

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.129 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/9/2017 Trang: 1/7
--	----------------------------	--

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG PROTEIN SỮA TRONG SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM TỪ SỮA BẰNG PHƯƠNG PHÁP KJELDAHL (DETERMINATION OF PROTEIN CONTENT IN MILK AND MILK PRODUCTS BY KJELDAHL METHOD)

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Phạm Thị Kim Cúc	Trịnh Thị Minh Nguyệt	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
01	D.	Bổ sung mục “Bảo đảm kết quả thử nghiệm”	15/9/2017

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.129 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/9/2017 Trang: 2/7
--	----------------------------	--

A. GIỚI THIỆU

I. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng protein trong sữa và các sản phẩm từ sữa.

II. Tài liệu tham khảo

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: TCVN 8099-5:2009

III. Nguyên tắc

Protein trong mẫu sẽ được kết tủa bằng cách bổ sung dung dịch acid tricloacetic sao cho nồng độ cuối cùng của acid tricloacetic trong hỗn hợp ở khoảng 12%. Lọc để tách kết tủa protein. Hàm lượng protein trong phần kết tủa được xác định ở nhiệt độ 420°C trong H₂SO₄ đậm đặc với xúc tác hỗn hợp CuSO₄ và K₂SO₄ để chuyển hóa toàn bộ N trong hợp chất về dạng amoni. Dung dịch sau thủy phân sẽ được kiềm hóa, chưng cất và lượng amoni thoát ra sẽ được hấp thụ vào dung dịch acid. Chuẩn độ lượng acid dư bằng NaOH.

IV. An toàn phòng thử 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.
- Các thao tác với hóa chất độc hại phải được thực hiện trong tủ hút.
- Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.
- Tuyệt đối không được hút thuốc và ăn uống trong khu vực thử nghiệm.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ

- Cân phân tích 0 – 200g, độ chính xác 0,1 mg

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.129 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/9/2017 Trang: 3/7
--	----------------------------	--

- Hệ thống phá mẫu kjeldahl.
- Máy chưng cất đậm
- Buret, pipet,
- Phễu lọc và giấy lọc.

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Hóa chất

- NaOH, PA.
- H₂SO₄, PA
- Hỗn hợp xúc tác CuSO₄ và K₂SO₄.
- Hỗn hợp chỉ thị methyl đỏ và methyl xanh.
- Dung dịch chuẩn H₂C₂O₄ 0.1N
- Acid tricloacetic
- Sacarose, có chứa hàm lượng N không quá 0.002% (không sấy khô trước khi sử dụng)
- Acetanilide (sigma-aldrich) 99% C₈H₉NO
- (NH₄)₂SO₄: sấy khô ở 102⁰C ± 2⁰C và để nguội trong bình hút ẩm trước khi sử dụng
- Nước cất 02 lần.

2. Dung dịch hóa chất

Chỉ sử dụng hóa chất có độ tinh khiết dùng cho phân tích, nước cất hoặc nước đã được loại khoáng có độ tinh khiết tương đương.

- Dung dịch Acid H₂SO₄ (0.1N): 2.8mL H₂SO₄ đậm đặc vào 1000mL nước cất.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.129 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/9/2017 Trang: 4/7
--	----------------------------	--

- Hỗn hợp chỉ thị: hòa tan 0.2g methyl đỏ và 0.1g xanh methylene trong 100ml ethanol 96%
- Hỗn hợp xúc tác: K_2SO_4 : $CuSO_4$ =10:1
- Dung dịch chuẩn acid oxalic 0.01N: Cân chính xác 4.5g $H_2C_2O_4$ pha trong nước cất và định mức thành 1L.
- DD acid tricloacetic: hòa tan 15g acid tricloacetic trong bình định mức 100ml và định mức tới vạch bằng nước cất.

III. Quy trình thử nghiệm

1. Kết tủa protein:

Cân khoảng 1.0- 2.0g mẫu cho vào erlen 100ml, thêm 40ml dd acid tricloacetic lắc để trộn đều mẫu, để yên 5 phút cho kết tủa lắng. Lọc kết tủa qua giấy lọc, chuyển toàn bộ kết tủa lên giấy lọc và tráng rửa nhiều lần bằng acid tricloacetic, để cho dịch lỏng xuống hết.

2. Phân hủy

Chuyển cẩn thận toàn bộ kết tủa cùng với giấy lọc vào ống kjeldahl. Thêm 2g hỗn hợp xúc tác K_2SO_4 : $CuSO_4$, thêm tiếp 20ml acid H_2SO_{4dd} theo thành ống Kjeldahl để tránh hiện tượng sôi trào. Cho ống kjeldahl vào hệ thống phá mẫu, nâng nhiệt độ lên từ từ tới $420^{\circ}C$ giữ trong 60phút hoặc cho tới khi dung dịch màu xanh trong suốt. Tắt bếp, để nguội.

3. Chưng cất amoni:

Cho cẩn thận từ từ 10ml nước cất để hòa tan hoàn toàn sulfat. Lắp ống kjeldahl vào hệ thống chưng cất. Dùng pipet lấy 50ml acid H_2SO_4 0.1N hoặc acid H_2SO_4 có nồng độ phù hợp cho vào bình hứng của thiết bị chưng cất, thêm vài giọt của chỉ thị hỗn hợp (0.2g methyl đỏ và 0.1g xanh methylene trong 100ml ethanol 96%). Nhúng đầu ra của ống sinh hàn trong bình hứng đã chứa dung dịch acid

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.129 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/9/2017 Trang: 5/7
---	---------------------	--

sâu ít nhất là 1cm. Sau đó cho từ từ 50-100ml dung dịch NaOH 35% vào ống Kjeldahl. Bắt đầu quá trình cất amoniac, kiểm tra độ pH của dịch cất ở đầu ống ngưng, nếu phản ứng trung tính thì kết thúc quá trình cất, thường là lấy khoảng 250ml dịch cất là được.

Lưu ý: Lấy bình hứng ra trước khi tắt hệ thống cất để tránh hiện tượng sục ngược trở lại của dịch cất.

4. Chuẩn độ

Chuẩn độ lại lượng acid H_2SO_4 dư bằng dung dịch NaOH 0.1N hoặc NaOH có nồng độ phù hợp, tại điểm tương đương có sự thay đổi màu từ tím sang xanh lá cây.

5. Mẫu trắng:

- Lấy giấy lọc đã được rửa bằng dung dịch acid tricloacetic thay cho phần mẫu thử và tiến hành giống B.III.2 đến B.III.4.
- Luôn chuẩn độ mẫu trắng bằng cùng loại thuốc thử và sử dụng cùng thiết bị như đã sử dụng đối với các phần mẫu thử.

6. Mẫu kiểm soát

- Kiểm soát hiệu suất phá mẫu: Cân 0.1g acetanilide cùng khoảng 1g sacarose vào ống kejhdal và tiến hành giống B.III.2 đến B.III.4.
- Kiểm soát độ kín của hệ thống: Cân 0.1g $(NH_4)SO_4$ vào bình định mức 100ml và định mức bằng nước cất. Hút 50ml dung dịch này cùng khoảng 1g sacarose vào ống kejhdal và tiến hành giống B.III.2 đến B.III.4.

C. TÍNH KẾT QUẢ

I. Chuẩn hóa lại nồng độ dung dịch NaOH 0.01M

- Rút chính xác V mL $H_2C_2O_4$ 0.01N, thêm 1 giọt chỉ thị phenolphthalein 1%. Sau đó tiến hành chuẩn độ bằng NaOH 0.01M đến khi xuất hiện màu hồng nhạt không biến mất trong 30 giây. Ghi thể tích NaOH đã tiêu tốn. Lặp lại thao tác trên 3 lần và ghi nhận thể tích trung bình của NaOH.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.129 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/9/2017 Trang: 6/7
---	---------------------	--

- Nồng độ chính xác của NaOH (M) được tính theo công thức sau:

$$C_{\text{NaOH}} = \frac{V_1 \times N_1}{V_2}$$

Trong đó:

V_1 : thể tích acid $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.01N, mL

N_1 : Nồng độ đương lượng của $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, N

V_2 : thể tích trung bình của NaOH đã tiêu tốn, mL

C_{NaOH} : Nồng độ NaOH, mol/L

II. Xác định hàm lượng nitơ:

$$\text{Nitơ (g/Kg)} = \frac{(A - B) * M * C}{m}$$

Trong đó:

A: mL NaOH chuẩn độ mẫu trắng.

B: mL NaOH chuẩn độ mẫu.

m: khối lượng mẫu (g)

C: nồng độ chính xác của dung dịch NaOH dùng để chuẩn độ, mol/L.

M: Khối lượng phân tử gam của nitơ .

$$\text{Protein} = N * 6.38$$

D. ĐẢM BẢO KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

- Mẫu lặp lại được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≤ 10 mẫu). 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 0,0038 % đối với hàm lượng nitơ protein (0,024 % đối với hàm lượng protein thực).
- Mẫu Kiểm soát được thực hiện ít nhất 1 lần cho một lô mẫu (≤ 10 mẫu). Kết quả mẫu mẫu kiểm soát không được quá 99% đến 101% đối với mẫu kiểm soát bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và không quá 98% đối với mẫu kiểm soát bằng acetanilide.

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.TN.129 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 15/9/2017 Trang: 7/7
--	----------------------------	--

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

- Mã số mẫu, ngày phân tích,...
- Khối lượng cân của mẫu thử nghiệm.
- Các số liệu liên quan A, B, M, C...
- Những ghi nhận hay thay đổi khác (nếu có).