

## 前 言

本标准是根据 FAO/WHO(联合国粮食及农业组织和世界卫生组织)植物蛋白评价组专家联席会的推荐,在 GB/T 15399—1994《饲料中含硫氨基酸测定方法 离子交换色谱法》、GB/T 15400—1994《饲料中色氨酸测定方法 分光光度法》国家标准和 NY/T 56—1987(原 GB 7649—1987)《谷物籽粒氨基酸测定的前处理方法》行业标准的基础上,充分吸纳国内外有关研究的最新成果和两次参加国际大型氨基酸实验室间联合试验研究的经验与结果制定的。

本标准的酸水解部分和国际公职分析化学家协会(AOAC International)的最新方法《饲料氨基酸测定方法》具有相同的构架,但补充了碱解色氨酸的离子交换色谱和高效液相色谱法,增加了酸提取添加氨基酸的测定。

本标准对饲料氨基酸不同水解、测定方法的适应场合与局限性做了全面综合、归纳和阐述,改进了有关国家标准的有如样品量、粒度和蒸发去酸温度等实验条件。但是,考虑我国具体情况,本标准未像 AOAC 法那样采用内标法,而采用了外标法;在酸解法中,除以偏重亚硫酸钠做终止剂的氧化酸解法外,其他水解法也未采用 AOAC 和欧共体标准通用的回流水解法,而采用了真空封管水解法。在碱解法中,未用 AOAC 的氢氧化钠做碱解剂,而是沿用了 NY/T 57—1987(原 GB 7650—1987)《谷物籽粒色氨酸测定法》中的碱解剂——氢氧化锂,这也是与德国等国家的做法相一致的。

本标准达到了与 AOAC 等方法同样的准确度和精密度。

在具体应用中,一般可用常规直接水解法测定除色氨酸和含硫氨基酸(胱氨酸和蛋氨酸)以外的蛋白水解氨基酸,用氧化酸解法测定含硫氨基酸,而用碱解法测定色氨酸。但使用者可根据自己的测定目的,在本标准不同方法中组合、择用。

本标准的附录 A 是标准的附录。

本标准由农业部和全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位:国家饲料产品质量监督检验中心(北京)。

本标准参加起草单位:中国农业科学院畜牧研究所、吉林省农业科学院大豆研究所和农业部谷物质量检测中心。

本标准起草人:常碧影、张瑜、阎惠文、张明、梁维英、李静梅。

# 中华人民共和国国家标准

## 饲料中氨基酸的测定

GB/T 18246—2000

Determination of amino acids in feeds

### 1 范围

本标准规定了饲料中氨基酸的测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料、单一饲料和预混料中氨基酸总量和添加游离氨基酸的测定。

酸、碱水解法适于含动、植物蛋白的单一饲料、配合饲料、浓缩饲料和预混料中氨基酸总量的测定。酸水解法不能测定色氨酸,其中常规水解法适于测定除含硫氨基酸(胱氨酸和蛋氨酸等)以外的蛋白水解氨基酸;氧化水解法在以偏重亚硫酸钠为氧化终止剂时,适于测定除酪氨酸以外的蛋白水解氨基酸,在以氢溴酸为终止剂时,适于测定除酪氨酸、苯丙氨酸和组氨酸以外的蛋白水解氨基酸。碱水解法只适于色氨酸的测定。

酸提取法适于配合饲料、预混料和浓缩饲料中添加氨基酸,主要是赖氨酸、蛋氨酸含量的测定,也可用于苏氨酸等其他添加(游离)氨基酸含量的测定。

### 2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 6432—1994 饲料中粗蛋白测定方法(eqv ISO 5983:1979)

GB/T 6433—1994 饲料粗脂肪测定方法(eqv ISO 5983:1979)

GB/T 15399—1994 饲料中含硫氨基酸测定方法 离子交换色谱法

### 3 方法原理

#### 3.1 酸水解法

常规(直接)水解法是使饲料蛋白在 110℃、 $c(\text{HCl})=6 \text{ mol/L}$  盐酸作用下,水解成单一氨基酸,再经离子交换色谱法分离并以茚三酮做柱后衍生测定。水解中,色氨酸全部破坏,不能测量。胱氨酸和蛋氨酸部分氧化,不能测准。氧化水解法是将饲料蛋白中的含硫氨基酸(胱氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸等)用过甲酸氧化,然后进行酸解,再经离子交换色谱分离、测定(详见 GB/T 15399)。水解中色氨酸破坏,不能测定。酪氨酸在以偏重亚硫酸钠做氧化终止剂时,被氧化,不能测准。酪氨酸、苯丙氨酸和组氨酸则在以氢溴酸作终止剂时被氧化,不能测准。

#### 3.2 碱水解法

饲料蛋白在 110℃、碱的作用下水解,水解出的色氨酸可用离子交换色谱或高效反相色谱(见附录 A)分离、测定。

#### 3.3 酸提取法

饲料中添加的氨基酸以稀盐酸提取,再经离子交换色谱分离、测定。

国家质量技术监督局 2000-10-24 批准

2001-04-01 实施

## 4 试剂和材料

除特别注明者外,所有试剂均为分析纯,水为去离子水,电导率小于 1 S/m。

### 4.1 酸水解法

#### 4.1.1 常规水解

4.1.1.1 酸解剂——盐酸溶液,  $c(\text{HCl})=6 \text{ mol/L}$ :将优级纯盐酸与水等体积混合。

4.1.1.2 液氮或干冰-乙醇(丙酮)。

4.1.1.3 稀释上机用柠檬酸钠缓冲液,  $\text{pH}2.2$ ,  $c(\text{Na}^+)=0.2 \text{ mol/L}$ :称取柠檬酸三钠 19.6 g,用水溶解后加入优级纯盐酸 16.5 mL,硫二甘醇 5.0 mL,苯酚 1 g,加水定容至 1 000 mL,摇匀,用 G4 垂熔玻璃砂芯漏斗过滤,备用。

4.1.1.4 不同 pH 和离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液:按仪器说明书配制。

4.1.1.5 茚三酮溶液:按仪器说明书配制。

4.1.1.6 氨基酸混合标准储备液:含 L-天门冬氨酸、L-苏氨酸等 17 种常规蛋白水解液分析用层析纯氨基酸,各组分浓度  $c(\text{氨基酸})=2.50(\text{或 } 2.00) \mu\text{mol/mL}$ 。

4.1.1.7 混合氨基酸标准工作液:吸取一定量的氨基酸混合标准储备液(4.1.1.6)置于 50 mL 容量瓶中,以稀释上机用柠檬酸钠缓冲液(4.1.1.3)定容,混匀,使各氨基酸组分浓度  $c(\text{氨基酸})=100 \text{ nmol/mL}$ 。

#### 4.1.2 氧化水解

按 GB/T 15399—1994 中 7.1 氧化水解步骤操作。

### 4.2 碱水解法

4.2.1 碱解剂——氢氧化锂溶液  $c(\text{LiOH})=4 \text{ mol/L}$ :称取一水合氢氧化锂 167.8 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL,使用前取适量超声或通氮脱气。

4.2.2 液氮或干冰-乙醇(丙酮)。

4.2.3 盐酸溶液,  $c(\text{HCl})=6 \text{ mol/L}$ :配制方法同 4.1.1.1。

4.2.4 稀释上机用柠檬酸钠缓冲液,  $\text{pH}4.3$ ,  $c(\text{Na}^+)=0.2 \text{ mol/L}$ :称取柠檬酸三钠 14.71 g、氯化钠 2.92 g 和柠檬酸 10.50 g,溶于 500 mL 水,加入硫二甘醇 5 mL 和辛酸 0.1 mL,最后定容至 1 000 mL。

4.2.5 不同 pH 和离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液与茚三酮溶液:按仪器说明书配制。

4.2.6 L-色氨酸标准储备液:准确称取层析纯 L-色氨酸 102.0 mg,加少许水和数滴 0.1 mol/L 氢氧化钠,使之溶解,定量地转移至 100 mL 容量瓶中,加水至刻度。  $c(\text{色氨酸})=5.00 \mu\text{mol/mL}$ 。

4.2.7 氨基酸混合标准储备液:同 4.1.1.6。

4.2.8 混合氨基酸标准工作液:准确吸取 2.00 mL L-色氨酸标准储备液和适量的氨基酸混合标准储备液,置于 50 mL 容量瓶中并用  $\text{pH}4.3$  稀释上机用柠檬酸钠缓冲液(4.2.4)定容。该液色氨酸浓度为 200 nmol/mL,而其他氨基酸浓度为 100 nmol/mL。

### 4.3 酸提取法

4.3.1 提取剂——盐酸溶液,  $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ :取 8.3 mL 优级纯盐酸,用水定容至 1 000 mL,混匀。

4.3.2 不同 pH 和离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液:按仪器说明书配制。

4.3.3 茚三酮溶液:按仪器说明书配制。

4.3.4 蛋氨酸、赖氨酸和苏氨酸标准储备液:于三只 100 mL 烧杯中,分别称取蛋氨酸 93.3 mg、赖氨酸盐酸盐 114.2 mg 和苏氨酸 74.4 mg,加水约 50 mL 和数滴盐酸溶解,定量地转移至各自的 250 mL 容量瓶中,并用水定容。该液各氨基酸浓度  $c(\text{氨基酸})=2.50 \mu\text{mol/mL}$ 。

4.3.5 混合氨基酸标准工作液:分别吸取蛋氨酸、赖氨酸和苏氨酸标准储备液各 1.00 mL 于同一 25 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度。该液各氨基酸的浓度  $c(\text{氨基酸})=100 \text{ nmol/mL}$ 。

## 5 仪器、设备

- 5.1 实验室用样品粉碎机。
- 5.2 样品筛:孔径 0.25 mm。
- 5.3 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 5.4 真空泵与真空规。
- 5.5 喷灯或熔焊机。
- 5.6 恒温箱或水解炉。
- 5.7 旋转蒸发器或浓缩器:可在室温至 65℃ 间调温,控温精度  $\pm 1^\circ\text{C}$ ,真空度可低至  $3.3 \times 10^3 \text{ Pa}$  (25 mm 汞柱)。
- 5.8 氨基酸自动分析仪:茚三酮柱后衍生离子交换色谱仪,要求各氨基酸的分辨率大于 90%。

## 6 样品

取具代表性的饲料样品,用四分法缩减分取 25 g 左右,粉碎并过 0.25 mm 孔径(60 目)筛,充分混匀后装入磨口瓶中备用。

酸水解样品按 GB/T 6432 测定蛋白质含量。

碱水解样品,按 GB/T 6433 测定粗脂肪含量。对于粗脂肪含量大于、等于 5% 的样品,需将脱脂后的样品风干、混匀,装入密闭容器中备用。而对粗脂肪小于 5% 的样品,则可直接称用未脱脂样品。

## 7 分析步骤

### 7.1 样品前处理

#### 7.1.1 酸水解法

7.1.1.1 常规水解法:称取含蛋白 7.5~25 mg 的试样(约 50~100 mg,准确至 0.1 mg)于 20 mL 安瓿中,加 10.00 mL 酸解剂(4.1.1.1),置液氮或干冰(丙酮)中冷冻,然后,抽真空至 7 Pa ( $\leq 5 \times 10^{-2}$  mm 汞柱)后封口。将水解管放在  $(110 \pm 1)^\circ\text{C}$  恒温干燥箱中,水解 22~24 h。冷却,混匀,开管,过滤,用移液管吸取适量的滤液,置旋转蒸发器或浓缩器中,  $60^\circ\text{C}$  抽真空,蒸发至干,必要时,加少许水,重复蒸干 1~2 次。加入 3~5 mL pH2.2 稀释上机用柠檬酸钠缓冲液(4.1.1.3),使样液中氨基酸浓度达 50~250 nmol/mL,摇匀,过滤或离心,取上清液上机测定。

7.1.1.2 氧化水解法:按 GB/T 15399—1994 中 7.1 规定操作。

7.1.2 碱水解法:称取 50~100 mg 的饲料试样(准确至 0.1 mg),置于聚四氟乙烯衬管中,加 1.50 mL 碱解剂(4.2.1),于液氮或干冰乙醇(丙酮)中(4.2.2)冷冻,而后将衬管插入水解玻管,抽真空至 7 Pa ( $\leq 5 \times 10^{-2}$  mm 汞柱),或充氮(至少 5 min),封管。然后,将水解管放入  $(110 \pm 1)^\circ\text{C}$  恒温干燥箱,水解 20 h。取出水解管,冷至室温,开管,用稀释上机用柠檬酸钠缓冲液(4.2.4)将水解液定量地转移到 10 mL 或 25 mL 容量瓶中,加入盐酸溶液(4.2.3)约 1.00 mL 中和,并用上述缓冲液定容。离心或用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,取清液贮于冰箱中,供上机测定使用。

7.1.3 酸提取法:称取 1~2 g 饲料试样(蛋氨酸含量  $\leq 4 \text{ mg}$ ,赖氨酸可略高),加 0.1 mol/L 盐酸提取剂(4.3.1)30 mL,搅拌提取 15 min,沉放片刻,将上清液过滤到 100 mL 容量瓶中,残渣加水 25 mL,搅拌 3 min,重复提取两次,再将上清液过滤到上述容量瓶中,用水冲洗提取瓶和滤纸上的残渣,并定容。摇匀,清液供上机测定。若试样提取过程中,过滤太慢,也可离心 10 min(4 000 r/min)。测定赖氨酸时,预混料和浓缩饲料基质会有较大干扰,应针对待测试样同时做添加回收率实验,以校准测定结果。

### 7.2 测定

用相应的混合氨基酸标准工作液(如 4.1.1.7、4.2.8 或 4.3.5 等)按仪器说明书,调整仪器操作参数和(或)洗脱用柠檬酸钠缓冲液的 pH,使各氨基酸分辨率  $\geq 85\%$ ,注入制备好的试样水解液和相应的

氨基酸混合标准工作液,进行分析测定。酸解液每 10 个单样为一组,碱解液和酸提取液每 6 个单样为一组,组间插入混合氨基酸标准工作液进行校准。

## 8 分析结果的表述

分别用式(1)和式(2),计算氨基酸在试样中的质量百分比:

$$\omega_{1i}(\%) = \frac{A_{1i}}{m} \times 10^{-6} \times D \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$\omega_2(\%) = \frac{A_2}{m} \times (1 - F) \times 10^{-6} \times D \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:  $\omega_{1i}$ ——用未脱脂试样测定的某氨基酸的含量, %;

$\omega_2$ ——用脱脂试样测定的色氨酸的含量, %;

$A_{1i}$ ——每毫升上机水解液中氨基酸的含量, ng;

$A_2$ ——每毫升上机液中色氨酸的含量, ng;

$m$ ——试样质量, mg;

$D$ ——试样稀释倍数;

$F$ ——样品中的脂肪含量, %。

以两个平行试样测定结果的算术平均值报告结果,保留两位小数。

## 9 允许差

对于酸解或酸提取液测定的氨基酸,当含量小于或等于 0.5% 时,两个平行试样测定值的相对偏差不大于 5%;含量大于 0.5% 时,不大于 4%。对于色氨酸,当含量小于 0.2% 时,两个平行试样测定值相差不大于 0.03%;含量大于、等于 0.2% 时,相对偏差不大于 5%。

附录 A

(标准的附录)

色氨酸测定 反相高效液相色谱(RP-HPLC)法

除测定时将氨基酸分析仪更换为反相液相色谱仪、相应的洗脱用柠檬酸钠缓冲液更换为下述流动相,以及用下述具体的仪器测定条件外,其试剂、设备、样品前处理以及结果计算、表述和允许差等均同正文。

A1 液相色谱仪

具适当内径、长度和柱材粒度的 C18 柱(如 25 cm×4.6 mm 内径的  $\mu$ -BondapakC18 柱)、紫外(UV)或荧光检测器。

A2 流动相,乙酸钠缓冲液[ $c(\text{Na}^+) = 0.0085 \text{ mol/L}$  的乙酸钠溶液用乙酸调节 pH 至 4.0,用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤]+甲醇=95+5。

A3 测定

条件:柱温:室温;

流动相流速:1.5 mL/min;

检测:紫外检测波长:280 nm;

荧光检测:激发波长:283 nm;

发射波长:343 nm;

进样量:15  $\mu\text{L}$ 。

先从混合氨基酸标准工作液开始分析,每 6 个水解液为一组,组间插入氨基酸标准工作液(4.2.8)进行校准。