

中华人民共和国国家标准

GB/T 15400—2018
代替 GB/T 15400—1994

饲料中色氨酸的测定

Determination of tryptophan in feeds

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施



国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 15400—1994《饲料中色氨酸的测定 分光光度法》。

本标准与 GB/T 15400—1994 相比,除编辑性修改外,主要技术内容的变化:

- 增加了高效液相色谱法,修改了适用对象,增加了两个方法的定量限(见第 1 章,1994 年版的第 1 章)。
- 修改了分光光度法原理的表述(见 4.1,1994 年版的第 3 章)。
- 修改了精密度的表述(见 4.7,1994 年版的 8.3)。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]、通威股份有限公司。

本标准主要起草人:李兰、贾铮、赵艳、赵根龙、宋军、张凤桦。

本标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 15400—1994。

饲料中色氨酸的测定

1 范围

本标准规定了饲料中色氨酸含量测定的高效液相色谱法和分光光度法。

本标准适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中色氨酸的测定。

高效液相色谱法的定量限为 0.02%；当试样最大称样量为 700 mg，水解液稀释倍数为 25 倍时，分光光度法的定量限为 0.04%。

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。凡是注日期的引用文件，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 6433 饲料中粗脂肪的测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 高效液相色谱法(仲裁法)

3.1 原理

试样中的色氨酸经氢氧化锂溶液水解，用高效液相色谱法分离，紫外或荧光检测器检测，外标法定量。

3.2 试剂或材料

除特殊注明外，本标准所用试剂均为分析纯。

3.2.1 水：符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

3.2.2 甲醇：色谱纯。

3.2.3 氢氧化钾溶液(0.1 mol/L)：称取 0.56 g 氢氧化钾，溶解于 100 mL 水中，即得。

3.2.4 氢氧化锂溶液(4 mol/L)：称取 83.9 g 氢氧化锂，溶解于 500 mL 水中，即得。

3.2.5 乙酸钠缓冲溶液(0.008 5 mol/L Na^+ , pH=4.5)：称取 0.70 g 无水乙酸钠，溶解于 1 000 mL 水中，用冰乙酸调节 pH 为 4.5。

3.2.6 流动相：乙酸钠缓冲溶液(3.2.5)+甲醇(3.2.2)= 95+5。

3.2.7 L-色氨酸标准储备溶液：准确称取 25 mg(精确到 0.000 1 g) 色氨酸对照品(纯度大于 99%)，置于 25 mL 烧杯中，用滴管滴加氢氧化钾溶液(3.2.3)使其溶解，将其定量地转移至 250 mL 棕色容量瓶中，用水定容，浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期为 1 个月。

3.2.8 L-色氨酸标准系列溶液：准确移取 L-色氨酸标准储备溶液(3.2.7) 5.00 mL、7.50 mL、10.00 mL、12.50 mL、15.00 mL、17.50 mL 分别置于 25 mL 棕色容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。其溶液浓度分别为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期为 2 周。

3.3 仪器设备

- 3.3.1 天平:感量 0.000 1 g、感量 0.001 g。
- 3.3.2 聚四氟乙烯水解管:配衬管和密封垫。
- 3.3.3 恒温干燥箱:可达到 110 °C ± 2 °C。
- 3.3.4 离心机:转速不低于 4 000 r/min。
- 3.3.5 高效液相色谱仪:配紫外检测器或者荧光检测器。

3.4 样品

按 GB/T 14699.1 的规定,抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按 GB/T 20195 制备试样,磨碎,全部通过 0.25 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,备用。取适量试样,按照 GB/T 6433 测定试样脂肪含量。

3.5 试验步骤

3.5.1 脂肪含量小于 4% 的试样

平行做两份试验。称取未脱脂试样 50 mg ~ 100 mg(精确至 0.000 1 g),置于聚四氟乙烯水解管(3.3.2)衬管中,加 1.5 mL 氢氧化锂溶液(3.2.4),充氮 1 min,旋紧密封盖后放入 110 °C ± 2 °C 恒温干燥箱(3.3.3)中,水解 20 h。取出水解管,冷却至室温,用乙酸钠缓冲溶液(3.2.5)将水解液定量地转移至 25 mL 容量瓶中,并用上述缓冲溶液定容,离心或者过 0.45 μm 滤膜后上液相色谱仪测定。

3.5.2 脂肪含量大于 4% 的试样

称取脱脂后的试样,按照 3.5.1 步骤进行水解。

3.5.3 参考色谱条件

- 色谱柱: C₁₈, 长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒度 5 μm, 或性能相当者。
- 流动相: 见 3.2.6。
- 流速: 1.0 mL/min。
- 柱温: 室温。
- 进样体积: 10 μL ~ 20 μL。
- 检测器: 紫外或二极管矩阵检测器, 检测波长 280 nm。
- 荧光检测器, 激发波长: 283 nm; 发射波长: 343 nm。

3.5.4 测定

按上述规定的色谱条件平衡色谱柱,向色谱柱注入相应的色氨酸标准系列溶液(3.2.8)和试样溶液(3.5.1 或 3.5.2),以保留时间定性;在线性范围内,用外标法单点校正定量。色氨酸标准溶液色谱图参见附录 A 中图 A.1。

3.6 试验数据处理

3.6.1 未脱脂试样中的色氨酸含量以质量分数 w_1 计,数值以克每 100 克表示,按式(1)计算:

$$w_1 = \frac{A_i \times V \times \rho \times V_{st}}{A_{st} \times m \times V_i} \times 10^{-4} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A_i —— 试样溶液峰面积值;

V —— 试样稀释体积,单位为毫升(mL);

ρ —— 色氨酸对照品溶液的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_{st} —— 色氨酸对照品溶液进样体积,单位为微升(μL);

A_{st} —— 色氨酸对照品溶液峰面积平均值;

m —— 试样质量,单位为克(g);

V_i —— 试样溶液进样体积,单位为微升(μL)。

3.6.2 脱脂试样中的色氨酸含量以质量分数 w_2 计,数值以克每 100 克表示,按式(2)计算:

$$w_2 = \frac{A_i \times V \times \rho \times V_{st}}{A_{st} \times m \times V_i} \times (1 - F) \times 10^{-4} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

F —— 脂肪含量, %。

式中其他参数同式(1)解释。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留两位小数。

3.7 精密度

在重复性条件下,当试样中色氨酸含量小于 0.1% 时,两次独立测定结果的绝对差值应不大于 0.01%。当试样中色氨酸含量在 0.1% ~ 0.5% 时,两次独立测定结果与其平均值的绝对差值,应不大于该平均值的 3%。当试样中色氨酸含量大于 0.5% 时,两次独立测定结果与其平均值的绝对差值,应不大于该平均值的 2%。

4 分光光度法

4.1 原理

饲料中蛋白质经碱水解后,降解成多肽和游离的氨基酸。在硫酸介质中,氧化剂亚硝酸钠存在下,色氨酸与对二甲氨基苯甲醛缩合反应生成蓝色化合物,其吸光度在一定范围内与色氨酸含量成正比。

4.2 试剂或材料

除特殊注明外,本标准所用试剂均为分析纯。

4.2.1 水:符合 GB/T 6682 中二级水的规定。

4.2.2 氢氧化钾溶液(10%):称取 100 g 氢氧化钾,溶解于 1 000 mL 水中,即得。

4.2.3 硫酸溶液(21.2 mol/L):量取 589 mL 硫酸,缓慢加入约 350 mL 水中,冷却后用水稀释至 1 L。

4.2.4 对二甲氨基苯甲醛溶液:称取 1.0 g 对二甲氨基苯甲醛溶于硫酸(4.2.3)中并定容至 100 mL,临用现配。

4.2.5 亚硝酸钠溶液(0.2%):称取 0.1 g 亚硝酸钠,溶解于 50 mL 水中,临用时制备。

4.2.6 L-色氨酸标准储备溶液:同 3.2.7。

4.2.7 L-色氨酸标准系列溶液:同 3.2.8。

4.3 仪器设备

4.3.1 天平:同 3.3.1。

4.3.2 培养箱:40 °C ± 2 °C。

4.3.3 离心机:同 3.3.4。

4.3.4 分光光度计,配 1 cm 比色皿。

4.4 样品

同 3.4。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样的水解

4.5.1.1 脂肪含量小于 4%的试样

平行做两份试验。参考附录 B 中表 B.1 的称样量,称取试样 0.16 g ~ 0.7 g(精确至 0.000 1 g)于 50 mL 容量瓶中,在轻轻振摇中缓慢加入 25 mL 氢氧化钾溶液(4.2.2),使试样湿润且不粘壁,置于培养箱(4.3.2)中水解 16 h ~ 18 h。取出水解液冷却至室温,用水定容至刻度,摇匀。取部分水解液以 4 000 r/min 转速离心 15 min,备用。

4.5.1.2 脂肪含量大于 4%的试样

称取脱脂后的试样,按照 4.5.1.1 步骤进行水解。

4.5.2 显色反应

4.5.2.1 L-色氨酸标准系列溶液的显色

精密移取水和 L-色氨酸标准系列溶液(4.2.7)各浓度溶液 1 mL,分别置于 10 mL 具塞试管中,水为试剂空白。向每支试管内加入氢氧化钾溶液(4.2.2)1 mL,混匀。将试管放入冷水盆中,加 5 mL 对二甲氨基苯甲醛溶液(4.2.4),从冷水盆中取出试管摇匀,在 20 °C ~ 30 °C 放置 30 min。向每支试管内加入 0.2 mL 亚硝酸钠溶液(4.2.5),摇匀,放置 25 min。

4.5.2.2 试样溶液的显色

取 2 mL 试样溶液(4.5.1.1 或 4.5.1.2)置于 10 mL 具塞试管中,并将试管放入冷水盆中,加 5 mL 对二甲氨基苯甲醛溶液(4.2.4),从冷水盆中取出试管,摇匀。再从每个试样溶液中另取 2 mL 置于 10 mL 具塞试管中,加 5 mL 硫酸溶液(4.2.3)作为样品空白,摇匀。从冷水盆中取出试管,在 20 °C ~ 30 °C 下放置 30 min。向每支试管内加入 0.2 mL 亚硝酸钠溶液(4.2.5),摇匀,放置 25 min。

4.5.3 比色测定

以试剂空白调零,在 590 nm 波长处测定色氨酸标准系列溶液的吸光度值。以色氨酸浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制工作曲线,列出回归方程。

同时测定样品空白和试样溶液的吸光度值。

4.6 试验数据处理

4.6.1 未脱脂试样中 L-色氨酸的含量以质量分数 w_3 计,数值以克每 100 克表示,按式(3)计算:

$$w_3 = \frac{\rho \times 25}{m \times 10^4} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

式中:

ρ ——以试样溶液吸光度值与样品空白吸光度值之差从工作曲线上查得的色氨酸含量,单位为微克(μg);

25 —— 试样稀释倍数；

m —— 试样质量,单位为克(g)。

4.6.2 脱脂试样中 L-色氨酸的含量以质量分数 w_4 计,数值以克每 100 克表示,按式(4)计算:

$$w_4 = \frac{\rho \times 25 \times (1 - F)}{m \times 10^4} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

F —— 脂肪含量, %。

式中其他参数同 4.6.1 解释。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留两位小数。

注: 试样脂肪含量小于 4% 时,式(3)和式(4)所得结果在允许偏差之内。

4.7 精密度

在重复性条件下,当试样中色氨酸含量小于 0.1% 时,两次独立测定结果的绝对差值应不大于 0.01%。当试样中色氨酸含量在 0.1% ~ 0.5% 时,两次独立测定结果与其平均值的绝对差值,应不大于该平均值的 3%。当试样中色氨酸含量大于 0.5% 时,两次独立测定结果与其平均值的绝对差值,应不大于该平均值的 2%。

附录 A
(资料性附录)
色氨酸标准溶液色谱图

色氨酸标准溶液色谱图见图 A.1。

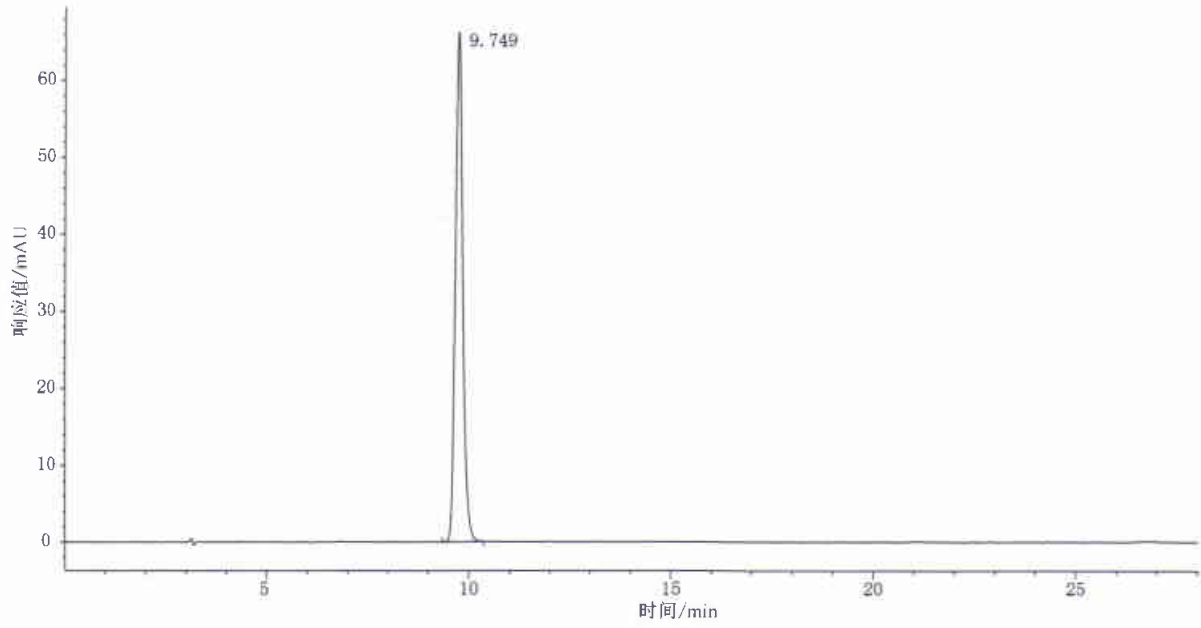


图 A.1 色氨酸标准溶液(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
参考称样量

根据样品蛋白质、色氨酸含量确定称样量,经试验研究建议不同饲料称样量见表 B.1。

表 B.1 参考称样量

蛋白质含量/%	饲料种类等	称样量/mg
≤10	高粱、玉米等	650~700
11~20	小麦、大麦、糠麸、糠饼、配合饲料、各种叶粉、精料补充料等	450~500
21~30	干酒糟、干粉渣、豆腐渣、杂豆、糟渣类等	350~400
31~40	棉仁饼、菜籽饼、蓖麻饼、向日葵饼、浓缩料等	200~250
41~50	虾粉、豆饼、芝麻饼、酵母、豆粕、花生饼、国产鱼粉	180~200
>50	鱼粉、血粉、肉骨粉、蚕蛹、羽毛粉等	160~180

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中色氨酸的测定
GB/T 15400—2018

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

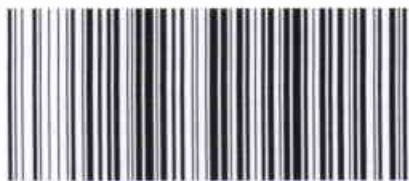
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2018年9月第一版 2018年9月第一次印刷

*

书号: 155066·1-61397 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 15400—2018