

附件 7

# NYSL

## 新饲料和新饲料添加剂产品标准

NYSL—1006—2022

---

### 饲料中单宁酸的测定 分光光度法

**Determination of tannin in feeds—Spectrophotometry**

2022-11-03 发布

2022-11-03 实施

---

中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出，由全国饲料评审委员会归口。

本文件由广州英赛特生物技术有限公司起草。

本文件主要起草人：彭险峰、覃宗华、区煜荣。

# 饲料中单宁酸的测定 分光光度法

## 1 范围

本文件规定了饲料中单宁酸的分光光度测定方法。

本文件适用于添加了饲料添加剂鞣酸蛋白的配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料中单宁酸含量的测定。

本文件检出限为140 mg/kg，定量限为420 mg/kg。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

用丙酮溶液将鞣酸蛋白中单宁酸与蛋白结合的氢键打开，单宁酸溶于丙酮溶液而蛋白质不溶，经过滤后，取滤液加钨酸钠-磷钼酸混合溶液（福林酚试剂）和碳酸钠溶液，显色后，用分光光度计于760 nm波长处测定吸光值，用单宁酸作标准曲线测定饲料中单宁酸的含量。由于饲料中可能含有还原性物质以及部分饲料原料可能含有少量单宁酸，会与福林酚试剂反应，故测试结果用空白饲料作校正。

## 5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂，水为符合GB/T 6682三级水。

5.1 丙酮溶液（丙酮+水+盐酸=600+400+20）：分别取 600 mL 丙酮、400 mL 水、20 mL 盐酸，混合，摇匀，即得。

5.2 钨酸钠-磷钼酸混合溶液：称取 100.0 g 钨酸钠、20.0 g 磷钼酸，溶于约 750 mL 水中，移入 1 000 mL 回流瓶中，加入 50 mL 磷酸，充分混匀，接上冷凝管，在沸水浴上加热回流 2 h，冷却，转入 1 000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，过滤，置棕色容量瓶中保存。室温下可保存 14 d。或购买市售福林酚试剂。

NYSL—1006—2022

5.3 碳酸钠溶液 (75 g/L)：称取 37.5 g 无水碳酸钠溶于 250 mL 温水中，混匀，冷却，稀释至 500 mL，过滤到储液瓶中备用。室温下可保存 7 d。

5.4 单宁酸标准品 (C<sub>76</sub>H<sub>52</sub>O<sub>46</sub>，CAS 号：1401-55-4)：含量 ≥95.0%。

5.5 单宁酸标准储备液 (1 mg/mL)：称取单宁酸标准品 (5.4) 适量 (精确至 0.000 1 g)，于 100 mL 棕色容量瓶中，用丙酮溶液 (5.1) 溶解定容。于 4 °C 保存，有效期为 2 d。

5.6 单宁酸标准中间溶液 (100 μg/mL)：准确移取单宁酸标准储备液 (5.5) 5.00 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中，用水定容。临用现配。

## 6 仪器设备

6.1 紫外可见分光光度计：波长精度 ±2 nm。

6.2 分析天平：感量 0.000 1 g。

6.3 集热式恒温加热磁力搅拌器：控温精度 ±1 °C。

6.4 离心机：转速不低于 10 000 r/min。

## 7 样品

按 GB/T 20195 制备样品，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，备用。选取相同但未添加鞣酸蛋白添加剂的饲料样品作为空白样品。

## 8 试验步骤

### 8.1 提取

#### 8.1.1 试样的提取

平行做两份试验。称取试样 0.5 g~2 g，准确至 0.000 1 g，置于 100 mL 具塞三角瓶中，准确加入 50.00 mL 丙酮溶液 (5.1)，加塞密封，置于集热式恒温加热磁力搅拌器 (6.3) 中，于 55 °C 水浴搅拌 1 h，充分冷却后，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液备用。

#### 8.1.2 空白饲料的提取

称取空白饲料样品 0.5 g~2 g，准确至 0.000 1 g，置于 100 mL 具塞三角瓶中，准确加入 50.00 mL 丙酮溶液 (5.1)，加塞密封，置于集热式恒温加热磁力搅拌器 (6.3) 中，于 55 °C 水浴搅拌 1 h，充分冷却后，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液备用。

### 8.2 测定

#### 8.2.1 标准曲线的绘制

准确移取单宁酸标准中间溶液 (5.6) 0.00 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、1.50 mL、2.00 mL、3.00 mL，分别置盛有约 30 mL 水的 50 mL 棕色容量瓶中，摇匀；加钨酸钠-磷钼酸混合溶液 (5.2) 2.5 mL，摇匀；加碳酸钠溶液 (5.3) 7.0 mL，摇匀；分别用水

定容至50 mL，摇匀。单宁酸系列标准溶液浓度分别为：0.00 mg/L、0.20 mg/L、0.40 mg/L、1.00 mg/L、2.00 mg/L、3.00 mg/L、4.00 mg/L、6.00 mg/L，放置80 min显色后，以标准曲线0.00 mg/L为空白，在760 nm波长处测定标准溶液的吸光度，以单宁酸浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

### 8.2.2 试样的测定

准确移取试液（8.1.1）和空白饲料提取液（8.1.2）各0.5 mL，分别置于盛有约30 mL水的50 mL棕色容量瓶中，摇匀；加钨酸钠-磷钼酸混合溶液（5.2）2.5 mL，摇匀；加碳酸钠溶液（5.3）7.0 mL，摇匀；分别用水定容至50 mL，摇匀。放置80 min显色后，以空白饲料显色液为空白，在760 nm波长处测定试样溶液的吸光度，根据标准曲线求出试液（8.1.1）中单宁酸的浓度。如果吸光度值超过6.00 mg/L单宁酸的吸光度时，将试液（8.1.1）用丙酮溶液（5.1）稀释后重新测定。

## 9 试验数据处理

试样中单宁酸以 $\omega$ 表示，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。按公式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V \times D}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

$\rho$  ——由标准曲线得出的试样测定液中单宁酸的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

$V$  ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$D$  ——试样稀释倍数；

$m$  ——试样质量，单位为克（g）。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留到小数点后一位。

## 10 精密度

在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。