

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8099-1 : 2009

ISO 8968-1 : 2001

Xuất bản lần 1

**SỮA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ –
PHẦN 1: PHƯƠNG PHÁP KJELDAHL**

Milk – Determination of nitrogen content

Part 1: Kjeldahl method

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8099-1 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 8968-1 : 2001;

TCVN 8099-1 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8099 (ISO 8968) Sữa – Xác định hàm lượng nitơ, gồm các phần sau đây :

- TCVN 8099-1 : 2009 (ISO 8968-1 : 2001), Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 1: Phương pháp Kjeldahl;
- TCVN 8099-2 : 2009 (ISO 8968-2 : 2001), Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 2: Phương pháp phân huỷ kín (Phương pháp Macro);
- TCVN 8099-3 : 2009 (ISO 8968-3 : 2004), Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 3: Phương pháp phân huỷ kín (Phương pháp thông dụng nhanh Semi-macro);
- TCVN 8099-4 : 2009 (ISO 8968-3 : 2001), Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 4: Phương pháp xác định hàm lượng nitơ phi protein;
- TCVN 8099-5 : 2009 (ISO 8968-3 : 2001), Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 5: Phương pháp xác định hàm lượng nitơ protein.

Sữa – Xác định hàm lượng nitơ –

Phần 1: Phương pháp Kjeldahl

Milk – Determination of nitrogen content – Part 1: 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 hết 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 thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng nitơ trong sữa nguyên chất hoặc sữa gầy dạng lỏng theo nguyên tắc Kjeldahl.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau 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, bổ sung (nếu có).

TCVN 7149-1 (ISO 385-1), Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh - Buret - Phần 1: Yêu cầu chung.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hàm lượng nitơ (nitrogen content)

Phần khối lượng của nitơ xác định được bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng nitơ được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

4 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được phân hủy bằng hỗn hợp của axit sulfuric đậm đặc và kali sulfat, đồng (II) sulfat được dùng làm chất xúc tác để chuyển nitơ hữu cơ có mặt về amoni sulfat. Kali sulfat là để tăng điểm sôi của axit sulfuric và tạo hỗn hợp oxi hoá mạnh hơn cho việc phân huỷ. Bổ sung một lượng dư natri hydroxit vào dịch phân huỷ đã nguội để giải phóng amoniac. Amoniac giải phóng được chưng cất trong dung dịch axit boric dư và sau đó dung dịch này được chuẩn độ bằng axit clohydric. Hàm lượng nitơ tính được từ lượng amoniac tạo thành.

5 Thuốc thử và vật liệu

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

5.1 Kali sulfat (K_2SO_4), không chứa nitơ.

5.2 Dung dịch đồng (II) sulfat, $c(CuSO_4) = 5,0 \text{ g}/100 \text{ ml}$.

Hoà tan 5,0 g đồng (II) sulfat ngậm năm phân tử nước ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) trong nước đựng trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml. Pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

5.3 Axit sulfuric (H_2SO_4), ít nhất là 95 % đến 98 % phần khối lượng, không chứa nitơ ($\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$).

5.4 Dung dịch natri hydroxit (NaOH), không chứa nitơ, chứa 50 g natri hydroxit trên 100 g dung dịch.

5.5 Dung dịch chất chỉ thị

Hoà tan 0,1 g đỏ methyl trong etanol 95 % (thể tích). Pha loãng đến 50 ml bằng etanol. Hoà tan 0,5 g xanh bromocresol trong etanol 95 % (thể tích). Pha loãng đến 250 ml bằng etanol. Trộn một phần dung dịch đỏ methyl với năm phần dung dịch xanh bromocresol hoặc gộp và trộn tất cả các phần của cả hai dung dịch.

5.6 Dung dịch axit boric, $c(H_3BO_3) = 40,0 \text{ g/l}$.

Hoà tan 40,0 g axit boric trong 1 l nước nóng đựng trong bình định mức một vạch dung tích 1000 ml. Để bình đựng dung dịch này nguội đến 20 °C. Pha loãng bằng nước đến vạch, thêm 3 ml dung dịch chất chỉ thị (5.5) và trộn. Bảo quản dung dịch trong chai thủy tinh borosilicat, dung dịch này sẽ có màu cam nhạt. Trong quá trình bảo quản dung dịch cần tránh ánh sáng và các nguồn hơi amoniac.

Nếu việc chuẩn độ có dùng máy đo pH điện tử thì có thể không cần phải bổ sung dung dịch chất chỉ thị vào dung dịch axit boric. Mặt khác, sự đổi màu cũng có thể được dùng để kiểm tra các qui trình chuẩn độ đúng.

5.7 Dung dịch axit clohydric thể tích chuẩn, $c(\text{HCl}) = (0,1 \pm 0,0005) \text{ mol/l}$

Khuyến cáo rằng vật liệu có bán sẵn này cần được nhà sản xuất chuẩn hoá trước để đáp ứng được bằng hoặc cao hơn yêu cầu trên đây.

CHÚ THÍCH Thông thường các sai số hệ thống (mà có thể tránh được) do người phân tích gây ra khi pha loãng dung dịch axit gốc đậm đặc rồi xác định độ mol, có thể giảm độ tái lập của phương pháp. Người phân tích không nên sử dụng dung dịch để chuẩn độ có nồng độ cao hơn 0,1 mol/l, vì sẽ làm giảm tổng thể tích chuẩn độ trên mẫu và tăng độ không chính xác khi đọc buret. Điều này sẽ ảnh hưởng xấu đến độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp. Khi dùng một axit khác (ví dụ như axit sulfuric) thay thế cho axit clohydric sẽ phát sinh sai số. Do đó, không khuyến cáo sử dụng các chất thay thế đó.

5.8 Amoni sulfat, $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, tối thiểu 99,9 % (khối lượng) theo chất khô

Ngay trước khi sử dụng, sấy khô amoni sulfat ở $102 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ không ít hơn 2 h. Để nguội trong tủ hút ẩm cho đến nhiệt độ phòng.

5.9 Tryptophan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$) hoặc lysin hydro clorua ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$), tối thiểu 99 % (khối lượng)

Không sấy khô thuốc thử này trong tủ sấy trước khi sử dụng.

5.10 Sacaroza, có chứa hàm lượng nitơ không quá 0,002 % (khối lượng).

Không sấy khô sacaroza trong tủ sấy trước khi sử dụng.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Nồi cách thủy, có thể duy trì ở $38 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.**6.2 Bình Kjeldahl, dung tích 500 ml hoặc 800 ml.****6.3 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.****6.4 Chất trợ sôi, ví dụ như: đá bọt đỏ, bụi kẽm, các mảnh sứ cứng hoặc hạt alundum (ví dụ: carbarundum), lượng tính có độ tinh khiết cao, có cỡ mesh 10.**

Không sử dụng lại các chất trợ sôi đã dùng.

CHÚ THÍCH Đôi khi các viên thủy tinh có đường kính khoảng 5 mm được sử dụng, nhưng không được khuyến cáo do hiệu quả sôi không đạt được như khi sử dụng các hạt alundum và khi sử dụng các viên thủy tinh này thì sẽ tạo bọt nhiều trong quá trình phân huỷ.

6.5 Buret hoặc pipet tự động, có thể phân phối các lượng 1,0 ml dung dịch đồng sulfat (5.2)**6.6 Ống đong chia độ, dung tích 50 ml, 100 ml và 500 ml.**

TCVN 8099-1 : 2009

6.7 Thiết bị phân huỷ, có thể giữ các bình Kjeldahl (6.2) theo tư thế nghiêng (khoảng 45°), có bộ phận gia nhiệt bằng điện hoặc đầu đốt bằng khí mà không đốt bình cao quá mức của lượng chứa trong bình và có hệ thống hút khói.

Nguồn nhiệt có thể được điều chỉnh để kiểm soát nhiệt độ tối đa của bộ gia nhiệt được sử dụng trong quá trình phân huỷ. Làm nóng sơ bộ nguồn nhiệt ở bộ gia nhiệt để ước lượng. Quá trình làm nóng sơ bộ phải là 10 min đối với bộ gia nhiệt sử dụng khí và 30 min đối với bộ gia nhiệt dùng điện. Đối với mỗi loại bộ gia nhiệt, xác định việc cài đặt bộ gia nhiệt sao cho trong khoảng từ 5 min đến 6 min sẽ làm sôi 250 ml nước cùng với 5 đến 10 hạt trợ sôi có nhiệt độ ban đầu là 25 °C. Việc cài đặt nhiệt tối đa này sẽ được sử dụng trong suốt quá trình phân huỷ.

6.8 Thiết bị chưng cất, được làm bằng thủy tinh borosilicat hoặc vật liệu thích hợp khác phù hợp với bình Kjeldahl (6.2) gồm có bộ phận chống bắn tung tóe được nối với bộ ngưng có ống phía trong thẳng và ống thoát gắn với đầu ra thấp hơn.

Ống nối và nắp đậy phải khít chặt và tốt nhất là được làm bằng neopren.

6.9 Bình nón, dung tích 500 ml, được chia vạch ở các mức 200 ml.

6.10 Buret, dung tích 50 ml, được chia vạch ít nhất là 0,01 ml, phù hợp với yêu cầu của loại A của TCVN 7149-1 (ISO 385-1).

Cách khác, có thể sử dụng buret tự động nếu đáp ứng được các yêu cầu.

6.11 Bộ chuẩn độ tự động có gắn máy đo pH

Máy đo pH cần được hiệu chuẩn chính xác trong dải pH từ 4 đến 7 theo các qui trình hiệu chuẩn pH của phòng thử nghiệm thông thường.

7 Lấy mẫu

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

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.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Làm ấm mẫu thử trên nồi cách thủy (6.1) ở 38 °C. Trộn kỹ mẫu thử một cách nhẹ nhàng bằng cách đảo chiều chai đựng mẫu mà không tạo bọt. Làm nguội mẫu đến nhiệt độ phòng ngay trước khi cân phần mẫu thử (9.1).

CHÚ THÍCH Trong Phụ lục A đưa ra cỡ mẫu đối với các sản phẩm khác của sữa khi áp dụng phương pháp này.

9 Cách tiến hành

9.1 Phân mẫu thử và xử lý sơ bộ

Cho vào bình Kjeldahl khô và sạch từ 5 đến 10 viên trợ sôi (6.4), 15,0 g kali sulfat (5.1), 1,0 ml dung dịch đồng (II) sulfat (5.2), khoảng 5 ml \pm 0,1 ml mẫu thử đã chuẩn bị (Điều 8) được cân chính xác đến 0,1 mg và 25 ml axit sulfuric (5.3). Dùng axit sulfuric để rửa đồng (II) sulfat, kali sulfat hoặc mẫu thử còn dính lại trên cổ bình cho trôi hết xuống bình. Nếu chất phân hủy còn sót lại trên cổ bình thì dùng một ít nước để tráng. Trộn nhẹ lượng chứa trong bình Kjeldahl.

CHÚ THÍCH Trong Phụ lục A đưa ra cỡ mẫu đối với các sản phẩm khác của sữa khi áp dụng phương pháp này.

9.2 Tiến hành xác định

9.2.1 Phân hủy

Bật hệ thống hút khói của thiết bị phân hủy (6.7) trước khi bắt đầu phân hủy. Làm nóng bình Kjeldahl cùng với lượng chứa bên trong (9.1) trên thiết bị phân hủy, sử dụng bộ cài đặt nhiệt đủ thấp để đốt phân hủy mà không làm bọt trào lên cổ bình Kjeldahl. Phân hủy ở nhiệt độ cài đặt cho đến khi có khói trắng xuất hiện trong bình sau khoảng 20 min. Tăng nhiệt đến một nửa nhiệt độ cài đặt tối đa xác định được trong 6.7 và tiếp tục đốt nóng trong 15 min. Sau 15 min, tăng đến nhiệt độ tối đa cài đặt. Sau khi dịch thủy phân đã trong (có màu lục lam) thì tiếp tục đun 1 h đến 1,5 h ở nhiệt độ tối đa cài đặt. Nếu như dung dịch này không sôi được thì bộ cài đặt nhiệt có thể quá thấp. Tổng thời gian phân hủy sẽ nằm trong khoảng từ 1,8 h đến 2,25 h.

Để xác định thời gian sôi đặc trưng yêu cầu đối với các điều kiện phân tích trong từng phòng thử nghiệm, sử dụng một bộ dụng cụ cụ thể, thì chọn mẫu sữa có hàm lượng protein cao, chất béo cao và xác định hàm lượng protein dùng các khoảng thời gian sôi khác nhau (1 h đến 1,5 h) sau khi làm trong. Kết quả trung bình của protein tăng theo thời gian sôi và giảm khi thời gian sôi quá dài. Chọn thời gian sôi để thu được protein tối đa.

Tại thời điểm kết thúc phân hủy, dịch phân hủy phải trong và không chứa vật liệu chưa phân hủy. Để dịch phân hủy nguội đến nhiệt độ phòng trong bình cầu mở nắp để trong tủ hút riêng rẽ trong khoảng 25 min. Nếu bình cầu được để trên bếp để làm nguội thì phải mất một khoảng thời gian dài hơn để đạt được nhiệt độ phòng. Dịch phân hủy phải ở dạng lỏng hoặc dạng lỏng có một ít kết tủa ở đáy bình sau khi làm nguội trong 25 min. Không để qua đêm dịch phân hủy chưa pha loãng trong bình cầu. Dịch phân hủy chưa pha loãng có thể có kết tinh trong giai đoạn này và sẽ khó để đưa các kết tinh này trở lại trạng thái lỏng.

CHÚ THÍCH Việc kết tinh quá nhiều sau 25 min là do thất thoát axit quá mức trong quá trình phân hủy và có thể cho kết quả thử nghiệm thấp. Việc thất thoát axit quá mức là do hút khói quá mạnh hoặc do thời gian phân hủy quá dài từ việc cài đặt nhiệt độ tối đa của bộ gia nhiệt không đúng.

TCVN 8099-1 : 2009

Thêm 300 ml nước vào các bình Kjeldahl dung tích 500 ml hoặc 400 ml nước khi dùng các bình Kjeldahl dung tích 800 ml. Dùng nước để tráng nửa cổ bình. Trộn kỹ lượng chứa trong bình để hoà tan các phần kết tinh. Thêm 5 đến 10 viên trợ sôi (6.4). Để cho hỗn hợp nguội trở lại đến nhiệt độ phòng trước khi chưng cất. Dịch phân huỷ đã pha loãng có thể được đậy kín lại và giữ một lúc để chưng cất.

9.2.2 Chưng cất

Bật bộ ngưng tụ nước của thiết bị chưng cất (6.8). Thêm 75 ml dung dịch natri hydroxit (5.4) vào dịch phân huỷ đã pha loãng (9.2.1) bằng cách rót cẩn thận xuống cổ bình Kjeldahl nghiêng để tạo một lớp trên đáy bầu của bình. Cần có một lớp phân cách rõ giữa hai dung dịch. Để giảm khả năng thất thoát amoniac, ngay sau khi bổ sung dung dịch natri hydroxit vào bình Kjeldahl thì nổi ngay bình vào thiết bị chưng cất (6.8). Đầu ra của ống ngưng được ngập trong 50 ml dung dịch axit boric (5.6) đựng trong bình nón (6.9). Xoáy mạnh bình Kjeldahl để trộn kỹ lượng chứa trong bình cho đến khi không còn thấy lớp phân cách giữa các dung dịch trong bình. Đặt bình trên bếp, bật bếp và để nhiệt độ đủ cao để làm sôi hỗn hợp. Tiếp tục chưng cất cho đến khi bắt đầu sôi không đều và sau đó tháo ngay bình Kjeldahl ra và tắt bếp. Tắt bộ ngưng. Tráng phía trong và phía ngoài đầu ống ngưng bằng nước, thu lấy nước rửa cho vào bình nón và trộn.

Tốc độ chưng cất phải sao cho thu được 150 ml dịch phân huỷ trước khi bắt đầu sôi không đều. Tổng thể tích trong bình nón phải ở khoảng 200 ml. Nếu lượng dịch phân huỷ thu được nhỏ hơn 150 ml thì dùng một lượng ít hơn 300 ml nước để pha loãng dịch phân huỷ. Bình ngưng phải giữ được nhiệt độ của dung dịch trong bình nón không vượt quá 35 °C trong quá trình chưng cất khi sử dụng phương pháp so màu điểm kết thúc.

9.2.3 Chuẩn độ

Dùng buret (6.5) chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.2.2) bằng axit clohydric (5.7). Điểm kết thúc đạt được khi dung dịch có vết màu hồng. Đọc buret chính xác đến 0,05 ml. Khi sử dụng máy khuấy từ nên được rọi sáng có thể giúp cho việc nhìn thấy điểm kết thúc.

Cách khác, chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.2.2) bằng axit clohydric (5.7) sử dụng máy chuẩn độ tự động đã hiệu chuẩn đúng có gắn máy đo pH (6.11). Điểm pH kết thúc của chuẩn độ đạt được là 4,6 là điểm uốn nhất trong đường chuẩn độ (điểm uốn). Đọc trên máy chuẩn độ tự động lượng chất chuẩn độ đã sử dụng.

CHÚ THÍCH 1 Vết hồng đầu tiên quan sát được giữa pH 4,3 và 4,6 đối với hệ thống chất chỉ thị và dung dịch axit boric 4 % qui định trong phương pháp này. Thực tế, tốc độ thay đổi pH phụ thuộc vào HCl 0,1 mol/l đã thêm vào là rất nhanh trong dải pH này. Trong hệ thống này thì khoảng 0,05 ml dung dịch HCl 0,1 mol/l sẽ thay đổi 0,3 đơn vị pH trong dải pH từ 4,3 đến 4,6.

CHÚ THÍCH 2 Các thống kê thực hiện trong phòng thử nghiệm và giữa các phòng thử nghiệm đối với phương pháp này đã được xác định sử dụng điểm kết thúc chuẩn độ màu. So sánh các kết quả thử nghiệm cuối cùng, kể cả các kết quả của phép thử trắng thu được với điểm kết thúc pH 4,6 với điểm kết thúc chuẩn độ màu cho thấy không có sự chênh lệch đáng kể.

9.3 Phép thử trắng

Luôn luôn chuẩn độ mẫu trắng bằng axit clohydric (5.7) và dùng buret (6.5) hoặc máy chuẩn độ tự động có gắn máy đo pH (6.11) như đã sử dụng đối với các phần mẫu thử. Tiến hành thử mẫu trắng theo qui trình trong 9.1 đến 9.2.3. Thay phần mẫu thử bằng 5 ml nước và khoảng 0,85 g sacaroza (5.10).

Ghi lại các giá trị thử trắng. Nếu các giá trị của phép thử trắng thay đổi thì phải tìm nguyên nhân.

CHÚ THÍCH 1 Mục đích của việc sử dụng sacaroza trong phép thử trắng hoặc chuẩn thu hồi để đóng vai trò của chất hữu cơ để tiêu thụ một lượng axit sulfuric trong quá trình phân huỷ tương đương với phần mẫu thử. Nếu lượng axit sulfuric tự do sót lại tại điểm kết thúc phân huỷ quá thấp thì độ thu hồi nitơ trong cả hai phép thử độ thu hồi trong 9.4.2 và 9.4.3 sẽ thấp. Tuy nhiên, nếu lượng axit còn lại có mặt trong giai đoạn cuối phân huỷ là đủ để giữ tất cả nitơ, nhưng các điều kiện nhiệt độ và thời gian trong quá trình phân huỷ là không đủ để giải phóng tất cả nitơ ra khỏi mẫu, thì độ thu hồi nitơ trong 9.4.2 sẽ có thể chấp nhận được và độ thu hồi nitơ trong 9.4.3 sẽ thấp.

Lượng chất chuẩn độ được sử dụng trong phép thử trắng phải luôn luôn lớn hơn 0. Các phép thử trắng trong cùng một phòng thử nghiệm cần nhất quán theo thời gian. Các giá trị mẫu trắng điển hình bằng hoặc thấp hơn 0,2 ml.

CHÚ THÍCH 2 Nếu mẫu trắng đã có màu hồng trước khi bắt đầu chuẩn độ thì đã có sai sót gì đó. Thông thường trong những trường hợp đó thì các bình nón đã không sạch hoặc nước từ không khí ẩm có thể ngưng tụ trên mặt ngoài của dụng cụ ngưng đã chảy vào bình ngưng gây nhiễm bẩn.

9.4 Các phép thử về độ thu hồi

9.4.1 Độ đúng của qui trình cần được kiểm tra thường xuyên bằng các phép thử về độ thu hồi sau đây, tiến hành theo 9.1 đến 9.2.3.

9.4.2 Kiểm tra để chắc chắn rằng nitơ không bị thất thoát bằng cách sử dụng phần mẫu thử 0,12 g amoni sulfat (5.8) cùng với 0,85 g sacaroza (5.10).

CHÚ THÍCH Kiểm tra độ thu hồi amoni sulfat không cho thông tin về khả năng phân huỷ để giải phóng nitơ liên kết trong các cấu trúc của protein.

Phần trăm nitơ thu hồi phải ở khoảng 99,0 % và 100 % đối với tất cả các vị trí trên thiết bị. Đối với độ thu hồi nhỏ hơn 99 % thì nồng độ của chất chuẩn độ cao hơn giá trị đã nêu hoặc có thể thất thoát nitơ trong quá trình phân huỷ hoặc chưng cất. Có thể sử dụng hỗn hợp của amoni sulfat và một lượng nhỏ axit sulfuric (lượng còn lại ở cuối giai đoạn phân huỷ) trong bình Kjeldahl. Pha loãng tiếp bằng một lượng nước và thêm một lượng natri hydroxit rồi chưng cất. Nếu độ thu hồi nitơ vẫn còn thấp như vậy thì việc thất thoát nitơ là do thiết bị chưng cất và không phải trong quá trình phân huỷ. Khả năng có thể là do ống nối trong hệ thống cổ truyền bị hở hoặc trong khi chưng cất đầu tip của bộ ngưng không được ngập trong axit boric. Cần kiểm tra thiết bị bằng qui trình trong 9.4.3 trước khi kiểm tra độ thu hồi.

TCVN 8099-1 : 2009

Khi độ thu hồi nitơ vượt quá 100 % thì không có việc thất thoát nitơ, mà có thể có một số nguyên nhân như sau:

- a) amoni sulfat bị nhiễm bẩn;
- b) nồng độ thực của chất chuẩn độ thấp hơn so với giá trị đã nêu;
- c) việc hiệu chuẩn buret để chuẩn độ có sai sót;
- d) nhiệt độ của chất chuẩn độ quá cao so với nhiệt độ hiệu chuẩn buret;
- e) tốc độ chuẩn độ của buret vượt quá tốc độ tối đa của buret đã hiệu chuẩn.

9.4.3 Kiểm tra hiệu quả của qui trình phân huỷ bằng cách sử dụng 0,16 g lysin hydro clorua hoặc 0,18 g tryptophan (5.9) cùng với 0,67 g sacaroza (5.10).

Ít nhất là 98 % nitơ phải được thu hồi. Nếu độ thu hồi thấp hơn 98 %, sau khi thu hồi được từ 99 % đến 100 % amoni sulfat, thì do nhiệt độ hoặc thời gian phân huỷ là chưa đủ (thực hiện qui trình trong 9.2.1, đoạn 1 và chú thích) hoặc có vật liệu chưa phân huỷ hết (nghĩa là hoá than) trong bình Kjeldahl. Đánh giá cuối cùng về tính năng thực hiện tốt nhất là có sự tham gia vào chương trình thử nghiệm thành thạo, ở đó các thông số thống kê trong một phòng thử nghiệm và giữa các phòng thử nghiệm được ước tính dựa trên phân tích các mẫu sữa.

9.4.4 Các kết quả thấp hơn trong các phép thử về độ thu hồi (hoặc cao hơn 100 % trong 9.4.2) cho thấy có sai sót trong qui trình và/hoặc nồng độ của dung dịch axit clohydric (5.7) không đúng.

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Tính hàm lượng nitơ

10.1.1 Tính hàm lượng nitơ trong mẫu thử, w_N , sử dụng công thức sau đây:

$$w_N = \frac{1,4007 (V_s - V_b) \times M_r}{m}$$

trong đó

w_N là hàm lượng nitơ của mẫu, tính bằng phần trăm khối lượng (%);

V_s là thể tích của dung dịch axit clohydric (5.7) đã dùng trong phép xác định (9.2.3), chính xác đến 0,05 ml, tính bằng mililit (ml);

V_b là thể tích của dung dịch axit clohydric (5.7) đã dùng trong phép thử trắng, chính xác đến 0,05 ml, tính bằng mililit (ml);

M_i là nồng độ mol/l của axit clohydric (5.7), lấy chính xác đến bốn chữ số thập phân;

m là khối lượng phần mẫu thử (9.1), cân chính xác đến 0,1 mg, tính bằng gam (g).

10.1.2 Biểu thị kết quả chính xác đến bốn chữ số thập phân, nếu cần để tính toán tiếp theo. Đối với kết quả cuối cùng, biểu thị hàm lượng nitơ đến ba chữ số thập phân và hàm lượng protein đến hai chữ số thập phân. Không làm tròn các kết quả thu được cho đến khi tính giá trị cuối cùng của phép thử.

CHÚ THÍCH Điều này đặc biệt đúng khi các giá trị được sử dụng để tính toán tiếp. Một ví dụ là khi các giá trị thử nghiệm riêng lẻ thu được từ phép phân tích nhiều mẫu được dùng để tính toán thống kê về thực hiện của phương pháp về độ lệch trong một phòng hoặc giữa các phòng thử nghiệm. Một ví dụ khác là khi các giá trị được sử dụng làm chuẩn để hiệu chuẩn thiết bị (ví dụ: máy phân tích sữa dùng tia hồng ngoại) có các giá trị từ nhiều mẫu được sử dụng trong tính toán đơn giản hoặc hồi qui bội số. Khi đó các giá trị thu được không được làm tròn trước khi dùng để tính toán tiếp theo.

10.2 Tính hàm lượng protein thô

10.2.1 Tính hàm lượng protein thô của mẫu thử, w_p , sử dụng công thức sau đây:

$$w_p = w_N \times 6,38$$

trong đó

w_p là hàm lượng protein thô, tính bằng phần trăm khối lượng (%);

w_N là hàm lượng nitơ của mẫu thử, tính bằng phần trăm khối lượng được lấy đến bốn chữ số thập phân (10.1) (%).

6,38 là hệ số để chuyển đổi nitơ thành protein thô.

10.2.2 Báo cáo kết quả thu được đối với protein thô đến ba chữ số thập phân, nếu cần để tính toán tiếp. Đối với kết quả cuối cùng (10.1) thì biểu thị kết quả đến hai chữ số thập phân.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập thu được từ kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725¹. Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được đưa ra trong [5], [6]. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các giá trị đã nêu.

¹ ISO 5725 : 1986 (hiện nay đã huỷ bỏ) được sử dụng để thu được số liệu về độ chụm.

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 trên vật liệu thử giống hệt nhau trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá 0,006 % đối với hàm lượng nitơ (0,038 % đối với hàm lượng protein thô).

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên vật liệu thử giống hệt nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá 0,0077 % đối với hàm lượng nitơ (0,049 % đối với hàm lượng protein thô).

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được;
- nếu thỏa mãn yêu cầu về độ thu hồi thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

**Quy trình cải biến để phân tích các sản phẩm sữa khác
khi không có tiêu chuẩn riêng cho sản phẩm đó**

A.1 Yêu cầu chung

Quy trình mô tả trong tiêu chuẩn này đã được tối ưu hoá và hiệu quả thực hiện của phương pháp này đã được đánh giá cho việc phân tích sữa bò. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể hiện hành thi phòng thử nghiệm có thể sử dụng quy trình này với sữa đối nhỏ, để xác định hàm lượng nitơ trong sản phẩm sữa. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng quy trình và tính năng thực hiện đối với việc sử dụng như thế chưa được đánh giá hiệu lực.

A.2 Cách tiến hành

Từ mẫu đại diện đã chuẩn bị như trên, cân lấy một lượng mẫu thử yêu cầu, chính xác đến 0,1 g theo mô tả dưới đây. Tiến hành xác định hàm lượng nitơ sử dụng phương pháp qui định trong 9.1 đến 9.4.

Các lượng axit sulfuric (5.3) và dung dịch natri hydroxit (5.4) được dùng để phân huỷ và chưng cất không được thay đổi. Việc thay đổi tỷ lệ axit với các thành phần khác bằng cách tăng lượng axit làm giảm điểm sôi ban đầu của hỗn hợp trong phân huỷ và điều này nên tránh.

Cần sử dụng cỡ mẫu thử thích hợp khi làm việc với các thuốc thử qui định trong tiêu chuẩn này. Phần mẫu thử thích hợp đối với mọi mẫu thử có thể ước lượng như sau. Lượng protein tối ưu trong một bình Kjeldahl phải từ 0,15 g đến 0,30 g trên bình đối với tất cả các mẫu thử. Do đó, nếu trung bình mẫu phomat Cheddar chứa 24,00 % protein, thì khối lượng phần mẫu thử cần ở khoảng từ 0,625 g đến 1,25 g. Việc quyết định sử dụng các khối lượng phần mẫu thử là lượng trung bình ở điểm cuối thấp hơn của dải hoặc điểm cuối cao hơn của dải, tùy thuộc vào có bao nhiêu lượng axit sẽ tiêu thụ trong quá trình phân huỷ các thành phần mẫu (nghĩa là chất béo và cacbohydrat) còn lại.

Phương pháp mô tả việc bổ sung 25 ml (khoảng 46 g) axit sulfuric vào phần mẫu thử trong bình Kjeldahl. Ở cuối giai đoạn phân huỷ, cần có khoảng 15 g axit sulfuric còn lại để giữ tất cả nitơ.

Cần lưu ý rằng axit sulfuric đã tiêu tốn cho phần mẫu thử và cũng bị thất thoát do bay hơi trong quá trình phân huỷ. Lượng thất thoát do bay hơi có thể bằng lượng đã tiêu tốn cho chất hữu cơ trong phần mẫu thử. Lượng axit còn lại cuối cùng phụ thuộc vào cả hai quá trình này. Việc thất thoát nhiều axit do

TCVN 8099-1 : 2009

bay hơi (do hút khói quá mạnh trong quá trình phân huỷ hoặc cổ bình bị quá nóng) có thể làm cho một lượng axit rất nhỏ sót lại cuối giai đoạn phân huỷ cho dù cỡ mẫu đã đúng.

Chỉ một lượng nhỏ axit còn lại cũng sẽ làm kết tinh dịch phân huỷ sau khi làm nguội 25 min và độ thu hồi nitơ thu được sẽ thấp.

Cream chứa 40 % chất béo là một ví dụ của sản phẩm sẽ gặp khó khăn. Trong trường hợp này hàm lượng nitơ hoặc protein của mẫu là thấp và hàm lượng chất béo là cao. Giả sử mẫu cream trung bình chứa 40 % chất béo, 1,9 % protein và 2,9 % lactoza. Để đạt được 0,15 g protein trong bình Kjeldahl (6.2), thì cần sử dụng phần mẫu thử 7,89 g. Phần mẫu thử này sẽ chứa 3,16 g chất béo và lượng mẫu này sẽ tiêu tốn 56,9 g (khoảng 30,9 ml) axit sulfuric trong phân huỷ mà không bị thất thoát axit sulfuric do bay hơi (dựa vào giả sử rằng 1 g chất béo sẽ tiêu tốn 18 g axit sulfuric trong suốt quá trình phân huỷ). Đây là một ví dụ khi một lượng mẫu thử cần phải giảm để có một lượng đủ axit sulfuric giữa lại trong phân huỷ. Trong trường hợp các mẫu thử như cream, thì cần sử dụng chất chuẩn độ có nồng độ thấp hơn (ví dụ: 0,01 mol/l). Trong các trường hợp này lượng mẫu thử cần phải giảm để có đủ lượng axit sulfuric còn lại ở cuối giai đoạn phân huỷ.

Lượng sacaroza yêu cầu đối với phép thử trắng hoặc các tiêu chuẩn về độ thu hồi đối với các sản phẩm không phải là sữa bò có thể được xác định như sau:

Trước tiên, phải ước lượng được hàm lượng gần đúng của chất béo, protein và cacbohydrat đối với loại mẫu thử và khoảng khối lượng phần mẫu thử được sử dụng trong phân huỷ.

Thứ hai, trong quá trình phân huỷ 1 g chất béo sẽ tiêu tốn khoảng 18 g axit sulfuric, 1 g protein sẽ tiêu tốn khoảng 9 g axit sulfuric và 1 g cacbohydrat sẽ tiêu tốn khoảng 7 g axit sulfuric.

Dựa vào thông tin trên đây, thì có thể tính được lượng axit tiêu tốn bởi phần mẫu thử và lượng sacaroza yêu cầu để tiêu tốn cùng một lượng axit trong quá trình phân huỷ. Lượng sacaroza tính được cần được sử dụng trong phép thử trắng và tiêu chuẩn thu hồi amoni sulfat.

Đối với tiêu chuẩn thu hồi nitơ axit amin (9.4.3), thì giảm lượng sacaroza bằng một lượng axit mà sẽ tiêu tốn (tính theo protein) bởi lysin hydro clorua hoặc tryptophan. Giả sử rằng độ thu hồi nitơ trong phân huỷ đối với thiết bị sử dụng cho các mẫu thử không phải là sữa, không có thực nghiệm về độ thu hồi để xây dựng các điều kiện để đạt được các mức dư tương tự của axit sulfuric tại điểm cuối phân huỷ.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
 - [2] ISO 5725 : 1986 Precision of test method of Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests (đã hủy).
 - [3] 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: Các định nghĩa và nguyên tắc chung.
 - [4] 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 để xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
 - [5] BANO, D.M, CLARK, J.L., C.E and FLEMING, J.R. Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 1990, pp. 849-859.
 - [6] LYNCH, J.M., BARBANO, D.M. and FLEMING, J.R. Performance evaluation of direct forced-air total solids and Kjeldahl total nitrogen method: 1990 through 1995. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **80**, 1997, pp. 1038-1043.
-