

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.296 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 2/6
---	----------------------------------	--

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng.

- Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định N tổng số và protein thô trong thủy sản và sản phẩm thủy sản.

II. Tài liệu tham khảo.

- Phương pháp này dựa trên: TCVN 3705:1990

III. Nguyên tắc.

- Vô cơ hóa mẫu thử bằng axit H_2SO_4 đậm đặc, nito có trong mẫu thử chuyển thành amoni sulfat. Dùng kiềm đậm đặc đẩy ammoniac ra khỏi amoni sulfat trong máy cất đạm, tạo thành amoni hydroxyt, rồi định lượng bằng axit.

VI. Thông tin an toàn phòng thí 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 (thao tác pha axit HCl 8M và sử dụng hexan...)
- Các hoá chất thải phải được thu gom vào các bình chứa riêng biệt, cụ thể và có dán nhãn nhận biết.

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ phân tích.

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

- Bếp phá đạm, ống kjeldahl.
- Máy chưng cất đạm
- Bình định mưa các loại
- Pipet các loại
- Ống đong 10ml, 100ml.
- Buret 25ml
- Erlen 250ml
- Cân phân tích

II. Hoá chất và chất chuẩn.

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác và nước được sử dụng phải là nước cất, nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương.

- H_2SO_4 đậm đặc và dung dịch 0.1N
- NaOH: dung dịch 33% và dung dịch 0.1N
- Hỗn hợp xúc tác: $CuSO_4$ và K_2SO_4 theo tỷ lệ 1:10.
- Chỉ thị hỗn hợp: 200mg đỏ metyl và 100mg xanh metylen trong 200ml etanol 96%
- Phenolphthalein 1% trong etanol.
- $H_2C_2O_4$ 0.1N chuẩn

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.296 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 3/6
---	----------------------------------	--

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 lặp
- Mẫu QC: Acetanilide

VI. xử lý mẫu.

1. Phá mẫu:

- Mẫu thử ở dạng sệt (mắm đặc, thủy sản): Cân 0.3-0.5g mẫu cho vào ống kjeldahl, thêm 1g hỗn hợp xúc tác và 10ml H₂SO₄ đậm đặc.
- Nếu mẫu thử là nước mắm: hút chính xác 10ml nước mắm vào bình định mức 200ml, thêm nước cất tới vạch, lắc đều. Hút 20ml dịch sau pha loãng cho vào bình kjeldahl, thêm chất xúc tác và 10ml H₂SO₄ đậm đặc
- Cho ống kjeldahl vào hệ thống pha mẫu, tăng nhiệt độ từ từ cho tới khi lên 420⁰C, để ở nhiệt độ này trong 1h hoặc cho đến khi thu được dung dịch trong suốt hoặc trong xanh. Ngừng đun, để nguội. Lưu ý dung dịch sau phá mẫu phải trong suốt không bị đen.

2. Chưng 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 H₂SO₄ 0.1N hoặc acid H₂SO₄ 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 ngập trong bình hứng đã chứa dung dịch acid sâu ít nhất là 1cm. Sau đó cho từ từ 5-20ml 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.

3. Chuẩn độ:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.296 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 4/6
---	--	--

- 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.

4. Mẫu trắng:

- Tiến hành giống IV.2 nhưng không có mẫu
- 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.

5. Mẫu kiểm soát:

- Kiểm soát hiệu suất phá mẫu: Cân 0.1g acetanilide 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 vào ống kejhdal và tiến hành giống IV.2.

C. TÍNH TOÁN KẾT QUẢ.

I. Chuẩn độ lại dung dịch NaOH 0.1M

Rút chính xác V mL $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0.1N, thêm 1 giọt chỉ thị phenolphthalein 1%. Sau đó tiến hành chuẩn độ bằng NaOH 0.1N 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 (N) 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. Đối với mẫu thủy sản:

1. Tổng hàm lượng nitơ tính bằng %, theo công thức sau:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.296 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 5/6
---	----------------------------------	--

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 14 \times 100}{m \times 1000}$$

trong đó:

V_1 là thể tích dung dịch NaOH chuẩn độ mẫu thử, tính bằng mililit (ml);

V_0 là thể tích dung dịch NaOH chuẩn độ mẫu trắng, tính bằng mililit (ml);

m là khối lượng mẫu, g

2. Hàm lượng protein được tính theo công thức sau:

$$\% \text{Protein} = X \times 6.25$$

3. Đối với nước mắm:

Hàm lượng N tổng số được tính gN/l theo công thức sau:

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times N \times 14 \times f}{V}$$

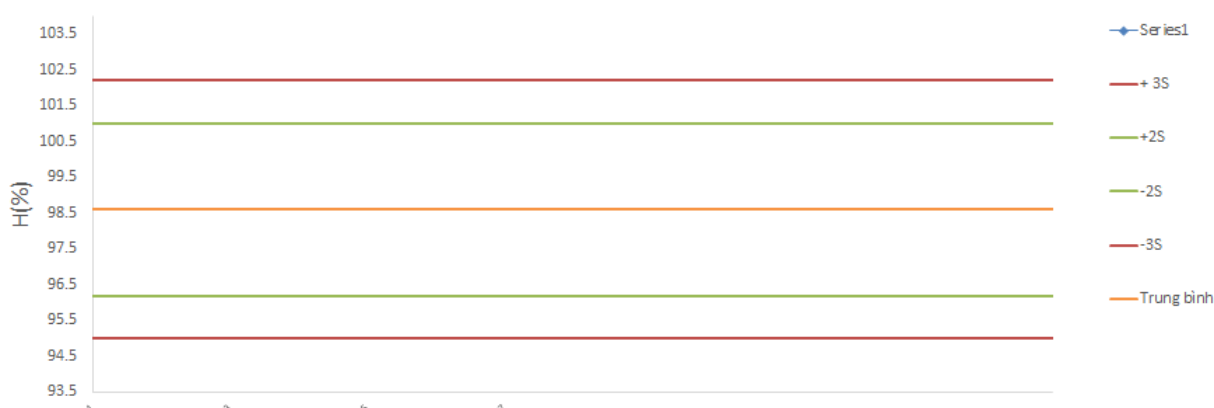
f: là hệ số pha loãng

V: thể tích mẫu mang đi phá, ml

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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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



E. BÁO CÁO KẾT QUẢ.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC PHÂN TÍCH	Mã số: HD.TN.296 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 20/6/2018 Trang: 6/6
---	--	---

- ✓ Kết quả phân tích được báo cáo theo biểu mẫu:
- BM.15.04b
 - BM.15.06