

Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô

Phần 1: Phương pháp Kjeldahl

Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content

Part 1: Kjeldahl method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng nitơ trong thức ăn chăn nuôi bằng phương pháp Kjeldahl và tính hàm lượng protein thô.

Phương pháp này không xác định được các dạng nitơ bị oxi hóa hoặc các hợp chất nitơ dị vòng.

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

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6952:2001 (ISO 6498:1998), Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử.

3 Nguyên tắc

Chất hữu cơ được phân hủy bằng axit sulfuric với sự có mặt của chất xúc tác. Sản phẩm phản ứng được kiềm hóa, sau đó được chưng cất và chuẩn độ lượng amoniac giải phóng. Tính hàm lượng nitơ và nhân kết quả với hệ số qui ước để thu được hàm lượng protein thô.

4 Thuốc thử và vật liệu

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

Các thuốc thử [ngoại trừ những chất chuẩn (4.6)] không được chứa các hợp chất nitơ.

4.1 Kali sunfat.

4.2 Chất xúc tác, 4.2.1 hoặc 4.2.2.

4.2.1 Đồng (II) oxit (CuO).

4.2.2 Đồng (II) sunfat ngậm năm phân tử nước ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

4.3 Axit sulfuric, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 18 \text{ mol/l}$, $\rho_{20}(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/ml}$.

4.4 Sáp parafin.

4.5 Sacaroza.

4.6 Chất chuẩn, 4.6.1 hoặc 4.6.2.

4.6.1 Axetanilit, có điểm nóng chảy ở 114°C ; hàm lượng nitơ (N) $103,6 \text{ g/kg}$.

4.6.2 Tryptophan, có điểm nóng chảy ở 282°C ; hàm lượng nitơ (N) $137,2 \text{ g/kg}$.

Sấy khô tryptophan trước khi sử dụng.

4.7 Dung dịch natri hydroxit, $w(\text{NaOH}) = 33 \%$ (phần khối lượng).

4.8 Dịch thu, 4.8.1 hoặc 4.8.2.

4.8.1 Axit sulfuric, dung dịch thể tích chuẩn, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$ hoặc $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,125 \text{ mol/l}$.

4.8.2 Axit boric, $\rho(\text{H}_3\text{BO}_3) = 40 \text{ g/l}$.

4.9 Dung dịch dùng để chuẩn độ.

4.9.1 Natri hydroxit: dung dịch thể tích chuẩn, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ hoặc $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.

4.9.2 Axit sulfuric, dung dịch thể tích chuẩn, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$ hoặc $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,125 \text{ mol/l}$.

Nồng độ phân tử gam của dung dịch thể tích chuẩn phải tính đến chữ số thập phân thứ tư.

4.10 Chất chỉ thị hỗn hợp, điểm trung tính ở pH = 4,4 đến 5,8.

Hòa tan 2 g đỏ metyl và 1 g xanh metylen trong 1 000 ml etanol [φ (C₂H₅OH) = 95% (phần thể tích)].

4.11 Giấy chỉ thị pH.

4.12 Chất trợ sôi, như đá bọt hạt, hoặc bi thủy tinh đường kính 5 mm đến 7 mm, hoặc các miếng carborundum đã được rửa bằng axit clohydric, nước cất và tro hoá.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Cân phân tích.

5.2 Thiết bị phân hủy, chưng cất và chuẩn độ.

6 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 4325 (ISO 6497).

Bảo quản mẫu sao cho tránh được sự hư hại và thay đổi thành phần.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952:2001 (ISO 6498:1998).

8 Cách tiến hành

CẢNH BÁO – Các thao tác được mô tả trong 8.3.1 và 8.3.2 phải thực hiện trong tủ hút có hệ thống thông gió tốt hoặc trong tủ hút khói chịu được axit sulfuric.

8.1 Yêu cầu chung

Hướng dẫn chung khi áp dụng phương pháp Kjeldahl, xem ISO 1871.

8.2 Phần mẫu thử

Cân một lượng mẫu thử, tùy thuộc vào hàm lượng nitơ sao cho phần mẫu thử chứa từ 0,005 g đến 0,2 g nitơ và tốt nhất là lớn hơn 0,02 g nitơ, chính xác đến 1 mg.

Khối lượng phần mẫu thử từ mẫu khô đồng nhất nên lấy trong khoảng từ 0,5 g đến 2,0 g. Khối lượng phần mẫu thử ướt và/hoặc không đồng nhất thì trong khoảng từ 2,5 g đến 5,0 g.

8.3 Xác định

8.3.1 Phân hủy chất hữu cơ

Chuyển hết phần mẫu thử sang bình phân hủy Kjeldahl có kích cỡ phù hợp (thường là 800 ml).

Thêm 15 g kali sunfat (4.1).

Thêm một lượng thích hợp chất xúc tác như sau: 0,3 g đồng (II) oxit (4.2.1) hoặc từ 0,9 g đến 1,2 g đồng (II) sunfat ngậm năm phân tử nước (4.2.2).

Thêm 25 ml axit sulfuric (4.3) đối với gam chất khô đầu tiên của phần mẫu thử và thêm 6 ml đến 12 ml cho mỗi gam chất khô tiếp theo. Trộn kỹ, đảm bảo rằng phần mẫu thử được ướt hoàn toàn.

Đặt bình cầu sao cho trục của nó nghiêng một góc 30° đến 45° so với phương thẳng đứng. Giữ bình ở vị trí này trong suốt quá trình đun nóng.

Đầu tiên đun nhẹ để tránh bọt trào lên cổ bình hoặc trào ra ngoài.

CHÚ THÍCH 1 Có thể thêm chất chống tạo bọt như sáp parafin (4.4).

Đun nhẹ và thỉnh thoảng khuấy cho đến khi hỗn hợp bị cacbon hóa và hết bọt. Sau đó tiếp tục đun đến khi dịch lỏng sôi đều.

CHÚ THÍCH 2 Nếu thấy axit ngưng tụ đến giữa cổ bình Kjeldahl có nghĩa là quá trình đun đã hoàn tất.

Tránh để thành bình quá nóng nếu thành bình không tiếp xúc với dịch lỏng.

CHÚ THÍCH 3 Nếu dùng ngọn lửa thường, có thể tránh hiện tượng quá nhiệt bằng cách đặt bình trên lưới làm bằng vật liệu chịu nhiệt có đường kính lỗ lưới hơi nhỏ hơn đường kính của bình ở đoạn chứa phần dịch lỏng.

Sau khi dịch lỏng đã trong có màu xanh lục lam, đun nóng thêm 2 giờ.

Để nguội. Nếu xuất hiện cặn rắn thì thêm một ít nước và trộn đều bằng cách khuấy.

8.3.2 Chứng cất amoniac

8.3.2.1 Cho cẩn thận từ 250 ml đến 350 ml nước để hòa tan hoàn toàn sunfat. Nếu cần có thể hòa tan bằng cách làm ấm bình trong nước ấm. Trộn đều bằng cách khuấy và để nguội.

Thêm một ít chất trợ sôi (4.12).

Đối với một số mẫu cụ thể, sunfat có thể không hòa tan hoàn toàn trong nước. Trong trường hợp này nên lặp lại quá trình phân hủy với một lượng kali sunfat (4.1) nhỏ hơn.

8.3.2.2 Dùng pipet lấy 25 ml axit sulfuric (4.8.1) cho vào bình hứng của thiết bị chưng cất, có nồng độ axit chọn phụ thuộc vào hàm lượng nitơ của phần mẫu thử. Thêm từ 100 ml đến 150 ml nước. Thêm vài giọt chất chỉ thị hỗn hợp (4.10). Tiến hành theo 8.3.2.4.

8.3.2.3 Cách khác, cho vào bình hứng từ 100 ml đến 250 ml axit boric (4.8.2). Thêm vài giọt chất chỉ thị hỗn hợp (4.10).

Nên chuẩn độ đồng thời amoniac (xem 8.3.3.3) trong quá trình chưng cất, điều này giúp cho việc xác định thời điểm kết thúc quá trình chưng cất được dễ dàng.

8.3.2.4 Nhúng đầu ra của bình sinh hàn trong dịch lỏng của bình hứng sâu ít nhất 1 cm.

Rót từ từ 100 ml dung dịch natri hydroxit (4.7) dọc theo thành bình vào bình phân hủy.

Lắp ngay bình vào thiết bị chưng cất.

Đun bình sao cho trong 30 phút thu được khoảng 150 ml dịch cất. Khi kết thúc thời gian chưng cất, dùng giấy chỉ thị pH (4.11) kiểm tra độ pH của dịch cất ở đầu ống ngưng. Nếu phản ứng vẫn kiềm tính, thì tiếp tục chưng cất.

CHÚ Ý – Lấy bình ngưng ra khỏi dịch lỏng ngay trước khi kết thúc quá trình chưng cất để tránh hiện tượng sục ngược trở lại của dịch cất.

Nếu trong suốt quá trình chưng cất sử dụng axit sulfuric làm dịch thu, thì dung lượng chứa trong bình hứng trở nên kiềm tính, vì vậy nên có sự điều chỉnh thích hợp khi xác định.

8.3.3 Chuẩn độ

8.3.3.1 Nên dùng máy đo pH khi chuẩn độ có chỉ thị điểm kết thúc tự động. Trái lại, điểm kết thúc được chỉ thị bằng sự đổi màu của chỉ thị hỗn hợp (4.10) được bổ sung ở 8.3.2.

8.3.3.2 Nếu dùng axit sulfuric làm dịch thu, thì trong bình hứng chuẩn độ lượng axit sulfuric dư bằng dung dịch natri hydroxit (4.9.1), $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ hoặc $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$ phù hợp, cho đến khi máy đo pH cho thấy điểm kết thúc hoặc cho đến khi có sự thay đổi màu từ tím sang xanh lá cây.

8.3.3.3 Nếu dùng axit boric làm dịch thu, thì chuẩn độ amoniac bằng axit sulfuric (4.9.2), $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$ hoặc $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,125 \text{ mol/l}$ thích hợp, cho đến khi máy đo pH cho thấy điểm kết thúc hoặc cho đến khi thay đổi màu từ xanh lá cây sang tím.

Nếu chuẩn độ không thể tiến hành được đồng thời (xem 8.3.2.3), thì nên tiến hành chuẩn độ càng sớm càng tốt sau khi kết thúc việc chưng cất và đảm bảo rằng nhiệt độ dịch cất không quá 25 °C. Ở điều kiện này sẽ tránh được sự hao hụt amoniac.

8.4 Phép thử trắng

Dùng khoảng 1 g saccaroza (4.5) thay thế phần mẫu thử.

8.5 Phép thử kiểm tra

Tiến hành phép thử kiểm tra bằng cách xác định hàm lượng nitơ của axetanilit (4.6.1) hoặc tryptophan (4.6.2) sau khi đã thêm 1 g sacaroza (4.5).

Việc chọn chất dùng cho phép thử kiểm tra cần phải xem xét đến khả năng phân hủy của mẫu để phân tích. Axetanilit dễ phân hủy còn tryptophan khó phân hủy hơn.

Độ thu hồi nitơ từ axetanilit hoặc từ tryptophan ít nhất phải là 99,5 % đối với axetanilit và ít nhất 99,0 % đối với tryptophan.

9 Tính và biểu thị kết quả

9.1 Tính hàm lượng nitơ

9.1.1 Dịch cất thu được trong axit sulfuric

Khi thể tích axit sulfuric dùng để thu hồi amoniac trong phép xác định (8.3) và trong phép thử trắng ở (8.4) là bằng nhau, tính hàm lượng nitơ của mẫu thử, w_{n1} , tính bằng gam trên kilogam mẫu thử, được tính bằng công thức sau đây:

$$w_{n1} = \frac{(V_0 - V_1) \times c_1 \times M}{m}$$

trong đó

V_0 là thể tích của dung dịch natri hydroxit (4.9.1) dùng cho phép thử trắng, tính bằng mililit;

V_1 là thể tích của dung dịch natri hydroxit (4.9.1) dùng để xác định, tính bằng mililit;

c_1 là nồng độ của dung dịch natri hydroxit (4.9.1) dùng để chuẩn độ, tính bằng mol trên lít;

M là khối lượng phân tử gam của nitơ, ($M = 14$ g/mol), tính bằng gam trên mol;

m là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam.

Báo cáo kết quả chính xác đến 0,01 g/kg.

9.1.2 Dịch cất thu được trong axit boric

Tính hàm lượng nitơ của mẫu thử theo công thức sau đây:

$$w_{n2} = \frac{2 (V_3 - V_2) \times c_2 \times M}{m}$$

trong đó

w_{n2} là hàm lượng nitơ của mẫu thử, tính bằng gam trên kilogram;

V_2 là thể tích của axit sulfuric (4.9.2) dùng cho phép thử trắng, tính bằng mililit;

V_3 là thể tích của axit sulfuric (4.9.2) dùng để xác định, tính bằng mililit;

M là khối lượng phân tử gam của nitơ, ($M = 14$ g/mol), tính bằng gam trên mol;

c_2 là nồng độ của axit sulfuric (4.9.2) dùng để chuẩn độ, tính bằng mol trên lít;

m là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam.

Báo cáo kết quả chính xác đến 0,01 g/kg.

9.1.3 Tính hàm lượng protein thô

Hàm lượng protein thô có thể tính bằng phần trăm hoặc gam trên kilogram. Công thức tính hàm lượng protein thô của mẫu thử như sau:

$$w_n = 6,25 w_p \text{ g/kg}$$

hoặc

$$w_p = 0,625 w_n \%$$

trong đó

w_p là hàm lượng protein thô tính bằng gam trên kilogram hoặc tính bằng phần trăm;

w_n là hàm lượng nitơ của mẫu thử (w_{n1} hoặc w_{n2} xem 9.1), tính bằng gam trên kilogram.

Báo cáo kết quả chính xác đến 0,01 g/kg hoặc 0,1 %.

10 Độ chum

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chum của phương pháp được đưa ra trong phụ lục A. 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 (matrix) khác với các giá trị đã nêu.

10.2 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 giới hạn lặp lại (r) được tính theo công thức sau đây:

$$r = 0,3 \% + 0,008 w_p$$

trong đó

r là giới hạn lặp lại, tính bằng phần trăm;

w_p là giá trị trung bình của hai kết quả thử đơn lẻ xác định lượng protein thô, tính bằng phần trăm.

10.3 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 giới hạn tái lập (R) được tính theo công thức sau đây:

$$R = 1,3 \% + 0,027 w_p$$

trong đó

R là giới hạn tái lập, tính bằng phần trăm;

w_p là giá trị trung bình của hai kết quả thử độc lập dùng để xác định hàm lượng protein thô, tính bằng phần trăm.

11 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, hàm lượng nito hoặc hàm lượng protein thô, tính bằng gam trên kilogam hoặc tính bằng phần trăm, cùng với hệ số chuyển đổi (nghĩa là 6,25); hoặc 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

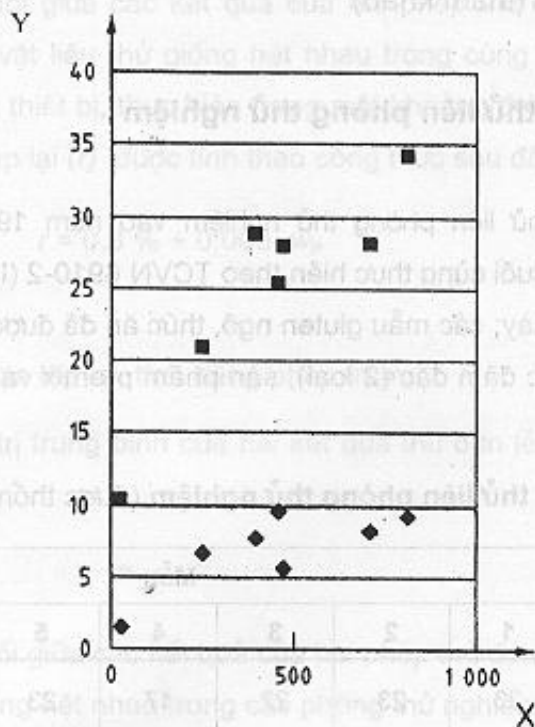
ISO/TC 34/SC 10 đã tổ chức một phép thử liên phòng thử nghiệm vào năm 1987 tiến hành theo ISO 5725:1986. Kết quả phân tích thống kê cuối cùng thực hiện theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Có 25 phòng thử nghiệm tham gia trong phép thử này; các mẫu gluten ngô, thức ăn đã được trộn trước vỗ béo, bột cá, thức ăn chăn nuôi đã được trộn trước đậm đặc (2 loại), sản phẩm premix và nấm men đã được đánh giá.

Bảng A.1 – Kết quả thống kê của phép thử liên phòng thử nghiệm (được thống kê năm 2002)

Thông số	Mẫu ^{a)}						
	1	2	3	4	5	6	7
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi đã loại trừ	23	23	22	17	23	23	23
Hàm lượng protein thô trung bình,%, (tính theo hàm lượng chất khô)	70,5	81,1	45,9	3,0	39,6	47,5	25,3
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), % protein thô	0,29	0,33	0,34	0,06	0,28	0,20	0,24
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	0,41	0,41	0,75	1,85	0,7	0,42	0,93
Giới hạn lặp lại (r) [$r = 2,8 \times s_r$], % protein thô	0,82	0,92	0,96	0,16	0,78	0,56	0,66
Giá trị Horrat ^b	0,3	0,3	0,5	0,9	0,5	0,3	0,7
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R), % protein thô	1,00	1,22	0,90	0,37	1,03	0,97	0,74
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	1,42	1,5	1,96	12,1	2,59	2,03	2,94
Giới hạn tái lập (R) [$R = 2,8 \times s_R$], % protein thô	2,80	3,42	2,53	1,02	2,88	2,78	2,08
Giá trị Horrat ^b	0,7	0,7	1,2	3,8	1,2	0,9	1,3

- ^a Mẫu 1: bột cá;
Mẫu 2: thức ăn chứa gluten ngô;
Mẫu 3: nấm men;
Mẫu 4: sản phẩm premix;
Mẫu 5: thức ăn chăn nuôi đã được trộn trước đậm đặc ;
Mẫu 6: thức ăn chăn nuôi đã được trộn trước đậm đặc;
Mẫu 7: thức ăn chăn nuôi đã được trộn trước vỗ béo.

^b Giá trị Horrat bằng 1 chứng tỏ đáp ứng được yêu cầu về độ chụm, còn giá trị > 2 thì không đáp ứng được yêu cầu về độ chụm; nghĩa là, độ chụm biến động lớn đối với hầu hết phép phân tích hoặc khi giá trị biến thiên thu được lớn hơn giá trị mong muốn đối với phương pháp đã dùng ^{[6], [7]}.



Chú giải

X giá trị trung bình, w_m , g/kg

Y giá trị độ chụm, g/kg

◆ Giới hạn lặp lại r (% protein thô) = $0,008 w_m + 0,3$

■ Giới hạn tái lập R (% protein thô) = $0,027 w_m + 1,3$

Hình A.1 – Mối quan hệ giữa các giá trị độ chụm (r , R) và giá trị trung bình (w_m)

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 1871 Agricultural food products – General directions for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method.
- [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] TCVN 4325:2007 (ISO 6497:2002), Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.
- [6] HORWITZ. Evaluation of methods used for regulation of foods and drugs, *Anal. Chem.*, **57**, 1982, pp. 67 A-76A.
- [7] PEELER J. T., HORWITZ W. and ALBERT R. Precision parameters of standard methods of analysis of dairy products, *J.AOAC*, **72** (5), 1989, pp. 784-806.