

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8474:2010

ISO 14637:2004

Xuất bản lần 1

**SỮA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG URE –
PHƯƠNG PHÁP ENZYM SỬ DỤNG CHÊNH LỆCH pH
(PHƯƠNG PHÁP CHUẨN)**

Milk – Determination of urea content –

Enzymatic method using difference in pH (Reference method)

HÀ NỘI – 2010

Lời nói đầu

TCVN 8474:2010 hoàn toàn tương đương với ISO 14637:2004/IDF 195:2004;

TCVN 8474:2010 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa – Xác định hàm lượng ure – Phương pháp enzym sử dụng chênh lệch pH (Phương pháp chuẩn)

*Milk – Determination of urea content –
Enzymatic method using difference in pH (Reference method)*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp enzym để xác định hàm lượng ure của sữa bằng cách đo sự chênh lệch độ pH.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Hàm lượng ure (urea content)

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

CHÚ THÍCH Hàm lượng ure được biểu thị bằng miligam trên lít.

3 Nguyên tắc

Ureaza được bổ sung vào mẫu thử để tách ure thành amoniac và cacbon dioxit. Ở pH 6,7, amoniac thủy phân ngay, do đó tách ra các ion hydroxyl, còn cacbon dioxit giải phóng các hạt proton và các hạt proton này trung hòa một phần các ion hydroxyl. Sự cân bằng giữa việc thủy phân amoniac và cacbon dioxit với sự trung hòa dẫn đến thay đổi pH. Giá trị pH biến đổi theo hàm lượng ure của mẫu và được đo bằng máy đo pH vi sai.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Thuốc thử để xác định ure

4.1.1 Dung dịch đệm, pH 6,7.

Hòa tan 1,777 g kali monohydrophosphat (K_2HPO_4), 1,388 g kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), 7,600 g kali clorua (KCl), 1,00 g natri azit (NaN_3), 0,010 g acetazolamide (5-acetamido-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide), 1,040 g magie clorua ngậm sáu phân tử nước ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 2 g Triton X100, 1 g Brij 35 và 20 ml LM1¹⁾ trong bình định mức 1 000 ml (5.5). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

Dung dịch đệm có thể bền trong 6 tháng nếu được bảo quản ở 4 °C.

4.1.2 Dung dịch ureaza

Hòa tan 360 mg ureaza đông khô (EC 3.5.1.5) trong 1 ml dung dịch glyxerol 50 % (phần thể tích). Hoạt độ của dung dịch ureaza thu được phải là 2 100 đơn vị/ml \pm 300 đơn vị/ml²⁾.

Dung dịch ureaza có thể bền trong 6 tháng nếu được bảo quản ở 4 °C.

4.1.3 Dung dịch chuẩn ure

Hòa tan 1,000 g ure khô (N_2H_4CO) (làm khô 1 ngày ở điều kiện chân không trong tủ sấy 90 °C \pm 1 °C), 7,45 g kali clorua (KCl) và 1,0 g natri azit (NaN_3) trong bình định mức 1 000 ml (5.5). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

Dung dịch chuẩn ure này có thể bền trong 6 tháng nếu được bảo quản ở 4 °C.

4.1.4 Sữa "Zero"

Thêm 20 μ l dung dịch ureaza (4.1.2) vào 1 ml sữa tươi. Trộn và ủ phần mẫu sữa đã chuẩn bị này trong 10 min để trong nồi cách thủy (5.3) ở 40 °C.

4.2 Thuốc thử để làm sạch và bảo trì các điện cực

4.2.1 Dung dịch làm sạch

Hòa tan 1,742 g dikali monohydrophosphat (K_2HPO_4), 1,361 g kali dihydrophosphat (KH_2PO_4), 7,455 g

¹⁾ Chất tẩy rửa này do Valetudo Srl, BG, Ý, cung cấp, đây là một ví dụ về sản phẩm thích hợp có sẵn trong thương mại. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và trong tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

²⁾ Đơn vị này (còn gọi là đơn vị quốc tế hoặc đơn vị chuẩn) được xác định là lượng enzym xúc tác sự chuyển đổi của một micromol cơ chất trong một phút dưới điều kiện chuẩn.

kali clorua (KCl), 1,00 g natri azit (NaN_3), 2 g Triton X100, 2 g Brij 35 và 3 g LM1¹⁾ trong bình định mức 1 000 ml (5.5). Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

Dung dịch làm sạch này có thể bền trong 1 năm nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

4.2.2 Dung dịch phục hồi

Sử dụng axit clohydric có nồng độ $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Dung dịch phục hồi này có thể bền trong 1 năm nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

4.2.3 Dung dịch phục hồi nhanh

Hòa tan 30 g axit nitric (HNO_3) có nồng độ khoảng 69 % phần khối lượng, 30 g axit clohydric (HCl) có nồng độ khoảng 37 % phần khối lượng, 30 g natri florua (NaF) và 1 g Triton X100 trong bình định mức 1 000 ml (5.5). Thêm nước đến vạch và trộn.

Dung dịch phục hồi nhanh này có thể bền trong 1 năm nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Cân phân tích, có khả năng cân chính xác đến 1 mg.

5.2 Micropipet (loại xyranh dịch chuyển), dung tích 15 μl và 20 μl .

5.3 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $38 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ và $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.4 Máy đo pH vi sai, thường hoạt động theo cơ chế nêu trong Phụ lục A.

Việc bố trí và các thành phần được sử dụng có thể khác nhau.

Máy đo pH vi sai gồm có máy bơm nhu động để tuần hoàn các chất lỏng, khoang trộn, hai điện cực thủy tinh mao dẫn chảy qua (EL1 và EL2) và một hệ thống đo bằng điện tử.

5.5 Bình định mức một vạch, dung tích 1 000 ml.

6 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

7 Chuẩn bị mẫu thử

Làm nóng mẫu thử trong nồi cách thủy (5.3) ở 38 °C, duy trì nhiệt độ trong khi trộn. Làm nguội đến 20 °C ngay trước khi chuẩn bị phần mẫu thử.

8 Cách tiến hành

8.1 Yêu cầu chung

Vì có sẵn các loại máy đo pH vi sai (5.4) khác nhau về thiết kế và xử lý, nên người thực hiện phải tuân thủ các chỉ dẫn của nhà sản xuất để cài đặt, hiệu chuẩn và vận hành máy. Bật máy và để cho các chế độ hoạt động của máy ổn định.

Nếu thời gian giữa hai phép đo liên tiếp bằng hoặc nhiều hơn 5 min, thì thay dung dịch đệm (4.1.1) mới trong khoang trộn của máy.

8.2 Phép thử trắng

Đổ đầy dung dịch đệm (4.1.1) vào các điện cực dòng chảy EL1 và EL2 của máy đo pH (5.4). Đo chênh lệch bù pH (D_1) giữa các điện cực. Chênh lệch giữa hai điện cực phải nằm trong giới hạn ± 150 mpH (mili pH).

Dùng micropipet (5.2) cho 15 μ l dung dịch ureaza (4.1.2) vào khoang trộn của máy và trộn. Chỉ cho hỗn hợp enzym/dung dịch đệm vào điện cực dòng chảy EL2, đo lại chênh lệch bù pH (D_2) giữa hai điện cực.

Tính sự chênh lệch độ pH cho mẫu trắng, ΔH_0 , bằng công thức sau đây:

$$\Delta H_0 = D_2 - D_1$$

trong đó:

ΔH_0 là chênh lệch pH giữa hai phép đo bù pH, D_1 và D_2 , đối với phép thử trắng;

D_1 là chênh lệch pH giữa các điện cực chứa đầy dung dịch đệm;

D_2 là chênh lệch pH giữa các điện cực khi một điện cực được đổ đầy dung dịch đệm và một được đổ đầy bằng hỗn hợp của enzym/dung dịch đệm.

Độ chênh lệch ΔH_0 giữa hai điện cực phải là ± 3 mpH, trong đó độ chênh lệch giữa hai phép đo liên tiếp phải $\leq 0,5$ mpH.

Nếu không thu được các kết quả như thế, thì kiểm tra dung dịch đệm và lặp lại quy trình nói trên. Trong trường hợp kết quả vẫn không đáp ứng được các yêu cầu, thì làm sạch các điện cực (xem 8.8) và bắt đầu lại quy trình của phép thử trắng nói trên.

8.3 Hiệu chuẩn

8.3.1 Cách tiến hành

Sử dụng micropipet (5.2) lấy 20 μl dung dịch chuẩn ure (4.1.3) cho vào khoang trộn của máy đo pH (5.4) để thu được tổng thể tích 1 000 μl (tỷ lệ của thể tích chuẩn ure với tổng thể tích yêu cầu là 1 : 50). Làm đầy cả hai điện cực dòng chảy EL1 và EL2 bằng hỗn hợp chất chuẩn đệm. Đo độ chênh lệch bù pH (D_3).

Dùng micropipet (5.2) lấy 15 μl dung dịch ureaza (4.1.2) cho vào khoang trộn của máy đo pH vi sai. Làm đầy điện cực dòng chảy EL2 bằng hỗn hợp chất chuẩn đệm. Sau khi kết thúc phản ứng enzym, đo chênh lệch bù pH (D_4).

8.3.2 Tính chênh lệch pH

Tính độ chênh lệch pH đối với dung dịch hiệu chuẩn, ΔH_c , bằng công thức sau đây:

$$\Delta H_c = (D_4 - D_3) - \Delta H_0$$

trong đó:

ΔH_c là chênh lệch pH giữa hai phép đo chênh lệch bù pH D_3 và D_4 (8.3.1) đối với việc hiệu chuẩn trừ đi phần chênh lệch thu được đối với phép thử trắng (8.2);

D_3 là chênh lệch pH giữa các điện cực khi cả hai được đổ đầy hỗn hợp đệm chuẩn (8.3.1);

D_4 là chênh lệch pH giữa các điện cực khi một điện cực được đổ đầy dung dịch đệm và điện cực còn lại được đổ đầy hỗn hợp enzym/dung dịch đệm (8.3.1).

8.3.3 Tính độ dốc

Tính độ dốc, s , của đường hiệu chuẩn bằng công thức sau đây:

$$s = \frac{\rho_U}{\Delta H_c}$$

trong đó: ρ_U là nồng độ của dung dịch chuẩn ure, tính bằng miligam trên lít (mg/l) (4.1.3).

8.4 Kiểm tra việc hiệu chuẩn

Kiểm tra việc hiệu chuẩn bằng cách lặp lại phép thử trắng (8.2) và sau đó phân tích 20 μl dung dịch chuẩn ure (4.1.3) theo quy trình trong 8.5. Các kết quả thu được phải trong giới hạn ± 15 mg/l đối với phép thử trắng và từ 970 mg/l đến 1 030 mg/l đối với dung dịch ure chuẩn. Nếu không thu được các kết quả như vậy thì lặp lại việc hiệu chuẩn.

TCVN 8474:2010

8.5 Xác định

Vận hành thiết bị và đưa phần mẫu thử vào phân tích theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Dùng micropipet (5.2) lấy 20 μ l phần mẫu thử cho vào khoang trộn của máy đo pH (5.4) để thu được tổng thể tích 1 000 μ l (tỷ lệ của thể tích phần mẫu thử với tổng thể tích yêu cầu là 1 : 50).

CHÚ THÍCH Trong quá trình phân tích, thực hiện quy trình sau đây cho máy. Trộn 20 μ l phần mẫu thử với dung dịch đệm (4.1.1). Đổ đầy hỗn hợp phần mẫu với dung dịch đệm vào cả hai điện cực đóng chày EL1 và EL2 và đo chênh lệch độ pH (D_s) giữa các điện cực. Sau đó, bổ sung một lượng dung dịch ureaza (4.2) thích hợp vào hỗn hợp còn lại trong khoang trộn và một lượng hỗn hợp tạo thành được đưa vào điện cực đóng chày EL2. Theo dõi chênh lệch độ pH mới (D_e) sau khi kết thúc phản ứng enzym.

8.6 Kiểm tra độ ổn định

Sau khi phân tích 30 mẫu thử và khi kết thúc dãy phân tích, tiến hành phân tích hai dung dịch trắng để kiểm tra điểm zero và 20 μ l dung dịch chuẩn ure (4.1.3) bằng quy trình xác định (8.5) để kiểm tra việc hiệu chuẩn.

Giá trị zero thứ hai phải nằm trong giới hạn ± 15 mg/l và giá trị chuẩn trong giới hạn từ 970 mg/l đến 1 030 mg/l. Nếu giá trị thu được nằm ngoài phạm vi này, thì lập lại phép thử trắng bù (8.2) và quy trình hiệu chuẩn (8.3).

8.7 Kiểm tra sự nhiễm bẩn các điện cực

Kiểm tra sự nhiễm bẩn các điện cực ít nhất là hàng tháng bằng cách phân tích một mẫu sữa zero (4.1.4) bằng quy trình xác định (8.5). Kết quả phải ≤ 30 mg/l. Nếu giá trị thu được nằm ngoài phạm vi này, thì thực hiện quy trình phục hồi nhanh (xem 9.2) và lập lại quy trình hiệu chuẩn (8.3).

8.8 Quy trình làm sạch

Rửa sạch các điện cực và khoang trộn của máy đo pH (5.4) bằng dung dịch làm sạch (4.2.1), thay cho dung dịch đệm (xem Hình A.1). Nếu máy đang hoạt động, thì để các điện cực tiếp xúc với các dung dịch làm sạch cho đến lần sử dụng sau đó, cứ sau 120 min lại thay mới dung dịch làm sạch. Khi máy không hoạt động, thì xử lý các điện cực theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

9 Bảo dưỡng điện cực

9.1 Phục hồi

Ít nhất hàng tuần, rửa các điện cực và khoang trộn của máy đo pH (5.4) bằng dung dịch phục hồi (4.2.2), thay dung dịch đệm (xem Hình A.1), sau đó thực hiện quy trình làm sạch (8.8).

9.2 Phục hồi nhanh

Ít nhất hai tháng một lần hoặc sớm hơn, nếu cần (xem 8.4), rửa các điện cực và khoang trộn của máy đo pH (5.4) bằng dung dịch phục hồi nhanh (4.2.3), thay dung dịch đệm (xem Hình A.1).

CHÚ THÍCH Hiệu quả của việc xử lý có thể được cải thiện bằng cách sục không khí vào dung dịch phục hồi nhanh.

Sau khi phục hồi, rửa sạch máy đo pH bằng nước (xem Hình A.1), sau đó thực hiện quy trình làm sạch (8.8).

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Tính toán

Tính hàm lượng ure của mẫu thử, w , bằng miligam trên lít, theo công thức sau đây:

$$w = s [(D_6 - D_5) - \Delta H_0]$$

trong đó:

s là độ dốc của đường hiệu chuẩn (8.3.3);

ΔH_0 là chênh lệch pH giữa kết quả của hai phép đo chênh lệch bù pH đối với phép thử trắng (8.2);

D_5 là chênh lệch pH giữa hai điện cực khi cả hai điện cực được đổ đầy hỗn hợp dung dịch đệm/phần mẫu thử (8.5);

D_6 là chênh lệch pH giữa hai điện cực khi một điện cực được đổ đầy hỗn hợp dung dịch đệm/phần mẫu thử và điện cực còn lại được đổ đầy hỗn hợp enzym/đệm/phần mẫu thử (8.5).

10.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến một chữ số thập phân.

CHÚ THÍCH Việc chuyển đổi các kết quả về millimol trên lít có thể áp dụng bằng cách nhân hệ số 0,01 665 với các kết quả được biểu thị bằng miligam trên lít, hoặc bằng cách tính độ dốc với nồng độ của dung dịch chuẩn ure tính bằng millimol trên lít ($\text{mg/l} \times 0,01\ 665$).

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của hai phép thử liên phòng thử nghiệm liên tiếp về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục B.

TCVN 8474:2010

Các giá trị về giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập được biểu thị ở mức xác suất 95 % và có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với dải nồng độ và chất nền đã nêu.

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau trong một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 15 mg/l.

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các nhà phân tích khác nhau sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn 50 mg/l.

12 Báo cáo thử nghiệm

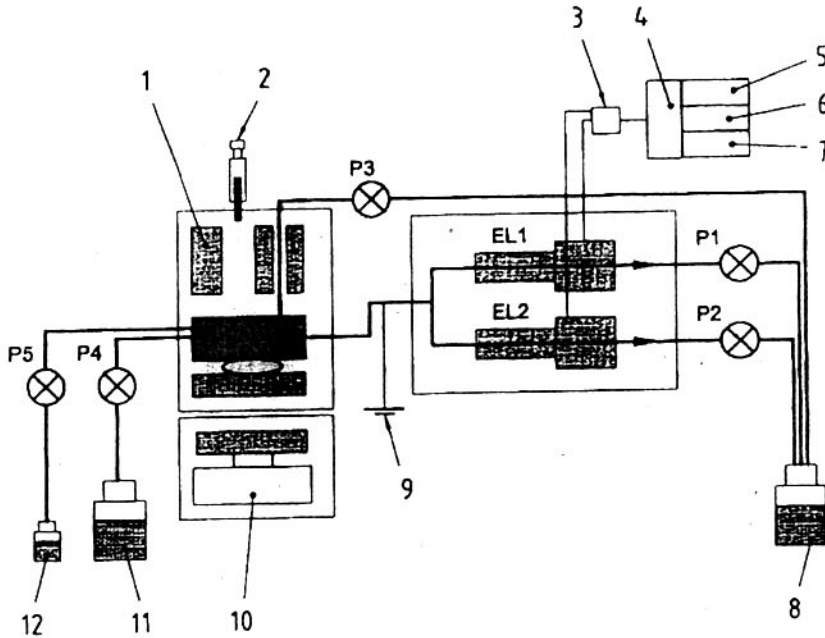
Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thu được hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại, nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Máy đo pH vi sai



CHÚ DẪN

- | | |
|------------------------------|--------------------|
| 1 khoang trộn | 7 bàn phím |
| 2 micropipet dùng để bơm mẫu | 8 đầu thái |
| 3 bộ khuếch đại vi sai | 9 nền |
| 4 bảng điện tử | 10 khuấy từ |
| 5 máy in | 11 dung dịch đệm |
| 6 hiển thị | 12 dung dịch enzym |

EL1 và EL2 là các điện cực mao dẫn thủy tinh

P1 đến P5 là các bơm nhu động

Hình A.1 – Ví dụ về máy đo pH vi sai

Phụ lục B

(Tham khảo)

Phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử liên phòng thử nghiệm gồm 18 phòng thử nghiệm tham gia thực hiện trên 10 mẫu thử nghiệm lặp lại hai lần. Các kết quả được đưa ra trong Tài liệu tham khảo [4].

Các kết quả thử nghiệm đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) để đưa ra các dữ liệu về độ chụm như trong Bảng B.1 và Bảng B.2.

Bảng B.1 – Phép thử liên phòng thử nghiệm thứ nhất

Giá trị tính bằng milligam trên lít

Mẫu	Trung bình	s_L	s_r	s_R	CV(r) %	CV(R) %	r	R
1	217,0	11,9	4,2	12,7	1,95	5,84	11,9	35,7
2	253,2	13,8	4,8	14,6	1,91	5,78	13,8	41,3
3	291,1	15,8	2,9	16,0	0,99	5,48	8,3	45,2
4	329,4	15,3	4,3	16,0	1,31	4,85	12,2	45,1
5	368,7	17,5	3,7	17,9	1,01	4,86	10,5	50,8
6	410,7	11,4	7,2	13,6	1,76	3,31	20,5	38,4
7	446,9	17,7	3,7	18,1	0,83	4,06	10,5	51,3
8	486,8	16,1	6,5	17,3	1,33	3,55	18,2	48,9
9	526,9	20,0	3,4	20,3	0,65	3,85	9,6	57,5
10	563,0	20,1	9,1	22,0	1,61	3,92	25,6	62,4
Trung bình tổng					1,40	4,64		

s_L : độ lệch chuẩn giữa các phòng thử nghiệm

s_r : độ lệch chuẩn lặp lại

s_R : độ lệch chuẩn tái lập

r : giới hạn lặp lại

R : giới hạn tái lập

CV(r): hệ số biến thiên lặp lại

CV(R) hệ số biến thiên tái lập

Phép thử cộng tác liên phòng thử nghiệm thứ hai gồm 23 phòng thử nghiệm tham gia thực hiện trên 10 mẫu thử lặp lại hai lần.

Bảng B.2 – Phép thử liên phòng thử nghiệm thứ hai

Giá trị tính bằng milligam trên lít

Mẫu	Trung bình	s_L	s_r	s_R	CV(r) %	CV(R) %	r	R
1	167,9	12,3	4,1	13,0	2,45	7,73	11,6	36,7
2	187,7	10,1	2,5	10,4	1,32	5,54	7,0	29,5
3	235,0	13,7	4,3	14,3	1,84	6,09	12,2	40,5
4	266,4	13,3	3,5	13,7	1,31	5,14	9,8	38,8
5	307,0	13,1	5,0	14,0	1,64	4,56	1,4	39,7
6	344,2	13,3	3,5	13,8	1,02	4,01	10,0	39,0
7	380,8	13,1	5,2	14,1	1,35	3,71	14,6	39,9
8	415,4	13,5	4,0	14,0	0,97	3,37	11,3	39,8
9	450,2	13,9	3,4	14,2	0,75	3,16	9,6	40,4
10	487,2	15,0	3,6	15,5	0,74	3,17	10,3	43,7
Trung bình tổng					1,43	4,86		

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Lấy mẫu.*
 - [2] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
 - [3] TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994), *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.*
 - [4] LUZZANA M. and GIARDINO R. Urea determination in milk by a differential pH technique. *Le Lait*, **79**, 1999, pp. 261-267.
-