

# Thức ăn chăn nuôi – Xác định lysin hữu dụng

## Animal feeding stuffs – Determination of available lysine

### 1 Phạm vi và lĩnh vực áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định lysin hữu dụng trong thức ăn chăn nuôi chứa các protein thực vật hoặc động vật.

Tuy nhiên, khi so sánh với phép xác định bằng sinh học thì phương pháp này đánh giá quá lượng lysin hữu dụng và cần phải chú ý trong phần giải thích các kết quả.

### 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 4325:2007 (ISO 6497:2002), Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.

TCVN 4328 (ISO 5983), Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protein thô.

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

### 3 Định nghĩa

**Lysin hữu dụng** (available lysine):

Lượng lysin còn lại sau khi lấy lượng lysin tổng số trừ đi lượng lysin không hữu dụng xác định được dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

Lượng lysin hữu dụng được biểu thị theo phần trăm khối lượng của nguyên liệu thô.

## 4 Nguyên tắc

Phần mẫu thử đã nghiền được thuỷ phân bằng axit clohydric, sau đó lysin tổng số được tách bằng sắc ký cột và xác định bằng đo phổ ở bước sóng 570 nm.

Phần mẫu thử đã nghiền thứ hai được phản ứng với dung dịch etanol của 2,4-dinitrofluorobenzen trong môi trường kiềm, được làm sạch rồi cho thuỷ phân bằng axit clohydric, tách lysin không hữu dụng bằng sắc ký cột, và xác định bằng đo phổ ở bước sóng 570 nm.

## 5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích. Nước sử dụng phải là nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

**5.1 Ete dietyl**, không chứa peroxit.

**5.2 Natri bicacbonat**, dung dịch 80 g/l.

**5.3 2,4-Dinitrofluorobenzen (DNFB)**, trong dung dịch etanol.

Hoà tan 0,15 ml DNFB trong 12 ml etanol 95 % (theo thể tích).

Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng.

**5.4 Axit clohydric**, khoảng 6 mol/l.

Trộn 1 thể tích axit clohydric ( $\rho_{20} = 1,19$  g/ml) với 1 thể tích nước.

**5.5 Dung dịch natri xitrat**, dung dịch đậm, pH khoảng 2,2.

Hoà tan trong nước theo thứ tự sau:

21 g axit xitric ngâm một phân tử nước;

8 g natri hydroxit;

16 ml axit clohydric ( $\rho_{20} = 1,19$  g/ml);

0,1 ml axit octanoic (caprylic);

20 ml thiodiglycol;

3 ml dung dịch ete dodecyl polyoxyetylen 30 % (theo thể tích) với khoảng 23 phân tử oxy-etylen<sup>1)</sup>.

Pha loãng bằng nước đến 1 000 ml.

<sup>1)</sup> Sản phẩm BRIJ 35 thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và ISO không ấn định sử dụng sản phẩm này.

## 5.6 Natri xitrat, dung dịch đậm, pH = 5,28.

Hoà tan trong nước theo thứ tự sau:

24,5 g axit xitric ngậm một phân tử nước;

14 g natri hydroxit;

6,8 ml axit clohydric ( $\rho_{20} = 1,19$  g/ml);

0,1 ml axit octanoic (caprylic);

3 ml dung dịch ete dodecyl polyoxyetylen 30 % (theo thể tích) với khoảng 23 phân tử oxy-etylen<sup>1)</sup>.

Pha loãng bằng nước đến 1 000 ml. Dùng axit clohydric ( $\rho_{20} = 1,19$  g/ml) hoặc dung dịch natri hydroxit 50 % (theo khối lượng) để chỉnh pH đến  $5,28 \pm 0,02$ .

## 5.7 Thuốc thử ninhydrin.

### 5.7.1 Natri propionat, dung dịch đậm, pH $5,5 \pm 0,1$

Hoà tan 168 g natri hydroxit trong khoảng 400 ml nước. Làm nguội, rồi thêm 498 ml axit propionic trong khi lắc liên tục. Pha loãng bằng nước đến 1 000 ml.

### 5.7.2 Chuẩn bị thuốc thử

Chuẩn bị thuốc thử ninhydrin trong môi trường nitơ và ở nơi tối. Cho 1 lít peroxit không chứa ete monometyl của glycol etylen, 1 lít dung dịch đậm natri propionat (5.7.1) và 40 g ninhydrin vào bình cầu 2 lít, lắc cho đến khi hoà tan hết, sau đó thêm 1,33 g thiếc (II) clorua ngậm hai phân tử nước ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Lắc cho đến khi hoà tan hết (xem chú thích).

Nếu giữ ở 4 °C dưới áp suất nhẹ trong môi trường nitơ và ở nơi tối, thì thuốc thử này có thể bền trong 1 tháng.

**CHÚ THÍCH** Nếu xuất hiện kết tủa  $\text{SnCl}_2$ , thì thay kẽm (II) clorua bằng 7,5 ml dung dịch thiếc (III) clorua 150 g/l hoặc bằng 1,5 g hydrindantin trên lít thuốc thử.

## 5.8 Lysin, dung dịch chuẩn, tương ứng với 1 mmol của lysin trên lít.

Hoà tan 182,5 mg lysin monohydroclorua trong 100 ml axit clohydric 0,1 mol/l. Lấy chính xác 10 ml dung dịch này và pha loãng đến 100 ml bằng dung dịch đậm natri xitrat pH 2,2 (5.5).

1 ml dung dịch này chứa 1  $\mu\text{mol}$  lysin.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

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

### 6.1 Máy nghiền, có các đặc tính sau đây:

- được cấu tạo bằng vật liệu không hút ẩm;
- dễ làm sạch và có khoảng trống không sử dụng tối thiểu;
- cho phép nghiền nhanh và nghiền đều, không làm nóng quá mức và ngăn tiếp xúc với không khí bên ngoài càng nhiều càng tốt.
- có khả năng điều chỉnh để thu được các hạt có các kích cỡ qui định trong 7.1.

**6.2 Bình cầu**, có dung tích 250 ml và 1 000 ml, đáy phẳng, cổ ngắn có khớp nối mài hình nón và **bình sinh hàn** khớp với bình cầu.

**6.3 Chén nung**, bằng thủy tinh chịu nhiệt loại P 16 (cỡ lỗ 10  $\mu\text{m}$  đến 16  $\mu\text{m}$ ).

**6.4 Bể dầu**, khả năng duy trì ở nhiệt độ đảm bảo cho việc đối lưu (120 °C đến 130 °C).

### 6.5 Máy cất quay.

**6.6 Thiết bị phân tích tự động axit amin**, hoặc nếu không sẵn có, thì dùng **hệ thống sắc ký thủ công** bao gồm:

- sắc ký cột, chiều dài khoảng 250 mm và đường kính trong 6 mm được duy trì nhiệt độ ổn định ở 55 °C bằng túi nước và bể tuần hoàn nhiệt, và được nhồi đầy đến 200 mm bằng resin trao đổi cation với các nhóm chức năng sulfonic, có cỡ hạt  $13 \pm 2 \mu\text{m}^2$  trong môi trường axit mạnh 8 %.
- bơm pittông nhỏ, tạo được tốc độ 50 ml/giờ;
- bộ thu nhận phần chiết;
- nồi cách thủy đun sôi;
- phổ kế cài đặt ở bước sóng 570 nm, có các cuvet dày 10 mm.

**6.7 Pipet chia độ**, có dung tích 1 ml; 5 ml và 10 ml.

**6.8 Bình định mức**, có dung tích 10 ml; 20 ml và 100 ml.

<sup>2)</sup> Sản phẩm Aminex A5 thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra để tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và ISO không ấn định sử dụng sản phẩm này.

## 6.9 Cân phân tích.

## 7 Lấy mẫu

TCVN 4325:2007 (ISO 6497:2002).

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Chuẩn bị mẫu thử

Nghiên từ 5 g đến 10 g mẫu phòng thử nghiệm để thu được các hạt lọt hết qua sàng có cỡ lỗ 315  $\mu\text{m}$ .

**CHÚ THÍCH** Cỡ lỗ của sàng được qui định nhỏ hơn so với khuyến cáo trong TCVN 6952:2001 (ISO 6498:1998) là để đảm bảo được sự tiếp xúc tối đa với DNFB.

### 8.2 Phần mẫu thử

Cân hai phần mẫu thử, mỗi phần tương ứng với khoảng 100 mg protein thô chính xác đến 1 mg và cho lần lượt vào hai bình cầu (6.2) [xem TCVN 4328 (ISO 5983) để xác định hàm lượng protein].

### 8.3 Lysin tổng số

#### 8.3.1 Thuỷ phân bằng axit clohydric

Cho 500 ml axit clohydric 6 mol/l (5.4) vào bình cầu 1 000 ml (xem 8.2). Lắp bình sinh hàn và đặt bình cầu vào trong bể dầu (6.4) đã được làm nóng trước từ 120 °C đến 130 °C.

Sau khi đun sôi nhẹ trong 24 giờ, làm nguội bình và lọc lượng chứa trong bình qua chén nung (6.3). Sử dụng máy cất quay (6.5) làm bay hơi dịch lọc ở nhiệt độ không quá 40 °C. Cho nước vào cạn thu được và cho bay hơi tiếp. Lặp lại thao tác này cho đến khi phần lớn axit clohydric được loại bỏ hết; thông thường, tráng bốn lần, mỗi lần bằng 30 ml nước là đủ.

Hòa tan cạn trong dung dịch đệm natri xitrat có pH 2,2 (5.5) và chuyển lượng này sang bình định mức một vạch 100 ml (6.8). Thêm dung dịch đệm natri xitrat pH 2,2 (5.5) cho đến vạch, lọc qua giấy lọc gấp nếp.

#### 8.3.2 Chuẩn bị cột lần cuối và hấp phụ dịch thuỷ phân

Nối bơm của thiết bị (6.6) vào bộ phận chứa dung dịch đệm natri xitrat có pH 5,28 (5.6); sau đó chỉnh tốc độ dòng đến 50 ml/giờ. Nối bơm vào cột resin, đã được làm nóng trước đến 55 °C, và cho dung dịch đệm (5.6) đi qua cột trong 20 phút để tạo sự cân bằng. Tháo bơm ra. Loại bỏ phần lớn chất lỏng phía trên cột resin, chú ý sao cho bề mặt của cột resin không bị khô.

Dùng pipet (6.7), lấy 0,5 ml dịch thủy phân (hoặc 1 ml nếu sử dụng hệ thống thủ công) cho lên cột, sau đó cho đi qua qua cột resin có sự hỗ trợ của áp suất nơ nhẹ. Tráng thành cột bằng 0,5 ml dung dịch đệm natri xitrat có pH 5,28 (5.6) và cho qua cột resin. Điền đầy cột đến đỉnh bằng dung dịch đệm natri xitrat (5.6) và nối với bơm.

### 8.3.3 Xác định

#### 8.3.3.1 Hệ thống tự động

Cài đặt thiết bị phân tích. Hiệu chuẩn thiết bị bằng 0,25  $\mu\text{mol}$  lysin [0,25 ml dung dịch chuẩn lysin (5.8)] hoặc theo lượng qui định trong chỉ dẫn của nhà sản xuất, tiến hành như mô tả trong 8.3.2.

#### 8.3.3.2 Hệ thống thủ công

##### 8.3.3.2.1 Định vị lysin

Phần chất rửa giải chứa lysin phải được kiểm tra bằng cách dùng dung dịch lysin đã biết trước nồng độ, ví dụ dung dịch 1  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  (5.8). Đối với mục đích này, loại bỏ 25 ml đến 30 ml chất rửa giải đầu tiên và thu lấy các phần 1 ml vào các ống thử nghiệm cho đến khi thu được phần thứ 50 tính từ khi bắt đầu rửa giải. Thêm vào mỗi phần 1 ml thuốc thử ninhydrin (5.7) vào các phần từ phần 30 đến phần 50. Trộn đều, chuyển vào nồi cách thủy đun sôi và để trong 15 phút. Để nguội. Pha loãng bằng cách thêm 10 ml dung dịch đệm natri xitrat có pH 5,28 (5.6). Trộn và đo chất hấp thụ ở 570 nm bằng phổ kế, dùng dung dịch đệm natri xitrat có pH 5,28 (5.6) làm dịch lỏng đối chứng.

**CHÚ THÍCH** Dưới các điều kiện qui định, lysin thường được rửa giải ở các phần từ phần 39 đến phần 45, đây chỉ là thông tin để tham khảo.

##### 8.3.3.2.2 Xác định

Nếu lysin được rửa giải từ các phần từ phần 39 đến phần 45 thì loại bỏ 38 ml chất rửa giải đầu tiên, thu lấy và gộp các phần (phần thứ 39 đến phần thứ 45) tương ứng với pic lysin và cho bay hơi bằng máy cất quay (6.5).

**CHÚ THÍCH** Sau khi thu hồi các phần có chứa lysin, cho khoảng 200 ml dung dịch đệm đi qua cột để loại bỏ hết thành phần không mong muốn có thể còn sót lại.

Hoà tan cạn trong 5 ml dung dịch đệm natri xitrat có pH 5,28 (5.6) và thêm 5 ml thuốc thử ninhydrin (5.7). Trộn đều, chuyển vào nồi cách thủy đun sôi và để trong 15 phút. Để nguội. Pha loãng hỗn hợp bằng dung dịch đệm natri xitrat có pH 5,28 (5.6) sao cho nồng độ lysin của dung dịch thử ở khoảng 0,02  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  ( $V$ , là phần thể tích mẫu thử thu được).

Đo độ hấp thụ ở 570 nm bằng phổ kế, dùng hỗn hợp của một phần thể tích dung dịch đệm natri xitrat (5.6) và một phần thể tích thuốc thử ninhydrin (5.7) làm dịch lỏng đối chứng, cho vào nổi cách thủy đun sôi trong 15 phút và sau khi làm nguội thì pha loãng đến thể tích  $V_1$ .

#### 8.3.3.2.3 Hiệu chuẩn phổ kế

Lấy chính xác 5 ml dung dịch lysin chuẩn (5.8). Cho 5 ml thuốc thử ninhydrin (5.7). Trộn đều, chuyển sang nổi cách thủy đun sôi và để trong 15 phút. Để nguội và pha loãng đến 100 ml bằng dung dịch đệm natri xitrat có pH 5,28 (5.6).

Đo độ hấp thụ bằng phổ kế dưới cùng điều kiện như trong 8.3.3.2.2.

### 8.4 Lysin không hữu dụng

#### 8.4.1 Phản ứng dinitrophenylation

Dùng pipet (6.7) chuyển 8 ml dung dịch natri bicacbonat (5.2) cho vào bình cầu 250 ml (xem 8.2). Để khoảng 10 phút, khuấy liên tục. Sau đó thêm dung dịch DNFB (5.3), đậy nắp bình, lắc và đảm bảo rằng các hạt không bám lên thành bình, để hỗn hợp qua đêm ở nhiệt độ phòng và ở nơi tối.

#### 8.4.2 Làm sạch

Dùng máy cất quay (6.5) làm bay hơi cho đến khô ở nhiệt độ nhỏ hơn 40 °C. Cho 75 ml ete dietyl (5.1) vào bình cầu, khuấy và để tách pha. Loại bỏ hết ete dietyl, chú ý tránh kéo theo các hạt rắn. Lặp lại các thao tác này trên hai lần, mỗi lần dùng 50 ml ete dietyl. Làm bay hơi các vết dietyl ete cuối cùng bằng cách đun nóng trên máy cất quay.

#### 8.4.3 Thuỷ phân bằng axit clohydric

Chuyển sang bình cầu 150 ml axit clohydric (5.4) và tiến hành như mô tả trong 8.3.1 nhưng chuyển hết lượng cặn và hoà tan trong dung dịch đệm natri xitrat có pH 2,2 (5.5) trong bình định mức 20 ml (6.8) (hoặc 10 ml nếu dùng hệ thống thủ công).

#### 8.4.4 Làm lắng dịch thuỷ phân và xác định

Tiến hành như mô tả trong 8.3.2 và 8.3.3.

Trong trường hợp hệ thống thủ công, thì đọc lần cuối cùng trên phổ kế có thể thực hiện được bằng cách pha loãng thể tích lysin cùng với hỗn hợp thuốc thử đến 20 ml bằng dung dịch đệm natri xitrat có pH 5,28 (5.6) ( $V_2$  là thể tích dung dịch thử thu được).

## 8.5 Số lần xác định

Tiến hành hai lần xác định trên cùng mẫu thử, dùng hai cặp phần mẫu thử khác nhau.

## 9 Biểu thị kết quả

### 9.1 Phương pháp tính và công thức

#### 9.1.1 Lysin tổng số

##### 9.1.1.1 Xác định bằng cách sử dụng dụng cụ phân tích tự động

Lysin tổng số,  $w_1$ , được biểu thị theo phần trăm khối lượng, tính bằng công thức sau đây:

$$\frac{0,365}{m_1 \times V_0} \times \frac{S_1}{S_0}$$

trong đó:

$S_0$  là diện tích pic tương ứng với 0,25  $\mu\text{mol}$  lysin;

$S_1$  là diện tích pic tương ứng với lysin tổng số xác định được trong 8.3.3.1;

$m_1$  là khối lượng của phần mẫu thử cho vào trong bình thứ nhất, tính bằng gam;

$V_0$  là thể tích của dịch thủy phân được chuyển vào cột (thông thường,  $V_0 = 0,5$  ml), tính bằng mililit.

##### 9.1.1.2 Xác định bằng cách sử dụng hệ thống phân tích thủ công

Lysin tổng số,  $w_1$ , được biểu thị theo phần trăm khối lượng, tính bằng công thức sau đây:

$$\frac{V_1 \times 0,073}{m_1 \times V_0} \times \frac{A_1}{A_0}$$

trong đó

$A_0$  là độ hấp thụ của dung dịch lysin chuẩn xác định được trong 8.3.3.2.3;

$A_1$  là độ hấp thụ xác định được trong 8.3.3.2.2;

$V_0$  là thể tích của dịch thủy phân được chuyển sang cột (thông thường,  $V_0 = 1$  ml), tính bằng mililit;

$V_1$  là thể tích của dung dịch thử, tính bằng mililit;

$m_1$  là khối lượng của phần mẫu thử cho vào trong bình cầu thứ nhất, tính bằng gam.



## 9.1.2 Lysin không hữu dụng

### 9.1.2.1 Xác định bằng cách sử dụng dụng cụ phân tích tự động

Lysin không hữu dụng,  $w_2$ , được biểu thị bằng phần trăm khối lượng, tính bằng công thức sau đây:

$$\frac{0,073}{m_2 \times V_0} \times \frac{S_2}{S_0}$$

trong đó

$S_0$  là diện tích pic tương ứng với 0,25  $\mu\text{mol}$  lysin;

$S_2$  là diện tích pic tương ứng với lysin không hữu dụng, xác định được trong 8.4.4;

$m_2$  là khối lượng của phần mẫu thử cho vào trong cầu bình thứ hai, tính bằng gam;

$V_0$  là thể tích của dịch thủy phân được chuyển sang cột (thông thường,  $V_0 = 0,5$  ml), tính bằng mililit.

### 9.1.2.2 Xác định bằng cách sử dụng hệ thống thủ công

Lysin không hữu dụng,  $w_2$ , được biểu thị bằng phần trăm khối lượng, tính bằng công thức sau đây:

$$\frac{V_2 \times 0,0073}{m_2 \times V_0} \times \frac{A_2}{A_0}$$

trong đó

$A_0$  là độ hấp thụ của dung dịch lysin chuẩn xác định được trong 8.3.3.2.3;

$A_2$  là độ hấp thụ xác định được trong 8.4.4;

$V_0$  là thể tích của dịch thủy phân được chuyển sang cột (thông thường,  $V_0 = 1$  ml), tính bằng mililit;

$V_2$  là thể tích của dung dịch thử (thông thường,  $V_2 = 20$  ml), tính bằng mililit;

$m_2$  là khối lượng của phần mẫu thử cho vào bình thứ hai, tính bằng gam.

## 9.1.3 Lysin hữu dụng

Lysin hữu dụng,  $w_3$ , được biểu thị bằng phần trăm khối lượng, tính bằng công thức sau đây:

$$w_1 - w_2$$

trong đó

$w_1$  là lysin tổng số (xem 9.1.1);

$w_2$  là lysin không hữu dụng (xem 9.1.2).

**CHÚ THÍCH** Lysin hữu dụng, được biểu thị bằng phần trăm khối lượng của lysin tổng số, tính bằng công thức sau đây:

$$\frac{(w_1 - w_2)}{w_1} \times 100$$

## 9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch giữa các kết quả thu được của hai lần xác định được tiến hành đồng thời hoặc kế tiếp nhau do cùng một người phân tích không quá 10 % giá trị trung bình của các kết quả thu được.

## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu được phương pháp sử dụng và kết quả thu được. Báo cáo cũng phải đề cập đến mọi chi tiết không qui định trong tiêu chuẩn này hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với bất kỳ chi tiết nào ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo thử nghiệm cũng phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu.

## Lời giới thiệu

Lysin trong sản phẩm thực phẩm thường được coi là dễ chuyển hoá khi nhóm amin cuối (amino  $\epsilon$ ) của chúng không kết hợp được. Phần lysin này có thể xác định được vì các nhóm này kết hợp với 2,4-dinitrofluorobenzen.