

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.038 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:15/10/2017 Trang: 1/7
---	----------------------------------	---

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ TỔNG VÀ PROTEIN TRONG THỰC PHẨM BẰNG PHƯƠNG PHÁP KJELDAHL

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

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	15/10/2017

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.038 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:15/10/2017 Trang: 2/7
---	----------------------------------	---

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng.

- Phương pháp này được sử dụng để xác định hàm lượng nito protein trong thực phẩm bằng phương pháp kjeldahl.

II. Tài liệu tham khảo.

- Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo: AOAC 928.08

III. Nguyên tắc.

- Mẫu sẽ được phân hủy ở nhiệt độ 420°C trong H_2SO_4 đậm đặc với xúc tác hỗn hợp CuSO_4 và K_2SO_4 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.

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.

- Thiết bị phân tích máy phá mẫu của hãng Velp, model DK 20.
- Máy chưng cất đạm của hãng FOSS.

2. Thiết bị phân tích

- Cân phân tích có độ chính xác $\pm 0.1\text{mg}$
- Cân kỹ thuật có độ chính xác $\pm 0.01\text{g}$
- Ống kjeldahl 250ml
- Pipet thủy tinh
- Buret thủy tinh 25ml
- Micro Pipet, có thể điều chỉnh được thể tích

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.038 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:15/10/2017 Trang: 3/7
---	----------------------------------	---

- Các đầu típ 0.2ml, 1mL.
- Các ống nghiệm có nắp, thể tích 15mL, 50ml.
- Các bình erlen 150ml; 250ml.
- Các bình định mức 50mL; 100mL; 500mL; 1000mL.

II. Hoá chất và chất chuẩn.

1. Hoá chất.

Tất cả các hóa chất sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích.

Các dung dịch hóa chất phải được pha với nước cất 2 lần khử ion.

- Axit sunfuríc , $\rho = 1,84 \text{ g/ml}$: Tinh khiết phân tích
- Kali sunfat, (K_2SO_4): Tinh khiết phân tích
- CuSO_4 : tinh khiết phân tích
- NaOH: Tinh khiết phân tích
- $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ Merck
- Methyl xanh
- Methyl red
- Ethanol 95%
- Acetanilide
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Đá bọt

➤ Dung dịch hóa chất:

- Dung dịch Acid H_2SO_4 (0.1N): 2.8mL H_2SO_4 đậm đặc vào 1000mL nước cất.
- Dung dịch NaOH 0.1N: Cân 4g NaOH và hòa tan trong 1L dung dịch
- 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: Pha từ ống chuẩn.

2. Chất chuẩn.

- Acetanilide (Merck) có độ tinh khiết 99% hoặc tương đương
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: sấy khô ở $102^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ và để nguội trong bình hút ẩm trước khi sử

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.038 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:15/10/2017 Trang: 4/7
---	----------------------------------	---

dụng

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: kiểm soát hệ thống phá và máy chưng cất.

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

IV. Xử lý mẫu.

1. Chuẩn bị mẫu.

Trích dẫn “ hướng dẫn công việc đồng nhất mẫu trong phòng thí nghiệm – HD.KT.022”

Điều kiện bảo quản mẫu tùy theo từng nền mẫu.

2. Phương pháp tiến hành.

a. Phân hủy chất hữu cơ

Cân khoảng 2.0- 2.2g mẫu đồng nhất (mẫu đồng nhất theo HD.KT.022 nếu khách hàng không yêu cầu.) cho vào bình Kjeldahl, thêm 15g K_2SO_4 và 0.45g $CuSO_4$, thêm tiếp 20ml acid H_2SO_{4dd} theo thành ống Kjeldahl để tránh hiện tượng sôi trào. Lắc nhẹ cho đều, và nâng nhiệt độ của bếp lên từ từ để tránh chất lỏng trong bình không bị sôi phồng, không bắn lên cổ bình, khi nhiệt độ đạt tới $420^{\circ}C$ thì giữ trong 1giờ, tắt bếp, để nguội.

b. Chưng cất amoniac

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.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.038 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:15/10/2017 Trang: 5/7
---	----------------------------------	---

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:

Tiến hành giống IV.2 thay mẫu bằng khoảng 1g sacarose

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.

4. Mẫu kiểm soát

- ✓ Kiểm soát hiệu suất phá mẫu: Cân 0.1g acetanilide cùng khoảng 1g sacarose vào ống kejhdal và tiến hành giống IV.2.
- ✓ Kiểm soát độ kín của hệ thống: Cân 0.1g $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 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.

1. Chuẩn độ lại dung dịch NaOH 0.01M

Rút chính xác V mL $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 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.

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:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.038 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:15/10/2017 Trang: 6/7
---	----------------------------------	---

V_1 : thể tích acid $H_2C_2O_4$ 0.01N, mL

N_1 : Nồng độ đương lượng của $H_2C_2O_4$, N

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

C_{NaOH} : Nồng độ NaOH, mol/L

2. Xác định hàm lượng nitơ:

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

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.

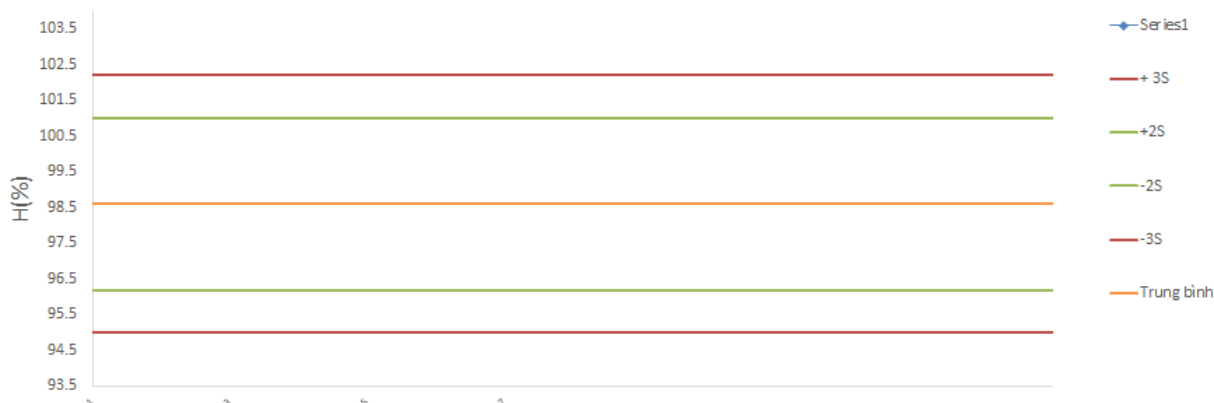
M: Khối lượng phân tử gam của nitơ

$$\text{Protein} = N * 6.25$$

D. KIỂM SOÁT DỮ LIỆU QA/QC

- ✓ Hiệu suất thu hồi từ kiểm soát hệ thống phá bằng chất acetanilide phải lớn hơn 98%
- ✓ Hiệu suất thu hồi của máy chưng cất từ việc kiểm soát bằng $(NH_4)_2SO_4$ phải lớn hơn 99%.
- ✓ Độ lệch của mẫu lặp mẫu trong giới hạn cho phép theo phụ lục f AOAC
- ✓ Biểu đồ kiểm soát xu hướng diễn biến kết quả phân tích (Control chart).

Biểu Đồ Quản Lý Chất Lượng Chỉ Tiêu Protein



CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.038 Lần ban hành:02 Ngày ban hành:15/10/2017 Trang: 7/7
---	--	---

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

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

- BM.15.04b
- BM.15.06