

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8099-4 : 2009

ISO 8968-4 : 2001

Xuất bản lần 1

**SỮA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ –
PHẦN 4: PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
NITƠ PHI PROTEIN**

*Milk – Determination of nitrogen content –
Part 4: Determination of non-protein-nitrogen content*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8099-4 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 8968-4 : 2001;

TCVN 8099-4 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8099 (ISO 8968), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ*, gồm các phần sau đây :

- TCVN 8099-1 : 2009 (ISO 8968-1 : 2001), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 1: Phương pháp Kjeldahl*;
- TCVN 8099-2 : 2009 (ISO 8968-2 : 2001), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 2: Phương pháp phân huỷ kín (Phương pháp Macro)*;
- TCVN 8099-3 : 2009 (ISO 8968-3 : 2004), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 3: Phương pháp phân huỷ kín (Phương pháp thông dụng nhanh Semi-macro)*;
- TCVN 8099-4 : 2009 (ISO 8968-3 : 2001), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 4: Phương pháp xác định hàm lượng nitơ phi protein*;
- TCVN 8099-5 : 2009 (ISO 8968-3 : 2001), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 5: Phương pháp xác định hàm lượng nitơ protein*.

Sữa – Xác định hàm lượng nitơ –

Phần 4: Phương pháp xác định hàm lượng nitơ phi protein

Milk – Determination of nitrogen content

Part 4: Determination of non-protein-nitrogen content

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 qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng nitơ phi protein trong sữa nguyên chất hoặc sữa gầy dạng lỏng.

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, bổ sung (nếu có).

TCVN 8099-1 : 2009 (ISO 8968-1 : 2001), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 1: Phương pháp Kjeldahl.*

TCVN 8099-2 : 2009 (ISO 8968-2 : 2001), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 2: Phương pháp phân huỷ kín (Phương pháp Macro.)*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

Hàm lượng nitơ phi protein (non-protein-nitrogen content)

Phần khối lượng của nitơ xác định được bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này

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

4 Nguyên tắc

Protein trong phần mẫu thử được kết tủa bằng cách bổ sung dung dịch axit tricloaxetic sao cho nồng độ cuối cùng của axit tricloaxetic trong hỗn hợp ở khoảng 12 %. Protein sữa kết tủa được lọc ra và dịch lọc còn lại có chứa các thành phần nitơ phi protein. Hàm lượng nitơ của dịch lọc xác định được bằng phương pháp qui định trong TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2).

CHÚ THÍCH Khi hàm lượng nitơ tổng số của mẫu sữa đã xác định được, thì hàm lượng nitơ protein đúng có thể tính được theo sự chênh lệch giữa hàm lượng nitơ tổng số và hàm lượng nitơ phi protein.

5 Thuốc thử

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

Các thuốc thử qui định để xác định hàm lượng nitơ tổng số được nêu trong TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2) và các thuốc thử sau đây. Phòng thử nghiệm có thể quyết định sử dụng phương pháp qui định trong TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2).

5.1 Dung dịch axit tricloaxetic (CCl_3COOH)

Hoà tan 15,0 g axit tricloaxetic trong nước trong bình định mức một vạch dung tích 100 ml. Thêm nước đến vạch. Không sử dụng các nồng độ và các lượng axit tricloaxetic khác với qui định.

Khi sử dụng các nồng độ và các lượng axit tricloaxetic khác với qui định thì các giá trị trung bình và hiệu năng giữa các phòng thử nghiệm sẽ khác nhau.

5.2 Dung dịch axit clohydric thể tích chuẩn, $c(\text{HCl}) = (0,1 \pm 0,0001) \text{ mol/l}$

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.

CHÚ THÍCH Thông thường các sai số hệ thống (mà có thể tránh được) do người phân tích gây ra khi pha loãng dung dịch axit gốc đậm đặc rồi xác định độ mol, 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 0,01 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. Khi dùng một axit khác (ví dụ như axit sulfuric) thay thế cho axit clohydric sẽ phát sinh sai số. Do đó, không khuyến cáo sử dụng các chất thay thế đó.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị của phòng thử nghiệm thông thường cùng với các thiết bị, dụng cụ qui định trong TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2), tùy thuộc vào phương pháp được chọn và cụ thể như sau:

- 6.1 **Nồi cách thủy**, có thể duy trì ở $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 6.2 **Bình nón**, dung tích 125 ml.
- 6.3 **Pipet**, dung tích 10 ml và 20 ml.
- 6.4 **Phễu lọc**, bằng thủy tinh, đường kính 75 cm.
- 6.5 **Giấy lọc**, không chứa nitơ, đường kính 15 cm (ví dụ: Whatman số 1¹) hoặc loại tương đương.
- 6.6 **Cốc có mỏ**, dung tích 50 ml.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải 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

Làm ấm mẫu thử trên nồi cách thủy (6.1) để ở $38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trộn kỹ mẫu thử một cách nhẹ nhàng bằng cách đảo chiều chai đựng mẫu mà không tạo bọt. Làm nguội mẫu đến nhiệt độ phòng ngay trước khi cân phần mẫu thử (9.1).

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử

Dùng pipet lấy $10\text{ ml} \pm 0,1\text{ ml}$ mẫu thử đã chuẩn bị (Điều 8) cho vào bình nón (6.2) đã cân chính xác đến $0,1\text{ mg}$, rồi cân lại chính xác đến $0,1\text{ mg}$.

CHÚ THÍCH Trong Phụ lục A của TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) có đưa ra cỡ mẫu đối với các sản phẩm khác của sữa khi áp dụng phương pháp này.

¹ Whatman là một ví dụ vì sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm đó.

TCVN 8099-4 : 2009

9.2 Tiến hành xác định

9.2.1 Kết tủa và lọc

Dùng pipet lấy 40 ml \pm 0,5 ml dung dịch axit tricloaxetic (5.1) cho vào bình nón có chứa phần mẫu thử (9.1). Cân bình cùng với phần mẫu thử này chính xác đến 0,1 mg. Xoay bình để trộn đều lượng chứa bên trong. Để yên 5 min cho kết tủa lắng xuống.

Lọc lượng chứa trong bình nón qua giấy lọc (6.5) trên phễu lọc (6.4). Thu lấy toàn bộ dịch lọc vào một bình nón (6.2) khô và sạch. Dịch lọc phải trong và không có kết tủa. Nếu không, cần lặp lại qui trình tạo phần kết tủa và lọc với phần mẫu thử mới.

Nếu các phép thử giống hệt nhau đã được thực hiện lặp lại, thì đối với mỗi một mẫu thử phải thực hiện hai qui trình tạo kết tủa và lọc riêng rẽ.

9.2.2 Chuẩn bị dịch lọc

Xoay bình nón (9.2.1) để trộn kỹ lượng chứa bên trong. Dùng pipet lấy 20 ml dịch lọc cho vào cốc có mỏ (6.6) dung tích 50 ml và cân. Rót phần dịch lọc từ cốc có mỏ sang bình Kjeldahl hoặc ống phân huỷ có chứa chất trợ sôi, kali sulfat và dung dịch đồng (II) sulfat như qui định trong TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2). Cân ngay cốc không chứa mẫu, chính xác đến 0,1 mg.

Phòng thử nghiệm có thể chọn TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2) để sử dụng.

9.2.3 Phân huỷ và chưng cất

Thêm một lượng thích hợp axit sulfuric vào bình Kjeldahl hoặc ống phân huỷ và tiếp tục thực hiện qui trình phân huỷ và chưng cất theo TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2).

9.2.4 Chuẩn độ

Chuẩn độ amoniac đã giải phóng bằng cách sử dụng qui trình qui định trong TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2), nhưng thay axit clohydric 0,1 mol/l bằng dung dịch axit clohydric 0,01 mol/l (5.2).

9.3 Phép thử trắng

Phân huỷ, chưng cất và chuẩn độ mẫu trắng gồm khoảng 0,1 g sacaroza và 16 ml \pm 0,5 ml dung dịch axit tricloaxetic (5.1).

Luôn chuẩn độ mẫu trắng bằng cùng một loại thuốc thử và thiết bị như đã sử dụng đối với các phần mẫu thử. Tiến hành thử mẫu trắng theo TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2). Thay phần mẫu thử bằng 16 ml \pm 0,5 ml dung dịch axit tricloaxetic (5.1) và 0,1 g sacaroza.

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

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Tính hàm lượng nitơ

10.1.1 Tính hàm lượng nitơ trong mẫu thử, w_{Np} , sử dụng công thức sau đây:

$$w_{Np} = \frac{1,4007 (V_s - V_b) \times M_r}{m_t \times m_m / (m_t - 0,065 m_m)}$$

trong đó

w_{Np} là hàm lượng nitơ phi protein (NPN) của mẫu, tính bằng phần trăm khối lượng (%);

V_s là thể tích của dung dịch axit clohydric (5.1) đã dùng trong phép xác định, chính xác đến 0,05 ml, tính bằng mililit (ml);

V_b là thể tích của dung dịch axit clohydric (5.1) đã dùng trong phép thử trắng, chính xác đến 0,05 ml, tính bằng mililit (ml);

M_r là nồng độ mol/l của axit clohydric (5.1), lấy chính xác đến bốn chữ số thập phân;

m_t là khối lượng của 20 ml dịch lọc (9.2.2), cân chính xác đến 0,1 mg, tính bằng gam;

m_m là khối lượng phần mẫu thử (9.1), cân chính xác đến 0,1 mg, tính bằng gam (g);

m_t là khối lượng phần mẫu thử có bổ sung 40 ml dung dịch axit tricloaxetic (9.2.1), cân chính xác đến 0,1 mg, tính bằng gam (g);

0,065 là hệ số được dựa trên giả sử rằng sữa chứa hàm lượng chất béo khoảng 3,5 % và protein đích thực là 3,0 % (như vậy $0,035 + 0,030 = 0,065$)

CHÚ THÍCH Hệ số 0,065 này trong mẫu số có thể cần được điều chỉnh nếu sản phẩm sữa được phân tích có dạng lỏng với thành phần khác (ví dụ: các sản phẩm sữa nguyên chất hoặc sữa gầy hoặc sữa cô đặc).

10.2 Biểu thị kết quả chính xác đến bốn chữ số thập phân, nếu cần để tính toán tiếp theo. Đối với kết quả cuối cùng, biểu thị hàm lượng nitơ phi protein thu được đến ba chữ số thập phân và hàm lượng phi protein đến hai chữ số thập phân. Không làm tròn các kết quả thu được cho đến khi tính giá trị cuối cùng của phép thử.

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

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập thu được từ kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm phù hợp với ISO 5725². 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 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 0,0025 % đối với hàm lượng NPN.

11.3 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 0,0052 % đối với hàm lượng NPN.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.
- nếu thỏa mãn yêu cầu về độ thu hồi thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

² ISO 5725:1986 (hiện nay đã bị hủy) được sử dụng để lấy các dữ liệu về độ chụm.