

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8179 : 2009
ISO/TS 17837 : 2008

Xuất bản lần 1

**SẢN PHẨM PHOMAT CHÉ BIẾN – XÁC ĐỊNH HÀM
LƯỢNG NITƠ VÀ TÍNH HÀM LƯỢNG PROTEIN THÔ –
PHƯƠNG PHÁP KJELDAHL**

*Processed cheese products – Determination of nitrogen content
and crude protein calculation – Kjeldahl method*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8179 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 17837 : 2008;

TCVN 8179 : 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.

Sản phẩm phomat chế biến – Xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô – Phương pháp Kjeldahl

Processed cheese products – Determination of nitrogen content and crude protein calculation – Kjeldahl method

CẢNH BÁO – Khi 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 theo nguyên tắc Kjeldahl và tính hàm lượng protein thô trong sản phẩm phomat chế biến, có sử dụng cả hai phương pháp truyền thống và phân hủy kín.

CHÚ THÍCH Các kết quả protein thô sẽ không chính xác nếu nguồn nitơ không phải từ sữa có trong sản phẩm phomat chế biến qui định.

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

TCVN 7153 : 2002 (ISO 1042 : 1998), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức.*

ISO 4788, *Laboratory glassware – Graduated measuring cylinders.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hàm lượng nitơ (nitrogen content)

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

CHÚ THÍCH Hàm lượng nitơ được tính bằng phần trăm khối lượng.

3.2

Hàm lượng protein thô (crude protein content)

Phần khối lượng của protein thô tính được theo qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng protein thô được tính bằng phần trăm khối lượng.

4 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được phân hủy bằng hỗn hợp axit sulfuric đậm đặc và kali sulfat. Đồng (II) sulfat làm chất xúc tác để chuyển nitơ hữu cơ thành amoni sulfat. Kali sulfat được dùng để nâng điểm sôi của axit sulfuric và cung cấp hỗn hợp oxy hóa mạnh hơn để phân hủy. Bổ sung một lượng natri hydroxit dư vào dịch phân hủy nguội để giải phóng amoniac. Amoniac giải phóng được chưng cất bằng hơi nước vào dung dịch axit boric dư và được chuẩn độ bằng dung dịch axit clohydric thể tích chuẩn. Hàm lượng nitơ được tính từ lượng amoniac tạo thành và hàm lượng protein thô từ hàm lượng nitơ thu được.

5 Thuốc thử

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

5.1 Kali sulfat (K_2SO_4), không chứa nitơ.

5.2 Đồng (II) sulfat ngậm năm phân tử nước, $\rho(CuSO_4 \cdot 5H_2O) = 5,0$ g/100 ml.

Dùng nước hòa tan 5,0 g đồng (II) sulfat ngậm năm phân tử nước trong bình định mức một vạch 100 ml (6.8). Thêm nước đến vạch và trộn.

5.3 Axit sulfuric (H_2SO_4), từ 95 % đến 98 % khối lượng, không chứa nitơ, $[\rho_{20}(H_2SO_4) \approx 1,84$ g/ml].

5.4 Dung dịch natri hydroxit, không chứa nitơ, có chứa 50 g natri hydroxit (NaOH) trên 100 g (khối lượng natri hydroxit, $w_{NaOH} = 50$ %).

Nếu việc bịt kín hệ thống thổi trong thiết bị chưng cất tự động gặp phải vấn đề thì sử dụng dung dịch có $w_{NaOH} = 40$ %.

5.5 Dung dịch chất chỉ thị

5.5.1 Hòa tan 0,1 g đỏ metyl trong etanol 95 % (thể tích) trong bình định mức một vạch 50 ml (6.8). Thêm etanol đến vạch 50 ml và trộn.

5.5.2 Hòa tan 0,5 g xanh bromocresol trong etanol 95 % (thể tích) trong bình định mức một vạch 250 ml (6.8). Thêm etanol tương tự đến vạch 50 ml và trộn.

5.5.3 Trộn một thể tích metyl đỏ (5.5.1) và năm thể tích xanh bromocresol (5.5.2) hoặc kết hợp và trộn lẫn cả hai dung dịch.

5.6 Dung dịch axit boric, $\rho(\text{H}_3\text{BO}_3) = 40,0 \text{ g/l}$

Hòa tan 40 g axit boric (H_3BO_3) trong 1 l nước nóng trong bình định mức một vạch 1 000 ml (6.8). Để cho bình và lượng chứa bên trong nguội đến 20 °C. Thêm nước đến vạch, sau đó thêm 3 ml dung dịch chỉ thị (5.5.3) và trộn.

Bảo quản dung dịch có màu vàng cam nhạt này trong chai thủy tinh bo silicat. Bảo vệ dung dịch tránh ánh sáng mặt trời và các nguồn amoniac trong suốt quá trình bảo quản.

CHÚ THÍCH Nếu dùng máy đo pH điện tử chuẩn độ điểm cuối, thì có thể bỏ qua việc bổ sung dung dịch chỉ thị (5.5.3) vào dung dịch axit boric. Mặt khác, việc đổi màu cũng có thể được sử dụng để kiểm tra các qui trình chuẩn độ đúng.

5.7 Dung dịch chuẩn axit clohydric, $\alpha(\text{HCl}) = (0,1 \pm 0,000 5) \text{ mol/l}$

Nên mua dung dịch chuẩn axit clohydric đã chuẩn hóa trước từ nhà sản xuất có uy tín.

Sử dụng các dung dịch đã chuẩn hóa trước tránh đưa vào sai số hệ thống khi pha loãng dung dịch axit clohydric gốc đậm đặc và khi xác định nồng độ phân tử gam của axit, quá trình này có thể làm kém đi hiệu năng tái lập của phương pháp. Điều này cũng tránh phải sử dụng dung dịch chuẩn để chuẩn độ có các nồng độ cao hơn giới hạn trên đã đề cập ($0,1 \pm 0,000 5 \text{ mol/l}$), vì nó sẽ giảm tổng thể tích chuẩn độ trên một mẫu. Trong trường hợp này, sẽ có phần trăm lớn hơn về sai số trong khi đọc buret. Các vấn đề tương tự và các nguồn sai số nảy sinh khi dùng axit khác thay cho axit clohydric (ví dụ: axit sulfuric). Do đó, không khuyến cáo các thay thế như vậy.

5.8 Amoni sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, tối thiểu 99 % khối lượng tính theo chất khô

Ngay trước khi sử dụng, sấy khô amoni sulfat ở $102 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ trong 2 h rồi để nguội đến nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm.

5.9 Tryptophan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$) hoặc lysin hydroclorua ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{HCl}$), tối thiểu 99 % khối lượng. Khi được bảo quản trong bình hút ẩm, thì không cần sấy khô các thuốc thử này trong tủ trước khi sử dụng.

5.10 Sacaroza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), có phần khối lượng nitrơ nhỏ hơn 0,002 %. Không sấy khô sacaroza trong tủ trước khi sử dụng.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

- 6.1 **Bình Kjeldahl**, dung tích 500 ml hoặc 800 ml.
- 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 phần 1,0 ml dung dịch đồng (II) sulfat (5.2).
- 6.4 **Ống đong chia độ**, dung tích 50 ml, 100 ml và 500 ml, phù hợp với các yêu cầu loại A của ISO 4788.
- 6.5 **Bình nón**, dung tích 500 ml, được chia vạch 200 ml.
- 6.6 **Buret**, dung tích 50 ml được chia vạch ít nhất tại mỗi 0,1 ml, phù hợp với yêu cầu loại A của TCVN 7149 (ISO 385). Cách khác, có thể sử dụng buret tự động đáp ứng đầy đủ các yêu cầu.
- 6.7 **Máy nghiền**

6.8 **Bình định mức một vạch**, dung tích 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1 000 ml, phù hợp với yêu cầu loại A của TCVN 7153 (ISO 1042).

6.9 **Chất trợ sôi**, ví dụ: đá bọt, bụi kềm, các mảnh sứ hoặc các hạt alundum lưỡng tinh (nghĩa là carborundum) có độ tinh khiết cao, nhẵn trơn, cỡ mesh 10. Không sử dụng lại các hạt trợ sôi.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng hạt thủy tinh đường kính khoảng 5 mm, nhưng chúng có thể không nâng nhiệt hiệu quả như alundum lưỡng tinh. Với hạt thủy tinh thì có thể có sủi bọt nhiều trong suốt quá trình phân hủy.

6.10 **Thiết bị phân hủy**, giữ được bình Kjeldahl (6.1) ở tư thế nghiêng (khoảng 45 °), có bếp điện hoặc đầu đốt bằng khí sao cho không đốt nóng bình Kjeldahl ở mức cao hơn lượng chứa bên trong, có hệ thống hút khói.

Nguồn nhiệt phải có thể điều chỉnh được để kiểm soát việc cài đặt bộ phận gia nhiệt tối đa được sử dụng trong quá trình phân hủy. Làm nóng sơ bộ nguồn cấp nhiệt khi cài đặt để đánh giá. Trong trường hợp dùng đầu đốt khí, thì quá trình làm nóng sơ bộ phải 10 min và đối với bếp điện phải 30 min. Đối với mỗi bộ phận gia nhiệt, xác định việc cài đặt để đưa 250 ml nước với 5 đến 10 viên trợ sôi có nhiệt độ ban đầu ở 25 °C đến điểm sôi trong 5 min đến 6 min. Đây là việc cài đặt bộ phận gia nhiệt tối đa cần sử dụng trong suốt quá trình phân hủy.

6.11 **Thiết bị chưng cất**, (phương pháp truyền thống), bằng thủy tinh bo silicat hoặc vật liệu thích hợp khác có thể phù hợp cho bình Kjeldahl (6.1) gồm có đầu phun có hiệu quả được nối với bình ngưng có ống lồng thẳng bên trong và ống đầu ra được gắn với đầu ra thấp của bình. Ống nối và nắp phải khít và tốt nhất được làm bằng cao su tổng hợp.

CHÚ THÍCH Thiết bị chưng cất được đề cập trên đây có thể được thay bằng thiết bị chưng cất Parnas-Wagner hoàn chỉnh (xem [4]) hoặc thiết bị thích hợp khác.

6.12 Bể phân hủy kín, bể hợp kim nhôm hoặc bể tương đương, được gắn với bộ phận kiểm soát nhiệt độ có thể điều chỉnh được và dụng cụ đo nhiệt độ bể.

6.13 Ống phân hủy, dung tích 250 ml, thích hợp để sử dụng với bể phân hủy kín (6.12).

6.14 Ống xả, thích hợp để sử dụng cho các ống phân hủy (6.13).

6.15 Thiết bị tách lọc khí ly tâm hoặc bơm lọc hoặc máy hút, bền với axit, để sử dụng với nguồn nước chính.

6.16 Thiết bị chưng cất (phương pháp phân hủy kín), có thể chưng cất hơi nước, thủ công hoặc bán tự động, thích hợp cho các ống phân hủy (6.13) và các bình nón (6.5).

6.17 Máy chuẩn độ tự động, có kèm theo máy đo pH.

Máy đo pH phải được điều chỉnh trong phạm vi pH 4 đến pH 7 theo phương pháp điều chỉnh pH của phòng thí nghiệm thông thường.

6.18 Dao trộn hoặc dụng cụ thích hợp.

6.19 Giấy lọc, không chứa nitơ có kích thước và độ xốp thích hợp để giữ lại mẫu thử phomat.

6.20 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ từ 38 °C đến 40 °C.

7 Lấy mẫu

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.

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

Loại bỏ cùi, các vết hoặc lớp bề mặt mốc của phomat sao cho thu được mẫu đại diện của phomat.

Nghiền mẫu đại diện bằng máy nghiền (6.7). Trộn nhanh mẫu đã nghiền và tốt nhất nghiền nhanh lại. Phân tích ngay mẫu sau khi nghiền.

Cân 1 g mẫu phomat nghiền, dùng dao trộn (6.18) chuyển sang giấy lọc (6.19) gấp nếp. Cuộn mẫu thử trong giấy lọc và cho tất cả vào vào đáy bình Kjeldahl (6.1) hoặc ống phân hủy (6.13) như trong 9.1.1 hoặc 9.1.2.

9 Cách tiến hành

9.1 Phương pháp truyền thống

9.1.1 Phân mẫu thử và xử lý sơ bộ

Cho vào bình Kjeldahl (6.1) khô và sạch từ 5 đến 10 hạt trợ sôi (6.9), 15,0 g kali sulfat (5.1), 1,0 ml dung dịch đồng (II) sulfat (5.2). Sau đó thêm mẫu thử đã chuẩn bị như trong Điều 8 và 25 ml axit sulfuric (5.3) dùng axit sulfuric để rửa luôn dung dịch đồng (II) sulfat, kali sulfat hoặc phân mẫu thử còn sót lại trên cổ bình. Trộn nhẹ lượng chứa trong bình Kjeldahl.

9.1.2 Xác định

9.1.2.1 Phân hủy

Bật hệ thống hút khói của thiết bị phân hủy (6.10) trước khi bắt đầu phân hủy. Làm nóng bình Kjeldahl và lượng chứa bên trong (9.1.1) trên thiết bị phân hủy dùng bộ phận gia nhiệt cài đặt đủ thấp sao cho dịch phân hủy cháy không tạo bọt dâng đến cổ bình Kjeldahl. Phân hủy ở giai đoạn cài đặt này cho đến khi xuất hiện khói trắng trong bình sau khoảng 20 min. Tăng nhiệt độ đến một nửa mức cài đặt tối đa trong 6.10 và tiếp tục đun trong 15 min. Sau 15 min, tăng nhiệt đến mức cài đặt tối đa trong 6.10. Sau khi dịch phân hủy trong (có màu xanh nhẹ) tiếp tục đun sôi từ 1 h đến 1,5 h ở mức cài đặt tối đa. Nếu chất lỏng này không sôi, thì có thể do nhiệt độ cài đặt sau này quá thấp. Tổng thời gian phân hủy sẽ từ 1,8 h đến 2,25 h. Nếu dịch phân hủy cháy vẫn còn sót lại trên cổ bình thì tráng bằng vài mililit nước.

Để xác định thời gian sôi cụ thể cần cho phép phân tích trong phòng thử nghiệm cụ thể sử dụng loại thiết bị cụ thể, thì chọn các mẫu sữa chứa chất béo cao, protein cao và xác định hàm lượng protein sử dụng các thời gian sôi khác nhau (1 h đến 1,5 h) sau khi đã trong. Kết quả protein trung bình tăng khi thời gian sôi tăng và giảm khi thời gian sôi kéo dài. Chọn thời gian sôi cho kết quả protein tối đa.

Tại điểm cuối quá trình phân hủy, dịch phân hủy phải trong và không chứa chất chưa phân hủy. Để dịch phân hủy nguội đến nhiệt độ phòng trong bình mở nắp để dưới tủ hút riêng rẽ trong khoảng 25 min. Nếu bình được để trên bếp đến nguội thì thời gian làm nguội đến nhiệt độ phòng bị kéo dài hơn. Dịch phân hủy nguội cần có dạng lỏng hoặc chất lỏng có vài chất kết tinh trên đáy bình khi kết thúc 25 min làm nguội. Việc kết tinh nhiều sau 25 min này là do thất thoát quá mức axit trong quá trình phân hủy và làm cho kết quả có giá trị thấp.

CHÚ THÍCH Việc thất thoát quá mức axit là do hút khói quá mạnh hoặc thời gian phân hủy kéo dài do phân hủy trong một thời gian dài ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối đa của phép phân tích.

Để giảm thất thoát axit, cần giảm tốc độ hút khói. Không để dịch phân hủy chưa pha loãng trong các ống nghiệm qua đêm. Dịch phân hủy chưa pha loãng có thể kết tinh trong giai đoạn này và sẽ rất khó khăn để đưa dịch đã kết tinh trở lại dạng dung dịch lỏng.

Cho 300 ml nước vào bình Kjeldahl 500 ml hoặc 400 ml nước khi sử dụng bình Kjeldahl 800 ml. Dùng nước để rửa cổ bình. Trộn kỹ để đảm bảo rằng mọi chất kết tinh đã được hòa tan. Thêm 5 đến 10 hạt trợ sôi (6.9). Để hỗn hợp nguội trở lại nhiệt độ phòng trước khi chưng cất. Dịch phân hủy đã pha loãng có thể được đẩy lại và giữ để chưng cất sau này.

9.1.2.2 Chưng cất

Bật bộ ngưng nước của thiết bị chưng cất (6.11). Thêm 75 ml dung dịch natri hydroxit (5.4) vào dịch phân hủy đã pha loãng (9.1.2.1) bằng cách rót cẩn thận dung dịch xuống theo cổ bình nghiêng của bình Kjeldahl để tạo thành một lớp trên đáy bầu của bình. Cần có lớp phân cách rõ giữa hai dung dịch này.

Để giảm khả năng thất thoát amoniac, ngay sau khi thêm dung dịch natri hydroxit vào bình Kjeldahl, nối ngay bình vào thiết bị chưng cất (6.11). Nhúng đầu tip ống ra của bình ngưng trong 50 ml dung dịch axit boric (5.6) được chứa trong bình nón (6.5).

Xoay mạnh bình Kjeldahl để trộn lượng chứa trong bình cho đến khi không còn thấy các lớp của dung dịch tách riêng trong bình. Đặt bình lên bếp.

Bật bếp cho đến nhiệt độ cài đặt đủ cao để làm sôi lượng chứa trong bình Kjeldahl. Tiếp tục chưng cất cho đến khi sôi mạnh và sau đó tháo bình Kjeldahl ra và tắt nguồn nhiệt. Tắt bộ ngưng tụ nước. Tráng phía trong và phía ngoài đầu tip của ống đầu ra bằng nước tráng rửa trong bình nón và trộn.

Tốc độ chưng cất phải sao cho thu được khoảng 150 ml dịch chưng cất trước khi bắt đầu sôi mạnh. Tổng thể tích của lượng chứa trong bình nón phải ở khoảng 200 ml. Nếu thể tích dịch chưng cất thu được ít hơn 150 ml thì có thể bổ sung ít hơn 300 ml nước để pha loãng dịch phân hủy. Hiệu quả của bình ngưng phải sao cho nhiệt độ của lượng chứa trong bình nón không vượt quá 35 °C trong quá trình chưng cất khi sử dụng điểm kết thúc so màu.

9.1.2.3 Chuẩn độ

Dùng buret (6.6) chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.1.2.2) dựa vào axit clohydric (5.7). Điểm kết thúc chuẩn độ đạt được khi có vết màu hồng đầu tiên. Lấy số đọc của buret ít nhất đến 0,05 ml. Có thể dùng bản khuấy từ rọi sáng để nhìn điểm kết thúc.

Cách khác, chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.1.2.2) dựa vào axit clohydric (5.7) sử dụng máy chuẩn độ tự động đã hiệu chuẩn có máy đo pH (6.17). Điểm cuối pH của chuẩn độ đạt được ở pH 4,6, là điểm tăng trong đường chuẩn độ (điểm uốn). Đọc lượng chất chuẩn độ đã dùng trên máy chuẩn độ tự động.

CHÚ THÍCH 1 Vết màu hồng đầu tiên quan sát được giữa pH 4,6 và pH 4,3 đối với hệ thống chất chỉ thị (5.5) và dung dịch axit boric (5.6) được qui định trong phương pháp này. Trong thực tế, tốc độ thay đổi pH phụ thuộc vào axit clohydric (5.7)

TCVN 8179 : 2009

được bổ sung là rất nhanh trong dải pH này. Trong hệ thống này, khoảng 0,05 ml dung dịch axit clohydric 0,1 mol/l thay đổi 0,3 đơn vị pH trong dải pH từ 4,6 đến pH 4,3.

CHÚ THÍCH 2 Các thống kê về hiệu năng phương pháp 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 phép thử cuối cùng, bao gồm cả các kết quả của phép thử trắng, thu được với điểm kết thúc pH 4,6 với việc chuẩn độ điểm kết thúc màu cho thấy rằng giữa chúng có sự chênh lệch không đáng kể.

9.2 Phương pháp phân hủy kín

9.2.1 Phân mẫu thử và xử lý sơ bộ

Cho vào ống phân hủy (6.13) khô và sạch 12,0 g kali sulfat (5.1), 1,0 ml dung dịch đồng (II) sulfat (5.2) và xử lý mẫu thử đã chuẩn bị theo Điều 8, thêm 20 ml axit sulfuric (5.3) dùng luôn axit sulfuric để rửa luôn dung dịch đồng (II) sulfat, kali sulfat hoặc phần mẫu thử còn sót lại trên cổ ống phân hủy. Trộn nhẹ lượng chứa trong ống.

Các thể tích axit lớn hơn 20 ml trong các hệ thống phân hủy kín cho các vấn đề về tạo bọt quá mức trong quá trình phân hủy và cho các kết quả khác nhau. Người sử dụng phương pháp phân hủy kín cần chú ý rằng lượng axit sulfuric đủ dư trong ống tại điểm kết thúc phân hủy cần được người phân tích lưu ý hơn so với phương pháp truyền thống. Việc thất thoát axit quá mức do tủ hút khói hút quá mạnh liên quan nhiều đến bộ phân hủy kín hơn so với các hệ thống truyền thống.

9.2.2 Xác định

9.2.2.1 Phân hủy

Cài đặt bộ phân hủy kín (6.12) ở nhiệt độ ban đầu thấp để khống chế bọt (từ 180 °C đến 230 °C). Chuyển ống sang bình hủy kín và ống xả (6.14) mà được nối với thiết bị tách lọc khí ly tâm (6.15) trên đỉnh ống. Tốc độ hút của thiết bị tách lọc khí ly tâm phải được điều chỉnh đủ để loại bỏ khói. Thiết bị phân hủy hoàn chỉnh có thể cần được giữ trong tủ hút khói.

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

Cũng có thể cần phải tăng dần nhiệt độ trong khoảng quá 20 min để khống chế việc tạo bọt. Trong mọi tình huống, không để bọt dâng cao quá 40 mm đến 50 mm dưới bề mặt của ống xả đã chèn vào đỉnh ống phân hủy.

Sau khi dịch phân hủy trong (trong có màu xanh nhẹ) tiếp tục phân hủy ở khoảng từ 410 °C đến 430 °C trong ít nhất 1 h. Trong suốt quá trình này axit sulfuric phải sôi. Nếu không thấy dịch trong sôi vì có bọt khí trên bề mặt dịch lỏng nóng xung quanh ống, thì nhiệt độ của bình phân hủy có thể quá thấp. Tổng thời gian phân hủy sẽ từ 1,75 h đến 2,5 h.

Để xác định thời gian sôi cụ thể cần cho phép phân tích trong phòng thử nghiệm cụ thể sử dụng loại thiết bị cụ thể, thì chọn các mẫu sữa chứa chất béo cao, protein cao và xác định hàm lượng protein sử dụng các thời gian sôi khác nhau (1 h đến 1,5 h) sau khi đã trong. Kết quả protein trung bình tăng khi thời gian sôi tăng và giảm khi thời gian sôi kéo dài. Chọn thời gian sôi cho kết quả protein tối đa.

Tại điểm cuối quá trình phân hủy, dịch phân hủy phải trong và không chứa chất chưa phân hủy. Lấy ống ra khỏi bình phân hủy cùng với ống xả.

Để dịch phân hủy nguội đến nhiệt độ phòng trong khoảng quá 25 min. Dịch phân hủy nguội cần có dạng lỏng hoặc chất lỏng có vài chất kết tinh trên đáy ống. Việc kết tinh nhiều sau 25 min này là do thất thoát quá mức axit trong quá trình phân hủy và làm cho kết quả có giá trị thấp.

CHÚ THÍCH Việc thất thoát quá mức axit là do hút khí quá mạnh hoặc thời gian phân hủy kéo dài do phân hủy trong một thời gian dài ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ tối đa của phép phân tích.

Để giảm thất thoát axit, cần giảm tốc độ hút khí. Không để dịch phân hủy chưa pha loãng trong các ống nghiệm qua đêm. Dịch phân hủy chưa pha loãng có thể kết tinh trong giai đoạn này và sẽ rất khó khăn để đưa dịch đã kết tinh trở lại dạng dung dịch lỏng.

Sau khi dịch phân hủy nguội đến nhiệt độ phòng trong khoảng 25 min, tháo ống xả ra và cẩn thận thêm 85 ml nước vào mỗi ống. Xoay ống để trộn lượng chứa bên trong để đảm bảo rằng mọi chất kết tinh đã được hòa tan. Để lượng chứa trong ống nguội trở lại nhiệt độ phòng.

9.2.2.2 Chung cất

Bật bộ ngưng nước của thiết bị chung cất. Gắn ống phân hủy chứa dịch phân hủy đã pha loãng vào thiết bị chung cất (6.16). Đặt bình nón (6.5) chứa 50 ml axit boric (5.6) dưới đầu ra của bộ ngưng, sao cho đầu ra này ngập trong dung dịch axit boric. Chỉnh thiết bị chung cất để phân phối được 55 ml dung dịch natri hydroxit (5.4).

Khi sử dụng dung dịch natri hydroxit 40 % khối lượng thì chỉnh thể tích phân phối đến 65 ml. Nếu dung dịch natri hydroxit được phân phối tự động thì lượng này sẽ bị dao động nhiều vì ống phân phối dung dịch natri hydroxit bị nghẽn từng phần, do đó sẽ có khác nhau nhiều giữa các kết quả riêng lẻ.

Vận hành thiết bị chung cất theo hướng dẫn của nhà sản xuất để chung cất hơi amoniac đã giải phóng bằng cách bổ sung dung dịch natri hydroxit, thu lấy dịch chung cất vào dung dịch axit boric. Tiếp tục quá trình chung cất cho đến khi thu được ít nhất 150 ml dịch chung cất.

Lấy bình nón ra khỏi thiết bị chung cất và làm ráo hẳn đầu tip chung cất. Tráng phía trong và ngoài đầu tip bằng nước tráng rửa và cho vào bình nón. Luôn tráng rửa đầu tip giữa các mẫu. Hiệu quả của bình ngưng phải sao cho nhiệt độ của lượng chứa trong bình nón không vượt quá 35 °C trong quá trình chung cất khi sử dụng điểm kết thúc bằng so màu.

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 chuẩn độ đạt được khi có vết màu hồng đầu tiên. Lấy số đọc của buret ít nhất đến 0,05 ml. Có thể dùng bản khuấy từ rọi sáng để nhìn điểm kết thúc.

Cách khác, chuẩn độ lượng chứa trong bình nón (9.2.2.2) bằng axit clohydric (5.7) sử dụng máy chuẩn độ tự động đã hiệu chuẩn có máy đo pH (6.17). Điểm cuối pH của chuẩn độ đạt được ở pH 4,6, là điểm uốn nhất trên đường chuẩn độ (điểm uốn). Đọc lượng chất chuẩn độ đã dùng trên máy chuẩn độ tự động.

CHÚ THÍCH 1 Vết màu hồng đầu tiên quan sát được giữa pH 4,6 và pH 4,3 đối với hệ thống chất chỉ thị (5.5) và dung dịch axit boric (5.6) được qui định trong phương pháp này. Trong thực tế, tốc độ thay đổi pH phụ thuộc vào axit clohydric (5.7) được bổ sung là rất nhanh trong dải pH này. Trong hệ thống này, khoảng 0,05 ml dung dịch axit clohydric 0,1 mol/l thay đổi 0,3 đơn vị pH trong dải pH từ 4,6 đến pH 4,3.

CHÚ THÍCH 2 Các thông kê về hiệu năng phương pháp 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 phép thử cuối cùng, bao gồm cả các kết quả của phép thử trắng, thu được với điểm kết thúc pH 4,6 với việc chuẩn độ điểm kết thúc màu cho thấy rằng giữa chúng có sự chênh lệch không đáng kể.

9.3 Phép thử trắng

Luôn chuẩn độ mẫu trắng dựa vào cùng loại axit clohydric (5.7) và sử dụng cùng loại buret (6.6) hoặc máy chuẩn độ tự động có kèm theo máy đo pH (6.17) như đã sử dụng đối với mẫu thử. Thực hiện phép thử trắng theo 9.1 hoặc 9.2. Thay phần mẫu thử bằng 5 ml nước và khoảng 0,85 g sacaroza (5.10).

Ghi lại các giá trị mẫu trắng điển hình. Nếu các giá trị này thay đổi thì phải tìm nguyên nhân.

CHÚ THÍCH 1 Mục đích của sacaroza trong phép thử trắng hoặc chuẩn thu hồi thực hiện như chất hữu cơ tiêu tốn một lượng axit sulfuric trong quá trình phân hủy mà tương đương với phần mẫu thử. Nếu lượng axit sulfuric dư tại cuối giai đoạn phân hủy quá thấp thì độ thu hồi nitơ của cả hai phép thử thu hồi trong 9.4.2 và 9.4.3 sẽ thấp. Tuy nhiên, nếu lượng axit dư có mặt tại cuối giai đoạn phân hủy đủ để giữ tất cả nitơ nhưng các điều kiện nhiệt độ và thời gian trong quá trình phân hủy không đủ để giải phóng tất cả các nitơ ra khỏi mẫu, thì độ thu hồi nitơ trong 9.4.2 có thể chấp nhận được và độ thu hồi nitơ trong 9.4.3 sẽ thấp.

CHÚ THÍCH 2 Lượng chất chuẩn độ được dùng trong mẫu trắng luôn lớn hơn 0,00 ml. Các giá trị thử trắng trong cùng một phòng thử nghiệm phải luôn ổn định. Nếu mẫu trắng đã có màu hồng trước khi bắt đầu chuẩn độ thì đã có sai sót. Thông thường trong các trường hợp này, thì do bình nón không sạch hoặc nước lử độ ẩm không khí có thể ngưng tụ trên mặt ngoài của bộ ngưng tụ đã chảy vào bình thu nhận làm nhiễm bẩn. Các giá trị mẫu trắng điển hình thường ít hơn hoặc bằng 0,2 ml.

9.4 Phép thử độ thu hồi

9.4.1 Định kỳ kiểm tra độ đúng của qui trình bằng cách thực hiện các phép thử độ thu hồi sau đây, thực hiện theo 9.1 và 9.2.

9.4.2 Kiểm tra để đảm bảo rằng không có sự thất thoát nitơ bằng cách sử dụng phần mẫu thử 0,12 g amoni sulfat (5.8) cùng với 0,85 sacaroza (5.10).

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

Phần trăm nitơ thu hồi phải lớn hơn 99 % khối lượng đối với tất cả các vị trí trên thiết bị. Đối với các độ thu hồi nhỏ hơn 99 %, thì nồng độ đương lượng của chất chuẩn độ cao hơn giá trị đã nêu hoặc có thể nitơ bị thất thoát trong quá trình phân hủy hoặc chưng cất.

Có thể sử dụng hỗn hợp amoni sulfat và một lượng nhỏ axit sulfuric (lượng dư còn lại tại điểm kết thúc phân hủy) trong bình Kjeldahl. Pha loãng với một lượng chuẩn của nước và thêm một lượng chuẩn natri hydroxit và chưng cất. Nếu độ thu hồi nitơ vẫn còn thấp với cùng một lượng tương tự, thì đã có thất thoát nitơ trong thiết bị chưng cất mà không phải trong quá trình chưng cất. Các nguyên nhân có khả năng là rò rỉ đường ống trong hệ thống truyền thống hoặc sai lỗi khi ngâm đầu tip của bộ ngưng trong dung dịch axit boric sớm trong khi chưng cất. Thiết bị phải được qua phép thử này trước khi kiểm tra độ thu hồi theo qui trình trong 9.4.3.

Nếu các độ thu hồi nitơ vượt quá 100 % và không có sự thất thoát nitơ có thể nhận thấy, thì một số nguyên nhân có thể là:

- a) amoni sulfat bị nhiễm bẩn;
- b) nồng độ đương lượng thực của chất chuẩn độ thấp hơn giá trị đã nêu;
- c) việc hiệu chuẩn buret đối với chất chuẩn độ bị sai;
- d) nhiệt độ của chất chuẩn độ quá cao so với nhiệt độ chuẩn độ buret;
- e) tốc độ dòng của chất chuẩn độ từ buret vượt quá tốc độ tối đa chuẩn độ có hiệu lực của buret.

CHÚ THÍCH Cho dù độ thu hồi tối đa theo lý thuyết không vượt quá 100 %, nhưng trong thực tế có thể thu được các độ thu hồi cao hơn do độ không đảm bảo của phép đo.

9.4.3 Kiểm tra hiệu quả của qui trình phân hủy sử dụng 0,16 g lysin hydroclorua hoặc 0,18 g tryptophan (5.9) cùng với 0,67 g sacaroza (5.10). Độ thu hồi của nitơ phải ít nhất là 98 % khối lượng.

Nếu độ thu hồi thấp hơn 98 %, thì sau khi có độ thu hồi từ 99 % đến 100 % khối lượng đối với amoni sulfat, thì thời gian hoặc nhiệt độ phân hủy là không đủ hoặc có vật liệu của mẫu chưa được phân hủy (nghĩa là chưa cháy) trong bình Kjeldahl.

Đánh giá cuối cùng về hiệu năng được thực hiện tốt nhất với sự tham gia vào chương trình thử nghiệm thành thạo, khi trong và giữa các phòng thử nghiệm các thông số thống kê được tính toán dựa trên các mẫu sữa.

TCVN 8179 : 2009

9.4.4 Các giá trị thấp hơn trong các phép thử độ thu hồi (hoặc cao hơn 100 % trong 9.4.2) cho thấy có sai sót trong qui trình và/hoặc nồng độ không đúng của dung dịch axit clohydric (5.7).

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Phương pháp tính

10.1.1 Hàm lượng nitơ

Hàm lượng nitơ của mẫu thử, w_N , tính bằng phần trăm khối lượng, được tính đến bốn chữ số thập phân, theo công thức (1) sau đây:

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

trong đó

c_t là nồng độ của dung dịch axit clohydric (5.7), tính đến bốn chữ số thập phân, biểu thị bằng mol trên lit (mol/l);

V_b là thể tích dung dịch axit clohydric (5.7), tính chính xác đến 0,05 ml, đã dùng cho phép thử trắng (9.3), tính bằng mililit (ml);

m là khối lượng phần mẫu thử (9.1), chính xác đến miligam, tính bằng gam (g);

V_s là thể tích dung dịch axit clohydric (5.7), tính chính xác đến 0,05 ml, đã dùng cho phép xác định (9.2.2.3), tính bằng mililit (ml).

10.1.2 Hàm lượng protein thô

Tính hàm lượng protein thô, w_p , bằng phần trăm khối lượng, theo công thức (2) sau đây:

$$w_p = 6,38 w_N$$

trong đó 6,38 là hệ số thường được chấp nhận để chuyển đổi hàm lượng nitơ về hàm lượng protein thô.

10.2 Biểu thị kết quả

Không làm tròn các kết quả tiếp cho đến khi tính kết quả thử nghiệm cuối cùng.

ĐIỀU QUAN TRỌNG – 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 của nhiều vật liệu mẫu được dùng để tính toán thống kê về hiệu năng của phương pháp về sai lệch trong hoặc giữa các phòng thử nghiệm. Một ví dụ khác, là khi các giá trị được sử dụng làm chuẩn cho hiệu chuẩn thiết bị (ví dụ: máy phân tích sữa bằng hồng ngoại) mà các giá trị thu được từ nhiều mẫu

sẽ được dùng để tính hồi qui đơn giản hoặc hồi qui phức tạp. Trong các trường hợp này, các giá trị thu được không được làm tròn trước khi chúng được dùng để tính toán tiếp.

10.2.1 Hàm lượng nitơ

Biểu thị các kết quả đến bốn chữ số thập phân, nếu cần để tính toán tiếp.

Cách khác, biểu thị các kết quả thử nghiệm cuối cùng đến ba chữ số thập phân.

10.2.2 Hàm lượng protein thô

Biểu thị các kết quả đến ba chữ số thập phân, nếu cần để tính toán tiếp.

Cách khác, biểu thị các kết quả thử nghiệm cuối cùng đến hai chữ số thập phân.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử liên phòng đã được thực hiện theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) [2] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) [3]. Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập đối với các loại phomat khác nhau, gồm phomat chế biến lại đã được công bố (xem [5]).

Các kết quả đối với phomat chế biến trong phép thử được đưa ra trong Phụ lục A.

CHÚ THÍCH Phép thử cộng tác không đưa ra dải rộng về hàm lượng protein tìm thấy trong một số các sản phẩm phomat chế biến có bán sẵn.

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.

Chênh lệch tối đa giữa các phép xác định lặp lại không được vượt quá 0,4 % khối lượng protein thô.

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 đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) 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;
- e) kết quả thử nghiệm thu được và nếu thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả phép thử liên phòng thử nghiệm

Để thử liên phòng thử nghiệm, gồm 18 loại phomat có hàm lượng protein tho dao động từ 18,41 % đến 36,01 % đã được 15 phòng thử nghiệm tham gia phân tích. Tám phòng trong số đó có tám phòng tham gia thử nghiệm sử dụng thiết bị Kjeldahl như qui định trong tiêu chuẩn này và bảy phòng sử dụng thiết bị thủy phân kin và thiết bị chưng cất hơi (xem [5]).

Bảng A.1 – Tổng hợp các thông số phân tích thống kê liên phòng thử nghiệm đối với phần trăm protein thô (6,38w_n) trong phomat chế biến được xác định bằng phương pháp Kjeldahl, đã trừ các trường hợp ngoại lệ (xem [5])

Phomat	Số phòng thử nghiệm	Số phép thử	Trung bình %	Độ lệch chuẩn lặp lại s_r	Độ lệch chuẩn tái lập s_R	Hệ số biến thiên lặp lại CV(r) %	Hệ số biến thiên tái lập CV(R) %	Giới hạn lặp lại $r=2,8s_r$	Giới hạn tái lập $R=2,8s_R$
Phomat chế biến, từ sữa nguyên chất	14	28	18,41	0,065	0,103	0,354	0,561	0,182	0,289
Phomat chế biến, chất béo giảm	15	30	19,57	0,068	0,111	0,348	0,570	0,191	0,312
Phomat chế biến, không chứa chất béo, nhà sản xuất số 3	14	28	22,69	0,084	0,094	0,369	0,415	0,235	0,263
Phomat chế biến, không chứa chất béo, nhà sản xuất số 3	13	26	22,76	0,047	0,080	0,207	0,351	0,132	0,223
Phomat chế biến, không chứa chất béo, nhà sản xuất số 1	14	28	23,94	0,129	0,153	0,537	0,638	0,360	0,428

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
 - [2] 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.
 - [3] 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.
 - [4] PAHNAS, J.K., WAGNER, R Gber die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl [On the determination of low nitrogen quantities after Kjeldahl] *Biochem Z* 1921, 125, pp 253-256.
 - [5] LVNGII J M, BARBANO, DM., FLEMING, J. R Determination of the total nitrogen content of hard, semihard and processed cheese by the Kjeldahl method: Collaborative study. } *AOAC Int.* 2002, 85, pp 445-455.
-