

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.219 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 28/01/2018 Trang: 2/7
---	--	---

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng.

Phương pháp này được sử dụng để xác định hàm lượng nitơ và tính protein thô trong sữa và các sản phẩm sữa theo nguyên tắc kjeldahl.

II. Tài liệu tham khảo.

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: TCVN 8099-1:2015

III. Nguyên tắc.

Phần mẫu thử được phân hủy bằng hỗn hợp của acid sulfuric đậm đặc và kali sulfat. Sử dụng CuSO_4 làm chất xúc tác để chuyển nito hữu cơ có mặt về amoni sulfat. Dùng kali sulfat để tăng điểm sôi của acid sulfuric và tạo hỗn hợp oxi hóa mạnh hơn cho việc phân hủy. Bổ sung một lượng dư NaOH vào dịch phân hủy đã để nguội làm giải phóng amoni. Amoni giải phóng ra được chưng cất và hấp thụ vào dung dịch acid dư. Chuẩn độ lượng acid dư để xác định hàm lượng nito trong mẫu.

VI. Thông tin an toàn phòng thí nghiệm.

Nhân viên phân tích phải tuân thủ các quy định về an toàn khi làm việc trong phòng thí nghiệm sau:

- Phải mặc bảo hộ lao động khi làm việc trong phòng thí nghiệm: áo Blouse, găng tay, mắt kính và khẩu trang.
- Các hóa chất phải được để đúng nơi quy định.
- Các hóa chất phải được thao tác trong tủ hút.
- Các hóa chất thải phải được thu hồi vào bình thu hồi đúng chủng loại để chuyển giao cho đơn vị có chức năng xử lý.
- Tuân thủ các quy tắc về phòng chống cháy nổ trong công ty.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.

1. Thiết bị cơ bản.

- Hệ thống phá mẫu: bếp phá mẫu kjeldahl, ống kjeldahl 250ml, bình xút để hấp thụ hơi acid bay ra, ống dẫn khí, bơm.
- Máy chưng cất nito.

2. Thiết bị phân tích

- Cân phân tích
- Erlen 250ml
- Buret 25ml
- Pipet các loại

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.219 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 28/01/2018 Trang: 3/7</p>
--	--	---

- Bình định mức các loại.

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá 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
- 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.
- NaOH 0.1N: Cân 4g NaOH hòa tan trong nước và định mức vào bình định mức 1L
- Hỗn hợp chỉ thị: hòa tan 0.2g methyl đỏ và 0.1g xanh methylene trong 100ml ethanol 96%
- Hỗn hợp xúc tác: K₂SO₄: CuSO₄=10:1
- Dung dịch chuẩn acid oxalic 0.1N: Cân chính xác 4.5g H₂C₂O₄ pha trong nước cất và định mức thành 1L.

III. Kiểm soát QA/QC.

Trong mỗi đợt phân tích, nhân viên phân tích thực hiện các mẫu sau để kiểm soát chất lượng phân tích.

- Mẫu Blank hóa chất:
- Mẫu QC:

Thực hiện mẫu Blank và mẫu QC theo mục IV.2.

IV. xử lý mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.219 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 28/01/2018 Trang: 4/7
--	--	---

- a. Sữa dạng lỏng nguyên chất, sữa tách một phần chất béo và sữa gầy: Làm ấm mẫu thử trong nồi cách thủy ở 38°C đến 40°C. Nhẹ nhàng trộn kỹ mẫu thử bằng cách đảo chiều chai đựng mẫu mà không tạo bọt. Làm nguội mẫu đến nhiệt độ phòng ngay khi trộn xong.
 - b. Phomat cứng, bán cứng và phomat chế biến:
 - Loại bỏ cùi, các vết hoặc lớp bề mặt mốc của phomat sao cho thu được mẫu thử đại diện của phomat
 - Nghiền và trộn đều mẫu thử
 - c. Sữa dạng khô và các sản phẩm sữa khô: Để mẫu thử đạt đến nhiệt độ phòng từ 20°C đến 25°C, chuyển vào vật chứa gấp hai lần thể tích mẫu thử, đập nắp và trộn kỹ bằng cách xoay và đảo chiều vật chứa.
2. Phương pháp tiến hành.
- a. Phân hủy mẫu
- Cân một lượng mẫu nhất định theo bảng sau:

Nền mẫu	Khối lượng mẫu
Sữa bò nguyên chất và sữa gầy dạng lỏng	5g ± 0.10g
Sữa dê nguyên chất và sữa gầy dạng lỏng	5g ± 0.10g
Sữa cừu nguyên chất và sữa gầy dạng lỏng	2.5g ± 0.1 g
Phomat cứng, bán cứng và phomat mềm	1g ± 0.05g
Sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh và sữa khô	0.5g ± 0.05g
Protein sữa đậm đặc, whey protein đậm đặc, casein và ccasseinat	0.25 ± 0.05g

Cho lượng mẫu thử đã cân vào ống kjeldahl, thêm 10.0g K₂SO₄, 1.g CuSO₄, 20ml dung dịch H₂SO₄ đậm đặc. Trộn nhẹ lượng chứa trong ống.

Đặt ống vào bộ phá mẫu và tăng nhiệt độ từ từ lên tới 420°C cho đến khi dịch phân hủy trong và tiếp tục phân hủy ở nhiệt độ này trong ít nhất là 1 giờ, tùy từng nền mẫu có hàm lượng protein cao hoặc chất béo cao mà thời gian phân hủy khác nhau thường từ 1h đến 2.5h sau khi làm trong. Kết quả của protein tăng theo thời gian sôi và trở nên không đổi, sau đó giảm khi thời gian sôi quá dài. Chọn thời gian sôi để thu được protein tối đa đối với sản phẩm thử nghiệm.

Tại thời điểm kết thúc phân hủy, dịch phân hủy phải trong và không chứa vật liệu chưa phân hủy.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.219 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 28/01/2018 Trang: 5/7
---	--	---

Để dịch phân hủy nguội đến nhiệt độ phòng trong khoảng 25 phút. Dịch phân hủy đã nguội phải ở dạng lỏng hoặc lỏng có một ít kết tinh dưới đáy ống. *Không để qua đêm khi dịch chưa được pha loãng bằng nước cất.*

Sau khi dịch phân hủy nguội đến nhiệt độ phòng trong khoảng 25 phút, thêm 50ml nước cất vào và hòa tan.

b. Chứng cất:

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 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.*

c. 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.

3. Mẫu trắng:

- Luôn thực hiện mẫu trắng cùng loại thuốc thử và sử dụng cùng thiết bị như đã sử dụng đối với các phần mẫu thử, thay mẫu bằng 1g sacarose.

4. Mẫu kiểm soát

- Kiểm soát hiệu suất phá mẫu: Cân 0.1g acetanilide cùng khoảng 1g sacarose vào ống kjeldahl và tiến hành giống IV.2 .
- 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 IV.2.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

I. Chuẩn hóa lại nồng độ dung dịch NaOH 0.1M

- Rút chính xác V mL $H_2C_2O_4$ 0.1N, thêm 1 giọt chỉ thị phenolphthalein 1%. Sau đó tiến hành chuẩn độ bằng NaOH 0.1M đến khi xuất hiện màu hồng nhạt không biến mất trong

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.219 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 28/01/2018 Trang: 6/7
---	----------------------------------	---

30 giây. Ghi thể tích NaOH đã tiêu tốn. Lập lại thao tác trên 3 lần và ghi nhận thể tích trung bình của NaOH.

- 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 $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.1N, 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 .

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

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

1. Độ lặp lại của nền mẫu sữa dạng lỏng, sữa nguyên chất và sữa gầy:

a. Sữa bò:

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)

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.TN.219 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 28/01/2018 Trang: 7/7</p>
--	---	---

b. Sữa dê:

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 0,0084 % đối với hàm lượng nitơ (0,052 % đối với hàm lượng protein thô)

c. Sữa cừu:

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 0,0078 % đối với hàm lượng nitơ (0,05 % đối với hàm lượng protein thô)

2. *Độ lặp lại của nền phomat cứng, bán cứng và phomat chế biến*

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 0,0489 % đối với hàm lượng nitơ (0,312 % đối với hàm lượng protein thô)

3. *Độ lặp lại của nền sữa dạng khô và sản phẩm sữa dạng khô:*

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 0,007M (trong đó M là giá trị trung bình của hai kết quả)

4. 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.

✓ Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu:

- BM.15.04b
- BM.15.06