



## مقایسه روش هج با روش کجدال در تعیین محتوای پروتئین خام برخی خوراکی‌های دامی

حسین عبدی بنمار<sup>۱</sup>، جمال سیف دواتی<sup>۲</sup>، بهرام فتحی آچاچلویی<sup>۲</sup> و رسول کچویی<sup>۳</sup>

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 هج در تعیین محتوای پروتئین خام برخی خوراکی‌های دامی بود. تعداد ۲۱ نمونه خوراکی شامل انواع مواد علوفه‌ای، مواد کنسانتره‌ای، مخلوط‌های کنسانتره‌ای، نمونه‌های هضمی شکمبه‌ای و مقادیر 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 کجدال، به‌عنوان روش مرجع و روش هج، 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 هج و روش کجدال از نظر تعیین محتوای پروتئین خام مواد خوراکی مورد آزمایش مثبت و بالا بود ( $r = 0.99$ ). تغییر در روش هضم نمونه‌ها طی روش اصلی هج 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 هج با دقت و صحت بالا تعیین نمود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین خام، روش کجدال، روش هج، ارزشیابی خوراک دام

### مقدمه

به‌طور معمول، محتوای پروتئین خوراکی‌های دامی بر اساس پروتئین خام مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (۱۳). پروتئین‌ها تقریباً 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 کجدال است (۱). در این روش ترکیبات نیتروژنی موجود در مواد خوراکی در قدم اول باید هضم شوند که این فرآیند بسیار زمان‌بر 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 کجدال 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 هج<sup>۱</sup> یک روش جایگزین برای روش کجدال که متفاوت از روش کجدال 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 کجدال و هج، همبستگی بسیار بالایی بین میزان محتوای پروتئین خام اندازه‌گیری شده با روش هج و روش رایج کجدال در نمونه‌های خوراکی متفاوت دیده شده است (۲،۱۴). همچنین این آزمایشات نشان دادند که نمونه‌های استاندارد در روش هج دقت و صحت بیشتری نسبت به روش کجدال داشت (۲،۷،۸،۱۷،۱۴). اگرچه صحت و دقت روش هج در تعیین محتوای نیتروژن مواد مختلف اثبات شده است، محدودیت اصلی این روش را می‌توان عدم امکان به‌کارگیری آن برای آنالیز تعداد بالایی نمونه به‌طور هم‌زمان ذکر کرد. به طوری که اجرای این روش در اصل توسط یک دستگاه هضم به نام دایجستال<sup>۲</sup> 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 هج 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 هج با هدف افزایش امکان تعداد نمونه مورد بررسی بطور هم‌زمان و مقایسه داده‌های حاصل با روش کجدال به‌عنوان روش استاندارد بود.

## مواد و روش‌ها

۲۱ نمونه ماده خوراکی با دامنه‌ای وسیع از پروتئین خام، شامل انواع مواد علوفه‌ای، مواد کنسنتره‌ای، مخلوط‌های کنسنتره‌ای، 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 هج 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.

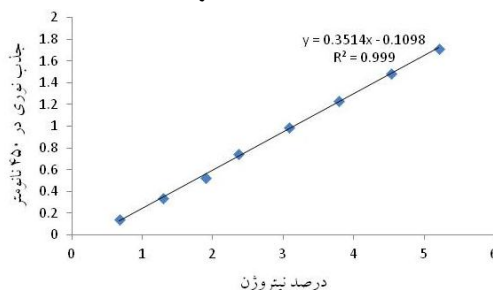
## روش کج‌لدال

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 سانتی‌گراد بر روی گرم کننده مخصوص تک‌تور<sup>۱</sup> قرار داده شد تا هضم شده تا بصورت کاملاً 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 کلنک 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).

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

## روش هج

در این آزمایش از روش هج با اندکی تغییرات استفاده شد (۸). به این ترتیب که کلیه مراحل مشابه روش اصلی هج بوده با این تفاوت که در مرحله هضم به جای به کارگیری از دستگاه هضمی مخصوص هج، 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 به طوری که روی یک گرم‌کننده به ابعاد ۴۰×۶۰ سانتی‌متری تعداد ۳۰ عدد بالن ۵۰ میلی‌لیتری به طور همزمان چیده شده و فرایند 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 آنکوباسیون، 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 آلدريج، 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 هج  
Figure 1. Standard curve of Hach method

### 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  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری لحاظ گردید.

### نتایج و بحث

میانگین محتوای پروتئین خام برخی نمونه‌های خوراکی اندازه‌گیری شده با استفاده از روش‌های هچ و کج‌دال 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 کج‌دال 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 کج‌دال اندکی بالاتر از مقادیر به دست آمده از روش هچ بود که با نتایج گزارش شده توسط سایر پژوهش‌گران در خصوص مقایسه روش کج‌دال و روش اصلی هچ مطابقت داشت (۱۷، ۱۴، ۸، ۷، ۴، ۲). اگرچه، نمونه‌های واضح و شفاف در طی هضم جهت آنالیز بدست می‌آید که با گزارشات قبلی (۸، ۱۴) در خصوص نحوه هضم نمونه‌ها مطابقت دارد، ولی علت بالاتر بودن محتوای پروتئین در روش کج‌دال ممکن است به این دلیل باشد که در روش کج‌دال هضم کامل‌تری نسبت به هچ صورت می‌گیرد (۱۷)، چراکه در روش کج‌دال مدت زمان بیشتری نسبت به روش هچ صرف هضم می‌گردد (۱۴). همچنین صحت کمتر روش هچ در مقایسه با روش کج‌دال 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 کج‌دال

P-Value	SEM	روش کج‌دال (درصد)	روش هچ (درصد)	نمونه خوراک
۰/۵۴۳۷	۰/۲۰۴	۱۲/۸۰	۱۲/۶۳	علف خشک یونجه
۰/۵۲۰۲	۰/۳۰۱	۸/۶۰	۸/۳۸	علوفه ذرت سیلو شده
۰/۵۸۹۹	۰/۲۵۷	۱۵/۱۰	۱۴/۹۸	علف خشک شبدر
۰/۸۱۴۱	۰/۲۳۲	۷/۸۵	۷/۷۹	کاه ماشک
۰/۸۲۵۲	۰/۲۰۱	۱۳/۲۵	۱۳/۱۹	دانه جو
۰/۹۵۰۸	۰/۳۱۵	۷/۷۹	۷/۷۷	دانه ذرت
۰/۹۸۸۳	۰/۲۲۸	۱۴/۷۲	۱۴/۷۱	دانه گندم
۰/۶۲۵۹	۰/۱۴۴	۴۴/۹۵	۴۴/۸۴	کنجاله سویا
۰/۸۱۵۲	۰/۲۰۱	۲۳/۶۶	۲۳/۶۰	دانه بزرک
۰/۹۹۳۳	۰/۱۵۷	۳۶/۹۴	۳۶/۹۳	دانه سویا
۰/۹۸۲۸	۰/۱۰۱	۶۰/۸۰	۶۰/۷۹	پودر ماهی
۰/۹۰۷۸	۰/۱۱۰	۱۵/۸۵	۱۵/۸۲	دانه ماشک
۰/۹۲۷۳	۰/۲۰۸	۲۴/۱۰	۲۳/۹۲	ماش
۰/۸۱۹۵	۰/۱۰۰	۵/۹۰	۵/۸۵	پوسته بادام زمینی
۰/۸۳۵۷	۰/۲۱۵	۱۱/۹۰	۱۲/۰۲	مخلوط کنسانتره‌های ۱
۰/۸۰۸۰	۰/۱۱۹	۱۴/۱۰	۱۴/۱۵	مخلوط کنسانتره‌های ۱
۰/۷۷۱۶	۰/۲۲۶	۱۱/۸۰	۱۱/۷۳	علف خشک یونجه پس از ۸ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای
۰/۸۶۳۰	۰/۱۰۲	۶/۲۰	۶/۱۶	ذرت سیلو شده پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای
۰/۹۶۹۹	۰/۲۱۶	۱۲/۲۰	۱۲/۱۸	علف شبدر پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای
۰/۸۳۱۶	۰/۱۹۴	۵/۷۴	۵/۶۹	گاودانه پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای
۰/۷۹۴۵	۰/۲۱۲	۴/۸۰	۴/۷۴	ماشک پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون شکمبه‌ای

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 کج‌دال، 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 تیترو می‌شود (۸). روش کج‌دال 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

روسی و همکاران (۱۴) با مقایسه روش هچ و کج‌دال 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 کج‌دال 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 کج‌دال 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

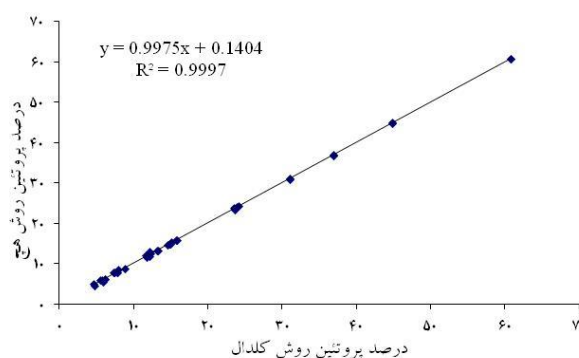
نتایج گزارش شده در خصوص استفاده از روش هج جهت تعیین محتوای پروتئین خام اسیدهای آمینه خالص (۸) و آلومین سرم و کازئین شیر خالص (۲) مطابقت دارد. شکل ۲ رابطه بین روش هج و روش کجهدال را از نظر تعیین محتوای پروتئین خام تمام نمونه های مورد آزمایش نشان می دهد. رابطه بین دو روش مستقیم بوده و همبستگی بسیار زیادی را نشان می دهد ( $r=0/99$ ). در تایید این نتایج، رابطه خطی مستقیم با همبستگی بسیار بالای (۹۹ درصد) بین روش کجهدال و هج 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 نمونه های خوراکی های دامی را نشان می دهد که با مقادیر همبستگی گزارش شده توسط روسی و همکاران ( $r=0/996$ ) مطابقت دارد (۱۴). هج و همکاران (۸،۷) بیان کردند که این روش نسبت به روش کجهدال تجهیزات، مواد و زمان کمتری نیاز داشته و نتایج به دست آمده با روش هج، صحیح و سریع و قابل مقایسه با روش استاندارد کجهدال است. باربارینو و لورنزو (۲) نیز با بررسی صحت داده های روش هج از طریق مقایسه آن با روش آنالیز کربن-هیدروژن-نیتروژن<sup>۱</sup> به منظور تعیین محتوای نیتروژن برخی نمونه های دریایی بیان کردند که روش هج برای تعیین محتوای نیتروژن نمونه های دریایی مناسب بوده و باید به عنوان یک روش جایگزین ارزان و دقیق جهت تعیین میزان نیتروژن مدنظر قرار گیرد. بطوریکه میزان مواد مصرفی کمتر، هزینه مواد کمتر (۴۰۰۰۰ ریال در مقابل ۶۰۰۰۰ ریال) و همچنین عدم نیاز به تجهیزات اختصاصی گران قیمت از مزایای روش هج می باشد. این محققین همبستگی بالایی (بالتر از ۰/۹۹) بین دوروش گزارش کردند.

سولفوریک جهت هضم مدت زمان و میزان مصرف اسید سولفوریک را کاهش داده و همچنین کاتالیزورهای مورد استفاده در روش کجهدال را نیز حذف نمودند. البته انجام این نوع هضم مستلزم استفاده از دستگاه هضم کننده ابداعی هج بنام دایجستال می باشد که علاوه بر نیاز به سرمایه گذاری، به علت تک واحد بودن تعداد نمونه های قابل آنالیز در زمان واحد را کاهش می دهد. در این پژوهش به جای استفاده از دستگاه دایجستال از بالن های حجمی ۵۰ میلی لیتری معمولی جهت انجام مراحل هضم روش هج با اندکی تغییرات استفاده شد که عدم وجود تفاوت معنی دار بین نتایج روش هج و روش استاندارد کجهدال در این پژوهش می تواند نشان از کارایی روش به کار رفته در پژوهش حاضر و قابل استفاده بودن آن علیرغم تغییرات اعمال شده در مرحله هضم باشد. به منظور محاسبه درصد پروتئین خام مقادیر مختلف کلرید آمونیوم آزمایشگاهی بدون استفاده از روش های 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 به دست آمده با استفاده از هر کدام از روش های اندازه گیری به مقادیر محاسبه شده می تواند نشان از صحت داده های به دست آمده توسط هر کدام از روش ها باشد. هج و همکاران (۸) بیان کردند که استفاده از ترکیبات خالص با محتوای مشخص نیتروژن می تواند یک ابزار ارزشمند جهت تایید صحت داده های حاصل از تکنیک اندازه گیری نیترون باشد. محتوای پروتئین خام مقادیر مختلف کلرید آمونیوم به روش کجهدال و هج در جدول ۲ آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که بین روش هج و کجهدال از نظر تعیین میزان پروتئین خام مقادیر مختلف کلرید آمونیوم تفاوت معنی داری وجود نداشت. نتایج به دست آمده در این مطالعه با

جدول ۲- محتوای پروتئین خام مقادیر مختلف کلرید آمونیوم اندازه گیری شده با روش های هج و کجهدال (میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد)  
Table 2. Crude protein content of different amounts of ammonium chloride measured by Hach and Kjehldal methods (average  $\pm$  standard deviation).

روش کجهدال (درصد)	روش هج (درصد)	مقادیر کلرید آمونیوم (میلی گرم) <sup>†</sup>
۴/۲۵ $\pm$ ۰/۳۵	۴/۱۴ $\pm$ ۰/۱۵	۰/۰۲۵
۸/۱۲ $\pm$ ۰/۱۷	۷/۸۷ $\pm$ ۰/۱۴	۰/۰۵
۱۱/۹۱ $\pm$ ۰/۷۰	۱۱/۷۱ $\pm$ ۰/۴۵	۰/۰۷۵
۱۶/۷۱ $\pm$ ۰/۲۹	۱۶/۲۶ $\pm$ ۰/۲۵	۰/۱
۲۰/۶۱ $\pm$ ۰/۴۱	۲۰/۲۳ $\pm$ ۰/۲۱	۰/۱۲۵
۲۵/۰۶ $\pm$ ۰/۵۶	۲۴/۵۱ $\pm$ ۰/۲۸	۰/۱۵
۲۸/۳۷ $\pm$ ۰/۴۳	۲۸/۳۱ $\pm$ ۰/۴۲	۰/۱۷۵
۳۲/۵۸ $\pm$ ۰/۳۹	۳۲/۳۸ $\pm$ ۰/۳۰	۰/۲

<sup>†</sup> 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 ۰/۰۹، ۰/۱۸، ۰/۲۷، ۰/۳۶، ۰/۴۵، ۰/۵۴، ۰/۶۳، ۰/۷۳ درصد پروتئین خام می باشند.



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

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.

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

#### 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 Agriculture 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 Academic 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, Kjeltex 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<sup>1</sup>, Jamal Seifdavati<sup>2</sup>, Bahram Fathi Achachlouei<sup>2</sup> and Rasool kachuee<sup>3</sup>

---

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili,  
(Corresponding author: [abdibenemar@uma.ac.ir](mailto: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 ( $r=0.99$ ). Modifying 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