

استانداردهای اندازه گیری میزان نیتريت در مواد غذایی

استاندارد ملی ایران شماره 923

تعیین مقدار نیتريت در گوشت و فرآورده های گوشتی (روش مرجع).

اصول آزمون

الف استخراج آزمون به آب گرم، رسوب دادن پروتئين ها، صاف کردن، افزودن سولفانيل آميد و ان 1 آلفانفتيل – اتيلن دی آمین دی هیدروکلراید به مایع صاف شده.
ب اندازه گیری شدت رنگ قرمز ایجاد شده در مجاورت نیتريت با روش فوتومتری در طول موج 538 nm.

استاندارد ملی ایران شماره 6963

اندازه گیری نیترات و نیتريت در سیب زمینی.

اصول آزمون

۱. تعیین نیتريت

الف استخراج آزمون به آب داغ، ته نشین ساختن پروتئينهای مربوط با اضافه نمودن محلولهای پتاسیم هگزاسیانوفرات و استات روی، صاف نمودن رسوب به دست آمده.
ب اضافه نمودن سولفانيل آميد کلراید و ان 1 نفتيل اتيلن دی آمین دی هیدروکلراید به مایع صاف شده و حصول کمپلکس قرمز رنگ. اندازه گیری غلظت نیتريت در طول موجهای 538nm تا 540nm به روش اسپکتروفوتومتری.

۲. تعیین نیترات

الف استخراج آزمون به آب داغ، ته نشین ساختن پروتئينها با اضافه نمودن محلولهای پتاسیم هگزاسیانوفرات و استات روی، صاف کردن رسوب.
ب احیای نیترات به نیتريت به وسیله کادمیم فلزی، افزودن سولفانيل آميد کلراید و ان 1 نفتيل اتيلن دی-آمین هیدروکلراید، به ماده صاف شده و حصول کمپلکس قرمز رنگ. اندازه گیری غلظت نیتريت در طول موجهای 538nm تا 540nm به روش اسپکتروفوتومتری.

استاندارد ملی ایران شماره 7132

اندازه گیری نیترات و نیتريت در انواع پیاز خوراکی.

اصول آزمون

۱. تعیین نیتريت

الف استخراج آزمون به آب داغ، ته نشین ساختن پروتئينهای مربوط با اضافه نمودن محلولهای پتاسیم هگزاسیانوفرات و استات روی، صاف نمودن رسوب به دست آمده.
ب اضافه نمودن سولفانيل آميد کلراید و ان 1 نفتيل اتيلن دی آمین دی هیدروکلراید به مایع صاف شده و حصول کمپلکس قرمز رنگ. اندازه گیری غلظت نیتريت در طول موجهای 538nm تا 540nm به روش اسپکتروفوتومتری.

۲. تعیین نیترات

الف استخراج آزمون به آب داغ، ته نشین ساختن پروتئينها با اضافه نمودن محلولهای پتاسیم هگزاسیانوفرات و استات روی، صاف کردن رسوب.
ب احیای نیترات به نیتريت به وسیله کادمیم فلزی، افزودن سولفانيل آميد کلراید و ان 1 نفتيل اتيلن دی-آمین هیدروکلراید، به

ماده صاف شده و حصول کمپلکس قرمز رنگ. اندازه گیری غلظت نیتريت در طول موجهای ۵۳۸nm تا ۵۴۰nm به روش اسپكتروفوتومتري.

استاندارد ملی ايران شماره 13327

دامنه کاربرد

تعيين درصد نيتريت و نيترات شير و فراوردههای آن از طريق احیای کادميوم و طيف سنجی. فراوردههای تحت آزمون عبارتند از:

الف شير خشک پس چرخشده به طور کامل يا جزئی.

ب پنيرهای سخت، نیمه سخت و نرم.

پ پنير ذوب شده.

ت آب پنير، کازئين و کازئينات و پودر آب پنير

یادآوری: اين روش ممکن است با استفاده از تجهيزات خودکار خصوصا از طريق روش جريان مقطع يا روش تزريقی وسپس بررسی کاهش آلودگی کادميوم در آزمایشگاه و فاضلاب انجام شود.

اصول آزمون

الف پخش آزمون در آب گرم به منظور رسوب چربيها و پروتئينها، صاف کردن مایع.

ب احیای يونهای نيترات به نيتريت با استفاده از کادميوم مسی در قسمتی از مایع صاف شده.

پ حصول رنگ قرمز با افزودن سولفانيل آميد و ان 1 نفتالين اتيلن دی آمين دی هيدروکلريد به قسمتهایی از محلول صاف شده اولیه و محلول احياشده.

ت انجام محاسبات طيف سنجی در طول موج معادل 538 nm .

ث اندازه گیری درصد نيتريت نمونه و درصد نيتريت کل پس از احیای يونهای نيترات با استفاده از مقایسه مقدار جذب محلولهای مورد آزمون و محلولهای کالبره شده نيتريت سدیم.

ج محاسبه درصد نيترات از اختلاف بين اين دو درصد

استاندارد ملی ايران شماره 13327-2

دامنه کاربرد

تعيين درصد نيتريت و نيترات شير و فراوردههای آن با استفاده از جريان مقطع.

یادآوری اين استاندارد برای فراوردههای شير، پنير، شيرمايع و شير خشک و غذای نوزاد کاربرد دارد.

اصول آزمون

۱. تعيين نيترات

الف تعليق آزمون در آب.

ب انتقال بخشی از اين مخلوط به دستگاه تجزيهکننده برای انجام عمليات تجزيه.

پ احیای يونهای نيترات به نيتريت.

ت تعيين درصد نيتريت به وسيله روش طيفسنجی.

ث محاسبه درصد نيترات با مقایسه نتايج به دست آمده برای آزمون و نتايج به دست آمده از محلولهای استاندارد.

یادآوری مقدار نيتريت عموما در مقایسه با مقدار نيترات کم است. غذای نوزاد با پایه پروتئينهای سبوس از اين قاعده مستثنی است، تصحيح مقدار نيتريت موجود میتواند پس از تعيين درصد نيتريت انجام شود.

۲. تعيين نيتريت

الف تعليق آزمون در مخلوطی از آمونیوم و کلريدسدیم.

ب انتقال بخشی از اين مخلوط به دستگاه تجزيه کننده برای انجام عمليات تجزيه.

پ تعيين درصد نيتريت با روش طيف سنجی.

ت محاسبه درصد نيتريت با مقایسه نتايج به دست آمده از محلول استاندارد

استاندارد ملی ایران شماره 3-1332

دامنه کاربرد

تعیین درصد نیتريت و نیترات شیر و فراورده‌های آن بروش احیای کادمیوم و آزمایش تزریق جریان. این استاندارد برای پنیرهای سفت، نیمه سفت و نرم با هر طول مدت عمر و پنیرهای ذوب شده، کاربرد دارد. این استاندارد هم چنین برای پودر آب پنیر، پودر شیر و غذای نوزادان با پایه شیر نیز قابل اعمال است. محدوده قابل تشخیص با این روش ۰/۵ میلی‌گرم یونهای نیترات در هر کیلوگرم و ۱/۰ میلی‌گرم یونهای نیتريت در هر کیلوگرم میباشد.

اصول آزمون

- الف تعلیق نمونه مورد آزمون در محلول بافر گرم شده.
- ب جدا کردن چربی با سانتریفیوژ کردن و خنک کردن سریع.
- پ تجزیه و تحلیل نهایی آزمونه‌ها در مقادیر کوچک تهیه شده از این محلول چربی گرفته، با انجام روش آزمون تزریق جریان.
- یادآوری تجزیه خطی برای خروج پروتئین و باقی ماندن چربی به کار میرود.
- ت احیای یونهای نیترات به یونهای نیتريت با استفاده از کادمیوم.
- ث ایجاد رنگ قرمز بر اثر واکنش یونهای نیتريت با سولفانیل آمید و ان 1 نفتالین اتیلن دی آمین دی-هیدروکلرید.

ج اندازه گیری رنگ حاصل در جریان جذب بیشینه رنگ در 540 nm با توجه به قدرت جذب محاسبه شده در 620 nm.

چ اندازه گیری درصد نیتريت و نیترات نمونه مورد آزمون با توجه به قدرت جذب مجموعه ای از محلولهای استاندارد نیتريت و نیترات.

یادآوری چنان چه درصد نیتريت از ۰/۵ mg/kg یا ۱۰٪ مقدار نیترات بیشتر باشد، درصد نیترات با کاهش درصد نیتريت از نتایج به دست آمده از نیترات تصحیح میشود.

استاندارد BS EN 12014-2

اندازه گیری نیترات در گستره ۵۰ mg/kg تا ۳۰۰۰ mg/kg در سبزیها و فراورده‌های آنها.

استاندارد BS EN 12014-3

اندازه گیری مقادیر کل نیترات و نیتريت به صورت یون نیتريت در گوشت و فراورده‌های آن در حد ۲۵ mg/kg

استاندارد BS EN 12014-4

اندازه گیری نیترات و نیتريت در گستره ۵۰ mg/kg تا ۳۰۰۰ mg/kg یون نیترات و مقدار نیتريت تا ۴۰ mg/kg در فراورده‌های گوشتی.

استاندارد BS EN 12014-7

اندازه گیری نیترات در گستره ۹۰۰ mg/kg تا ۵۲۰۰ mg/kg در سبزیها و فراورده‌های آنها.

روش اندازه گیری نیتريت در فراورده‌های گوشتی

مقدمه:

استفاده از نمک های سدیم و پتاسیم نیتريت از قدیم الایام به عنوان یک ماده نگهدارنده، طعم دهنده و تثبیت کننده رنگ در فرآورده های گوشتی مثل سوسیس و کالباس به منظور تثبیت رنگ قرمز آنها و جلوگیری از فعالیت میکروارگانیسم های مولد فساد و همچنین بهبود طعم، مورد استفاده قرار می گیرد. مصرف مقادیر بالای این املاح در فرآورده های گوشتی خطر بروز سرطان، توده های بدخیم و ناقص الخفله زائی در بین مصرف کنندگان را افزایش می دهد و از طرف دیگر همچنین تأثیر آن در ایجاد بیماری متهموگلوبین ثابت شده

است. غلظت پائین این املاح در محصول خطر رشد کلستریدیوم بوتولینوم در طول مدت نگهداری و خطر تولید شدن سم بسیار مهلک و کشنده بوتولیسم را افزایش می دهد لذا کنترل میزان مصرف این املاح در زمان تولید و مقدار باقی مانده آن در طول نگهداری ضروری می باشد.

با توجه به جمع موارد فوق، میزان نیتريت مورد استفاده تا حدود یک پنجم نسبت به دو دهه قبل کمتر شده است. در صورت استفاده از نیتريت سدیم ، میزان آن در فرآورده نهایی نباید از ۱۲۰ ppm بیشتر گردد.

روش کار:

۱. مواد و تجهیزات

۱.۱. مواد شیمیایی و معرفها :

۱.۱.۱. فرو سیانور پتاسیم سه آبه $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$

۲.۱.۱. استات روی دو آبه $Zn(CH_3-COOH) \cdot 2.2H_2O$

۳.۱.۱. تترابورات سدیم ده آبه $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$

۴.۱.۱. اسیداستیک گلاسیال ۱۰۰٪

۵.۱.۱. نیتريت سدیم $NaNO_2$

۶.۱.۱. سولفانیل آمید $C_6H_8N_2O_2S$

۷.۱.۱. اسیدکلریدریک غلیظ با وزن مخصوص ۱/۱۹ g/ml

۸.۱.۱. (N-۱) آلفانفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید

۹.۱.۱. آب مقطر عاری از نیتريت و نیترات

۲.۱. تجهیزات :

۱.۲.۱. ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم

۲.۲.۱. چرخ گوشت در اندازه آزمایشگاهی دارای صفحه مشبک که قطر سوراخ های آن از ۴ میلی متر تجاوز نکند

۳.۲.۱. دستگاه اسپکتروفتومتر با محفظه مخصوص که طول مسیر نور در آن ۱ سانتیمتر باشد.

۴.۲.۱. بن ماری جوش

۳.۱. لوازم شیشه ای و غیره :

۱.۳.۱. بالن ژوژه درحجم های ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتری

۲.۳.۱. ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری

۳.۳.۱. همزن شیشه ای

۴.۳.۱. قیف شیشه ای

۵.۳.۱. پی پت مدرج در حجم های ۵ و ۲۰ میلی لیتری

۶.۳.۱. استوانه مدرج ۱۰۰ میل لیتری

۷.۳.۱. پی پت حبابدار در حجم های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میلی لیتری

۸.۳.۱. کاغذ صافی عاری از نیتريت

۹.۳.۱. پوآر

۲. تهیه محلول ها :

۱.۲. **محلول فروسیانور پتاسیم :** ۱۰۶ گرم فروسیانور پتاسیم سه آبه را در مقداری آب حل کرده و در بالن ژوژه ۱۰۰۰ میلی لیتری به حجم برسانید.

۲.۲. **محلول استات روی :** ۳۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال را به مقداری آب مقطر (حدود ۳۰۰ میلی لیتر) اضافه کنید. ۲۱۹ گرم استات روی دوآبه را در آن حل کنید. محلول حاصل را در بالن ژوژه ۱۰۰۰ میلی لیتری با آب مقطر به حجم برسانید.

۳.۲. **محلول بوراکس :** ۵۰ گرم تترابورات سدیم ده آبه را در مقداری آب مقطر ولرم حل کرده و در بالن ژوژه ۱۰۰۰ میلی-لیتری با آب مقطر به حجم برسانید.

۴.۲. **محلول سولفانیل آمید :** ۲ گرم سولفانیل آمید را به وسیله حرارت بر روی بن ماری در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. محلول را خنک کرده و در صورت لزوم آن را صاف کنید. در حالیکه محلول را مرتباً بهم می زنید ۱۰۰ میلی لیتر اسیدکلریدریک غلیظ به آن اضافه کنید. محلول را به بالن ژوژه ۱۰۰۰ میلی لیتری منتقل کرده و با آب مقطر آن را به حجم برسانید.

۵.۲. **محلول (N-۱) آلفانفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید :** ۰/۲۵ گرم (N-۱) آلفانفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید را در مقداری آب مقطر حل کرده سپس در بالن ژوژه ۲۵۰ میلی لیتری به حجم برسانید. (این محلول به مدت یک هفته در شیشه قهوه ای درب دار و در دمای یخچال قابل نگهداری است.

۶.۲. **اسیدکلریدریک ۱/۱۹:** ۴۴۵ میلی لیتر از اسیدکلریدریک غلیظ را به بالن ژوژه ۱ لیتری حاوی مقداری آب مقطر به آرامی افزوده و پس از سرد شدن محلول را با آب مقطر به حجم رسانده و در شیشه قهوه ای رنگ نگهدارید.

۷.۲. آماده سازی محلولهای استاندارد :

۱.۷.۲. **محلول استاندارد نیتريت سدیم (۱) :** ۱ گرم نیتريت سدیم را در مقداری آب مقطر حل کرده سپس در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری به حجم برسانید.

۲.۷.۲. **محلول استاندارد نیتريت سدیم (۲) :** به وسیله پی پت ژوژه ۵ میلی لیتر از محلول استاندارد نیتريت سدیم (۱) را در بالن ژوژه ۱ لیتری ریخته و با آب مقطر به حجم برسانید. (این محلول را در روز آزمایش تهیه و مورد استفاده قرار دهید).

۳.۷.۲. **محلول های استاندارد میانی :** به وسیله پی پت ژوژه ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ و ۲۵ میلی لیتر از محلول استاندارد (۲) را در بالن ژوژه های ۱۰۰ میلی لیتری ریخته و با آب مقطر به حجم برسانید. این محلول ها به ترتیب حاوی ۲/۵، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۲/۵ میکروگرم نیتريت سدیم در میلی لیتر می باشند. (این محلول ها را در روز آزمایش تهیه و مورد استفاده دهید).

۴.۷.۲. **محلول های استاندارد نهایی :** ۶ عدد بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری را از شماره ۱ تا ۶ شماره گذاری کنید. در بالن ژوژه شماره ۱ به وسیله پی پت ژوژه ۱۰ میلی لیتر آب مقطر بریزید (محلول بلانک). در بالن ژوژه های شماره ۲ الی ۶ به وسیله پی پت

ژوژه به ترتیب ۱۰ میلی لیتر از محلول های استاندارد میانی و سپس ۶۰ میلی لیتر آب مقطر بریزید. به هر ۶ بالن ۱۰ میلی لیتر محلول سولفانیل آمید بیفزایید و هم بزنید. به هر ۶ بالن ۶ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک بیفزایید و کاملاً مخلوط کنید. هر ۶ بالن را ۵ دقیقه در دمای اطاق در تاریکی قرار دهید.

هر ۶ بالن را از تاریکی خارج کرده و ۲ میلی لیتر از محلول (N-۱) آلفانفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید به آنها اضافه کرده و کاملاً مخلوط کنید.

بالن ها را مجدداً ۱۰ دقیقه در دمای اطاق در تاریکی قرار دهید. بالن ها را از تاریکی خارج کرده و با آب مقطر به حجم برسانید.

دستگاه اسپکتروفتومتر را روشن کرده تا آماده شود طول موج ۵۳۸ نانومتر را به دستگاه بدهید.

میزان جذب نور محلول بالن های شماره ۲ الی ۶ را در مقابل محلول بلانک (بالن شماره ۱) قرائت نموده و منحنی استاندارد مربوطه را رسم کنید. (بالن های فوق به ترتیب از شماره ۱ الی ۶ حاوی صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵ میلی گرم در لیتر نیتريت سدیم می باشند).

۸.۲. آماده سازی نمونه :

حداقل ۲۰۰ گرم از نمونه مورد نظر (سوسیس ، همبرگر، کالباس) را نمونه برداری و بلافاصله پس از تهیه مورد آزمایش قرار دهید. نمونه را رنده یا چرخ کنید تا یکنواخت و همگن شود و آن را در یک ظرف غیرقابل نفوذ به هوا نگهداری کنید.

۳. مراحل انجام آزمایش:

۱۰ گرم از نمونه همگن شده را در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری با تقریب ۰/۱۰۰ گرم وزن کنید. (دقت کنید نمونه به دیواره های ارلن نچسبد). ۵ میلی لیتر از محلول بوراکس به محتوی ارلن اضافه کنید. ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به محتوی ارلن بیفزایید.

بن ماری را روشن کنید تا آب آن به جوش آید. ارلن را بر روی بن ماری به مدت ۱۵ دقیقه گذاشته و محتوی آن را مرتباً بهم بزنید. ارلن را از روی بن ماری برداشته و بگذارید در دمای اطاق سرد شود. ۲ میلی لیتر از هر یک از محلول های فرو سیانور پتاسیم و استات روی به محتوی ارلن افزوده و پس از هر بار افزایش کاملاً مخلوط کنید. محتوی ارلن را به بالن ژوژه ۲۰۰ میلی لیتری منتقل کرده و با آب مقطر به حجم برسانید. محتوی بالن ژوژه را یکنواخت کرده و بگذارید به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق بماند.

محلول رویی را توسط کاغذ صافی در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری صاف کنید به نحوی که یک محلول روشن حاصل گردد. توسط پی پت ژوژه ۲۰ میلی لیتر از محلول صاف شده را به یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری منتقل کنید.

حدود ۶۰ میلی لیتر آب مقطر به بالن ژوژه اضافه کنید. ۱۰ میلی لیتر محلول سولفانیل آمید به بالن اضافه کنید.

۶ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک به بالن افزوده و کاملاً مخلوط کنید. بالن را ۵ دقیقه در دمای اطاق در تاریکی قرار دهید. بالن را از تاریکی خارج کرده و ۲ میلی لیتر از محلول (N-۱) آلفانفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید به آن افزوده و کاملاً مخلوط کنید. بالن را مجدداً ۱۰ دقیقه در دمای اطاق در تاریکی قرار دهید.

بالن را از تاریکی خارج کرده، با آب مقطر به حجم برسانید و بهم بزنید. میزان جذب نور محلول را با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۸ نانومتر در مقابل محلول بلانک (بالن شماره ۱) قرائت کنید. اگر مقدار جذب نور در محلول رنگی نمونه بیشتر از مقدار جذب نور در محلول استاندارد با بالاترین غلظت باشد، مراحل ذکر شده را با کاهش مقدار نمونه صاف شده مجدداً تکرار کنید.

۴. محاسبات :

با استفاده از منحنی استاندارد، جذب محلول های استاندارد، میزان جذب نور نمونه و نیز با استفاده از فرمول زیر مقدار نیتريت موجود در نمونه را بر حسب ملی گرم نیتريت سدیم در کیلوگرم (ppm) محاسبه کنید.

$$\text{مقدار نیتريت موجود در نمونه بر حسب میلی گرم نیتريت سدیم در کیلوگرم (ppm)} = \frac{C \times 2000}{m \times V}$$

C = غلظت نیتريت سدیم بر حسب میلی گرم در میلی لیتر (ppm) به دست آمده از منحنی استاندارد که با جذب نور توسط نمونه مطابقت دارد.

m = مقدار نمونه بر حسب گرم

V = حجم محلول صاف شده بر حسب میلی لیتر

روش اندازه گیری نیتريت در سبزیجات

۱. مواد و تجهیزات:

۱.۱. مواد شیمیایی و معرفها:

- ۱.۱.۱. تترا بورات سدیم
- ۲.۱.۱. هگزا فرات سیانور پتاسیم ۳ آبه
- ۳.۱.۱. استات روی ۲ آبه
- ۴.۱.۱. اسید استیک خالص
- ۵.۱.۱. اسید کلرید ریک خلوص ۳۷٪ با دانسیته ۱/۱۹
- ۶.۱.۱. سولفونیل آمید
- ۷.۱.۱. (۱ نفتیل) اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید
- ۸.۱.۱. مفتول روی به درازای ۱۵۰ میلی لیتر و قطر ۵ تا ۷ میلی متر (و یا پودر روی)
- ۹.۱.۱. سولفات کادمیم هشت آبه
- ۱۰.۱.۱. کلرید آمونیم
- ۱۱.۱.۱. نیتريت سدیم
- ۱۲.۱.۱. آمونیاک غلیظ ۲۵٪

۲.۱. لوازم شیشه ای و تجهیزات:

- ۱.۲.۱. بالن حجمی در دار سمباده ای با حجم های ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتر
- ۲.۲.۱. پیپت های حباب دار با حجم های ۵، ۱۰، ۲۰ میلی لیتر و پیپت های مدرج با حجم های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی لیتر
- ۳.۲.۱. ارلن مایر در دار سمباده ای ۵۰ میلی لیتری
- ۴.۲.۱. مزور با حجم ۲۰۰ میلی لیتر
- ۵.۲.۱. بشر ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتری، بشر بلند ۲۵۰ میلی لیتری
- ۶.۲.۱. مگنت های با طول ۲ سانتی متر و عرض ۰/۵ سانتی متر
- ۷.۲.۱. کاردک که نک آن با پی - تی - اف - ای پوشیده شده باشد .
- ۸.۲.۱. کاغذ صافی سلولزی معمولی
- ۹.۲.۱. میله بهم زن شیشه ای
- ۱۰.۲.۱. پ هاش متر
- ۱۱.۲.۱. ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم
- ۱۲.۱.۱. هیتر دارای همزن مغناطیسی
- ۱۳.۲.۱. چراغ گاز آزمایشگاهی
- ۱۴.۲.۱. بن ماری (حمام آب گرم)
- ۱۵.۲.۱. بینابسنج مناسب برای اندازه گیری در طول موج ۵۳۸ نانومتر و مجهز به سل با عرض یک سانتی متر
- ۱۶.۲.۱. آسیاب و خردکن
- ۱۷.۲.۱. قیف
- ۱۸.۲.۱. آون قابل تنظیم در دمای 115 ± 5 درجه سلسیوس

۲. روش کار:

۱.۲. مقدمه:

۱.۱.۲. اندازه گیری نیتريت آزاد: استخراج آزمونه با آب داغ ته نشین کردن پروتئین ها ، با افزایش محلول های هکزا سیانوفرات پتاسیم و استات روی صاف کردن محلول بدست آمده ، افزودن کلور سولفانیل آمید و ان- (۱ نفتیل) اتیلین دی آمین دی هیدروکلرید به محلول صاف شده و اندازه گیری کمپلکس پیچیده قرمز رنگ ایجاد شده توسط نیتريت در طول موج ۵۳۸ نانومتر به روش بیناب سنجی .

۲.۱.۲. اندازه گیری نیتريت کل

استخراج آزمونه با آب داغ ، ته نشین کردن پروتئین ها با افزایش محلول فروسیانور پتاسیم دو ظرفیتی و استات روی ، صاف کردن محلول بدست آمده ، احیای نیترات این محلول به نیتريت بوسیله کادمیوم فلزی ، افزایش کلور سولفانیل آمید و ان- (۱ نفتیل) اتیلین دی آمید دی هیدرو کلرید به محلول صاف شده و اندازه گیری کمپلکس قرمز رنگ ایجاد شده توسط نیتريت در طول موج ۵۳۸ نانومتر به روش بیناب سنجی .

۲.۲. تهیه محلول ها:

۱.۲.۲. محلول اشباع شده تترا برات سدیم: ۲۵ گرم تترا برات سدیم را بطور کمی به بشر ۱۰۰۰ میلی لیتری منتقل کنید و به آن حدود ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید. آنگاه بر روی هیتر مغناطیسی با همزدن و حرارت دادن حل نمایید. سپس محلول را در بالن ۵۰۰ میلی لیتری به حجم برسانید.

۲.۲.۲. محلول هگزا فرات سیانور پتاسیم: ۵۳ گرم هگزا فرات سیانور پتاسیم ۳ آبه را در حدود ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس در بالن ۵۰۰ میلی لیتری به حجم برسانید.

۳.۲.۲. محلول استات روی: ۱۱۰ گرم استات روی ۲ آبه را در حدود ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس به بالن ۵۰۰ میلی لیتری منتقل کرده و ۱۵ میلی لیتر اسید استیک خالص به آن افزوده و به حجم برسانید.

۴.۲.۲. محلول اسید کلرید ریک: به ۵۵/۵ میلی لیتر آب مقطر، ۴۴/۵ میلی لیتر اسید کلزیدریک غلیظ ۳۷٪ را اضافه کنید.

۵.۲.۲. **محلول سولفونیل آمید:** ۰/۴ گرم سولفانیل آمید را با افزودن ۱۶۰ میلی لیتر آب مقطر در بشر ۲۰۰ میلی لیتری حل کنید. سپس محلول را به بالن حجمی ۲۰۰ منتقل کرده و ۲۰ میلی لیتر محلول اسیدی بند ۴.۲.۲ به آن افزوده و به وسیله آب مقطر به حجم برسانید (ماندگاری این محلول یک هفته در شیشه قهوه ای تیره است).

۶.۲.۲. **محلول (انفتیل) اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید:** ۰/۰۵ گرم محلول (انفتیل) اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید را در کمی آب حل کنید. سپس آنرا به بالن ۵۰۰ میلی لیتری منتقل کرده و با آب مقطر به حجم برسانید (ماندگاری این محلول یک هفته در شیشه قهوه ای تیره است).

۷.۲.۲. **محلول سولفات کادمیم هشت آب:** ۴۰ گرم سولفات کادمیم هشت آب را در بشر ۲۰۰ میلی لیتری با حدود ۱۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس در بالن حجمی ۲۰۰ میلی لیتر به حجم برسانید.

۸.۲.۲. **کادمیم احیا:** در یک بشر باریک و بلند ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محلول سولفات کادمیم می باشد میله های روی را در درون محلول به مدت یک ساعت قرار دهید ، به طوری که محلول میله های روی را کاملاً بپوشاند و به طور منظم با کاردک کادمیوم های احیا شده را از روی میله روی بتراشید تا وارد محلول شود .

با بکار بردن میله بهم زن شیشه ای کادمیوم را به صورت گرد نرم درآورید . کادمیوم جمع آوری شده از روی میله های روی را یکبار با جوهر نمک ۰/۱ مول در لیتر و چند بار با آب مقطر بشوئید و سپس بکار برید. کادمیوم بدست آمده را خرد کنید و زیر آب مقطر نگهدارید (بجای مفتول روی می توانید از پودر روی استفاده کنید. بدین صورت که ۱۰ گرم پودر روی را در محلول بند ریخته و هم بزنید. سپس کادمیم را که رسوب می کند جدا کرده و شستشو داده و زیر آب مقطر نگهدارید).

۹.۲.۲. **محلول بافر آمونیایی با پ هاش ۹/۶:** ۱۸/۷ گرم کلرید آمونیم را در حدود ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. سپس پ هاش محلول را به وسیله محلول غلیظ آمونیاک به ۹/۶ برسانید. آنگاه در بالن ۵۰۰ میلی لیتری محلول را با آب مقطر به حجم برسانید.

۳.۲. آماده سازی نمونه:

۱.۳.۲. نمونه آزمایشگاهی را به خوبی با هم بیامیزید اگر نیاز باشد ابتدا هسته ها و پوست سخت دانه ها را بیرون بیاورید و نمونه آزمایشگاهی را در یک آسیاب مکانیکی بسائید .
فرآورده منجمد را در ظرف در بسته بگذارید تا از انجماد خارج شود و مایع تراوش شده را با آن مخلوط و به خوبی یکنواخت کنید .

۴.۲. مراحل انجام آزمایش:

۱.۴.۲. **رسم منحنی کالیبراسیون:** ۳ گرم نیتريت سدیم را که قبلاً در دمای 5 ± 115 درجه سلسیوس خشک و به وزن ثابت رسیده است با تقریب ۱ میلی گرم بکشید و در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید و به طور کمی با شستشوی مکرر آب به یک بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری منتقل کنید و به حجم برسانید و بهم بزنید .

۷-۴-۱-۲) با یک پی پت حباب دار، ۵ میلی لیتر از این مایع را به داخل یک بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری منتقل کنید و با آب به حجم برسانید . یک میلی لیتر از محلول استاندارد بدست آمده، دارای ۱۰ میکرو گرم یون نیتريت است. (این محلول ناپایدار است و باید در هنگام کاربرد تهیه شود) .

در یک سری شش تائی بالن های حجمی ۵۰ میلی لیتری، به ترتیب مقادیر ۰ (محلول بلانک)، ۰/۵ ، ۱ ، ۲ ، ۵/۲ و ۳ میلی لیتر محلول استاندارد نیتريت سدیم و به ترتیب ۳۰ ، ۲۹/۵ ، ۲۹ ، ۲۸ ، ۲۷/۵ و ۲۷ میلی لیتر آب مقطر بریزید.

سپس ۳ میلی لیتر از محلول اسید کلریدریک بند ۷-۲-۴ و ۵ میلی لیتر از محلول سولفانیل امید بند ۷-۲-۵ را به هر یک از بالن های حجمی ۵۰ میلی لیتر اضافه کرده و بخوبی محلول ها را هم بزنید.

آنگاه ۵ دقیقه، محلول ها را در تاریکی نگهدارید. پس از این مدت ۱ میلی لیتر از محلول آلفا نفتیل بند ۷-۲-۶ را به هر یک از بالن های حجمی ۵۰ میلی لیتر اضافه کنید و مجدداً محلول ها را بخوبی هم بزنید. آنگاه ۳ دقیقه، محلول ها را در تاریکی و دمای اتاق نگهدارید. سپس محلول ها را با آب مقطر به حجم برسانید و هم بزنید.

در طول موج ۵۳۸ نانومتر، و در مقابل محلول بلانک جذب محلول ها را در طی ۱۵ دقیقه بخوانید (بهتر است در ۱۰ دقیقه خوانده شود). نمودار کالیبراسیون بر اساس جذب و غلظت را به ترتیب بر روی محورهای X و Y رسم نمائید.

۲.۴.۲. سنجش نیتريت:

۱.۲.۴.۲. بوسیله پی پت حجمی ۱۰ میلی لیتر و یا به وسیله ترازو ۱۰ تا ۲۰ گرم (بسته به نیتريت نمونه) از نمونه های خورد شده برداشت کنید و به بالن ۲۰۰ میلی لیتری منتقل کنید.

۲.۲.۴.۲. حدود ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر جوشیده به محلول اضافه کنید.

۳.۲.۴.۲. ۵ میلی لیتر محلول تترا برات بند ۷-۲-۱ را به محلول اضافه کنید.

۴.۲.۴.۲. بالن را به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سلسیوس قرار دهید.

۵.۲.۴.۲. به محلول ۲ میلی لیتر محلول پتاسیم هگزا سیانوفرات و ۲ میلی لیتر محلول استات روی اضافه کنید و خوب به هم بزنید.

۶.۲.۴.۲. محلول را سرد کرده و با آب مقطر به حجم برسانید.

۷.۲.۴.۲. محلول را با کاغذ صافی سلولزی صاف کنید.

۸.۲.۴.۲. آنگاه ۲۰ میلی لیتر از محلول صاف شده را به بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری منتقل کنید.

۹.۲.۴.۲. سپس ۳ میلی لیتر از محلول اسید کلریدریک و ۵ میلی لیتر از محلول سولفانیل امید بند ۷-۲-۵ را به بالن حجمی اضافه کرده و بخوبی محلول را هم بزنید.

۱۰.۲.۴.۲. آنگاه ۵ دقیقه، محلول را در تاریکی و دمای اتاق نگهدارید.

۱۱.۲.۴.۲. پس از این مدت ۱ میلی لیتر از محلول آلفا نفتیل بند ۷-۲-۶ به بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری اضافه کنید و مجدداً محلول را بخوبی هم بزنید.

۱۲.۲.۴.۲. آنگاه ۳ دقیقه، محلول را در تاریکی نگهدارید.

۱۳.۲.۴.۲. سپس محلول را به حجم برسانید و هم بزنید.

۱۴.۲.۴.۲. نهایتاً در طول موج ۵۳۸ نانومتر، جذب محلول را در طی ۱۵ دقیقه در مجاورت بلانک بخوانید (بهتر است در ۱۰ دقیقه خوانده شود).

۳.۴.۲. سنجش نیتريت کل:

۱.۳.۴.۲. بوسیله پی پت حجمی ۱۰ میلی لیتر از محلول صاف شده برداشت کرده و به ارلن مایر ۵۰ میلی لیتری درب سمباده ای منتقل کنید.

۲.۳.۴.۲. بوسیله پی پت حجمی ۵ میلی لیتر از محلول بافر آمونیایی به آن اضافه کنید.

۳.۳.۴.۲. گرم کادمیم احیا شده را به محلول اضافه کنید.

۴.۳.۴.۲. مگنت را در محلول قرار داده و پس از بستن در ارلن، به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از همزن مغناطیسی محلول را هم بزنید.

۵.۳.۴.۲. محلول را در یک بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری با کاغذ صافی سلولزی صاف کنید.

۶.۳.۴.۲. محلول را به حجم برسانید.

۷.۳.۴.۲. ۵ میلی لیتر (یا ۱۰ میلی لیتر، بسته به نیتريت کل نمونه) از محلول صاف شده فوق را بطور کمی با پیپت حجمی به بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری منتقل کنید.

۸.۳.۴.۲. سپس ۳ میلی لیتر از محلول اسید کلریدریک و ۵ میلی لیتر از محلول سولفانیل امید به بالن حجمی اضافه کرده و بخوبی محلول را هم بزنید.

۹.۳.۴.۲. آنگاه ۵ دقیقه، محلول را در تاریکی و دمای اتاق نگهدارید.

۱۰.۳.۴.۲. پس از این مدت ۱ میلی لیتر از محلول آلفا نفتیل بند ۷-۲-۶ به بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری اضافه کنید و مجدداً محلول را بخوبی هم بزنید.

۱۱.۳.۴.۲. آنگاه ۳ دقیقه، محلول را در تاریکی و دمای اتاق نگهدارید.

۱۲.۳.۴.۲. سپس محلول را با آب مقطر به حجم برسانید و هم بزنید.

۱۳.۳.۴.۲. نهایتاً در طول موج ۵۳۸ نانومتر، جذب محلول را در طی ۱۵ دقیقه در مجاورت محلول بلانک بخوانید (بهتر است در ۱۰ دقیقه خوانده شود).

۵.۲. محاسبات:

۱.۵.۲. مقدار نیتريت : غلظت نیتريت بر حسب قسمت در میلیون برابر با احتساب ۱۰ میلی لیتر یا ۱۰ گرم نمونه خرد شده به صورت زیر است

$$(Y) = (50 \div 10) \times (200 \div 10) \times \text{غلظت حاصل از منحنی استاندارد}$$

۲.۵.۲. مقدار نیتريت کل: با فرض ۱۰ گرم نمونه در بالن ژوژه ۲۰۰ میلی لیتر، حجم برداشتی از محلول صاف شده ۱۰ میلی لیتر برای مرحله احیا نیترات به نیتريت و حجم برداشتی ۵ میلی لیتر در مرحله تشکیل کمپلکس رنگی غلظت نیتريت کل (مجموع نیتريت اوليه و نیتريت حاصل از احیای نیترات به نیتريت) بر حسب قسمت در میلیون برابر با حاصل عبارت زیر است:

$$(Y) = 1/348 \times (50 \div 5) \times (50 \div 10) \times (200 \div 10) \times \text{غلظت حاصل از منحنی استاندارد} = (Y)$$

* توجه ضريب ۱/۳۴۸، نسبت بين جرمهای مولکولی يون نیترات (NO₃) به يون نیتريت (NO₃) محاسبه غلظت نیترات: مقدار نیترات از تفاضل مقدار نیتريت کل از نیتريت آزاد طبق رابطه زیر محاسبه می شود:

غلظت نیترات = غلظت اوليه نیتريت - غلظت نیتريت کل (پس از مرحله احیا نیترات به نیتريت)

کمپلکس رنگی تشکیل شده

