

燃燒法與凱氏法分析飼料粗蛋白質之評估⁽¹⁾

李免蓮⁽²⁾ 崔美玲⁽²⁾ 徐阿里⁽²⁾

收件日期：90 年 8 月 14 日；接受日期：91 年 03 月 05 日

摘 要

本試驗目的在評估以燃燒法與凱氏法分析飼料中粗蛋白質之差異性。以玉米、大豆粕、魚粉等 10 種單味飼料 170 個及混合飼料 81 個共 251 個測試樣品，進行凱氏法與燃燒法分析粗蛋白質含量之比較。結果顯示，燃燒法之分析值略高於凱氏法，而樣品重覆間之偏差值 (Sr) 則凱氏法略低於燃燒法。由分析參考物質之含氮量比較，則燃燒法優於凱氏法。二法之分析值以一次迴歸處理結果，相關性 (R^2) 以蝦殼粉 (0.9963) 為最高，玉米 (0.8772) 為最低，251 個樣品之迴歸式之迴歸係數為 1.0006， R^2 為 0.9996，顯示二法間相關性極高，而其間之差距大約在 0.3%。隨試驗材料之不同，其迴歸式之相關性各異，二法間不宜以單一相關式來做調整。

關鍵詞：粗蛋白質、凱氏法、燃燒法、飼料。

緒 言

飼料中粗蛋白質之測定均以凱氏法 (Kjeldahl method) 為主，自 1950 年代即已列入美國官方檢定方法 (AOAC, 1995)。為達到理想結果，此法需用強酸及含汞催化劑等，易造成環境污染。凱氏法多年來雖經不斷的研發及改進，包括催化劑改用非含汞化合物，但其分析過程仍然有大量有害氣體及廢液之產生，在環保要求日益嚴格下，凱氏法面臨使用百年來最大之困境。

AOAC 於 1990 年新增燃燒法 (Combustion Method, 984.13)，此法在飼料 (Sweeney and Rexroad, 1987; Sweeney, 1989)、穀物及油仔類 (Bicsak, 1993; Daun and DeClercq, 1994)、肉製品 (Marcia and Sebranek, 1993)、乳製品 (Wiles and Gray, 1998) 等有許多比較試驗之報告。燃燒法係將樣品於高溫純氧狀態下燃燒為含氮氣體、含碳氣體及水蒸氣，由過氯酸鎂 [$Mg(ClO_4)_2$] 吸收水分，氫氧化鈉 (NaOH) 吸收含碳氣體及銅絲去除過剩之氧氣，剩餘之含氮氣體經觸媒還原為氮氣 (N_2)，並以氦氣將氮氣導入熱導檢測系統 (Thermal conductivity detection, TCD) 加以定量 (AOAC, 984.13, 1995)。此法分析一個樣品僅需 3 分鐘，且不使用複雜之化學溶液，符合現代迅速、安全及環保之要求。

依飼料中粗蛋白質之燃燒分析法 (AOAC, 984.13, 1995)，有以下之規範：

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1092 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所家畜營養系。

A. 方法指標

S_r (實驗室內重覆偏差) = 0.28 ; S_R (實驗室間重覆偏差) = 0.52 ; RSD_r = 0.59% ; RSD_R = 1.10% ; ($RSD, \% = SD / \text{mean} \% N$)

B. 設備

以燃燒法方式測定氮含量之任何儀器或裝置均可，需具備下列條件：

- (a) 燃燒爐一爐內溫度至少維持在 950°C，使樣品在純氧 (99.9%) 下高溫分解，有些系統需更高之溫度。
- (b) 分離系統一燃燒後之氣體混合物中將氮氣體分離出來以供 TCD 檢測。儀器設計包含將所有 NO_x 氣體轉變成 N_2 或以 NO_2 來測定之。
- (c) 檢測系統一了解檢測反應結果是以 % (w/w) 之含氮量表示。尚包括標準檢量線之製作，空白測試及氣壓補償等特性。所有檢量線均需通過純標準有機物質 (如 EDTA) 之理論值校正後方可使用。

C. 性能要求—任何廠牌之設備均需符合或超越以下之要求

- (a) 可供含氮量 0.2~20% 之飼料樣品之分析。
- (b) 系統精確度要求—以離胺酸-鹽酸 (Lysine-HCl) 為材料經 10 重覆之分析結果，其分析值需在理論值 $\pm 0.15\%$ 以內，且分析所得之標準偏差值亦低於 0.15%。
- (c) 樣品粗細度要求—玉米及大豆 (2:1 比例混合) 粉碎後做 10 重覆分析，其重覆性之相對標準偏差 (RSD_r) $\leq 2.0\%$ 為最佳粗細度。

$$(RSD_r, \% = SD / \bar{x} \times 100)$$

在本系統下配合飼料或其他非均勻性樣品要達此一精確度時，以 0.5 mm 及以下之粗細度為最適當。

D. 計算

粗蛋白質含量 (%) = 氮含量 (%) \times 6.25 (當樣品為小麥時應改為 5.70)

本試驗以數種飼料原料及配合飼料為供試樣品，從事凱氏法與燃燒法之分析比較，以確實了解其間之差異性，並供日後實作之參考。

材料與方法

I. 試驗材料：

- (i) 大豆及玉米粒經粗碎後，以玉米與大豆 2 : 1 之比例混合之，並分別經 0.5 mm、0.75 mm 及 1.0 mm 篩網之離心粉碎機 (Retsch, ZM1000) 粉碎後裝瓶，此等樣品供作粗細度之比較試驗用。
- (ii) 分析方法比較用之供試樣品 (括號內表樣品數) 為玉米 (30)、大豆粕 (30)、魚粉 (30)、麩皮 (21)、苜蓿 (17)、羽毛粉 (7)、肉骨粉 (9)、乳清粉 (9)、奶粉 (10)、蝦殼粉 (7) 及配合飼料 (81) 等，並以 EDTA 為標準品。離胺酸-鹽酸及色胺酸為標準參考物質，樣品經 0.75 mm 粉碎後，分別以兩種方法分析其粗蛋白質量或含氮量。

II. 試驗設備：

凱氏法使用之設備為 BUCHI B435 分解爐及 BUCHI B-339 全自動蒸餾滴定分析儀；燃燒法則使用 LECO FP-528 Protein/Nitrogen Analyzer。

III. 試驗方法

(i) 水分之測定依中國國家標準法（經濟部中央標準局，1986）測定之。

(ii) 粗蛋白質之測定

1. 凱氏法（依 AOAC 修飾法，李及徐，1989）

秤取約 0.5~1.0 g 之樣品（使樣品中含氮量在 40 mg 以下），加入含硒催化劑 5 g 及 15 ml 濃硫酸後於 450℃ 之電熱爐上加熱分解至澄清（約 90 分鐘），加水蒸餾並滴定之，以測得全氮量，並同時作空白樣品檢測，以推算樣品中粗蛋白質含量。

2. 燃燒法（依 AOAC 修飾法，1995）

秤取 0.2 g 左右之樣品（精秤至小數點第四位），以鋁薄紙包之，置入儀器（LECO, FP-528）中，以氣壓將樣品打入燃燒器，於 850℃ 下以氧氣快速燃燒樣品，使成氣體，並經冷卻系統，將水氣冷凝去除，餘氣體收集於集氣筒內，集氣筒內以活塞控制，使氣體維持在 975 mm 及一定溫度之狀態下混合均勻，再以活塞將氣體壓入採樣環圈中，取 3 ml 做分析。取樣後之氣體樣品經過還原系統（內含熱銅絲及三氧化錫），去除氧氣及還原所有含氮氧化物成氮氣，再經吸附系統（內含氫氧化鈉及過氯酸鎂）吸附氣體中之二氧化碳及水氣，最後剩餘氮氣導入 TCD 系統中，測定含氮量，並換算成樣品中之粗蛋白質量。

IV. 統計分析

將二法所得之分析數據，以 SAS (1988) 作統計分析，並比較二法間之差異性。

結果與討論

I. 粉碎粗細度對水分及粗蛋白質分析之影響

玉米—大豆 (2:1) 之樣品經不同孔徑之篩網粉碎後，分析水分 (5 重覆) 及粗蛋白質含量 (10 重覆)，結果 (表 1) 顯示粉碎粗細度顯著影響測試樣品之水分及粗蛋白質分析值 ($P<0.01$)。水分含量隨粉碎篩網孔徑之增大而增加，粗蛋白質則反之；但分析變異性 (標準偏差；SD) 均隨粗細度之增大而增加。Sweeney (1989) 認為樣品粗細度會影響分析之再現性，經 1 mm 過篩之樣品，凱氏法之粗蛋白質分析變異性小於燃燒法，但經 0.5 mm 過篩之樣品其結果反之。其原因在於燃燒法使用 FP-528 儀器時，樣品取樣必需在 0.2 g 以下所造成。AOAC 中建議燃燒法之樣品粉碎粗細度為 0.5 mm。由表 1 之結果顯示處理內重覆偏差太小導致粉碎粗細度顯著影響水分之分析結果，0.5 mm 及 1.0 mm 處理組之水分平均差 0.4%，而 0.75 mm 及 1.0 mm 組則僅差 0.14%。粗蛋白質分析上，0.5 mm 處理組與其他兩組間差異顯著存在 ($P<0.01$)，分析值平均差異達 0.3%，而 0.75 mm 及 1.0 mm 組則差異不顯著。太細之樣品粉碎粗細度顯著影響水分之分析值，則相對影響其他成分之分析值表現，但粉碎粗細度又影響分析再現性並提高分析偏差，故本試驗之樣品粉碎粗細度均採 0.75 mm 孔徑之篩網。

表 1. 粉碎粗細度對水分及粗蛋白質分析之影響

Table 1. Effect of screen mesh on moisture and crude protein

Screen mesh	Moisture			Crude protein ^A		
	Mean	SD	RSD ^B	Mean	SD	RSD ^B
0.5 mm	12.14 % ^a	0.01	0.09	17.26 % ^a	0.12	0.70
0.75 mm	12.40 % ^b	0.02	0.18	16.98 % ^b	0.16	0.94
1.0 mm	12.54 % ^c	0.06	0.47	16.96 % ^b	0.17	1.00

^A Crude protein was determined by Combustion method.

^B RSD = SD/Mean*100.

^{a,b,c} Means within the same row with different superscripts differ significantly (P<0.01).

II. 燃燒法與凱氏法之分析比較

長期間收集各種原料樣品，同時進行兩種方法之分析，每一樣品二重覆，並以平均值為分析值，由表 2 結果顯示，燃燒法之分析值略高於凱氏法，除奶粉及羽毛粉外二種分析法之分析值間差異顯著 (P<0.05)，而樣品重覆間之偏差 (Sr) 則凱氏法低於燃燒法，此結果與 Sweeney & Rexroad (1987) 及 Sweeney (1989) 之報告相似，李及馬 (1997) 之比較試驗採同一樣品五重覆分析，亦以燃燒法之分析變異為高。因燃燒法之樣品用量為 0.2 g 左右，較凱氏法之 0.5 g 為低，故樣品大小影響分析之再現性，致使燃燒法之 Sr 高於凱氏法。Bicsak (1993) 將測試樣品分別以 1 mm 及 2 mm 篩網過篩，分析結果證明降低篩網孔徑可改善分析再現性，即降低重覆間之標準偏差。Sweeney (1989) 認為樣品粉碎使用 1 mm 之篩網，則燃燒法之再現性較凱氏法差，但若改用 0.5 mm 篩網時，兩種方法之重覆偏差可得到相同結果。本試驗之燃燒法重覆偏差 (Sr) 雖略高於凱氏法，但除了魚粉、肉骨粉及羽毛粉等均勻度較差之樣品外，其重複偏差 (Sr) 均低於 0.2%，符合 AOAC 使用本法之條件。但兩種分析方法分析值之差異是顯著存在的。

表 2. 燃燒法與凱氏法之飼料粗蛋白質分析結果

Table 2. Comparison of crude protein determined by combustion method and Kjeldahl method

Feeds	No. of Samples	Combustion		Kjeldahl		Difference between				
		Method (C), %		Method (K)		two method (C-K)				
		Mean	Sr	Mean	Sr	Mean	Min	Max	SD	P
Feed ingredients										
Corn, ground	30	7.78	0.05	7.61	0.06	0.17	0.01	0.37	0.13	0.000
Soybean meal	30	42.48	0.16	42.25	0.16	0.23	0.01	0.77	0.39	0.003
Fish meal	30	64.16	0.22	63.98	0.21	0.18	0.01	0.86	0.06	0.036
Whey, dried	9	11.61	0.11	11.29	0.06	0.32	0.28	0.64	0.30	0.013
Skim milk, dried	10	30.77	0.14	30.55	0.24	0.22	0.17	0.82	0.48	0.189
Wheat bran	21	16.85	0.12	16.43	0.06	0.42	0.03	0.80	0.25	0.000
Alfalfa	17	16.96	0.17	16.52	0.13	0.43	0.00	1.00	0.42	0.001
Meat & bone meal	9	50.41	0.30	49.90	0.19	0.52	0.02	1.29	0.43	0.007
Feather meal	7	88.49	0.22	88.10	0.12	0.39	0.50	1.15	0.69	0.186
Shrimp shell meal	7	34.74	0.16	33.71	0.08	1.03	0.62	1.55	0.37	0.000
Mixed feeds										
CP 10~20%	30	17.21	0.17	17.05	0.15	0.17	0.06	0.51	0.29	0.004
CP 20~30%	30	23.38	0.17	23.03	0.10	0.36	0.04	1.14	0.33	0.000
CP 30~50%	21	43.95	0.19	43.27	0.17	0.68	0.25	1.63	0.36	0.000

Sr: Standard deviation between sample replication.

SD: Standard deviation of difference between two methods.

分析方法對標準參考物質之含氮量之比較，燃燒法在標準參考物質之離胺酸-鹽酸及色胺酸之分

析值與理論值極為相近，且標準偏差 (SD) 分別在 0.02 及 0.03%，顯示本系統處於非常良好狀態，而凱氏法分析值則偏低且 SD 亦較高 (表 3)。Kane (1987) 及 Daun (1994) 認為凱氏法之分析值偏低原因在於未使用含汞化合物為催化劑。Wiles and Gray (1998) 亦認為凱氏法在 425°C 之分解溫度下，離胺酸-鹽酸之分解能力低於色胺酸。而在使用含銅、銻、硒等化合物為催化劑之狀態下分解 1 小時，其效果仍遠低於以含汞化合物分解 30 分鐘。Sweeney (1989) 及 Marcia and Sebranek (1993) 之比較試驗中，離胺酸-鹽酸之分析結果均以燃燒法較凱氏法穩定，參與共同比較試驗之實驗室中，部份實驗室在凱氏法上無法達到理想回收率。故凱氏法在樣品分解過程中，酸液用量、加熱溫度、催化劑種類等條件上尋求最佳組合，方可得到理想分析結果，而燃燒法則無這方面之困擾。

表 3. 氮分析方法對參考物質之含氮量分析值 (%)

Table 3. Analysis value of reference matter by different analysis method

Reference matter	Kjeldahl method			Combustion method			P	Theoretical value
	Replicate	Analysis value	SD	Replicate	Analysis value	SD		
Lysine-HCl	8	15.17	0.10	10	15.33	0.02	<0.01	15.34
Tryptophan	8	13.43	0.05	10	13.74	0.03	<0.01	13.72

若將兩種氮分析方法之分析值以一次迴歸處理，依飼料原料別處理，則每種原料之迴歸式均不相同，而相關性 (R^2) 以蝦殼粉 (0.9963) 為最高，玉米 (0.8772) 為最低 (表 4)，但若以粗蛋白質含量範圍分類之，則除了低含量 (粗蛋白質 10% 以下，如玉米) 之迴歸式外，其餘迴歸式之迴歸係數相近 (0.9924~1.0156)，251 個樣品之迴歸式迴歸係數為 1.0006， R^2 為 0.9996 (表 5)，顯示二法間相關性極高，而其間之差距大約在 0.3% 左右。雖然二方法分析值間相關性高，但由表 4 觀之，隨試驗材料之不同，其迴歸式之表現相異，故二方法間分析值宜依飼料種類之相關式分別校正。

表 4. 燃燒法 (C) 與凱氏法 (K) 粗蛋白質分析值之線性迴歸分析 (依飼料種類別)

Table 4. The difference of linear regression of crude protein content between Combustion (C) and Kjeldahl method (K) (in feed kinds)

Item	No. of samples	Regression equation	R^2
Feed ingredients			
Corn, ground	30	$C = 0.8762K + 1.1107$	0.8772
Soybean meal	30	$C = 0.9817K + 1.0065$	0.9903
Fish meal	30	$C = 1.0196K + 1.0715$	0.9917
Whey, dried	9	$C = 0.9744K + 0.6100$	0.9292
Skim milk, dried	10	$C = 0.9423K + 1.9793$	0.9864
Wheat bran	21	$C = 0.9939K + 0.5240$	0.9289
Alfalfa	17	$C = 1.0943K + 1.1242$	0.9690
Meat & bone meal	9	$C = 1.0004K + 0.5001$	0.9404
Feather meal	7	$C = 0.8900K + 10.0792$	0.9896
Shrimp shell meal	7	$C = 0.9798K + 1.7131$	0.9963
Mixed feeds			
CP 10%~20%	30	$C = 0.9784K + 0.5342$	0.9746
CP 20%~30%	30	$C = 0.9652K + 1.1579$	0.9866
CP 30%~50%	30	$C = 0.9767K + 1.6930$	0.9959

表 5. 燃燒法 (C) 與凱氏法 (K) 粗蛋白質分析值之線性迴歸分析 (依粗蛋白質含量)

Table 5. The linear regression of crude protein by combustion (C) and Kjeldahl method (K)

Crude protein (%)	No. of samples	Regression equation	R ²
Under 10%	31	$C = 0.9698 K + 0.4060$	0.9254
10% - 20 %	75	$C = 0.9924 K + 0.4272$	0.9775
20% - 30 %	34	$C = 1.0048 K + 0.3409$	0.9792
30% - 40 %	25	$C = 1.0156 K - 0.1025$	0.9671
40% - 50 %	44	$C = 0.9962 K + 0.5977$	0.9758
Over 50%	42	$C = 1.0021 K + 0.1079$	0.9981
Total	251	$C = 1.0006 K + 0.3135$	0.9996

結 論

在不影響水分分析及樣品分析再現性，燃燒法之樣品以粉碎機之篩網徑 0.75 mm 粉碎之粗細度為宜。且燃燒法可將試樣中所有含氮物質分解後測定之，而凱氏法因分解條件不一，而導致其分析值顯著較燃燒法低。二法分析值之迴歸相關性極佳，但隨飼料種類迴歸方程式表現相異。燃燒法分析時間短、不用複雜之化學溶液及無廢液、廢氣等問題，可適用於例行分析工作上。

參考文獻

- 李免蓮、徐阿里。1989。飼料粗蛋白質分析方法之探討。飼料品管 4:25-35。
- 李免蓮、馬錦端。1997。凱氏法與燃燒法對飼料中粗蛋白質分析之比較。飼料品管 9:10-15。
- 經濟部中央標準局。1986。中國國家標準—飼料檢驗法 (N4024)。
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16 th Ed., current through : March, 1996. AOAC, Arlington, VA. Secs 4.2.01-4.2.09.
- Bicsak, R. C. 1993. Comparison of Kjeldahl method for determination of crude protein in cereal grains and oilseeds with generic combustion method: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 76 (4): 780-786.
- Daun, J. K. and D. R. DeClercq. 1994. Comparison of combustion and Kjeldahl methods for determination of nitrogen in oilseeds. J. Am. Oil. Soc. 71: 1069-1072.
- Kane, P. F. 1987. Comparison of HgO and CuSO₄/TiO₂ as catalysts in manual Kjeldahl digestion for determination of crude protein in animal feed: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70 (5) : 907-911.
- Marcia, K. B. and J. G. Sebranek. 1993. Combustion method for determination of crude protein in meat and meat products : Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 76 (4) : 787-793.
- SAS. 1988. SAS/STAT User's Guide, Statistical Analysis System. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Sweeney, R. A. 1989. Generic combustion method for determination of crude protein in feeds: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72 (5) : 770-774.
- Sweeney, R. A. and P. R. Rexroad. 1987. Comparison of LECO FP-228 "Nitrogen Determinator" with AOAC copper catalyst Kjeldahl method for crude protein. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70 (6) :

1028-1030.

Wiles, P. G. and I. K. Gray. 1998. Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 81 (3) : 620-632.

Evaluation of Crude Protein Determination in Feeds by Combustion Method and Kjeldahl Method ⁽¹⁾

Mian-Lian Lee ⁽²⁾ May-Ling Choi ⁽²⁾ and A-Li Hsu ⁽²⁾

Received Aug.14, 2001 ; Accepted Mar. 5, 2002

Abstract

A total of 251 feed samples containing 81 mixed feeds and 170 ingredient feeds such as corn, soybean meal and fish meal, etc. were used to evaluate the difference between the combustion method and Kjeldahl method for crude protein analysis. The results showed that the values of crude protein in feeds analyzed by the combustion method were higher than that of Kjeldahl method. The standard errors of replication (Sr) were a little lower in Kjeldahl method than that of the combustion method. Comparing to nitrogen in the standard reference material, the combustion method was better than the Kjeldahl method. The results of the primary regression test showed that the R^2 of shrimp shell meal was the highest (0.9963) and that of the corn was the lowest (0.8772). Regression coefficient of 251 samples was 1.0006, and $R^2 = 0.9996$, suggesting a high correlation between the two methods. The difference between the regression coefficients was about 0.3% and the regression equation might be various depending on the test materials.

Key words: Crude protein, Combustion method, Kjeldahl method, Feeds.

(1) Contribution No. 1092 from Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture.

(2) Department of Animal Nutrition, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.