

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

TCVN 4328-2 : 2011; TCVN 9109 : 2011; TCVN 9124 : 2011;  
ISO 5983-2 : 2009 ISO 6867 : 2000  
TCVN 9125 : 2011; TCVN 9126 : 2011; TCVN 9127 : 2011;  
ISO 6866 : 1985 ISO 17375 : 2006 ISO 14797 : 1999  
TCVN 9128 : 2011; TCVN 9129 : 2011; TCVN 9130 : 2011.  
ISO 14939 : 2001 ISO 6655 : 1997 ISO 14902 : 2001  
TCVN 9131 : 2011; TCVN 9132 : 2011.  
ISO 6870 : 2002 ISO 7485 : 2000

Xuất bản lần 1

**TUYỂN TẬP TIÊU CHUẨN QUỐC GIA  
VỀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG  
CÁC THÀNH PHẦN HÓA HỌC**

HÀ NỘI – 2011



## **Lời nói đầu**

TCVN 4328-2 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 5983-2 : 2009;

TCVN 9124 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6867 : 2000;

TCVN 9125 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6866 : 1985;

TCVN 9126 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 17375 : 2006;

TCVN 9127 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14797 : 1999;

TCVN 9128 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14939 : 2001;

TCVN 9129 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6655 : 1997;

TCVN 9130 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14902 : 2001;

TCVN 9131 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6870 : 2002;

TCVN 9132 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 7485 : 2000.

TCVN 4328-2 : 2011; TCVN 9109:2010; TCVN 9124 : 2011 ÷ TCVN 9132 : 2011 do Cục Chăn nuôi biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng nitơ hòa tan sau khi xử lý bằng pepsin trong axit clohydric loãng

*Animal feeding stuffs – Determination of soluble nitrogen content after treatment with pepsin in dilute hydrochloric acid*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nitơ hòa tan sau khi xử lý bằng pepsin trong axit clohydric loãng trong thức ăn chăn nuôi.

Phương pháp này không phân biệt được nitơ protein và nitơ phi protein.

CHÚ THÍCH:

- 1 Các giá trị thu được bằng phương pháp này không liên quan trực tiếp đến khả năng tiêu hóa *in vivo*.
- 2 Nếu kết quả thử nghiệm phải tính riêng nitơ phi protein thì hàm lượng này cần được xác định bằng phương pháp thích hợp.

### 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 4328:2001 (ISO 5983:1997) *Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô – Phần 1: Phương pháp Kjeldahl*

ISO 6498:1983<sup>1)</sup>, *Animal feeding stuffs – Preparation of test samples*.

### 3 Nguyên tắc

Ủ mẫu 48 h ở 40 °C trong dung dịch pepsin trong axit clohydric loãng.

<sup>1)</sup> Hiện nay đã có TCVN 6952 (ISO 6498), *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử*

## TCVN 9129:2011

Lọc huyền phù và xác định hàm lượng nitơ của phần dịch lọc hoặc của phần còn lại trên bộ lọc bằng phương pháp Kjeldahl được quy định trong TCVN 4328 (ISO 5983). Trong trường hợp thứ hai, xác định hàm lượng nitơ của mẫu thì cũng thực hiện theo TCVN 4328 (ISO 5983)

### 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

Thuốc thử (trừ các chất chuẩn) không được chứa các hợp chất nitơ

**4.1 Axit clohydric loãng**,  $c(\text{HCl}) = 0,075 \text{ mol/l}$ .

**4.2 Pepsin**, có hoạt độ 2,0 đơn vị trên miligam phù hợp với định nghĩa nêu trong Phụ lục A. Kiểm tra hoạt độ pepsin theo phương pháp quy định trong Phụ lục A.

**4.3 Dung dịch pepsin trong axit clohydric**, có hoạt độ pepsin khoảng 400 đơn vị trên lít.

Hòa tan  $0,2 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$  pepsin (4.2) trong 1 lít axit clohydric loãng (4.1). Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng.

Nếu hoạt độ của pepsin khác 2,0 đơn vị trên miligam, thì chỉnh khối lượng pepsin để thu được dung dịch có hoạt độ pepsin là 400 đơn vị trên lít.

**4.4 Axit clohydric**,  $c(\text{HCl}) = 7,5 \text{ mol/l}$  ( $\rho_{20} = 1,125 \text{ g/ml}$ ).

### 5 Thiết bị, dụng cụ

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

**5.1 Nồi cách thủy hoặc tủ ấm**, có thể duy trì nhiệt độ ở  $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

**5.2 Bình phân hủy Kjeldahl**, có dung tích thích hợp.

**5.3 Giấy lọc**, tốc độ lọc nhanh, bền với axit

**5.4 Dụng cụ chưng cất và chuẩn độ**

### 6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 4325 (ISO 6497) *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu* [3].

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 (ISO 6498) *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử*.

Nếu hàm lượng chất béo của mẫu thử vượt quá 10 % (khối lượng), thì chiết chất béo theo TCVN 6952 (ISO 6498), và hàm lượng chất béo chiết cần được đưa vào phần tính kết quả (Điều 9)

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Phần mẫu thử

Cân khoảng 2 g mẫu thử đã chuẩn bị, chính xác đến 0,001 g.

### 8.2 Ủ ấm

Cho phần mẫu thử vào bình định mức 500 ml và thêm 450 ml dung dịch pepsin (4.3) trước đó đã được làm nóng đến 40 °C. Lắc để tránh kết tụ. Kiểm tra để chắc chắn rằng pH của huyền phù thấp hơn 1,7. Đặt bình vào nồi cách thủy hoặc tủ ấm (5.1) để ở 40 °C trong 48 h. Lắc bình sau 8 h, 24 h và 32 h.

Sau 48 h, thêm 15 ml axit clohydric (4.4) và để nguội đến 20 °C. Pha loãng bằng nước đến vạch, lắc và lọc qua giấy lọc (5.3). Tiến hành tiếp theo 8.3 hoặc 8.4

### 8.3 Xác định hàm lượng nitơ của phần dịch lọc

#### 8.3.1 Phân hủy chất hữu cơ

Lấy 250 ml dịch lọc (8.2) và chuyển vào bình phân hủy Kjeldahl (5.2). Thêm thuốc thử cần thiết để phân hủy theo quy định trong 8.2.1 của TCVN 4328 (ISO 5983). Trộn và đun sôi.

CHÚ THÍCH Có thể cần cho thêm chất chống tạo bọt.

Giữ dung dịch sôi mạnh cho đến khi nước gần như bay hơi hết. Chú ý để loại hết lượng nước còn lại, giảm tốc độ gia nhiệt. Sau khi chất lỏng đã trong thì tiếp tục gia nhiệt thêm 1 h, sau đó để nguội.

#### 8.3.2 Chứng cất và chuẩn độ

Tiến hành tiếp theo quy định trong 8.2.2 và 8.2.3 của TCVN 4328 (ISO 5983).

### 8.3.3 Phép thử trắng

Tiến hành phép thử trắng sử dụng cùng một quy trình nhưng không dùng phần mẫu thử. Tiến hành tiếp theo Điều 9.

## 8.4 Xác định hàm lượng nitơ trong phần còn lại và của phần mẫu thử

### 8.4.1 Phân hủy hợp chất hữu cơ trong phần giữ lại

Rửa giấy lọc và lượng giữ lại (8.2) bằng nước ấm cho đến khi không còn axit. Chuyển giấy lọc cùng với phần giữ lại trên giấy lọc vào bình phân hủy Kjeldahl (5.2). Thêm thuốc thử cần thiết để phân hủy như quy định trong 8.2.1 của TCVN 4328 (ISO 5983). Trộn và đun sôi.

CHÚ THÍCH Nên cho thêm chất chống tạo bọt.

Loại nước bằng cách lúc đầu đun sôi mạnh, sau đó giảm tốc độ gia nhiệt để loại bỏ hết lượng nước còn lại. Sau khi chất lỏng đã trong, tiếp tục gia nhiệt thêm 1 h, sau đó để nguội.

### 8.4.2 Chứng cất và chuẩn độ

Tiến hành tiếp theo quy định trong 8.2.2 và 8.2.3 của TCVN 4328 (ISO 5983).

### 8.4.3 Xác định hàm lượng nitơ của mẫu thử

Xác định hàm lượng nitơ của mẫu thử đã chuẩn bị (xem Điều 7) theo TCVN 4328 (ISO 5983).

### 8.4.4 Phép thử trắng

Tiến hành phép thử trắng sử dụng cùng một quy trình nhưng không dùng phần mẫu thử.

## 9 Biểu thị kết quả

### 9.1 Tính hàm lượng nitơ hòa tan thu được sử dụng quy trình quy định trong 8.3

Với điều kiện là lượng axit sulfuric được sử dụng để thu lấy amoniac để xác định và phép thử trắng là như nhau [xem TCVN 4328 (ISO 5983)], tính hàm lượng nitơ hòa tan của mẫu thử theo công thức sau:

$$w_1 = \frac{2(V_0 - V_1) \times c \times M}{m}$$

Trong đó:

$w_1$  là hàm lượng nitơ hòa tan của mẫu thử thu được bằng quy trình quy định trong 8.3, tính bằng gam trên kilogam (g/kg);

$c$  là nồng độ của dung dịch natri hydroxit sử dụng để chuẩn độ (xem 4.9.1 trong TCVN 4328 (ISO 5983)), tính bằng mol trên lít (mol/l)

$m$  là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

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

$V_0$  là thể tích của dung dịch natri hydroxit (xem 4.9.1 của TCVN 4328 (ISO 5983)) đã dùng trong phép thử trắng, tính bằng mililit (ml);

$V_1$  là thể tích của dung dịch natri hydroxit (xem 4.9.1 của TCVN 4328 (ISO 5983)) đã dùng trong phép xác định (8.3.2)

Báo cáo kết quả chính xác đến 0,1 g/kg

## 9.2 Tính hàm lượng nitơ hoà tan thu được bằng quy trình quy định trong 8.4

Với điều kiện là lượng axit sulfuric được sử dụng để thu được amoniac dùng cho phép xác định và dùng cho phép thử trắng là như nhau (xem TCVN 4328 (ISO 5983)), tính hàm lượng nitơ hòa tan của mẫu thử theo công thức sau:

$$w_2 = w_N - \frac{(V_0 - V_1) \times c \times M}{m}$$

Trong đó:

$w_2$  là hàm lượng nitơ hoà tan của mẫu thử thu được bằng quy trình quy định trong 8.4, tính bằng gam/kilogram (g/kg);

$c$  là nồng độ của dung dịch natri hydroxit [xem 4.9.1 của TCVN 4328 (ISO 5983)] được sử dụng để chuẩn độ, tính bằng mol trên lít (mol/l);

$m$  là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

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

$V_0$  là thể tích của dung dịch natri hydroxit [xem 4.9.1 của TCVN 4328 (ISO 5983)] đã dùng trong phép thử trắng, tính bằng mililit;

$V_1$  là thể tích của dung dịch natri hydroxit [xem 4.9.1 của TCVN 4328 (ISO 5983)] đã dùng trong phép xác định (8.4.2)

$w_N$  là hàm lượng nitơ của phần mẫu thử được xác định trong 8.4.3, tính bằng gam trên kilôgam (g/kg);

Báo cáo kết quả chính xác đến 0,1 g/kg



### 9.3 Tính hàm lượng protein thô hoà tan

Nếu cần biểu thị kết quả là protein thô hoà tan, thì nhân hàm lượng nitơ hoà tan xác định được với hệ số 6,25.

## 10 Độ chụm

### 10.1 Thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục B. Các giá trị thu được của phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các giải nồng độ và các chất nền khác 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 được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giá trị  $r$  đưa ra trong Bảng 1.

### 10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các nhà phân tích khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau thực hiện, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giá trị  $R$  đưa ra trong Bảng 1.

**Bảng 1 – Giới hạn lặp lại ( $r$ ) và giới hạn tái lập ( $R$ )**

Mẫu thử	Hàm lượng protein thô hoà tan trung bình (g/kg) <sup>1)</sup>	$r$ (g/kg)	$R$ (g/kg)
Bột Alfalfa	136,6	7,2	26,5
Gluten ngô thức ăn chăn nuôi	141,5	7,9	28,9
Khô dầu dừa	149,5	7,4	31,6
Cỏ ủ chua	192,9	7,9	36,3
Bột xương	512,0	8,9	63,1
Bột lông vũ	574,3	22,1	166,3

<sup>1)</sup> Tính theo chất khô

## 11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng;
- kết quả thử nghiệm thu được, biểu thị theo nitơ hoà tan hoặc protein thô hoà tan và trong trường hợp cuối cùng sử dụng hệ số chuyển đổi (ví dụ 6,25);
- nếu độ lặp lại được kiểm tra thì nêu kết quả cuối cùng thu được;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tuỳ chọn cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

## Phụ lục A

(Quy định)

### Xác định hoạt độ pepsin

#### A.1 Phạm vi áp dụng

Phụ lục này quy định phương pháp xác định hoạt độ của pepsin được sử dụng trong phép xác định hàm lượng nitơ hoà tan sau khi xử lý với pepsin trong axit clohydric loãng.

#### A.2 Định nghĩa

Trong phụ lục này, sử dụng định nghĩa sau:

##### A.2.1

**Đơn vị hoạt độ pepsin** (Unit of pepsin activity)

Lượng pepsin được giải phóng trong một phút, trong các điều kiện quy định, lượng nhóm hydroxyl này bắt màu thuốc thử Folin-Ciocalteu's có độ hấp thụ tương đương với 1  $\mu\text{mol}$  tyrosin trong cùng điều kiện.

#### A.3 Nguyên tắc

Xử lý hemoglobin bằng pepsin trong axit clohydric loãng. Tạo kết tủa protein không thuỷ phân bằng axit tricloaxetic.

Lọc và bổ sung natri hydroxit và thuốc thử Folin-Ciocalteu. Đo độ hấp thụ của dung dịch này ở bước sóng 750 nm và xác định lượng tyrosin tương ứng từ đường hiệu chuẩn.

#### A.4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

**A.4.1 Axit clohydric**,  $c(\text{HCl}) = 0,2 \text{ mol/l}$ .

**A.4.2 Axit clohydric**,  $c(\text{HCl}) = 0,06 \text{ mol/l}$ .

**A.4.3 Axit clohydric**,  $c(\text{HCl}) = 0,025 \text{ mol/l}$ .

**A.4.4 Dung dịch axit tricloaxetic**,  $\rho(\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}) = 50 \text{ g/l}$ .

**A.4.5 Dung dịch natri hydroxyt**,  $c(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$ .

#### A.4.6 Thuốc thử Folin-Ciocalteu's

Cho 100 g natri tungstat ngậm hai phân tử nước ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 g natri molybdat ngậm hai phân tử nước ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) và 700 ml nước vào bình cầu đáy tròn 2 lít có cổ bằng thủy tinh mài. Thêm 50 ml axit phosphoric [ $\rho(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,71 \text{ g/ml}$ ] và 100 ml axit clohydric đậm đặc [ $\rho(\text{HCl}) = 1,19 \text{ g/ml}$ ]. Lắp bộ ngưng hồi lưu với bình cầu, đun sôi dung dịch và giữ sôi nhẹ trong 10 h. Để nguội, tháo bộ ngưng hồi lưu, thêm 175 g liti sulfat ngậm hai phân tử nước ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 50 ml nước và 1 ml brom. Đun sôi 15 min để loại bỏ brom dư thừa.

Để nguội, sau đó gạn dung dịch vào bình định mức 1 lít. Pha loãng bằng nước đến vạch, trộn và lọc. Dung dịch này không được có màu xanh lục.

Trước khi sử dụng, pha loãng 1 thể tích thuốc thử này với 2 thể tích nước.

#### A.4.7 Dung dịch hemoglobin

Cân một lượng cơ chất protein-hemoglobin theo phương pháp Anson (khoảng 2 g) tương ứng với 354 mg nitơ và cho vào bình cầu 200 ml có cổ thủy tinh mài và có vạch chia ở 100 ml.

**CHÚ THÍCH** Xác định hàm lượng nitơ của cơ chất bằng phương pháp Kjeldahl bán vi nếu cần. Hàm lượng nitơ lý thuyết là 17,7 % (khối lượng).

Thêm vài mililit axit clohydric loãng (A.4.2), nối bình cầu với bơm chân không và lắc cho đến khi hemoglobin hòa tan hoàn toàn. Giải phóng chân không và trong khi vẫn tiếp tục lắc, thêm axit clohydric loãng (A.4.2) đến khoảng 100 ml.

Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng.

#### A.4.8 Dung dịch chuẩn tyrosin, $c(\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3) = 0,2 \text{ mmol/l}$ .

Để chuẩn bị dung dịch gốc, hòa tan trong bình định mức 1 lít 181,2 mg tyrosin trong axit clohydric loãng (A.4.1) và thêm axit clohydric loãng này đến vạch.

Nồng độ tyrosin của dung dịch chuẩn này là  $0,2 \mu\text{mol/l}$  ( $= 0,2 \text{ mmol/l}$ ).

### A.5 Thiết bị, dụng cụ

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

**A.5.1 Nồi cách thủy**, có thể duy trì ở  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**A.5.2 Máy đo phổ**, có thể thực hiện đo ở bước sóng 750 nm.

**A.5.3 Đồng hồ bấm giờ chính xác**, có thể đọc chính xác đến 1 s.

**A.5.4 Máy đo pH**, có thể đọc chính xác đến 0,1 đơn vị pH.

## **TCVN 9129:2011**

**A.5.5 Que khuấy thủy tinh, có một đầu dày hơn đầu kia.**

### **A.6 Các tiến hành**

#### **A.6.1 Chuẩn bị dung dịch**

Hòa tan 150 mg pepsin (hoặc một lượng cần thiết để thu được giá trị hấp thụ  $0,35 \pm 0,035$ ) trong 100 ml axit clohydric loãng (A.4.2).

Sử dụng pipet, chuyển 2 ml dung dịch này vào bình định mức 50 ml và pha loãng bằng axit clohydric loãng (A.4.3) đến vạch. pH của dung dịch này phải là  $1,6 \pm 0,1$ .

Ngâm bình trong nồi cách thủy (A.5.1) để ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### **A.6.2 Thủy phân**

Dùng pipet, chuyển 5,0 ml dung dịch hemoglobin (A.4.7) vào ống nghiệm và làm ấm đến nhiệt độ  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong nồi cách thủy (A.5.1). Thêm 1,0 ml dung dịch pepsin thu được trong A.6.1 và trộn bằng que khuấy thủy tinh (A.5.5) với 10 lần di chuyển qua lại. Giữ ống nghiệm trong nồi cách thủy ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong  $10\text{ min} \pm 1\text{ s}$ , thời gian tính từ khi thêm dung dịch pepsin. Thời gian và nhiệt độ phải được quan sát chính xác. Thêm 10,0 ml dung dịch axit tricloaxetic (A.4.4) đã được làm ấm trước ở nhiệt độ  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , trộn và lọc qua giấy lọc khô.

#### **A.6.3 Hiện màu và đo độ hấp thụ**

Sử dụng pipet, chuyển 5,0 ml dịch lọc vào bình nón 50 ml, thêm 10,0 ml dung dịch natri hydroxit (A.4.5), và 3,0 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu (A.4.6) đã pha loãng, lắc liên tục. Sau 5 min đến 10 min, xác định độ hấp thụ của dung dịch so với nước ở bước sóng 750 nm sử dụng máy đo phổ (A.5.2) và cuvet có chiều dài đường quang 1 cm.

#### **A.6.4 Phép thử trắng**

Đối với mỗi phép xác định, tiến hành phép thử trắng như sau:

Sử dụng pipet, chuyển 5,0 ml dung dịch hemoglobin (A.4.7) vào ống nghiệm. Làm ấm đến nhiệt độ  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong nồi cách thủy (A.5.1), thêm 10,0 ml dung dịch axit tricloaxetic (A.4.4) đã được làm ấm trước đến  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , trộn và thêm 1,0 ml dung dịch pepsin thu được trong A.6.1. Dùng que khuấy thủy tinh để trộn và giữ ống nghiệm trong nồi cách thủy (A.5.1) ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong  $10\text{ min} \pm 1\text{ s}$ . Trộn và lọc qua giấy lọc khô. Sau đó thực hiện theo A.6.3.

#### **A.6.5 Đường chuẩn**

Trong một dãy sáu bình nón 50 ml, cho 0 ml (thành phần zero), 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, và 5,0 ml dung dịch chuẩn tyrosin (A.4.8), tương ứng với 0  $\mu\text{mol}$ , 0,2  $\mu\text{mol}$ , 0,4  $\mu\text{mol}$ , 0,6  $\mu\text{mol}$ , 0,8  $\mu\text{mol}$  và

1,0  $\mu\text{mol}$  tyrosin. Khi thích hợp thêm vào mỗi bình, một lượng đủ axit clohydric loãng (A.4.1) để đưa tổng thể tích là 5,0 ml trong bình.

Thêm vào mỗi bình 10,0 ml dung dịch natri hydroxit (A.4.5) và 3,0 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu (A.4.6) đã pha loãng, lắc tiên tục. Đo độ hấp thụ của từng dung dịch như trong A.6.3.

Dùng đường chuẩn biểu thị độ hấp thụ dựa vào lượng tyrosin tính bằng micromol.

### A.7 Biểu thị kết quả

Từ đường chuẩn, xác định lượng tyrosin bằng micromol, tương ứng với độ hấp thụ của dung dịch màu, đã hiệu chỉnh với phép thử trắng.

Tính hoạt độ của pepsin ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bằng micromol tyrosin trên miligam và trên phút, theo công thức sau:

$$a = \frac{3,2n}{m \times t}$$

Trong đó:

$a$  là hoạt độ của pepsin ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tính bằng micromol trên miligam trên phút ( $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ );

$m$  là khối lượng pepsin đã sử dụng trong A.6.1, tính bằng miligam (mg);

$n$  là lượng tyrosin đọc được từ đường chuẩn, tính bằng micromol ( $\mu\text{mol}$ );

$t$  là thời gian phản ứng, tính bằng phút ( $t = 10\text{ min}$ ).

**CHÚ THÍCH** Hai đơn vị hoạt độ pepsin trên miligam thu được bằng phương pháp này tương ứng với 3,64 mili đơn vị Anson trên miligam (micromol tyrosin trên miligam trên phút ở  $35,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hoặc 36 400 đơn vị thương mại trên gam (micromol tyrosin trên gam trong 10 min ở  $35,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

## Phụ lục B

(Tham khảo)

## Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp được thiết lập bởi một phép thử nghiệm liên phòng được thực hiện ở cấp quốc tế do ISO/TC 34/SC 10 thực hiện phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) [2]. Trong các phép thử này có 19 phòng thử nghiệm tham gia, mỗi phòng thực hiện ba phép xác định trên sáu mẫu thử.

Mẫu	Bột alfalfa	Gluten ngô thức ăn chăn nuôi	Khô đầu dừa	Cò ù chua	Bột xương	Bột lông vũ
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi loại trừ ngoại lệ	17	18	17	18	15	17
Hàm lượng protein thô hòa tan trung bình, (g/kg) <sup>1)</sup>	136,6	141,5	149,5	192,9	512,0	574,3
Độ lệch chuẩn lặp lại ( $s_r$ ), g/kg	2,5	3,1	2,6	2,8	3,2	7,8
Hệ số biến thiên lặp lại, %	1,8	2,2	1,7	1,4	0,6	1,4
Giới hạn độ lặp lại ( $r$ ) [ $r = 2,8 \times s_r$ ], g/kg	7,2	8,9	7,4	7,9	8,9	22,1
Độ lệch chuẩn tái lập ( $s_R$ ), g/kg	9,4	10,2	11,2	12,8	22,3	58,8
Hệ số biến thiên tái lập, %	6,8	7,2	7,5	6,6	4,4	10,2
Giới hạn tái lập ( $R$ ) [ $R = 2,8 \times s_R$ ], g/kg	26,5	28,9	31,6	36,3	63,1	166,3
<sup>1)</sup> Tính theo chất khô						

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] 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: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
- [2] 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 xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
- [3] TCVN 4325 (ISO 6497) *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.*
-