

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10034:2013

ISO 1871:2009

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –
HƯỚNG DẪN CHUNG VỀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ
BẰNG PHƯƠNG PHÁP KJELDAHL**

*Food and feed products – General guidelines for the determination
of nitrogen by the Kjeldahl method*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 10034:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 1871:2009;

TCVN 10034:2013 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Đối với các sản phẩm thực phẩm và thức ăn chăn nuôi có nguồn gốc động vật hoặc thực vật, để xác định hàm lượng nitơ thường sử dụng phương pháp Kjeldahl.

Về nguyên tắc, phương pháp Kjeldahl có thể chuẩn hóa được, vì phương pháp này thường chấp nhận các thiết bị khác nhau hoặc các phương pháp tương tự nếu cho các kết quả tương đương.

Mục đích của tiêu chuẩn này là mô tả các bước khác nhau của phương pháp, các điểm tới hạn kèm theo và các mục tiêu tối thiểu đạt được nhằm đảm bảo phương pháp được áp dụng chính xác.

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung và tiêu chuẩn này không được dùng để thay thế các tiêu chuẩn hiện hành đang được sử dụng.

Thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chung về xác định hàm lượng nitơ bằng phương pháp Kjeldahl

Food and feed products – General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method

CẢNH BÁO – Việc áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn sức khỏe thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung để xác định hàm lượng nitơ bằng phương pháp Kjeldahl. Tiêu chuẩn này áp dụng cho thực phẩm và thức ăn chăn nuôi có chứa các hợp chất nitơ có thể xác định trực tiếp bằng phương pháp Kjeldahl.

CHÚ THÍCH Nguyên tắc đo của phương pháp này là không tính đến nitơ từ nitrat và nitrit.

2 Nguyên tắc

Phân hủy phần mẫu thử bằng axit sulfuric đậm đặc với sự có mặt của chất xúc tác để chuyển hóa các nitơ hữu cơ thành amoni sulfat. Natri hydroxit dư được thêm vào dịch phân hủy đã nguội để giải phóng amoniac. Amoniac giải phóng được chưng cất vào dung dịch axit boric dư, sau đó được chuẩn độ bằng dung dịch axit sulfuric hoặc axit clohydric chuẩn. Hàm lượng nitơ được tính từ lượng ammoniac tạo thành.

CHÚ THÍCH Trong các phần tiếp theo, thuật ngữ "nitơ" dùng để chỉ nitơ hữu cơ.

3 Thuốc thử

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

TCVN 10034:2013

3.1 Axit sulfuric, không chứa các hợp chất nitơ và có khối lượng riêng từ $\rho_{20} = 1,83$ g/ml đến $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.

3.2 Chất xúc tác (xem 5.2.1).

3.3 Dung dịch axit boric, (nồng độ từ 10 g/l đến 40 g/l tùy thuộc vào thiết bị sử dụng). Nếu sử dụng phép đo điểm kết thúc chuẩn độ bằng so màu, thì dung dịch axit boric phải chứa chất chỉ thị (chỉnh pH hoặc màu của hỗn hợp dung dịch này trước khi sử dụng).

3.4 Dung dịch axit clohydric chuẩn (nồng độ từ 0,02 mol/l đến 0,50 mol/l) hoặc **dung dịch axit sulfuric chuẩn** (nồng độ từ 0,01 mol/l đến 0,25 mol/l). Độ chuẩn của dung dịch, c_t , phải biết đến ít nhất khoảng 0,001 mol/l.

3.5 Chất chỉ thị, đổi màu trong khoảng pH 4 đến pH 5.

CHÚ THÍCH Các chất chỉ thị khác nhau có bán sẵn. Hỗn hợp chỉ thị màu đỏ metyl và xanh bromocresol được sử dụng rộng rãi nhất. Dung dịch axit boric chứa hỗn hợp chỉ thị màu có bán sẵn.

3.6 Hydro peroxit (H_2O_2), tối thiểu 30 % khối lượng.

3.7 Dung dịch natri hydroxit, tối thiểu 30 % khối lượng.

3.8 Chất chống tạo bọt

Ví dụ Silicon, parafin dạng lỏng.

3.9 Amoni sulfat hoặc amoni clorua (độ tinh khiết tối thiểu 99,9 %).

Ngay trước khi sử dụng, sấy amoni sulfat hoặc amoni clorua ở $104\text{ }^\circ\text{C} \pm 4\text{ }^\circ\text{C}$ trong ít nhất 2 h, rồi để nguội ở nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng dung dịch đã biết nồng độ.

3.10 Tryptophan hoặc axetanilit hoặc lysin hydroclorua (độ tinh khiết tối thiểu 99 % khối lượng).

Các loại thuốc thử này cần phải giữ cách xa nguồn ẩm.

CẢNH BÁO – Không sấy các loại thuốc thử này trong tủ sấy trước khi sử dụng.

3.11 Sucrose, có hàm lượng nitơ nhỏ hơn 0,002 % khối lượng.

CẢNH BÁO – Không sấy sucrose trong tủ sấy trước khi sử dụng.

4 Thiết bị, dụng cụ và vật liệu thử

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

4.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,001 g.

4.2 Hệ thống phân hủy, chưng cất hơi nước và chuẩn độ

Các hệ thống này được sử dụng để thực hiện các thao tác quy định trong Điều 5 và để đảm bảo rằng các mục tiêu thực hiện quy định trong 5.5.3 và 5.5.4 được thỏa mãn.

4.3 Chất điều chỉnh điểm sôi (nếu cần), ví dụ viên đá bọt, hạt thủy tinh, nhôm oxit (corundum) hoặc silic cacbua.

4.4 Giấy cân hoặc vật liệu cân, không chứa các hợp chất nitơ, thích hợp cho phần mẫu thử và dạng sản phẩm.

5 Cách tiến hành

CHÚ THÍCH Tùy thuộc vào bản chất của mẫu mà có thể chuẩn bị trước phần mẫu thử để thu được mẫu đồng nhất (nghiền, đồng hóa, v.v...).

5.1 Phần mẫu thử

Phần mẫu thử được lấy phụ thuộc vào hàm lượng nitơ dự kiến có mặt trong mẫu, phải đại diện cho mẫu và chứa khoảng từ 0,005 g đến 0,2 g nitơ.

Dùng cân phân tích (4.1) để cân khối lượng phần mẫu thử, m , tính bằng gam hoặc dùng pipet để lấy một thể tích phần mẫu thử, V_t , tính bằng mililit.

Phần mẫu thử có thể được cho trực tiếp vào trong ống hoặc cho qua giấy cân (4.4).

Khối lượng phần mẫu thử có thể được điều chỉnh phụ thuộc vào thành phần của sản phẩm dùng trong phép thử và lượng axit sulfuric (xem 5.2.2).

5.2 Phân hủy

5.2.1 Chất xúc tác

Cần phân biệt các hợp chất được sử dụng để nâng điểm sôi của chất lỏng trong suốt quá trình phân hủy với các chất xúc tác tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phân hủy. Trước đây thường sử dụng kali sulfat hoặc natri sulfat. Các chất xúc tác này thêm vào với một lượng vừa đủ để làm tăng điểm sôi của axit từ 380 °C đến 430 °C. Chất xúc tác được sử dụng phổ biến nhất là đồng dạng tinh thể của đồng sulfat được sử dụng riêng hoặc ở dạng hỗn hợp với titan oxit.

TCVN 10034:2013

Cho vào mỗi ống từ 3 ml đến 5 ml hydro peroxit (3.6) trước khi làm nóng để tăng tốc độ phân hủy nhưng cần sử dụng hydro peroxit cẩn thận để đảm bảo không làm thất thoát nitơ ở dạng bay hơi. Ngoài ra, cần hết sức chú ý khi cho hydro peroxit vào ống, vì xảy ra phản ứng tỏa nhiệt mạnh.

Lượng kali sulfat từ chất xúc tác không được ít hơn 7 g.

Có thể sử dụng các tổ hợp khác nhau. Các tổ hợp này phải đáp ứng được các yêu cầu của phép thử mẫu trắng (5.5.2) và các phép thử kiểm soát (5.5.3 và 5.5.4).

Người thực hiện cần cẩn thận khi sử dụng các chất xúc tác chứa selen và điều kiện khi thải bỏ.

CHÚ THÍCH Các chất xúc tác hỗn hợp có bán sẵn trên thị trường (ví dụ dạng viên hoặc dạng hạt).

5.2.2 Bỏ sung axit

Điều quan trọng là sử dụng một lượng vừa đủ axit sulfuric để đảm bảo cho quá trình phân hủy do:

- Sự tiêu tốn axit bởi các chất hữu cơ có trong mẫu, thực tế thì 1 g chất béo tiêu tốn 10 ml axit sulfuric, 1 g protein tiêu tốn 5 ml axit sulfuric, 1 g cacbohydrat tiêu tốn 4 ml axit sulfuric;
- Sự tiêu tốn axit bởi các thuốc thử (các muối);
- Hao hụt axit do bay hơi.

Thêm từ 20 ml đến 25 ml axit (3.1) là vừa đủ để phân hủy tốt và để duy trì lượng axit dư ở cuối phản ứng.

5.2.3 Làm nóng

CẢNH BÁO – Các thao tác dưới đây phải được thực hiện trong tủ hút thông gió tốt.

Cần tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất liên quan đến việc sử dụng thiết bị. Hệ thống phân hủy phải đồng đều, ví dụ bằng cách tạo ra một sơ đồ quy trình phân hủy hoặc quy trình nhiệt hiệu quả (5.5.3).

Đối với các mẫu có chứa các chất sinh ra bọt cần đưa đến điểm sôi bằng cách tăng nhiệt độ từ từ hoặc tăng nhiệt độ theo từng giai đoạn. Có thể sử dụng từ ba đến bốn giọt chất chống tạo bọt (3.8) cho mỗi ống.

Đối với các sản phẩm "khô" (nghĩa là không thấy ướt), thì các ống có thể được đặt trực tiếp vào bộ phận gia nhiệt sơ bộ.

Khói axit phải được loại bỏ bằng hệ thống chiết thích hợp đối với thiết bị sử dụng. Việc chiết quá mức có thể gây ra kết tinh và hao hụt nitơ (xem Phụ lục A).

Trong mọi trường hợp, nhiệt độ và thời gian phân hủy cần được xác định để đáp ứng các yêu cầu của phép thử kiểm soát quá trình phân hủy (5.5.3).

CHÚ THÍCH 1 Đun nóng ở 420 °C trong 2 h là thích hợp đối với nhiều loại nền mẫu.

Dịch phân hủy phải trong và không có các hạt màu đen.

Tại cuối quá trình phân hủy, làm nguội các ống ở cách xa mọi nguồn có khả năng nhiễm bẩn. Ở giai đoạn này, các phần mẫu thử có thể được bảo quản và để chưng cất về sau.

CHÚ THÍCH 2 Bước pha loãng bằng nước được quy định trong 5.3.1 có thể được thực hiện ở giai đoạn này để tránh kết tinh.

5.3 Chưng cất amoniac

5.3.1 Kiểm hóa

Pha loãng dịch phân hủy bằng nước rồi kiểm hóa bằng cách thêm ít nhất 3,5 ml dung dịch natri hydroxit (3.7) cho mỗi mililit axit sulfuric (3.1) đã sử dụng cho quá trình phân hủy.

CHÚ THÍCH Thể tích dung dịch natri hydroxit (3.7) thêm vào có thể thấp hơn, nếu nồng độ khối lượng dung dịch natri hydroxit cao hơn 30 %.

CẢNH BÁO – Phải cẩn thận khi bỏ sung dung dịch, vì môi trường rất nóng.

5.3.2 Chưng cất

Thực hiện quá trình chưng cất sử dụng thiết bị ở điều kiện hoạt động bình thường. Thu lấy dịch chưng cất vào dung dịch axit boric (3.3) có chứa chất chỉ thị (3.5). Chỉnh pH cho đến khi dung dịch chuyển sang màu xám (chất chỉ thị xanh bromocresol + đỏ metyl) trước khi bắt đầu chưng cất.

Có nhiều tiêu chí để xác định điểm kết thúc quá trình chưng cất, ví dụ khi thu được một thể tích xác định dịch chưng cất sau một thời gian chưng cất nhất định v.v... Đảm bảo sự phù hợp với các phép thử kiểm soát (5.5), quá trình chưng cất amoniac xảy ra hoàn toàn và không có dung dịch kiềm bị lôi cuốn theo.

5.4 Chuẩn độ

Dịch chưng cất thu được được chuẩn độ bằng axit sulfuric (3.1) hoặc axit clohydric (3.4); có thể chuẩn độ đồng thời hoặc sau khi chưng cất. Chuẩn độ sau chưng cất cần thực hiện càng sớm càng tốt ngay sau khi chưng cất.

Có hai phương pháp để nhận biết điểm kết thúc chuẩn độ:

- Bằng phép so màu bằng mắt thường hoặc sử dụng hệ thống đo quang: Điểm kết thúc đạt được khi chất chỉ thị đổi màu. Trong trường hợp nhìn mắt thường thì điều quan trọng để chuẩn độ từng mẫu thử dựa vào các điều kiện thu được trong phép thử mẫu trắng.
- Bằng phép phân tích điện thế sử dụng hệ thống đo pH: Tùy thuộc vào thiết bị và các phương pháp thực hiện mà điểm kết thúc có thể là một giá trị pH cố định (thường pH 4,6 tương ứng với điểm uốn của đường chuẩn độ), giá trị pH thu được trong phép thử mẫu trắng hoặc pH ban đầu của dung dịch axit boric.

TCVN 10034:2013

Trong cả hai trường hợp trên, tính phù hợp của các thao tác chuẩn độ cần được kiểm tra theo quy định trong 5.5.4.

Ghi lại thể tích chất chuẩn độ thu được: V_0 đối với phép thử mẫu trắng và V_1 đối với mẫu thử.

5.5 Phép thử kiểm soát

5.5.1 Yêu cầu chung

Đối với mỗi dãy phép xác định nitơ cần có một phép thử mẫu trắng, ít nhất một phép thử kiểm soát quá trình chưng cất và một phép thử kiểm soát quá trình phân hủy.

5.5.2 Phép thử mẫu trắng

Thực hiện phép thử mẫu trắng sử dụng cùng phương pháp quy định ở trên, thay phần dung dịch mẫu thử bằng cùng một thể tích nước và bổ sung một lượng sucrose (3.11) thích hợp.

CHÚ THÍCH Trong phép thử mẫu trắng và phép thử kiểm soát quá trình phân hủy, thì sucrose được sử dụng như chất hữu cơ tiêu tốn một lượng axit sulfuric tương đương với lượng axit sulfuric dùng cho phần mẫu thử trong quá trình phân hủy.

5.5.3 Phép thử phân hủy

Thực hiện phép thử kiểm soát quá trình phân hủy sử dụng cùng phương pháp quy định ở trên, thay phần mẫu thử bằng cùng một lượng tryptophan hoặc axetanilit hoặc lysin hydrochlorua (3.10) có cùng lượng nitơ trong các mẫu thử và bổ sung một lượng sucrose (3.11) thích hợp.

Tính phần trăm khối lượng của nitơ thu hồi được, cần nằm trong khoảng từ 98 % đến 101 %.

5.5.4 Phép thử chưng cất-chuẩn độ

Thực hiện phép thử chưng cất-chuẩn độ mẫu trắng sử dụng cùng phương pháp quy định trong 5.3, nhưng không có phần mẫu thử. Thể tích thu được sẽ được trừ đi từ thể tích dung dịch trong phép thử chưng cất-chuẩn độ.

Thực hiện phép thử kiểm soát quá trình chưng cất-chuẩn độ trong các điều kiện tương tự trên một phần mẫu thử của muối amoni (3.9) tương ứng với lượng nitơ có trong mẫu thử.

Tính phần trăm khối lượng của nitơ thu hồi được, cần nằm trong khoảng từ 99 % đến 101 %.

6 Biểu thị kết quả

Hàm lượng nitơ được biểu thị bằng phần trăm khối lượng hoặc tính bằng gam trên 100 ml, theo công thức:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c_1 \times 14 \times 100}{m \times 1000}$$

hoặc

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c_1 \times 14 \times 100}{V_1 \times 1000}$$

Trong đó:

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

c_1 là độ chuẩn của axit clohydric hoặc axit sulfuric, tính bằng mol trên lít (mol/l);

V_0 là thể tích của axit clohydric hoặc axit sulfuric đã dùng trong phép chuẩn độ mẫu trắng, tính bằng mililit (ml);

V_1 là thể tích của axit clohydric hoặc axit sulfuric đã dùng trong phép chuẩn độ phần mẫu thử, tính bằng mililit (ml);

V_1 là thể tích phần mẫu thử, tính bằng mililit (ml).

Phụ lục A
(Tham khảo)

Các nguồn có khả năng gây sai số

Các lỗi đã được ghi lại	Nguyên nhân	Các giải pháp được dự kiến
1. Trong suốt quá trình phân hủy		
Quá nhiều bọt khí hoặc bọt	Tăng nhiệt độ quá nhanh Các mẫu thử chứa chất béo hoặc chứa đường Thể tích dung dịch mẫu thử quá lớn	Giảm tốc độ đun nóng hoặc điều chỉnh các giai đoạn Sử dụng chất chống tạo bọt Sử dụng phân mẫu thử nhỏ hơn
Các hạt màu đen trong dịch phân hủy	Thời gian chưng cất/nhiệt độ chưng cất không thích hợp	Tối ưu hóa các điều kiện: kiểm tra lại quá trình phân hủy (5.5.3) Kiểm tra các tỷ lệ mẫu/axit/chất xúc tác
Kết tinh dạng hạt	Hao hụt axit do hệ thống chiết bay hơi quá mạnh	Giảm tốc độ chiết: tốc độ chiết có thể giảm càng nhanh càng tốt ngay khi hết khói trắng Kiểm tra các tỷ lệ mẫu/axit/chất xúc tác
2. Trong quá trình chưng cất và xác định hàm lượng nitơ		
Kết quả phép thử chưng cất-chuẩn độ quá thấp	Hao hụt amoniac Lượng axit boric không đủ Lỗi cuốn amoniac chưa hết Phép đo độ chuẩn axit không chính xác Kết quả phép thử chưng cất-chuẩn độ mẫu trắng quá cao	Kiểm tra độ kín của thiết bị (các mối hàn kín và các dụng cụ thủy tinh) Giảm nồng độ hoặc thể tích của dung dịch axit boric Giảm thời gian chưng cất Chuẩn độ axit Tiến hành phép thử mẫu trắng mới

<p>Kết quả phép thử chung cát-chuẩn độ quá cao</p>	<p>Phép đo độ chuẩn axit không chính xác</p> <p>Nhiễm bẩn do bay hơi amoniac</p> <p>Lỗi cuốn natri hydroxit trong dịch chung cát</p>	<p>Chuẩn độ axit</p> <p>Tránh xử lý amoniac trong vùng lân cận nơi thực hiện phép thử</p> <p>Giảm thể tích nước thêm vào trước khi chung cát</p>
<p>Kết quả phép thử phân hủy quá thấp</p>	<p>Thời gian/nhiệt độ phân hủy không thích hợp</p>	<p>Tối ưu các điều kiện: kiểm tra phép thử phân hủy (5.5.3)</p> <p>Kiểm tra các tỷ lệ mẫu/axit/chất xúc tác</p>

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4328-1:2007 (ISO 5983-1:2005) *Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô – Phần 1: Phương pháp Kjeldahl.*
 - [2] TCVN 8099-1:2009 (ISO 8968-1:2001) *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 1: Phương pháp Kjeldahl.*
 - [3] TCVN 8125:2009 (ISO 20483:2006) *Ngũ cốc và đậu đỗ – Xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô – Phương pháp Kjeldahl.*
-