

TIÊU CHUẨN NGÀNH

10TCN 850:2006

TIÊU CHUẨN NÔNG SẢN THỰC PHẨM PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NITƠ VÀ TÍNH HÀM LƯỢNG PROTEIN THÔ

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nitơ tổng số trong nông sản thực phẩm bằng phương pháp Kjeldahl và tính hàm lượng protein thô.

Phương pháp này không phân biệt giữa nitơ protein và nitơ phi protein. Nếu cần phải xác định hàm lượng nitơ protein thì sử dụng phương pháp thích hợp khác.

2. Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn:

TCN 847:2006. Ngũ cốc, đậu đỗ và các sản phẩm nghiền- Lấy mẫu từ lô hàng tĩnh. (ISO 13690:1999. Cereals, pulses and milled products. Sampling of static batches).

ISO 542: 1990. Oilseeds- Sampling. (Hạt có dầu - Lấy mẫu).

TCVN 5102- 90. Rau quả tươi- Lấy mẫu.

3. Nguyên tắc

Vô cơ hoá chất hữu cơ trong mẫu bằng axit sunfuric đậm đặc với sự có mặt của chất xúc tác. Kiềm hoá sản phẩm sau phản ứng, sau đó đem chưng cất amoniac vào dung dịch axit và xác định hàm lượng nitơ tổng số bằng cách chuẩn độ lượng amoniac giải phóng ra. Nhân hàm lượng nitơ với hệ số chuyển đổi để có hàm lượng protein thô.

4. Thuốc thử và hoá chất

Tất cả thuốc thử phải là loại tinh khiết phân tích. Nước phải là nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

4.1. Axit sunfuric (H_2SO_4) đậm đặc (98%; $d=1,84$).

4.2. Hỗn hợp xúc tác:

Nghiền nhỏ và trộn đều kalisunfat (K_2SO_4), đồng sunfat ngậm 5 phân tử nước ($CuSO_4.5H_2O$) và selen theo tỉ lệ khối lượng tương ứng 100:10:2. Có thể dùng các chất xúc tác khác nếu đảm bảo độ chính xác tương tự.

4.3. Chất chỉ thị, khoảng chuyển màu pH 4,4 đến 5,8.

Hoà tan 0,2g metyl đỏ và 0,1g metyl xanh trong 100ml etanol 95% (v/v), khuấy đều cho tan hết và đựng trong lọ tối màu để ở nơi mát.

Có thể dùng hỗn hợp chỉ thị gồm 0,07g metyl đỏ và 0,2g bromocresol xanh trong 100ml etanol 95%.

4.4. Dung dịch axit sunfuric (H_2SO_4) 0,1N.

4.5. Dung dịch axit boric (H_3BO_3) 40g/l.

Hoà tan 40g axit boric trong nước cất nóng, để nguội và cho thêm nước cất đến đủ 1 lít.

4.6. Dung dịch natri hydroxyt (NaOH) 33%.

4.7. Đường saccaroza.

4.8. Giấy chỉ thị pH.

4.9. Sáp parafin.

4.10. Chất trợ sôi, hạt đá bọt hoặc bi thuỷ tinh đường kính 5mm đến 7mm.

5. Thiết bị và dụng cụ

Thiết bị thường dùng trong phòng thí nghiệm và đặc biệt sau:

5.1. Cân phân tích có độ chính xác đến 0,001g.

5.2. Cân kỹ thuật có độ chính xác 0,01g.

5.3. Máy nghiền phòng thí nghiệm.

5.4. Sàng có đường kính lỗ 1,0mm và 3,0mm làm bằng lưới kim loại.

5.5. Dụng cụ chia mẫu: ví dụ như thiết bị chia tư hình nón, thiết bị chia nhiều ngăn có hệ thống phân hạt hoặc các thiết bị chia khác đảm bảo phân chia mẫu thí nghiệm thành mẫu thử đồng nhất.

5.6. Máy cắt có tấm cắt 4mm.

- 5.7. khay nhôm để sấy mẫu sơ bộ, ví dụ có kích thước 20cm x 12cm x 2cm.
- 5.8. Tủ sấy điện có hệ thống thông gió và có khả năng duy trì ở nhiệt độ $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 5.9. Hộp đựng mẫu có nắp đậy kín.
- 5.10. Dụng cụ công phá mẫu.
- 5.11. Bình công phá mẫu 250ml.
- 5.12. Thiết bị chưng cất Kjeldahl trung lượng.
- 5.13. Bình tam giác 250ml.
- 5.14. Micro buret có vạch chia tới 0,02ml.
- 5.15. Bình định mức 100ml, 1000ml.
- 5.16. Pipet 10ml, 25ml

6. Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thí nghiệm phải đại diện cho mẫu, không bị hư hỏng hoặc biến đổi thành phần trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Phương pháp lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu thử theo TCVN, ISO và/hoặc các tiêu chuẩn riêng thích hợp với sản phẩm có liên quan, ví dụ: TCN 847:2006. Ngũ cốc, đậu đỗ và các sản phẩm nghiền- Lấy mẫu từ lô hàng tĩnh (ISO 13690:1999. Cereals, pulses and milled products. Sampling of static batches); đậu đỗ và sản phẩm bột nghiền; ISO 644 đối với hạt có dầu; TCVN 5102 đối với rau quả tươi...

Nếu không có tiêu chuẩn phù hợp, các bên liên quan sẽ phải thỏa thuận với nhau về phương pháp quy định lấy mẫu.

7. Chuẩn bị mẫu thử

7.1. Đối với ngũ cốc, hạt các loại khác, mẫu dạng bột, mảnh

7.1.1. Mẫu dạng bột mịn

Trường hợp bột có kích thước lọt hoàn toàn qua sàng 1,0mm. Lấy khoảng 50g mẫu thí nghiệm đã được chuẩn bị (mục 6), làm vụn tất cả những phần bột vón cục (nếu có) và sàng (nếu cần) qua sàng có đường kính lỗ 1,0mm, trộn đều.

7.1.2. Mẫu có kích thước hạt vừa

Nếu mẫu thí nghiệm không lọt hết qua sàng có kích thước lỗ sàng 1,0mm nhưng lại lọt hoàn toàn qua sàng lỗ sàng 3,0mm thì trộn thật đều mẫu thí nghiệm và tiến hành chia mẫu bằng dụng cụ chia mẫu cho đến khi thu được lượng mẫu thử không ít hơn 100g. Nghiền lượng mẫu thử này trong máy nghiền cho đến khi mẫu lọt hoàn toàn qua sàng kích thước lỗ sàng 1,0mm.

7.1.3. Mẫu có kích thước hạt to

7.1.3.1. Nếu mẫu thí nghiệm không lọt hết qua sàng có kích thước lỗ sàng 3,0mm thì tiến hành nghiền trên máy nghiền cho đến khi lọt hoàn toàn qua sàng 3,0mm. Trộn đều mẫu.

7.1.3.2. Chia mẫu đã trộn đều theo (7.1.3.1) cho đến khi thu được mẫu thử không ít hơn 100g. Nghiền lượng mẫu thử này trên máy nghiền cho đến khi lọt hoàn toàn qua sàng 1,0mm.

7.1.4 Đối với mẫu hạt ngũ cốc có độ ẩm trên 17%: cân khoảng 50g mẫu với độ chính xác 0,01g cho vào khay nhôm đã biết trước khối lượng và sấy trong tủ sấy ở 80°C trong thời gian đủ để mẫu trở về độ ẩm khoảng 8-12%. Lấy khay mẫu ra khỏi tủ sấy để nguội trong phòng thí nghiệm trong 1 giờ. Sau đó cân với độ chính xác 0,01g. Nghiền nhanh trên máy nghiền cho đến khi lọt hoàn toàn qua sàng 1,0mm. Trường hợp này cần sử dụng hệ số hiệu chỉnh về độ ẩm đối với kết quả thu được (theo mục 9).

7.2 Đối với mẫu thô xanh

7.2.1. Mẫu thô xanh có hàm ẩm cao, có khả năng nghiền nhỏ sau khi sấy khô (khoai tây, cà rốt, ngô hạt, ngô ngọt tươi, thân lá rau...).

Lau sạch hoặc rửa và để ráo mẫu thí nghiệm, dùng máy cắt hoặc dao thái cắt mẫu thành nhiều miếng nhỏ, bỏ hạt, vỏ khoai bọc cứng nếu cần, trộn đều, và lấy ít nhất 100g mẫu thử cho vào hộp đựng mẫu đậy nắp kín.

Cân với độ chính xác 0,01g khoảng 100g mẫu cho vào khay nhôm đã biết trước khối lượng. Cho khay mẫu vào tủ sấy ở nhiệt độ 60°C - 80°C trong thời gian đủ để mẫu trở về độ ẩm thích hợp để nghiền. Lấy khay mẫu ra khỏi tủ sấy để nguội trong phòng thí nghiệm trong 1 giờ. Sau đó cân với độ chính xác 0,01g. Nghiền nhanh trên máy nghiền cho đến khi lọt hoàn toàn qua sàng 1,0mm. Trong trường hợp này cần sử dụng hệ số hiệu chỉnh về độ ẩm đối với kết quả thu được (theo mục 9).

7.2.2. Mẫu thô xanh có hàm ẩm cao, không nghiền nhỏ được sau khi sấy khô (mẫu thịt quả có hàm lượng đường cao như vải, nhãn, dưa hấu, cà chua...). Lau sạch hoặc rửa và để ráo mẫu thí nghiệm, dùng máy cắt hoặc dao thái cắt mẫu thành nhiều miếng nhỏ, bỏ hạt, vỏ khoang bọc cứng nếu cần, trộn đều, và lấy ít nhất 100g mẫu thử. Dùng dao hoặc kéo cắt lại mẫu cho càng nhỏ càng tốt, cho vào hộp đựng mẫu đầy nắp kín. Cần tiến hành ngay các bước phân tích tiếp theo.

7.3. Các mẫu thử được bảo quản trong các lọ đựng mẫu khô sạch và có nắp đầy kín.

8. Tiến hành xác định

8.1. Phần mẫu thử

Từ mẫu phân tích đã được chuẩn bị ở mục 7 cân chính xác đến 1mg một lượng mẫu thử, tùy thuộc vào hàm lượng nitơ sao cho phần mẫu thử chứa khoảng 0,02g đến 0,2g nitơ. Khối lượng phần mẫu thử từ mẫu khô đồng đều nên lấy khoảng 0,3g đến 1,0g; khối lượng mẫu thử ướt và/hoặc không đồng nhất phải nằm trong khoảng 2,0g đến 5,0g.

8.2. Công phá mẫu

Chuyển phần mẫu thử cho vào bình công phá mẫu. Thêm 0,5 đến 1g hỗn hợp chất xúc tác và 10ml axit sunfuric đậm đặc. Chú ý để cho bột xúc tác trôi hết xuống phần mẫu thử. Lắc đều và để yên cho mẫu thấm đều axit. Dùng phễu thủy tinh đầy bình và đặt nghiêng một góc 30°C đến 45°C so với đường thẳng đứng và giữ bình ở vị trí này trong suốt quá trình đun nóng. Đầu tiên đun nóng nhẹ để tránh bọt trào lên cổ bình hoặc trào ra ngoài. Để tránh hiện tượng này có thể thêm vài giọt parafin. Tiếp tục đun nhẹ và thỉnh thoảng lắc đều cho đến khi hỗn hợp hết sủi bọt và hoà tan hết. Sau đó tăng nhiệt độ đun cho đến khi chất lỏng sôi đều và tiếp tục cho đến khi dịch trong bình trong suốt hoặc có màu xanh nhạt. Lấy bình ra khỏi thiết bị đun nóng và để nguội.

Toàn bộ quá trình công phá mẫu phải tiến hành trong tủ hút.

Có thể sử dụng thiết bị công phá mẫu thích hợp như thiết bị công phá Kjeldahl tự động để đảm bảo hỗn hợp vô cơ hoá được xử lý nhiệt tốt.

8.3. Chứng cất amoniac

8.3.1. Cho từ từ khoảng 100ml nước cất vào bình chứa mẫu đã vô cơ hoá (8.2) để hoà tan hoàn toàn các muối sunfat lắc đều, để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm vài hạt đá bọt hoặc bi thủy tinh.

8.3.2. Dùng pipet hút 20ml đến 30ml dung dịch axit boric cho vào bình hứng của thiết bị chưng cất. Thêm 3 đến 4 giọt chỉ thị hỗn hợp.

8.3.3. Đưa bình hứng vào phía dưới của bộ ngưng tụ sao cho đầu cuối của ống ngập sâu ít nhất 1cm trong chất lỏng của bình hứng. Rót từ từ khoảng 60ml đến 70ml natri hydroxit 33% dọc theo thành bình vào bình chưng cất để tạo thành lớp riêng ở đáy bình. Lắp ngay bình vào thiết bị chưng cất và tiến hành chưng cất đến khi có khoảng 100ml dịch cất trong bình hứng. Khi gần kết thúc thời gian chưng cất, dùng giấy chỉ thị pH để kiểm tra độ pH của dịch cất ở đầu ống ngưng. Nếu phản ứng vẫn kiềm thì tiếp tục cất.

CHÚ Ý: Hạ thấp ngay bình hứng sao cho phần dưới ống ngưng không tiếp xúc với dịch trong bình để tránh hiện tượng sục ngược trở lại của dịch cất.

8.4. Chuẩn độ

Dùng axit sunfuric 0,1N để chuẩn độ ngay dung dịch trong bình thu nhận mẫu cho đến khi dung dịch chuyển từ màu xanh lá cây sang màu tím nhạt. Ghi thể tích dung dịch axit sunfuric đã dùng để chuẩn độ.

Nên chuẩn độ ngay sau khi quá trình chưng cất hoàn thành và đảm bảo nhiệt độ dịch cất không vượt quá 25°C để tránh tổn thất amoniac.

8.5. Mẫu trắng

Được tiến hành tương tự như nêu trên nhưng mẫu thử là 1g đường saccharosa

9. Tính và biểu thị kết quả

9.1.1. Hàm lượng nitơ tổng số

Hàm lượng nitơ tổng số (X_N) biểu thị bằng phần trăm theo khối lượng, được tính theo công thức:

Hàm lượng nitơ tổng số (X_N) biểu thị bằng phần trăm theo khối lượng, được tính theo công thức:

$$X_N(\%) = \frac{0,0014 \times (V_1 - V_2)}{m} \times 100$$

Trong đó:

V_1 là thể tích axit sunfuric dùng để chuẩn độ mẫu thử, tính bằng ml.

V_2 là thể tích axit sunfuric dùng để chuẩn độ mẫu trắng, tính bằng ml.

0,0014 là lượng nitơ tương ứng 1ml axit sunfuric 0,1N, tính bằng g.

m là khối lượng mẫu thử, tính bằng g.

Báo cáo kết quả chính xác đến 0,01%.

9.2. Tính theo chất khô

Đối với mẫu có sấy sơ bộ (theo 7.2) cần sử dụng hệ số hiệu chỉnh về độ ẩm đối với kết quả thu được.

9.3. Hàm lượng protein thô

Hàm lượng protein thô (X_P) biểu thị bằng % được tính theo công thức:

$$X_P(\%) = X_N \times k$$

Trong đó:

X_N là phần trăm nitơ tổng số trong mẫu thử (9.1).

k là hệ số chuyển đổi: 5,95 đối với thóc gạo; 5,83 đối với lúa mạch và tiểu mạch; 5,71 đối với đậu tương; 6,25 đối với ngô và các sản phẩm khác.

Báo cáo kết quả chính xác đến 0,1%. Kết quả cuối cùng là hiệu số trung bình của hai lần xác định đồng thời nếu sự sai khác của chúng không vượt quá:

0,2% trong trường hợp mẫu có hàm lượng protein nhỏ hơn 20%.

0,3% trong trường hợp mẫu có hàm lượng protein từ 20% đến 40%.

0,5% trong trường hợp mẫu có hàm lượng protein lớn hơn 40%.

10. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi những nội dung sau đây:

- Tất cả các thông tin cần thiết khác để xác định toàn diện về mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- Phương pháp xử lý mẫu đối với những mẫu đặc biệt, nếu có;
- Kết quả thu được, hoặc về hàm lượng nitơ hoặc về hàm lượng protein thô cùng với hệ số chuyển đổi;
- Báo cáo phải cung cấp mọi chi tiết về thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả.