

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3002—2016

饲料中动物源性成分检测 显微镜法

Analysis for the determination of constituents of animal origin in feed—
Microscopy method

2016-11-01 发布

2017-04-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:中国农业大学。

本标准主要起草人:刘贤、杨增玲、韩鲁佳、陈龙健、黄光群、肖卫华、姜训鹏、吕程序。

饲料中动物源性成分检测 显微镜法

1 范围

本标准规定了饲料中动物源性成分的显微镜检测方法。

本标准适用于饲料原料以及畜禽饲料中陆生动物肉骨粉和鱼粉的显微镜定性检测。

本标准方法的检出限为 0.1%(W/W)。

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 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6003.1 试验筛 技术要求和检验 第1部分:金属丝编织网试验筛

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 原理

基于骨、软骨、肌纤维、羽毛、动物毛发以及鱼骨和鱼鳞等典型的、显微镜可识别的特征,对饲料原料和畜禽饲料中可能存在的动物源性成分进行鉴别分析。

4 试剂及制剂

除另有说明,所用试剂均为化学纯。用水符合 GB/T 6682 中三级水的规定。所用制剂制备应符合 GB/T 603 的规定。

4.1 浓缩剂

四氯乙烯。

4.2 染色剂

茜素红溶液:取 2.5 mL 1 mol/L 盐酸置于 100 mL 水中稀释,添加 0.2 g 茜素红至该溶液。

4.3 封固剂

4.3.1 丙三醇。

4.3.2 石蜡。

4.3.3 紫外固化光学胶。

4.4 染色封固剂

4.4.1 斐林溶液:称取 6.9 g 五水合硫酸铜溶于 100 mL 水中,制备溶液 A;分别称取 34.6 g 四水合酒石酸钾钠和 12 g 氢氧化钠溶于 100 mL 水中,制备溶液 B。使用前,取溶液 A 和溶液 B 按 1:1(V/V)混合。

4.4.2 胱氨酸溶液:分别称取 2 g 醋酸铅和 10 g 氢氧化钠,溶于 100 mL 水中。

4.5 清洗剂

4.5.1 乙醇:≥95%。

4.5.2 丙酮。

4.6 漂白剂

次氯酸钠溶液:8%~14%有效氯。

5 仪器和设备

- 5.1 分析天平:感量为 0.001 g 和 0.01 g。
- 5.2 样品磨或研钵。
- 5.3 试验筛:筛孔尺寸 1 mm、500 μm 和 250 μm ,试验筛应符合 GB/T 6003.1 的要求。
- 5.4 锥形玻璃分液漏斗:容积 250 mL,聚四氟乙烯或磨砂玻璃活塞,活塞开口直径应 ≥ 4 mm。
- 5.5 生物显微镜:放大 100 倍~400 倍,明场透射光。
- 5.6 实验室常用玻璃器皿。
- 5.7 玻片:平板载玻片、单凹载玻片和盖玻片(20 mm $\times$ 20 mm)。
- 5.8 实验室用镊子、探针。
- 5.9 紫外灯:波长范围 350 nm~380 nm。
- 5.10 电热板(50 $^{\circ}\text{C}$)或酒精灯。
- 5.11 涡旋混合器。
- 5.12 电热干燥箱。

6 采样与试样制备

6.1 采样

按 GB/T 14699.1 规定的方法采样。

6.2 试样制备

为避免交叉污染,所有重复使用的设备使用前应仔细清洁。分液漏斗应拆分清洗,先人工预清洗,后清洗机清洗。试验筛应使用硬纤维刷进行清理。筛分鱼粉等高脂质成分样品的试验筛,宜采用丙酮和气枪进行清理。

6.2.1 样品干燥

水分含量 $>14\%$ 的样品,处理前应使用电热干燥箱进行干燥[(103 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$]。

6.2.2 样品预筛分

为避免物流等环节可能造成的交叉污染,对于颗粒饲料和谷粒,宜采用 1 mm 试验筛进行预筛分,筛上物和筛下物宜作为独立样品进行后续制备和分析。

6.2.3 分样与粉碎

按 GB/T 20195 规定的方法,抽取有代表性的样品,用四分法缩减取样不少于 50 g。粉碎过 1 mm 试验筛,混匀备用。

6.2.4 沉淀物的提取与制备

准确称取 10 g 试样(鱼粉、其他纯动物源性产品、矿物成分或沉淀物比例高于 10%的预混料应称取 3 g),精确至 0.01 g,置于分液漏斗中,加入 50 mL 四氯乙烯,连续振荡混合至少 30 s,再量取不少于 50 mL 四氯乙烯,连续沿分液漏斗内壁倒入彻底洗净着壁试样,静置 5 min,打开活塞,分离沉淀物于滤纸过滤后风干。

准确称量风干后沉淀物(精确至 0.001 g),统一过 500 μm 试验筛。若筛上物 $>5\%$,应采用 250 μm 试验筛进行筛分。筛上物和筛下物两部分均应进行分析。

注:上述操作应在通风柜内进行。

6.2.5 悬浮物的提取与制备

倒置分液漏斗,将提取沉淀物后剩余的悬浮物从分液漏斗倒入表面皿,风干后收集并准确称重(精确至 0.001 g),统一过 500 μm 试验筛。若筛上物 $>5\%$,应采用 250 μm 试验筛进行筛分,筛上物和筛下

物两部分均应进行分析。

注：上述操作应在通风柜内进行。

6.3 试样染色处理与玻片制备

6.3.1 沉淀物染色

采用茜素红溶液进行染色，具体染色步骤如下：

- 将制备的沉淀物移至玻璃试管中，加入 5 mL 乙醇清洗，涡旋混合 30 s 后，静置 1.5 min，倒出上清液，再加入 5 mL 乙醇，重复操作 1 次。
- 加入 1 mL 次氯酸钠溶液，沉淀物脱色反应持续 10 min。加满水，静置 2 min~3 min，倒出上清液。
- 加入茜素红溶液 2 滴~10 滴，涡旋混合。反应 30 s 后，加入 5 mL 乙醇清洗，涡旋混合 30 s，静置 1 min，倒出上清液，再加入 5 mL 乙醇，重复操作 1 次；加入 5 mL 丙酮清洗，涡旋混合 30 s，静置 1 min，倒出上清液。
- 置染色后的沉淀物于电热干燥箱干燥(60℃, 2 h)。

经染色处理，沉淀物中的动物骨、软骨组成呈红色。

6.3.2 沉淀物玻片制备

依检测需要，选择经染色处理的沉淀物制备玻片。若样品经过筛分，则筛上物和筛下物均制备玻片， $>250\ \mu\text{m}$ 的沉淀物使用单凹载玻片， $\leq 250\ \mu\text{m}$ 的沉淀物使用平板载玻片。

玻片制备数量应满足执行 7.1 分析流程的要求。

6.3.2.1 非永久性玻片

取清洁载玻片置于台面，加 5 滴~7 滴丙三醇(避免产生气泡)，取约 10 mg 沉淀物分散其中浸透，用探针搅拌使分散均匀，加盖玻片，用石蜡密封。

6.3.2.2 永久性玻片

取清洁载玻片置于台面，加 5 滴~7 滴紫外固化光学胶(避免产生气泡)，取约 10 mg 沉淀物分散其中浸透，用探针搅拌分散均匀，及时加盖玻片(1 min 内完成)，移置紫外灯下照射至少 2 min。

6.3.3 悬浮物染色与玻片制备

6.3.3.1 肌纤维

采用斐林溶液进行染色。取清洁载玻片置于台面，加适量斐林溶液，取少量悬浮物分散其中浸透，用探针搅拌分散均匀，加盖玻片。为免褪色影响使用，宜尽快使用为佳。

经斐林溶液染色处理，肌纤维呈淡粉紫色。

6.3.3.2 羽毛和动物毛发

采用胱氨酸溶液进行染色。取清洁载玻片置于台面，加适量胱氨酸溶液，取少量悬浮物分散其中浸透，用探针搅拌分散均匀，加盖玻片，静置反应至明显变色。可通过使用电热板(50℃)或酒精灯加热玻片(避免沸腾)加快染色反应。

经胱氨酸溶液染色处理，羽毛和动物毛发呈深棕色。

7 显微镜观察

7.1 分析流程

应严格按照规定流程进行显微镜观察分析。饲料原料以及畜禽饲料中动物源性成分镜检分析流程如图 1 所示，鱼粉中陆生动物源性成分的镜检分析流程如图 2 所示。

每个镜检玻片均应使用不同放大倍数观察。

镜检分析流程中每个步骤规定的镜检玻片数量应严格遵守。每个分析流程最多观察 6 个玻片。

依据附录 A 动物源性成分典型图谱对显微镜观察结果进行判定。

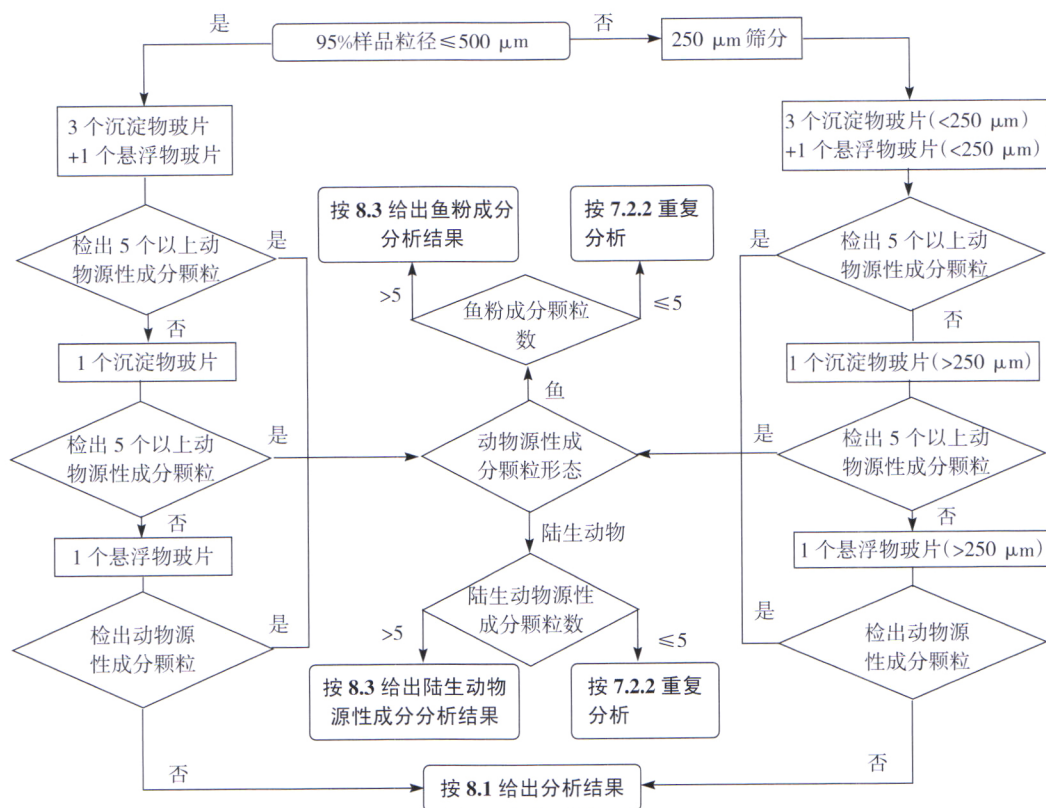


图 1 饲料原料以及畜禽饲料中动物源性成分分析流程图

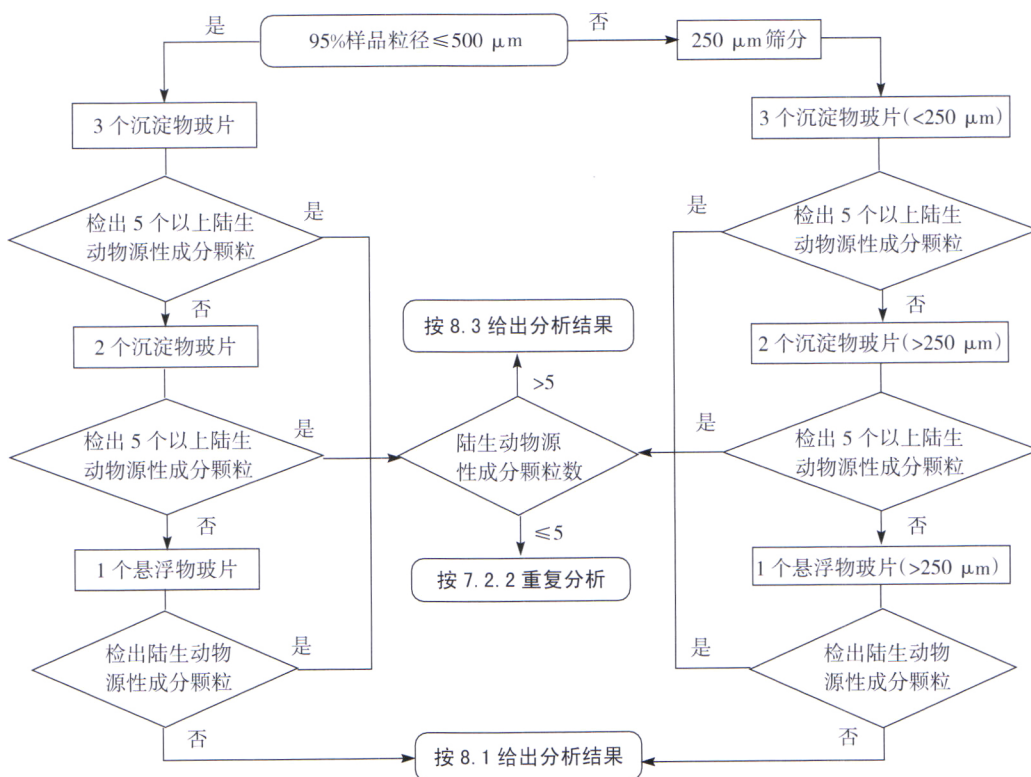


图2 鱼粉中陆生动物源性成分分析流程图

7.2 重复分析次数

7.2.1 如果按上述分析流程未检出动物源性成分,无需重复分析,应按 8.1 规定给出分析结果。

7.2.2 如果按上述分析流程检出的动物源性成分颗粒数量为 1 个~5 个,应按 6.2.3 重新分样与粉碎,取 50 g 进行重复分析。如果重复分析检出的动物源性成分颗粒数量为 0 个~5 个,应按 8.2 给出分析结果;否则,应按 6.2.3 再重新分样与粉碎,取 50 g 再次进行重复分析。但是,如果前两次分析检出的动物源性成分颗粒总数大于 15 个,应按 8.3 直接给出分析结果。如果 3 次分析检出的动物源性成分颗粒总数大于 15 个,应按 8.3 给出分析结果;否则,应按 8.2 给出分析结果。

7.2.3 如果按上述分析流程检出的动物源性成分颗粒数量大于 5 个,也无需重复分析,应按 8.3 给出分析结果。

8 结果表示

注:结果表示包含制备试样的类别(沉淀物、悬浮物)、重复分析次数以及是否检出陆生动物源和鱼粉成分等信息。

8.1 未检出动物源性成分颗粒

结果表示为:采用显微镜法,在送检样品中未检出陆生动物源性成分。

或者表示为:采用显微镜法,在送检样品中未检出鱼粉成分。

8.2 平均检出 1 个~5 个动物源性成分颗粒

结果表示为:采用显微镜法,在送检样品中检出的陆生动物源性成分颗粒平均数量 ≤ 5 个,检出的颗粒判定为……(骨、软骨、肌纤维、毛发、羽毛等)。此结果低于显微镜法的检出限,不排除假阳性的可能。

或者表示为:采用显微镜法,在送检样品中检出的鱼粉成分颗粒平均数量 ≤ 5 个,检出的颗粒判定为……(鱼骨、软骨、肌纤维、鱼鳞等)。此结果低于显微镜法的检出限,不排除假阳性的可能。

如果样品经过预筛分,结果表示中应说明检出的动物源性成分颗粒源自的独立样品(筛下物、颗粒或谷粒)。如果只在筛下物中检出,则不排除环境污染的可能。

8.3 平均检出 5 个以上动物源性成分颗粒

结果表示为:采用显微镜法,在送检样品中平均检出 5 个以上陆生动物源性成分颗粒,检出的颗粒判定为……(骨、软骨、肌纤维、毛发、羽毛等)。

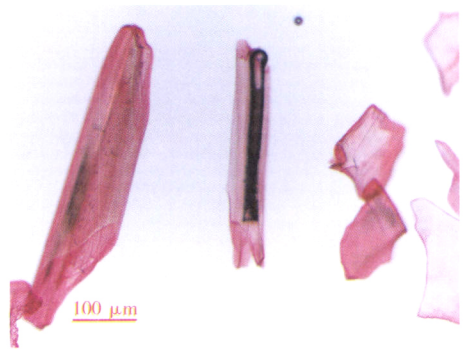
或者表示为:采用显微镜法,在送检样品中平均检出 5 个以上鱼粉成分颗粒,检出的颗粒判定为……(鱼骨、软骨、肌纤维、鱼鳞等)。

如果样品经过预筛分,结果表示中应说明检出的动物源性成分颗粒源自的独立样品(筛下物、颗粒或谷粒)。如果只在筛下物中检出,则不排除环境污染的可能。

附 录 A
(资料性附录)
动物源性成分典型显微镜图谱

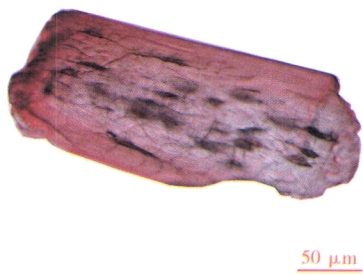
A.1 鱼骨

见图 A.1～图 A.4。



(100 倍;细长管状,边角锐利)

图 A.1 鱼 骨



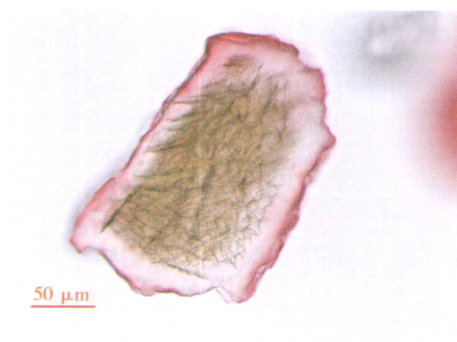
(200 倍;细长管状,边角锐利,不规则细长腔隙与丝网状导管呈黑色)

图 A.2 鱼 骨



(100 倍;鱼鳃,细长管状,边角锐利,表层黑色)

图 A.3 鱼 骨

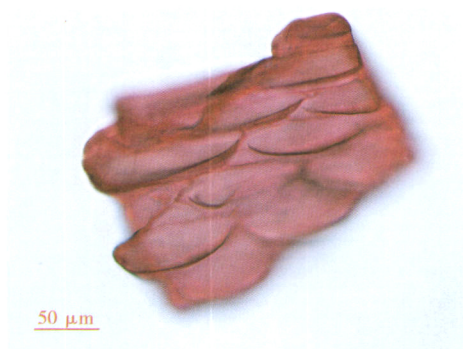


(200 倍;长管形,边角锐利,不规则细长腔隙与网状导管呈黑色)

图 A.4 鱼 骨

A.2 鱼鳞

见图 A.5。



(200 倍;鳞片状,边角锐利,似瓦片叠压排列)

图 A.5 鱼 鳞

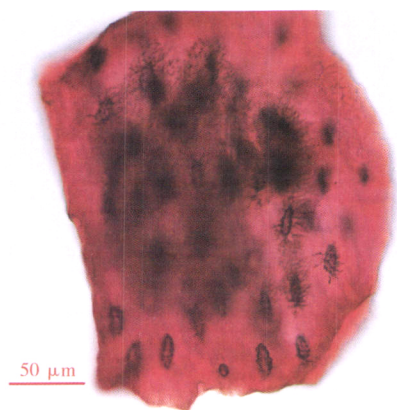
A.3 陆生动物骨

见图 A.6~图 A.9。



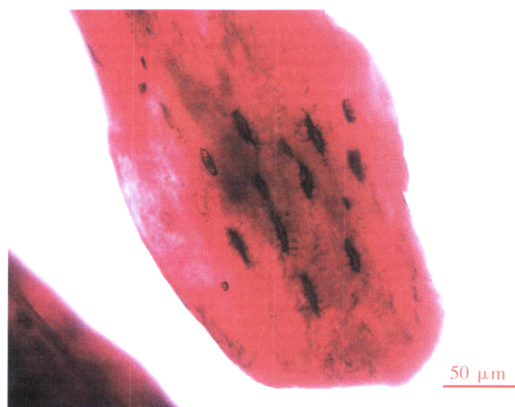
(200 倍;不规则多边体,黑色腔隙密集多呈圆形,导管细短、沿腔隙分布)

图 A.6 鸡 骨



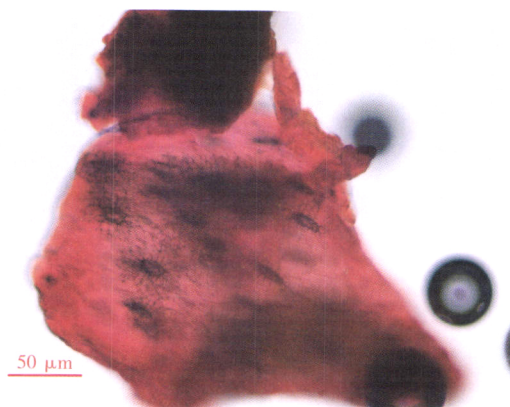
(200 倍; 不规则多边形, 黑色腔隙呈椭圆形, 导管细短、沿腔隙分布)

图 A.7 牛 骨



(200 倍; 不规则多边形, 黑色腔隙呈椭圆形, 导管细短、沿腔隙分布)

图 A.8 羊 骨

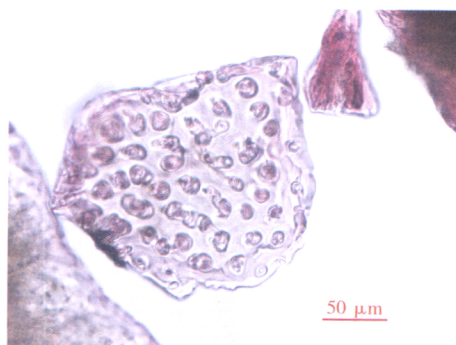


(200 倍; 不规则多边形, 黑色腔隙呈椭圆形, 导管细短、沿腔隙分布)

图 A.9 猪 骨

A.4 软骨

见图 A.10。

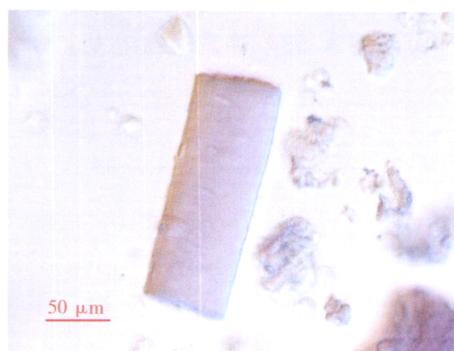


(200 倍;不规则多边形,球形腔隙,无导管)

图 A. 10 软 骨

A. 5 肌纤维

见图 A. 11。

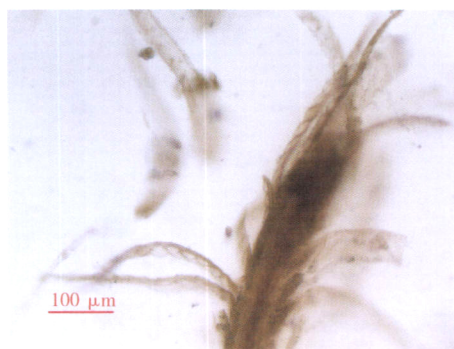


(200 倍;淡粉紫色规则矩形,表面平行细纹分布规则)

图 A. 11 肌纤维

A. 6 羽毛

见图 A. 12。



(100 倍;深棕色,羽枝清晰)

图 A. 12 羽 毛

A.7 哺乳动物毛发

见图 A.13。



(100 倍;深棕色,光滑细长表面,中心黑色髓质清晰)

图 A.13 哺乳动物毛发