH)CH_2COONa]_2 \cdot 2H_2O$
- i. NH_3 , 25%.
- j. Nước cất
- k. CH_3COOH
- l. Chuẩn NO_2 1000ppm, Sigma hoặc tương đương

| | | |
|--|--------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.112 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 4/7 |
|--|--------------------------------|---|

m. Chuẩn NO_3 1000ppm của Sigma hoặc tương đương hoặc chuẩn NO_3 pha từ muối KNO_3 , TKPT

2. Cách pha dung dịch thử

2.1 Dung dịch làm kết tủa protein

2.1.1 Carrez I

Hoà tan 220g kẽm axetate ngậm 2 phân tử nước $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ và 30ml axit axetic băng trong nước và thêm nước đến 1000mL.

2.1.2 Carrez II

Hoà tan 106g kali feroxyanua ngậm ba phân tử nước $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ trong nước và thêm nước đến 1000mL.

2.1.3 Borat, dung dịch bão hoà

Hoà tan 50g dinatri tetraborat ngậm mười phân tử nước $[\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}]$ trong 1000mL nước ấm và để nguội đến nhiệt độ phòng.

2.2 Dung dịch HCl có nồng độ khoảng 0.1N

Pha loãng 8ml dung dịch HCl đđ bằng nước đến 1000mL.

2.3 Dung dịch đệm amoni, pH từ 9.6 đến 9.8

Pha loãng 20ml dung dịch HCl đđ bằng 500ml nước cất. Sau khi lắc đều, thêm 10g muối $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{COONa}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 55ml amoni đđ, thêm nước đến 1000mL và lắc đều. Kiểm tra lại pH.

2.4 Dung dịch hiện màu

Thêm 100ml acid phosphoric 85% và 10g sulfanilamide vào 800ml nước cất khử ion, sau khi sulfanilamide tan hoàn toàn, thêm 1g N-(1-naphthyl)-ethylendiamine dihydrochloride, khuấy cho tan hết, sau đó định mức đến 1000ml bằng nước cất khử ion.

2.5 Pha dung dịch chuẩn nitrate 100ppm

| | | |
|--|--------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.112 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 5/7 |
|--|--------------------------------|---|

Lấy 1mL của chuẩn gốc NO₃ 1000ppm cho vào bình định mức 10mL, định mức đến vạch bằng nước cất.

2.6 Pha dung dịch chuẩn NO₂

Dung dịch chuẩn trung gian

- Dung dịch chuẩn trung gian 100mg/L: Lấy 1 mL dung dịch chuẩn gốc 1000 mg/L cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng nước cất được dung dịch chuẩn 100 mg/L.
- Dung dịch chuẩn trung gian 10mg/L: Lấy 0.1 mL dung dịch chuẩn gốc 1000 mg/L cho vào bình định mức 10 mL, định mức đến vạch bằng nước cất.
- Dung dịch chuẩn trung gian 1mg/L: Rút 0.25mL dung dịch chuẩn 100mg/L cho vào bình định mức 25mL, định mức đến vạch bằng nước.

2. Dung dịch chuẩn làm việc

Tiến hành pha loãng chuẩn trung gian trong nước để được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ từ 0.01 đến 1 mg/L.

Lưu ý: Cũng có thể pha chuẩn theo cách khác để có nồng độ chuẩn phân bố đều từ 0.01-1ppm.

| Nồng độ chuẩn trung gian, ppm | Vrút, mL | Vdm, mL | Nồng độ cuối, mg/L |
|----------------------------------|----------|---------|--------------------|
| 1 | 0.25 | 25 | 0.01 |
| 1 | 0.5 | 25 | 0.02 |
| 1 | 1.25 | 25 | 0.05 |
| 1 | 2.5 | 25 | 0.1 |
| 10 | 0.5 | 25 | 0.2 |
| 10 | 1 | 25 | 0.4 |
| 10 | 2 | 25 | 0.8 |
| 10 | 2.5 | 25 | 1 |

III. Kiểm soát QA/QC

Trong 1 lô mẫu cần phải thực hiện:

- Mẫu lặp
- Mẫu spike trên nền mẫu

| | | |
|--|--------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.112 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 6/7 |
|--|--------------------------------|---|

IV. Xử lý mẫu

1. Chuẩn bị mẫu thử

Đồng nhất mẫu theo HD.KT.22 và bảo quản mẫu tùy theo bản chất của mẫu.

2. Qui trình phân tích

2.1 Chuẩn bị cột Cd

- Cadimi được ngâm trước với HCl 0.1N trong becher, thỉnh thoảng khuấy, hoặc đánh siêu âm một lúc sao cho bề mặt cadimi được sáng.
- Gạn bỏ dung dịch và rửa cadimi hai lần bằng nước cất.
- Lắp một ít bông gòn thủy tinh vào đáy buret để giữ cadimi.
- Cho cadimi vào buret cùng với nước đến khi chiều cao của cadimi ở khoảng 17cm. Chú ý không được để cho mức nước thấp hơn đỉnh của lớp cadimi, và không được để cho cột nhồi bị bọt khí.

2.2. Phần mẫu thử

Tùy hàm lượng chất [phân tích có trong mẫu. Cân 3- 5g mẫu thử vào bình nón.

2.3. Khử protein

Thêm lần lượt 5ml dung dịch borax bão hòa và 100ml nước ở nhiệt độ không dưới 70°C vào bình nón chứa mẫu thử, sau đó đun cách thủy 15 phút, lắc nhiều lần trong quá trình đun, để nguội.

Thêm tiếp 2ml thuốc thử I và 2ml thuốc thử II, trộn kỹ sau mỗi lần thêm.

Chuyển lượng chứa sang bình định mức 200mL. Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn. Để yên 30 phút ở nhiệt độ phòng.

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

2.4. Kiểm tra khả năng khử của cột cadimi

Lấy 1ml dung dịch NO_3 100mg/L cho vào erlen 100ml, thêm 5ml dung dịch đệm amoniac, và 40 ml nước cất, trộn đều cho lên cột. Thu lấy phần rửa giải vào bình định mức 100mL. Sau đó tráng erlen nhiều lần bằng nước và cũng cho lên cột. Khi thu được gần 100mL dung dịch rửa giải, lấy bình ra và định mức đến vạch bằng nước cất.

Lấy 25mL của dung dịch rửa giải này cho vào ống ly tâm 50mL và tiến hành hiện màu theo mục 2.6. Hiện màu

Nếu nồng độ thu được tính theo NO_3 thấp hơn 0.9mg/L (nghĩa là thấp hơn 90% theo giá trị lý thuyết), thì cột khử này chưa đạt yêu cầu.

Lưu ý: tốc độ qua cột không được quá 3ml/phút.

2.5 Khử nitrate về nitrite trong mẫu thử

Dùng pipet lấy 10 đến 20ml dung dịch sau lọc (C.4) cho vào erlen 100ml, thêm 5ml dung dịch đệm amoniac (B.3.3), và 25 ml nước cất, trộn đều cho lên cột. Thu lấy phần rửa giải vào bình định mức 100mL.

2.6. Hiện màu

🌈 Đối với mẫu xác định nitrite

Đối với mỗi điểm chuẩn thêm 1mL dung dịch hiện màu, lắc đều để ít nhất 10 phút rồi đo quang ở bước sóng 538nm.

Lấy 25mL dung dịch sau lọc (dung dịch sau khi khử protein mục 4) cho vào ống ly tâm 50mL, thêm 1mL dung dịch hiện màu, lắc đều để ít nhất 10 phút rồi đo quang ở bước sóng 538nm.

🌈 Đối với mẫu xác định nitrate

Nếu mẫu chỉ xác định nitrate thì cũng phải tiến hành thêm bước xác định nitrite để trừ đi.

Lấy 25mL dung dịch rửa giải ở mục 2.5 cho vào ống ly tâm 50mL, thêm 1mL dung dịch hiện màu, lắc đều để ít nhất 10 phút rồi đo quang ở bước sóng 538nm.

V. Phân tích

1. Thông số thiết bị

| | | |
|--|--------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.112 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 8/7 |
|--|--------------------------------|---|

Máy so màu UV-Vis cài đặt ở bước sóng 538nm.

2. Trình tự đo mẫu

- Mẫu blank nước cất có thêm các hóa chất lên màu để Autozero
- Chuẩn có nồng độ từ thấp đến cao
- Mẫu, mẫu lặp, mẫu spike
- Chuẩn check

Lưu ý: Nếu độ hấp thu của mẫu vượt quá đường chuẩn thì giảm thể tích của dung dịch đem đi hiện màu sau đó định mức bằng nước tới 25mL và cũng thêm 1mL dung dịch hiện màu.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ

1 Biểu thị kết quả nitrite

$$\text{Hàm lượng nitrite trong mẫu: NO}_2^- \text{ (mg/kg)} = \frac{Co * V_3 * V_1}{V_2 * m}$$

Trong đó:

Co: Nồng độ NO₂⁻ tính theo đường chuẩn (mg/L)

V₁: thể tích chiết (mL)

V₂: thể tích dịch lọc đem đi hiện màu (mL)

V₃: thể tích định mức sau khi hiện màu (mL)

m: khối lượng mẫu (g)

2. Biểu thị kết quả nitrate

$$\text{Hàm lượng NO}_3^- \text{ trong mẫu: NO}_3^- \text{ (mg/kg)} = \left(\frac{Co * V_1 * V_3 * V_5}{V_2 * V_4 * m} - C_{NO_2} \right) * 1.348$$

Trong đó:

| | | |
|--|--------------------------------|---|
| CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ | HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC | Mã số: HD.TN.112 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2018 Trang: 9/7 |
|--|--------------------------------|---|

Co: Nồng độ NO_2^- tính theo đường chuẩn (mg/L)

V_1 : thể tích chiết (mL)

V_2 : thể tích dịch lọc đem đi qua cột khử (mL)

V_3 : thể tích định mức sau khi qua cột khử (mL)

V_4 : thể tích mẫu đem đi hiện màu (mL)

V_5 : thể tích định mức sau khi hiện màu (mL)

C_{NO_2} : Nồng độ nitrite trong mẫu, mg/kg.

m: khối lượng mẫu (g)

1.348: hệ số chuyển đổi từ nitrite sang nitrate.

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- Đường chuẩn phải có $R^2 \geq 0.995$
- Theo tiêu chuẩn tham khảo thì chênh lệch giữa các lần tiến hành đồng thời không được vượt quá 10% giá trị trung bình.
- Hiệu suất thu hồi của phương pháp dao động từ 80-110%, lấy từ XNGTSD của phương pháp.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Kết quả báo cáo phân tích được ghi nhận lại trong phiếu phân tích BM.15.04b và BM.15.06