

团 体 标 准

T/NAIA XXX—2021

饲料中真蛋白的测定 凯氏定氮法

Determination of true protein in feedstuffs, Kjeldahl method

2021-XX-XX 发布

2021-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009 《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》规定编写。

本标准由宁夏昊标检测服务研究院（有限公司）提出。

本标准由宁夏化学分析测试协会归口。

本标准起草单位：宁夏昊标检测服务研究院（有限公司）、宁夏饲料工程技术研究中心、宁夏化学分析测试协会。

本标准主要起草人：任亚丽、王京、张亮亮、徐欢、刘鸿翔、马晓瑞、杨婷、卜姣姣、刘辉、张小飞。

本标准于 2021 年 X 月 XX 日首次发布。

饲料中真蛋白的测定

凯氏定氮法

1 范围

本标准规定了饲料中真蛋白的测定方法，其中包括原理、试剂和溶液、仪器设备、分析步骤、结果计算及精密度。

本操作方法适用配合饲料、浓缩饲料和单一饲料中真蛋白的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的应用文件，仅注日期的版本适用于本文件，凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

GB/T 20195-2006 动物饲料 试样的制备。

GB/T 6432-2018 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法。

3 原理

样品在水溶液中，加入过量硫酸铜，在碱性条件下，纯蛋白被氢氧化铜沉淀，用水洗去水溶性含氮物，沉淀部分按粗蛋白的测定方法测定其含氮量。

4 试剂和溶液

除非另有说明外，本方法均使用符合国家标准和分析纯试剂，分析用水为GB/T 6682规定的三级水。

4.1 五水硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。

4.2 浓硫酸 (H_2SO_4) 含量为 98%，无氮。

4.3 氢氧化钠 (NaOH)。

4.4 硫酸钠 (Na_2SO_4)。

4.5 硼酸 (H_3BO_3)。

4.6 硫酸铵：分析纯，干燥。

4.7 溴甲酚绿。

4.8 甲基红。

4.9 蔗糖。

4.10 10%硫酸铜溶液

称取五水硫酸铜10 g用水溶解，转移至100 mL容量瓶中定容至刻度。

4.11 2.5 %氢氧化钠溶液

称取2.5 g氢氧化钠用水溶解，转移至100 mL容量瓶中定容至刻度。

4.12 催化剂

0.4 g五水硫酸铜，6 g硫酸钠，均为分析纯，磨碎混匀。

4.13 40 %的氢氧化钠溶液

称取400.0 g氢氧化钠溶于水中，并稀释至1000 mL。

4.14 20 g/L 硼酸溶液

称取20.0 g硼酸溶于水中，并稀释至1000 mL。

4.15 混合指示剂

称取0.50 g溴钾酚绿 ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$)及0.10 g甲基红 ($C_{15}H_{15}N_3O_2$),用少量95%乙醇研磨至完全溶解，用95 %乙醇定容至100 mL,该指示剂贮存期不超过2个月。

4.16 0.02 mol/L 盐酸或硫酸标准溶液

按GB/T601制备

4.17 0.1 mol/L 盐酸或硫酸标准溶液

按GB/T601制备

5 仪器设备

5.1 实验室用样品粉碎机。

5.2 分样筛:孔径 0.45 mm (40 目)。

5.3 分析天平:感量 0.0001 g。

5.4 滴定管:酸式, 25 mL、50 mL。

5.5 凯氏定氮仪。

5.6 锥形瓶: 250 mL。

5.7 容量瓶: 100 mL。

5.8 烧杯: 200 mL。

5.9 干燥箱。

6 操作步骤

6.1 样品的处理

称取待测样品0.5-1 g (精确到0.1 mg)于200 mL烧杯中,加50 mL蒸馏水,用玻璃棒搅拌均匀,在电炉上加热煮沸,加入20 mL 10%硫酸铜溶液(4.10),再加入20 mL 2.5%氢氧化钠溶液

(4.11) 搅匀, 从电炉上取下, 在室温放置2 h, 然后用倾泻法将样品过滤到滤纸上, 用少量温水多次洗涤烧杯和沉淀物, 直至洗出液无硫酸根离子(10 %氯化钡溶液来检验滤液无沉淀), 连同漏斗一起放入80 ℃±2 ℃干燥箱中干燥4 h, 将滤液和沉淀物小心放入250 mL凯氏烧瓶中, 加入6.4 g催化剂(4.12), 10 mL浓硫酸(4.2), 在电炉上消化, 样液澄清后继续消煮2 h, 取下冷却。同时做空白实验。

6.2 蒸馏

将蒸馏装置的冷凝管末端浸入装有25mL硼酸(4.14)的吸收液和3滴混合指示剂(4.15)的锥形瓶内。然后小心的向凯氏烧瓶中加入50 mL氢氧化钠溶液, 轻轻摇动凯氏烧瓶, 使溶液混匀后再加热蒸馏, 直至流出液最少为100 mL, 降下锥形瓶, 使冷凝管末端离开液面, 继续蒸馏1-2 min, 并用蒸馏水冲洗冷凝管末端, 洗液均需流入锥形瓶内, 然后停止蒸馏。

6.3 滴定

蒸馏后的吸收液立即用0.1 mol/L 盐酸标准溶液(4.17)滴定, 溶液由蓝绿色变成灰红色为终点。

6.4 馏蒸步骤的检验

精确称取0.2 g硫酸铵(4.6)代替试样, 按操作步骤6进行操作, 测得硫酸铵含氮量为21.19±0.2 %, 否则应检查加碱、蒸馏和滴定各步骤是否正确。

6.5 空白测定

称取蔗糖(4.8) 0.5 g代替试样, 按操作步骤6进行空白测定, 消耗0.1 mol/L盐酸标准溶液(4.17)的体积不得超过0.2 mL。消耗0.02 mol/L盐酸标准溶液(4.16)体积不得超过0.3 mL。

7 结果计算

试样中真蛋白含量以质量分数 X 计, 数值以质量分数 (%) 表示, 按公式 (1) 计算:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times \frac{14}{1000} \times 6.25}{m \times \frac{V'}{V}} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

V_1 —滴定试样时所需标准溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

V_2 —滴定空白时所需标准溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

c —盐酸标准溶液的浓度, 单位为摩尔每升 (mol/L);

V —试样分解液的总体积, 单位为毫升 (mL);

V' —试样分解液蒸馏用体积, 单位为毫升 (mL);

m —试样质量，单位为克（g）

14—氮的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）；

6.25—氮换算成蛋白质的平均系数。

8 精密度

每个试样取两个平行样进行测定，以其算术平均值为结果。

当真蛋白含量在 25 %以上时，允许相对偏差为 1 %。

当真蛋白含量在 10 %-25 %之间时，允许相对偏差为 2 %。

当真蛋白含量在 10 %以下时，允许相对偏差为 3 %。
