

中华人民共和国国家标准

饲料中异硫氰酸酯的测定方法

GB 13087—91

Method for determination of isothiocyanates
in feeds

1 主题内容与适用范围

本标准规定了配合饲料和菜籽饼粕中异硫氰酸酯的测定方法。

本标准适用于配合饲料(包括混合饲料)和菜籽取油后的饼粕中异硫氰酸酯的测定。

第一篇 气相色谱法

2 原理

配合饲料中存在的硫葡萄糖苷,在芥子酶作用下生成相应的异硫氰酸酯,用二氯甲烷提取后再用气相色谱进行测定。

3 试剂和溶液

除特殊规定外,本标准所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

3.1 二氯甲烷或氯仿(GB 682)。

3.2 丙酮(GB 686)。

3.3 pH7缓冲液:市售或按下法配制。量取35.3 mL 0.1 mol/L 柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)溶液,置入200 mL 定容瓶中,用0.2 mol/L 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, GB 1263)稀释至刻度,配制后检查 pH 值。

3.4 无水硫酸钠。

3.5 酶制剂:将白芥(*Sinapis alba* L.)种子(72 h 内发芽率必须大于85%,保存期不超过两年)粉碎后,称取100 g,用300 mL 丙酮(3.2)分10次脱脂,滤纸过滤,真空干燥脱脂白芥子粉,然后用400 mL 水分两次提取脱脂粉中的芥子酶,离心,取上层混悬液体,合并,于合并混悬液中加入400 mL 丙酮(3.2)沉淀芥子酶,弃去上清液,用丙酮(3.2)洗沉淀5次,离心,真空干燥下层沉淀物,研磨成粉状,装入密闭容器中,低温保存备用,此制剂应不含异硫氰酸酯。

3.6 丁基异硫氰酸酯内标溶液:配制0.100 mg/mL 丁基异硫氰酸酯[$CH_3(CH_2)_3NCS$]二氯甲烷或氯仿(3.1)溶液,贮于4℃,如试样中异硫氰酸酯含量较低,可将上述溶液稀释,使内标丁基异硫氰酸酯峰面积和试样中异硫氰酸酯峰面积相接近。

4 仪器、设备

4.1 气相色谱仪:具有氢焰检测器。

4.2 氮气钢瓶:其中氮气纯度为99.99%。

4.3 微量注射器:5 μ L。

4.4 分析天平:感量0.000 1 g。

国家技术监督局 1991-07-16 批准

1992-04-01 实施

- 4.5 实验室用样品粉碎机。
 4.6 振荡器(往复,200次/min)。
 4.7 具塞锥形瓶,25 mL。
 4.8 离心机。
 4.9 离心试管:10 mL。

5 试样制备

采集具有代表性的配合饲料样品,至少2 kg,四分法缩分至约250 g,磨碎,过1 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器,防止试样变质,低温保存备用。

6 测定步骤

6.1 试样的酶解

称取约2.2 g 试样于具塞锥形瓶(4.7)中,精确到0.001 g,加入5 mL pH7缓冲液(3.3),30 mg 酶制剂(3.5),10 mL 丁基异硫氰酸酯内标溶液(3.6),用振荡器(4.6)振荡2 h,将具塞锥形瓶(4.7)中内容物转入离心试管(4.9)中,离心机(4.8)离心,用滴管吸取少量离心试管(4.9)下层有机相溶液,通过铺有少量无水硫酸钠(3.4)层和脱脂棉的漏斗过滤,得澄清滤液备用。

6.2 色谱条件

- 6.2.1 色谱柱:玻璃,内径3 mm,长2 m。
 6.2.2 固定液:20%FFAP(或其他效果相同的固定液)。
 6.2.3 载体:Chromosorb W,HP,80~100目(或其他效果相同的载体)。
 6.2.4 柱温:100℃。
 6.2.5 进样口及检测器温度:150℃。
 6.2.6 载气(氮气)流速:65 mL/min。

6.3 测定

用微量注射器(4.3)吸取1~2 μL 上述澄清滤液,注入色谱仪,测量各异硫氰酸酯峰面积。

7 测定结果

7.1 计算公式

$$\begin{aligned}
 X &= \frac{m_e}{115.19 \times S_e \times m} [(4/3 \times 99.15 \times S_a) + (4/4 \times 113.18 \times S_b) \\
 &\quad + (4/5 \times 127.21 \times S_p)] \times 1000 \\
 &= \frac{m_e}{S_e \times m} (1.15S_a + 0.98S_b + 0.88S_p) \times 1000 \quad \dots\dots\dots(1)
 \end{aligned}$$

式中: X —— 试样中异硫氰酸酯的含量,mg/kg;

m —— 试样质量,g;

m_e —— 10mL 丁基异硫氰酸酯内标溶液中丁基异硫氰酸酯的质量,mg;

S_e —— 丁基异硫氰酸酯的峰面积;

S_a —— 丙烯基异硫氰酸酯的峰面积;

S_b —— 丁烯基异硫氰酸酯的峰面积;

S_p —— 戊烯基异硫氰酸酯的峰面积。

7.2 结果表示

每个试样取2个平行样进行测定,以其算术平均值为结果。结果表示到1 mg/kg。

7.3 重复性

同一分析者对同一试样同时或快速连续地进行两次测定,所得结果之间的差值;

在异硫氰酸酯含量小于或等于100 mg/kg时,不超过平均值的15%。

在异硫氰酸酯含量大于100 mg/kg时,不超过平均值的10%。

第二篇 银量法

8 原理

菜籽饼粕中存在的硫葡萄糖苷,在芥子酶作用下可生成相应的异硫氰酸酯。用水气蒸出后再用硝酸银-氢氧化铵溶液吸收而生成相应的衍生硫脲。过量的硝酸银在酸性条件下以硫酸铁铵为指示剂用硫氰酸铵回滴,再计算出异硫氰酸酯的含量。

9 试剂和溶液

除特殊规定外,本标准所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

9.1 乙醇(GB 679):95%(V/V)。

9.2 去泡剂:正辛醇($C_8H_{17}OH$)。

9.3 6 mol/L 硝酸溶液:量取195 mL 浓硝酸(GB 626),加水稀释至500 mL。

9.4 10%氢氧化铵溶液:取氨水(30%,GB 631)100 mL,加200 mL 水混匀。

9.5 硫酸铁铵溶液:称取100 g 硫酸铁铵 $[NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$ (GB 1279),溶于500 mL 水中。

9.6 0.1 mol/L 硝酸银标准溶液:准确称取在硫酸干燥器中干燥至恒重的基准硝酸银16.987 g,用水溶解后加水定容至1 000 mL。置棕色瓶中避光保存。

9.7 0.1 mol/L 硫氰酸铵标准贮备液:称取7.6 g 硫氰酸铵(NH_4CNS ,GB 660),溶于1 000 mL 水中。按下法标定:准确量取10.00 mL 0.1 mol/L 硝酸银标准溶液(9.6),加1 mL 硫酸铁铵(9.5)指示剂和2.5 mL 6 mol/L 硝酸(9.3),摇动下用0.1 mol/L 硫氰酸铵标准贮备液滴定,终点前摇动溶液至完全清亮后,继续滴定至溶液所呈淡棕色保持30 s。

硫氰酸铵标准贮备液的摩尔浓度按式(2)计算:

$$N = \frac{N_1 \cdot V_1}{V} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中: N —— 硫氰酸铵标准贮备液摩尔浓度, mol/L;

N_1 —— 硝酸银标准溶液摩尔浓度, mol/L;

V_1 —— 硝酸银标准溶液的用量, mL;

V —— 消耗硫氰酸铵标准贮备液的体积, mL。

9.8 0.01 mol/L 硫氰酸铵标准工作液:临用前将0.1 mol/L 硫氰酸铵标准贮备液(9.7)用水稀释10倍,摇匀。

9.9 pH4缓冲液:称取42 g 柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$),溶于1 L 水中,用浓氢氧化钠溶液调节 pH 至4。

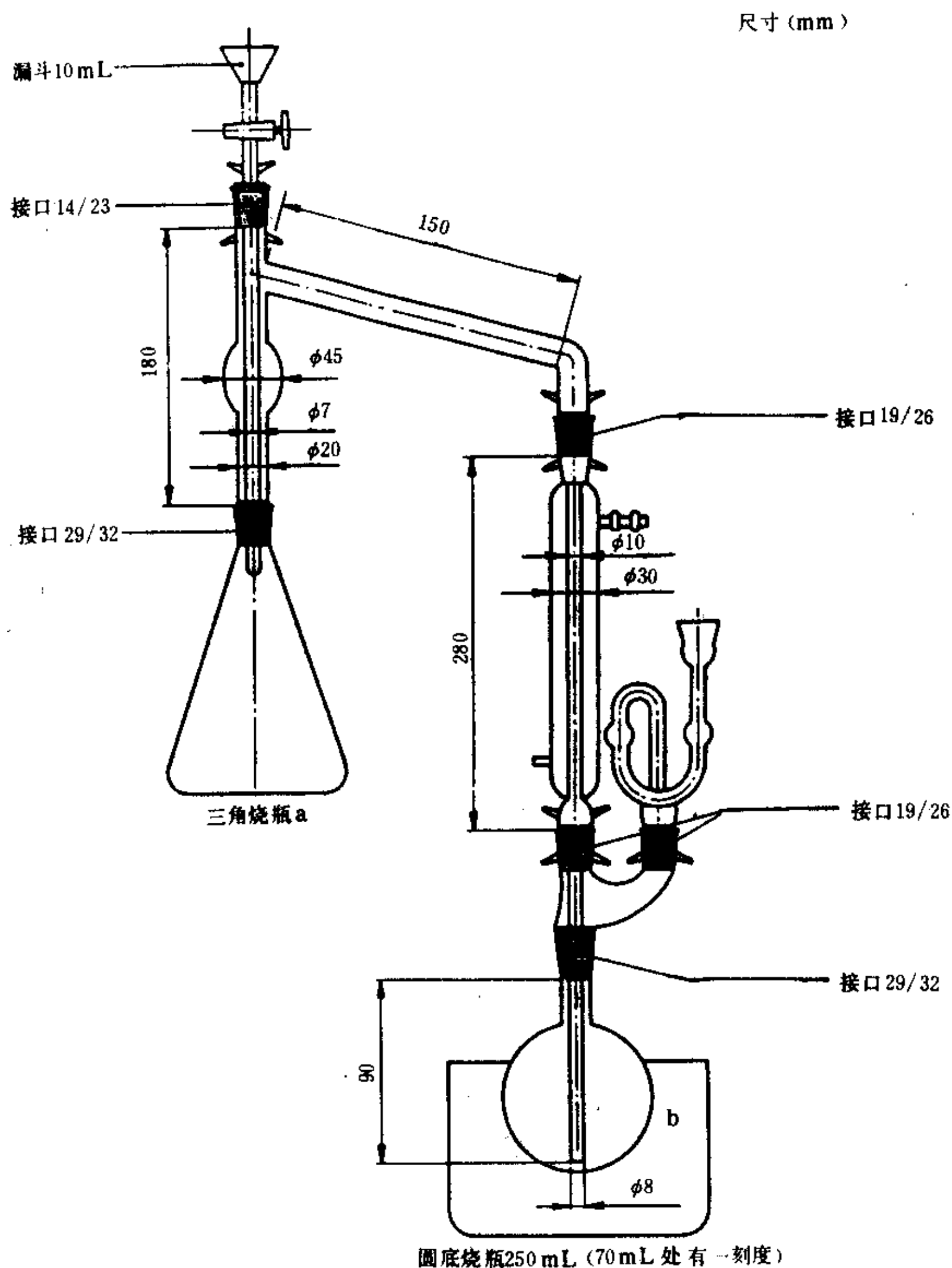
9.10 粗酶制剂:取白芥(*Sinapis alba* L.)种子(72 h 内发芽率必须大于85%,保存期不得超过两年),粉碎后用冷石油醚(沸程40~60℃)或正己烷脱脂,使脂肪含量不大于2%,然后再粉碎一次使全部通过0.28 mm 筛,放4℃冰箱可使用6周。

10 仪器、设备

10.1 分析天平:感量0.000 1 g。

10.2 恒温箱:温度范围30~60℃,精度±1℃;

10.3 异硫氰酸酯蒸馏装置：见下图，其中 a 为 500 mL 三角烧瓶（具塞），b 为 250 mL 圆底烧瓶（在 70 mL 处有一刻度）。



异硫氰酸酯蒸馏装置图

- 10.4 冰水浴。
- 10.5 沸水浴。
- 10.6 三角烧瓶：100、500（具塞）mL。
- 10.7 容量瓶：100 mL。
- 10.8 移液管：10、25 mL。
- 10.9 吸量管：5、10 mL。
- 10.10 半自动滴定管：5 mL，最小分度为 0.02 mL。
- 10.11 滤纸。
- 10.12 回流冷凝器，可与瓶 b 相配。

11 试样制备

采集具有代表性的样品至少250 g,四分法缩分至50 g。若样品含脂率大于5%时需要事先脱脂,测定脂肪含量;若含脂率小于5%时,则进一步磨碎使其80%能通过0.28 mm(40目)筛,混匀,装入密闭容器中,置-15℃保存备用。

12 测定步骤

12.1 称取试样2.2 g于事先烘烤并精确称重至0.001 g的烧杯中,103±2℃烘烤至少8 h,在干燥器中冷却至室温后精确称重至0.001 g。

12.2 试样的酶解

将上述烘烤过的试样全部转移至500 mL三角烧瓶a中,加入100 mL pH4缓冲液(9.9),同时加入0.5 g粗酶制剂(9.10)。另取1个500 mL三角烧瓶(10.6)加入100 mL pH4缓冲液(9.9)和0.5 g粗酶制剂(9.10),将三角烧瓶塞好塞子,置40℃恒温箱(10.2)中保温3 h,中间不时轻摇几次。

12.3 蒸馏接收瓶准备

准确量取10.00 mL硝酸银标准溶液(9.6)至250 mL圆底烧瓶b中,并加入2.5 mL氢氧化铵溶液(9.4)。将此瓶b与蒸馏装置(10.3)相连并置于冰水浴(10.4)中,冷凝器(10.12)末端必须没于硝酸银-氢氧化铵液中。

12.4 蒸馏

将盛试样的三角烧瓶a冷至室温,加入几粒玻璃珠和几滴去泡剂(9.2),然后与蒸馏装置(10.3)相连,从上面漏斗中加入10 mL 95%乙醇(9.1),另加3 mL乙醇(9.1)于接收瓶上的安全管中。缓慢加热蒸馏,至馏出液达到接收瓶b 70 mL刻度处。

12.5 试样测定

取下接收瓶b,将安全管中的乙醇(9.1)倒入此瓶中,将它与回流冷凝器(10.12)连接,于沸水中加热瓶中内容物30 min,然后取下冷却至室温。将内容物定量地转至100 mL容量瓶(10.7)中,用水洗接收瓶b 2~3次,用水稀释至刻度,摇匀后过滤于100 mL三角烧瓶(10.6)中,用移液管(10.8)取25 mL滤液于另一100 mL三角烧瓶(10.6)中,加1 mL 6 mol/L硝酸(9.3)和0.5 mL硫酸铁铵指示剂(9.5),用0.01 mol/L硫氰酸铵标准工作液(9.8)滴定过量的硝酸银,直到稳定的淡红色出现为终点。

12.6 空白测定

按同样测定步骤操作,但不加试样,得到空白测定值。

13 测定结果

13.1 计算公式

$$X = \frac{4 \times (V_1 - V_2) \times c \times 56.59}{m} = \frac{c(V_1 - V_2)}{m} \times 226.36 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中: X —— 试样中异硫氰酸酯的含量,以每克绝干样中丁基异硫氰酸酯的毫克数表示;

V_1 —— 空白测定所耗硫氰酸铵标准工作液的体积, mL;

V_2 —— 试样测定所耗硫氰酸铵标准工作液的体积, mL;

c —— 硫氰酸铵标准工作液的浓度, mol/L;

m —— 试样的绝干质量, g。

13.2 结果表示

每个试样取2个平行样进行测定,以其算术平均值为结果。

结果表示到0.01 mg/g。

13.3 重复性

同一分析者对同一试样同时或快速连续地进行两次测定,所得结果之间的差值:

在异硫氰酸酯含量小于或等于0.50 mg/g 时,不得超过平均值的20%;

在异硫氰酸酯含量大于0.50 mg/g 而小于1.00 mg/g 时,不得超过平均值的15%;

在异硫氰酸酯含量等于或大于1.00 mg/g 时,不得超过平均值的10%。

附加说明:

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准由中国农业科学院畜牧研究所负责起草。

本标准主要起草人汪徽、雷祖玉、冯学勤、李建凡、姜云侠、高振川。