

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8099-5 : 2009

ISO 8968-5 : 2001

Xuất bản lần 1

**SỮA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ –
PHẦN 5: PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
NITƠ PROTEIN**

*Milk – Determination of nitrogen content –
Part 5: Determination of protein-nitrogen content*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8099-5 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 8968-5 : 2001;

TCVN 8099-5 : 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 5: Phương pháp xác định hàm lượng nitơ protein

Milk – Determination of nitrogen content – Part 5: Determination of 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 protein trong sữa nguyên chất hoặc sữa gầy dạng lỏng.

Phương pháp gián tiếp để tính toán cũng được mô tả trong tiêu chuẩn này.

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).*

TCVN 8099-4 : 2009 (ISO 8968-4 : 2001), *Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 4: Xác định hàm lượng nitơ phi protein.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hàm lượng nitơ protein (protein-nitrogen content)

Phần khối lượng của nitơ xác định được bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này trực tiếp hoặc gián tiếp.

CHÚ THÍCH Hàm lượng nitơ 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 %. Lọc để tách các kết tủa protein (kết tủa này chứa cả hàm lượng nitơ phi protein). Hàm lượng nitơ protein 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).

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 phương pháp sử dụng.

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, $c(\text{HCl}) = (0,1 \pm 0,0005) \text{ mol/l}$

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.

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) 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 **Pipet**, dung tích 5 ml.
- 6.3 **Phễu lọc**, bằng thủy tinh, đường kính 75 cm.
- 6.4 **Giấy lọc**, không chứa nitơ, đường kính 15 cm (ví dụ: giấy Whatman số 1¹) hoặc loại tương đương.
- 6.5 **Pipet tự động hoặc bơm pittông**, có thể phân phối được 10 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 $5,0\text{ ml} \pm 0,1\text{ ml}$ mẫu thử đã được chuẩn bị (Điều 8) cho vào bình Kjeldahl hoặc ống phân hủy khô, sạch đã được cân chính xác đến 0,1 mg. Cân mẫu thử chính xác đến 0,1 mg. Thêm ngay $5,0\text{ ml} \pm 0,1$ nước vào bình hoặc ống, tráng hết phần mẫu thử còn dính trên cổ bình hoặc ống.

CHÚ THÍCH 1 Có thể sử dụng bình Kjeldahl hoặc ống phân hủy tùy thuộc vào phương pháp được chọn.

CHÚ THÍCH 2 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.

9.2 Phương pháp xác định trực tiếp

9.2.1 Kết tủa và lọc

Dùng pipet lấy $40\text{ ml} \pm 0,5\text{ ml}$ dung dịch axit tricloaxetic (5.1) cho vào bình Kjeldahl hoặc ống phân hủy có chứa phần mẫu thử (9.1) và xoay bình để trộn đều lượng chứa bên trong. Để yên 5 min cho kết tủa

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

lắng xuống. Lọc lượng chứa trong bình nón qua giấy lọc (6.4) trên phễu lọc (6.3). Thu lấy toàn bộ dịch lọc vào một bình nón khô và sạch. Một số phần kết tủa còn sót lại trong bình Kjeldahl hoặc ống phân huỷ và một số nằm trên giấy lọc. Không cần thiết phải lấy toàn bộ phần kết tủa ra khỏi bình hoặc ống phân huỷ.

Ngay sau khi rót xong hỗn hợp và không để bất kỳ phần kết tủa nào bị khô lại trên cổ bình hoặc ống, dùng pipet tự động (6.5) bổ sung 10 ml axit tricloaxetic (5.1). Dùng dung dịch này để tráng rửa hết kết tủa còn dính lại trên cổ bình hoặc ống phân huỷ. Xoay bình để trộn kỹ lượng chứa bên trong bình. Rót hết lượng chứa trong bình hoặc ống qua cùng giấy lọc. Cho phần dịch lọc này vào phần dịch lọc thu được trước đó đựng trong bình nón. Sau khi tráng cổ bình hoặc ống bằng 10 ml dung dịch axit tricloaxetic tiếp theo thì xoay bình để trộn. Rót lượng chứa trong bình hoặc ống lần thứ ba qua cùng loại giấy lọc, cho phần dịch lọc này vào phần thu được trước đó đựng trong bình nón.

Dịch lọc thu được phải trong và không có kết tủa. Tại giai đoạn này dịch lọc không cần thiết nữa và có thể được loại bỏ theo cách thích hợp.

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

Mang gắng tay và nhắc cẩn thận giấy lọc ra khỏi phễu lọc và gấp kín giấy lọc chứa phần kết tủa. Nếu còn sót lại kết tủa ở bên trong hoặc bên ngoài miệng bình Kjeldahl hoặc ống phân huỷ thì dùng giấy lọc đã gấp để lau sạch kết tủa và thả giấy lọc này vào bình Kjeldahl hoặc ống phân huỷ.

9.2.3 Phân huỷ và chưng cất

Thêm một lượng thích hợp của chất trợ sôi, kali sulfat, dung dịch đồng xúc tác và 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).

Phòng thử nghiệm có thể chọn phương pháp qui định trong TCVN 8099-1 : 2009 (ISO 8968-1 : 2001) hoặc TCVN 8099-2 : 2009 (ISO 8968-2 : 2001) để sử dụng.

9.2.4 Phép thử trắng

Tiến hành phép thử trắng, lấy giấy lọc (6.4) đã được rửa bằng dung dịch axit tricloaxetic (5.1) thay cho phần mẫu thử được mô tả trong 9.2.1 và tiến hành theo 9.2.3. 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.

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

9.3 Phương pháp gián tiếp

Cách khác, hàm lượng nitơ protein của mẫu thử có thể tính được bằng phương pháp xác định gián tiếp cổ điển. Lấy hàm lượng nitơ tổng số xác định được bằng phương pháp quy định trong TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2) trừ đi hàm lượng nitơ phi protein của cùng mẫu thử xác định được bằng phương pháp quy định trong TCVN 8099-4 (ISO 8968-4). Kết quả thu được của hàm lượng nitơ protein nhân với 6,38 cho hàm lượng protein thực.

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Tính hàm lượng nitơ

10.1.1 Tính hàm lượng nitơ trong mẫu thử, w_{pn} , theo công thức sau đây:

$$w_{pn} = \frac{1,4007(V_s - V_b) \times M_r}{m}$$

trong đó

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

V_s là thể tích của dung dịch axit clohydric (5.2) 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 (5.2) 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 (5.2), lấy chính xác đến bốn chữ số thập phân;

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

10.1.2 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 protein thu được đến ba chữ số thập phân và hàm lượng 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.

10.2 Tính hàm lượng protein thực

10.2.1 Tính hàm lượng protein thực của mẫu thử, w_p , theo công thức sau đây:

$$w_p = w_{pn} \times 6,38$$

trong đó

w_p là hàm lượng protein thực, tính bằng phần trăm khối lượng (%);

w_{pn} là hàm lượng nitơ protein của mẫu thử, tính bằng phần trăm khối lượng được lấy đến bốn chữ số thập phân (10.1) (%).

6,38 là hệ số để chuyển đổi nitơ thành protein thực.

10.2.2 Biểu thị kết quả chính xác đến bốn chữ số thập phân, nếu cần để tính toán tiếp theo. Đối với các kết quả cuối cùng (xem 10.1.), biểu thị các kết quả này đến hai chữ số thập phân.

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 chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được đưa ra trong [5] và [6]. 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 0,0038 % đối với hàm lượng nitơ protein (0,024 % đối với hàm lượng protein thực).

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 0,0092 % đối với hàm lượng nitơ protein (0,059 % đối với hàm lượng protein thực).

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

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 TCVN 8099-1 (ISO 8968-1) hoặc TCVN 8099-2 (ISO 8968-2);
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn 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.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
 - [2] ISO 5725 : 1986 Precision of test method – Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter – Laboratory tests (đã hủy).
 - [3] TCVN 6910-1 : 2001 (ISO 5725-1 : 1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Các định nghĩa và nguyên tắc chung.
 - [4] TCVN 6910-2 : 2001 (ISO 5725-2 : 1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản để xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
 - [5] AOAC International, *Official Method of Analysis*, 16th edn., 1995, Method 991.20, 991.21, 999.22 and 991.23.
 - [6] BARBANO, D.M. and LYNCH, J.M. Direct and indirec determination of true protein content in milk by Kjeldahl analysis: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 1991, pp. 281-288.
-