دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

# مقایسه روش هچ با روش کجلدال در تعیین محتوای پروتئین خام برخی خوراک‌های دامی

**حسین عبدی بنمار[۱]، جمال سیف دواتی[۲]، بهرام فتحی آچاچلوئی[۲] و رسول کچویی[۳]**

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی، (نویسنده مسوول: abdibenemar@uma.ac.ir)
۲ و ۳- استادیار و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی
تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱ تاریخ پذیرش:۹۶/۱/۲۳

**چکیده**

**هدف از این پژوهش ارزیابی روش هچ در تعیین محتوای پروتئین خام برخی خوراک‌های دامی بود. تعداد ۲۱ نمونه خوراکی شامل انواع مواد علوفه‌ای، مواد کنسانتره‌ای، مخلوط‌های کنسانتره‌ای، نمونه‌های هضمی شکمبه‌ای و مقادیر ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۱۵، ۰/۱۷۵ و ۰/۲ میلی‌گرم کلرید آمونیوم انتخاب شده و با استفاده از روش کجلدال، به‌عنوان روش مرجع و روش هچ، محتوای نیتروژن و پروتئین خام آن‌ها تعیین و با یکدیگر مقایسه شدند. تفاوت معنی‌داری بین دو روش از نظر برآورد محتوای پروتئین خام مواد خوراکی مختلف و مقادیر کلرید آمونیوم وجود نداشت. همبستگی بین روش هچ و روش کجلدال از نظر تعیین محتوای پروتئین خام مواد خوراکی مورد آزمایش مثبت و بالا بود (r = ۰/۹۹). تغییر در روش هضم نمونه‌ها طی روش اصلی هچ سبب سرعت بخشیدن به روش مذکور شده و امکان آنالیز همزمان چندین نمونه را فراهم آورد. با توجه به نتایج این آزمایش، محتوای پروتئینی نمونه‌های مورد آنالیز در آزمایشگاه‌های خوراک دامی را می‌توان با استفاده از روش هچ با دقت و صحت بالا تعیین نمود.**

**واژه‌های کلیدی: پروتئین خام، روش کجلدال، روش هچ، ارزشیابی خوراک دام**

## مقدمه

به‌طور معمول، محتوای پروتئین خوراک‌های دامی بر اساس پروتئین خام مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (۱۳). پروتئین‌ها تقریبا حاوی درصد یکسانی از نیتروژن (حدود ۱۶ درصد) هستند و به همین جهت است که روش‌های تجزیه‌ای برای تعیین مقدار نیتروژن به‌ویژه در مواد خوراکی از اهمیت خاصی برخوردارند.

روش‌های مختلفی جهت اندازه‌گیری محتوای نیتروژن مواد خوراکی توسعه یافته است. متداول‌ترین روش برای تعیین مقدار نیتروژن در مواد آلی که بر اساس خنثی شدن با تیتراسیون استوار است روش کجلدال است (۱). در این روش ترکیبات نیتروژنی موجود در مواد خوراکی در قدم اول باید هضم شوند که این فرآیند بسیار زمان بر و نیازمند تعدادی از معرف‌هاست. بدین‌منظور، ابتدا نمونه مورد نظر با اسید سولفوریک غلیظ و به همراه کاتالیزور که سبب سرعت بخشیدن واکنش می‌شود هضم شده و ترکیبات نیتروژنی موجود به نمک آمونیوم تبدیل می‌شوند. مرحله دوم شامل جداسازی اشکال مختلف آمونیوم و جمع‌آوری آن‌ها با استفاده از تقطیر و یک اسید ضعیف (اسید بوریک) است و مرحله سوم تعیین مقدار آمونیوم بوسیله تیتراسیون با یک اسید قوی مانند اسید سولفوریک یا اسید کلریدریک است (۱). اگرچه روش اصلی کجلدال بیش از صد سال پیش توسعه یافته (۳،۴،۵،۱۱) و تاکنون دستخوش تغییرات متعددی شده است، ولی همچنان به‌عنوان روش مرجع و استاندارد اندازه‌گیری محتوای نیتروژنی در بسیاری از آزمایشگاه‌های آنالیز مواد خوراکی انسانی و دامی کاربرد دارد (۲). روش هچ[۱] یک روش جایگزین برای روش کجلدال که متفاوت از روش کجلدال است و مرحله هضم در روش آن‌ها سریعتر و با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ و پراکسید هیدروژن و همچنین بدون نیاز به استفاده از کاتالیزور و به‌دنبال آن، از روش رنگ سنجی برای تعیین میزان نیتروژن استفاده می‌شود (۷). در چندین مطالعه انجام شده در باره مقایسه روش‌های کجلدال و هچ، همبستگی بسیار بالایی بین میزان محتوای پروتئین خام اندازه‌گیری شده با روش هچ و روش رایج کجلدال در نمونه‌های خوارکی متفاوت دیده شده است (۲،۱۴). همچنین این آزمایشات نشان دادند که نمونه‌های استاندارد در روش هچ دقت و صحت بیشتری نسبت به روش کجلدال داشت (۲،۷،۸،۱۷،۱۴). اگرچه صحت و دقت روش هچ در تعیین محتوای نیتروژن مواد مختلف اثبات شده است، محدودیت اصلی این روش را می‌توان عدم امکان به‌کارگیری آن برای آنالیز تعداد بالای نمونه به‌طور هم زمان ذکر کرد. به طوری که اجرای این روش در اصل توسط یک دستگاه هضم به نام دایجستال[۲] انجام می‌شود که نمونه‌ها به‌طور یک به یک در آن قابل هضم خواهند بود و سبب محدودیت در سرعت انجام، برای سنجش محتوای پروتئین خام تعداد زیادی نمونه می‌شود. نمونه‌های به‌کار رفته در تغذیه دام به علت ساختار بیوشیمیایی متفاوت از علوفه‌ها تا غلات، گستردگی بالایی از نظر محتوای پروتئین خام و همچنین مقاومت به هضم با اسید دارند. لذا با توجه به عدم ارزیابی روش هچ در سنجش محتوای پروتئین خام مواد خوراکی دامی در مطالعات قبل، هدف از پژوهش حاضر سنجش محتوای پروتئین خام برخی نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از روش هچ با هدف افزایش امکان تعداد نمونه مورد بررسی بطور همزمان و مقایسه داده‌های حاصل با روش کجلدال به عنوان روش استاندارد بود.

1- Hach method
2- Digestahl

## مواد و روش‌ها

۲۱ نمونه ماده خوراکی با دامنه‌ای وسیع از پروتئین خام، شامل انواع مواد علوفه‌ای، مواد کنستانتره‌ای، مخلوط‌های کنسانتره‌ای، نمونه‌های هضمی شکمبه‌ای و مقادیر ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۱۵، ۰/۱۷۵ و ۰/۲ میلی گرم کلرید آمونیوم در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و با استفاده از روش کجلدال و روش هچ در سه تکرار جهت تعیین محتوای نیتروژنی و پروتئینی در آزمایشگاه تغذیه دام گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. انتخاب مقادیر مختلف کلرید آمونیوم با توجه به اطلاع از میزان نیتروژن موجود در آن به منظور بررسی درستی داده‌های به دست آمده در دو روش انجام شد.

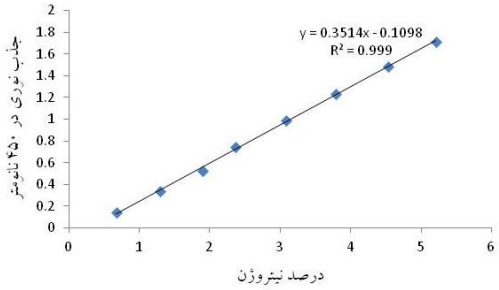
### روش کجلدال

یک گرم از نمونه‌های مورد آزمایش داخل لوله‌های هضمی کجلدال ریخته شد. سپس ۵ گرم کاتالیزور شامل ۰/۵ گرم سولفات مس (شرکت مرک، آلمان) و ۴/۵ گرم سولفات پتاسیم (شرکت مرک، آلمان) به همراه ۱۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد (شرکت مرک، آلمان) به داخل لوله‌ها افزوده شد. سپس لوله‌های مربوطه به مدت ۲/۵–۳ ساعت (با توجه به ماهیت نمونه) در دمای ۳۰۰ درجه سانتی گراد بر روی گرم کننده مخصوص تکاتور[1] قرار داده شد تا هضم شده تا بصورت کاملا شفاف در آیند و بعد از سرد شدن بالن و محتویات آن، مقدار ۷۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس این محلول در دستگاه کلتک[2] برای تقطیر و تیتراسیون قرار داده شد. از محلول هیدروکسید سدیم ۴۰ درصد (شرکت مرک، آلمان) برای قسمت تقطیر و برای قسمت تیتراسیون از اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال و معرف اسید بوریک استفاده شد. دستگاه با بلانک صفر شد که شامل تمام مواد ذکر شده در بالا به جز نمونه مورد آزمایش است. سپس نمونه‌ها به ترتیب در دستگاه قرار داده شد و با استفاده از رابطه زیر، نیتروژن کل موجود در خوراک اندازه‌گیری شد و از حاصل ضرب نیتروژن کل در ضریب ۶/۲۵، درصد پروتئین خام به دست آمد (۱).

$$\text{درصد نیتروژن کل} = \frac{\text{حجم اسید مصرفی} \times \text{نرمالیته اسید} \times ۱۴}{\text{گرم وزن نمونه} \times ۱۰۰۰} \times ۱۰۰$$

### روش هچ

در این آزمایش از روش هچ با اندکی تغییرات استفاده شد (۸). به این ترتیب که کلیه مراحل مشابه روش اصلی هچ بوده با این تفاوت که در مرحله هضم به‌جای به‌کارگیری از دستگاه هضمی مخصوص هچ، نمونه مورد نظر داخل بالن ۵۰ میلی‌لیتری به همراه اسید سولفوریک روی یک هیتر معمولی در دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفتند. سپس بر روی هر بالن ۵۰ میلی‌لیتر یک مبرد قرار داده شد. این قطعه برای برگرداندن بخارهای حاصل از هضم نمونه شامل بخار اسید سولفوریک و آب به داخل بالن و جلوگیری از خشک شدن نمونه در طی فرایند هضم بود. انتهای مبرد با استفاده از یک تکه لوله پلاستیکی برای خروج قطرات تشکیل شده احتمالی به سینک ظرفشویی ارتباط داشت. این تغییرات امکان هضم و آنالیز همزمان تعداد بالای نمونه را فراهم ساخت به‌طوری که روی یک گرم‌کننده به ابعاد ۶۰×۴۰ سانتی‌متری تعداد ۳۰ عدد بالن ۵۰ میلی‌لیتری به طور همزمان چیده شده و فرآیند هضم در زیر یک هود آزمایشگاهی قابل انجام بود. بدین منظور نیم‌گرم از خوراک همراه با ۴ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد (شرکت مرک، آلمان) به بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و پس از انکوباسیون، بالن‌ها به روی هات پلیت ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد چیده شده و دما به مرور به ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. بعد از گذشت ۱ ساعت ۲ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۳۵ درصد (شرکت مرک، آلمان) به آن اضافه شد. به همین ترتیب هر ۲۰ دقیقه یک بار این عمل تکرار شد تا نمونه‌ها هضم شده و بی‌رنگ شدند (حدود ۸ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن مصرف شد). سپس نمونه‌ها با استفاده از آب مقطر در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شدند. در ادامه ۰/۵ میلی لیتر از نمونه هضم شده را به ۲۴/۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ گرم بر لیتر پلی ونیل الکل ۱۰۰۰۰ (شرکت مرک، آلمان) اضافه شد. سپس به محلول فوق ۱ میلی‌لیتر معرف نسلر (سیگما آلدریچ، آمریکا) اضافه شد و بلافاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر میزان جذب خوانده شد. مقادیر ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۱۵، ۰/۱۷۵ و ۰/۲ میلی‌گرم کلرید آمونیوم، برای رسم منحنی میزان جذب در برابر محتوای نیتروژن بعنوان منحنی استاندارد به کار گرفته شد (شکل ۱). محتوای پروتئین خام نمونه از حاصل ضرب نیتروژن کل در عدد ۶/۲۵ محاسبه گردید.




شکل ۱– منحنی استاندارد روش هچ
Figure 1. Standard curve of Hach method

1- Tecator
2- Tecator Kjeltec 1030 Auto Analyzer

## تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور بررسی وجود تفاوت آماری بین دو روش تعیین پروتئین خام، داده‌های بدست آمده برای مواد خوراکی مختلف و مقادیر متفاوت کلرید آمونیوم با استفاده از آزمون t و نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ مقایسه شدند. همبستگی بین دو روش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ رویه CORR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح (P<۰/۰۵) به عنوان سطح معنی‌داری لحاظ گردید.

## نتایج و بحث

میانگین محتوای پروتئین‌خام برخی نمونه‌های خوراکی اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های هچ و کجلدال در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین دو روش از نظر برآورد درصد پروتئین خام وجود نداشت (جدول ۱) و مقادیر پروتئین خام تعیین شده با روش هچ قابل مقایسه با روش کجلدال می‌باشد که با نتایج گزارش شده توسط هچ و همکاران (۸) و روسی و همکاران (۱۴) مطابقت داشت. اگرچه، به‌طور کلی مقادیر اندازه‌گیری شده با روش کجلدال اندکی بالاتر از مقادیر به دست آمده از روش هچ بود که با نتایج گزارش شده توسط سایر پژوهش‌گران در خصوص مقایسه روش کجلدال و روش اصلی هچ مطابقت داشت (۲،۴،۷،۸،۱۴،۱۷). اگرچه، نمونه‌های واضح و شفافی در طی هضم جهت آنالیز بدست می‌آید که با گزارشات قبلی (۱۴،۸) در خصوص نحوه هضم نمونه‌ها مطابقت دارد، ولی علت بالاتر بودن محتوای پروتئین در روش کجلدال ممکن است به این دلیل باشد که در روش کجلدال هضم کامل‌تری نسبت به هچ صورت می‌گیرد (۱۷)، چراکه در روش کجلدال مدت زمان بیشتری نسبت به روش هچ صرف هضم می‌گردد (۱۴). همچنین صحت کمتر روش هچ در مقایسه با روش کجلدال گزارش شده (۱۴) که این مسئله نیز به هضم سریع‌تر مواد آلی و عدم هضم کامل برخی ترکیبات نیتروژن‌دار در روش هچ ارتباط داده شده است (۸،۷).

جدول ۱- محتوای پروتئین خام برخی نمونه‌های خوراکی اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های هچ و کجلدال

Table 1. Crude protein content of some feed samples measured by Hach and Kjehldal methods

| نمونه خوراک | روش هچ(درصد) | روش کجلدال (درصد) | SEM | P-Value |
|---|---|---|---|---|
| علف خشک یونجه | ۱۲/۶۳ | ۱۲/۸۰ | ۰/۲۰۴ | ۰/۵۴۳۷ |
| علوفه ذرت سیلو شده | ۸/۳۸ | ۸/۶۰ | ۰/۳۰۱ | ۰/۵۲۰۲ |
| علف خشک شبدر | ۱۴/۹۸ | ۱۵/۱۰ | ۰/۲۵۷ | ۰/۵۸۹۹ |
| کاه ماشک | ۷/۷۹ | ۷/۸۵ | ۰/۲۳۲ | ۰/۸۱۴۱ |
| دانه جو | ۱۳/۱۹ | ۱۳/۲۵ | ۰/۲۰۱ | ۰/۸۲۵۲ |
| دانه ذرت | ۷/۷۷ | ۷/۷۹ | ۰/۳۱۵ | ۰/۹۵۰۸ |
| دانه گندم | ۱۴/۷۱ | ۱۴/۷۲ | ۰/۲۲۸ | ۰/۹۸۸۳ |
| کنجاله سویا | ۴۴/۸۴ | ۴۴/۹۵ | ۰/۱۴۴ | ۰/۶۲۵۹ |
| دانه بذرک | ۲۳/۶۰ | ۲۳/۶۶ | ۰/۲۰۱ | ۰/۸۱۵۲ |
| دانه سویا | ۳۶/۹۳ | ۳۶/۹۴ | ۰/۱۵۷ | ۰/۹۹۲۳ |
| پودر ماهی | ۶۰/۷۹ | ۶۰/۸۰ | ۰/۱۰۱ | ۰/۹۸۲۸ |
| دانه ماشک | ۱۵/۸۲ | ۱۵/۸۵ | ۰/۱۱۰ | ۰/۹۰۷۸ |
| ماش | ۲۳/۹۲ | ۲۴/۱۰ | ۰/۲۰۸ | ۰/۹۲۷۳ |
| پوسته بادام زمینی | ۵/۸۵ | ۵/۹۰ | ۰/۱۰۰ | ۰/۸۱۹۵ |
| مخلوط کنسانتره‌ای ۱ | ۱۲/۰۲ | ۱۱/۹۰ | ۰/۲۱۵ | ۰/۸۳۵۷ |
| مخلوط کنسانتره‌ای ۱ | ۱۴/۱۵ | ۱۴/۱۰ | ۰/۱۱۹ | ۰/۸۰۸۰ |
| علف خشک یونجه پس از ۸ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای | ۱۱/۷۳ | ۱۱/۸۰ | ۰/۲۲۶ | ۰/۷۷۱۶ |
| ذرت سیلو شده پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای | ۶/۱۶ | ۶/۲۰ | ۰/۱۰۲ | ۰/۸۶۳۰ |
| علف شبدر پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای | ۱۲/۱۸ | ۱۲/۲۰ | ۰/۲۱۶ | ۰/۹۶۹۹ |
| گاودانه پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای | ۵/۶۹ | ۵/۷۴ | ۰/۱۹۴ | ۰/۸۳۱۶ |
| ماشک پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای | ۴/۷۴ | ۴/۸۰ | ۰/۲۱۲ | ۰/۷۹۴۵ |

روسی و همکاران (۱۴) با مقایسه روش هچ و کجلدال جهت تعیین محتوای پروتئین خام ۲۵ ماده غذایی گزارش کردند که بین نمونه‌های آنالیز شده تفاوت معنی‌داری بین دو روش وجود نداشت و در ۶۴ درصد از نمونه‌های آزمایشی، روش کجلدال به میزان بسیار کم و غیر معنی‌داری، محتوای نیتروژنی بیشتری نسبت به روش هچ اندازه‌گیری می‌کند (۱۴). این محققین بیان کردند که روش هچ می‌تواند به‌عنوان یک روش جایگزین برای روش کجلدال استفاده شود و همچنین روش هچ را به‌عنوان یک روش با فوایدی از قبیل مصرف کمتر مواد شیمیایی، حجم کمتر نمونه مورد نیاز و مدت زمان کمتر مورد نیاز برای انجام آزمایش معرفی نمودند. همچنین واتکینز و همکاران (۱۷) پیشنهاد کردند که باتوجه به عدم استفاده از هیچ نوع کاتالیزوری در طی هضم با روش هچ، می‌توان از نمونه‌های هضم شده برای آنالیز عناصر دیگر نیز استفاده کرد.

تعیین محتوای نیتروژن یک روش آزمایشگاهی پرکاربرد در بسیاری از صنایع می‌باشد. در روش کجلدال، نمونه داخل اسید سولفوریک غلیظ همراه با برخی کاتالیزورهای فلزی به منظور تسریع تجزیه ترکیبات آلی حرارت داده می‌شود. نیتروژن آلی موجود در آن به آمونیاک تبدیل شده، سپس به درون یک محلول اسیدی تقطیر شده و در نهایت تیتر می‌شود (۸). روش کجلدال مرحله هضمی مشکلی را در بر می‌گیرد که مستلزم تجهیزات، مواد و صرف زمان زیادی است. از طرفی، هچ و همکاران (۸) با استفاده از پراکسید هیدروژن به همراه اسید

سولفوریک جهت هضم مدت زمان و میزان مصرف اسید سولفوریک را کاهش داده و همچنین کاتالیزورهای مورد استفاده در روش کجلدال را نیز حذف نمودند. البته انجام این نوع هضم مستلزم استفاده از دستگاه هضم کننده ابداعی هچ بنام دایجستال می‌باشد که علاوه بر نیاز به سرمایه‌گذاری، به علت تک واحده بودن تعداد نمونه‌های قابل آنالیز در زمان واحد را کاهش می‌دهد. در این پژوهش به جای استفاده از دستگاه دایجستال از بالن‌های حجمی ۵۰ میلی‌لیتری معمولی جهت انجام مراحل هضم روش هچ با اندکی تغییرات استفاده شد که عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین نتایج روش هچ و روش استاندارد کجلدال در این پژوهش می‌تواند نشان از کارایی روش به کار رفته در پژوهش حاضر و قابل استفاده بودن آن علیرغم تغییرات اعمال شده در مرحله هضم باشد.

به‌منظور محاسبه درصد پروتئین خام مقادیر مختلف کلرید آمونیوم آزمایشگاهی بدون استفاده از روش‌های اندازه گیری، عدد مربوط به میزان نیتروژن درج شده توسط شرکت سازنده بر روی برچسب ظرف حاوی آن در عدد ۶/۲۵ ضرب و درصد خلوص آن نیز لحاظ گردید. با توجه به خلوص بالای ترکیب کلرید آمونیوم مورد استفاده (۹۹/۹۹ درصد)، لذا نزدیکی اعداد به‌دست آمده با استفاده از هر کدام از روش‌های اندازه‌گیری به مقادیر محاسبه شده می‌تواند نشان از صحت داده‌های به دست آمده توسط هر کدام از روش‌ها باشد. هچ و همکاران (۸) بیان کردند که استفاده از ترکیبات خالص با محتوای مشخص نیتروژن می‌تواند یک ابزار ارزشمند جهت تایید صحت داده‌های حاصل از تکنیک اندازه‌گیری نیترون باشد.

محتوای پروتئین خام مقادیر مختلف کلرید آمونیوم به روش کجلدال و هچ در جدول ۲ آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که بین روش هچ و کجلدال از نظر تعیین میزان پروتئین خام مقادیر مختلف کلرید آمونیوم تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. نتایج به دست آمده در این مطالعه با نتایج گزارش شده در خصوص استفاده از روش هچ جهت تعیین محتوای پروتئین خام اسیدهای آمینه خالص (۸) و آلبومین سرم و کازئین شیر خالص (۲) مطابقت دارد.

شکل۲ رابطه بین روش هچ و روش کجلدال را از نظر تعیین محتوای پروتئین خام تمام نمونه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد. رابطه بین دو روش مستقیم بوده و همبستگی بسیار زیادی را نشان می دهد (r=۰/۹۹). در تایید این نتایج، رابطه خطی مستقیم با همبستگی بسیار بالای (۹۹ درصد) بین روش کجلدال و هچ در خصوص تعیین محتوای پروتئین خام برخی مواد غذایی مانند انواع سوسیس و کالباس نشان داده شده است (۱۴). این همبستگی بالا، کارایی روش مورد استفاده در تعیین محتوای پروتئین خام نمونه‌های خوراک‌های دامی را نشان می‌دهد که با مقادیر همبستگی گزارش شده توسط روسی و همکاران (r=۰/۹۹۶) مطابقت دارد (۱۴). هچ و همکاران (۸،۷) بیان کردند که این روش نسبت به روش کجلدال تجهیزات، مواد و زمان کمتری نیاز داشته و نتایج به دست آمده با روش هچ، صحیح و سریع و قابل مقایسه با روش استاندارد کجلدال است. باربارینو و لورنزو (۲) نیز با بررسی صحت داده‌های روش هچ از طریق مقایسه آن با روش آنالیز کربن–هیدروژن–نیتروژن[1] به منظور تعیین محتوای نیتروژن برخی نمونه‌های دریایی بیان کردند که روش هچ برای تعیین محتوای نیتروژن نمونه‌های دریایی مناسب بوده و باید به‌عنوان یک روش جایگزین ارزان و دقیق جهت تعیین میزان نیتروژن مدنظر قرار گیرد. بطوریکه میزان مواد مصرفی کمتر، هزینه مواد کمتر (۴۰۰۰۰ حدود ریال در مقابل ۶۰۰۰۰ ریال) و همچنین عدم نیاز به تجهیزات اختصاصی گران‌قیمت از مزایای روش هچ می‌باشد. این محققین همبستگی بالایی (بالاتر از ۰/۹۹) بین دوروش گزارش کردند.

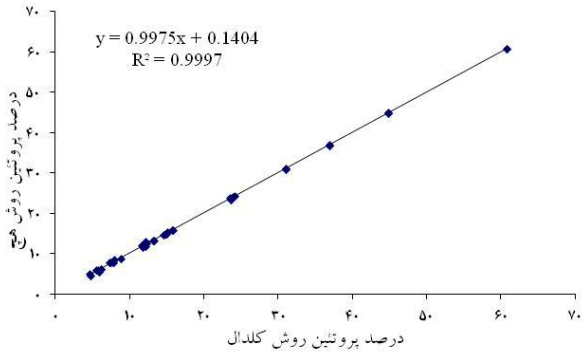
جدول ۲– محتوای پروتئین خام مقادیر مختلف کلرید آمونیوم اندازه‌گیری شده با روش‌های هچ و کجلدال (میانگین ± انحراف استاندارد)

Table 2. Crude protein content of different amounts of ammonium chloride measured by Hach and Kjehldal methods (average ± standard deviation).

| مقادیر کلرید آمونیوم (میلی گرم)[†] | روش هچ (درصد) | روش کجلدال (درصد) |
|---|---|---|
| ۰/۰۲۵ | ۴/۱۴±۰/۱۵ | ۴/۲۵±۰/۳۵ |
| ۰/۰۵ | ۷/۸۷±۰/۱۴ | ۸/۱۲±۰/۱۷ |
| ۰/۰۷۵ | ۱۱/۷۱±۰/۴۵ | ۱۱/۹۱±۰/۷۰ |
| ۰/۱ | ۱۶/۲۶±۰/۲۵ | ۱۶/۷۱±۰/۲۹ |
| ۰/۱۲۵ | ۲۰/۲۳±۰/۲۱ | ۲۰/۶۱±۰/۴۱ |
| ۰/۱۵ | ۲۴/۵۱±۰/۲۸ | ۲۵/۰۶±۰/۵۶ |
| ۰/۱۷۵ | ۲۸/۳۱±۰/۴۲ | ۲۸/۳۷±۰/۴۳ |
| ۰/۲ | ۳۲/۳۸±۰/۳۰ | ۳۲/۵۸±۰/۳۹ |

[†] مقادیر ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۱۵، ۰/۱۷۵ و ۰/۲ میلی گرم کلرید آمونیوم (با فرض ۱۶ درصد نیتروژن و خلوص ۹۹/۹۹ منبع کلرید آمونیوم مورد استفاده) در صورت محاسبه به ترتیب حاوی ۴/۰۹، ۸/۱۸، ۱۲/۲۷، ۱۶/۳۶، ۲۰/۴۵، ۲۴/۵۴، ۲۸/۶۳، ۳۲/۷۳ درصد پروتئن خام می باشند.

1- CHN analysis




شکل ۲- ارتباط بین روش‌های هچ و کجلدال در تعیین مقادیر درصد پروتئین خام نمونه‌های مورد آزمایش
Table 2. Relation between Hach and Kjeldahl methods for determining crude protein contents of test samples

بر اساس نتایج به دست آمده تغییر در روش هضم نمونه‌ها طی روش اصلی هچ سبب سرعت بخشیدن به روش مذکور شده و امکان آنالیز همزمان چندین نمونه را فراهم می‌آورد. همچنین با توجه به عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار بین روش هچ و روش کجلدال در تعیین میزان پروتئین خام، نتایج نشان داد که محتوای پروتئینی نمونه‌های مورد آنالیز در آزمایشگاه‌های خوراک دامی که گستردگی بالایی از نظر میزان پروتئین خام و همچنین میزان هضم در برابر اسید دارند را می‌توان با استفاده از روش هچ با دقت و صحت بالا تعیین نمود.

## منابع


1. AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Arlington (VA): Association of official analytical chemists.
2. Barbarino, E. and S.O. Lourenço. 2009. Comparison of CHN analysis and Hach acid digestion to quantify total nitrogen in marine organisms. Limnology and oceanography: methods, 7: 751-760.
3. Bradstreet, R.B. 2013. The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. Elsevier, pp: 39-88.
4. Figenschou, D.L., J.P. Marais and M. De Figueiredo. 2000. A comparison of three methods of nitrogen analysis for feedstuffs. South African Journal of Animal Science: Supplement, 1: 23-23.
5. Florence, E. and D.F. Milner. 1979. Routine determination of nitrogen by Kjeldahl digestion without use of catalyst. Analyst, 104: 378-381.
6. Fukumoto, H.E. and G.W. Chang. 1982. Manual salicylate-hypochlorite procedure for determination of ammonia in Kjeldahl digests [Urine and faeces analysis, mankind, urine, faeces, nitrogen content, digestion, spectrometry, methods, chemical analyses]. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 65: 1076-1079.
7. Hach, C.C., B.K. Bowden, A.B. Kopelove and S.T. Brayton. 1987. More powerful peroxide Kjeldahl digestion method. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 70: 783-787.
8. Hach, C.C., S.V. Brayton, and A.B. Kopelove. 1985. A powerful Kjeldahl nitrogen method using peroxymonosulfuric acid. Journal of Agriculter and Food Chemistry, 33: 1117-1123.
9. Kjeldahl, J. 1883. A new method for the estimation of nitrogen in organic compounds. Zeitschrift für Analytische Chemie, 22: 366-382.
10. Miller G.L. and E.E. Miller. 1948. Determination of nitrogen in biological materials. Analytical Chemistry, 20(5): 481-488.
11. National Research Council. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 6th rev. ed. National Acadmic Science. Washington. DC.
12. Osborne, R.A. and J.B. Wilkie. 1935. A study of the Kjeldahl method. III-Further comparisons of selenium with mercury and with copper catalysts. journal of Association official Agricultural Chemists, 18: 604-609.
13. Reynolds, C.K. and N.B. Kristensen. 2008. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. Journal of animal science, 86: 293-305.
14. Rossi, A.M., M. Villarreal, M.D. Juarez and N.C. Samman. 2004. Nitrogen contents in food: A comparison between the Kjeldahl and Hach methods. The journal of the Argentine Chemical Society, 92: 99-108.
15. Sahoo, B. and T.K. Walli. 2008. Effect of feeding undegradable protein with energy on nutrient utilization, milk yield and milk composition of crossbred goats. Small Ruminant Research, 75: 36-42.
16. Wall, L.L., G.W. Gehrke, T.E. Neuner, R.D. Cathey and P.R. Rexroad. 1975. Total protein nitrogen: evaluation and comparison of four different methods. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 58: 1221-1226.
17. Watkins, K.L., T.L. Veum and G.F. Krause. 1986. Total nitrogen determination of various sample types: a comparison of the Hach, Kjeltec and Kjeldahl methods. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 70: 410-412.

# Comparison of Hach Method with Kjeldahl Method for Determining of Crude Protein Contents of Some Animal Feeds

**Hossein Abdi Benemar[1], Jamal Seifdavati[2], Bahram Fathi Achachlouei[2] and Rasool kachuee[3]**

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, (Corresponding author: abdibenemar@uma.ac.ir)
2 and 3- Assistant Professor and PhD Student, Department of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili,
Received: April 20, 2016 Accepted: April 12, 2017

**Abstract**

The aim of present study was to evaluation of Hach method for determining of crude protein contents of some animal feeds. Twenty one samples of animal feeds and digesta, including a variety of forages, concentrate feeds and mixtures and digesta ruminal samples and 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.175 and 0.2 mg ammonium chloride were chosen and their nitrogen and protein contents were measured using Kjeldahl, as the reference method and the Hach Methods and compared with each other. There was no significant difference between the methods in terms of crude protein content estimation of different feed samples and different amounts of ammonium chloride. The regression between the crude protein contents measured by the two methods was linear and showed a significant correlation (r=0.99). Modifing the digestion method of the original Hach method accelerate the method and it makes possible to analysis more samples without any negative effects on the obtained results. According with the reslt of this experiment the protein content of some analyzing samples in animal nutrition laboratories can be accurately measured through the Hach method.

**Keywords**: Crude protein, Feed evaluation, Hach method, Kjeldahl method