

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 8099-1:2015**

**ISO 8968-1:2014**

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA - XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITO -  
PHẦN 1: NGUYÊN TẮC KJELDAHL VÀ TÍNH PROTEIN THÔ**

*Milk and milk products -- Determination of nitrogen content --  
Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation*

**HÀ NỘI - 2015**

## Lời nói đầu

TCVN 8099-1:2015 thay thế TCVN 8099-1:2009, TCVN 8099-2:2009 và TCVN 8179:2009;

TCVN 8099-1:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 8968-1:2014;

TCVN 8099-1:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biến soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

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

- TCVN 8099-1:2015 (ISO 8968-1:2014), *Phần 1: Phương pháp Kjeldahl;*
- TCVN 8099-3:2009 (ISO 8968-3:2001), *Phần 3: Phương pháp phân huỷ kín (Phương pháp thông dụng nhanh Semi-micro);*
- TCVN 8099-4:2009 (ISO 8968-4:2001), *Phần 4: Phương pháp xác định hàm lượng nitơ phi protein;*
- TCVN 8099-5:2009 (ISO 8968-5:2001), *Phần 5: Phương pháp xác định hàm lượng nitơ protein.*

## Sữa và sản phẩm sữa - Xác định hàm lượng nitơ - Phần 1: Nguyên tắc Kjeldahl và tính protein thô

*Milk and milk products - Determination of nitrogen content -*

*Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation*

**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 quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nitơ và tính protein thô trong sữa và các sản phẩm sữa theo nguyên tắc Kjeldahl, sử dụng các phương pháp phân hủy truyền thống và phân hủy kín.

Các phương pháp này có thể áp dụng cho:

- sữa bò dạng lỏng (sữa nguyên chất, sữa tách một phần chất béo hoặc sữa già), sữa dê và sữa cừu nguyên chất;
- phomat cứng, phomat bán cứng và phomat chế biến;
- sữa bột và sản phẩm sữa bột (bao gồm sữa công thức cho trẻ sơ sinh, protein sữa đậm đặc, protein whey đậm đặc, casein và caseinat).

Các phương pháp này không áp dụng cho các mẫu chứa các amoni caseinat.

**CHÚ THÍCH:** Các kết quả tính protein thô thu được sẽ không chính xác, nếu trong các sản phẩm có mặt các nguồn nitơ không phải từ sữa.

## 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 (nếu có).

TCVN 7149 (ISO 385), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thuỷ tinh – Buret*.

TCVN 10505-3 (ISO 8655-3), *Dụng cụ đo thể tích có cơ cấu pittông – Phần 3: Buret pittông*.

## 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)

Khối lượng của nitơ xác định được bằng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH 1 Hàm lượng nitơ được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

### 3.2

#### Hàm lượng protein thô (crude protein content)

Khối lượng protein thô tính được bằng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH 1 Hàm lượng protein thô được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

## 4 Nguyên tắc

Phản mẫu thử được phân hủy bằng hỗn hợp của axit sulfuric đậm đặc và kali sulfat. Sử dụng đồng (II) sulfat làm chất xúc tác để chuyển nitơ hữu cơ có mặt về amoni sulfat. Dùng 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 dung dịch phân huỷ đã để nguội làm giải phóng amoniac. Amoniac giải phóng được chưng cất hơi trong dung dịch axit boric dư và sau đó dung dịch này được chuẩn độ bằng dung dịch thể tích chuẩn axit clohydric. Hàm lượng nitơ tính được từ lượng amoniac tạo thành.

## 5 Thuốc thử

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

CHÚ THÍCH: Các dung dịch quy định trong tiêu chuẩn này có thể khác với các dung dịch quy định cho các bộ chuẩn độ tự động. Trong tiêu chuẩn đã quy định rõ, tuy nhiên người phân tích cần tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất thiết bị.

### 5.1 Kali sulfat ( $K_2SO_4$ ), không chứa nitơ.

### 5.2 Dung dịch đồng (II) sulfat ngậm 5 phân tử nước, $c(CuSO_4 \cdot 5H_2O) = 5,0 \text{ g}/100 \text{ ml}$ .

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 ( $H_2SO_4$ ), trong khoảng từ 95 % đến 98 % khối lượng, không chứa nitơ (xấp xỉ $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$ ).

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

Với các hệ thống chưng cất tự động, có thể sử dụng các phần khối lượng khác của natri hydroxit, với điều kiện là có lượng dư natri hydroxit trong hỗn hợp chưng cất, ví dụ: có thể sử dụng phần khối lượng natri hydroxit 40 % khối lượng thay cho 50 % khối lượng khi phần làm kín của hệ thống dòng chảy của hệ thống gấp vẫn đè. Tổng thể tích dung dịch natri hydroxit cần được xem xét để duy trì các thể tích chưng cất thích hợp.

### 5.5 Dung dịch chất chỉ thị

Hoà tan 0,1 g đỏ methyl trong etanol 95 % (thể tích) trong bình định mức một vạch 50 ml (6.16). Pha loãng bằng etanol đến 50 ml và trộn. Hoà tan 0,5 g xanh bromocresol trong etanol 95 % (thể tích) đựng trong bình định mức một vạch 250 ml (6.16). Pha loãng đến 250 ml bằng etanol và trộn. 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 ( $H_3BO_3$ ) trong 1 lít nước nóng đựng trong bình định mức một vạch dung tích 1000 ml (6.16). Để dung dịch này nguội đến  $20^\circ\text{C}$ . Pha loãng bằng nước đến vạch, thêm 3 ml dung dịch chất chỉ thị (5.5) và trộn. Bảo quản dung dịch trong chai thuỷ tinh bo silicat, dung dịch này sẽ có màu cam nhạt. Bảo quản dung dịch này tránh ánh sáng và các nguồn hơi amoniac.

Với các hệ thống chưng cất tự động, có thể sử dụng các nồng độ khác của axit boric sau khi đánh giá.

Nếu sử dụng chuẩn độ điểm kết thúc pH, 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 quy trình chuẩn độ đúng.

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

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. Thông thường, các sai số hệ thống (có thể tránh được) do người

phân tích gây ra khi pha loãng dung dịch axit gốc đậm đặc và sau đó xác định nồng độ phân tử gam, 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.

Nếu dùng axit sulfuric thay cho axit clohydric, thì dung dịch này cần có nồng độ  $0,05 \pm 0,0003$  mol/l.

#### 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  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  không ít hơn 2 h. Để nguội trong bình 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 chất này trong tủ sấy trước khi sử dụng.

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

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

### 6 Thiết bị, dụng cụ

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

#### 6.1 Nồi cách thuỷ, có thể duy trì nhiệt độ nước từ $38^{\circ}\text{C}$ đến $40^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.2 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

#### 6.3 Buret hoặc pipet tự động, có thể phân phối các lượng 1,0 ml dung dịch đồng sulfat (5.2).

#### 6.4 Ống đồng chia độ, dung tích 25 ml, 50 ml, 100 ml và 500 ml.

#### 6.5 Bình nón, dung tích 500 ml.

#### 6.6 Buret tự động, dung tích thích hợp, ví dụ: 20 ml, được chia vạch ít nhất là 0,004 ml, phù hợp với các yêu cầu trong TCVN 10505-3 (ISO 8655-3). Cách khác, có thể sử dụng buret dung tích 50 ml được chia vạch ít nhất là 0,1 ml phù hợp với yêu cầu của loại A trong TCVN 7149 (ISO 385) để phân tích sữa.

CHÚ THÍCH: Buret thủ công không có độ phân giải đủ để thu được các chữ số có nghĩa cho tất cả các sản phẩm khác.

#### 6.7 Dụng cụ nghiên.

#### 6.8 Bình phân hủy, dung tích 500 ml hoặc 800 ml. Thích hợp cho hệ thống phân hủy được sử dụng và các yêu cầu của nhà sản xuất thiết bị phân hủy (6.10 hoặc 6.11).

**6.9 Chất trợ sôi**, ví dụ như: các mảnh sứ cứng hoặc hạt alundum (ví dụ: carbarundum) lưỡng tính có độ tinh khiết cao, thô, có cỡ mesh 10. Không sử dụng các chất trợ sôi đã sử dụng.

**CHÚ THÍCH:** Đổi khi các viên thuỷ tinh có đường kính khoảng 5 mm được sử dụng, nhưng không khuyến khích do hiệu quả sôi không đạt được như khi sử dụng các hạt alundum và khi sử dụng các viên thuỷ tinh này thi sẽ tạo bọt nhiều trong quá trình phân huỷ.

**6.10 Thiết bị phân huỷ**, để giữ các bình phân hủy (6.8) 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 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. Đổi 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.

**6.11 Thiết bị chưng cất (phương pháp truyền thống)**, được làm bằng thuỷ tinh bo silicat hoặc vật liệu thích hợp khác phù hợp với bình phân hủy (6.8) 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 polycloropren.

**CHÚ THÍCH:** Thiết bị chưng cất trên đây có thể được thay thế bằng thiết bị thích hợp khác hoặc thiết bị chưng cất hoàn thiện Parnas-Wagner.

**6.12 Buồng phân hủy (phương pháp phân hủy kín)**, buồng hợp kim nhôm hoặc buồng tương tự, có bộ phận kiểm soát điều chỉnh nhiệt độ và đo nhiệt độ của buồng.

**6.13 Ống phân thủy (phương pháp phân hủy kín)**, dung tích 250 ml, thích hợp để sử dụng với buồng phân hủy (6.12).

**6.14 Ống thải khí (phương pháp phân hủy kín)**, thích hợp để sử dụng với ống phân hủy (6.13).

**6.15 Thiết bị làm sạch ly tâm hoặc bơm lọc hoặc máy hút (phương pháp phân hủy kín)**, bằng vật liệu bền với axit để dùng với nguồn cấp nước chính.

**6.16 Bình định mức một vạch**, dung tích 50 ml, 250 ml và 1000 ml.

**6.17 Bộ chưng cất (phương pháp phân hủy kín)**, có thể chưng cất hơi, thủ công hoặc bán tự động, thích hợp với ống phân hủy 250 ml (6.13) và các bình nón 500 ml (6.5).

### 6.18 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 quy trình hiệu chuẩn pH của phòng thử nghiệm thông thường. Buret chuẩn độ tự động phải phù hợp với các yêu cầu của 6.6.

### 6.19 Dao trộn hoặc dụng cụ thích hợp khác.

6.20 Giấy lọc, không có nitơ, có kích thước và độ xốp thích hợp để giữ phần mẫu thử phomat.

### 6.21 Tấm khuấy từ rọi sáng.

## 7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy 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

### 8.1 Sữa dạng lỏng nguyên chất, sữa tách một phần chất béo và sữa già

Làm ấm mẫu thử trong nồi cách thuỷ (6.1) ở 38 °C đến 40 °C. Nhẹ nhàng trộn kỹ mẫu thử bằng cách đảo chiều chai đựng mẫu mà không tạo bọt hoặc tạo kẽm. Làm nguội mẫu đến nhiệt độ phòng ngay khi trộn xong.

Tiếp tục theo 9.1 hoặc 9.2.

### 8.2 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 mẫu thử bằng dụng cụ nghiền thích hợp (6.7). Trộn nhanh mẫu đã nghiền và tốt nhất nghiền nhanh lại. Phân tích ngay mẫu thử sau khi nghiền.

Cân lượng yêu cầu (Bảng A.1) của mẫu phomat đã nghiền, dùng dao trộn (6.19) chuyển sang giấy lọc (6.20) đã biết khối lượng và gấp nếp trước. Cuộn mẫu thử trong giấy lọc và cho tất cả vào đáy bình phân hủy (6.8) hoặc ống phân hủy (6.13) như trong 9.1.1 hoặc 9.2.1.

CHÚ THÍCH: Việc sử dụng giấy lọc có thể tăng việc tạo bọt trong hệ thống phân hủy khí. Để tránh điều này, khi sử dụng phương pháp phân hủy khí (9.2), thì không dùng giấy lọc mà cân mẫu cho vào bình thích hợp, cân phomat và bình, chuyển phomat vào bình phân hủy, cân lại bình rỗng và xác định khối lượng mẫu bằng cách lấy khối lượng của bình chứa phomat trừ đi khối lượng bình rỗng.

### 8.3 Sữa dạng khô và các sản phẩm sữa khô

Để mẫu thử đạt đến nhiệt độ phòng từ 20 °C đến 25 °C trước khi chuyển vào vật chứa có thể tích trong khoảng gấp hai lần thể tích mẫu thử. Đậy ngay nắp vật chứa để tránh làm thay đổi độ ẩm của mẫu. Trộn kỹ mẫu bằng cách xoay và đảo chiều vật chứa.

Tiếp tục theo 9.1 hoặc 9.2.

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Phương pháp chuẩn độ

#### 9.1.1 Phần mẫu thử và xử lý sơ bộ

Cho vào bình phân hủy (6.8) khô và sạch từ 5 đến 10 viên trợ sôi (6.9), 15,0 g kali sulfat (5.1), 1,0 ml dung dịch đồng (II) sulfat (5.2), một lượng mẫu thử đã chuẩn bị (8.1, 8.2 hoặc 8.3) theo Bảng A.1, 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 trên cổ bình. Trộn nhẹ lượng chứa trong bình phân hủy.

Có thể sử dụng các viên có bán sẵn để thay thế cho 5.1 và 5.2, ví dụ: 15 g kali sulfat và 0,05 g đồng (II) sulfat ngâm năm phân tử nước, với điều kiện:

- a) Các viên này chứa một lượng kali sulfat sao cho lượng yêu cầu có thể hòa tan sử dụng các viên còn nguyên để duy trì tỷ lệ muối axit (5.3) tương tự; Ví dụ: Ba viên mỗi viên chứa 5 g kali sulfat có thể sử dụng với 20 ml axit sulfuric (5.3), và
- b) Các viên này không chứa các muối của các kim loại độc hại, như selen hoặc thủy ngân.

#### 9.1.2 Tiến hành xác định

##### 9.1.2.1 Phân hủy

Bật hệ thống hút khói của thiết bị phân huỷ (6.10) trước khi bắt đầu phân huỷ. Làm nóng bình phân huỷ và lượng chứa bên trong (9.1.1) trên thiết bị phân huỷ, sử dụng bộ cài đặt nhiệt dù thấp để đốt phân huỷ mà không làm bọt trào lên cổ bình phân huỷ. Phân huỷ 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 6.10 và tiếp tục đốt nóng trong 15 min. Ở thời điểm cuối trong giai đoạn 15 min đốt nóng, tăng đến nhiệt độ cài đặt tối đa trong 6.10. Sau khi dịch thuỷ phân đỏ trong (có màu lục lam sáng trong) thì tiếp tục đun sôi 1 h đến 2,5 h ở nhiệt độ cài đặt tối đa. Nếu không thấy chất lỏng trong suốt sôi vì hình thành bọt trên bề mặt chất lỏng nóng là do nhiệt độ của thiết bị già nhiệt có thể quá thấp. Tổng thời gian phân huỷ sẽ nằm trong khoảng từ 1,8 h đến 3,25 h.

Để xác định thời gian sôi cần thiết trong các điều kiện phân tích của từng phòng thử nghiệm, sử dụng một bộ dụng cụ đặc thù, 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 2,5 h) sau khi làm trong. Các sản phẩm sữa khác cần phải có các thành phần mẫu tương tự với mẫu đã phân tích. Kết quả trung bình của protein tăng theo thời gian sôi lúc đầu không đổi và sau đó giảm khi thời gian sôi quá dài. Chọn thời gian sôi để cho kết quả protein tối đa đối với sản phẩm thử nghiệm.

Tại thời điểm kết thúc phân huỷ, dịch phân huỷ phải trong và không chứa vật liệu chưa phân huỷ. Để dịch phân huỷ nguội trong bình cầu mở nắp trong tủ hót riêng khoảng 25 min đến nhiệt độ phòng. Nếu bình cầu để nguội trên thiết bị gia nhiệt thì sẽ mất một khoảng thời gian dài hơn để đạt được nhiệt độ phòng. Dịch phân huỷ đã nguội phải ở dạng lỏng hoặc dạng lỏng có một ít kết tinh nhỏ ở đáy bình sau khi làm nguội trong 25 min. Không để dịch phân huỷ chưa pha loãng trong bình cầu qua đêm. Dịch phân huỷ chưa pha loãng có thể có kết tinh trong giai đoạn này và sẽ khó để phân hủy 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 huỷ 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 huỷ quá dài từ việc cài đặt nhiệt độ tối đa của bộ gia nhiệt không đúng.

Thêm 300 ml nước vào các bình phân hủy dung tích 500 ml hoặc 400 ml nước khi dùng các bình phân hủy dung tích 800 ml. Dùng nước để tráng rửa cổ bình. Trộn kỹ lượng chứa trong bình để hòa tan các phần kết tinh. Để hỗn hợp nguội lại đến nhiệt độ phòng trước khi chưng cất. Dịch phân huỷ đã pha loãng có thể được đây kín lại và giữ để chưng cất ở giai đoạn sau.

#### 9.1.2.2 Chưng cất

Bật bộ ngưng tụ nước của thiết bị chưng cát (6.11). Thêm 75 ml dung dịch natri hydroxit (5.4) vào dịch phân huỷ đã pha loãng (9.1.2.1) bằng cách rót cẩn thận xuống cổ bình phân hủy đặt nghiêng để tạo một lớp tại đáy bầu của bình. Cần có một lớp phân cách giữa hai dung dịch. Để giảm khả năng thất thoát amoniac, ngay sau khi bổ sung dung dịch natri hydroxit vào bình Kjeldahl thì nối ngay bình vào thiết bị chưng cát (6.11), đầu ra của ống ngưng ngập trong 50 ml dung dịch axit boric (5.6) đựng trong bình nón (6.5). Xoay mạnh bình phân hủy 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 trong bình phân hủy. Tiếp tục chưng cát cho đến khi bắt đầu sôi không đều (sôi sục) 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 cát phải sao cho thu được 150 ml dịch phân huỷ trước khi bắt đầu sôi không đều (sôi sục). Tổng thể tích các lượng chứa trong bình nón phải xấp xỉ 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.

### 9.1.2.3 Chuẩn độ

Dùng buret (6.6) chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.1.2.2) bằng axit clohydric (5.7). Điểm kết thúc đạt được khi dung dịch có vết màu hồng đầu tiên. Đọc buret chính xác đến 0,05 ml. Khi sử dụng máy khuấy từ rọi sáng (6.21) có thể giúp cho việc nhìn thấy điểm kết thúc.

Cách khác, chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.2.2) bằng dung dịch thử tích chuẩn axit clohydric (5.7) sử dụng máy chuẩn độ tự động đã hiệu chuẩn đúng có gắn máy đo pH (6.18). 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** Đối với hệ thống chất chỉ thị và dung dịch axit boric 4 % quy định trong phương pháp này thì vết hồng đầu tiên quan sát được giữa pH 4,3 và 4,6. Thực tế, tốc độ thay đổi pH phụ thuộc vào HCl 0,1 mol/l bổ sung 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 thông kê hiệu năng 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.

## 9.2 Phương pháp phân hủy kín

### 9.2.1 Phản mẫu thử và xử lý sơ bộ

Cho vào một ống phân huỷ sạch và khô (6.13) 12,0 g kali sulfat (5.1), 1,0 ml dung dịch đồng (II) sulfat (5.2), một lượng mẫu thử đã chuẩn bị (8.1, 8.2 hoặc 8.3) như trong Bảng A.1, được cân chính xác đến 0,1 mg và 20 ml axit sulfuric (5.3), dùng axit sulfuric để rửa đồng (II) sulfat, kali sulfat hoặc mẫu thử còn lại trên thành trên của ống phân huỷ cho trôi hết xuống bình. Trộn nhẹ lượng chứa trong ống.

**CHÚ THÍCH:** Việc sử dụng các thử tích axit lớn hơn 20 ml trong các hệ thống phân hủy kín tạo bọt quá mức trong quá trình phân hủy và cho các kết quả khác nhau. Người sử dụng thiết bị phân huỷ kín cần lưu ý để duy trì đủ một lượng axit sulfuric dư tại cuối giai đoạn phân huỷ, việc này cần được người phân tích chú ý nhiều hơn trong phân hủy kín so với các hệ thống cổ truyền. Trong hệ thống phân huỷ kín thì thoát thoát nhiều axit hơn do hút khói so với hệ thống cổ truyền.

Để thay cho 5.1 và 5.2 có thể sử dụng các viên có bán sẵn, ví dụ: 3,5 g kali sulfat, 0,105 đồng (II) sulfat ngâm nấm phân tử nước và 0,105 g titan dioxit, với điều kiện:

- các viên chứa một lượng kali sulfat sao cho có thể có một lượng cần thiết sử dụng số tích phân của các viên nguyên có chứa tỷ lệ tương tự của muối/axit (5.3). Ví dụ: hai viên mỗi viên chứa 3,5 g kali sulfat, có thể được sử dụng với 12 ml axit sulfuric (5.3) và
- các viên không được chứa các muối kim loại độc hại như selen hoặc thủy ngân.

## 9.2.2 Phép xác định

### 9.2.2.1 Phân hủy

Cài đặt bộ phận phân huỷ kín (6.12) ở nhiệt độ ban đầu thấp để kiểm soát việc tạo bọt (ở khoảng từ 180 °C đến 230 °C). Chuyển ống phân huỷ sang buồng phân huỷ kín và đặt ống thoát khí (6.14), ống này được nối với tháp rửa khí ly tâm của dụng cụ tương tự (6.15) trên đỉnh ống phân huỷ. Tốc độ hút của tháp rửa khí ly tâm hoặc dụng cụ tương tự phải vừa đủ để loại bỏ khói. Thiết bị phân huỷ hoàn chỉnh cần được đặt trong tủ hút khói.

Trong các trường hợp không tạo bọt, có thể chuyển các ống phân huỷ (6.13) với phần mẫu thử (9.2.1) sang buồng phân huỷ kín (6.12) đã được cài đặt trước ở nhiệt độ từ 410 °C đến 430 °C mà không điều chỉnh tiếp nhiệt độ.

Phân huỷ phần mẫu thử trong 30 min hoặc cho đến khi có khói trắng. Sau đó tăng nhiệt độ của buồng phân huỷ kín đến khoảng từ 410 °C đến 430 °C. Tiếp tục phân huỷ phần mẫu thử cho đến khi dịch phân huỷ trong.

Cũng có thể phải tăng từ từ nhiệt độ trong khoảng 20 min để hạn chế tạo bọt. Trong mọi trường hợp, không để bọt dâng lên quá 4 cm đến 5 cm dưới bề mặt của tháp rửa khí được đặt trên đỉnh ống phân huỷ.

Sau khi dịch phân huỷ đã trong (có màu lục lam sáng), tiếp tục phân huỷ ở nhiệt độ từ 410 °C đến 430 °C trong ít nhất 1 h. Trong suốt quá trình này axit sulfuric phải sôi. Nếu không nhìn thấy chất lỏng trong suốt sôi vì hình thành các bọt trên bề mặt chất lỏng bao quanh vành đai ống thì có thể do nhiệt độ của buồng phân huỷ quá thấp.

Tổng thời gian phân huỷ phải nằm trong khoảng từ 1,75 h đến 3 h. Có thể cần đến thời gian phân huỷ dài hơn đối với các sản phẩm có tạo bọt được kiểm soát bằng cách hạ thấp nhiệt độ phân huỷ ban đầu dưới 410 °C.

Để xác định thời gian sôi cần thiết trong các điều kiện phân tích của 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 2,5 h) sau khi làm trong. Các sản phẩm sữa khác cần đến các mẫu có các thành phần tương tự với mẫu cần phân tích. Kết quả trung bình của protein tăng theo thời gian sôi trở nên không đổi và 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 huỷ, dịch phân huỷ phải trong và không chứa vật liệu chưa phân huỷ. Lấy ống phân huỷ cùng với tháp rửa khí ra khỏi buồng phân huỷ kín.

Để dịch phân huỷ nguội đến nhiệt độ phòng trong khoảng 25 min. Dịch phân huỷ đã nguội phải ở dạng lỏng hoặc dạng lỏng có một ít kết tinh trên đáy ống phân huỷ. Không để qua đêm dịch phân huỷ chưa pha loãng trong bình cầu. Dịch phân huỷ chưa pha loãng có thể kết tinh trong giai đoạn này và sẽ khó để phân hủy 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 huỷ 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 huỷ quá dài ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối đa của phép phân tích. Để giảm việc thất thoát axit, thi giảm tốc độ hút khói.

Sau khi dịch phân huỷ nguội đến nhiệt độ phòng trong khoảng 25 min, tháo tháp rửa khí ra và cẩn thận thêm 85 ml nước vào mỗi ống. Xoay để trộn trong khi đảm bảo các tinh thể tách ra được hoà tan. Để nguội lượng chứa trong ống trở lại nhiệt độ phòng.

#### 9.2.2.2 Chưng cất

Bật bộ ngưng tụ nước của thiết bị chưng cất. Gắn ống phân huỷ có chứa dịch phân huỷ đã pha loãng vào thiết bị chưng cất (6.17). Đặt bình nón (6.5) có chứa 50 ml dung dịch axit boric (5.6) dưới đầu ra của bộ ngưng tụ, sao cho đầu ra của ống thấp hơn bề mặt của dung dịch axit boric. Điều chỉnh thiết bị chưng cất (6.17) để phân phối 55 ml dung dịch natri hydroxit (5.4).

Khi sử dụng dung dịch natri hydroxit 40 % khởi lượng, thì thể tích phân phối phải là 65 ml. Nếu việc phân phối tự động dung dịch natri hydroxit dao động nhiều do tắc cục bộ của đường ống phân phối dung dịch natri hydroxit, thì sẽ cho sai khác lớn trong các kết quả lặp lại.

Cho vận hành thiết bị chưng cất theo chỉ dẫn của nhà sản xuất để chưng cất amoniac đã giải phóng bằng cách bổ sung dung dịch natri hydroxit, thu lấy dịch cát trong dung dịch axit boric. Tiếp tục quá trình chưng cất cho đến khi thu được ít nhất 150 ml dịch cát. Tháo bình nón ra khỏi thiết bị chưng cất và làm ráo đầu tip chưng cất. Tráng rửa bên trong và bên ngoài đầu tip bằng nước, thu lấy nước rửa cho vào bình nón. Sau mỗi mẫu, đầu tip luôn luôn được tráng rửa bằng nước. Bình ngưng phải giữ được nhiệt độ của các lượng chứa trong bình nón không vượt quá 35 °C trong quá trình chưng cất khi sử dụng phương pháp so màu điểm kết thúc.

#### 9.2.2.3 Chuẩn độ

Dùng buret (6.6) chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.2.2.2) bằng axit clohydric (5.7). Điểm kết thúc đạt được khi dung dịch có vết màu hồng đầu tiên. Đọc buret chính xác đến 0,05 ml. Sử dụng máy khuấy từ nên được rọi sáng (6.21) có thể giúp cho việc nhìn thấy điểm kết thúc.

Cách khác, chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.2.2.2) bằng dung dịch thể tích chuẩn axit clohydric (5.7) sử dụng máy chuẩn độ tự động đã hiệu chuẩn đúng có gắn máy đo pH (6.18). 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.

## TCVN 8099-1:2015

**CHÚ THÍCH 1** Đổi với hệ thống chất chỉ thị và dung dịch axit boric 4 % quy định trong phương pháp này thì vết hồng đầu tiên quan sát được giữa pH 4,3 và 4,6. 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 đổi 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 chuẩn độ mẫu trắng bằng dung dịch thè tích chuẩn axit clohydric (5.7) và dùng buret (6.6) hoặc máy chuẩn độ tự động có gắn máy đo pH (6.18) như đã sử dụng đổi với các phần mẫu thử. Tiến hành phép thử trắng theo quy trình trong 9.1 đến 9.2. Thay phần mẫu thử bằng 5 ml nước và khoảng 0,85 g sacarose (5.10).

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

Đổi với mục đích này có thể sử dụng 0,85 g sacarose (5.10) mà không bổ sung nước.

**CHÚ THÍCH:** Mục đích của việc sử dụng sacarose trong phép thử trắng hoặc chuẩn thu hồi là 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 còn 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 dư có mặt trong giai đoạn cuối phân huỷ 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 có thể thấp nhặt 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 lớn hơn 0,00 ml. Các phép thử trắng thực hiện trong cùng một phòng thử nghiệm luôn phải ổn định. Nếu mẫu trắng đã có màu hồng trước khi bắt đầu chuẩn độ thì đã có sai sót. Thông thường trong những trường hợp đó thì các bình nón không sạch hoặc nước từ không khí ẩm có thể ngưng tụ trên mặt ngoài của dụng cụ ngưng đà chảy vào bình thu nhận. Các giá trị mẫu trắng điển hình bằng hoặc thấp hơn 0,2 ml.

### 9.4 Các phép thử về độ thu hồi

**9.4.1** Độ đúng của quy 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.

**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 sacarose (5.10).

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

Phần trăm nitơ thu hồi phải lớn hơn 99 % 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 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 thấp thì việc 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 chưng cất truyền thống bị hở hoặc đầu tip của bộ ngưng không được ngập trong axit boric trong khi chưng cất. Thiết bị chưng cất đạt yêu cầu này trước khi thực hiện kiểm tra độ thu hồi theo 9.4.3.

Khi độ thu hồi nitơ vượt quá 100 % và không có sự thoát nitơ, có thể có một số nguyên nhân 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; hoặc
- e) tốc độ chuẩn độ của buret vượt quá tốc độ tối đa của buret đó hiệu chuẩn.

Cho dù độ thu hồi lý thuyết tối đa không vượt quá 100 % nhưng thực tế có thể thu được độ thu hồi cao hơn do độ không đảm bảo đo, nghĩa là 99 % đến 101 % có thể thu được. Nếu độ thu hồi trung bình của các phép thử cao hơn 100 %, thì cần nghiên cứu thêm.

#### 9.4.3 Kiểm tra hiệu quả của quy 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 sacarose (5.10).

**CHÚ THÍCH:** Tryptophan (5.9) là chất chỉ thị thích hợp về hiệu quả phân huỷ đối với các loại sữa dạng lỏng, nhưng không phải đối với sữa bột và sản phẩm sữa bột; lysin hydro clorua (5.9) được sử dụng để cung cấp thêm chỉ thị đại diện hơn về hiệu quả phân huỷ đối với các sản phẩm sữa bột này.

ít nhất là 98 % nitơ phải được thu hồi. Nếu độ thu hồi thấp hơn 98 %, trong khi thu hồi được amoni sulfat từ 99 % đến 100 % khối lượng, thì do nhiệt độ hoặc thời gian phân huỷ là chưa đủ hoặc mẫu chưa phân huỷ hết (nghĩa là hoá than) trong bình Kjeldahl.

#### 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 quy trình và/hoặc nồng độ của dung dịch axit clohydric thể tích chuẩn (5.7) không đúng.

Các phòng thử nghiệm thực hiện phép thử này nên tham gia vào chương trình thử nghiệm thành thạo quốc tế.

## 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 (1) sau đây:

$$w_n = \frac{1,4007 (V_s - V_b) \times M_t}{m} \quad (1)$$

Trong đó

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

$V_s$  là thể tích của dung dịch thử tích chuẩn axit clohydric (5.7) được sử dụng trong phép xác định (9.1.2.3 hoặc 9.2.2.3), chính xác đến 0,05 ml, tính bằng mililít (ml);

$V_b$  là thể tích của dung dịch thử tích chuẩn axit clohydric (5.7) được sử dụng trong phép thử trắng (9.3), chính xác đến 0,05 ml, tính bằng mililít (ml);

$M_t$  là nồng độ mol/l của dung dịch thử tích chuẩn axit clohydric (5.7), lấy chính xác đến bốn chữ số thập phân. Nếu sử dụng axit sulfuric thay thế cho axit clohydric, thì  $M_t$  là nồng độ mol chính xác của axit sulfuric nhân với hệ số 2, biểu thị đến bốn chữ số thập phân;

$m$  là khối lượng phần mẫu thử (9.1.1 hoặc 9.2.1), chính xác đến 0,1 mg, tính bằng gam (g).

### 10.1.2 Tính hàm lượng protein khô

10.2.1 Tính hàm lượng protein khô của mẫu thử,  $w_p$ , sử dụng công thức (2) sau đây:

$$w_p = w_n \times 6,38 \quad (2)$$

Trong đó

$w_p$  là hàm lượng protein khô, 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 (10.1.1).

6,38 là hệ số để chuyển đổi hàm lượng nitơ thành hàm lượng protein khô.

### 10.1.3 Độ thu hồi

Tính hệ số thu hồi nitơ,  $R_n$ , sử dụng công thức (3) sau đây:

$$R_n = \frac{w_n \times 100}{T_n} \quad (3)$$

Trong đó:

$R_n$  là hệ số thu hồi của nitơ, biểu thị bằng phần trăm khối lượng (%);

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

$T_n$  là hàm lượng nitơ lý thuyết của chất, tính bằng phần trăm khối lượng (%).

Hàm lượng nitơ lý thuyết đối với amoni sulfat là 21,20 %, tryptophan là 13,72 % và lysin hydro clorua là 15,34 %.

Các giới hạn dưới của độ thu hồi trong 9.4 dựa trên phép thử tối thiểu trong 5.7 và 5.8. Không đưa độ tinh khiết của thuốc thử vào tính độ thu hồi.

## 10.2 Biểu thị kết quả

### 10.2.1 Yêu cầu chung

Các kết quả thu được không được làm tròn số tiếp theo cho đến khi thực hiện tính kết quả cuối cùng.

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 quy bội số. Khi đó các giá trị thu được không được làm tròn trước khi dùng để tính toán tiếp theo.

### 10.2.2 Hàm lượng nitơ

Biểu thị kết quả thu được chính xác đến bốn chữ số thập phân, nếu cần để tính toán tiếp theo. Đối với kết quả cuối cùng, biểu thị kết quả đến ba chữ số thập phân.

### 10.2.3 Hàm lượng protein thô

Biểu thị kết quả thu được chính xác đến ba chữ số thập phân, nếu cần để tính toán tiếp theo. Đối với kết quả cuối cùng, biểu thị kết quả đến hai chữ số thập phân.

## 11 Độ chum

### 11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Các giá trị độ lặp lại và độ tái lập đối với sữa và sản phẩm sữa quy định trong tiêu chuẩn này đã được

công bố [5], [6], [7], [8], [9], [10]. 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.

## 11.2 Sữa dạng tòng, sữa nguyên chất và sữa gầy

### 11.2.1 Độ lặp lại

#### 11.2.1.1 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).

#### 11.2.1.2 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).

#### 11.2.1.3 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 (0,050 % đối với hàm lượng protein thô).

### 11.2.2 Độ tái lập

#### 11.2.2.1 Sữa bò

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).

#### 11.2.2.2 Sữa dê

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 0,0131 % đối với hàm lượng nitơ (0,084 % đối với hàm lượng protein thô).

### 11.2.2.3 Sữa cừu

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 0,0114 % đối với hàm lượng nitơ (0,073 % đối với hàm lượng protein thô).

## 11.3 Phomat cứng, bán cứng và phomat chè biến

### 11.3.1 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 0,0489 % đối với hàm lượng nitơ (0,312 % đối với hàm lượng protein thô).

### 11.3.2 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 0,067 % đối với hàm lượng nitơ (0,428 % đối với hàm lượng protein thô).

## 11.4 Sữa dạng khô và sản phẩm sữa dạng khô

### 11.4.1 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  $0,007 M$ , trong đó  $M$  là giá trị trung bình của hai kết quả.

### 11.4.2 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  $0,013 M$ , trong đó  $M$  là giá trị trung bình của hai kết quả.

## 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 đó sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đó dựng, vien dán tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tuỳ ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, nếu đáp ứng các yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được;

**Phụ lục A**  
**(Tham khảo)**

**Phản mẫu thử**

**Bảng A.1 – Kích thước phản mẫu thử để xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô trong sữa và sản phẩm sữa theo nguyên tắc Kjeldahl**

Mẫu	Kích thước phản mẫu thử
Sữa bò nguyên chất và sữa giàn dạng lỏng	$5 \text{ g} \pm 0,10 \text{ g}$
Sữa dê nguyên chất và sữa giàn dạng lỏng	$5 \text{ g} \pm 0,10 \text{ g}$
Sữa cừu nguyên chất và sữa giàn dạng lỏng	$2,5 \text{ g} \pm 0,10 \text{ g}$
Phomat cứng, bán cứng và phomat mềm	$1 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$
Sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh và sữa khô	$0,5 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$
Protein sữa đậm đặc, whey protein đậm đặc, casein và caseinat	$0,25 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$

**Phụ lục B**

(Tham khảo)

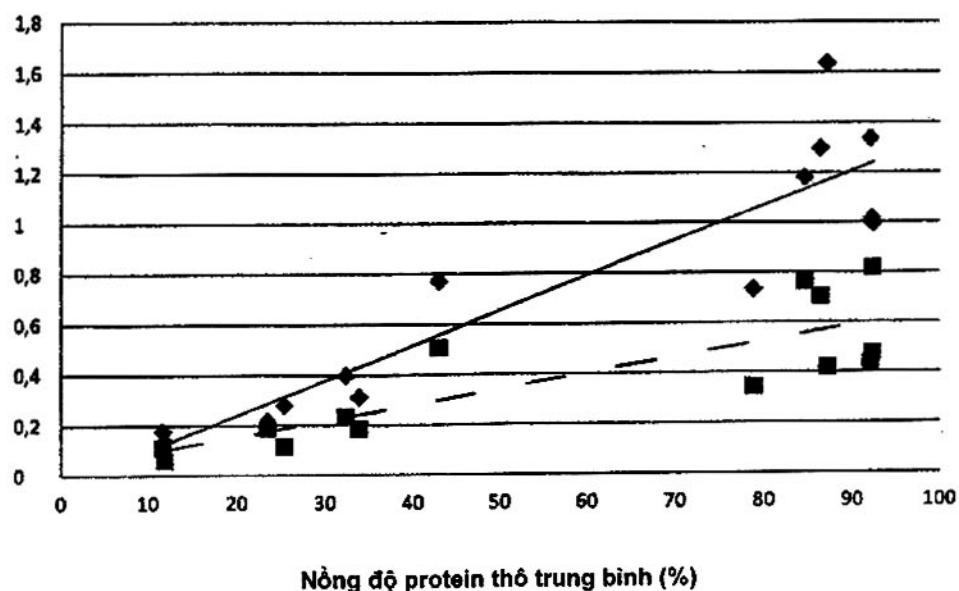
**Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm**

**Bảng B.1 – Thống kê các thông số thử nghiệm liên phòng về phần trăm protein thô ( $N \times 6,38$ ) trong sữa và sản phẩm sữa xác định theo nguyên tắc Kjeldahl, sau khi đã trừ ngoại lệ [5], [6], [7], [8], [9]**

<b>Mẫu</b>	<b>Số liệu thống kê</b>						
	Trung bình (%)	$s_r$	$s_R$	$C_{V,r} (%)$	$C_{V,R} (%)$	$R$ ( $2,8.s_r$ )	$R$ ( $2,8.s_R$ )
Sữa bò nguyên chất và sữa giày dạng lỏng	3,395	0,014	0,017	0,39	0,50	0,038	0,049
Sữa dê nguyên chất	4,807	0,018	0,030	0,37	0,62	0,052	0,084
Sữa cừu nguyên chất	5,398	0,018	0,026	0,35	0,49	0,050	0,073
Phomat	26,461	0,111	0,153	0,42	0,58	0,312	0,428

**Bảng B.2 – Thống kê các thông số thử nghiệm liên phòng về phần trăm protein thô (N x 6,38) trong sữa và sản phẩm sữa xác định theo nguyên tắc Kjeldahl, sau khi đã trừ ngoại lệ [10]**

<b>Mẫu</b>	<b>Số liệu thống kê</b>						
	Trung bình (%)	$s_r$	$s_R$	$C_{V,r}(\%)$	$C_{V,R}(\%)$	$R$ (2,8. $s_r$ )	$R$ (2,8. $s_R$ )
Sữa bột nguyên chất (2000)	23,47	0,067	0,077	0,28	0,33	0,19	0,22
Sữa bột nguyên chất (1995)	25,37	0,042	0,100	0,16	0,39	0,12	0,28
Sữa bột già (2004)	33,85	0,066	0,111	0,20	0,33	0,18	0,31
Sữa bột già (2009)	32,32	0,083	0,142	0,26	0,44	0,23	0,40
Thức ăn công thức cho trẻ sơ sinh (2011)	11,71	0,039	0,064	0,34	0,54	0,11	0,18
Thức ăn công thức cho trẻ sơ sinh (2010)	11,90	0,022	0,049	0,19	0,41	0,06	0,14
Protein sữa đậm đặc (1971)	42,98	0,181	0,275	0,42	0,64	0,51	0,77
Protein sữa đậm đặc (1992)	84,67	0,273	0,422	0,32	0,50	0,76	1,18
Whey protein đậm đặc (2005)	78,86	0,122	0,262	0,15	0,33	0,34	0,73
Whey protein đậm đặc (2002)	92,36	0,292	0,355	0,32	0,38	0,82	0,99
Casein (2006)	86,45	0,251	0,464	0,29	0,54	0,70	1,30
Casein (2001)	87,20	0,150	0,583	0,17	0,67	0,42	1,63
Caseinat (1988)	92,08	0,157	0,477	0,17	0,52	0,44	1,34
Caseinat (1984)	92,27	0,170	0,363	0,18	0,39	0,48	1,02



#### CHÚ ĐÁN

- ◆ độ tái lập
- độ lặp lại
- đường tuyến tính (tái lập)
- đường tuyến tính (lặp lại)

Hình B.1 – Mối tương quan giữa  $r$  và  $R$  với nồng độ protein thô (%)<sup>[10]</sup>

Vì các giá trị độ chụm có liên quan chặt chẽ đến nồng độ protein, nên việc sử dụng các giá trị độ lặp lại và độ tái lập là thích hợp.

Độ lặp lại tương đối trung bình,  $r$  là 0,69 (%) và độ tái lập tương đối trung bình,  $R$  là 1,28 (%).

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*.
- [2] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chum) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Các định nghĩa và nguyên tắc chung*.
- [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chum) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản để xác định độ lặp lại và độ tái lặp của phương pháp đo tiêu chuẩn*.
- [4] J.K. Parnas, R. Wagner Über die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl, *Biochem. Z.*, 125, 1921, pp. 253–256
- [5] D.M. Barbano, J.L. Clark, C.E. Dunham, J.R. Fleming Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk: Collaborative study. *Journal of AOAC.*, 73, 1990 pp. 849–859
- [6] J.M. Lynch, D.M. Barbano, J.R. Fleming Performance evaluation of direct forced-air total solids and Kjeldahl total nitrogen methods: 1990 through 1995. *Journal of AOAC.*, 80, 1997, pp. 1038–1043
- [7] J.M. Lynch, D.M. Barbano Determination of the Total Nitrogen Content of Hard, Semihard and Processed Cheese by the Kjeldahl Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC.*, (85) 2, 2002, p. 445
- [8] S. Orlandini, L. Lattanzi, U. Paggi, G. Psathas, O. Leray Interlaboratory Collaborative Study on the Kjeldahl Reference Method for Nitrogen Determination in Goat Milk according to ISO 8968-1/2|IDF 20-1/2. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 440, 2009, pp. 15–24
- [9] S. Orlandini, G. Psathas, O. Leray Interlaboratory Collaborative Study on the Kjeldahl Reference Method for Nitrogen Determination in Sheep Milk according to ISO 8968-1/2|IDF 20-1/2. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 440, 2009, pp. 2–14
- [10] R. Johnson, R. Crawford Interlaboratory Collaborative Study on the Kjeldahl Reference Method for Nitrogen Determination of Dried Milk Products according to ISO 8968-1/2|IDF 20-1/2. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 459, 2012, pp. 2–14