

# 目 录

1 绪论 .....	(1)
1.1 饲料分析与饲料质量检测 .....	(1)
1.2 饲料原料和全价配合饲料的变异 .....	(4)
1.3 饲料质量检测方法 .....	(6)
2 饲料样品的采集与制备 .....	(9)
2.1 样品的采集 .....	(9)
2.2 样品的制备 .....	(20)
2.3 样品的登记与保管 .....	(23)
3 饲料物理性状检验 .....	(25)
3.1 饲料的鉴定方法 .....	(25)
3.2 饲料的显微镜检测 .....	(30)
3.3 掺假鱼粉的鉴别 .....	(38)
3.4 蛋氨酸和赖氨酸添加剂原料真伪鉴别 .....	(42)
4 饲料中常规成分分析 .....	(45)
4.1 概述 .....	(45)
4.2 饲料中水分的测定 .....	(46)
4.3 饲料中粗蛋白质( $N \times 6.25$ )的测定——凯氏定氮法 .....	(49)
4.4 饲料中粗脂肪的测定 .....	(56)
4.5 饲料中粗纤维和 ADF、NDF 的测定 .....	(63)
4.6 饲料中粗灰分的测定 .....	(74)
4.7 饲料中无氮浸出物(NFE)的计算——差值计算 .....	(75)
4.8 饲料常规分析的局限性 .....	(79)
5 饲料中热能的测定 .....	(81)
5.1 概述 .....	(81)
5.2 总能的测定 .....	(82)
5.3 消化能和代谢能的测定 .....	(94)
6 饲料中氨基酸的测定 .....	(105)
6.1 概述 .....	(105)

6.2	离子交换树脂法氨基酸自动分析 .....	(105)
6.3	氨基酸高效液相色谱法(HPLC)的分析测定 .....	(116)
6.4	饲料有效赖氨酸的测定 .....	(121)
6.5	饲料添加剂氨基酸质量标准与检测 .....	(125)
7	矿物元素分析 .....	(131)
7.1	饲料中常量元素的分析测定 .....	(131)
7.2	微量元素的检测与分析 .....	(145)
8	维生素的分析测定 .....	(172)
8.1	概述 .....	(172)
8.2	维生素添加剂的分析测定 .....	(173)
8.3	饲料中维生素的分析测定 .....	(200)
9	饲料中有毒有害物质的检验 .....	(220)
9.1	无机元素类有毒有害物质的分析测定 .....	(221)
9.2	天然有毒有害物质的分析测定 .....	(244)
9.3	次生性有毒有害物质的分析测定 .....	(264)
9.4	饲料中微生物检验 .....	(278)
10	饲料中违禁药物和加药饲料中药物的检验 .....	(288)
10.1	概述 .....	(288)
10.2	饲料中盐酸克仑特罗的检验 .....	(292)
10.3	饲料中己烯雌酚的检验 .....	(296)
10.4	饲料中金霉素的测定 .....	(300)
10.5	饲料中喹乙醇的测定 .....	(302)
11	配合饲料加工质量检测 .....	(305)
11.1	配合饲料粉碎粒度的测定 .....	(306)
11.2	配合饲料混合均匀度的测定 .....	(306)
11.3	微量元素预混合饲料混合均匀度的测定 .....	(310)
11.4	颗粒饲料硬度的测定 .....	(311)
11.5	颗粒饲料淀粉糊化度的测定 .....	(313)
11.6	颗粒饲料粉化率的测定 .....	(318)
11.7	渔用配合饲料水中稳定性的测定 .....	(319)
11.8	蛋白质溶解度的测定 .....	(321)
11.9	动物蛋白质饲料体外消化率的测定——胃蛋白酶法 .....	(322)

12 现代近红外光谱(NIR)分析在饲料工业中的应用 .....	(325)
12.1 近红外光谱分析的进展 .....	(325)
12.2 近红外分析技术的基本原理 .....	(326)
12.3 近红外光谱仪的典型类型及进展 .....	(329)
12.4 近红外光谱分析过程 .....	(332)
12.5 NIR 分析的特点及在饲料工业中的应用 .....	(338)
附录一 国际相对原子质量表 .....	(340)
附录二 常用酸碱指示剂 .....	(341)
附录三 混合酸碱指示剂 .....	(342)
附录四 普通酸碱溶液的配制 .....	(343)
附录五 容量分析基准物质的干燥条件 .....	(344)
附录六 筛号与筛孔直径对照表 .....	(345)
附录七 缓冲溶液的配制 .....	(346)
附录八 中华人民共和国国家标准——化学试剂 滴定分析(容量分析)用标准溶液的制备 .....	(348)
附录九 微量元素饲料添加剂原料质量标准 .....	(371)
附录十 维生素饲料添加剂标准 .....	(372)
附录十一 饲料卫生标准(GB 13078—2001) .....	(375)
参考文献 .....	(380)

# 1 绪 论

## 1.1 饲料分析与饲料质量检测

### 1.1.1 概述

饲料是一种十分复杂的混合物。因此,一种看起来似乎营养价值高、质量好的饲料,如果不通过系统地分析,不通过物理学、化学或生物手段进行检测,就无法确保这种饲料对动物有真正价值。两种看起来差不多的干草,其中一种可能含12%的粗蛋白质,而另一种粗蛋白含量可能为18%,这只有通过化学分析才能判断出来。但仅仅知道饲料的化学组成是不够的,还必须进一步通过试验以确定饲料中各种营养成分的消化利用效率,配合饲料也是如此。如果一种饲料营养成分含量较高,但消化率、利用率低,那么这种饲料仅是一种填充料,对于动物并无多大益处。

测定饲料价值最确切的办法是用这种饲料在试验场或饲养场进行消化代谢试验和饲养试验。但这样做花费大,时间长,每一种饲料通过消化代谢试验和饲养试验评定营养价值不切合实际。因此,实验室测定就逐渐发展成为分析饲料价值的一种重要手段,如大家公认的、目前在国际上通用的 Weende 系统分析法,就是在130年前在德国 Weende 试验站工作的两位科学家所逐步发展起来的有关“饲料近似成分分析法”。随着生产与科学技术的发展,一些新的有关饲料成分分析测定和检测的方法都在不断发展与改进之中,分析的手段不断改进,分析的项目也越来越精细和广泛。

所谓“质量”乃“一种物质本身固有品质的优劣程度”。一般是用来阐明饲料和饲料加工的优劣程度。此外,消费者对饲料的安全、卫生的要求呼声也越来越高。对生产者来说,优质饲料必须:①能提供动物充足的养分;②能使动物获得良好的饲用效果。但劣质饲料原料不可能组成优质的配合饲料。因此,任何一种低品质谷物或其他原料都会导致生产出来的配合饲料产品质量下降。此外,在运输、贮藏和使用过程中均应注意保证饲料的质量,如加工、贮藏条件或饲喂方式不当,也可使饲料丧失其优良品质,影响其饲养效果。



企业依据已有国家标准或行业标准,制定的严于国家标准或行业标准,或在没有国家标准或行业标准情况下,企业制定的标准,主要包括产品标准和检测方法标准,仅适用于企业内部。

#### 1.1.2.2 标准性质

国家标准或行业性标准按照其性质又可分为强制性标准、推荐性标准和指导性技术文件。保障人体健康、人身、财产安全的标准和法律、行政法规规定强制执行的标准为强制性标准,如《饲料标签》标准和《饲料卫生标准》,这些标准一般为国家标准。推荐性标准一般为行业标准和非强制性国家标准,如饲料原料标准、检测方法标准等。地方性标准只有在本地区为强制性标准。国家强制性标准、推荐性标准和指导性技术文件代号分别为 GB、GB/T 和 GB/Z。

#### 1.1.2.3 我国饲料工业标准制定现状与展望

我国饲料工业起步较晚,开展标准化工作的历史相对较短,但其发展较快。截止 1999 年底,经全国饲料工业标准化委员会审查后由国务院标准化行政主管部门发布的国家标准和有关行政主管部门发布的行业标准共 216 项,其中国家标准 79 项,行业标准 137 项。国家标准中有 9 项为强制性标准,其余为推荐性标准。9 项强制性标准中,有两项是基础性标准,即《饲料标签》标准和《饲料卫生标准》。

加入 WTO 后,在标准化方面,我国将按照 WTO/TBT 协定的要求,严格按照有关国际组织制定的国际文件实施我国的标准化工作。当前,饲料工业标准制定、修订的重点是饲料安全卫生方面的标准、检测方法标准及管理标准,特别是通用基础性标准,这些标准在某些方面还满足不了生产、使用和管理需要,如《饲料卫生标准》等。对于一些新的饲料产品如酶制剂、微量元素氨基酸螯合物、中草药提取物等,除安全卫生标准外,要加大检测技术标准的制定,以便统一方法、统一标准,用一把尺子衡量市场产品质量。

#### 1.1.2.4 饲料工业、法律和商业方面检测方法的标准化

从工业、法律和商业角度对饲料成分分析和检测技术的标准化问题是各有一套制度的。一般企业界有它自己的一些分析方法,这些方法适合于其本企业的情况(大型企业或小型企业,先进的或一般的)及其实验室设备能力,并且通常是快速而简便的,同时又可靠的分析方法。他们分析的主要目的是获得可靠的原料营养成分含量,并为建立回归公式,推算饲料中的能量及可消化粗蛋白质等提供参数。

可以把工业使用的方法分为两部分;其一是为了使出售给顾客的饲料质量最优而进行的分析测定项目;其二是关于政府(官方)所要求的为保护消费者利

益而进行的分析工作。它一方面考虑到终产品(成品)的质量,另一方面还须考虑到消费者的健康。而对于从事商业性贸易的来讲,也有它自己的一套制度。它所采用的分析测定是作为卖主或买主的质量保证,并根据买卖双方达成的协议来选择的。其最重要的一点是有作为衡量原料真实价值的标准分析方法,当然它们也必须是一些可靠的分析方法。这不仅容易为买卖双方所接受采用,而且必须在合同中加以强调,确保交货时按合同保证饲料质量。

法律方面则有其更加精确的标准方法,它采用这些方法是用来管理饲料工业中出现的涉及到法律问题,强调的是再现性<sup>①</sup>(reproducibility)。为了确定这些法律上的限制程度,它在数字方面要求具有不超过一定的限度,并且允许的变化范围很窄。因此,法律的分析程序是严格标准化的。政府拥有自己的实验室,在遵守有关的法律法规前提下,建立了一套有效的质量保证和质量控制程序体系,严格按照标准化方法进行分析测定,确保测定结果的准确性、公正性和有效性。作为标准的分析方法,最重要的在于不同实验室所测定的结果应有高度的再现性,而不在于其简单、快速和同一实验室结果的重复性<sup>②</sup>(repeatability)。

目前我国已建立起以国家级、部级饲料质量监督检验中心和省市级等饲料质量监督检验中心或质检站组成的饲料质量监督检验机构体系。要求这些实验室按照 ISO/IEC 17025(GB 15481)《检测和校准实验室能力的通用要求》和国家计量局“产品质量检验机构计量认证/审查认可(验收)评审准则”进行了实验室机构认证和计量认证,采用标准分析方法进行检验测定,以保证提供可靠的有法律效应的数据。

## 1.2 饲料原料和全价配合饲料的变异

来自同一原产地的一种饲料原料会出现变异。概括来讲,影响饲料原料和全价配合饲料质量主要有以下几个因素。

### 1.2.1 自然变异

饲料原料养分含量的自然变异系数平均为 $\pm 10\%$ ,变异范围一般在 $10\% \sim 15\%$ 之间是正常的。饲料原料的质量因产地、年份、采样、品种、土壤肥力、气候、收割时成熟程度不同而变异。例如普通玉米的粗蛋白含量一般在 $8\%$ 左右,而有

①再现性 reproducibility:在再现性条件下,测试结果之间的一致程度(ISO 5725-1)。

②重复性 repeatability:在重复性条件下,相互独立的测试结果之间的一致程度(ISO 5725-1)。

些新品种玉米的粗蛋白含量超过了 10%。与鱼粉等蛋白质饲料原料相比,谷类及其副产品的养分含量比较稳定,变异范围较小,大豆粕也是一种养分含量变异的蛋白质补充饲料。

### 1.2.2 加工

农产品加工技术不同,生产出的产品或副产品质量就会有差异,高标准成套碾米机所生产的米糠主要含的是胚芽和米粒种皮外层。而低标准碾米机则生产出混杂有相当一部分稻壳的低质量米糠。在溶剂浸出过程中,热处理温度过低或过高所生产的大豆粕质量都会比热处理工艺温度适当所产的大豆粕质量差。

### 1.2.3 掺假

颗粒细小的饲料原料易于掺假,即以一种或多种可能有或者可能没有营养价值的廉价细粒物料进行故意掺杂。一般讲,掺假不仅改变被掺假饲料原料的化学成分,而且会降低其营养价值。目前鱼粉、氨基酸添加剂原料和维生素原料等的掺假使杂现象严重。常见于鱼粉中的掺假物主要有经过细粉碎的贝壳、膨化水解羽毛粉、血粉、皮革粉以及非蛋白氮物质如尿素、缩醛脲等。赖氨酸和蛋氨酸是饲料生产中普遍采用的氨基酸饲料添加剂,掺假现象时有发生,主要掺假物有淀粉、石粉、滑石粉等廉价易得原料。其他饲料原料也可能出现掺假现象,如米糠可能会用稻壳掺假。经过细粉碎的石灰石有用做磷酸氢钙的掺杂物。由此可见,饲料掺假可以归纳为以下一些情况:“以次充好”,“以假乱真”,“过失性混进杂质”,“漏加贵重成分”以及“故意增减某些成分”等。因此,在采购饲料原料时必须对其质量加以识别,进行必要的质量检查。

### 1.2.4 损坏和变质

在不适当的运输装卸、贮藏和加工过程中饲料原料会因损坏和变质失去其原有的质量,高水分玉米收获后在不适当的运输装卸情况下非常容易被真菌污染而损坏。高水分米糠和鱼粉在袋装贮藏条件下会发热、自燃或者会很快发生酸败,酸败作用还促使其脂溶性维生素尤其是维生素 A 的损失,这使情况变得更糟。饲料谷物在不适当的贮藏条件下通常会被虫蚀损坏。劣质饲料原料不可能生产出优质的配合饲料。所以,选择优质饲料原料并保持其质量是制作优质动物饲料至关重要的环节。

此外,实验室的分析结果报道也有差异(有些报道是指营养成分占风干饲料的百分含量,另一些报道则是指营养成分占饲料干物质的百分比)。由于饲料在组

成上有这么一些变异范围,所以针对具体的饲料应该进行具体地分析,并应切合实际地加以应用。不过,在大多数情况下并没有充足的时间来采样分析众多的饲料,或者一些饲料批量太小以至于这样做并不合算。所以,人们通过大量的采样分析和试验,制定了饲料成分和营养价值表。这些表格有两个作用:①为买卖交易时的依据;②为设计满足动物的营养需要的配合饲料配方提供必要的参考数据。

### 1.3 饲料质量检测方法

优质饲料原料应该指的是根据化学成分和营养利用两方面来看都具有良好营养价值的原料。掺假或者说往优质饲料原料里掺和营养价值低或者根本没有营养价值的其他物料,这样就会生产出劣质饲料原料。低质原料是指含有较丰富的营养成分,但含有限制养分利用的天然毒素(如棉子粕中棉酚和菜子粕中的异硫氰酸酯和噁唑烷硫酮)和抗营养因子(如大豆制品中抗胰蛋白酶因子等)的原料。在实际生产中,在对这些原料养分、毒素含量及抗营养因子的分析,依据毒素和抗营养因子的有关限量标准,确定其在配合饲料中的最适使用比例。饲料质量通常可采用以下方法进行检测。

#### 1.3.1 饲料显微镜检测

饲料显微镜检测的主要目的是借外表特征(体视显微镜检测)或细胞特点(生物显微镜检测),对单独的或者混合的饲料原料进行鉴别和评价。如果将饲料原料和掺杂物或污染物分离开来以后再做比例测量,则可借显微镜检测方法对饲料原料做定量鉴定。总之,无掺假或污染的饲料原料,其化学成分与本地区推荐或报告的标准或者平均值将非常接近。借助饲料显微镜检测能告诉饲料原料的纯度,若有一些经验者还能对质量做出令人满意的鉴定。用显微镜检查饲料质量,在美国已有 50 年历史,目前已经普及。这种方法具有快速准确、分辨率高等优点。此外,还可以检查用化学方法不易检出的项目如某些掺假物等。与化学分析相比,这种方法不仅设备简单(用 50~100 倍放大镜和 100~400 倍立体显微镜)、耐用、容易购得,而且在每个样品的分析费用方面要求都少得多。商品化饲料加工企业和自己生产饲料的大型饲养场都可以采用这种方法,对饲料原料的质量进行初步的评估。

#### 1.3.2 点滴试验和快速试验

为了检测某种影响饲料质量的物质是否存在,许多快速化学试验法和点滴

试验法已研究出来。在鉴定饲料原料和全价饲料的真实质量上,对化学分析和饲料显微镜检测都有帮助。大豆制品的脲酶活性分析可以反映出大豆制油加工过程中蒸炒的是否充分以及养分的利用情况。加上几滴 50% 的盐酸溶液,并注意二氧化碳气泡的形成,或者分离出四氯化碳中的掺杂物,即可鉴别出米糠中掺和的石灰石粉末。为了检查预混料和全价饲料中是否有某些药物、其他饲料添加剂以及矿物质和维生素,许多点滴试验方法已经研究出来。这些方法中有许多非常简便,一般养殖场也可以做。而有些技术则需要复杂的、相当贵的化学试剂,所以其应用仅限于商品化饲料生产。

饲料显微镜检测和点滴试验可在不同规模饲料生产企业中予以应用。在饲料加工生产过程中采用各种方法进行饲料质量检测是最理想的。然而,实际上饲料生产的规模影响检测方法的应用。对日产量大、价格和质量具有竞争性的商品化饲料生产者来说,保证进厂饲料原料和出厂饲料产品两者的质量都非常重要。有必要将饲料显微镜检测与点滴试验、快速试验以及化学分析相结合,从而把所有的饲料质量检测方法全部都利用起来,进行综合评定。对于小规模饲料产地加工业和饲养场,一般无力提供装备精良的实验室进行化学分析,建议将开展定性、定量的全面饲料显微镜检测与某些快速试验和点滴试验相结合。总之,这些小厂和养殖场一般能够有效地采用饲料显微镜检测以及某些点滴、快速试验方法,如脲酶活性检验、尿素检验、石灰石掺假检验以及简单的浮选法检验。所有这些技术全都非常简单而实用。只要稍加培训推广,一些小型饲料加工厂和饲养场就能以较低的成本生产出优质的饲料来。

### 1.3.3 化学分析

化学分析是饲料分析测定中最为普遍采用的方法。饲料原料的化学成分,通常包括常规营养成分如水分、蛋白质、乙醚浸出物(油脂)、粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、粗灰分,能量,18 种氨基酸,矿物元素,包括常量元素钙、磷、钠、氯、镁等和微量元素铁、铜、锰、锌、碘、硒等,各种维生素,有毒有害物质,包括无机有毒有害物质如砷、铅、镉、汞、铬、氟等,天然有毒有害物质如棉子粕中的游离棉酚、菜子粕中的异硫氰酸酯和噻唑烷硫酮,次生有毒有害物质如霉菌毒素等都可通过化学分析,获得实际的含量,并通过与标准做比较来评价其质量。

通过化学分析获得的被检分析原料的真实养分含量数据,可直接用于饲料配合。含量比较高的常规营养成分和常量矿物元素等成分的分析,不需要昂贵的设备,仅借助简单和普通的设备和设施就可开展工作,但需要训练有素的化学分析人员或者技术员工。饲料企业和养殖企业都应该装备开展这些项目的实验室,

以满足饲料质量控制的需要。

饲料中维生素、微量元素、氨基酸、有毒有害物质、药物等由于含量较低,它们的测定都需要借助先进的大型仪器设备如高效液相色谱、原子吸收分光光度计、离子交换色谱氨基酸分析仪、薄层色谱、层析、液相色谱质谱仪和气相色谱质谱仪等进行,仪器分析的准确度、精确度和灵敏度都非常高,检测限可达  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 甚至  $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$  水平。但设备昂贵,实验室的设施条件要求也较高。所以,只有大型的商业性饲料企业、科研院所和专门从事饲料质量检验机构才有能力和有必要装备大型先进设备。

化学分析方法仅能提供某成分的含量情况,如饲料中最为重要的养分——蛋白质,用凯氏定氮法测定,以粗蛋白质表示( $\text{N} \times 6.25$ )。所得结果不能揭示氮到底来自原料中的蛋白质,还是掺杂物中的蛋白质或者样品中掺和的非蛋白氮。此外,对原料所含养分的利用情况难以明示。为了使这种方法得到最佳应用,可利用其他饲料质量检测方法对化学分析数据做相应的分析整理,并可通过几个指标,做出综合性准确判断。

#### 1.3.4 近红外光谱分析技术

近红外光谱技术(简称 NIRS)是 20 世纪 70 年代兴起的有机物质快速分析技术。该技术首先由美国农业部 Norris 开发。近 20 年来,随着光学、电子计算机学科的不断发展和硬件的不断改进,软件版本不断翻新,使得该技术的稳定性、实用性不断提高,应用领域也日渐拓宽。近红外光谱分析技术在测试饲料成分前只需对样品进行粉碎处理,应用相应的定标软件,在 1 min 内就可测出样品的多种成分含量。由于其具有简便、快速、相对准确等特点,许多国家已将该技术成功地应用于食品、石油、药物等方面的质量检验。在饲料质量检验方面,不仅用于常量成分分析,而且在微量成分氨基酸、有毒有害成分的测定,以及饲料营养价值评定,如单胃动物有效能值、氨基酸利用率、反刍动物饲料营养价值评定方面也获得了许多可喜的成果。该技术还应用于许多先进的饲料厂的原料质量控制,产品质量监测等现场在线分析。

近红外光谱技术虽然具有快速、简便、相对准确等优点,但该法估测准确性受许多因素的影响。其中以样品的粒度及均匀度影响最大,粒度变异直接影响近红外光谱的变异。虽然在样品光谱处理时采用了二阶导数,减少了粒度差异引起的误差,但在实际工作中更重要的是使定标及被测样品制样条件一致,保证样品具有粒度分布均匀,减少由于粒度变异引起的误差。

## 2 饲料样品的采集与制备

### 【内容提要】

从待测饲料原料或产品中获取一定数量、具有代表性的部分作为样品的过程称为采样。将样品经过干燥、磨碎和混合处理,以便进行理化分析的过程称为样品的制备。饲料样品的采集和制备是饲料分析中两个极为重要的步骤,决定分析结果的准确性,从而影响饲料企业的各种决策。采样的根本原则是样品必须具有代表性。保证采样准确的方法有:正确的采样方法、熟练的采样技能、严格的管理。采样常用方法有“四分法”和“几何法”。半干样品是将含水量高的新鲜样品如青饲料等在 60~70℃烘箱烘干制备而成;风干样品是将含水量低的饲料样品如玉米等风干制备而成。一般要求将样品粉碎通过孔径为 1.00~0.25 mm 的试验筛。制备好的半干和风干样品应保存在磨口广口瓶中,贴好标签和样品登记,并将样品保存在低温、避光、干燥环境中。

样品是待检饲料原料或产品的一部分。从待测饲料原料或产品中按规定并取一定数量、具有代表性样品的过程称为采样。将样品经过干燥、磨碎和混合处理,以便进行理化分析的过程称为样品的制备。饲料样品的采样和制备是饲料分析中两个极为重要的步骤,必须加以重视。

### 2.1 样品的采集

#### 2.1.1 采样的目的

样品的采集是饲料分析的第一步,采样的根本目的是通过对样品的理化指标的分析,客观反映受检饲料原料或产品的品质。样品的分析结果有不同的用途。对饲料工业而言,采样左右着许多方面的决策,并且这种影响面很广泛,具体主要表现在以下 8 个方面。

- (1)为饲料配方选择原料。
- (2)选择原料供应商。
- (3)接收或拒绝某种饲料原料。

(4)判断产品的质量是否符合规格要求和保证值,以决定产品出厂与否或仲裁买卖双方的争议。

(5)判断饲料加工程度和生产工艺控制质量。

(6)分析保管贮存条件对原料和产品质量的影响程度。

(7)保留每一批饲料原料或产品的样品,以备急需时用。

(8)分析测定方法的准确性和实验室或人员之间操作误差的比较 由权威实验室仔细分析化验的样品可作为标准样品。将标准样品均匀分成若干平行样品,分别送往不同实验室或人员进行分析,比较不同实验室或人员测定结果的差异,用于校正或确定某一测定方法或某种仪器的准确性,规范实验分析操作规程,提高分析人员的操作水平。

由此可见,采样对饲料工业的影响是非常广的。正如 Gehrt(1976)所述:“采样比分析更为重要”。

## 2.1.2 采样的要求

### 2.1.2.1 样品必须具有代表性

受检饲料容积和质量往往都很大,而分析时所用样品仅为其中的很小一部分,所以样品采集的正确与否决定分析样品的代表性,直接影响分析结果的准确性。因此,在采样时,应根据分析要求,遵循正确的采样技术,并详细注明饲料样品的情况,使采集的样品具有足够的代表性,使采样引起的误差减至最低限度,使所得分析结果能为生产实际所参考和应用。否则,如果样品不具有代表性,即使一系列分析工作非常精密、准确,无论分析了多少个样品的数据,其意义都不大,有时甚至会得出错误结论。事实上,实验室提交的分析数据不可能优于所采集的样品。

### 2.1.2.2 必须采用正确的采样方法

正确的采样应该从具不同代表性的区域取几个样点,然后把这些样品充分混合成为整个饲料的代表样品,然后再从中分出一小部分作为分析样品用。采样过程中,做到随机、客观,避免人为和主观因素的影响。

### 2.1.2.3 样品必须有一定的数量

不同的饲料原料和产品要求采集的样品数量不同,主要取决于以下几个因素。

(1)饲料原料和产品的水分含量。水分含量高,则采集的样品应多,以便干燥后的样品数量能够满足各项分析测定要求;反之,水分含量少,则采集的样品可相应减少。



(2)原料或产品的颗粒大小和均匀度。原料颗粒大,均匀度差,则采集的样品应多。

(3)平行样品的数量。同一样品的平行样品数量越多,则采集的样品数量就越多。

#### 2.1.2.4 采样人员应有高度责任心和熟练的采样技能

采样人员应明白自己是饲料厂管理及产品质量的“眼睛”,应具有高度的责任心,在采样时,认真按操作规程进行,不弄虚作假和谋取私利,及时发现和报告一切异常的情况。

采样人员应通过专门培训,具备相应技能,经考核合格后方能上岗。

#### 2.1.2.5 重视和加强管理

主管部门、权威检测机构和饲料企业必须高度重视采样和分析的重要性,加强管理。管理人员必须熟悉各种原料、加工工艺和产品;对采样方法、采样操作规程和所用工具提供相应规定;对采样人员提供培训和指导。

### 2.1.3 采样工具

采样工具种类很多,但必须符合要求:①能够采集饲料中的任何粒度的颗粒,无选择性;②对饲料样品无污染,如不增加样品中微量金属元素的含量或引入外来生物或霉菌毒素。目前使用的采样工具主要有以下几种。

#### 2.1.3.1 探针采样器

也叫探管或探枪(probe),是最常用的干物料采样工具。其规格有多种,有带槽的单管或双管,具有锐利的尖端(图 2.1)。

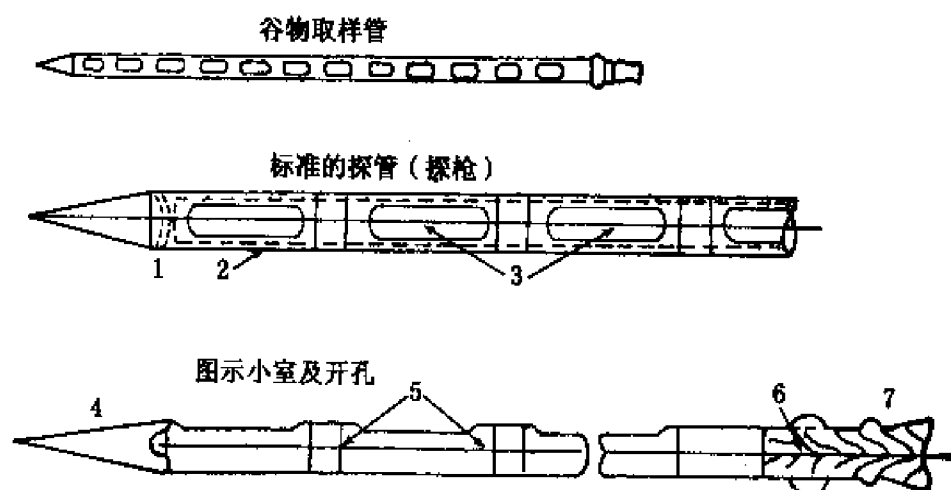


图 2.1 谷物取样器(探管)

1. 外层套管 2. 内层套管 3. 分隔小室 4. 尖顶端 5. 小室间隔 6. 锁扣 7. 固定木柄

### 2.1.3.2 锥形袋式取样器(图 2.2)

该种取样器是用不锈钢制作的,特点是具有一个尖头、锥形体和一个开启的进料口。

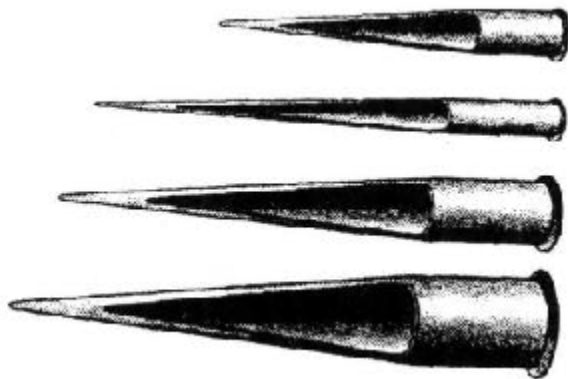


图 2.2 锥形袋式取样器

### 2.1.3.3 液体采样器

(1)空心探针。实际上是一个镀镍或不锈钢的金属管,直径为 25 mm,长度为 750 mm,管壁有长度为 715 mm,宽度为 18 mm 的孔,孔边缘圆滑,管下端为圆锥形,与内壁成  $15^\circ$  角,管上端装有把柄。常用做桶和小型容器的采样。

(2)炸弹式或区层式采样器(图 2.3)。为密闭的圆柱体,可用做散装罐的液体采样,能从贮存罐的任何指定区域采样。当到达贮罐底部时,一个阀提起,或如果在中间的深度取样时,它可由一根连在该阀的柱塞上的绳子手动提起。



图 2.3 炸弹式液体取样器

### 2.1.3.4 自动采样器

自动采样器可安装在饲料厂的输送管道、分级筛或打包机等处,能够定时、定量采集样品。自动采样器适合于大型饲料企业,其种类很多,根据物料类型和特性、输送设备等进行选择。

### 2.1.3.5 其他采样器

剪刀(或切草机)、刀、铲、短柄或长柄勺等也是常用的采样器具。

## 2.1.4 采样步骤和基本方法

### 2.1.4.1 采样的步骤

(1) 采样前记录。采样前, 必须记录与原料或产品相关的资料, 如生产厂家、生产日期、批号、种类、总量、包装堆积形式、运输情况、贮存条件和时间、有关单据和证明、包装是否完整、有无变形、破损、霉变等。

(2) 原始样品采集。也叫初级样品, 是从生产现场如田间、牧地、仓库、青贮窖、试验场等的一批受检的饲料或原料中最初采取的样品。原始样品应尽量从大批(或大数量)饲料或大面积牧地上, 按照不同的部位即深度和广度来分别采取一部分, 然后混合而成。原始样品一般不得少于 2 kg。

(3) 次级样品。也叫平均样品, 是将原始样品混合均匀或简单的剪碎混匀, 从中取出的样品。平均样品一般不少于 1 kg。

(4) 分析样品。也叫试验样品。次级样品经过粉碎、混匀等制备处理后, 从中取出的一部分即为分析样品, 用做样品分析用。分析样品的数量根据分析指标和测定方法要求而定。

#### 2.1.4.2 采样基本方法

虽然采样的方法随不同的物品而不同, 但一般来说, 采样的基本方法有两种: 几何法和四分法。

(1) 几何法。指把整个一堆物品看成一种具有规则的几何立体, 如立方体、圆柱体、圆锥体等。取样时首先把这个立体分成若干体积相等的部分(虽然不便实际去做, 但至少可以在想像中将其分开), 这些部分必须在全体中分布均匀, 即不只是在表面或只是在一面。从这些部分中取出体积相等的样品, 这些部分的样品称为支样, 再把这些支样混合即得样品。

几何法常用于采集原始样品和大批量的原料。

(2) 四分法。是指将样品平铺在一张平坦而光滑的一张方形纸或塑料布、帆布、漆布等上(大小视样品的多少而定), 提起一角, 使饲料流向对角, 随即提起对角使其流回, 如此法, 将四角轮流反复提起, 使饲料反复移动混合均匀, 然后将饲料堆成等厚的正四方形体或圆锥, 用药铲、刀子或其他适当器具, 在饲料样品方体上划一“十”字, 将样品分成 4 等份, 任意弃去对角的 2 份, 将剩余的 2 份混合, 继续按前述方法混合均匀、缩分, 直至剩余样品数量与测定所需要的用量相接近时为止。如图 2.4 所示。

首先将大量的子实、粉末在洁净的地板上堆成锥形, 然后用铲将堆移至另一处, 移动时将每一铲饲料倒于前一铲饲料之上, 这样使子实、粉末由锥顶向下流动到周围, 如此反复移动 3 次以上, 即可混合均匀。最后, 将饲料堆成圆锥形, 将顶部略略压平使呈圆台状, 再从上部中间分割为十字形的 4 等份, 弃去对角线的两部分, 缩减  $1/2$ , 然后, 如上法缩减至适当数量为止。

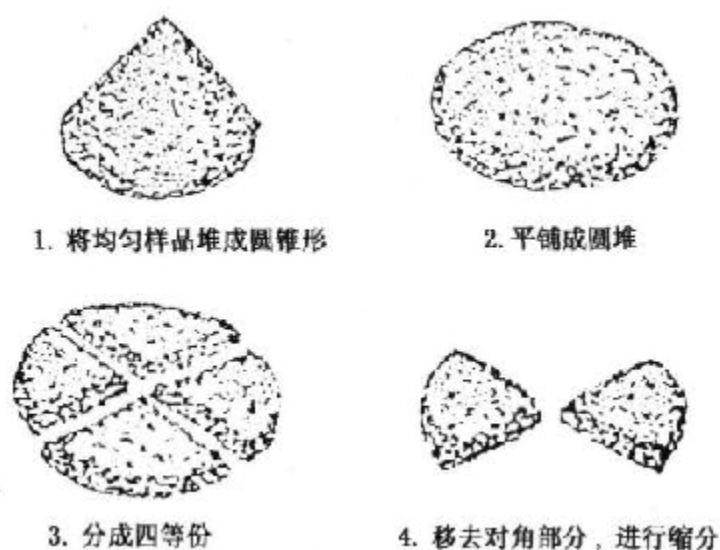


图 2.4 四分法示意图

四分法常用于小批量样品和均匀样品的采样或从原始样品中获取次级样品和分析样品。

也可采用分样器或四分装置代替上述手工操作。如常用的锥形分配器和具有分类系统的复合槽分配器, 分别如图 2.5 和图 2.6 所示。

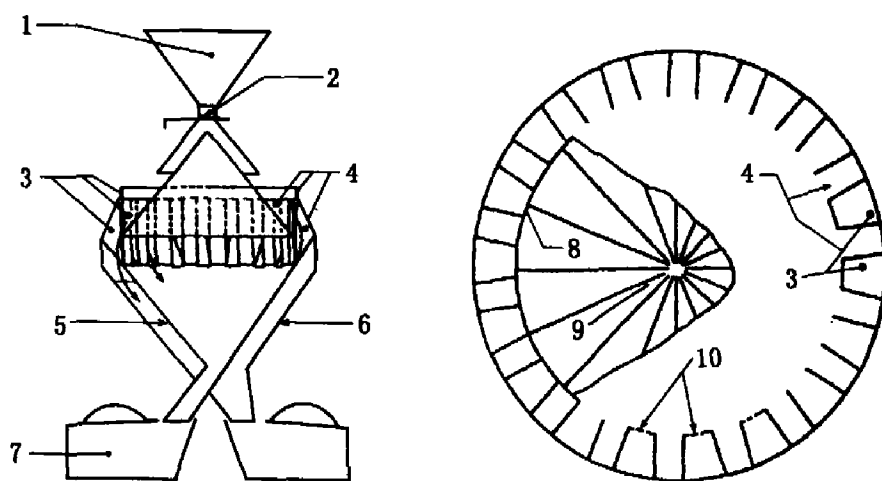


图 2.5 圆锥分样器

1. 加料斗 2. 截断阀门 3. 通向外斗的槽 4. 通向内斗的槽  
5. 内斗 6. 外斗 7. 容器 8. 圆锥底 9. 圆锥顶 10. 与圆锥底相连的槽

对粉末状、均匀度高的样品, 可直接通过四分法采集分析样品, 一般在 500 g 左右。对颗粒大、均匀度不好的饲料如子实饲料, 通过四分法可从原始样品中采集次级样品。次级样品至少在 1 kg 左右。

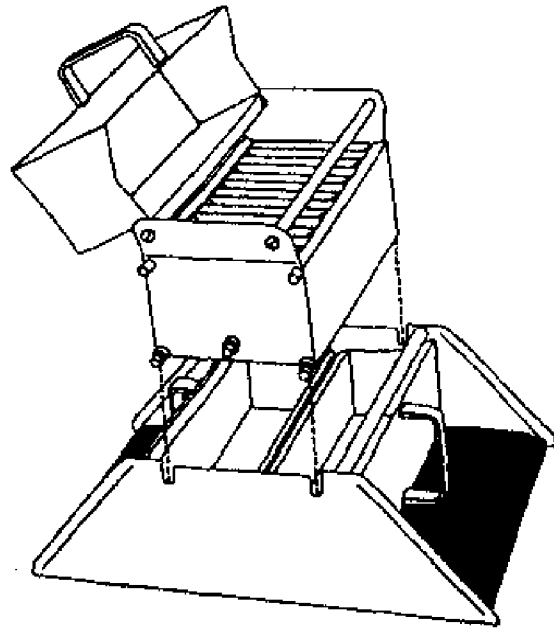


图 2.6 具备分类系统的复合槽分样器

对于不均匀的物品如各种粗饲料、块根、块茎饲料、动物屠体等,则需要将几何法和四分法结合起来反复使用,使用的次数随物品体积的大小和不均匀性质的情况而定。

#### 2.1.5 不同饲料样品的采集

不同饲料样品的采集因饲料原料或产品的性质、状态、颗粒大小或包装方式不同而异。

##### 2.1.5.1 粉状和颗粒饲料

(1)散装。散装的原料应在机械运输过程中的不同场所(如滑运道、传送带等处)取样。如果在机械运输过程中未能取样,则可用探管取样,但应避免因饲料原料不匀而造成的错误取样。

取样时,用探针从距边缘 0.5 m 的不同部位分别取样,然后混合即得原始样品。取样点的分布和数目取决于装载的数量,见图 2.7。也可在卸车时用长柄勺、自动选样器或机器选样器等,间隔相等时间,截断落下的料流取样,然后混合得原始样品。

(2)袋装。用抽样锥随意从不同袋中分别取样,然后混合得原始样品。每批采样的袋数取决于总袋数、颗粒大小和均匀度,有不同的方案,取样袋数至少为总袋数的 10%,也可以按  $\sqrt{\frac{\text{总袋数}}{2}}$  计算得出。中小颗粒饲料如玉米、大麦等取样

的袋数不少于总袋数的 5%。粉状饲料取样袋数不少于总袋数的 3%。总袋数在 100 袋以下,取样不少于 10 袋,每增加 100 袋需增加 1 袋。

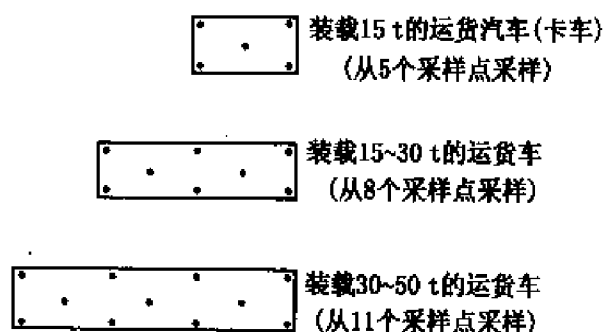


图 2.7 散装料取样示意图

取样时,用口袋探针从口袋的上下两个部位采样,或将袋平放,将探针的槽口向下,从袋口的一角按对角线方向插入袋中,然后转动器柄使槽口向上,抽出探针,取出样品。

大袋的颗粒饲料在采样时,可采取倒袋和拆袋相结合的方法取样,倒袋和拆袋的比例为 1:4。倒袋时,先将取样袋放在洁净的样布或地面上,拆去袋口缝线,缓慢地放倒,双手紧握袋底两角,提起约 50 cm 高,边拖边倒,至 1.5 m 远全部倒出,用取样铲从相当于袋的中部和底部取样,每袋各点取样数量应一致,然后混匀。拆袋时,将袋口缝线拆开 3~5 针,用取样铲从上部取出所需样品,每袋取样数量一致。将倒袋和拆袋采集的样品混合即得原始样品。

(3) 仓装。一种方法是原始样品在饲料进入包装车间或成品库的流水线或传送带上、贮塔下、料斗下、秤上或工艺设备上采集,具体方法:用长柄勺、自动或机械式选样器,间隔时间相同,截断落下的饲料流。间隔时间应根据产品移动的速度来确定,同时要考虑到每批选取的原始样品的总量。对于饲料级磷酸盐、动物性饲料粉和鱼粉应不少于 2 kg,而其他饲料产品则不低于 4 kg。另一种方法是针对贮藏在饲料库中的散状产品的原始样品。方法是按高度分层采样,即采样前将层表面划分为 6 个等份,在每一部分的四方形对角线的四角和交叉点 5 个不同地方采样。料层厚度在 0.75 m 以下时,从两层中选取,即从距料层表面 10~15 cm 深处的上层和靠近地面的下层选取;当料层厚度在 0.75 m 以上时,从 3 层中选取,即从距料层表面 10~15 cm 深处的上层、中层和靠近地面的下层选取,采集时从上而下进行。料堆边缘的点应距边缘 50 cm 处,底层距底部 20 cm。

圆仓可按高度分层,每层分内(中心)、中(半径的一半处)、外(距仓边 30 cm 左右)3 圈,圆仓直径在 8 m 以下时,每层按内、中、外分别采 1, 2, 4 个点,共 7 个

点;直径在 8 m 以上时,每层按内、中、外分别采 1,4,8 个点,共 13 个点。将各点样品混匀即得原始样品。

#### 2.1.5.2 液体或半固体饲料

(1)液体饲料。桶或瓶装的植物油等液体饲料应从不同的包装单位(桶或瓶)中分别取样,然后混合。取样的桶数如下:

7 桶以下,取样桶数不少于 5 桶。

10 桶以下,取样桶数不少于 7 桶。

10~50 桶,取样桶数不少于 10 桶。

51~100 桶,取样桶数不少于 15 桶。

101 桶以上,按不少于总桶数的 15% 扦取。

取样时,将桶内饲料搅拌均匀(或摇匀),然后将空心探针缓慢地自桶口插至桶底,然后堵压上口提出探针,将液体饲料注入样品瓶内混匀。

对散装(大池或大桶)的液体饲料按散装液体高度分上、中、下 3 层分层布点取样。上层距液面约 40 cm 处,中层设在液体中间,下层距池底 40 cm 处,3 层采样数量的比例为 1:3:1(卧式液池、车槽为 1:8:1)。采样时,用液体取样器在不同部位采样,并将各部位采集的样品进行混合,即得原始样品。原始样品的数量取决于总量,总量为 500 t 以下,应不少于 1.5 kg;501~1 000 t,不少于 2.0 kg;1 001 t 以上,不少于 4.0 kg。原始样品混匀后,再采集 1 kg 做次级样品备用。

(2)固体油脂。对在常温下呈固体的动物性油脂的采样,可参照固体饲料采样方法,但原始样品应通过加热熔化混匀后,才能采集次级样品。

(3)黏性液体。黏性浓稠饲料如糖蜜,可在卸料过程中采用抓取法,即定时用勺等器具随机采样。原始样品数量应为总量 1 t 至少采集 1 L。原始样品充分混匀后,即可采集次级样品。

#### 2.1.5.3 块饼类

块饼类饲料的采样依块饼的大小而异。

大块状饲料从不同的堆积部位选取不少于 5 大块,然后从每块中切取对角的小三角形(图 2.8),将全部小三角形块捶碎混合后得原始样品,然后再用四分法取分析样品 200 g 左右。

小块的油粕,要选取具有代表性者数 10 片(25~30 片),粉碎后充分混合得原始样品,再用四分法取分析样品约 200 g 左右。

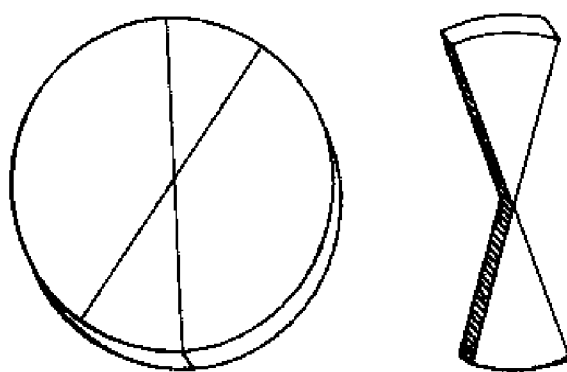


图 2.8 块饼类饲料采样示意图

#### 2.1.5.4 副食及酿造加工副产品

此类饲料包括酒糟、醋糟、粉渣和豆渣等。取样方法是：在贮藏池、木桶或贮堆中分上、中、下 3 层取样。视池、桶或堆的大小每层取 5~10 个点，每点取 100 g 放入瓷桶内充分混合得原始样品，然后从中随机取分析样品约 1 500 g，用 200 g 测定其初水分，其余放入大瓷盘中，在 60~65 ℃ 恒温干燥箱中干燥供制风干样品用。

对豆渣和粉渣等含水较多的样品，在采样过程中应注意避免汁液损失。

#### 2.1.5.5 块根、块茎和瓜类

这类饲料的特点是含水量大，由不均匀的大体积单位组成。采样时，通过采集多个单独样品来消除每个个体间的差异。样品个数的多少，根据样品的种类和成熟的均匀与否，以及所需测定的营养成分而定，见表 2.1。

表 2.1 块根、块茎和瓜类取样数量

种 类	个数/个	种 类	个数/个
一般块根、块茎饲料	10~20	胡萝卜	20
马铃薯	50	南 瓜	10

采样时，从田间或贮藏窖内随机分点采取原始样品 15 kg，按大、中、小分堆称重求出比例，按比例取 5 kg 次级样品。先用水洗干净，洗涤时注意勿损伤样品的外皮，洗涤后用布拭去表面的水分。然后，从各个块根的顶端至根部纵切具有代表性的对角 1/4、1/8 或 1/16……，直至适量的分析样品，迅速切碎后混合均匀，取 300 g 左右测定初水分，其余样品平铺于洁净的瓷盘内或用线串联置于阴凉通风处风干 2~3 d，然后在 60~65 ℃ 的恒温干燥箱中烘干备用。



## 2.1.5.6 新鲜青绿饲料及水生饲料

新鲜青绿饲料包括天然牧草、蔬菜类、作物的茎叶和藤蔓等。一般取样是在天然牧地或田间,在大面积的牧地上应根据牧地类型划区分点采样(图 2.9)。每区选 5 个以上的点,每点为  $1\text{ m}^2$  的范围,在此范围内离地面  $3\sim 4\text{ cm}$  处割取牧草,除去不可食草,将各点原始样品剪碎,混合均匀得原始样品。然后,按四分法取分析样品

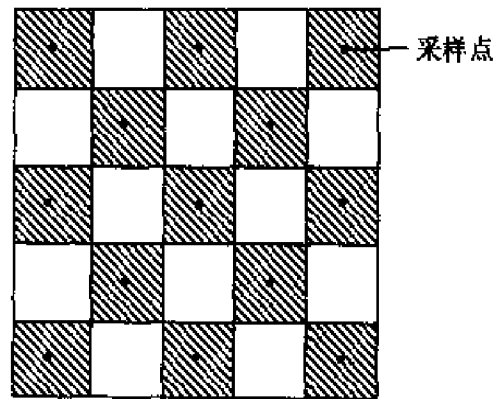


图 2.9 草地及田间采样示意图

$500\sim 1\,000\text{ g}$ ,取  $300\sim 500\text{ g}$  用于测定初水,一部分立即用于测定胡萝卜素等,其余在  $60\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$  的恒温干燥箱中烘干备用。

栽培的青绿饲料应视田块的大小,按上述方法等距离分点,每点采 1 至数株,切碎混合后取分析样品。该方法也适用于水生饲料,但注意采样后应晾干样品外表游离水分,然后切碎取分析样品。

## 2.1.5.7 青贮饲料

青贮饲料的样品一般在圆形窖、青贮塔或长形壕内采样。取样前应除去覆盖的泥土、秸秆以及发霉变质的青饲料。原始样品质量为  $500\sim 1\,000\text{ g}$ ,长形青贮壕的采样点视青贮壕长度大小分为若干段,每段设采样点分层取样(图 2.10 和图 2.11)。

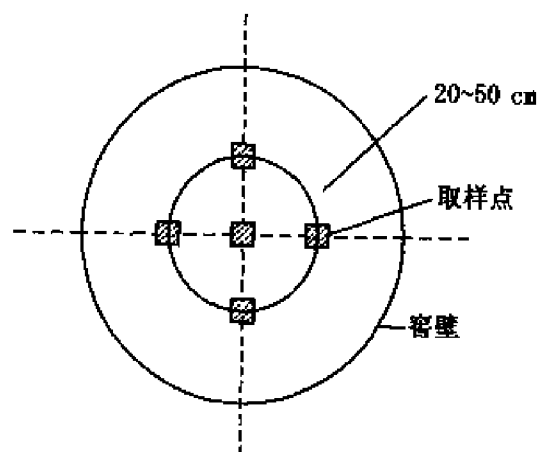


图 2.10 圆形青贮窖采样部位示意图

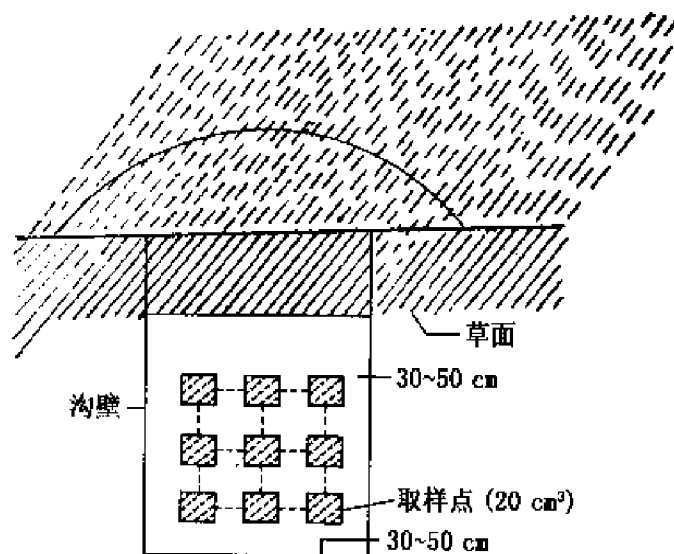


图 2.11 长形青贮壕采样部位示意图

#### 2.1.5.8 粗饲料

这类饲料包括秸秆及干草类。取样方法为在存放秸秆或干草的堆垛中选取 5 个以上不同部位的点采样(即采用几何法取样),每点采样 200 g 左右,采样时应注意由于干草的叶子极易脱落,影响其营养成分的含量,故应尽量避免叶子的脱落,采取完整或具有代表性的样品,保持原料中茎叶的比例。然后将采取的原始样品放在纸或塑料布上,剪成 1~2 cm 长度,充分混合后取分析样品约 300 g,粉碎过筛。少量难粉碎的秸秆渣应尽量捶碎弄细,并混入全部分析样品中,充分混合均匀后装入样品瓶中,切记不能丢弃。

## 2.2 样品的制备

样品的制备指将原始样品或次级样品经过一定的处理成为分析样品的过程。样品制备方法包括烘干、粉碎和混匀,制备成的样品可分为半干样品和风干样品。

### 2.2.1 风干样品的制备

风干饲料是指自然含水量不高的饲料,一般含水在 15% 以下,如玉米、小麦等作物子实、糠麸、青干草、蕹苕、配合饲料等。

风干样品的制备过程包括 3 个过程。

### 2.2.1.1 原始样品的采集

按照几何法和四分法采集。

### 2.2.1.2 次级样品的采集

对不均匀的原始样品如干草、秸秆等,可应经过一定处理如剪碎或捶碎等混匀,按“四分法”采得次级样品。对均匀的样品如玉米、粉料等,可直接用“四分法”采得次级样品。

### 2.2.1.3 分析样品制备

(1)制备设备。常用样品制备的粉碎设备有植物样本粉碎机、旋风磨、咖啡磨和滚筒式样品粉碎机(图 2.12)。其中最常用的有植物样本粉碎机和旋风磨。植物样本粉碎机易清洗,不会过热及使水分发生明显变化,能使样品经研磨后完全通过适当筛孔的筛。旋风磨粉碎效率较高,但在粉碎过程中水分有损失,需注意校正。

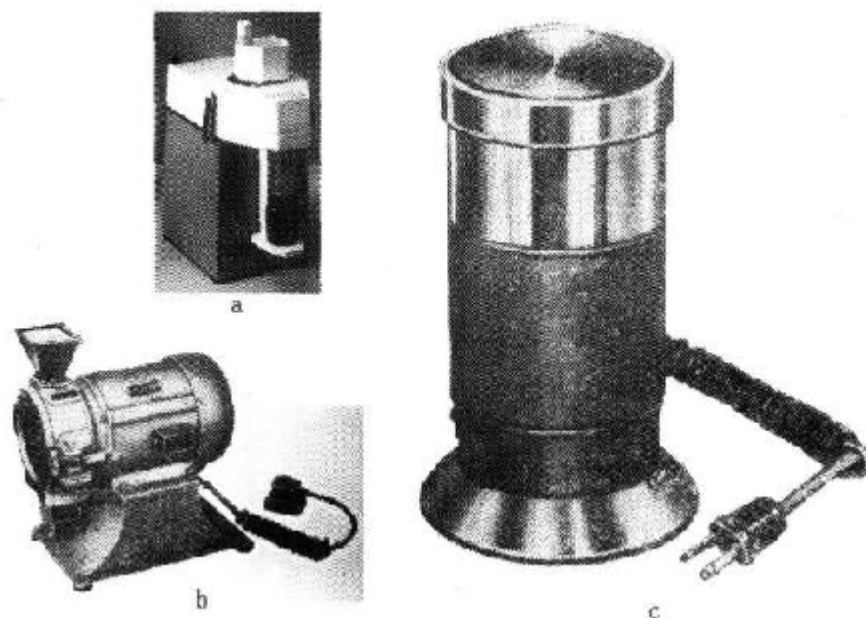


图 2.12 常见样品粉碎磨类型

a. 旋风磨 b. 植物样本粉碎机 c. 咖啡磨

注意磨的筛网的孔径大小不一定与检验用的大小相同。而粉碎粒度的大小直接影响分析结果的准确性。

(2)制备过程。次级样品用饲料样品粉碎机粉碎,通过孔径为 1.00~0.25 mm 孔筛即得分析样品。主要分析指标样品粉碎粒度要求见表 2.2。注意:不易粉碎的粗饲料如秸秆渣等在粉碎机中会剩留极少量难以通过筛孔,这部分决不可抛弃,应尽力弄碎如用剪刀仔细剪碎后一并均匀混入样品中,避免引起分

析误差。将粉碎完毕的样品 200~500 g 装入磨口广口瓶内保存备用,并注明样品名称、制样日期和制样人等。

表 2.2 主要分析指标样品粉碎粒度的要求

指 标	分析筛规格/目	筛孔直径/mm
水、粗蛋白、粗脂肪、粗灰分、钙、磷、盐	40	0.45
粗纤维、体外胃蛋白酶消化率	18	1.00
氨基酸,微量元素,维生素,脲酶活性,蛋白质溶解度	60	0.25

## 2.2.2 半干样品的制备(附:初水分测定)

### 2.2.2.1 半干样品的制备过程

半干样品是由新鲜的青饲料、青贮饲料等制备而成。这些新鲜样品含水量高,占样品质量的 70%~90%,不易粉碎和保存。除少数指标如胡萝卜素的测定可直接使用新鲜样品外,一般在测定饲料的初水含量后制成半干样品,以便保存,供其余指标分析备用。

初水是指新鲜样品在 60~65 ℃ 的恒温干燥箱中烘 8~12 h,除去部分水分,然后回潮使其与周围环境条件的空气湿度保持平衡,在这种条件下所失去的水分称为初水分。去掉初水分之后的样品为半干样品。

半干样品的制备包括烘干、回潮和称恒重 3 个过程。最后,半干样品经粉碎机磨细,通过 1.00~0.25 mm 孔筛,即得分析样品。将分析样品装入磨口广口瓶中,在瓶上贴上标签,注明样品名称、采样地点、采样日期、制样日期、分析日期和制样人,然后保存备用。

### 2.2.2.2 初水分的测定步骤

(1)瓷盘称重。在普通天平上称取瓷盘的质量。

(2)称样品重。用已知质量的瓷盘在普通天平上称取新鲜样品 200~300 g。

(3)灭酶。将装有新鲜样品的瓷盘放入 120 ℃ 烘箱中烘 10~15 min。目的是使新鲜饲料中存在的各种酶失活,以减少对饲料养分分解造成的损失。

(4)烘干。将瓷盘迅速放在 60~70 ℃ 烘箱中烘一定时间,直到样品干燥容易磨碎为止。烘干时间一般为 8~12 h,取决于样品含水量和样品数量。含水低、数量少的样品也可能只需 5~6 h 即可烘干。

(5)回潮和称重。取出瓷盘,放置在室内自然条件下冷却 24 h,然后用普通天平称重。

(6)再烘干。将瓷盘再次放入 60~70 ℃ 烘箱中烘 2 h。

(7)再回潮和称重。取出瓷盘,同样在室内自然条件下冷却 24 h,然后用普通天平称重。

如果两次质量之差超过 0.5 g,则将瓷盘再放入烘箱,重复(6)和(7)步骤,直至两次称重之差不超过 0.5 g 为止。以最低的质量即为半干样品的质量。将半干样品粉碎至一定细度即为分析样品。

(8)计算公式与结果表示:

$$w(\text{初水分}) = \frac{m(\text{新鲜样品}) - m(\text{半干样品})}{m(\text{新鲜样品})}$$

## 2.3 样品的登记与保管

### 2.3.1 样品的登记

制备好的风干样品或半干样品均应装在洁净、干燥的磨口广口瓶内作为分析样品备用。瓶外贴有标签,标明样品名称、采样和制样时间、采样和制样人等。此外,分析实验室应有专门的样品登记本,系统的详细记录与样品相关的资料,要求登记的内容如下。

(1)样品名称(一般名称、学名和俗名)和种类(必要时须注明品种、质量等级)。

(2)生长期(成熟程度)、收获期、茬次。

(3)调制和加工方法及贮存条件。

(4)外观性状及混杂度。

(5)采样地点和采集部位。

(6)生产厂家、批次和出厂日期。

(7)质量。

(8)采样和制样人姓名。

### 2.3.2 样品的保管

#### 2.3.2.1 保存条件

样品应避光保存,并尽可能低温保存,并做好防虫措施。

#### 2.3.2.2 保存时间

样品保存时间的长短应有严格规定,这主要取决于原料更换的快慢及买卖

双方谈判情况(如水分含量过高,蛋白质含量是否合乎要求)。此外,对某些饲料在饲喂后能出现问题,故该饲料样品应长期保存,备做复检用。但一般条件下原料样品应保留 2 周,成品样品应保留 1 个月(与对客户的保险期相同)。有时为了特殊目的饲料样品需保管 1~2 年。对需长期保存的样品可用锡铝纸软包装,经抽真空充氮气后(高纯氮气)密封,在冷库中保存备用。专门从事饲料质量检验监督机构的样品保存期一般为 3~6 个月。

饲料样品应由专人采集、登记、制备与保管。

### 思考题

1. 在采样过程中怎样才能正确获得所需有代表性样品?采样的目的是什么?对于不同的原样及不同形状、形态的原料应如何采样?
2. 什么是半干样品、风干样品,如何制备半干样品及风干样品?
3. 如何测定样品的初水分?
4. 对于制备好的样品,应如何登记和保管?

## 3 饲料物理性状检验

### 【内容提要】

饲料的鉴定是指根据饲料的形态特征、理化性质,鉴别饲料原料的种类、质量或混杂物的方法。饲料的鉴定方法有感官方法、物理方法、化学快速方法和化学分析法。本章主要介绍感官方法、物理方法、化学快速方法。本章举例介绍了重要饲料原料鱼粉、蛋氨酸和赖氨酸添加剂原料的鉴别方法。

### 3.1 饲料的鉴定方法

饲料的鉴定是指根据饲料的形态特征、理化性质,鉴别饲料原料的种类、质量或混杂物的方法。饲料的鉴定方法有感官方法、物理方法、快速化学方法和化学分析方法。其中,化学分析方法为定量分析,其余方法主要为定性分析。

#### 3.1.1 感官鉴定方法

此法是对样品不加以任何处理,直接通过感觉器官进行鉴定。

(1)视觉。观察饲料的形状、色泽、颗粒大小、有无霉变、虫子、硬块、异物等。

(2)味觉。通过舌舔和牙咬来辨别有无异味和干燥程度等。

(3)嗅觉。嗅辨饲料气味是否正常,鉴别有无霉臭、腐臭、氨臭、焦臭等。

(4)触觉。将手插入饲料中或取样品在手上,用指头捻,通过感触来判断粒度大小、软硬度、黏稠性、有无夹杂物及水分含量等。

感官鉴定是最普通、最初步、简单易行的鉴定方法。经验和熟练是技术人员最重要的检查先决条件,有经验的检验人员判断结果的准确性很高。

#### 3.1.2 物理鉴定方法

##### 3.1.2.1 筛别法

可用来判断颗粒的大小、细粉和异物含量及种类。

(1)颗粒粒度测定。粒度对原料的混合特性和制粒能力是一个非常重要的因素,也是饲料或原料在散仓内堵塞或起拱的因素,同时也是影响饲料利用率的重要因素。

粒度测定方法:将饲料样品通过孔径大小不同的一组分析筛(例如筛孔直径为0.5,1,2 mm),分别测定各级饲料的质量,按照公式计算颗粒的平均粒度。同时,也判断饲料样品中的异物种类和数量。

分级筛的层数有4层、8层、15层等。商业部关于饲料粉碎机的试验方法(SB 23-77)中,规定了使用4层筛法来测定饲料成品的粗细度。将100 g饲料样品,用孔径为2.00,1.10,0.425 mm和底筛(盲筛)组成的分析筛,在振动机上振动筛分,各层筛上物用感量为0.1 g的天平分别称重,按下式计算算术平均粒径( $\Phi$ ,mm):

$$\Phi = \frac{1}{100} \times \left\{ \frac{a_0 + a_1}{2} \times p_0 + \frac{a_1 + a_2}{2} \times p_1 + \frac{a_2 + a_3}{2} \times p_2 + \frac{a_3 + a_4}{2} \times p_3 \right\}$$

式中: $a_0, a_1, a_2, a_3$ 分别为由底筛上数各层筛的孔径(mm),筛比为2~2.35; $a_4$ 为假设的2.00 mm孔径筛的筛上物能全部通过的孔径,此处按筛比为2计算时, $a_4 = 4.00$  mm; $p_0, p_1, p_2, p_3$ 为由底筛上数各层筛的筛上物质量,g。

(2)细粉含量测定。细粉含量可反映颗粒饲料的加工质量,主要与饲料的调制和颗粒饲料的黏结性有关。

测定方法:将原始样品称重,然后通过一定孔径的分析筛,仔细收集细粉并称重,计算细粉的百分含量。也可称取筛上物质量,计算筛上物百分含量。本书11.1介绍的“配合饲料粉碎粒度测定法”即属此法,为采用3层筛法。

同一批生产的饲料的不同部分的细粉含量差异很大,因此需要检测多个样品或进行多次检测试验,以获得代表该批产品的检测结果。

### 3.1.2.2 容重法

(1)容重及测定意义。容重是指单位体积的饲料所具有的质量,通常以1 L体积的饲料质量计。各种饲料原料均有其一定的容重。测定饲料样品的容重,并与标准纯品的容重进行比较,可判断有无异物混入和饲料的质量。如果饲料原料中含有杂质或掺杂物,容重就会改变(或大或小)。在判断时,应对饲料样品进行仔细观察,特别要注意细粉粒。一般说来,掺杂物常被粉碎得特别细小以逃避检查。根据容重测定结果,可供检验分析人员做进一步的观察,如饲料的形状、颜色、粒度、软硬度、组织、气味、霉菌和污点等外观鉴别和化验分析。常见饲料的容重见表3.1。

(2)容重的测定方法。有排气式容重器测定法和简易测定法。下面介绍简易测定方法。



表 3.1 常见饲料的容重

 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 

饲料名称	容重	饲料名称	容重
麦(皮麦)	580	大麦混合糠	290
大麦(碎的)	460	大麦细糠	360
黑麦	730	豆饼	340
燕麦	440	豆饼(粉末)	520
粟	630	棉子饼	480
玉米	730	亚麻子饼	500
玉米(碎的)	580	淀粉糟	340
碎米	750	鱼粉	700
糙米	840	$\text{CaCO}_3$	850
麸	350	贝壳粉(粗)	630
米糠	360	贝壳粉(细)	600
脱脂米糠	426	盐	830

资料来源:夏玉宇、朱丹编著,饲料质量分析检验,北京:化学工业出版社,1994。

①样品制备:饲料样品应彻底混合,无需粉碎。

②仪器与设备:粗天平(感量  $0.1 \text{ g}$ );  $1\,000 \text{ mL}$  量筒 4 个;不锈钢盘 ( $30 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$ ) 4 个;小刀、药匙等。

③测定步骤:

a. 用四分法取样,然后将样品非常轻而仔细地放入  $1\,000 \text{ mL}$  的量筒内,用药匙调整容积,直到正好达  $1\,000 \text{ mL}$  刻度为止。注意:放入饲料样品时应轻放,不得打击。

b. 将样品从量筒中倒出并称重。

c. 反复测量 3 次,取平均值,即为该饲料的容重。

### 3.1.2.3 比重鉴别法

比重鉴别法是根据饲料样品在一定比重的溶剂中的沉浮情况来鉴别是否混入异物、异物种类和混入比例。该方法比较简单有效,在实际中易于应用。例如使用下述比重液,可鉴别出鱼粉及其他种饲料中混杂的土砂等异物。

一般使用比重液有:低汽油,  $0.64$ ; 甲苯,  $0.88$ ; 水,  $1.00$ ; 氯仿,  $1.47$ ; 四氯化碳,  $1.58$ ; 三溴甲烷,  $2.90$ 。

混入土砂的鉴别方法:用试管或细长的玻璃杯盛上饲料样品,加入  $4 \sim 5$  倍的蒸馏水(或干净自来水等),充分振荡混合,静置一段时间后,因为土砂等异物的比重大,所以沉降在试管的最底部,很容易鉴别出来。

#### 3.1.2.4 颗粒耐久性指数(PDI)测定

该指数用来测定饲料输送系统中抗破坏的相对能力。

#### 3.1.2.5 硬度测定

借助专用仪器来测定颗粒的相对硬度。在测定时,需测定大量颗粒,以获得有代表性的平均数据。

#### 3.1.2.6 显微镜镜检鉴别法 详见 3.2 饲料的显微镜检测。

### 3.1.3 快速化学鉴定方法

快速化学鉴定方法是利用饲料成分的化学性质所进行的点滴试验,主要用做定性分析,以快速判断饲料中是否存在某些特定的化学物质,如淀粉、脲酶等。这些方法简便易行,在饲料厂和养殖场均可使用。

下面介绍几种物质或饲料原料的鉴定方法。

#### 3.1.3.1 淀粉的检验

在白色器皿内放上少量饲料样品,加入碘-碘化钾溶液,若有淀粉存在,则呈明显的深蓝色。例如,鱼粉、肉粉等动物性饲料内应当不含淀粉,但如果应用这个方法检查出有淀粉,就说明掺杂有淀粉或植物性成分。

#### 3.1.3.2 木质素的检验

取少量饲料样品,加入  $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  间苯三酚 95% 酒精溶液至浸过样品,再加入浓盐酸 1~2 滴。若有木质素存在,则呈深红色。此时,再加入水,呈深红色的木质素会浮在水面上,就更容易分辨。例如,在麦麸或其他饲料内混有营养价值极低的花生壳、糠壳、糠屑等木质素粉末,用肉眼很难判断,但应用此方法,就很容易检查出来。

#### 3.1.3.3 尿素的检验

(1)试剂。

①脲酶溶液:将 0.2 g 脲酶粉末溶于 50 mL 蒸馏水中。

②标准尿素溶液:尿素含量为 0,10,20, ...,  $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

③  $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  甲基红指示剂。

(2)测定步骤。

①称取饲料样品 10 g,加入 100 mL 蒸馏水,搅拌,然后用滤纸过滤。

②分别各取 1 mL 标准溶液和饲料样品溶液于试管中。

③在各试管中分别加 2~3 滴甲基红指示剂,然后加 2~3 滴脲酶溶液(等量加入)。反应 3~5 min。

④如果存在尿素,则将出现深红紫色;无尿素时,则呈显黄色。将试验样品与

不同标准量尿素样比较,可大致判断尿素的掺入量。试验应在 10~12 min 观察完毕。

#### 3.1.3.4 皮革粉的检验

将 5 g 钼酸铵溶解于 100 mL 蒸馏水中,再倒入 35 mL 硝酸,即得钼酸铵溶液。挑选褐色至黑色的样品颗粒,放入培养皿中,加 5 滴钼酸铵溶液,然后静置 10 min。皮革粉不会有颜色变化,肉骨粉则显出绿黄色。

#### 3.1.3.5 血的检验

(1)试剂。

①溶液 a:溶解 1 g N,N-二甲基苯胺于 100 mL 冰醋酸内,然后用 150 mL 蒸馏水稀释。

②冰醋酸。

③3%双氧水。

(2)步骤。

①将少量样品放于玻璃片上。

②用 4 体积的溶液 a 和 1 体积的 3%双氧水混合(即用即配),加 1~2 滴混合液于样品上。如有血存在,则围绕血粒四周呈现深绿色,无血粒时为淡绿色。可放在低倍显微镜下观察。

#### 3.1.3.6 砂分含量的测定

本实验方法适用于酸不溶性烧灼残渣的定量测定。

(1)试剂。

15%盐酸溶液:量取盐酸(GB 622)约 203 mL,用蒸馏水稀释至 500 mL。

(2)操作方法。

①将预先用稀盐酸煮过 1~2 h 并洗净的 50 mL 瓷坩埚在 550~600 °C 高温炉中灼烧 30 min,稍冷却取出,在干燥器中冷却 30 min,准确称重至 0.001 g。

②准确称取样品 5 g(精确至 0.001 g),置于坩埚中。

③将坩埚先在电炉上逐步加热,使样品充分炭化,而后将坩埚移入高温炉中,550~600 °C 下灼烧 4 h,至颜色变白。如仍有炭粒,在高温炉中继续灼烧 1 h;如仍有可疑黑点存在,则放冷后用蒸馏水弄湿,在(105±2) °C 烘箱中烘干,而后再移入高温炉中灼烧 1 h,稍冷却后取出,在干燥器中冷却 30 min。

④坩埚中加 15%盐酸溶液 50 mL,移至 300 mL 的烧杯中,并用少量蒸馏水充分冲洗坩埚,洗液并入烧杯中,小心加热煮沸 30 min,用无灰滤纸趁热过滤,并用热蒸馏水洗净,直至流下的洗液不呈酸性为止。

⑤将滤纸和滤渣一起移入原坩埚中,先在(105±2) °C 烘箱中烘干 1 h,再移

入 550~600℃ 高温炉中灼烧 30 min, 稍冷却后取出, 再在干燥器中冷却 30 min, 准确称重(准至 0.001 g)。

(3) 计算。砂分的质量分数按下列公式计算:

$$w(\text{砂分}) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

式中:  $m_0$  为坩埚质量, g;  $m_1$  为坩埚加样品质量, g;  $m_2$  为坩埚加样品灼烧后质量, g。

## 3.2 饲料的显微镜检测

近年来, 显微镜检测技术的不断提高以及在饲料分析上的应用, 使饲料的微生物分析法和生物鉴定法有了新的发展, 大大改进了饲料的物理检验。

### 3.2.1 饲料显微镜检测的原理

饲料显微镜检测是以动植物形态学、组织细胞学为基础, 将显微镜下所见饲料的形态特征、物化特点、物理性状与实际使用的饲料原料应有的特征进行对比分析的一种鉴别方法。

常用的显微镜检技术包括体视显微镜检技术和生物显微镜检技术, 前者以被检样品的外部形态特征为依据, 如表面形状、色泽、粒度、硬度、破碎面形状等; 后者以被检样品的组织细胞学特征为依据。由于动植物形态学在整体与局部的特征上具有相对的独立性, 各部位组织细胞学上具有特异性, 因而不论饲料加工工艺如何处理, 都或多或少地保留一些用于区别诸种饲料的典型特征, 这就使饲料显微镜检测结果具有稳定性与准确性。饲料显微镜镜检的准确程度取决于对原料特征的熟悉程度及应用显微技术的熟练程度。

### 3.2.2 饲料显微镜检测的目的和特点

饲料原料或产品进行显微镜检测的主要目的包括以下几个方面:

- (1) 检查饲料原料中应有的成分是否存在。
- (2) 检查是否含有有害的成分。
- (3) 检查是否存在污染物。
- (4) 检查是否含有有毒的植物和种子。
- (5) 检查处理是否恰当。
- (6) 检查是否污染霉菌、昆虫或啮齿类的排泄物。

(7)检查是否混合均匀。

(8)弥补化学分析或其他分析的不足。

饲料显微镜检测的主要特点是快速、简便、准确。这种检测手段既不需要大型的仪器设备,也不需要复杂的检前准备,只需将被检样品按要求进行研磨,过筛或脱脂处理即可,即使生物显微镜检测的样品处理也非常简单。此外,饲料的显微镜检测不仅可做定性分析,而且可做定量分析,可对原料成分的纯度进行准确分析。通过饲料显微镜检测可鉴别伪劣商品,控制饲料加工,贮藏品质,弥补化学分析之不足。

目前,在一些国家,显微镜检测已被规定为饲料质量诉讼案的法定裁决方法之一。

### 3.2.3 饲料显微检测所需设备

#### 3.2.3.1 体视显微镜

带有宽视野目镜和物镜,放大范围为10~45倍。采用平行光比采用会聚系统要好,可减少眼睛的疲劳。增加边角物镜镜头可加速检测速度。

#### 3.2.3.2 生物显微镜

放大倍数为40~1 000倍,在预算许可的情况下,尽量购置最佳的显微镜。

#### 3.2.3.3 其他

(1)离心机。 $1\ 200\sim 1\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

(2)烘箱。

(3)抽滤器。

(4)分析天平。

(5)分级筛。孔径为2.00,0.84,0.42 mm。

(6)电热板,载玻片,盖玻片,探针,镊子(最好是修理钟表用的),镜头纸,滤纸,漏斗,滴管,烧杯,试管,小刷子,瓷盘等。

### 3.2.4 饲料显微检测的基本步骤

#### 3.2.4.1 体视显微镜检测

(1)原始样品。采集方法见2饲料样品的采集与制备。将待测样品平铺于纸上,仔细观察,记录原始样品的外观特征如颜色、粒度、软硬程度、气味、霉变、异物等情况。观察中应特别注意细粉粒,因为掺假,掺杂物往往被粉得很细以逃避检查。将记录下来的特征与参照样特征进行比较,判断是否有疑。

(2)样品前处理。粉状饲料可不制备即可用做进一步分析;颗粒饲料或大小

差异很大的饲料则需减小颗粒大小,以便观察;硬颗粒饲料必须进行粉化处理(有时用水,但可能影响某些有机物的分析),以便使所有微粒都分离开来。减小粒度的方法有两种:

①将饲料样品粉碎过孔径 0.42 mm 的分级筛,以便在粒度大致相同的基础上进行观察。

②用研钵和杵将较大的样品捣碎,但尽量使原粒度均匀的组分保持原料的粒度级别。此法最常用,以便获得样品的主要组分的最大信息量。

(3)分离。称取 2.0 g 样品,用分级筛进行筛分,将各级组分分别称重。

(4)脱脂。对高脂含量的样品,脂肪溢于样品表面,往往黏附许多细粉,使观察产生困难。可用乙醚、四氯化碳等有机溶剂脱脂,然后烘箱干燥 5~10 min 或室温干燥后,可使样品清晰可辨。

脱脂的样品可另外称样进行。脱脂后,将样品过分级筛,称取各级组分的质量。

(5)观察。将筛分好的各组样品分别平铺于纸上或培养皿中,置于体视显微镜下,从低倍(7 倍)至高倍(20~40 倍)进行检查。从上到下,从左到右顺序逐粒观察,先粗粒,后细粒,边检查边用探针将识别的样品分类,同时探测各种颗粒的硬度、结构、表面特征,如色泽、形状等,并做记载。

将检出的结果与生产厂家出厂记录的成分相对照,即可对掺假、掺杂、污染等质量情况做出初步测定。初检后再复检一遍,如果形态特征不足以鉴定,则可进一步用生物显微镜观察组织学特征和细胞排列情况,以便做出最后判定。对 0.42 mm 孔径筛的筛下物尤其注意,因一般掺杂物都粉碎得很细以逃避检测。

饲料显微镜镜检的基本步骤可用图 3.1 来说明。

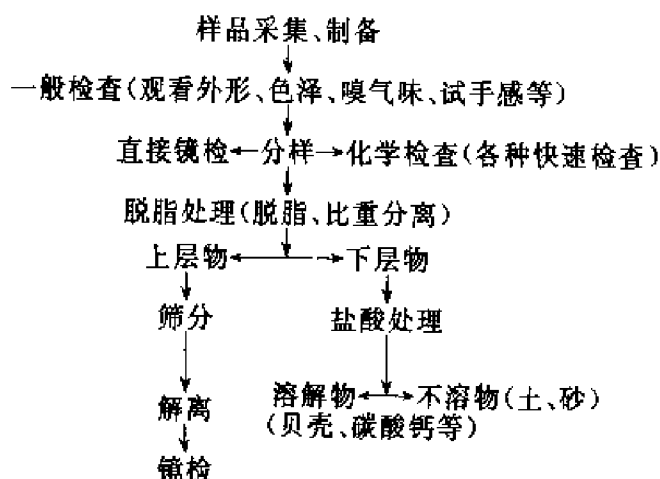


图 3.1 饲料显微镜镜检基本步骤示意图

### 3.2.4.2 生物显微镜检测

当某种异物掺入较少且磨得很细时,在体视镜下很难辨认,需通过生物镜进行观察。

(1)样品处理。生物镜观察的样品,一般采用酸与碱进行处理。对于不同的原料,所用酸碱浓度和处理时间也不同。动物类原料多用酸处理,植物类和甲壳类需酸和碱处理。对于动物中的单纯蛋白,如鱼粉、肉骨粉、水解羽毛粉等,只需用 1.25% 的硫酸溶液处理 5~15 min;而对含角蛋白的样品,如蹄角粉、皮革粉、生羽毛粉、猪毛等需用 50% 的硫酸溶液处理,时间也稍长;动物中的甲壳类和植物中的玉米粉、麸皮、米糠、饼粕类等先用 1.25% 的硫酸溶液,再用  $12.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液处理,时间 10~30 min。稻壳粉和花生壳粉等硅质化程度高和含纤维较高的样品需分别用 50% 的硫酸溶液和  $500\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液处理,对各种样品的处理时间可根据经验而定。

处理步骤如下:

过筛(粒大过 10 目/2.00 mm 孔径,粒小过 20 目/0.84 mm 孔径)→酸处理(加温)→过滤→蒸馏水冲洗 2~3 次(必要时→碱处理,加温→过滤→蒸馏水冲洗 2~3 次)→制片。

(2)制片与观察。取少量处理好的样品于载玻片上,加适量载液并将样品铺平,力求薄而匀,载液可用 1:1:1 的蒸馏水:水合氯醛:甘油,也可用矿物油等,单纯用蒸馏水也较普遍。

观察时,应注意样片的每个部位,而且至少要检查 3 个样片后再做综合判断。

### 3.2.4.3 定量分析

定量分析不如定性分析容易,受技术人员的观察技能和实践经验影响。镜检人员应不断改进、提高操作技能,以使显微镜检工作做得更好。下面介绍几种主要方法及实例。

(1)采样和称重。大部分精确的定量测定是检出某一成分的所有颗粒,分别称量各级颗粒。因为操作较困难,所以一般取样可以少些,减少工作量(假设少量的样品就能反映所有特点)。最好样品是有色的(如棉子粕)或晶状物(如盐),那么在 10~30 倍的放大镜下就可以很容易辨别。如果测出含淀粉的胚乳粉并分离、称重,则可以肯定判断粉碎的成分(如玉米)。

(2)以标准物为对照。使用某种标准含量的、密度基本相同的物质作为标准,往往用食盐,或使用已知质量比例的普通组分混合物,例如一种含 1 g 盐、5 g 硫酸铜和 94 g 磷酸二钙的混合物,或使用两种组分的一整套混合物标准如以 10%

递增的 10 : 90, 20 : 80, 30 : 70, 40 : 60, 50 : 50 的混合物或以 5% 递增的 35 : 65, 40 : 60, 45 : 55 等的混合物。肉眼不能辨别 5 个单位以下的比例, 因此不可能得到更精确的结果。在显微镜下, 必须数几个未知视野来确定正确的比例。

(3) 数细胞。需要准备一个细胞计数框和生物显微镜。细胞计数载玻片(血细胞计数载玻片)或普通载玻片带有刻度计数框均可以。载玻片要仔细校认标准的刻度, 待测物要做相同的处理, 每次测定要数几个载玻片, 取平均值。

(4) 用化学分析法做验证。可用粗蛋白含量来推算每种成分的含量(直接或间接), 或验证由其他方法获得的百分比含量。显微镜检员要多次验证每种成分的相关比例, 或找到不平衡的原因。差异值应该保持在  $\pm 10\%$ , 最好能在  $\pm 5\%$ 。

### 3.2.5 霉菌毒素的显微镜检测

霉菌毒素污染是饲料行业中的一个突出问题, 可给饲料生产家和养殖者带来惨重的损失。有许多方法可以用来检测霉菌毒素, 显微镜检测就是一种简便有效的方法。

霉菌毒素的显微镜检测又可称为“黑光灯法”。该测试法利用黑暗视野中的长波紫外线进行检测。若见到明亮的绿黄色荧光(BGYF)则显示受黄曲霉毒素污染。所采集的样品必须具有代表性, 所有谷粒应被破碎, 观测由一位有经验的操作者来实施, 这样“黑光灯法”检测结果比较准确。玉米贮藏过程中尽管可能有黄曲霉毒素污染, 但由于荧光减弱, 会呈现假性结果。

### 3.2.6 常见饲料原料的显微特征

#### 3.2.6.1 常见植物性饲料原料的显微特征

##### (1) 谷物类原料。

① 玉米及制品: 整粒玉米形似牙齿, 黄色或白色, 主要由玉米皮、胚乳、胚芽 3 部分组成。胚乳包括糊粉层、角质淀粉和粉质淀粉。

玉米粉碎后各部分特征明显。体视镜下玉米表皮为薄而半透明, 略有光泽, 呈不规则片状, 较硬, 其上有较细的条纹。角质淀粉为黄色(白玉米为白色), 多边, 有棱, 有光泽, 较硬; 粉质淀粉为疏松、不定型颗粒, 白色, 易破裂, 许多粉质淀粉颗粒和糊粉层的细小粉末常黏附于角质淀粉颗粒和玉米皮表面, 另外还可见漏斗状帽盖和质轻而薄的红色片状颖花。

生物镜下可见玉米表皮细胞, 长形, 壁厚, 相互连接排列紧密, 如念珠状。角质淀粉的淀粉粒为多角形; 粉质淀粉淀粉粒为圆形, 多成对排列。每个淀粉粒中



央有一个清晰的脐点,脐点中心向外有放射性裂纹。

②小麦及制品:整粒小麦为椭圆形,浅黄色至黄褐色,略有光泽。在其腹面有一条较深的腹沟,背部有许多细微的波状皱纹。主要由种皮、胚乳、胚芽3部分组成。

小麦麸皮多为片状结构,其片大小、形状依制粉程度不同而不同,通常可分为大片麸皮和小片麸皮。大片麸皮片状结构大,表面上保留有小麦粒的光泽和细微横向纵纹,略有卷曲,麸皮内表面附有许多淀粉颗粒。小片麸皮片状结构小,淀粉含量高。小麦的胚芽扁平,浅黄色,含有油脂,粉碎时易分离出来。

高倍镜下可见小麦麸皮由多层组成,具有链珠状的细胞壁,仅一层管状细胞,在管细胞上整齐地排列一层横纹细胞。链珠状的细胞壁清晰可见。小麦淀粉颗粒较大,直径达 $30\sim 40\mu\text{m}$ ,圆形,有时可见双凸透镜状,没有明显的脐点。

③高粱及制品:整粒高粱为卵圆形至圆形,端部不尖锐,在胚芽端有一个颜色加深的小点,从小点向四周颜色由深至浅,同时有向外的放射状细条纹,高粱外观色彩斑驳,由棕、浅红棕至黄白等多色混杂,外壳有较强的光泽。

在体视镜下可见皮层紧紧附在角质淀粉上,粉碎物粒度大小参差不齐,呈圆形或不规则形状,颜色因品种而异,可为白、红褐、淡黄等。角质淀粉表面粗糙,不透明;粉质淀粉色白,有光泽,呈粉状。

在高倍镜下,高粱种皮和淀粉颗粒的特征在鉴定上尤为重要。其种皮色彩丰富,细胞内充满了红色、橘红、粉红和黄色的色素颗粒,淡红棕色的色素颗粒常占优势。高粱的淀粉颗粒与玉米淀粉颗粒极为相似,也为多边形,中心有明显的脐点并向外呈放射状裂纹。

④稻谷及制品:整粒稻谷由内颖、外颖(或仅有内颖)、种皮、胚乳、胚芽构成,长形,外表粗糙,其上有刚毛,颜色由浅黄至金黄色。

稻谷粉碎后用做饲料的主要有粗糠(统糠)、米糠和碎米。粗糠主要是稻壳的粉碎物。在体视显微镜下稻谷壳呈较规则的长形块状,一些交错的纹理凹陷而使得突起部分呈枳格状排布,并闪着光泽,如珍珠亮点,可见刚毛。高倍镜下,可见管细胞上纵向排布的弯曲细胞,细胞壁较厚,这种特有的细胞排列方式是稻谷壳在生物显微镜下的主要特征。米糠是一层种皮,由于稻谷的种皮包裹在胚乳、胚芽之外不易脱落,因此在米糠中常有许多碎米,体视镜下,米糠为无色透明,柔软,含油脂或不含油脂(全脂米糠或脱脂米糠)的薄片状结构,其中还有一些碎小的稻壳,碎米粒较小,具有剔透晶莹之感。生物镜下米糠的细胞非常小,细胞壁薄而呈波纹状,略有规律的细胞排列形式似筛格状。米粒的淀粉粒小呈圆形,有脐点,常聚集成团。

## (2) 饼粕类原料。

### ① 大豆饼粕：大豆饼粕主要由种皮、种脐、子叶组成。

在体视镜下可见明显的大块种皮和种脐，种皮表面光滑，坚硬且脆，向内面卷曲。在 20 倍放大条件下，种皮外表面可见明显的凹痕和针状小孔，内表面为白色多孔海绵状组织，种脐明显，长椭圆形，有棕色、黑色、黄色。浸出粒中子叶颗粒大小较均匀，形状不规则，边缘锋利，硬而脆，无光泽不透明，呈奶油色或黄褐色。由豆饼粉碎后的粉碎物中子叶因挤压而成团，近圆形，边缘浑圆，质地粗糙，颜色外深内浅。

高倍镜下大豆种皮是大豆饼粕的主要鉴定特征。在处理后的的大豆种皮表面可见多个凹陷的小点及向四周呈现的辐射状裂纹，犹如一朵朵小花，同时还可看见表面的“工”字形细胞。

② 花生饼粕：花生饼粕以碎花生仁为主，但仍有不少花生种皮、果皮存在，体视镜下能找到破碎外壳上的成束纤维脊，或粗糙的网络状纤维，还能看见白色柔软有光泽的小块。种皮非常薄，呈粉红色、红色或深紫色，并有纹理，常附着在子仁的碎块上。

生物镜下，花生壳上交错排列的纤维更加明显，内果皮带有小孔，中果皮为薄壁组织，种皮的表皮细胞有 4~5 个边的厚壁，壁上有孔，由正面观可看到细胞壁上有许多指状突起物。子仁的细胞大，壁多孔，含油滴。

③ 棉子饼粕：棉子饼粕主要由棉子仁、少量的棉子壳、棉纤维构成。在体视显微镜下，可见棉子壳和短绒毛黏附在棉子仁颗粒中，棉纤维中空、扁平、卷曲；棉子壳为略凹陷的块状物，呈弧形弯曲，壳厚，棕色、红棕色。棉仁碎粒为黄色或黄褐色，含有许多黑色或红褐色的棉酚色素腺。棉子压榨时将棉仁碎片和外壳都压在一起了，看起来颜色较暗，每一碎片的结构难以看清。

生物镜下可见棉子种皮细胞壁厚，似纤维，带状，呈不规则的弯曲，细胞空腔较小，多个相邻细胞排列呈花瓣状。

④ 菜子饼粕：在体视镜下，菜子饼粕中的种皮仍为主要的鉴定特征。一般为很薄的小块状，扁平，单一层，黄褐色至红棕色。表面有油光泽，可见凹陷刻窝。种皮和子仁碎片不连在一起，易碎。种皮内表面有柔弱的半透明白色薄片附着。子叶为不规则小碎片，黄色无光泽，质脆。

生物镜下，菜子饼粕最典型的特征是种皮上的栅栏细胞，有褐色色素，为 4~5 边形，细胞壁深褐色，壁厚，有宽大的细胞内腔，其直径超过细胞壁宽度，表面观察，这些栅栏细胞在形状、大小上都较近似，相邻两细胞间总以较长的一边相对排列，细胞间连接紧密。

⑤向日葵粕：其中存在着未除净的葵花子壳是主要的鉴别特征。向日葵粕为灰白色，壳为白色，其上有黑色条纹。由于壳中含有较高的纤维素、木质素，通常较坚韧，呈长条形，断面也呈锯齿状。子仁的粒度小，形状不规则，黄褐或灰褐，无光泽。高倍镜下可见种皮表皮细胞长，有工字形细胞壁，而且可见双毛，即两根毛从同一个细胞长出。

#### 3.2.6.2 常见动物性原料的显微特征

(1)鱼粉。鱼粉一般是将鱼加压、蒸煮、干燥粉碎加工而成。多为棕黄色至黄褐色，粉状或颗粒状，有烤鱼香味。在体视镜下，鱼肉颗粒较大，表面粗糙，用小镊子触之有纤维状破裂，有的鱼肌纤维呈短断片状。鱼骨是鱼粉鉴定中的重要依据，多为半透明或不透明的碎片，仔细观察可找到鱼体各部位的鱼骨如鱼刺、鱼脊、鱼头等。鱼眼球为乳白色玻璃球状物，较硬。鱼鳞是一种薄平而卷曲的片状物，半透明，有圆心环纹。

(2)虾壳粉。虾壳粉是对虾或小虾脱水干燥加工而成的。在显微镜下的主要特征是触角、虾壳及复眼。虾触须以片断存在，呈长管状，常有4个环节相联；虾壳薄而透明。头部的壳片则厚而不透明，壳表面有平行线，中间有横纹，部分壳有十字形线或玫瑰花形线纹；虾眼为复眼，多为皱缩的小片，深紫色或黑色，表面上有横影线。

(3)蟹壳粉。蟹壳粉的鉴别主要依据蟹壳在体视镜下的特征。蟹壳为小的无规则几丁质壳形状，壳外表多为橘红色，而且多孔，有时蟹壳可破裂成薄层，边缘较卷曲，褐色如麦皮。在蟹壳粉中常可见到断裂的蟹螯枝头部。

(4)贝壳粉。体视镜下贝壳粉多为小的颗粒状物，质硬，表面光滑，多为白色至灰色，光泽暗淡，有些颗粒的外表面具有同心或平行的线纹。

(5)骨粉及肉骨粉。在肉骨粉中肉的含量一般较少，颗粒具油腻感，浅黄至深褐色，粗糙，可见肌纤维。骨为不定型块状，边缘浑圆，灰白色，具有明显的松质骨，不透明。肉骨粉及骨粉中还常有动物毛发，长而稍卷曲，黑色或灰白色。

(6)血粉。喷雾干燥的血粉多为血红色小珠状，晶亮；滚筒干燥的血粉为边缘锐利的块状，深红色，厚的地方为黑色，薄的地方为血红色，透明，其上可见小血细胞亮点。

(7)水解羽毛粉。其多为碎玻璃状或松香状的小块状。透明易碎，浅灰、黄褐至黑色，断裂时常呈扇状边缘。在水解羽毛粉中仍可找到未完全水解的羽毛残枝。

### 3.3 掺假鱼粉的鉴别

鱼粉是优质的蛋白质补充饲料,粗蛋白质含量高达 50%~70%,并且氨基酸种类齐全,赖氨酸含量丰富,磷、钙含量高,铁和碘的含量也高,并且含丰富的维生素 A、维生素 D、维生素 B<sub>12</sub>和未知生长因子。但是,目前有些供应商为了赚钱,常常在鱼粉中掺入砂土、稻糠、贝壳粉、尿素、虾壳粉、蟹壳粉、棉子饼、菜子饼、羽毛粉、血粉等,这些鱼粉通过常规化学分析,粗蛋白质含量仍很高,但由于掺假成分的影响,其消化利用率及饲料营养价值很低。因此,如何判断鱼粉是否掺假是饲料生产单位和动物养殖单位极为关注的问题。

鉴别鱼粉是否掺假,一般采用感官鉴定、物理检验和化学分析 3 种方法。

#### 3.3.1 感官鉴别

优质鱼粉多为棕黄色或黄褐色,粉状或颗粒状,细度均匀,表面干燥无油腻,用手捻,感觉到质地柔软,呈肉松状。优质鱼粉可见细长的肌肉束、鱼骨、鱼肉块等,具有较浓烤鱼香味,略带鱼腥味。而掺假鱼粉多为灰白色或灰黄色,极细,均匀度差,手捻感到粗糙,纤维状物较多,粗看似灰渣,鱼味不香,腥味较浓。掺假的原料不同就带有不同的异味,如掺入尿素就略有氨味,掺入油脂就略有油脂味。

#### 3.3.2 物理检验

##### 3.3.2.1 体视显微镜鉴别

优质鱼粉在体视显微镜下明显可见鱼肌肉束、鱼骨、鱼鳞片 and 鱼眼等。鱼肉在显微镜下表面粗糙,具有纤维结构,类似肉粉,只是颜色浅。鱼骨为半透明至不透明的银色体,一些鱼骨块呈琥珀色,其空隙呈深色的流线型波状线段,似鞭状葡萄枝,从根部沿着整个边缘向上伸出。鱼鳞为平坦或弯曲的透明物,有同心圆,以深色和浅色交替排布。鱼鳞表面有轻微的十字架。鱼鳞表面破裂,形成乳白色的玻璃珠。在鱼粉中有和以上特征相差较远的其他颗粒或粉状物多为掺假物,可根据掺假物的显微特征进行鉴别。

##### 3.3.2.2 水浸泡法鉴别

此法用于对鱼粉中掺麦麸、花生壳粉、稻壳粉及砂分的鉴别。其方法是将样品 2~4 g 加水 100 mL 左右,搅拌后静置数分钟。麦麸、花生壳粉、稻壳粉一般浮在上面,鱼粉则沉入水底;如有砂分时鱼粉和砂都沉于底部,轻轻搅拌后鱼粉稍

浮起旋转,而砂分在底部也有旋转。

### 3.3.2.3 容重法鉴别

粒度为 1.5 mm 的纯鱼粉,容重  $550 \sim 600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。如果容重偏大或偏小,均不是纯鱼粉。

### 3.3.3 化学分析

#### 3.3.3.1 鱼粉粗蛋白和纯蛋白质含量的分析

有分析表明,正常国产鱼粉的粗蛋白为  $49.0\% \sim 61.9\%$ ,纯蛋白质  $40.7\% \sim 55.4\%$ ,纯蛋白质/粗蛋白质  $79.4\% \sim 91.9\%$ 。初步认为纯蛋白质/粗蛋白质  $80\%$  可作为判断鱼粉是否掺有高氮化合物的依据之一。高于该值即没有掺入高氮化合物。

粗蛋白质测定采用凯氏定氮法,纯蛋白质测定采用硫酸铜沉淀法(详见本书 4.2)。

#### 3.3.3.2 鱼粉中粗灰分和钙、磷比例的分析

全鱼鱼粉的粗灰分含量为  $16\% \sim 20\%$ ,如果鱼粉中掺入贝壳粉、骨粉、细砂等,则鱼粉粗灰分含量明显增加。

优质鱼粉的钙、磷比例一般为  $1.5 \sim 2:1$  (多在  $1.5:1$  左右)。若鱼粉中掺入石粉、细砂、泥土、贝壳粉等的比例较大时,则鱼粉中钙、磷比例增大。

#### 3.3.3.3 鱼粉中粗纤维和淀粉的分析

鱼粉中粗纤维含量极少,优质鱼粉一般不超过  $0.5\%$ ,并且鱼粉中不含淀粉。如果鱼粉中混入稻壳粉、棉子饼粕等物质,则粗纤维含量势必大幅度增加。若混入玉米粉等富含淀粉物质,则无氮浸出物含量大大增加。

如果怀疑鱼粉中掺有纤维类物质,可用下述检验方法:取样品  $2 \sim 5 \text{ g}$ ,分别用  $1.25\%$  硫酸和  $12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液煮沸过滤,干燥后称重。

如果怀疑掺有淀粉可用碘蓝反应来鉴定,其方法是:取试样  $2 \sim 3 \text{ g}$  置于烧杯中,加入  $2 \sim 3$  倍水后,加热  $1 \text{ min}$ ,冷却后滴加碘-碘化钾溶液(取碘化钾  $5 \text{ g}$ ,溶于  $100 \text{ mL}$  水中,再加碘  $2 \text{ g}$ )。若鱼粉中掺有淀粉类物质,则颜色变蓝,随掺入量的增加,颜色由蓝变紫。

#### 3.3.3.4 鱼粉中掺杂锯末(木质素)的分析

可用两种方法分析。

方法 1: 将少量鱼粉置于培养皿中,加入  $95\%$  的乙醇浸泡样品,再滴入几滴浓盐酸,若出现深红色,加水后该物质浮在水面,说明鱼粉中掺有锯末类物质。

方法 2: 称取鱼粉  $1 \sim 2 \text{ g}$  置于试管中,再加入  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的间苯三酚  $95\%$  乙

醇溶液10 mL,滴入数滴浓盐酸,观察样品的颜色变化,如其中有红色颗粒产生,则为木质素,说明鱼粉中掺有锯末类物质。

#### 3.3.3.5 鱼粉中掺入碳酸钙粉、石粉、贝粉和蛋壳粉的分析

可利用盐酸对碳酸盐反应产生二氧化碳来判断。取试样10 g,放在烧杯中,加入2 mL的盐酸,立即产生大量气泡,就说明掺入了上述物质。

#### 3.3.3.6 鱼粉中皮革粉的分析

可以利用钼酸铵溶液浸泡鱼粉观察有无颜色发生变化来分析,无色为皮革粉,呈绿色为鱼粉。钼酸铵溶液的配制方法是:称取5 g钼酸铵,溶解于100 mL蒸馏水中,再加入35 mL的浓硝酸即可。

另一种方法是称取2 g鱼粉样品置于坩埚中,经高温灰化,冷却后用水浸润,加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液10 mL,使之呈酸性。滴加数滴二苯基卡巴腓溶液,如有紫红色物质产生,则有铬存在,说明鱼粉中有皮革粉。

$1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液的配制:量取55 mL浓硫酸,慢慢倒入有200 mL左右蒸馏水的玻璃烧杯中,再转入1 000 mL的容量瓶中,稀释定容即可。

二苯基卡巴腓溶液的配制:称取0.2 g二苯基卡巴腓,溶解于100 mL 90%的乙醇中。

该方法的原理是在皮革鞣制过程中,采用铬制剂,通过灰化后,有一部分转变为六价铬,在强酸溶液中,六价铬与二苯基卡巴腓反应,生成紫红色的水溶性二硫代卡巴腓化合物。

#### 3.3.3.7 鱼粉中掺羽毛粉的分析

称取约1 g试样于2个500 mL三角烧杯中,一个加入1.25%硫酸溶液100 mL,另一个加入 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液100 mL,煮沸30 min后静置,吸去上清液,将残渣放在50~100倍显微镜下观察。如果有羽毛粉,用1.25%硫酸处理的残渣在显微镜下会有一种特殊形状,而 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液处理后的残渣没有这种特殊形状。

#### 3.3.3.8 鱼粉中掺入血粉的分析

取被检鱼粉1~2 g于试管中,加入5 mL蒸馏水,搅拌,静置数分钟后。另取一支试管,先加联苯胺粉末少许,然后加入2 mL冰醋酸,振荡溶解,再加入1~2 mL过氧化氢溶液,将被检鱼粉的滤液徐徐注入其中,如两液接触面出现绿色或蓝色的环或点,表明鱼粉中含有血粉,反之,就不含血粉。

如不用滤液,而用被检鱼粉直接徐徐注入溶液面上,在液面上及液面以下可见绿色或蓝色的环或柱,表明有血粉掺入,否则就没有血粉掺入。

该方法原理是鱼粉中铁质有类似过氧化酶的作用,可分解过氧化氢,放出新

生态氧,使联苯胺氧化为联苯胺蓝,呈绿色或蓝色。

所用试剂现配现用。

#### 3.3.3.9 鱼粉中掺尿素的分析

方法1:同3.1.3.3。

方法2:取两份1.5 g 鱼粉于两支试管中,其中一支加入少许黄豆粉,两管各加蒸馏水5 mL,振荡,置60~70℃恒温水浴中3 min,滴6~7滴甲基红指示剂。若加黄豆粉的试管中出现深紫红色,则说明鱼粉中有尿素。

方法3:称取10 g 鱼粉样品。置于150 mL 三角瓶中,加入50 mL 蒸馏水,加塞用力振荡2~3 min,静置,过滤,取滤液5 mL,于20 mL 的试管中,将试管放在酒精灯上加热灼烧,当溶液蒸干时,可嗅到强烈的氨臭味。同时把湿润的pH试纸放在管口处,试剂立即变成红色,此时pH值高达近14。如果是纯鱼粉就没有强烈的氨臭味,置于管口处的pH试纸稍有碱性反应,显微蓝色,离开管口处则慢慢退去。

#### 3.3.3.10 鱼粉中掺入双缩脲的分析

称取鱼粉试样2 g,加20 mL 蒸馏水,充分搅拌,静置10 min,干燥滤纸过滤,取滤液4 mL 于试管中,加6 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液1 mL,再加入15 g·L<sup>-1</sup>硫酸钙溶液1 mL,摇匀,立即观察,溶液呈蓝色的鱼粉没掺入双缩脲,若是紫红色,则掺有双缩脲,颜色越深,掺入的双缩脲越多。

#### 3.3.3.11 根据鱼粉常规分析结果鉴别掺假

通过常规分析各项指标可以准确鉴别鱼粉的真伪。如掺有尿素的鱼粉,测定的粗蛋白值很高,但真蛋白却很低;掺入植物蛋白后,真蛋白虽然很高,但脂肪和淀粉含量又相对增加;掺入砂土,灰分就会增加。

将以上所介绍的3种鉴别方法,紧密结合,可以较准确地鉴别鱼粉是否掺假。

下面将我国农牧渔业部颁布的鱼粉标准摘录如下,以供参考。

### 附 3.1 部颁鱼粉标准

本标准适用于以鱼、虾、蟹类等水产动物或在鱼品加工过程中所得鱼头、尾、内脏等为原料进行干燥、脱脂粉碎或先经蒸煮、压榨、干燥粉碎而成的作为饲料用的鱼粉。

### 一、鱼粉等级和器官感觉、物理、化学指标

	一级品	二级品	三级品
颜色	黄棕色	黄褐色	黄褐色
气味	具有鱼粉的正常气味,无异味及焦灼味		
颗粒细度	至少 98% 能通过筛孔宽度为 2.8 mm 的标准筛网		
蛋白质/%,不低于	55	50	45
脂肪/%,不超过	10	12	14
水分/%,不超过	12	12	12
盐分/%,不超过	4	4	5
砂分/%,不超过	4	4	5

### 二、鱼粉卫生要求

- (1) 鱼粉中不得有虫寄生和发霉现象。
- (2) 鱼粉中不得有沙门氏菌属或志贺氏菌属。
- (3) 细菌总数少于每克 200 万个。

注:①蛋白质系指 CP,鱼粉中不允许添加非鱼粉原料的含氮物质。

②脂肪系指粗脂肪。

③盐分系指以氯化钠为代表的氯化物。

④砂分系指酸不溶性烧灼残渣。

## 3.4 蛋氨酸和赖氨酸添加剂原料真伪鉴别

蛋氨酸和赖氨酸作为第一或第二限制性氨基酸,对提高各种动物的生产性能起着非常重要的作用。因此,饲料企业为提高产品质量,大多在预混料或全价配合饲料中添加适量蛋氨酸和赖氨酸。但目前市场上出现了许多假冒伪劣产品,含量不足,掺假掺杂,甚至完全不含,给饲料企业和养殖场造成了很大的经济损失。下面分别介绍几种有效鉴别蛋氨酸和赖氨酸添加剂原料真伪的方法。

### 3.4.1 DL-蛋氨酸的鉴别方法

(1) 外观鉴别。蛋氨酸一般呈白色或淡黄色的结晶性粉末或片状,在正常光线下有反射光发出。市场上假蛋氨酸多呈粉末状,颜色多为淡白或纯白色,正常光线下没有反射光或只有零星反射光发出。



(2)溶解性。取1 g 蛋氨酸产品于250 mL 三角瓶中,加入50 mL 水,并轻轻搅拌。纯品几乎完全溶解( $33\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  20℃水),且溶液澄清。如溶液浑浊或有沉淀多为掺假产品。

(3)烧灼。取瓷坩埚一个,加入约1 g 蛋氨酸,在电炉上炭化至无烟,然后在550℃高温电炉中灼烧1 h,纯品蛋氨酸灼烧残渣不超过0.5%,掺有滑石粉等的伪劣产品则往往高于此值。

(4)分别取1 g 蛋氨酸产品置于2个250 mL 的三角瓶中,分别加入1:3 (V:V)的盐酸溶液和 $400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液各50 mL。假冒蛋氨酸不溶或部分溶于上述溶液,下部有白色沉淀,上部溶液浑浊,而真蛋氨酸应溶于上述溶液,且溶液澄清。

(5)取30 mg 的蛋氨酸产品于50 mL 的小烧杯中,加入饱和硫酸铜溶液1 mL,假冒蛋氨酸不变色,呈饱和硫酸铜溶液的浅蓝色,而真蛋氨酸呈蓝色。

(6)氨基酸特征反应呈阳性 称取蛋氨酸样品0.1 g,溶于100 mL 水中。取此溶液5 mL,加 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 茚三酮溶液1 mL,加热3 min 后,加水20 mL,静置15 min,溶液呈红紫色。

(7)取约5 mg 的蛋氨酸于150 mL 的具塞碘量瓶中,加入50 mL 水溶解,然后加入 $400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液2 mL,振荡混合,加入 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸银溶液8~10滴,再振荡混合,然后在35~40℃下水浴10 min,随即冷却2 min,加入1:3 (V:V)盐酸溶液2 mL,振荡混合。假冒蛋氨酸不变色,且静置几分钟后底部有沉淀,上部溶液浑浊;而真蛋氨酸应呈红色。

(8)蛋氨酸的理论含氮量约为9.4%,蛋白质等价58.6%。

(9)在有条件的情况下,可以测定其蛋氨酸含量,即也可鉴别真伪。

对于上述几种方法,饲料企业和养殖生产者可根据化验室条件,任选一种或几种进行鉴别。但为了更准确无误,建议采用上述方法逐项全面进行鉴别。

#### 3.4.2 L-赖氨酸盐酸盐的鉴别方法

L-赖氨酸盐酸盐也是掺假使杂较严重的一种原料,其掺假物基本同蛋氨酸,鉴别方法如下。

##### 3.4.2.1 颜色

正品为白色或浅黄或淡褐色结晶粉末。伪品或掺杂者颜色较暗,呈灰白色粉末。掺杂掺假多用石粉、石膏或淀粉等。

##### 3.4.2.2 溶解性

正品易溶于水, $64.2\text{ g}/100\text{ mL}$  20℃水。取约0.5 g 的样品,加入10 mL 水,

摇动,溶液是澄清的。伪品则不溶或少量溶解,且溶液呈浑浊。

#### 3.4.2.3 烧灼

正品产生的气体呈碱性,可使湿的 pH 试纸变为蓝色。如掺入淀粉则试纸变红。如果是矿物质则无烟。

正品的灰分含量不超过 0.3%,假的则不论是淀粉或矿物质,都远大于 0.3%。

#### 3.4.2.4 茚三酮反应

取少量样品置于试管中,加入 1 mL  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 茚三酮丙酮溶液,加水 2 mL,摇匀,加热至沸,静置,溶液呈现紫红色者为正品,不产生紫红色为伪品。

#### 3.4.2.5 定氮

*L*-赖氨酸盐酸盐的纯度最低为 98.0%,相应含 *L*-赖氨酸 78%,理论含氮量为 15.3%,蛋白质等价为 95.8%。

在有条件的情况下,可以测定其赖氨酸含量,即也可鉴别真伪。

赖氨酸真伪的鉴别还可以用灼烧炭化观察其有无残渣来进行,要准确鉴别其真伪最好是将上述各方法结合使用。

### 思考题

1. 感官方法可以鉴定饲料的哪些特征,如何运用感官方法鉴定饲料的品质;饲料鉴别中常用的物理和化学方法有哪些,如何运用?
2. 饲料显微镜检的原理,如何进行镜检的定性和定量分析操作,怎样对饲料中的霉菌毒素进行显微镜检测?
3. 鱼粉掺假鉴别在生产中很重要,采用哪些分析检验方法可以对其进行鉴别?
4. 如何通过物理、化学方法鉴别 *DL*-蛋氨酸和 *L*-赖氨酸盐酸盐添加剂的真伪?

## 4 饲料中常规成分分析

### 【内容提要】

本章主要概括介绍了饲料中常规成分分析的主要内容,饲料中水分、粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、粗灰分的测定方法和无氮浸出物的计算方法和常规分析系统方法(即 Weende 系统分析法)的局限性。由于粗纤维酸碱测定方法存在缺陷,在国际上已趋于用酸性洗涤纤维和中性洗涤纤维来替代。因此,本章详细介绍了 Van Soest 纤维分析方案,该分析方案不仅可测定酸性洗涤纤维和中性洗涤纤维,并可将粗纤维的各种组分分别予以定量测定。

### 4.1 概述

饲料养分概略分析,通常又称为饲料常规成分分析。100 多年来,人们沿用德国 Henneberg 和 Stohmann 两位科学家在 Weende 试验站所创立的方法来分析饲料概略养分,这种方法称为 Weende 饲料分析体系,也就是饲料常规成分分析体系,亦称饲料近似成分分析或饲料概略分析(feed proximate analysis)。它把饲料分为 6 个组分进行分析测定(表 4.1),即:①水分(moisture);②粗灰分(ash);③粗蛋白质(CP);④乙醚浸出物(即粗脂肪,EE);⑤无氮浸出物(NFE);⑥粗纤维(CF)。

常规成分是进行饲料原料和产品质量控制的最基本的指标。目前,在我国,商品饲料和饲料添加剂(包括进口饲料和饲料添加剂)必须按照中华人民共和国 2000 年 6 月 1 日颁布实施的《饲料标签》(GB 10648—1999)要求,设计制作饲料标签,并必须注明产品成分分析保证值。不同产品类型如蛋白质饲料、配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、复合预混料、微量元素预混料、维生素预混料、矿物质饲料、营养性添加剂、非营养性添加剂等,所要求注明的保证值项目不同。按照《饲料标签》的要求,蛋白质饲料、配合饲料、浓缩饲料、精料补充料等必须标明水分、灰分、粗蛋白、粗纤维、钙、磷和食盐等成分。

目前,我国规定凡是申请饲料生产登记许可证的商业性饲料加工企业必须配备常规成分的检测设备和持有上岗证的检测人员,以便为产品质量提供基本的保证。

表 4.1 常规概略养分组分简表

组 分	过 程 <sup>1</sup>	主要成分
1. 水分(干物质, DM)	以刚超过水的沸点温度(100℃), 加热至恒重, 所减少的质量即为水分含量	水和挥发性物质 $1 - w(\text{H}_2\text{O}) = w(\text{干物质})$
2. 灰分(矿物质)	在 500~600℃ 烧灼 2~3 h	矿物质
3. 粗蛋白质(CP)(蛋白质平均含 N 量为 16%, 因此, $w(\text{N}) \times 6.25 = w(\text{CP})$ )	凯氏定氮	蛋白质 非蛋白氮(NPN)
4. 乙醚浸出物(EE)(粗脂肪)	乙醚浸提	脂肪, 油, 蜡, 色素, 树脂
5. 粗纤维 <sup>2</sup> (CF)	经弱酸、弱碱煮沸 30 min 后过滤	纤维素、半纤维素和木质素
6. 无氮浸出物(NFE)	由 1 减去其他物质质量分数后所得, 是一个计算值	淀粉, 糖, 部分纤维素、半纤维素, 木质素

注: 1. 每组分的测定可以单独取样, 也可以只取一个样, 先依次测定干物质、粗脂肪、粗纤维, 然后再分别测定粗灰分和粗蛋白质。无氮浸出物是由 1 减去其他物质质量分数后所得, 是一个计算值。

2. 碳水化合物主要包括粗纤维和无氮浸出物。

## 4.2 饲料中水分的测定

要比较饲料的营养价值, 第一步是必须测定饲料中水分含量的多少。许多水分含量高的产品, 如甜菜, 其干物质与玉米和其他传统饲料相比, 品质要好得多, 但甜菜水分含量过高, 因而限制了它的干物质进食量。由于众多饲料的水分不一致, 故饲料营养价值表中多以干物质为基础表示各种成分含量。

不同化合物或饲料的水分含量测定需要采用不同的分析技术, 主要根据以下几点选择适宜的方法: ①是否有挥发性物质存在? ②成分变棕色的可能性如何? ③是否需低温真空? ④某些化合物是否可起化学变化, 如糖类。

水分的测定通常有以下 5 种途径。

(1) 烘箱干燥。依 AOAC (Association of Official Analytist Chemists) 的正规方法, 将样品放在 105℃ 烘箱中烘至恒重, 样品的失重即代表水分含量。这种方法不很精确, 因为在水分蒸发的同时, 一些短链脂肪酸和有机酸有挥发损失的情况。

(2) 真空干燥。样品能在低温真空条件下干燥。样品处于真空条件时, 水的

沸点降低,因此,真空烘箱有时可用来减少其他挥发性化合物的相对损失。

(3)甲苯蒸馏。样品的干物质中含有大量能通过甲苯蒸馏测定出来的挥发性酸和碱。

(4)冷冻干燥。这种干物质测定方法越来越受到重视。冷冻干燥机大体由一个加热架,外围有一个压缩机组成。冷冻干燥前先将样品冰冻,将冰冻样品放入冷冻干燥机后,机器将空气排空,冷冻干燥机内压力相当低,在这种条件下,升华开始,即样品中水的结晶体不变成液体而直接进入气体阶段。这种方法可防止样品中的很多挥发性物质的损失。

(5)水分快速测定装置。很多时候,养殖场或配合饲料加工厂需要立即知道饲料的含水量。比如,如果他们正在购买含水量的谷物,不可能等实验室化学分析后的结果。因此为了方便,现在已推广应用了几种水分快速测定装置。价格也不是很贵。这对饲料厂商保证购进饲料原料的质量方面有极大帮助。

对于一般饲料原料和产品,通常采用烘箱干燥法测定水分。该方法也是我国目前采用的推荐性国家标准。下面详细介绍烘箱干燥法。

#### 4.2.1 适用范围

本方法适用于测定配合饲料和单一饲料中水分的含量,但用做饲料的奶制品,动物、植物油脂和矿物质则除外。

#### 4.2.2 测定原理

样品在 $(105\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 烘箱内,在一个大气压下烘干,直至恒重,逸失的质量为水分。在该温度下干燥,不仅饲料中的吸附水被蒸发,同时一部分胶体水分也被蒸发,另外还有少量挥发油挥发。

#### 4.2.3 仪器设备

- (1)实验室用样品粉碎机或研钵。
- (2)分析筛。孔径 0.45 mm(40 目)。
- (3)分析天平。感量 0.000 1 g。
- (4)称样皿。玻璃或铝制,直径 40 mm 以上,高度 25 mm 以下。
- (5)电热式恒温烘箱。可控制温度为 $(105\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。
- (6)干燥器。用变色硅胶或氯化钙做干燥剂。

#### 4.2.4 试样的选取和制备

(1)选取有代表性的试样,其原始样量在 1 000 g 以上。

(2)用四分法将原始样品缩至 500 g,再缩至 200 g,风干后粉碎至 40 目,装入密封容器,放阴凉干燥处保存。

(3)如试样是多汁的鲜样,或无法粉碎时,应预先干燥处理。称取试样 200~300 g,置于已知质量的培养皿中,先在 105 ℃烘箱中烘 15 min,然后立即降到 65 ℃,烘干 5~6 h。将烘干的样品放在室内空气中冷却 1 h,称重,即得风干样品。重复上述操作,直到两次称重之差不超过 0.5 g 为止。

#### 4.2.5 测定步骤

(1)将洁净的称量瓶,在(105±2)℃烘箱中烘 1 h,取出,在干燥器中冷却 30 min,称重,准确至 0.000 2 g。重复以上操作,直至两次质量之差小于 0.000 5 g 为恒重。

(2)在已知质量的称量瓶中称取两份平行试样,每份 2~5 g(含水量 0.1 g 以上,样厚 4 mm 以下),准确至 0.000 2 g。

(3)将盛有样品的称量瓶不盖盖,在(105±2)℃烘箱中烘 3 h(温度到达 105 ℃开始计时),取出,盖好称量瓶盖,在干燥器中冷却 30 min,称重。

(4)再同样烘干 1 h,冷却,称重,直到两次质量差小于 0.000 2 g。

#### 4.2.6 结果计算

##### 4.2.6.1 计算

$$w(\text{H}_2\text{O}) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \quad 4-1$$

式中: $m_1$  为 105 ℃烘干前试样及称量瓶质量,g; $m_2$  为 105 ℃烘干后试样及称量瓶质量,g; $m_0$  为已恒重的称量瓶质量,g。

##### 4.2.6.2 重复性

每个试样应取两个平行样进行测定,以其算术平均值为测定结果。两个平行样测定值相差不得超过 0.2%,否则重做。

精密度:含水量在 10%以上,允许相对偏差为 1%;含水量在 5%~10%时,允许相对偏差为 3%;含水量在 5%以下时,允许相对偏差为 5%。

#### 4.2.7 注意事项

(1)如果按上述 4.2.4.2 的步骤进行过预先干燥处理(指多汁的鲜样),则按下式计算原来试样中所含水分含量:

$$w(\text{原试样总水分}) = w(\text{预干燥减重}) + [1 - w(\text{预干燥减重})] \times w(\text{风干试样水分})$$

(2)加热时试样中有挥发性物质可能与试样中水分一起损失,例如青贮料中的挥发性脂肪酸(VFA)。

(3)某些含脂肪高的样品,烘干时间长反而会增重,乃脂肪氧化所致,应以增重前那次称量为准。

(4)含糖分高的、易分解或易焦化样品,应使用减压干燥法(70℃,80 kPa 以下,烘干 5 h)测定水分。

### 4.3 饲料中粗蛋白质(N×6.25)的测定——凯氏定氮法

饲料中含氮物质包括纯蛋白质和氮化物(氮化物有氨基酸、酰胺、硝酸盐及铵盐等),两者总称为粗蛋白质。

测定粗蛋白质的方法很多,有间接法和直接法。间接法是根据每种蛋白质的含氮量是恒定的,通过测定样品中含氮量推算蛋白质含量的方法。常用的有:凯氏法、杜马斯法、强碱直接蒸馏法、纳氏试剂比色法和靛酚蓝比色法。直接方法是根据蛋白质的物理及化学性质直接测定蛋白质含量的方法,其中有紫外吸收法、双缩脲法、酚试剂法、染料结合法(DBL 法)、茚三酮法、折射率法、放射性同位素法、比浊法等。凯氏定氮法是 19 世纪建立的经典方法,结果可靠,但操作费时,人们在经典法基础上选择催化剂,加快分析速度,改进仪器装置,研制出了蛋白质测定仪,如瑞典 Tecator 1035 型自动定氮分析仪,国产 KDN-01 蛋白质测定仪等。下面介绍凯氏定氮法,并附有纯蛋白质的测定方法。

#### 4.3.1 适用范围

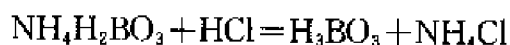
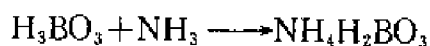
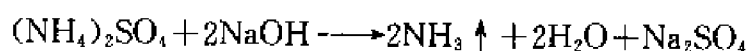
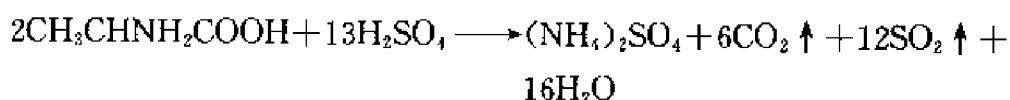
本方法适用于配合饲料、浓缩饲料和单一饲料等粗蛋白质的测定。

#### 4.3.2 测定原理

各种饲料的有机物质在催化剂(如硫酸铜或硒粉)的帮助下,用浓硫酸进行

消化作用,使蛋白质和氨态氮(在一定处理条件下也包括硝酸态氮)都转变成氨气,并被浓硫酸吸收变为硫酸铵;而非含氮物质,则以二氧化碳、水、二氧化硫的气体状态逸出。消化液在浓碱的作用下进行蒸馏,释放出的氨气,通过蒸馏,氨气随汽水顺着冷凝管流入硼酸吸收液中,并与其结合成硼酸胺,然后以甲基红-溴甲酚绿作混合指示剂,用盐酸标准溶液滴定,求出氮的含量,再乘以一定的换算系数(通常用 6.25 系数计算),得出样品中粗蛋白质的含量。

其主要化学反应如下:



#### 4.3.3 仪器设备

- (1)实验室用样品粉碎机或研钵。
- (2)分析筛。孔径 0.45 mm(40 目)。
- (3)分析天平。感量 0.000 1 g。
- (4)消煮炉或电炉。
- (5)滴定管。酸式,25,50 mL。
- (6)凯氏烧瓶。250 mL。
- (7)凯氏蒸馏装置。常量直接蒸馏式或半微量蒸馏式。
- (8)锥形瓶。150,250 mL。
- (9)容量瓶。100 mL。
- (10)消煮管。250 mL。
- (11)定氮仪。以凯氏原理制造的各种类型半自动,全自动定氮仪。

#### 4.3.4 试剂及配制

- (1)浓硫酸(GB 625)。化学纯。
- (2)硫酸铜(GB 665)。化学纯。
- (3)硫酸钾(HG 3-920)。化学纯或硫酸钠(HG 3-908):化学纯。
- (4)400 g · L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液。40 g 氢氧化钠(GB 629)溶于 100 mL 水中。
- (5)20 g · L<sup>-1</sup>硼酸溶液。2 g 硼酸(GB 628)溶于 100 mL 水中。



(6) 盐酸标准滴定溶液。邻苯二甲酸氢钾法标定(见附录八)。

$c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 盐酸标准溶液。8.3 mL 盐酸(GB 622, 分析纯), 注入 1 000 mL 水中。

$c(\text{HCl})=0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 盐酸标准溶液。16.7 mL 盐酸(GB 622, 分析纯), 注入 1 000 mL 水中。

(7) 混合指示剂。甲基红(HG 3-958)  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇溶液与溴甲酚绿(HG 3-1220)  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇溶液, 两溶液等体积混合, 阴凉处保存 3 个月以内。

(8) 硫酸铵(GB 1396)。分析纯, 干燥。

(9) 蔗糖(HG 3-1001)。分析纯。

(10) 硼酸吸收液。  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸溶液 1 000 mL, 加入甲基红  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇溶液 7 mL, 与溴甲酚绿  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇溶液 10 mL,  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 0.5 mL, 混合, 置阴凉处保存期为 1 个月(全自动定氮分析仪用)。

#### 4.3.5 试样的选取和制备

取有代表性试样用四分法缩减至 200 g, 粉碎至 40 目, 装入密封容器中, 防止试样成分的变化或变质。

液体或膏状黏液试样应注意取样的代表性。用干净的、可放入凯氏烧瓶或消化管的玻璃容器量取。

#### 4.3.6 测定步骤

##### 4.3.6.1 试样的消化

称取 0.5~1 g 试样(含氮量 5~80 mg), 准确至 0.000 2 g, 无损地放入凯氏烧瓶或消化管中, 加入硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.4 g, 无水硫酸钾(或无水硫酸钠) 6 g, 与试样混合均匀, 再加浓硫酸 10 mL 和 2 粒玻璃珠。把凯氏烧瓶或消化管放在通风柜里的电炉或消煮炉上小心加热, 待样品焦化, 泡沫消失, 再加大火力( $360 \sim 440 \text{ }^\circ\text{C}$ ), 直至溶液澄清后, 再加热消化 15 min。凯氏电热消化架如图 4.1 所示。

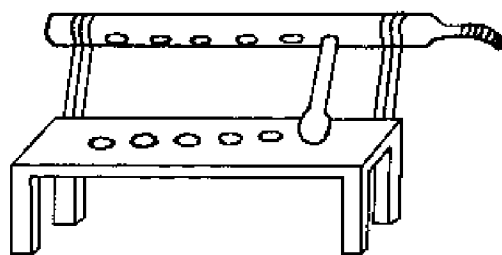


图 4.1 凯氏电热消化架

试剂空白测定: 另取凯氏烧瓶或消化管一个, 加入硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.4 g, 无水硫酸钾(或硫酸钠) 6 g, 浓硫酸 10 mL, 加热消化至溶液澄清。

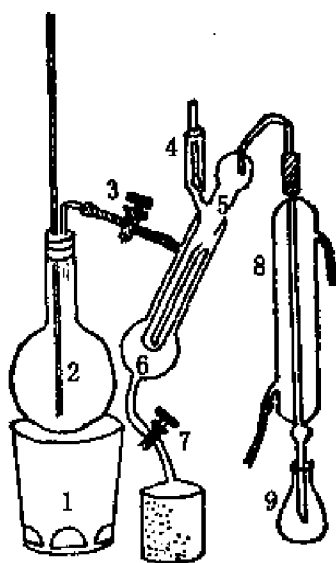


图 4.2 凯氏蒸馏装置

1. 电炉 2. 蒸汽发生器 3. 螺丝夹  
4. 小玻璃杯及棒状玻璃塞 5. 反应室  
6. 反应室外层 7. 橡皮管及螺丝夹  
8. 冷凝器 9. 蒸馏液接收三角瓶

#### 4.3.6.2 氨的蒸馏

(1) 常量直接蒸馏法。将试样消煮液冷却,加水 60~100 mL,摇匀,冷却。将蒸馏装置冷凝管的末端浸入 35 mL 硼酸吸收液和加混合指示剂 2 滴的锥形瓶中,然后小心地向凯氏烧瓶或消化管中,加入氢氧化钠溶液至溶液颜色变黑,再稍加少许,使溶液混匀后,加热蒸馏,直至馏出液体积约 150 mL。降下锥形瓶,使冷凝管末端离开液面,继续蒸馏 1~2 min,并用水冲洗末端,洗液均需流入锥形瓶内,然后停止蒸馏。

(2) 半微量水蒸汽蒸馏法。如图 4.2 所示。

将试样消煮液冷却,加水 20 mL,移入 100 mL 容量瓶中,冷却后用水稀释至刻度,摇匀,作为试样分解液。取 35 mL 硼酸溶液,加混合指示剂 2 滴,使半微量装置的冷凝管末端浸入此溶液。蒸汽发生器的水中应加入甲基红指示剂数滴,硫酸数滴,在蒸馏过程中保持此溶液为橙红色,否则需补加硫酸。准确移取试样分解液 10~20 mL,注入蒸馏装置的反应室中,用少量水冲洗进样入口,塞好入口玻璃塞,再加 10 mL  $400\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液,小心拉起玻璃塞使之进入反应室,将玻璃塞塞好,且在入口处加水封好,防止漏气,蒸馏 4 min,使冷凝管末端离开吸收液面,再蒸馏 1 min,用水冲洗冷凝管末端,洗液均流入锥形瓶内,然后停止蒸馏。

注:4.3.6.2(1)和(2)蒸馏法测定结果相近,可任选一种。

#### 4.3.6.3 滴定

用 4.3.6.2(1)和(2)法硼酸吸收氨后,立即用  $0.1$  或  $0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸标准滴定溶液滴定,溶液由蓝绿色变为灰红色为终点。

在测定饲料样品中含氮量的同时,应做一空白对照测定,即各种试剂的用量及操作步骤完全相同,但不加试样,这样可以校正因试剂不纯所发生的误差。

#### 4.3.6.4 空白测定

称取蔗糖  $0.5\text{ g}$ ,以代替试样,按 4.3.6.1 测定步骤进行空白测定,消耗  $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸标准滴定溶液的体积不超过  $0.2\text{ mL}$ 。消耗  $0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸标准滴定溶液的体积不超过  $0.3\text{ mL}$ 。

## 4.3.6.5 测定步骤的检验

精确称取 0.2 g 硫酸铵,代替试样,按 4.3.6.2 和 4.3.6.3 测定步骤操作,测得硫酸铵含氮量为 21.19%±0.2%,否则应检查加碱、蒸馏和滴定各步骤是否正确。

## 4.3.7 结果计算

## 4.3.7.1 计算

试样中粗蛋白质质量分数按公式 4-2 计算。

$$w(\text{CP}) = \frac{(V_1 - V_2)c \times 0.0140 \times 6.25}{m \times (V'/V)} \quad 4-2$$

式中: $c$  为盐酸标准滴定溶液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ ;  $V_1$  为滴定试样时所需盐酸标准滴定溶液体积,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为空白滴定所需盐酸标准滴定溶液体积,  $\text{mL}$ ;  $V$  为试样分解液总体积,  $\text{mL}$ ;  $V'$  为试样分解液蒸馏用体积,  $\text{mL}$ ; 0.0140 为与 1.00 mL 盐酸标准滴定溶液 [ $c(\text{HCl}) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的,以克表示的氮的质量; 6.25 为氮换算成蛋白质的平均系数。

## 4.3.7.2 重复性

每个试样取两平行样进行测定,以其算术平均值为结果。

当粗蛋白质含量在 25% 以上,允许相对偏差为 1%;

当粗蛋白质含量在 10%~25%,允许相对偏差为 2%;

当粗蛋白质含量在 10% 以下时,允许相对偏差为 3%。

## 附 4.1 推荐方法

(1) 试样的消化。称取 0.5~1 g 试样(含氮量 5~80 mg),准确至 0.000 2 g,无损地放入消化管中,加入硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.4 g,无水硫酸钾(或硫酸钠) 6 g,与试样混合均匀,再加浓硫酸 10 mL。于 420 °C 下在消煮炉上消化 1 h。取出冷却后加入 30 mL 水。

(2) 氮的蒸馏。采用全自动定氮仪时,按仪器本身测定程序进行测定。

采用半自动定氮仪时,将带消化液的管子插在蒸馏装置上,以 35 mL 20 g · L<sup>-1</sup> 硼酸溶液为吸收液,加入 2 滴混合指示剂,蒸馏装置的冷凝管末端要浸入装有吸收液的锥形瓶内,然后向消煮管中加入 400 g · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液至消化液变黑,再加少许,进行蒸馏。蒸馏时间以吸收液体积达到 150 mL 时为宜。降下锥

形瓶,用水冲洗冷凝管末端,洗液均需流入锥形瓶内。

(3)滴定。用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸标准滴定溶液滴定,溶液由蓝绿色变为灰红色为终点。

(4)结果计算同 4.3.7.1。

凯氏半自动定氮仪及消煮炉如图 4.3 所示。

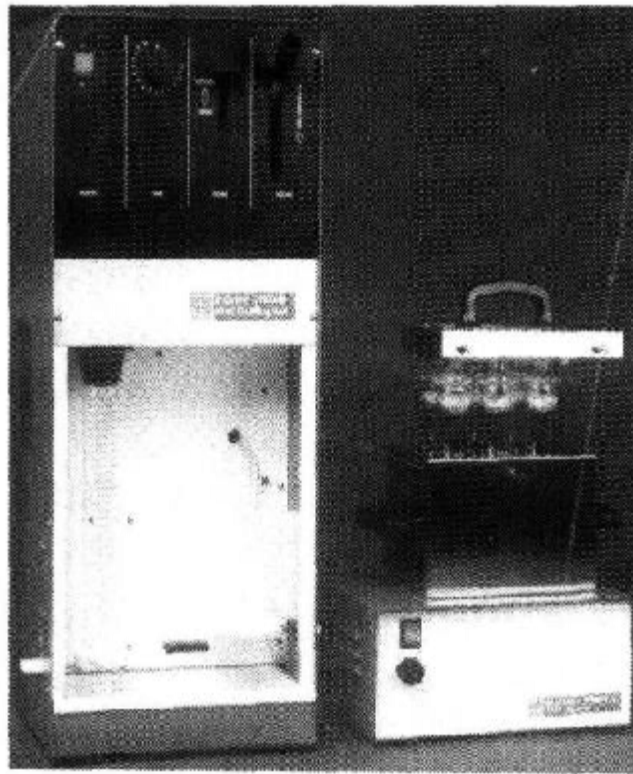


图 4.3 凯氏半自动定氮仪及消煮炉

#### 4.3.8 注意事项

- (1)消化时应经常转动凯氏烧瓶,以使消化进行得迅速而完全。
- (2)蒸馏完毕应先取下接收瓶,然后关闭电源,以免酸液倒流。
- (3)一次蒸馏后必须彻底洗净碱液,以免再次使用时引起误差。
- (4)含硝酸盐多的饲料,用凯氏定氮法测定粗蛋白时,很多硝酸盐还原而损失。
- (5)各种饲料的粗蛋白质中实际含氮量,差异很大,变异范围在 14.7%~19.5%之间,平均为 16%。凡饲料的粗蛋白质中氮含量尚未确定的,可用 6.25 平均系数来乘以氮量换算成粗蛋白质量。凡饲料的粗蛋白质的含氮量已经确定的,可用它们的实际系数来换算。例如荞麦、玉米用系数 6.00,箭舌豌豆、大豆、

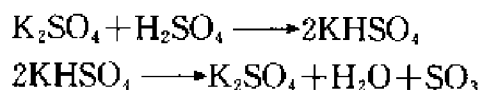
蚕豆、燕麦、小麦、黑麦用系数 5.70, 牛奶用系数 6.38。

#### 4.3.9 样品的分解条件

在消化过程中为了加速分解过程, 缩短消化时间, 常加入以下物质。

##### 4.3.9.1 无水硫酸钾或无水硫酸钠

硫酸钾的功用是提高浓硫酸的沸点, 使消化效力提高。纯硫酸的沸点为  $317^{\circ}\text{C}$ , 加入无水硫酸钠后, 硫酸沸点可增至  $325\sim 341^{\circ}\text{C}$ 。

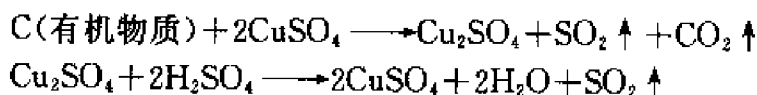


在消化过程中, 随着硫酸的不断分解, 水分的不断蒸发, 硫酸钾的浓度逐渐增大, 则沸点升高, 加速了对有机物的分解作用。

无水硫酸钠的作用同无水硫酸钾, 但不及无水硫酸钾的效果好。

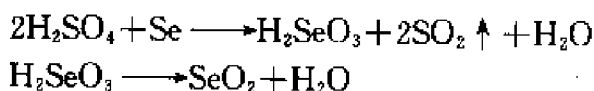
##### 4.3.9.2 催化剂

(1) 硫酸铜。以硫酸铜作为催化剂, 其反应如下:



在有机物全部消化后, 这时溶液具有清澈的蓝绿色。硫酸铜除有催化作用外, 并可在下一步蒸馏时做碱性反应的指示剂。

(2) 硒粉。催化效能较强, 可大大缩短消化时间。



硒粉用量不宜过多, 消化时间不可过久, 同时要小心控制消化温度, 否则将引起氮素的损失。

##### 4.3.9.3 氧化剂

添加氧化剂可帮助有机物消化, 但要防止氮进一步氧化为氮。一般说来, 若有足够量的其他还原剂, 如碳, 则添加氧化剂不致使测定结果偏低。

过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )具有消化速度快, 操作简便的优点, 近代常推荐采用这种氧化剂。但在使用时应特别注意, 须待消化液完全冷却后再加入数滴过氧化氢。

## 附 4.2 饲料中纯蛋白质的测定

纯蛋白质又叫真蛋白质, 它是由许多种氨基酸合成的一类高分子化合物。

### 一、测定原理

硫酸铜在碱性溶液中,可将蛋白质沉淀,且不溶于热水,过滤和洗涤后,可将纯蛋白质和非蛋白质含氮物分离,再用凯氏定氮法测定沉淀中的蛋白质含量。

### 二、仪器设备

- (1)烧杯:200 mL。
- (2)定性滤纸。
- (3)其他设备与粗蛋白质测定法相同。

### 三、试剂及配制

- (1)100 g·L<sup>-1</sup>硫酸铜溶液:分析纯硫酸铜(CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O)10 g溶于100 mL水中。
- (2)25 g·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液:将2.5 g分析纯氢氧化钠溶于100 mL水中。
- (3)10 g·L<sup>-1</sup>氯化钡溶液:1 g氯化钡(BaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O)溶于100 mL水中。
- (4)2 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液。
- (5)其他试剂与一般粗蛋白质测定法相同。

### 四、测定步骤

准确称取试样1 g左右(精确至0.0001 g),置于200 mL烧杯中,加50 mL水,加热至沸,加入20 mL硫酸铜溶液,20 mL氢氧化钠溶液,用玻璃棒充分搅拌,放置1 h以上,用倾斜过滤(用定性滤纸),然后用60~80℃热水洗涤沉淀5~6次,用氯化钡溶液5滴和盐酸溶液1滴检查滤液,直至不生成白色硫酸钡沉淀为止。将沉淀和滤纸放在65℃烘箱干燥2 h,然后全部转移到凯氏烧瓶中,消化后进行定氮测定。

### 五、结果计算

同粗蛋白质测定。

## 4.4 饲料中粗脂肪的测定

饲料脂肪的测定,通常是将试样放在特制的仪器中,用脂溶性溶剂(乙醚、石油醚、氯仿等)反复抽提,可把脂肪抽提出来,浸提出的物质除脂肪外,还有一部

分类脂物质也被浸出,如游离脂肪酸、磷脂、蜡、色素以及脂溶性维生素等,所以称为粗脂肪。

测定粗脂肪的方法常用的有油重法、残余法、浸泡法等。本节仅介绍油重法和残余法。

#### 4.4.1 油重法

##### 4.4.1.1 适用范围

本方法适用于各种混合饲料、配合饲料、浓缩饲料及单一饲料中粗脂肪的测定。

##### 4.4.1.2 测定原理

用乙醚等有机溶剂反复浸提饲料样品,使其中脂肪溶于乙醚,并收集于盛醚瓶中,然后将所有的浸提溶剂加以蒸发回收,直接称量盛醚瓶中的脂肪重,即可计算出饲料样品中的脂肪含量。

##### 4.4.1.3 仪器设备

- (1)实验室用样品粉碎机或研钵。
- (2)分析筛:孔径 0.45 mm(40 目)。
- (3)分析天平:感量 0.000 1 g。
- (4)电热恒温水浴锅:室温至 100 ℃。
- (5)恒温烘箱。
- (6)索氏脂肪提取器(图 4.4):100 或 150 mL。
- (7)干燥器:用氯化钙(干燥级)或变色硅胶为干燥剂。
- (8)滤纸或滤纸筒:中速,脱脂。

##### 4.4.1.4 试剂

无水乙醚(分析纯)

##### 4.4.1.5 试样的选取和制备

取有代表性试样用四分法缩减至 200 g,粉碎至 40 目,装入密封容器中,防止试样成分的变化或变质。

##### 4.4.1.6 测定步骤

(1)索氏提取器应干燥无水。将抽提瓶(内有沸石数粒)在 $(105\pm 2)$ ℃烘箱中烘干 30 min,干燥器中冷却 30 min,称重。再烘干 30 min,同样冷却称重,两次称重之差小于 0.000 8 g 为恒重。

(2)称取试样 1~5 g(准确至 0.000 2 g),于滤纸筒中或用滤纸包好,并用铅笔注明标号,放入 $(105\pm 2)$ ℃烘箱中烘干 2 h(或称测水分后的干试样,折算成

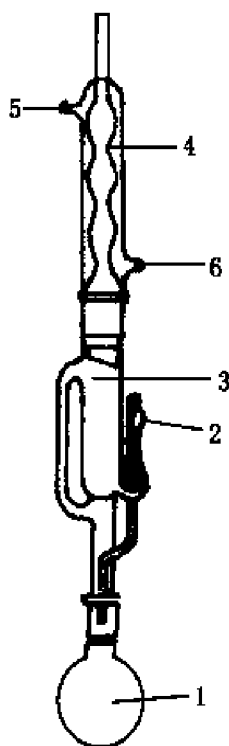


图 4.4 索氏浸提器

1. 抽提瓶 2. 虹吸管 3. 抽提管  
4. 冷凝管 5. 出水口 6. 入水口

风干样重)。滤纸筒应高于提取器虹吸管的高度,滤纸包长度应以可全部浸泡于乙醚中为准。

(3)将滤纸筒或包放入抽提管中,在抽提瓶中加入无水乙醚 60~100 mL,在 60~75 ℃ 的水浴(用蒸馏水)上加热,使乙醚回流,控制乙醚回流次数为每小时约 10 次,共回流约 50 次(含油高的试样约 70 次)或检查抽提管流出的乙醚挥发后不留下油迹为抽提终点。

(4)取出试样,仍用原提取器回收乙醚直至抽提瓶全部收完,取下抽提瓶,在水浴上蒸去残余乙醚。擦净外壁。将抽提瓶放入(105±2)℃烘箱中烘干 2 h,干燥器中冷却 30 min,称重。再烘干 30 min,同样冷却称重,两次称重之差小于 0.001 g 为恒重。

#### 4.4.1.7 测定结果的计算

(1)计算公式。试样中粗脂肪的质量分数按公式 4-3 计算。

$$w(\text{EE}) = \frac{m_2 - m_1}{m} \quad 4-3$$

式中: $m$  为试样质量, g;  $m_1$  为抽提瓶质量, g;  $m_2$  为盛有脂肪的抽提瓶质量, g。

(2)重复性。每个试样取两平行样进行测定,以其算术平均值为结果。

粗脂肪含量在 10% 以上,允许相对偏差为 3%。

粗脂肪含量在 10% 以下时,允许相对偏差为 5%。

#### 4.4.1.8 注意事项

(1)全部称量操作,样品包装时要戴乳胶手套或棉手套。

(2)使用乙醚时,严禁明火加热,保持室内良好通风,抽提时防止乙醚过热而爆炸。

(3)测定样品在浸提前必须粉碎烘干,以免在浸提过程中样品水分随乙醚溶解样品中糖类而引起误差。

(4)粗脂肪的测定也可采用脂肪提取仪测定。依各仪器操作说明书进行测定。



#### 4.4.2 残余法

##### 4.4.2.1 测定原理

试样经脂溶性溶剂反复抽提,使全部脂肪除去,根据试样质量和残渣质量之差计算粗脂肪含量。

##### 4.4.2.2 仪器设备

同油重法。

##### 4.4.2.3 试剂

同油重法。

##### 4.4.2.4 测定步骤

按油重法 4.3.1.6(1)、(2)、(3)操作。当脂肪浸提干净后取出小包,置于干净表面皿上晾干 20~30 min,然后装入同号码称量瓶中,置 $(105\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘至恒重。试样中粗脂肪质量分数按公式 4-4 计算。

$$w(\text{EE}) = \frac{m_2 - m_1}{m} \quad 4-4$$

式中: $m_1$  为装有试样滤包或筒浸提前质量,g; $m_2$  为装有试样滤包或筒浸提后质量,g; $m$  为试样质量,g。

### 附 4.3 Tecator 公司脂肪测定仪操作步骤

以下操作步骤适用于瑞典 Tecator 公司生产的 Soxtec System(图 4.5)。

传统的索氏脂肪浸提法因它的精确性和重复性而被世界所公认。然而手工索氏浸提法操作太费时间。

脂肪测定仪既采用经典的索氏浸提法原理,又可大大缩短浸提时间,它将浸提过程分为高温沸腾浸提与冲洗浸提两个步骤,整个浸提过程一般只需 30~60 min,依样品类型而定,从而可以快速测定试样中的粗脂肪含量。

操作步骤:

(1) 打开恒温加热装置开关,控制工作温度为  $75^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 称取 2 g 左右的样品(准确至 0.000 2 g)( $m_1$ ),放入滤纸筒内烘干。

(3) 用套筒夹将 6 个滤纸套筒装入浸提冷凝管内,当确信套筒已被磁铁吸牢后取下套筒夹。



图 4.5 Tecator 脂肪测定仪

(4)称量浸提杯质量( $m_2$ ),然后加入约 50 mL 无水乙醚。用杯托将 6 个浸提杯放在加热板上,再将冷凝管提升机构扳下,使浸提杯与冷凝管连接好。

(5)事先接通浸提冷凝管的冷却水。将滤纸筒置于“沸腾”位置。冷凝管应有良好的冷凝作用。

(6)无水乙醚沸腾 15 min 或 30 min(依样品含油量而异)后,将滤纸筒提升到“冲洗”位置,冲洗 30 min 或 45 min。

(7)冲洗结束后,关闭冷凝管旋塞阀,回收乙醚。

(8)松开冷凝管提升机构,取下浸提杯,并放入烘箱烘干。

(9)在干燥器中冷却浸提杯,然后用分析天平称重( $m_3$ )。

(10)按公式 4-5 计算试样中粗脂肪的质量分数。

$$w(\text{EE}) = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \quad 4-5$$

#### 附 4.4 滤袋技术在饲料脂肪分析中的应用

由于滤袋技术(filter bag technology, FBT)用于批量分析饲料中的纤维含量的推广,使 Ankom Technology 闻名于世。基于在纤维分析方面已获得的经验,Ankom Technology 新近又开发了一项快速批量抽提脂肪技术(accelerated batch extraction, ABE)。Ankom XT20 脂肪分析仪(图 4.6)是采用 ANKOM 技

术开发的一项使用普通溶剂快速抽提食品和饲料脂肪的新技术而研制成的。

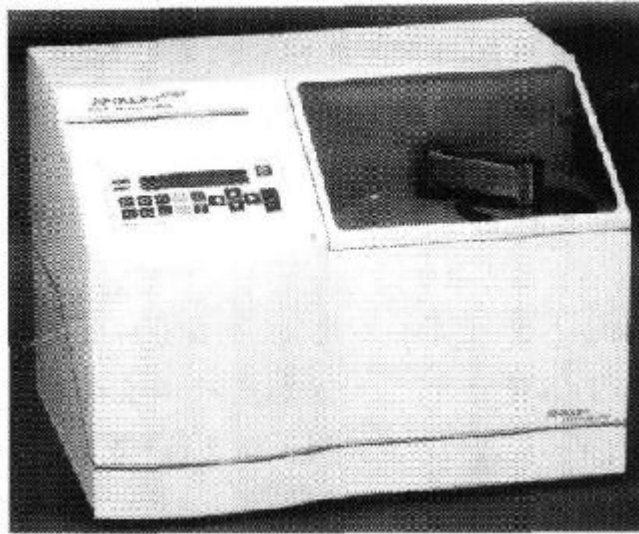


图 4.6 Ankom XT20 脂肪分析仪

#### 快速批量抽提脂肪的原理

ABE 的原理十分简单。样品被分装在一用特殊材料制作的滤袋中,在溶剂的作用下,脂肪溶解透出滤袋,而样品基质颗粒不能通过滤袋而留在滤袋中,从而实现脂肪与样品基质的分离。

#### 快速批量抽提脂肪优点

高效:Ankom XT20 脂肪分析仪,一次能用不同的方式完成抽提 20 个样品 [AOAC 920.39(a)]。并且多数情况下,在 30 min 内完成,但肉类样品需在 90 ℃ 下抽提 50 min 左右。

整个抽提过程是在一个密闭的氮气环境,3 倍于溶剂沸点的情况下,来加速脂肪抽提。通过自动控制溶剂的用量、流速、温度和压力使脂肪的分析时间由传统的 Soxhlet 法的数小时缩短到只用数十分钟。

Ankom 这种抽提脂肪的方法在行业中是独一无二的(正在申请专利)。ABE 技术采用经典的脂肪提取剂完成粗脂肪的测定。通过系统的升温、升压,从而使某些难于处理的样品的测定值与水解方法测定值一致。采用美国官方饲料控制协会(The Association of American Feed Control Officials, AAFCO)和其他合作实验室的数据比较 Ankom 方法的相对准确性。结果表明,Ankom XT20 脂肪分析仪可以满足寻求一种准确、精密和经济快速的测定粗脂肪的方法的实验室的需求。

安全:Ankom 脂肪分析仪采用了使用普通挥发性易燃溶剂抽提的安全设

计。仪器的设计包含了几个水平失败操作,但仍保证安全的设置。多数情况下,一个危险情况的出现需要有四次失败操作才能发生。当提取缸密封后,整个提取过程才开始。在打开浸提缸前,溶剂可完全蒸发,并充满氮气。

电子电路元件密封在一个隔离的电子单元中,电子单元中的线路也是安全或防爆的。不锈钢提取缸,用一个合成橡胶环密封。每一步操作前,计算机测试压力。盖子由氮气气动控制。加热板被完全密封和隔离在一个不锈钢单元中,充有氮气。样品架的转动靠磁力驱动。

作为一个附加的安全因素,Ankom XT20 脂肪分析仪带有一个电子有机蒸汽检测器(OVD),OVD 信号由 XT20 计算机监视,当有机蒸汽被检测到就会显示到显示屏上。如果有机蒸汽的浓度达到爆炸极限下限的 40%,计算机将关闭密封电子单元外面的所有电路。

应用滤袋技术测定饲料中脂肪的方法步骤

仪器和材料

(1)Ankom XT20 脂肪分析仪。

(2)XT20 滤袋。

(3)石油醚。

(4)封口机。

测定步骤

(1)称取 1~3 g 代表性样品于已知质量的 XT20 滤袋中,封口。

(2)将盛有样品的滤袋摆放在 XT20 样品架上。

(3)将 XT20 样品架放入分析仪的抽提缸中。

(4)按 LID 按钮关闭抽提缸盖。

(5)从操作控制台(operator control station,OCS)上选择程序方式,按“Auto Start”(自动开始)。一旦一个程序或者手动输入设定被选中,仪器会开始所有的所需步骤。

(6)当抽提过程完成后,XT20-OCS 将显示“Test Complete-Remove Samples”(测试结束,移去样品)。

(7)将滤袋置于 100 ℃条件下干燥 1 h,并称重。

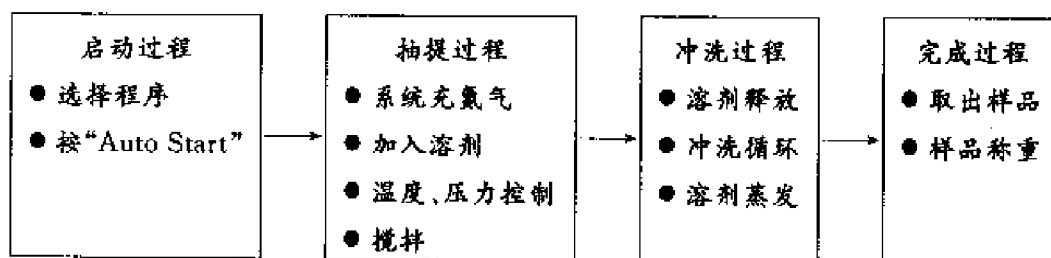
结果计算

计算公式:

$$w(\text{EE}) = [(m_{\text{样}} \times w_{\text{DM}}) - (m_{\text{滤袋后}} - m_{\text{滤袋}})] / m_{\text{样}}$$

式中:  $m_{\text{样}}$  为试样质量, g;  $w_{\text{DM}}$  为干物质的质量分数;  $m_{\text{提取后}}$  为抽提后试样质量, g;  
 $m_{\text{滤袋}}$  为滤袋质量, g。

流程图



## 4.5 饲料中粗纤维和 ADF、NDF 的测定

纤维素是植物细胞壁的主要成分,它是高分子化合物,不溶于水和任何有机溶剂。在稀酸或稀碱中也相当稳定,但与硫酸或盐酸共热时可水解为  $\alpha$ -葡萄糖。

根据纤维素的性质,测定时首先将其与淀粉、蛋白质等物质分离,然后定量。常用的测定方法有:酸碱洗涤法、中性洗涤剂法、酸性洗涤剂法等。

本节主要介绍酸碱洗涤法。另外,也介绍范氏(Van Soest)中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的测定方法。

### 4.5.1 饲料中粗纤维的测定(酸碱法)

#### 4.5.1.1 适用范围

本方法适用于各种混合饲料、配合饲料、浓缩饲料及单一饲料中粗纤维的测定。

#### 4.5.1.2 测定原理

用固定量的酸和碱,在特定条件下消煮样品,再用乙醇除去醇可溶物,经高温灼烧扣除矿物质的量,所余量称为粗纤维。它不是一个确切的化学实体,只是在公认强制规定的条件下,测出的概略养分。其中以纤维素为主,还有少量半纤维素和木质素等。

#### 4.5.1.3 仪器和设备

- (1)实验室用样品粉碎机或研钵。
- (2)分析筛。孔径 1.00 mm(18 目)。
- (3)分析天平。感量 0.000 1 g。

- (4)电热恒温烘箱。可控制温度在 $(130 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。
- (5)高温炉。电加热,有温度计且可控制炉温在 $550 \sim 600^\circ\text{C}$ 。
- (6)消煮器(图 4.7)。有冷凝球的高型烧杯(500 mL)或有冷凝管的锥形瓶。

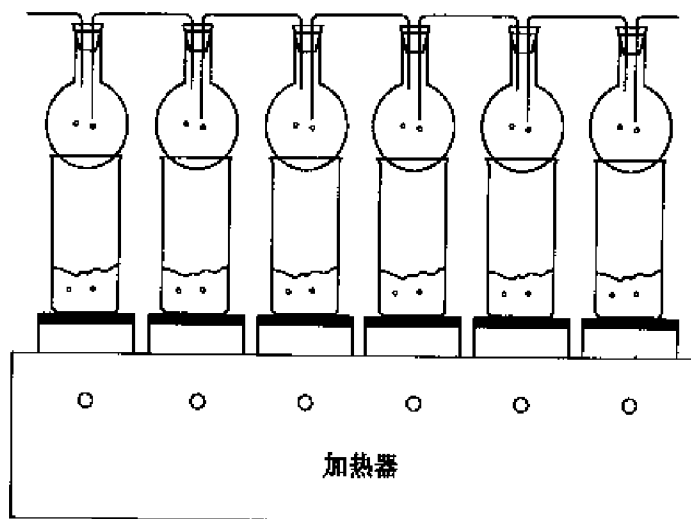


图 4.7 粗纤维消煮装置

- (7)抽滤装置(图 4.8):抽真空装置、吸滤瓶及漏斗。

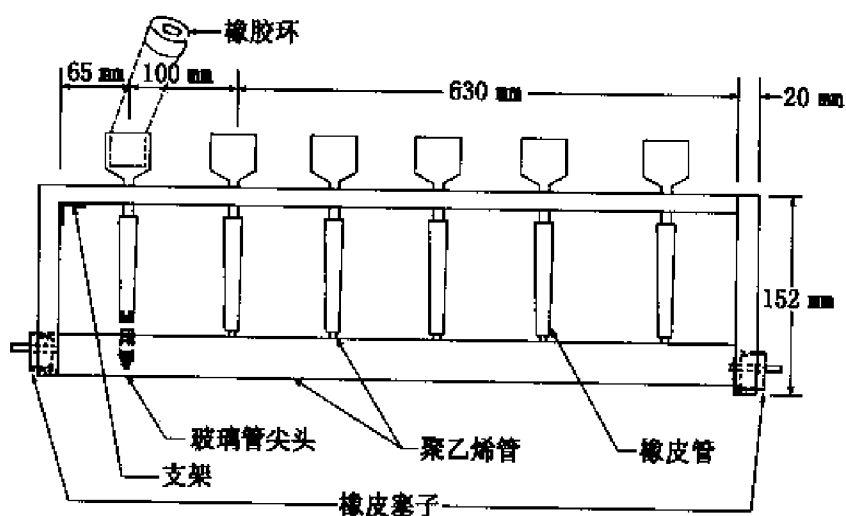


图 4.8 粗纤维抽滤装置

- (8)滤器:使用 200 目不锈钢网或尼龙滤布,或  $G_2$  号玻璃滤器。
- (9)古氏坩埚:30 mL,预先加入酸洗石棉悬浮液。再抽干,以石棉厚度均匀,不透光为宜。
- (10)干燥器:用氯化钙(干燥级)或变色硅胶为干燥剂。

#### 4.5.1.4 试剂及配制

(1)  $(0.128 \pm 0.005) \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸溶液。吸取比重 1.84 的浓硫酸(GB 625) 6.89 mL, 注入 800 mL 水中, 冷却后稀释至 1 000 mL。用氢氧化钠标准溶液标定(参见附录八)。

(2)  $(0.313 \pm 0.005) \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液。迅速称取分析纯氢氧化钠(GB 629) 12.5 g, 溶于 100 mL 水中, 准确定容至 1 000 mL。邻苯二甲酸氢钾法标定(参见附录八)。

(3) 酸洗石棉。将中等长度的酸洗石棉(HG 3-1062)在 1:3 盐酸溶液(V:V)中煮沸 45 min, 过滤后于 550 ℃ 烧灼 16 h, 用  $(0.128 \pm 0.005) \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸溶液浸泡且煮沸 30 min, 过滤, 用水洗净酸。同样用  $(0.313 \pm 0.005) \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液煮沸 30 min, 过滤, 先用少量硫酸溶液洗 1 次, 再用水洗净, 烘干后, 于 550 ℃ 烧灼 2 h, 其空白试验结果为每 1 g 石棉含粗纤维值小于 1 mg。

(4) 95% 乙醇(GB 697)。化学纯。

(5) 乙醚(HG 3-1002)。化学纯。

(6) 正辛醇。分析纯, 防泡剂。

#### 4.5.1.5 试样的选取和制备

取有代表性试样用四分法缩减至 200 g, 粉碎至 18 目, 装入密封容器中, 防止试样成分的变化或变质。

#### 4.5.1.6 测定步骤

(1) 酸处理。称取 1~2 g 试样, 准确至 0.000 2 g, 用乙醚脱脂(含脂肪大于 10% 必须脱脂, 含脂肪低于 10% 可不脱脂), 置于消煮器的高型烧杯中, 加入已沸腾的硫酸溶液 200 mL 和 1 滴正辛醇, 立即加热, 使其在 2 min 内沸腾, 且连续微沸  $(30 \pm 1) \text{ min}$ , 注意保持硫酸浓度不变。试样不应该离开溶液沾到瓶壁上。随后抽滤, 残渣用沸蒸馏水洗至中性后抽干。

(2) 碱处理。加已沸腾的氢氧化钠溶液 200 mL 和 1 滴正辛醇, 立即加热, 使其在 2 min 内沸腾, 且连续微沸  $(30 \pm 1) \text{ min}$ , 注意保持氢氧化钠浓度不变。

(3) 抽滤。将(2)中经处理后的样品液用铺有石棉的古氏坩埚上抽滤(上下铺两层玻璃纤维有助于过滤), 先用 25 mL 硫酸溶液洗涤, 将残渣无损失地转移到坩埚中, 用沸水洗至中性, 再用 15 mL 95% 乙醇洗涤, 抽干。

(4) 烘干、灰化。将坩埚放入烘箱, 在  $(130 \pm 2)^\circ\text{C}$  烘箱下烘干 2 h, 取出后在干燥器中冷却至室温, 称重, 再于  $(550 \pm 25)^\circ\text{C}$  高温炉中灼烧 30 min, 称重, 取出后在干燥器中冷却至室温, 称重。

#### 4.5.1.7 测定结果的计算

(1)计算公式。试样中粗纤维质量的分数按公式 4-7 计算。

$$w(\text{CF}) = \frac{m_2 - m_1}{m} \quad 4-7$$

式中： $m$  为试样(未脱脂)质量，g； $m_1$  为  $(130 \pm 2)^\circ\text{C}$  烘干后坩埚及试样残渣质量，g； $m_2$  为  $(550 \pm 25)^\circ\text{C}$  灼烧后坩埚及试样残灰质量，g。

(2)重复性。每个试样应取两个平行样测定，以其算术平均值为结果。

粗纤维含量在 10% 以下，允许相差(绝对值)0.4%。

粗纤维含量在 10% 以上，允许相对偏差为 4%。

#### 4.5.1.8 注意事项

粗纤维的测定也可采用纤维测定仪测定。依各仪器操作说明书进行测定。

#### 4.5.2 范氏(Van Soest)中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的测定(附纤维素、木质素的测定)

传统的粗纤维测定法(酸碱洗涤法)存在严重的缺点，测得的结果仅包括部分纤维素和少量半纤维素以及木质素。所测粗纤维含量要低于实际含量，而计算得出的无氮浸出物含量则又高于实际含量。另外，粗纤维不是一种纯化合物，而是几种化合物的混合物。鉴于此，Van Soest 提出了中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维的测定方法。

##### 4.5.2.1 测定原理

(1)应用中性洗涤剂分析饲料，使植物性饲料中大部分细胞内容物溶解于洗涤剂中，称之为中性洗涤剂溶解物(NDS)，其中包括脂肪、糖、淀粉和蛋白质。剩余的不溶解残渣主要是细胞壁组分，称为中性洗涤纤维(NDF)，其中包括半纤维素、纤维素、木质素、硅酸盐和很少量的蛋白质。

(2)应用酸性洗涤剂可将 NDF 各组分进一步细分。植物性饲料中可溶于酸性洗涤剂的部分称为酸性洗涤剂溶解物(ADS)，它包括 NDS 和半纤维素；剩余的残渣称为酸性洗涤纤维(ADF)，其中包括纤维素、木质素和硅酸盐。由 NDF 和 ADF 之差，可得饲料的半纤维素含量。

(3)应用 72% 硫酸消化 ADF，纤维素被溶解，其残渣为木质素和硅酸盐。从 ADF 值中减去 72% 硫酸消化后残渣部分，则为纤维素含量。

(4)将经 72% 硫酸消化后的残渣灰化，留下的灰分即为饲料中硅酸盐的含量。在灰化中逸失的部分即为酸性洗涤木质素(ADL)。

见于以上，利用洗涤剂纤维分析法，可以准确地获得植物性饲料中所含纤维



素、半纤维素、木质素和酸不溶灰分的含量(图 4.9)。从而解决了传统的常规分析中测定粗纤维时带来的问题。这无疑是纤维素测定的一项重大改革。

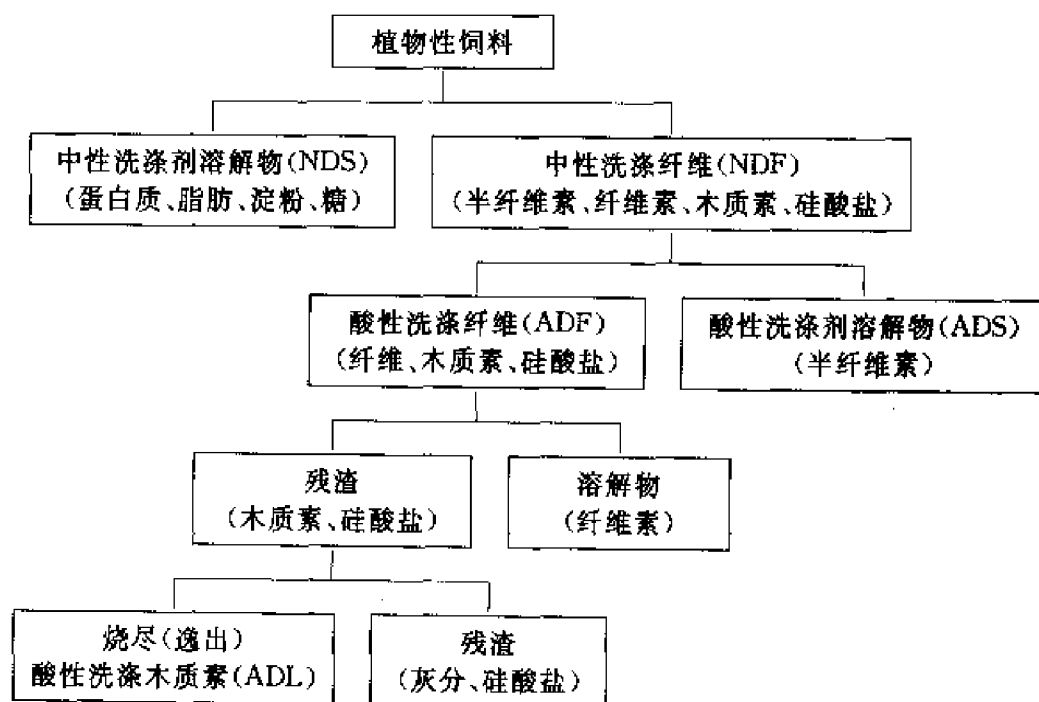


图 4.9 Van Soest 纤维素分析方案

目前,酸性洗涤纤维测定法已获得公认,而中性洗涤纤维测定法由于还存在某些缺点,尚在继续研究改进之中(4.5.2.6 注解),所以还不能完全代替传统的粗纤维测定法。

#### 4.5.2.2 仪器

同粗纤维的测定。

#### 4.5.2.3 试剂及配制

(1)  $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  十二烷基硫酸钠(中性洗涤剂)溶液。称取  $18.61\text{ g}$  乙二胺四乙酸钠(EDTA)和  $6.81\text{ g}$  四硼酸钠( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )同放入  $1\,000\text{ mL}$  烧杯中,加少量水加热溶解后,再加入  $30\text{ g}$  十二烷基硫酸钠。称取  $4.65\text{ g}$  无水磷酸二氢钠,置于另一烧杯中,加少量水,微微加热溶解后倾于第一个烧杯中,稀释至  $100\text{ mL}$ 。此溶液 pH 在  $6.9 \sim 7.0$ (一般不需调整)。

(2)  $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  十六烷三甲基溴化铵(酸性洗涤剂)溶液。称取  $20\text{ g}$  十六烷三甲基溴化铵,溶于  $1\,000\text{ mL}$  已标定过的  $2.0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸溶液中,搅动溶解,必要时过滤。

(3)  $2.0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸溶液。取  $49\text{ g}$ (约  $27\text{ mL}$ )浓硫酸,慢慢加入已装有

500 mL 水的 1 000 mL 容量瓶中,冷却后加水至刻度,标定。标定方法见附录八。

(4)酸洗石棉。处理方法同酸碱洗涤法。

(5)72%硫酸。取 734.69 mL 浓硫酸,倒入 200 mL 水中,冷却后稀释至 100 mL。

(6)其他试剂。丙酮,无水硫酸钠,十氢化萘。

#### 4.5.2.4 测定步骤

(1)NDF 的测定。

①准确称取过 40 目筛饲料样品  $0.5\sim 1.0\text{ g}(m)$ ,置无嘴高型烧杯中,加入中性洗涤剂溶液 100 mL 和 2 mL 十氢化萘即萘烷和 0.5 g 无水亚硫酸钠。

②装上冷凝装置,立即置于电炉上煮沸(5~10 min),并微沸 1 h。

③煮沸完毕,冷却 10 min,将已知质量的玻璃坩埚( $m_1$ )安装于抽滤瓶上,将残渣全部移入,抽滤,并用沸水冲洗,再抽滤。再用 20 mL 丙酮冲洗,抽滤。

④取下坩埚,105 ℃烘干,称重( $m_2$ )。

(2)ADF 的测定。

①准确称取样品  $0.5\sim 1.0\text{ g}(m')$ ,置于无嘴烧杯中,加入酸性洗涤剂溶液 100 mL 和数滴十氢化萘。

②同 NDF 测定。

③用已知质量的玻璃坩埚( $m_1'$ ),在抽滤瓶上抽滤残渣,并用沸水洗涤残渣,抽滤反复 3 次。然后用少量丙酮洗涤残渣,反复冲洗至滤液无色为止,抽净全部丙酮。

④同 NDF 测定,坩埚+残渣质量为  $m_2'$ 。

(3)木质素的测定。

①在上述酸性洗涤纤维测定中含有纤维残渣的已知质量的玻璃坩埚( $m_1'$ )中加入 1 g 石棉,将玻璃坩埚安放在 50 mL 烧杯或浅搪瓷盘上,注入凉的 72%硫酸(15 ℃)入坩埚,使淹没坩埚中的纤维与石棉,用玻璃棒搅成浆状,并将全部大块弄碎,玻璃棒可存在坩埚内。

②当坩埚中酸流出时,每 1 h 再加酸并搅动,使坩埚温度保持在 20~23 ℃(必要时可以冷却)。

③3 h 后过滤。可利用真空泵尽量抽尽坩埚中的酸,用水洗涤直到洗过液的 pH 值为中性为止,冲洗坩埚边缘,撤出搅动用玻璃棒。

④将坩埚置于 105 ℃烘箱中烘干,至恒重( $m_3$ )。

⑤在高温电炉中(500 ℃)灼烧坩埚 2 h,将坩埚趁热取出,冷却称重( $m_4$ )。

⑥用石棉作空白试验:称取 1 g 石棉放入已知质量的玻璃坩埚中,从上述步骤(3)①的将玻璃坩埚要放在……直到步骤(3)⑤,记录烧灼石棉的失重( $m_5$ )。如果石棉空白试验失重小于  $0.0020 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  石棉,则可停止空白试验。

#### 4.5.2.5 结果计算

(1)NDF 的计算:

$$w(\text{NDF}) = \frac{m_2 - m_1}{m} \quad 4-8$$

式中: $m_1$  为坩埚+NDF 质量,g; $m_2$  为坩埚质量,g; $m$  为试样质量,g。

(2)ADF 的计算:

$$w(\text{ADF}) = \frac{m_2' - m_1'}{m'} \quad 4-9$$

式中: $m_2'$  为坩埚+ADF 质量,g; $m_1'$  为坩埚质量,g; $m'$  为试样质量,g。

(3)半纤维素的计算:

$$w(\text{半纤维素}) = w(\text{NDF}) - w(\text{ADF}) \quad 4-10$$

(4)酸性洗涤木质素(ADL)的计算:

$$w(\text{ADL}) = \frac{m_3 - m_4 - m_5}{m'} \quad 4-11$$

式中: $m'$  为试样质量,g; $m_3$  为 72%硫酸消化后坩埚+石棉+残渣质量,g; $m_4$  为灰化后坩埚+石棉+残渣质量,g; $m_5$  为石棉空白试验中失重,g。

(5)酸不溶灰分(AIA)的计算:

$$w(\text{AIA}) = \frac{m_4 - m_2' + m_5 - \text{石棉质量}}{m'} \quad 4-12$$

式中: $m'$ 、 $m_2'$  为同“ADF”计算公式; $m_4$ 、 $m_5$  为同“ADL”计算公式;石棉质量为测定木质素时加入的石棉绝干质量,g。

(6)纤维素:

$$w(\text{纤维素}) = w(\text{ADF}) - w(\text{ADL}) - w(\text{AIA}) \quad 4-13$$

#### 4.5.2.6 注解

测定高蛋白饲料中的中性洗涤纤维时,由于中性洗涤剂提取蛋白质的效率不高,因而残留的蛋白质混杂在中性洗涤纤维中,使测定值偏高。同样,淀粉也有

相似的干扰作用,针对这一问题,已有人提出了以下改进方法。

①将中性洗涤剂溶液的 pH 值由 6.9~7.1 调节到 3.5 左右。

②在用中性洗涤剂消化高蛋白饲料之前,先用蛋白酶处理样品,使其中的蛋白质被充分水解后,再用中性洗涤剂消化,得到蛋白酶处理的中性洗涤纤维。

③对高淀粉饲料可以考虑先用  $\alpha$ -淀粉酶处理后再经中性洗涤剂消化,得到  $\alpha$ -淀粉酶处理的中性洗涤纤维。

## 附 4.5 滤袋技术在纤维测定中的应用

滤袋技术(filter bag technology, FBT)是 20 世纪 90 年初发展起来的一种简便易行,高效准确分析技术。该项技术目前主要应用于饲料和食品中粗纤维(CF),中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)的测定。在该项技术的开发过程中,美国 Ankom 公司的创始人之父 Dr. R. J. Komarek,著名的营养学家、油脂化学家、生化/营养/生理方面的大学教授,做出了卓越贡献。众所周知的纤维素分析方案的创始人 Dr. Peter Van Soest,也参加了此项技术的开发。

1993 年由美国康奈尔大学和加拿大共同合作,开发了 Ankom 纤维分析仪获得专利。产品开发后的最初两年,该产品和技术应用仅限于国际上 4~6 个国家。自 1996 年以来,国际市场迅速扩展。目前已在世界上 75 个国家有用户,并被美国、法国、意大利、阿根廷、爱尔兰、澳大利亚、肯尼亚和越来越多的国家政府和研究机构所采用。

### 一、滤袋的结构特点

用于纤维素分析的滤袋是用特殊材料制成的统一规格,具有一定孔隙的三维结构袋。用于纤维素测定和体外消化率测定的 F57 滤袋的孔径为 30  $\mu\text{m}$ 。由于这种特殊结构,可使溶液自由通过,但同时不使袋内物质流出。这种滤袋可耐受强烈化学试剂,甚至可耐受 72% 硫酸。做工精制,燃烧后无灰,并且不含氮。

### 二、应用滤袋技术测定饲料中粗纤维的方法步骤

仪器设备 Ankom 220 型纤维分析仪, F57 滤袋, 封口机, 如图 4.10 所示。

试剂  $(0.128 \pm 0.005) \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸溶液,  $(0.313 \pm 0.005) \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液, 丙酮。

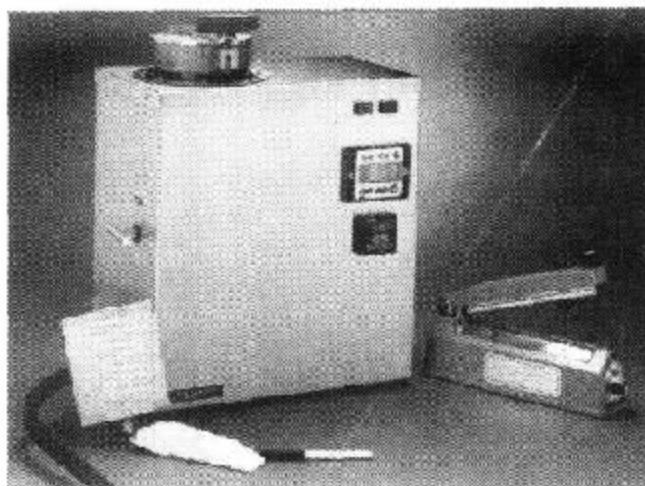


图 4.10 Ankom 220 型纤维分析装置

#### 测定操作步骤

采用滤袋分析饲料粗纤维主要包括以下几个主要步骤：

(1) 首先将 1 g 左右的样品装入已知质量的 F57 滤袋中，然后用封口机封口。平放在样品架上。样品架每批可同时放 24 个滤袋，分 8 层，每层放 3 个滤袋。

(2) 然后将放有滤袋的样品架置于纤维分析仪的消煮容器中，加入 1 900~2 000 mL 室温硫酸溶液 $[(0.128 \pm 0.005) \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ ，密封。按下加热和搅拌按钮，设定好时间(45 min)。待容器中温度显示达 100 ℃，按下计时按钮，开始倒计时。

(3) 45 min 后，关掉加热和搅拌开关，停止加热和搅拌。先打开废液阀，将废液排掉。待废液排尽，关闭排液阀。然后打开容器盖，加入 1 900~2 000 mL 热的水(90~100 ℃)，按下搅拌开关，盖好盖，冲洗滤袋 3~5 min。然后再重复 2 次。

(4) 加入 1 900~2 000 mL 室温碱溶液 $[(0.313 \pm 0.005) \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ 氢氧化钠溶液，密封。按下加热和搅拌按钮，设定好时间(45 min)。待容器中温度显示达 100 ℃，按下计时按钮，开始倒计时。

(5) 45 min 后，关掉加热和搅拌开关，停止加热和搅拌。先打开废液阀，将废液排掉。待废液排尽，关闭排液阀。然后打开容器盖，加入 1 900~2 000 mL 热水(90~100 ℃)，打开搅拌开关，盖好盖，冲洗滤袋 3~5 min。然后再重复 2 次。

(6) 将样品架从容器中取出，放置在干净搪瓷盘中，用手将滤袋中的水分轻轻挤掉。然后将滤袋置于干净烧杯中，加入丙酮，使滤袋浸没。2~3 min 后取出，轻轻挤出丙酮，并在通风橱中晾干。

(7) 105 ℃烘箱中烘干 2~3 h, 冷却, 称重。

(8) 将滤袋置于已知质量坩埚中, 在电炉上炭化至无烟。然后转移到高温电炉中 550 ℃灰化 2 h。冷却, 称重。

结果计算:

$$w(\text{CF}) = \frac{m_3 - m_2 - m_4 + m_5}{m_1} \quad 4-14$$

式中:  $m_1$  为试样质量, g;  $m_2$  为滤袋质量, g;  $m_3$  为滤袋 + 残渣质量, g;  $m_4$  为灰分质量, g;  $m_5$  为空白灰分质量, g。

### 三、滤袋技术分析纤维素的优点

采用滤袋技术分析粗纤维时, 省去了抽滤, 而且可批量进行测定。归纳起来具体有以下几方面的优点:

(1) 精密度和准确度高。当采用滤袋技术时, 可消除很多影响纤维素分析结果的准确度和精确度的因素。操作人员间由于操作误差对分析结果产生的影响大大降低, 甚至可完全消除, 从而使分析结果重现性很好。操作人员只需认真按照操作规程进行, 就可获得准确的分析结果。

(2) 分析成本降低。一方面由于 Ankom 纤维分析系统比目前市场其他纤维素分析仪器的廉价, 更主要的是操作人员不必专门看守, 而同时可交替进行其他分析工作。熟练的操作人员, 1 d 可测定 4 批纤维素分析样品, 共 96 个。工作效率可大大提高。分析每个样品的劳动力成本可减少 50% 以上。

(3) 安全。Ankom 纤维素分析系统免除了人工直接处理热的化学试剂。整个分析过程非常安全。

(4) 分析结果准确。在世界许多著名实验室进行大量的对比分析数据表明, 滤袋分析技术适合于各种样品, 并且其分析结果可与传统方法(酸碱法)结果相吻合。

## 附 4.6 Tecator 公司 Fibertec System 纤维测定仪操作步骤

特卡托纤维(Fibertec)测定仪(图 4.11)是一种适用于新旧测定纤维方法的半自动化仪器。使用方便、灵活, 特别在灵活性方面, 更予以特殊关注。因此, 该仪器既适用于实验室的常规分析工作, 同时, 又可用于研究和开发方面。

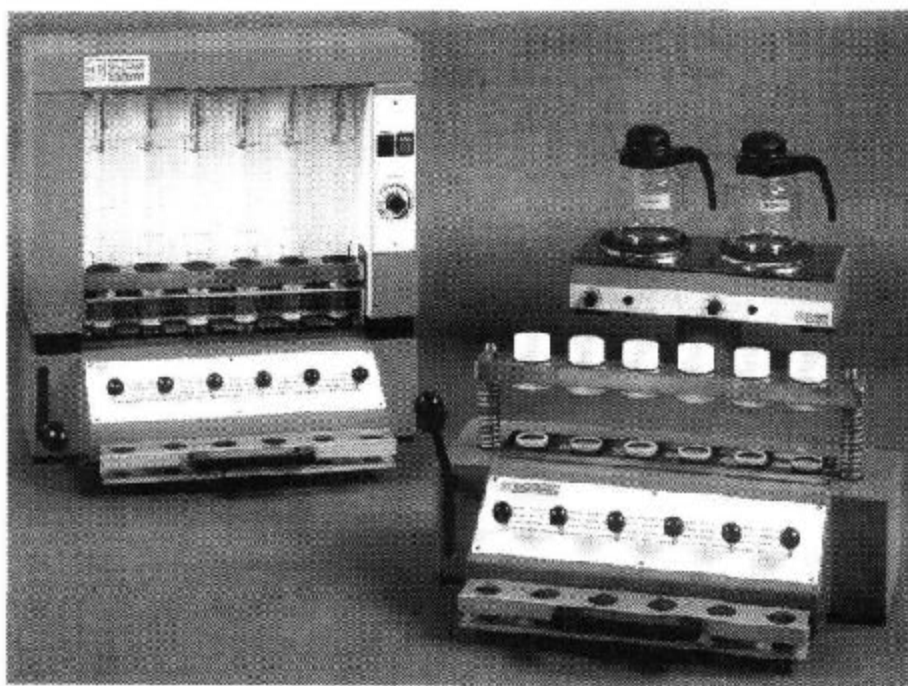


图 4.11 Tecator 公司 Fibertec System 纤维测定仪

测试样品称重后,置于扣去皮重的过滤坩埚内。将 6 个盛试样或不盛试样的过滤坩埚放在一个特备的夹子上,每一个坩埚要进行标号,例如: $P_2-1, 2, 3$ 。 $P_2$ 代表过滤坩埚底面的微孔的型号;1,2,3 是批号。

用煮沸试剂单次或连续浸提时,应在热浸提器内进行。盛有试样残渣的过滤坩埚可用于一次或多次的浸提处理。在一个连续浸提分析时,每一次浸提完毕后,可随时很方便的取下来,烘干、称重。

热浸提所用的试剂,存放于有良好绝热外套的试剂瓶内。通过安装在水浴上的热交换器的循环水来使其预热,并对每次热浸提完毕后用来冲洗过滤坩埚或煮沸蒸馏柱。

将预热过的试剂加入煮沸蒸馏柱过滤坩埚系统,使进一步由辐射热元件加热至沸腾。

冷浸提器是为测定前使试样脱脂时应用的。在热浸提后用丙酮冲洗,再用 72% 硫酸法测定木质素时应用。

关于测定方法细节,请查阅测定方法说明书。

## 4.6 饲料中粗灰分的测定

试样经灼烧完全后,余下的残留物质(如氧化物和盐)称为灰分。灰分有水溶性与水不溶性,酸溶性与酸不溶性。水溶性灰分大部分是钾、钠、钙、镁等氧化物和可溶性盐,水不溶性灰分除泥沙外,还有铁、铝等的氧化物和碱土金属的碱式磷酸盐。酸不溶性灰分大部分为污染掺入的泥沙和原来存在于动植物组织中经灼烧成的二氧化硅。

### 4.6.1 适用范围

本方法适用于各种混合饲料、配合饲料、浓缩料和单一饲料中粗灰分的测定。

### 4.6.2 测定原理

试样在 550℃灼烧后,所得残渣,用质量分数表示。残渣中主要是氧化物,盐类等矿物质,也包括混入饲料中的砂石、土等,故称粗灰分。

### 4.6.3 仪器和设备

- (1)实验室用样品粉碎机或研钵。
- (2)分析筛。孔径 0.45 mm(40 目)。
- (3)分析天平。感量 0.000 1 g。
- (4)高温电炉。电加热,有温度计且可控制炉温在 550~600℃。
- (5)坩埚。30 mL,瓷质。
- (6)干燥器。用氯化钙(干燥级)或变色硅胶为干燥剂。

### 4.6.4 试样的选取和制备

取有代表性试样用四分法缩减至 200 g,粉碎至 40 目,装入密封容器中,防止试样成分的变化或变质。

### 4.6.5 测定步骤

(1)将坩埚和盖一起放入高温炉中,于 $(550\pm 20)$ ℃下灼烧 30 min,取出,在空气中冷却约 1 min,放入干燥器中冷却 30 min,称重。再重复灼烧,冷却、称重,直至 2 次质量之差小于 0.000 5 g 为恒重。



(2)在已知质量的坩埚中称取 2~5 g 试样(灰分质量应在 0.05 g 以上),在电炉上低温炭化至无烟为止。

(3)炭化后将坩埚移入高温炉中,于 $(550 \pm 20)^\circ\text{C}$ 下灼烧 3 h。取出,在空气中冷却约 1 min,放入干燥器中冷却 30 min,称重。再同样灼烧 1 h,冷却、称重,直至 2 次质量之差小于 0.001 g 为恒重。

#### 4.6.6 测定结果的计算

##### 4.6.6.1 计算公式

试样中粗灰分质量分数按公式 4-15 计算。

$$w(\text{Ash}) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad 4-15$$

式中: $m_0$  为已恒重空坩埚的质量,g; $m_1$  为坩埚加试样的质量,g; $m_2$  为灰化后坩埚加灰分质量,g。

##### 4.6.6.2 重复性

每个试样应取两个平行样进行测定,以其算术平均值为结果。

粗灰分含量在 5% 以上时,允许相对偏差为 1%。

粗灰分含量在 5% 以下时,允许相对偏差为 5%。

#### 4.6.7 注意事项

(1)新坩埚编号,将带盖的坩埚洗净烘干后,用钢笔蘸  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化铁墨水溶液(称 0.5 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶于 100 mL 蓝墨水中)编号,然后于高温炉中  $550^\circ\text{C}$  灼烧 30 min 即可。

(2)试样开始炭化时,应打开部分坩埚盖,便于气流流通;温度应逐渐上升,防止火力过大而使部分样品颗粒被逸出的气体带走。

(3)为了避免试样氧化不足,不应把试样压得过紧,试样应松松地放在坩埚内。

(4)灼烧温度不宜超过  $600^\circ\text{C}$ ,否则会引起磷、硫等盐的挥发。

(5)灼烧残渣颜色与试样中各元素含量有关,含铁高时为红棕色,含锰高为淡蓝色。但有明显黑色炭粒时,为炭化不完全,应延长灼烧时间。

### 4.7 饲料中无氮浸出物(NFE)的计算——差值计算

一般采用的饲料分析方案中,无氮浸出物(NFE)是根据相差计算法而求

得,即在 1 中减去水分、粗蛋白质、粗脂肪、粗纤维、粗灰分等的质量分数,所得之差即为无氮浸出物的质量分数。由于不进行直接测定,因此,只能概括说明饲料中这部分养分的含量。

#### 4.7.1 原理

饲料中无氮浸出物主要指的是淀粉、葡萄糖、果糖、蔗糖、糊精、五碳糖胶、有机酸和不属于纤维素的其他碳水化合物,如半纤维素及一部分木质素(不同来源的饲料,其无氮浸出物中所含木质素的量相差极大)。在植物性饲料中只有少量的有机酸游离存在或与钾、钠、钙等形成盐类。有机酸多为酒石酸、柠檬酸、草酸、苹果酸;发酵过的饲料多含乳酸、醋酸和酪酸等。

由于不同种类饲料的无氮浸出物所含上述各种养分的比重相差很大(特别是木质素的成分),因此不同种类饲料无氮浸出物的营养价值也相差悬殊。但在新的饲料分析方案未确定下来以前,无氮浸出物的成分比较复杂,一般不进行实际测定,而根据相差算法来求得,暂时仍采用旧方案中规定的相差算法。

#### 4.7.2 计算方法

$$w(\text{NFE}) = 1 - w(\text{H}_2\text{O}) - w(\text{CP}) - w(\text{EE}) - w(\text{CF}) - w(\text{Ash}) = \\ w(\text{DM}) - w(\text{CP}) - w(\text{EE}) - w(\text{CF}) - w(\text{Ash})$$

### 附 4.7 饲料中可利用糖(碳水化合物)的测定

常规饲料分析方案中,关于碳水化合物部分的测定,是以无氮浸出物(NFE)与粗纤维(CF)两项来表示的。显然,这是一个概略的分析测定。它未能正确地阐明饲料中这一组分的真实情况。例如马铃薯和甘薯中是以淀粉为主要成分的,而甜菜和饲用萝卜则以糖和淀粉为主,秸秆类饲料则又以纤维素占多数。因此,饲料中碳水化合物部分,可包括:总还原糖、淀粉、半纤维素、(纯)纤维素和木质素等 5 个组分。而用“差值法”计算出的无氮浸出物含量,事实上就不能表示饲料中全部可利用的碳水化合物(糖)。因此,为了正确计算饲料的热能值(如消化能、代谢能等),直接测定饲料中可利用糖的含量就很必要。例如, Carpenter 和 Clegg(1956)曾提出用糖和淀粉两个变量来替代无氮浸出物(NFE),这样就可以提高计算饲料热能值回归公式的精度;又如 Sibbald(1963)和田河山等(1991)等在计算鸡饲料的代谢能时,在用更大范围样品的回归公式中,其变量中也都采用

了糖和淀粉的数字,从而提高了估算公式的精度,因而使筛选出的回归公式具有较大的应用价值。为此,我们在下面介绍了采用简单快速的蒽酮比色法测定饲料中可利用糖的方法,仅供参考。

### 一、饲料中可利用糖的测定

(1)仪器与试剂。分光光度计。

80%乙醇(或80%甲醇):用水20份稀释80份乙醇( $V:V$ ),配成80%乙醇。

高峰氏糖化酶(takadiastase)(或淀粉葡萄糖酶,amylglucosidase)——配制新鲜的 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高峰氏糖化酶溶液或1 mL溶液中含有1 mg淀粉葡萄糖酶悬浮液。

乙酸缓冲液: $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,pH4.5。

蒽酮-硫脲嘧啶溶液(anthrone-thiourea):将蒽酮在乙醇中再结晶。制配硫酸溶液,将660 mL硫酸,慢慢地、边加、边搅拌,边冷却地注入340 mL冷水中,最后配制成硫酸溶液。同样方法,应配制几升溶液(备用)。另外,在80~90℃条件下,溶解10 g硫脲嘧啶和0.5 g蒽酮在1 000 mL的66%硫酸溶液中,此溶液可在4℃条件下保存2周。

葡萄糖标准溶液:此标准溶液每升含葡萄糖200 mg。即1 mL含葡萄糖200  $\mu\text{g}$ 。每次测定应事先用1 mL含25~200  $\mu\text{g}$ 葡萄糖标准液,绘制标准曲线。标准曲线至少应有4个点。

(2)测定步骤。准确称取3~4 g风干样品于锥形瓶中,并用80%乙醇25 mL在沸点进行浸提。然后,将热的浸提液移入100 mL容量瓶中,并以80%乙醇液加至刻度。此浸提液即用做游离糖的测定。

锥形瓶中的残渣用乙醚洗涤并在室温下进行干燥。然后在锥形瓶中加入已知质量的样品,加入10 mL热水。并将此锥形瓶在沸水浴上处理15 min,使其中淀粉形成胶凝。在40℃条件下冷却,加入1.2 mL的乙酸缓冲液及5 mL的高峰氏糖化酶(或淀粉葡萄糖酶)溶液。使混合后,再加几滴甲苯以防腐。然后,移入37℃培养箱中过夜。在培养完毕后,加入4倍容积的乙醇,使其混合。将此内容物置离心机中离心,移去其上浮液注入100 mL容量瓶中,其沉淀物则再次用80%乙醇20 mL使之悬浮,然后再经离心,其上清液集中于容量瓶中,并定容到100 mL刻度。

含有乙醇或甲醇的溶液可以与蒽酮试剂直接使用。同样,在葡萄糖标准溶液中可加入合乎需要的等量乙醇。

吸取测试溶液和葡萄糖标准溶液各 1 mL 注入具有玻璃塞的试管中,并加入 10 mL 蒽酮试剂,然后塞紧试管。将试管置于水浴中使在室温下达到平衡。然后在沸水浴中加热 15 min。然后用水冷却至室温,并置试管于暗处 30 min,使产生颜色。最后在 620 nm 下测定其吸光度(OD)。

如果乙醇浸出物具有深的颜色,则应采用旋转蒸发器用温热蒸发去乙醇,并将其含水残渣转移至锥形瓶,加入饱和乙酸铅溶液 0.1 mL,使容量达 100 mL,并混匀。在 15 min 后,将此溶液过滤,如果在去除铅(Pb)后,即可测定糖的含量。如果溶液含有铅(Pb),则需用固体碳酸钠使其沉淀。

如果醇可溶糖是从淀粉、糊精和糖原中分别测定的,则本法可以获得精确的测定值。

注:本材料引自 Southgate, D. A. T., 1969, J. Sci. Fd. Agric. 20, 326~330。

## 二、可利用糖的快速比色测定法(注)

(注: Clegg K. M The application of the anthrone reagent to the estimation of starch in Cereals. J Sci Food Agric 7:40, 1956)

(1)糖的提取。称取精磨试样 0.2 g,放入 50 mL 离心管中,先加 2 滴 80% 乙醇以助分散均匀,再加入 5 mL 蒸馏水,搅拌混匀。然后加入 25 mL 热的 80% 乙醇,继续搅拌。搅拌停止后放置 5 min 离心。将上清液轻轻倒入 100 mL 的减压蒸馏瓶内,并重新加入 30 mL 热的 80% 乙醇,重复提取。合并两次乙醇提取液,用减压蒸馏法在水浴上除去其中的乙醇,将剩余的水溶液再用蒸馏水稀释,使该溶液最终含糖浓度大约在  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(2)淀粉的提取。将 5 mL 蒸馏水加入经乙醇提取后的残余物中,搅拌后再加入 6.5 mL 的 52% 过氯酸溶液,继续搅拌 5 min。然后间歇地搅拌 30 min,此时把试管内容物全部洗入前次提取物的容量瓶内,然后用蒸馏水稀释到 100 mL,再将溶液过滤,弃去开始的 5 mL,并将滤液稀释到大约含糖浓度在  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。比色操作如表 4.2 所示。

表 4.2 比色管的制作

试 剂	空白管	样品管 D	(样品—内标准)管
蒸馏水/mL	2	1	—
标准葡萄糖工作液/mL	—	—	1
蒽酮试剂/mL	10	10	10
样品提取液/mL	—	1	1

(3) 提取液中糖含量的测定。按表 4.2 每种测定应制备双管, 摇匀后放入沸水中煮 12 min, 然后迅速放入温度相当于室温的水中使冷却至室温, 在分光光度计 630 nm 处分别测定糖提取液和淀粉提取液的浓度。

(4) 计算。可根据下述计算方法, 得到各测定样品的含糖量

① 样品含糖葡萄糖( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) =

$$\frac{100 \mu\text{g}}{\text{含内标准样品吸光度} - \text{样品吸光度}} \times \text{样品吸光度}$$

② 提取液中糖(或淀粉)总量(mL)/0.2 g 样品 =

$$\frac{\text{样品含糖葡萄糖}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) \times \text{稀释倍数}}{1000}$$

③ 可利用糖 =  $\frac{\text{糖总量}(\text{mg}) + \text{淀粉总量} \times 0.9(\text{注})}{200} \times 100\%$

(注: 经多次实验结果测知, 用本法浸出的糖液中, 不溶解物质约占 9 mL 容积, 因之, 滤液所测定的糖的结果, 应乘以校正系数 0.9 ( $= \frac{100-9}{100}$ ))

例举 用比色法测定食物中可利用糖的含量 %

样 品	糖	淀粉	可利用糖
南 瓜	52.4	2.6	55.0 %

## 4.8 饲料常规分析的局限性

通常饲料分析所采用的 Weende 系统分析方案, 即所谓饲料常规分析方案, 它仅仅是饲料营养价值评定的一个指示, 它不能精确表示那种饲料所含的营养成分。因此, 这种“概略养分”的分析在饲料评定和日粮配合方面所提供的信息是不够理想的。与每一种“概略养分”分析有关的一些问题, 在本章上述各节中都已有了说明。由于很多不同物质在分析过程中所产生的其他一些问题, 可用表 4.3 中所列出的、在同一组分中把它们一一区分开来(表 4.3)。

从表 4.3 可见, 在营养成分之间还有一个定性的问题, 它没有在常规饲料分析中加以考虑, 而它们对动物的生理作用和营养功能却是有分别不同的重要性。因此, 采用常规饲料分析方案在全面、精确地评价饲料营养价值方面, 则是一个初步的指示。在一些情况下, 仍有待于进一步的、或附加一些分析方法, 深入全面

地进行饲料营养成分的评价。这在本书以后各章节中将予以详细介绍。

表 4.3 在常规饲料分析方案中不同组分中的成分

组 分	成 分
水分	水分(可能存在挥发性的酸和碱)
粗灰分	必需元素 大量元素:K,Mg,Na,S,Ca,P,Cl 微量元素:Fe,Mn,Cu,Co,I,Zn,Mo,Se,F,Br,Ba,Sr 非必需元素:Si,Cr,Ni,Ti,Al,V,B,Pb,Sn
粗蛋白质	蛋白质,氨基酸,胺类,含氮糖苷,糖脂,B族维生素(有时还有硝酸盐类)
粗脂肪	脂肪,油类,蜡,有机酸,色素,甾醇,维生素A、维生素D、维生素E、维生素K
粗纤维	纤维素,半纤维素,木质素
无氮浸出物(NFE)	淀粉,糖,果聚糖,半纤维素,果胶,木质素,有机酸树脂,单宁,色素,水溶性维生素

### 思考题

1. 简述水分测定的常用方法及其原理。
2. 简述凯氏定氮法测定粗蛋白的基本原理和主要测定步骤。
3. 试分析导致试样粗蛋白分析结果偏低的主要原因。
4. 盛有粗脂肪的盛醚瓶在 100~105℃烘箱内的时间为什么不能过长?过长是否会影响测定结果?
5. 脂肪包的长度为何不能超过虹吸管的高度?
6. 饲料中粗纤维是在什么公认的规定条件下测定的?如果这些规定的条件有变动,则所测定结果可否作为纤维含量,试说明其原因。
7. 酸碱法测定粗纤维的缺点是什么?
8. 坩埚加高热后,坩埚钳也需烧热后才可夹取,理由何在?
9. 如何计算饲料中有机物的含量?
10. 无氮浸出物包括哪些成分?如何计算其含量?

## 5 饲料中热能的测定

### 【内容提要】

本章系统介绍了饲料热量的测定原理、仪器设备、测定步骤和结果计算。以 GR-3500 型氧弹式热量计为例,详细介绍了其结构和功能特点。简要介绍了饲料消化能和代谢能的测定原理和步骤。并附有以全收粪法和离体法测定猪饲料表观消化能的测定规程,鸡饲料表观代谢能和氮校正代谢能测定技术规程和国际先进的热量计 PARR 1281 氧弹式热量计的简要操作规程。

### 5.1 概述

测定饲料或粪、尿、动物产品的燃烧热是研究动物能量代谢的基本方法,无论是评定饲料的能量价值或测定动物对能量的需要量,都将应用这一测定方法。

饲料的燃烧热即饲料所含的总能( $E_G$ ),是饲料在燃烧过程中,完全氧化成最终的尾产物(二氧化碳、水及其他气体)所释放的热量。单位质量之物质的燃烧热即该物质的热价,过去通常以  $\text{kcal} \cdot \text{g}^{-1}$  为单位,目前则都改用  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$  ( $1 \text{ kcal} = 4.186 \text{ kJ}$ )。

饲料的消化能( $E_D$ )和代谢能( $E_M$ )按理论上的定义如下:

(1) 饲料的消化能( $E_D, \text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ) = 食入饲料的燃烧热( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ) - 粪中的燃烧热( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )

(2) 饲料的代谢能( $E_M, \text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ) = 食入饲料的燃烧热( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ) - 粪中的燃烧热( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ) - 尿中的燃烧热( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )

因此,测定饲料的消化能或代谢能,必须分别对食入饲料量和排出的粪、尿量进行准确的测量。这可借助进行动物的消化、代谢试验来获得。此外,还应分别测定饲料和粪、尿样品的燃烧热。

因此,在学习并掌握了有关动物消化代谢试验的知识和饲料或粪、尿燃烧热的测定方法之后,就可求出饲料的总能、消化能和代谢能值。表 5.1 是几种饲料猪的  $E_D$  和  $E_M$  的数值。

表 5.1 几种猪饲料营养价值的比较表

 $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ 

饲 料	$E_D$	$E_M$	$E_{MN}$
玉 米	$15.88 \pm 0.25^{a,c}$	$15.67 \pm 0.25^c$	$14.50 \pm 0.18^c$
大 麦	$14.12 \pm 0.26^d$	$13.94 \pm 0.26^{c,e}$	$12.77 \pm 0.21^{b,c}$
小 麦	$15.52 \pm 0.12^{a,b,c}$	$15.17 \pm 0.14^{c,d}$	$13.95 \pm 0.14^{c,d}$
小黑麦	$15.07 \pm 0.13^{b,c}$	$14.74 \pm 0.13^{a,d,e}$	$13.49 \pm 0.14^{a,c,e}$

资料来源:家畜饲养学实验指导,1988。

注:a,b——差异显著, $p < 0.05$ ;c,d,e——差异高度显著, $p < 0.01$ 。 $E_{MN}$ ——氮校正代谢能值。

## 5.2 总能的测定

### 5.2.1 测定原理

有机物的燃烧热系单位质量有机化合物完全氧化时,所能释放出的热量,称为该物质的燃烧热,也称总能。

根据热力学第一定律,一个热化学反应,只要其开始与终末状态一定,则反应的热效应就一定。这一原理使我们测定各种物质的燃烧热变为有意义。有机物差不多均能氧化完全,并且反应进行很快,因此,准确地测定燃烧热就有了可能。由所测得的燃烧热还可以计算反应的热效应和化合物的生成热。

将由消化代谢试验所用的饲料或日粮以及所收集的粪、尿样品,制备成一定质量的测定试样,装于充有 $(25 \pm 5) \text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 纯氧氧弹中进行燃烧。燃烧所产生之热量为氧弹周围已知质量的蒸馏水及热量计整个体系所吸收,并由贝克曼温度计读出水温上升的度数。该上升的温度乘以热量计体系和水的热容量之和,即可得出试样的燃烧热。

在测定过程中一些因素会影响测定结果的准确性,须加以校正才可得出真实的热价。例如,由于辐射的影响,水温上升的度数与由燃烧产热所致的实际升温之间有偏差;引火丝本身燃烧的发热量;以及含有氮、硫等元素的样品,在氧化后生成硝酸、硫酸,其发热量应予以扣除等。

### 5.2.2 仪器、试剂及必需物品

#### 5.2.2.1 仪器

氧弹式热量计(GR-3500型,长沙仪器厂),1套;氧气钢瓶(附氧气表)及支



架,1套;容量瓶 2 000,1 000,200 mL,各 1 个;量筒 200,500 mL,各 1 个;滴定管 50 mL,1 支;吸管 10 mL,1 支;烧杯 250,500 mL,各 1 个。

#### 5.2.2.2 试剂

蒸馏水;苯甲酸(保证级试剂或分析纯); $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液(或  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液); $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基红指示剂(或酚酞指示剂)。

#### 5.2.3 氧弹式热量计结构简介

氧弹式热量计主要由氧弹、金属内筒与外筒(即外用水槽)3部分组成。此外,还有搅拌器、引燃装置、样品压样机、弹头座、氧气表(附氧气减压阀)及氧气过滤器等。

GR-3500 型氧弹式热量计结构示意图如图 5.1 所示。

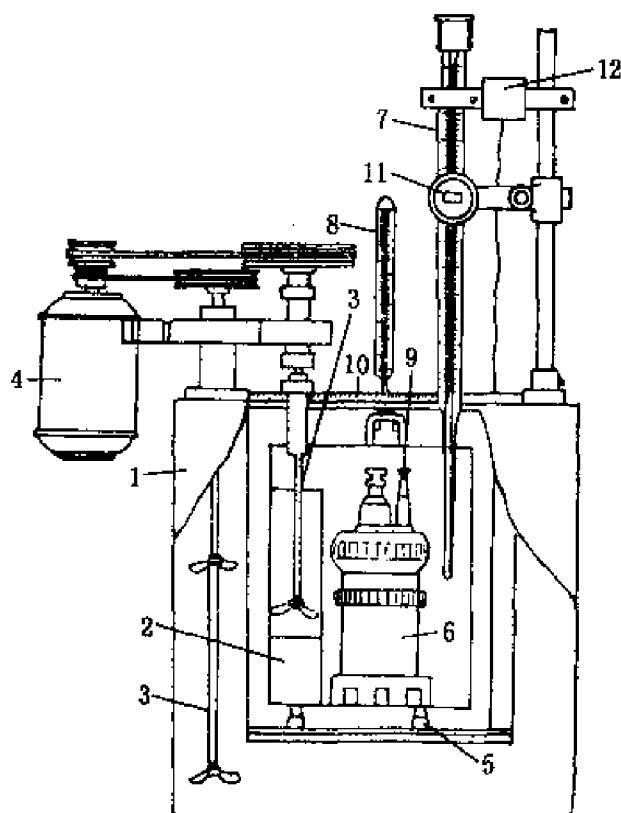


图 5.1 GR-3500 型氧弹式热量计结构示意图

1. 外筒 2. 内筒 3. 搅拌器 4. 搅拌马达 5. 绝热支柱 6. 氧弹 7. 贝克曼温度计  
8. 工业用玻套温度计 9. 电极 10. 盖子 11. 放大镜 12. 电动振动装置

#### 5.2.3.1 氧弹

氧弹为热量计的主要部分,由耐酸不锈钢所铸成。分弹头与弹体两部分。弹

体为一厚壁圆筒,筒口处有螺纹,借螺帽使弹头与弹体旋紧。螺帽与弹头间嵌有耐酸皮圈,当试样燃烧时,弹内压力增加,迫使弹头压紧螺帽,使其间的橡皮垫圈向侧面膨胀而与弹体筒口壁密合,弹内压力越大,则气密性也就越严。

弹头上有进气阀,针形出气阀与电极栓。进气阀在弹头内有止围阀,停止充氧后,由于弹体内压力增大,使止围阀上顶,防止氧气逸出。燃烧后的废气由针形出气阀排出。

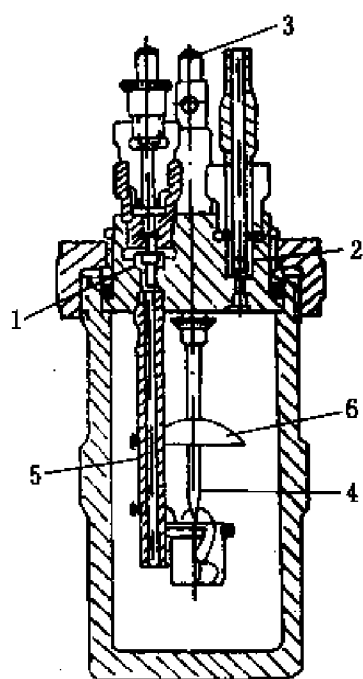


图 5.2 GR-3500 型氧弹式  
热量计纵剖面图

1. 充氧阀门 2. 放氧阀门 3. 电极  
4. 坩埚架 5. 充气管 6. 燃烧挡板

进气阀向下有金属导气管,氧气由进气阀从导气管充入弹体;电极栓向下有一金属棒,与导气管一起构成两电极栓。坩埚悬于二电极之间,试样置于坩埚内,通电后由连在两电极的引火丝点火燃烧。

进气管上固定有遮板,防止试样燃烧时火焰直接喷向弹头,并使产生的热流经遮板反射后,较均匀地分布于氧弹内。

GR-3500 型氧弹式热量计氧弹的纵剖面示意图,如图 5.2 所示。

#### 5.2.3.2 外筒与内筒

为双壁镀镍的金属筒,是热量计的隔热装置。与室温相近的温水由注水口灌入筒内,注水口上有橡皮塞固定的温度计,另有一手摇搅拌器以匀衡水温。内筒为内外镀镍的铜制水容器,置于外筒中央的绝热三角架上。

此外,外筒上有固定贝克曼温度计的支架及读温放大镜。另外,有一可拆卸的马达及搅拌器,用以均衡内筒水温。外筒盖有绝热的塑料盖。备有两个钩子供提取内筒之用。

#### 5.2.3.3 搅拌系统

GR-3500 型氧弹式热量计是内外筒同步搅拌的,搅拌器由搅拌马达带动。外筒搅拌转速为  $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ;内筒为  $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。通过搅拌系统的运动,加速水的循环,使水的温度很快均匀一致。

#### 5.2.3.4 贝克曼温度计及其测温装置

贝克曼温度计为精密的测温仪器,温度计上最小的刻度为  $0.01^\circ\text{C}$ ,用放大镜可估计出  $0.001^\circ\text{C}$ ,温度计的刻度范围很小,仅  $0\sim 5^\circ\text{C}$  或  $0\sim 6^\circ\text{C}$ 。温度计一

端有一回线形储备泡,用以储存多余的水银。此种温度计的优点在于能适应各种不同温度的测定。

温度计水银柱在运动时,由于管壁之间发生摩擦而产生温度停滞现象,影响测温的正确性。为消除上述现象,GR-3500 型氧弹式热量计装有振动器。振动器安置在温度计的支架上,其另一端有温度计夹子,因电磁作用而产生振动。控制振动器的开关设在控制箱上,读温之前闭合开关,使振动器发生作用,可消除停滞现象。贝克曼温度计结构如图 5.3 所示。

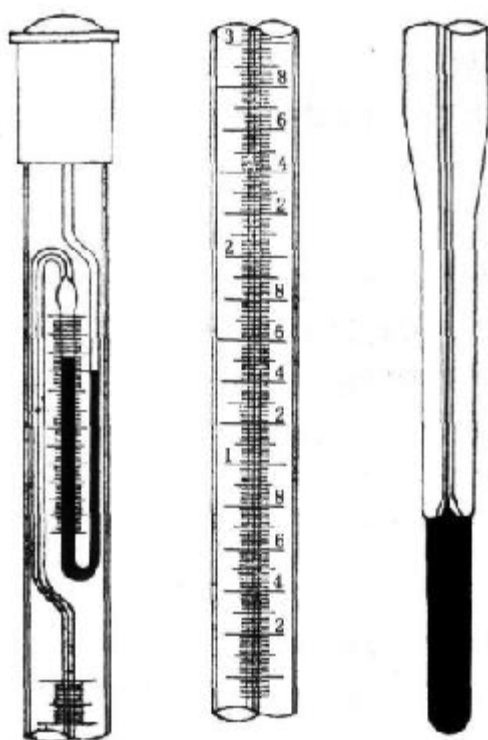


图 5.3 贝克曼温度计结构示意图

#### 5.2.3.5 引燃装置与控制箱

引燃开关设于控制箱上,点火电压 24 V,通电后引火丝燃断,信号灯即熄灭。

为了方便,GR-3500 型热量计点火、记时、振动温度计等,通过一配电装置进行控制。

#### 5.2.3.6 压样机

其用途是将粉状试样压成饼状。使用时应将压样机固定在桌上;如长期不用,应涂一薄层无酸凡士林以防生锈。

#### 5.2.3.7 弹头座

专供放置弹头用。便于连接引火丝等的操作。

#### 5.2.3.8 氧气减压阀

一端直接与氧气钢瓶相连,另一端接氧气过滤器或氧弹进气阀。试验时氧弹仅需  $(25 \pm 5) \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  压力,而一般氧气钢瓶的压力都很高。所以,须装有减压装置。减压阀有 2 个压力表,第一个表乃指示氧气钢瓶压力;第二个表指示工作的压力。氧弹充氧时所需之压力可以通过调整减压阀的手钮来控制。

#### 5.2.3.9 氧气过滤器

降压的氧气通过过滤器除去可能存在的二氧化碳、水及其他酸性气体杂质。过滤器为一镀铬合金钢制成的厚壁圆筒,开端有塑料垫做密封圈,有螺帽扭紧,

故有良好的密闭性。筒内有吸水的硅胶和吸二氧化碳的钠石灰,成分各为 50%,氧气中的杂质经两头的过滤片过滤。不用时将螺帽扭紧,以防硅胶吸水而溶化,过滤剂每隔 3~6 个月应更换 1 次。

新仪器使用前必须用汽油或酒精将过滤器所有零件的油污清除,以免通氧时发生意外的爆炸。

#### 5.2.4 对测热室的要求

测热工作应在恒温条件下进行,否则所得结果将引入误差。在没有恒温室的条件下最好选择无窗的或北屋作测热室。门窗应严密,室内避免阳光照射以及通风和暖气的影响。要求尽可能使室温变动不大。当仪器新搬入室内时,应放置适当时间,待仪器温度与室温平衡时,方可开始试验工作。

#### 5.2.5 操作步骤

##### 5.2.5.1 准备工作

测定前应擦净氧弹各部污物及油渍,以防试验时发生危险,氧气钢瓶应置于阴凉安全处,并应注意避免滑倒。

(1)称量样品及引火丝的准备。取 1~1.5 g 风干饲料样品(经粉碎过 40 目筛),用压样机压成饼状,然后置于干燥洁净的坩埚中称重(准确至 0.000 1 g)。样品的多少依测定时温度上升不高于 3~4 °C 为准,最好以 1 °C 左右为宜。如温差大时,热量计因辐射而损失的热也多,引起的误差也较大。此外,在称量样品的同时,应测定样品的含水量,以便换算成绝干基础的热价。

量取及称重 10 cm 的引火丝,将盛有样品的坩埚置于弹头的坩埚支架上,将引火丝固定在两个电极之上,其中一端应距样品表面 1~2 mm。引火丝切勿接触坩埚。

(2)加水及充氧。在弹头与弹体装配前,取 5~10 mL 水注入氧弹底部,以吸收燃烧过程中产生的五氧化二氮与三氧化硫气体。加入的水量不要求很精确,但与测定热量计水当量相一致。

然后用螺帽将弹头与弹体扭紧,取下进气阀的螺母,拧上连接氧气瓶的气管接头,充氧之前应先打开针形阀。先充氧约  $5 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,使氧弹中空气排尽。然后,充氧压力应逐渐增至  $25 \sim 30 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。但充氧不可过快,否则会使坩埚中的试样为气流所冲散而损失。这一点必须注意。

(3)内外水筒的准备及热量计的安装。从外筒的注水口加入水至离上缘 1.5 cm 处止,为防止水中杂质的沉淀,应用蒸馏水。外筒灌水后可用搅拌器搅拌

(外筒水不须经常更换),待水温与室温一致时,才能使用。如热量计长期不用,应将水套中的水全部放出干燥保存。

热量计内筒的蒸馏水应盖过氧弹进气阀螺母  $2/3$  高度。各套仪器的水量不同,2 000~3 000 g。国产 GR-3500 型热量计的加水量为 3 000 g,每次称量应相等,准确至 0.1~0.5 g (如不具备称量条件,可用容量瓶量取 2 000~3 000 mL 蒸馏水)。为减少辐射,测定前应调节内筒水温使低于外筒水温,GR-3500 型以 0.5~0.7 °C 为宜,其他型号在 1~1.5 °C 之间(试样发热量少时,可相差 0.5 °C)。内筒灌水应在内筒放入外筒,并将氧弹放入内筒后才可进行。灌注时注意勿使水溅出,以免影响数值的准确性。

氧弹在内筒中应放置适当的位置,勿使搅拌器的叶片与内筒或氧弹接触,然后将贝克曼温度计固定于支架上,使其水银球中心位于氧弹一半高度的位置,最后盖上盖子。

整个热量计准备就绪后,才可开动搅拌器,为保证测定时搅拌所生的热大致相等。搅拌器的速度变化,不得超过 10 %。搅拌速度可由控制箱上的旋钮加以调节。

#### 5.2.5.2 测定工作

全部测定工作分为 3 期:燃烧前期(即初期)、燃烧期(即主期)及燃烧后期(即末期)。

(1)燃烧前期(初期)是燃烧之前的阶段,用以了解热由外筒传入内筒的速度。搅拌器开动 3~5 min 后,开始记录温度,每分钟 1 次。当每分钟温度上升几乎恒定时,可定为初期的起点,也即试验的开始点(定为 0 点)。然后,每隔 1 min 读记 1 次温度,如此连续 5~10 min。读温度应精确至 0.001 °C。

(2)燃烧前期之未按电钮点火(此时定为  $a$  点),燃烧前期最后 1 次读温,也就是燃烧期(主期)的第一次读温。燃烧期(主期)内每 0.5 min 记录 1 次,直至温度不再上升为止(此时为  $c$  点),燃烧即行结束。使用的点火电压约为 24 V,由于点火而进入热量计体系的电热通常可忽略。但通电流的时间每次都应相同,不应超过 2 s。如通电时间过久,则因点火而产生的热会影响测定结果的精确度。

(3)燃烧后期(末期)。燃烧期结束即为燃烧后期(末期)的开始。其目的在测定热由内筒传向外筒的速度,亦须每分钟读记温度 1 次,至每分钟温度变化不大时为止,需 5~10 min。燃烧后期的终点,即为全部试验期的结束(定为  $d$  点)。

#### 5.2.5.3 结束工作

测定温度后,停止搅拌器。首先取下温度计,然后从内筒取出搅拌器及氧弹。氧弹应静置 30 min,使能溶解的气体完全溶解。然后将排气口打开,使氧弹中剩

余的氧气和二氧化碳在 5~10 min 徐徐排出。拧开螺帽,取出弹头,如氧弹内有黑烟或未燃尽的试样,则这个试验应作废。如燃烧成功,则小心取出烧剩的引火丝,精确测量其长度或质量。用热蒸馏水仔细冲洗氧弹内壁、坩埚及进气阀、导气管等各部分,洗液及燃烧后的灰分移入洁净的烧杯中,供测定酸与硫的含量,以校正酸的生成热。在一般情况下,由于酸的生成热很小,约为 4 J,因此常忽略不计。

氧弹、内筒、搅拌器在使用后应用纱布擦干净。各塞门应保持不关闭状态,并用热风将其接触部分吹干,防止塞门生锈而不能密闭而漏气。

每次燃烧结束后,应清除坩埚中的残余物。普通坩埚可置于高温电炉中,加热至 600 ℃维持 3~4 min,燃去可能存在的污物及水分。白金坩埚可在稀盐酸中煮沸,也可用氟氢酸稍加热以去污,石英坩埚只能擦拭,因加热与用氟氢酸处理,都对石英有损。

#### 5.2.6 饲料燃烧热(总能)的计算

饲料燃烧热( $Q$ )按下列公式 5-1 计算:

$$Q = \frac{KH[(T+R) - (T_0+R_0) + \Delta T] - qb}{m} \quad 5-1$$

式中: $Q$  为饲料或粪、尿样品的燃烧热,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $K$  为热量计的水当量;  $T$  为主期阶段最终温度,  $^{\circ}\text{C}$ ;  $T_0$  为主期阶段最初温度,  $^{\circ}\text{C}$ ;  $R$  为在  $T$  温度计刻度的校正值,  $^{\circ}\text{C}$ ;  $R_0$  为在  $T_0$  时温度计刻度的校正值,  $^{\circ}\text{C}$ ;  $H$  为用贝克曼温度计时, 温度计上每一刻度相当于实际温度值,  $^{\circ}\text{C}$ ;  $m$  为试样的质量,  $\text{g}$ ;  $\Delta T$  为热量计与周围空气的热交换校正值;  $b$  为点火丝的质量,  $\text{g}$ ;  $q$  为点火丝的热值,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

样品两次平行测定结果允许相差不超过  $0.13 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

点火丝热值:铁丝,  $6.69 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 镍丝,  $3.24 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 铜丝,  $2.51 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 铅丝,  $0.42 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

(1) 热交换校正值  $\Delta T$  计算。在热量测定过程中, 外筒水温与室温平衡, 应保持其恒定不变。内筒水温低于外筒  $1 \sim 1.5^{\circ}\text{C}$ , 在点火燃烧以前, 热由外筒向内筒辐射。点火燃烧之后, 内筒温度上升超过外筒温度后, 热由内筒向外辐射。由于此种辐射的影响, 观察的温度需要校正。测定过程中内、外筒热辐射的关系如图 5.4 所示。

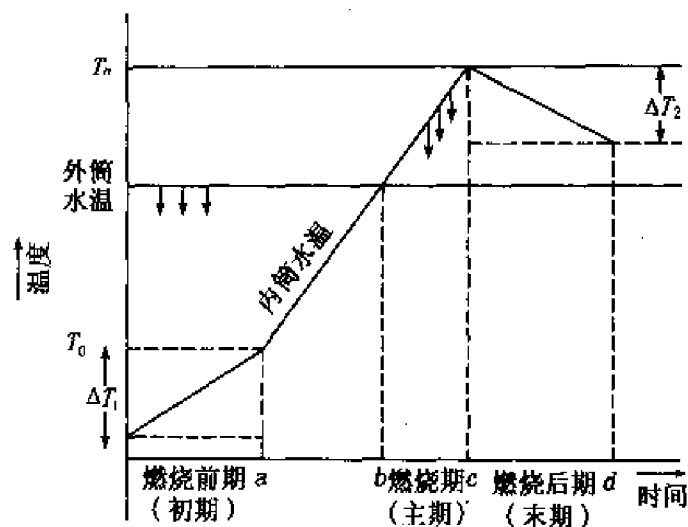


图 5.4 内、外筒热辐射的关系示意图

$\Delta T$  为辐射热的校正值,可应用奔特氏公式来计算。奔特氏公式如下:

$$\Delta T = \frac{(V + V')}{2} n_1 + V' n_2 \quad 5-2$$

式中:  $V$  为初期阶段每 0.5 min 温度平均变化(负值)(以 10 次为准);  $V'$  为末期阶段每 0.5 min 温度平均变化(正值)(以 10 次为准);  $n_1$  为主期阶段中快速升温 0.5 min 次数(每 0.5 min 温度上升大于 0.3 °C);  $n_2$  为主期阶段中慢速升温 0.5 min 次数(每 0.5 min 温度上升小于 0.3 °C)。

奔特氏公式的依据:当点火燃烧之初,内筒水温迅速上升时,热量计体系和环境(外筒水温)之间热交换速度相当于燃烧前期和后期温度变化速度的算术平均数,即  $(V + V')/2$ 。而当温度上升较慢时,则相当于燃烧后期的冷却速度,即  $V, V'$  以 10 次为准,便于计算。

(2) 热量计的水当量。仪器(整个体系)的热容量(包括氧弹、搅拌器、内筒、温度计以及辐射损失部分等),为了在计算上方便,用相当于水的质量(g)来表示,即使仪器体系温度上升 1 °C 所需的热量,能使多少克水温上升 1 °C,故又称水当量。因为仪器的热容量也是随环境温度而变化的,因此仪器的热容量或水当量不是恒定不变的常数。故在测定饲料或其他试样的热价时,须先测知在该环境温度下仪器的热容量。

热量计的水当量测定方法与测定饲料燃烧热的方法相同,只是用一定质量的已知热价的纯有机化合物来代替饲料试样,例如可采用苯甲酸、水杨酸等,其中苯甲酸为最常用。苯甲酸应先经研细,放置在盛有浓硫酸的干燥器中 3 d 后使

用。也可放在 121~126 ℃ 的烘箱中干燥 1 h,再放在干燥器中冷却使用。如果表面出现针状结晶,应用小刷刷掉,以防燃烧不完全。常用有机化合物的热价:

苯甲酸, 26.46 kJ · g<sup>-1</sup>; 水杨酸, 21.95 kJ · g<sup>-1</sup>; 蔗糖, 16.51 kJ · g<sup>-1</sup>; 安息香酸, 26.46 kJ · g<sup>-1</sup>。

另外,测定热量计的水当量时,除了需要扣除引火丝本身燃烧发热量外,还需要校正其他来源的热量,如酸的生成热及其在水中的溶解热,以及因含硫不同而产生的不同硫酸生成热。上述各项热量必须从饲料燃烧热中扣除。一般情况下只校正酸的生成热和溶解热,其他可略去不计。

试样中的硫与氮若在普通情况下燃烧时,则生成二氧化硫与二氧化氮,但在高压氧中燃烧时,则生成三氧化硫与五氧化二氮,溶于水则  $\text{SO}_3 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{HNO}_3$ 。已知 1 mol 氮变成五氧化二氮,再变成硝酸时放出 119.66 kJ 热。

为了测定酸的生成热和溶解热,应将测定结束后弹筒洗液煮沸数分钟,冷却后加 2 滴 10 g · L<sup>-1</sup> 酚酞指示剂,用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液滴定。硝酸的生成热按每毫升 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液相当于 0.006 kJ 计算。

热量计的热容量(以水当量计算)(K)可按下列公式计算:

$$K = \frac{Qm + qb + 0.006 V}{H[(T + R) - (T_0 + R_0)] + \Delta T} \quad 5-3$$

式中:Q 为苯甲酸热值, kJ · g<sup>-1</sup>; m 为苯甲酸的质量, g; V 为氢氧化钠消耗量, mL; 其他同公式 5-1。

热量计的热容量应至少测定 5 次,如各次测定值不超过其平均值的 ±0.1% 时,则平均值为该条件下仪器的热容量(以水当量计)。测定试样的条件应与测定热容量的条件相同。每当操作条件有变化时,应重新测定。热容量值为正数,保留小数点后两位。

实例如下。

试验记录:

初 期		主 期		末 期	
0.5 min 数	温度/℃	0.5 min 数	温度/℃	0.5 min 数	温度/℃
0	1.283	10	1.304	21	3.527
10	1.304	11	1.51	31	3.512
		12	2.50		
		13	3.10		



续前表

初 期		主 期		末 期	
0.5 min 数	温度/℃	0.5 min 数	温度/℃	0.5 min 数	温度/℃
		14	3.31		
		15	3.43		
		16	3.50		
		17	3.52		
		18	3.525		
		19	3.528		
		20	3.528		
		21	3.527		

$$K=9.97$$

$$H=1.006$$

$$R=-0.011$$

$$T=3.527$$

$$T_0=1.304$$

$$R_0=+0.003$$

$$q=6.69$$

$$b=0.0065$$

$$m=0.8612$$

$$n_1=3$$

$$n_2=8$$

$$V=\frac{1.283-1.304}{10}=-0.0021$$

$$V'=\frac{3.527-3.512}{10}=0.0015$$

$$\Delta T=\frac{-0.0021+0.0015}{2}\times 3+0.0015\times 8=0.0111$$

$$Q=\frac{9.97\times 1.006[(3.527-0.011)-(1.304+0.003)+0.0111]}{0.8612}$$

$$-\frac{6.69\times 0.0066}{0.8612}$$

$$=25.81$$

### 5.2.7 样品的处理

在测定样品热价时,关于饲料、粪、尿、乳、血及动物组织、瘦肉、肥肉等样品

处理的一般方法,现扼要介绍如下。

#### 5.2.7.1 各种饲料

与测定一般化学成分的处理方法相同,饲料须经烘干粉碎,通过 40 目标准筛,在空气中吸潮,使与空气湿度平衡后贮于样品瓶中。测定时用压样机压成饼状(1~1.5 g)。在称量样品的同时,应测定含水量,以便换算成干物质基础的热价。含脂肪高的饲料(如脂肪含量在 5%~6% 以上时),则不可用压样机,以避免脂肪的损失。可用已知燃烧热的滤纸将样品包好,置于坩埚中燃烧,最后扣除滤纸的热价。

注意不得将粉碎的样品直接加入坩埚中燃烧,因充入氧气时可能将样品吹出坩埚,使燃烧不完全。如用制备好的全干样品测定其热价,效果将最好。样品压片的松紧度,不宜过紧或过松,通常以转移成型片样时不致粉碎为宜。

#### 5.2.7.2 粪

取消化试验中收集的已经低温烘干、粉碎、制备好的平均样品,按上述饲料样品相同方法,压制成饼状(1~1.5 g)即可。

#### 5.2.7.3 尿

在代谢试验中试验动物每日排尿经过滤、计量后(在盛尿瓶中事先已加入 10% 稀硫酸 50 mL),取其一部分(为 2%~3%),保存于密闭的容器中,逐日将尿样混合。取平均样品进行测定。由于尿液易腐败分解,通常应加入少量防腐剂:如氯仿、甲苯、氟化钠与百里酚等。其中以氟化钠或百里酚的  $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酒精溶液最好,不仅防腐作用强,且不影响尿的热价。

尿样含水量高,不易燃烧,因此一般不直接测定。通常的简单做法为:将 2 张已知质量的折叠滤纸置于坩埚中,逐滴加尿,直至吸透为止,然后将滤纸连同坩埚一起置于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  下真空烘干。如此重复多次,直至滤纸吸尿 10~15 mL 为止。最后应将滤纸的燃烧热扣除。滤纸的燃烧热每批应测 5 次,求其平均值为其热价。如果前 4 次测定的热价差异小于  $0.13\text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ,则可不进行第 5 次测定。

此外,亦可在烧杯中吸取尿液样品 100 mL,于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴上蒸干,然后用已知热价的干滤纸(约 0.5 g),将全部残渣无损失地移入坩埚中。留有少量干滤纸做引燃之用。如残渣中水分尚多,不易燃着,可再用红外灯烘干。最后测热结果亦应扣除滤纸热价。

#### 5.2.7.4 乳

将鲜乳经水浴蒸发制成乳粉(为加快蒸发速度可在乳中加 2~3 滴浓醋酸。加热时醋酸全部挥发,不致影响结果)。然后将乳粉压制成饼状,然后用与饲料样品同样的方法测定其热价。

#### 5.2.7.5 血

可在烘箱中将血烘干,磨成血粉。因血粉不易压成饼,因此可用已知热价的滤纸包血粉后,置于坩埚中进行测热。

#### 5.2.7.6 动物组织

结合比较屠宰试验,往往需要测定整个动物体的能量。为避免整个屠体不易取得有代表性的均匀样品,因此,可分为:毛、皮、骨、肉、脂、内脏及血等样品,分别采样制成测定用样品,然后将上述7部分样品的热价总和起来。

皮、肉、脂肪及内脏可用绞肉机绞碎,反复2~3次,尽量使其均匀。为节省操作,可不测定各种组织样的水分。为此应立即称出原始水分基础的测定样品,除脂肪样品取0.5~0.7 g外,其他样品可各取2~3 g。测定原始水分基础的组织,应以少量已知热价的干滤纸进行引燃。

骨骼样品亦用捣碎机捣碎,充分混匀,取样2~3 g。毛、血样品可在烘干后计其质量,然后取样测定。这样可直接得出全干基础的热价。

对瘦肉及肥肉(或花板油)的一些具体制备处理如下:

瘦肉:可将剥离出的鲜瘦肉置于70~80℃的真空烘箱中,减压至汞柱13.3~20 kPa时,测定水分至恒重。然后研碎过40目标准筛。其他步骤同饲料样品的制备,但在氧弹坩埚中必须用酸洗石棉垫底。

肥肉与花板油:将样品先在70~80℃的真空干燥箱中,减压至汞柱13.3~20 kPa,烘至恒重,然后将熔化的油脂与残渣分离。将残渣全部包在滤纸包中,放在无水乙醚中浸泡过夜,然后置于索氏抽脂器中抽提8~12 h。将脱脂的滤纸包放在100~105℃烘箱中烘1 h以后,每烘30 min称重1次,直至恒重,求出含渣率。将脱脂渣全部研碎,置于热量计中测热,求出脱脂残渣的含热量。测热方法与饲料样品相同,但引火丝弧面应距样品表面高些,否则样品有被引火丝断裂时弹出坩埚,造成测热失败。氧弹坩埚底部应以酸洗石棉垫底。

油脂部分:先用角匙按几何分点取样法,取油脂0.5 g左右,放在垫有石棉的、已知质量的氧弹坩埚中称重。然后置于氧弹的皿环中,用金属引火丝点火时,引火丝弧面要距样品表面至少0.5 cm。否则在充氧时,引火丝易陷于样品中,只通气而不燃烧。

因油脂属于半固态状态,不易点燃。因此,可在样品表面撒以少量已知热价的苯甲酸(一般在0.02 g左右),以助燃。但苯甲酸量千万不应加之过多,且必须记录加入的苯甲酸量。从测试的总热量中减去苯甲酸热价,即为油脂样品的热价。根据油脂与残渣在样品中所占质量分数,计算样品所含热价,计算的公式如下:

$$Q[\text{样品(干物质基础)}] = \frac{Q(\text{油渣}) \times w(\text{油渣}) - Q(\text{油脂}) \times w(\text{油脂})}{\text{样品质量(干物质基础)}} \quad 5-4$$

### 5.2.8 注意事项

(1) 不得将粉碎试样直接加入坩锅中, 防止充氧时将样品吹出坩锅。

(2) 含脂肪高的饲料(如含脂肪 6% 以上), 则不可用压样机, 以免脂肪损失, 可用已知热值的滤纸将试样包好, 置于坩锅中, 最后扣除滤纸的热值。

### 5.2.9 饲料(或日粮)能量消化率的计算

$$\text{饲料或日粮能量消化率} = \frac{Q_1 m_1 - Q_2 m_2}{Q_1 m_1}$$

式中:  $Q_1$  为每克饲料或日粮所含热能,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $m_1$  为消化试验食入饲料或日粮质量,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $Q_2$  为每克粪样所含热能,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $m_2$  为消化试验时总排粪质量,  $\text{g}$ 。

注: 所有测定结果为 2~3 个平行测定的平均值。

## 5.3 消化能和代谢能的测定

饲料的消化能和代谢能按理论上的定义如下:

$$\text{消化能}(E_D) = \text{总能}(E_G) - \text{粪能}(E_F)$$

$$\text{代谢能}(E_M) = \text{总能}(E_G) - \text{粪能}(E_F) - \text{尿能}(E_U)$$

式中:  $E_D$  为食入饲料的消化能,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $E_G$  为食入饲料的热能,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $E_F$  为排出粪中的热能,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $E_U$  为排出尿中的热能,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $E_M$  为食入饲料的代谢能,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

因此, 进行动物的消化、代谢试验, 分别对食入的饲料量和排出粪、尿量进行准确测量, 并分别测定饲料和粪、尿样品的热能, 即可计算出饲料的消化能和代谢能。

### 附 5.1 猪饲料表观消化能的测定技术规程

#### 一、全收粪法

(一) 适用范围 本规程适用于猪配合饲料及各种类型饲料原料表观代谢能

的测定。

## (二)术语

(1)饲料表观代谢能=饲料总能-粪中的总能。

(2)消化能的直接测定法:用于测定整个日粮,即全价配合饲料、混合饲料及单一饲料即可充作日粮的其他饲料表观消化能测定方法。

(3)消化能的间接测定法:用于测定日粮中单一饲料(即被测饲料)表观消化能的方法。该法需进行两次消化试验,第一次试验测定整个日粮,即基础日粮的表观消化能,第二次试验测定试验日粮的表观消化能,试验日粮由70%~90%的基础日粮和30%~10%的被测饲料组成;根据两次消化试验测定结果套算被测饲料的消化能。

## (三)试验猪

(1)选择体质量30~60 kg、健康状况正常的去势公猪,免疫驱虫后备用。

(2)每次消化试验需试验猪6头以上,其品种、月龄、体质量等应力求一致。

## (四)饲养管理方式

(1)猪舍应符合卫生防疫要求。

(2)猪舍温度为15~27℃。

(3)猪舍采用自然光照。

(4)饲养猪于适宜生长的代谢笼内,适应后供试验用。

(5)在非试验期,每日按试验猪体质量的3.5%~4%喂全价配合料,并按每日给料量的3~4倍给水。

## (五)试验日粮

(1)基础日粮。根据试验猪体质量确定日粮营养水平,其日粮类型应充分考虑被测饲料的物理学性状和营养学特性。

(2)试验日粮。由基础日粮和被测饲料按比例构成。被测饲料为能量饲料、蛋白质饲料和粗饲料时,其用量应不低于20%;被测饲料为青饲料时,不低于10%(按干物质计)。

(3)日粮应调制为粉状、粒状或其他匀质状态,应确保试验猪按预定试验日粮配比摄入饲料,必要时,应对残余饲料分类收集,计量分析。

## (六)测试程序

(1)试验分适应期、预试期和正试期3个阶段。

(2)适应期。喂给全价配合饲料3~5 d,观察并记录每头试验猪的自由采食量,按自由采食量的85%确定预试期和正试期每日给饲饲料量。

(3)预试期。为3~5 d。定量给饲试验日粮。

(4)正试期。为4 d。在此之前,一次将每头猪试验全期所需日粮迅速在同一温度条件下按顿分装于袋中,并同步测定其干物质含量,定时定量给饲试验饲料。正试期内收集每头猪每日(24 h)排粪。

(5)采用消化能的间接测定法进行消化试验时,可设置两个试验猪组(6头/组×2组),同时测定上述基础日粮和试验日粮的表观消化能;亦可使用同一批试验猪(6头),相继进行基础日粮和试验日粮的消化试验,两次试验之间应增设过渡期,期间,定量给饲试验日粮。

#### (七)排粪的收集与处理

(1)准确收集正试期内各试验猪每日(24 h)排粪,并充分混匀,称重。以试验猪最静卧状态界定日与日之间的时间界限,一般在早饲后1~1.5 h为宜。

(2)各头猪每日排粪经充分混匀后,按鲜重的相同比例取样,并在60~65℃条件下烘干或冻干,置室温下回潮24 h,称重、记录、粉碎。

(3)将每头猪4 d风干排粪样,混合均匀,取样装瓶,立即测定样品干物质含量,用以计算每头猪4 d的平均全干排粪量。倘不能同步进行总能测定时,于测定前须再次测定样品干物质含量,以便准确计算总排粪总能。

#### (八)饲料及排粪样品的分析

(1)分析指标。被测饲料样和粪样分析干物质和总能。

(2)分析方法。总能测定方法同本章5.1,干物质测定见本书4.1。

#### (九)数据计算与统计分析

(1)测试结果小数点后保留位数:饲料样、粪样总能( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )和表观消化能值( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )保留小数点后二位数;饲料干物质含量(%)保留小数点后一位数;食入饲料总量(g)和粪干物质排泄总量(g)保留整位数。

(2)以个体为单位计算日粮和被测饲料表观消化能。

(3)日粮表观消化能计算公式:

$$\text{表观消化能}(\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}) \underset{\text{(干物质基础)}}{=} \frac{\text{食入总能}(\text{kJ}) - \text{排粪总能}(\text{kJ})}{\text{食入干物质总量}(\text{g})} \quad 5-5$$

式中:

食入总能(kJ)=食入饲料总量(g)×食入饲料总能( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )/1 000

排粪总能(kJ)=粪干物质排泄量(g)×粪干物质总能( $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ )/1 000

食入总干物质(g)=食入风干物质量(g)×饲料风干样品的干物质质量  
分数

(4)被测饲料表观消化能按公式5-6计算:

$$\text{表观消化能(kJ} \cdot \text{g}^{-1}) \text{ (干物质基础)} = \frac{\text{食入试验日粮消化能总量(kJ)} - \text{食入基础日粮消化能总量(kJ)}}{\text{食入被测饲料干物质总量(g)}} \quad 5-6$$

式中:

$$\text{食入试验日粮消化能总量(kJ)} = \text{食入试验日粮量(g)} \times \text{试验日粮消化能(kJ} \cdot \text{g}^{-1})$$

$$\text{食入基础日粮消化能总量(kJ)} = \text{由试验日粮食入基础日粮量(g)} \times \text{基础日粮消化能(kJ} \cdot \text{g}^{-1})$$

$$\text{食入被测饲料干物质总量(g)} = \text{由试验日粮食入风干被测饲料量(g)} \times w(\text{风干被测饲料干物质})$$

$$\text{表观消化能(kJ} \cdot \text{g}^{-1}) \text{ (风干物质基础)} = \frac{\text{全干饲料中表观消化能(kJ} \cdot \text{g}^{-1}) \times w(\text{风干饲料样品中干物质})}{w(\text{风干饲料样品中干物质})}$$

(5) 计算 6 头猪被测饲料消化能的平均数和标准差。

## 二、离 体 法

### (一) 适用范围

本方法适用于测定猪的配合饲料、能量饲料、粗饲料及植物性蛋白质饲料的表观消化能值。

### (二) 术语

(1) 消化能。饲料表观消化能 = 饲料总能 - 粪中的总能。

(2) 离体法。即 In Vitro 法, 又称体外法。在动物体外模拟其消化生理生化过程, 用实验室手段测定其消化、代谢反应或某项生理、生化指标的方法。

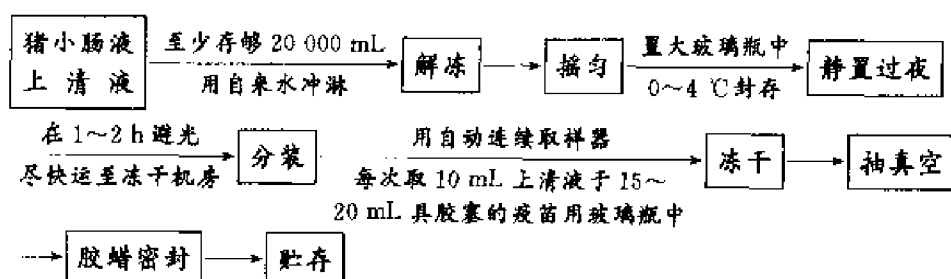
### (三) 试剂的制备

(1) 胃蛋白酶消化液的制备。在  $0.075 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液中加入  $1:10^4$  活力的结晶胃蛋白酶 2 g。

### (2) 猪小肠冻干粉的制备

① 猪小肠液的收集与制备: 每日早饲后约 1 h, 在小肠瘘的套管口连接胶管, 引流小肠液到大约 500 mL 时。取下胶管, 堵好管口。在  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心, 用滤纸撇去表层浮油, 分装于 80~100 mL 的小塑料瓶中置  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中备用。

②猪小肠液冻干粉的制备与贮存:将贮存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 下的猪小肠液按下列程序制成冻干粉:



室温下保持 3 个月效价不变, $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 下可保持 6 个月效价不变。

#### (四)小肠瘘管手术

(1)套管设计:套管呈“T”型,用硬质硅胶在车床上加工而成。圆管和凹形槽的直径为 8 mm,管壁为 1 mm,而外壁则在车床上铣成螺纹,全套套管由管筒及外垫片和固定螺母组成,套管内壁光滑,用凹形槽的边缘部分必须圆滑,以防术后损伤肠内壁。另外准备和套管粗细相近的橡皮管,在采取小肠液时,连在套管上。取毕小肠液后,将橡皮管取下,将套管口用消毒棉堵严,勿使脱落。

(2)术前准备:选用质量 30~35 kg 的健康猪,饲喂在消化试验笼内。禁食 24 h,防止手术时肠道内产气膨胀,妨碍手术顺利进行。但饮水可照常供给。

(3)麻醉:用苯巴比妥钠(结合乙醚麻醉效果更好)或百戊巴比妥钠耳静脉注射麻醉,1 kg 体质量按 30 mg(遵医嘱)进行静脉注射。

(4)保定和术部消毒:将呈现麻醉状态的猪,背卧位保定于手术台上,最好使整个猪体呈前低后高,即垂头仰卧姿势,从而使腹部器官移向膈膜,并防止手术时唾沫吸入气管。用水和肥皂清洗局部,由剑状软骨以后的整个腹部区域,剃去被毛,再清洗一遍擦干后,涂擦碘酒消毒,酒精脱碘,盖上消毒的手术中巾,以巾钳固定。

(5)手术:整个手术可分 4 个阶段:a.剖开腹腔,寻找术部;b.插入套管;c.从腹侧开洞向外引出套管;d.闭锁腹腔。

①剖开腹腔沿中线从剑状软骨至脐,在皮肤上做 15 mm 的切口,切口要一刀切成,有利于术后的愈合。然后再顺序切开肌壁和腹膜。从盲肠向前顺序寻找术部。

②插入套管将所需的一段小肠拉出体外,置于浸湿的温热生理盐水的消毒纱布上,确定切口的正确位置,取小肠液的套管位置,规定在离幽门向后 $(170\pm 15)\text{cm}$ 处,如不能确定术部的准确位置时可顺着小肠先找到回盲韧带处,再反方向徐徐向幽门方向同步送回腹腔,直至感到有阻力时;用手触诊,确定部位即可,



但须防止小肠充血。在切口两端 5 cm 处用肠钳横向夹住,夹前如该段肠中有内容物时应挤向后方,在切口周围肠壁上穿引一根呈椭圆形的缝线,缝线只能穿透浆膜和肌层,沿椭圆的长径,在中央切开肠壁,切口长度以能正好插入管底的横径为宜。将套管底部插入切口内,收聚缝线进行荷包缝合。在收聚的同时,用镊子小心将露出的黏膜及组织向肠腔内翻转,决不可有少许肉芽暴露于小肠术部外侧。否则,此处极易与其他组织发生黏连,在术部与腹壁接壤处生成坏死样组织。固定套管,套管内腔口可用棉塞紧。去掉肠钳。

③向外引出套管:在左腹壁上距剖开腹腔切口末端 100 mm 处,将皮肤做一直径 10 mm 的圆形切口,除去中央的皮肤,用一略大于套管外径的钝头穿针垂直刺穿腹壁,一手在腹腔中协助,一手将套管经穿孔向外引导,确认肠道上下顺序正常后,理顺位置,在露出皮外的套管筒上,垫上外环片,用固定螺丝箍子拧紧。

④封闭腹腔:用连续缝合法将腹膜缝合,在缝合处可撒少许消炎粉,再将腹膜外皮肤内的组织(肌膜和腱鞘膜)一并做结节缝合,最后用粗丝线做皮肤的结节缝合,局部消毒,用纱布包扎。两人持手术猪的前后四蹄,前后上下轻轻的抖动使肠道在腹中复位。

⑤术后护理:术后 24 h 内不给饲料和饮水。每日肌肉注射青霉素 80 万 U,共注射 5 d。术后第 7 天拆线。一般 2 周后即可康复并采取肠液,正常肠液呈黄褐色。

#### (五)胃蛋白酶液与猪小肠液的效价标定

(1)每批猪小肠液的效价标定,必须与固定活力的商品胃蛋白酶配套标定。

(2)胃蛋白酶—小肠液的效价必须用 30 个以上,日粮标准样品的消化能值进行回归校正。

#### (3)标样消化能值的产生条件

①用公允的生物学全收粪法测出。

②被测饲料的营养水平与定标样品的营养水平相差不宜太大。

③标样的营养水平不宜密集,应高低设置均匀。

④标样尽量考虑其全价性。

⑤如测定特殊的饲料的离体消化能值时应以相应的营养水平的标样为背景。

#### (六)样品处理

(1)粉碎饲料样品,通过 50 目筛,装入广口瓶中密封。防虫防霉,低温保存。

(2)胃蛋白酶处理:

①称取 0.5 g 饲料样品(精确到 0.000 2 g)4 份,分别置于 4 个 100 mL 带盖三角瓶中(粗饲料 2 份即可)。

②加 10 mL  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胃蛋白酶溶液。

③将三角瓶置  $37^\circ\text{C}$  恒温振荡器中, 以其温度达到  $37^\circ\text{C}$  开始计时, 振荡 4 h, 每分钟 70~80 次往返, 注意勿使样品附着瓶壁不与酶液接触。必要时可以采取适当措施, 使其浸入酶液, 但不可用蒸馏水冲洗, 以防酶液浓度下降。

(3) 猪小肠液处理:

①将猪小肠液冻干粉以蒸馏水 10 mL 溶解后, 经过 200 目尼龙布分别滤入规定的三角瓶中。

②依放入顺序取下三角瓶, 用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液中和, 调整 pH 值到 7.0, 分别用上述猪小肠液冻干粉水溶液冲洗三角瓶壁。

③继续在  $37^\circ\text{C}$  下振荡 4 h。

④将 4 个平行三角瓶中的内容物无损失地两两并入 250 mL 烧杯中, 用蒸馏水充分洗净三角瓶, 加满蒸馏水, 盖上表面皿, 静置过夜。夏季须置冷暗处或加甲苯一滴防霉。

⑤用扎有 200 目尼龙布的抽滤漏斗吸去上清液(注意不要泛起沉淀物及悬浮絮状物, 只吸去上清液)。将残渣无损失地转移到已知绝干物质含量和热值的无灰滤纸上。

⑥通过布氏漏斗抽滤。

⑦用蒸馏水反复冲洗烧杯中的残渣。抽干后, 将滤纸叠成小包, 放入已知质量的带磨口盖的称量皿内, 置  $105^\circ\text{C}$  下烘至恒重(允许误差  $\pm 0.0002 \text{ g}$ )。测定含残渣的滤纸包的总燃烧热值(允许误差  $\pm 83.68 \text{ J}$ )。

⑧滤纸的燃烧热值按滤纸的干物质中的抽样平均值扣除。

(七) 计算方法

(1) 待校正的能量表观消化率的计算:

$$\text{待校正的能量表观消化率} = \frac{m \times w \times Q_2 - Q + m_1 \times Q_1}{m \times w \times Q_2} \quad 5-7$$

式中:  $m$  为并入一个烧杯中的 2 份平行饲料试样的质量, g;  $w$  为饲料绝干物质质量分数;  $m_1$  为滤纸绝干质量, g;  $Q_2$  为饲料干物质的燃烧热值,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $Q_1$  为绝干滤纸的燃烧热值,  $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $Q$  为绝干滤纸和残渣的总燃烧热值, kJ。

(2) 能量表观消化率的计算:

$$\text{能量表观消化率} = a + bx$$

式中:  $x$  为未校正的离体法能量消化率;  $a$  为截距;  $b$  为回归系数。

实例: 设未经校正的能量消化率 = 72.1%

$$b=0.95 \quad a=9.53$$

$$\text{则能量消化率(\%)} = 0.95 \times 72.1\% + 9.53 = 78.0\%$$

(3) 被测饲料的表观消化能计算公式:

$$\begin{aligned} \text{表观消化能(kJ} \cdot \text{g}^{-1}) \\ \text{(干物质基础)} \end{aligned} = \begin{aligned} \text{饲料干物质中的燃烧值(kJ} \cdot \text{g}^{-1}) \times \\ \text{能量表观消化率} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{表观消化能(kJ} \cdot \text{g}^{-1}) \\ \text{(风干物质基础)} \end{aligned} = \begin{aligned} \text{全干饲料中表观消化能(kJ} \cdot \text{g}^{-1}) \times \\ \text{风干饲料中干物质质量分数} \end{aligned}$$

## 附 5.2 鸡饲料代谢能测定

### 一、鸡饲料表观代谢能的测定

#### (一) 适用范围

本规程适用于各种类型鸡饲料表观代谢能的测定。

#### (二) 术语

饲料表观代谢能 = 饲料总能 - 粪、尿排泄物中的总能

#### (三) 试验鸡

(1) 选用体质量 1.8 kg 以上、体质量相近、采食正常、强饲后无异常反应、无怪癖的健康公鸡为试验鸡。

(2) 排泄物收集瓶的缝合手术。在代谢试验开始前 1 周, 于泄殖腔口外围处缝合 60 mL 塑料瓶盖, 瓶盖面中央挖一圆孔及对称的 4 对小孔, 以便粪尿排泄物通过及缝合固定瓶盖用。在收集排泄物期间, 拧上收集排泄物的塑料瓶, 其他时间取下塑料瓶任其自由, 不收集排泄物; 以集粪盘收集排泄物时, 不进行上述处理。

(3) 连续两次测定期间, 应设置 10~14 d 的恢复期。

(4) 供试鸡只数。每测一种饲料需设置 4 个重复组, 每个重复组至少 4 只鸡。

#### (四) 饲养管理方式

(1) 鸡舍。全封闭式或半开放式鸡舍。

(2) 在带集粪盘的代谢笼内个体饲养, 适应后供试验用。

(3) 室温。15~27℃。

(4) 光照。光照强度 20 lx; 自然光照和/或人工光照; 每日光照时间为 16 h。

(5) 在非试验期, 限制饲喂生长蛋鸡全价配合饲料。

(6)自由饮水、禁食砂石。

#### (五)试验进程

试验分预试期、正试期(禁食排空、强饲、粪尿排泄物收集)及体况恢复期三个阶段进行,其进程列于表:

鸡饲料表观代谢能测试过程

期 别	第一次测定				
	预试期	禁食排空期	强饲	粪尿排泄物收集期	体况恢复期
时 间	3 d 以上	48 h	按个体准确计时	48 h	10~14 d
被 试 饲料组	喂生长蛋鸡全价配合饲料,最后一顿喂供试料	自由饮水	被测饲料	自由饮水	同预试期

#### (六)待测饲料测定程序

(1)禁食。准确记录禁食排空开始时间,禁食 48 h,禁食期间自由饮水。

(2)强饲。禁食结束后,通过强饲器,每只鸡准确强饲风干被试饲料 50 g,并及时按个体记录时间,粗饲料及羽毛粉等低容重饲料可酌减,以不呕吐为度。

(3)排泄物的收集与处理。强饲后立即装好“集粪瓶”以重复组为单位收集 48 h 的排泄物,视集粪瓶内排泄物的量,其间,每日收集若干次,以集粪盘收集排泄物时,须仔细拣出羽毛、皮屑等杂物,取出后立即保存于 4℃ 下,亦可直接在 60~65℃ 下烘干至恒重,置室内回潮 24 h,称重、记录,作为每个重复组鸡的平均风干排泄物总量  $[g \cdot (只 \cdot 48 h)^{-1}]$ ;粉碎、过 40 目筛(圆孔筛孔径 0.45 mm);将每个重复组 4 只鸡的风干排泄物混合均匀、装瓶封存并立即取样,在 100~105℃ 下分析其干物质含量,用以计算每个重复组鸡的平均全干排泄物量  $[g \cdot (只 \cdot 48 h)^{-1}]$ ;若不能同步进行总能测定时,于测定总能之前须再次测定样品干物质含量,以便准确计算排泄物总能。

#### (七)强饲用饲料的配比与配合

(1)被测饲料。按照常规方法将待测饲料粉碎、混匀、备用;对液体状饲料应以已知表观代谢能值的单一饲料作为吸附剂酌情处理,其表观代谢能值则以套算法计算。

(2)上述各种强饲饲料,分别按鸡只数一次性按需要份数等量称出,同步测定干物质含量后备用。

#### (八)饲料及粪尿排泄物的分析

(1)分析指标。风干饲料样品和粪、尿排泄物样品分析干物质、总能。

(2)分析方法。依所用量热计使用说明书测定总能。

## (九)数据计算与统计分析

(1)分析结果小数点后保留位数。饲料及排泄物中总能值(kJ)等,保留小数点后二位数;饲料的干物质(%)、表观代谢能值(kJ·g<sup>-1</sup>)等保留小数点后一位数。

(2)按下列公式分别计算每个重复组鸡的饲料表观代谢能:

$$\frac{\text{表观代谢能(kJ}\cdot\text{g}^{-1})}{(\text{干物质基础})} = \frac{\text{食入总能(kJ)} - \text{排泄物总能(kJ)}}{\text{食入总干物质质量(g)}} \quad 5-8$$

式中:

$$\text{食入总能(kJ)} = \text{食入干物质质量(g)} \times \text{食入干物质中总能(kJ}\cdot\text{g}^{-1})$$

$$\text{排泄物中总能(kJ)} = \text{食入被测饲料后 48 h 排出干物质质量(g)} \times \text{排泄物干物质总能(kJ}\cdot\text{g}^{-1})$$

$$\text{食入总干物质(g)} = \text{食入风干物质质量(g)} \times w(\text{风干饲料样品干物质})$$

$$\text{表观代谢能(kJ}\cdot\text{g}^{-1})(\text{风干物质基础}) = \text{全干饲料中表观代谢能(kJ}\cdot\text{g}^{-1}) \times w(\text{风干饲料样品干物质})$$

(3)根据 4 个重复组鸡的表观代谢能推算被测饲料表观代谢能的平均值及其相应的标准差。

## 二、鸡饲料氮校正代谢能的测定

家禽的粪、尿、内源分泌物和肠脱落物混成粪便一起排泄出体外,因此,粪能的一部分是内源能而不是来自饲料。肠道中没有食物时的家禽的排泄物能量就是内源性能量。经校正内源排泄物能量的代谢能( $E_M$  或表观代谢能  $E_{AM}$ )叫真代谢能( $E_{TM}$ ),有时进行氮存留校正时,可获得氮校正代谢能( $E_{AMN}$ )。

$$(1) E_{AM}(\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}) = [\text{饲料总能(kJ)} - \text{该饲料的排泄物能(kJ)}] / \text{饲料进食量(g)}$$

$$(2) E_{AMN} = E_{AM} - N \times 0.034$$

式中: $N$  为食入每克饲料在体内沉积的氮克数;0.034 为食入 1 g 氮尿能的损失为 0.034 kJ

## 附 5.3 绝热型氧弹热量计(PARR 1281)

## (图 5.5)简单操作规程

(一)确保供气、供电设备工作正常。

(二)打开主机、打印机、恒温水循环器电源。

- (三)调节氧气、氮气输出压力分别为  $31.7 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  和  $5.6 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。
- (四)按数字键“1”进入测定状态,用“Yes”或“No”键选择“Detr”。
- (五)待氧弹外套稳定在  $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  后,按“F<sub>2</sub>”键,系统试运行,如有故障须排除。
- (六)将经准确称量的试样和引线装于氧弹中,拉下上盖。
- (七)按“Start”键,从数字键输入氧弹号,按“Enter”,输入试样序号,按“Enter”,输入试样质量,按“Enter”,仪器开始测定。
- (八)仪器显示“Idle”表示测定完毕。
- (九)重复 6,7 操作进行下一试样的测定。
- (十)关闭主机、打印机、恒温水循环器电源;关闭氧气、氮气阀门,测定完毕。

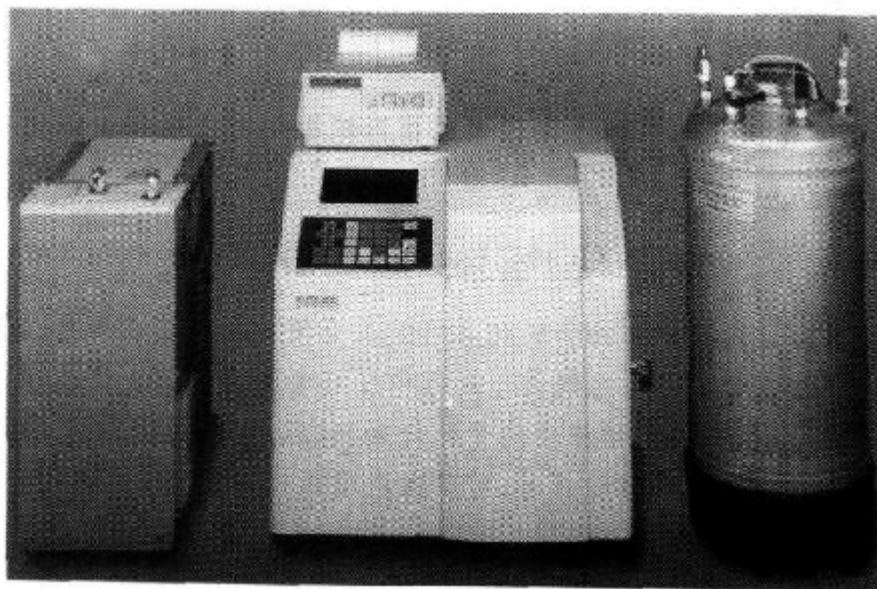


图 5.5 PARR 1281 能量测定体系

### 思考题

1. 简述氧弹式测热计测定燃烧热的基本原理。
2. 描述 GR-3500 型氧弹式测热计的主要构造和功能。
3. 什么是热量计的水当量? 如何测定及注意事项。
4. 简述测定燃烧热的主要步骤。
5. 测热室的基本要求有哪些?

## 6 饲料中氨基酸的测定

### 【内容提要】

本章系统介绍了采用离子交换色谱法和高效液相色谱法测定饲料中氨基酸的方法;介绍了常用饲料级氨基酸添加剂原料的质量标准和纯度测定方法;介绍了饲料中有效赖氨酸的测定方法。

### 6.1 概述

氨基酸是组成蛋白质的基本单位,也是蛋白质的分解产物。在自然界中常见的氨基酸有 20 余种。各种氨基酸在动物体内起着不同的作用。缺少某种氨基酸,特别是必需氨基酸,或各种氨基酸配比不当,都会影响动物的正常生长发育。因此,氨基酸的测定在动物饲养、营养生理和蛋白质代谢、理想蛋白质模型的研究以及生产实践中都有重要意义。

氨基酸的分析通常主要包括两种情况:一是对饲料原料和各种配合饲料产品中以蛋白质形式存在或游离氨基酸含量的测定;二是饲料级氨基酸添加剂单制剂中氨基酸含量的测定。目前,关于饲料原料和各种配合饲料产品中氨基酸的测定,通过一定的前处理方法,如酸水解、碱水解等,将以不同形态存在的氨基酸变成游离的氨基酸,然后通过离子交换树脂(氨基酸自动分析仪)或高效液相色谱(HPLC)分离技术进行分离测定。关于氨基酸添加剂单制剂纯度的测定一般采用简单的化学分析法。

本章将分别介绍氨基酸的离子交换树脂法和高效液相色谱法对饲料原料和配合饲料产品中氨基酸的测定、几种主要饲料添加剂氨基酸含量的测定以及饲料中有效赖氨酸的测定方法。

### 6.2 离子交换树脂法氨基酸自动分析

#### 6.2.1 概述

离子交换层析法分离氨基酸是氨基酸分析的经典方法,分离后的氨基酸与

茚三酮进行柱后反应,然后根据反应产物颜色的深浅比色定量测定。

氨基酸自动分析仪早在 1951 年由 Stein 及 Moore 两人发明,后来经 Spackman, Stein 和 Moore 加以改进。由于氨基酸自动分析仪是根据氨基酸的特点,专门设计的专用 HPLC,具有分离效果好,准确度高等特点,因此比较普遍用于氨基酸的测定。但与一般 HPLC 相比,设备价格比较昂贵。氨基酸分析仪主要由日本、美国、英国和德国等国家生产。目前在饲料分析中使用比较普遍的氨基酸自动分析仪为日本日立(Hitachi)系列产品。日立氨基酸自动分析仪到目前为止有三代产品,分别为 835-50 型、L-8500 型和 L-8800 型。下面以 L-8800 型氨基酸自动分析仪为例介绍其结构、分离测定原理和数据处理。

#### 6.2.1.1 主要结构

日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪的外观和开门后的前观分别如图 6.1 和图 6.2 所示。

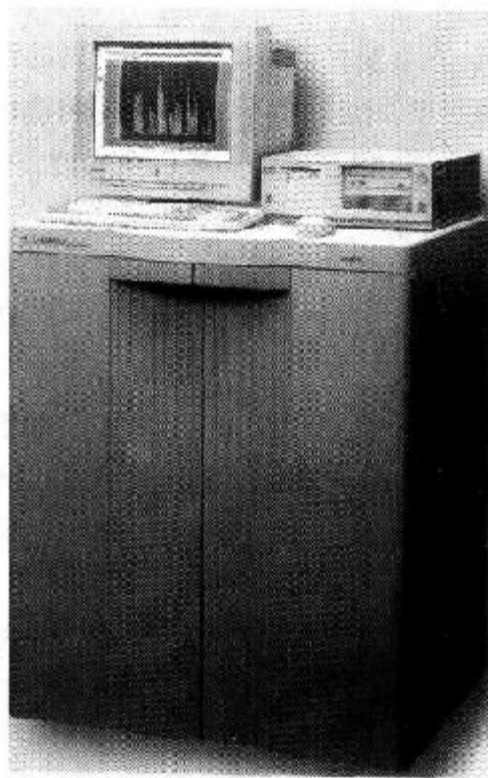


图 6.1 日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪外观

#### 6.2.1.2 分离测定原理

(1)离子交换树脂。用于氨基酸分析仪的,一般是合成的离子交换树脂,在合成树脂上,由于连接着酸根和碱根,故有阳离子交换剂和阴离子交换剂之别。树脂多为各厂商的专利产品,售价昂贵。



(2)分离原理。不同氨基酸对树脂的亲合力不同,其强弱顺序为:碱性氨基酸>芳香族氨基酸>中性氨基酸>酸性氨基酸及羟基氨基酸。

因此氨基酸分离时便有先后顺序,一般酸性及含 OH 基(羟脯氨酸)的氨基酸最先洗脱,然后是中性氨基酸,最后是碱性氨基酸。

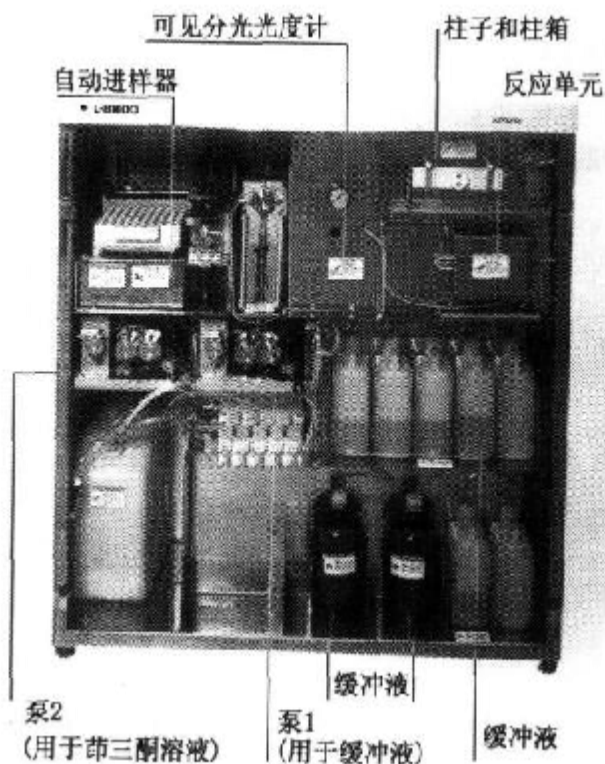


图 6.2 日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪前观(开前门后)

(3)氨基酸分离出峰顺序。L-8800 型氨基酸自动分析仪的出峰顺序如下(图 6.3)。

天门冬氨酸(Asp)—苏氨酸(Thr)—丝氨酸(Ser)—谷氨酸(Glu)—脯氨酸(Pro)—甘氨酸(Gly)—丙氨酸(Ala)—半胱氨酸(Cys)—缬氨酸(Val)—蛋氨酸(Met)—异亮氨酸(Ile)—亮氨酸(Leu)—酪氨酸(Tyr)—苯丙氨酸(Phe)—赖氨酸(Lys)—氨( $\text{NH}_3$ )—组氨酸(His)—精氨酸(Arg)。

(4)氨基酸的洗脱。氨基酸的洗脱是用不同 pH 值的缓冲液来进行的,一般标准分析(蛋白质水解物)采用柠檬酸钠盐作缓冲溶液,如果分析生理体液(尿、血浆、乳汁、脑脊髓液及植物组织提取液),则采用柠檬酸锂盐作缓冲液,因为天门冬酰胺及谷氨酰胺于钠盐缓冲液中,在图谱上不能与天门冬氨酸和谷氨酸分开,两者重叠成一个峰,不能得出各自的结果。

标准分析(蛋白质水解分析)一般采用 4 种缓冲液。

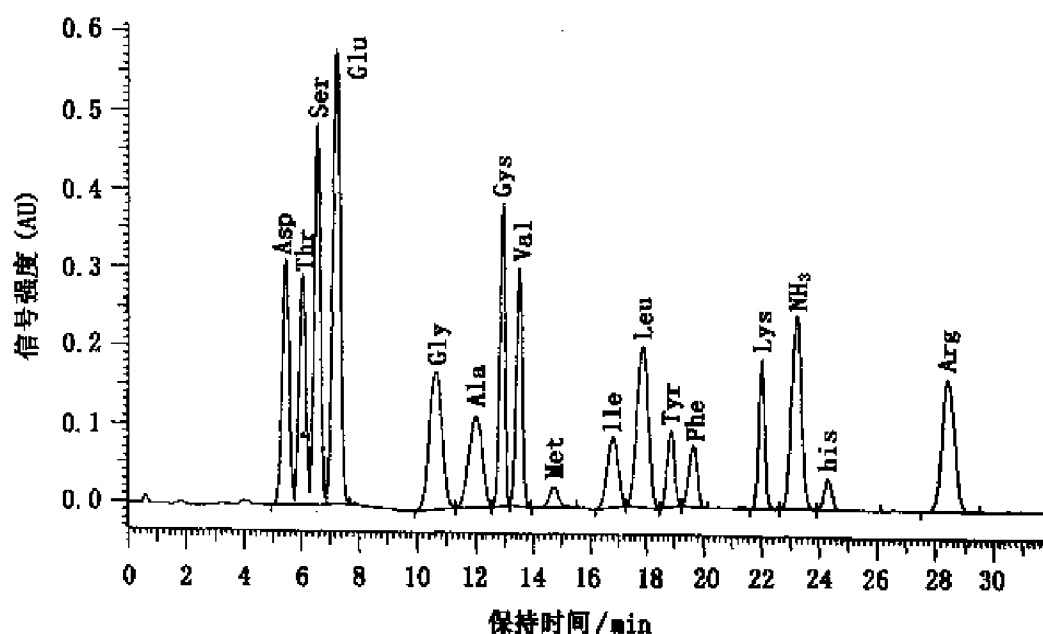


图 6.3 L-8800 型氨基酸自动分析仪的出峰顺序

分析条件:1. 分析柱(4.6 mm×60 mm) 2. 树脂(No. 2622) 3. 温度(57 ℃)

4. 流量(0.4 mL·min<sup>-1</sup>) 5. 缓冲液(缓冲液 1~4) 6. 分析时间(31 min)

7. 循环时间(53 min) 8. 毛发水解液

①缓冲液 1 的 pH 值为 3.3,冲洗出酸性氨基酸。

②缓冲液 2 的 pH 值为 3.3,主要用于冲洗出中性氨基酸。与缓冲液 1 相比,缓冲液 2 中乙醇含量较少。

③缓冲液 3 的 pH 值为 4.3,主要用于冲洗异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。

④缓冲液 4 的 pH 值为 4.9,主要用于碱性氨基酸的洗脱。

除了上述 4 种缓冲液外,所有的氨基酸分析仪都配有再生液,内含较浓的氢氧化钠溶液,用做柱子的再生。每做完一个试样,仪器自动吸入再生液,将柱子冲洗干净后,再接着做下一个样品。各种缓冲液和再生液的配制参见仪器说明书。日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪缓冲液和再生液的配制见表 6.1。

洗脱出来的氨基酸,与另一流路的茚三酮溶液结合,在一定温度条件下,便呈颜色反应,一般氨基酸呈紫色,但脯氨酸呈黄色,所以氨基酸自动分析仪一般都设有两个频道:一个频道是 570 nm 波长,另一个频道为 440 nm 波长。日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪的分光光度计与一般光度计不同,它的单色器是一种凹面光栅,比色效果较为稳定。

因为茚三酮在 pH 值 5.5 时才适于颜色反应,否则出峰很低。所以,试样上

机溶液要调整至 pH 值 2.2, 通过柱子后 pH 值就可变成 5.5。另外, 茚三酮实际在光和空气中极不稳定, 光及氧易使茚三酮氧化, 故新配制的茚三酮溶液要先充氮气, 除去氧气, 再加还原剂, 以防止氧化。常用的稳定剂有三氯化钛、氯化亚锡和硼氢化钠等。用三氯化钛做还原剂, 加入后 1 h 就可稳定, 且不产生沉淀, 而氯化亚锡则需要 24 h 才能稳定。日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪推荐采用硼氢化钠做还原剂。

表 6.1 日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪缓冲溶液和再生液的配制

名 称	pH-1	pH-2	pH-3	pH-4	RH-RG
缓冲液储液桶	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>
钠离子浓度/mol · L <sup>-1</sup>	0.16	0.2	0.2	1.2	0.2
超纯水/mL	700	700	700	700	700
二水柠檬酸三钠/g	6.19	7.74	13.31	26.67	—
氢氧化钠/g	—	—	—	—	8.00
氯化钠/g	5.66	7.07	3.74	54.35	—
一水柠檬酸/g	19.80	22.00	12.80	6.10	—
乙醇/mL	130.0	20.0	4.0	—	100.0
苯甲醇/mL	—	—	—	5.0	—
硫二甘醇/mL	5.0	5.0	5.0	—	—
聚氧乙烯十二烷基醚/mL Brij-35*	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
pH 值	3.3	3.2	4.0	4.9	—
总体积/mL	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
辛酸/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

注意事项: 表面活性剂 Brij-35\* 取 25 g 溶于 100 mL 纯水中。

#### 6.2.1.3 数据采集和处理

日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪采用 32 位操作系统即 Windows NT 管理系统, 使用操作软件进行数据自动采集和数据处理。

#### 6.2.2 普通酸水解法(盐酸水解法)

##### 6.2.2.1 适用范围

本方法适合于饲料原料、配合饲料和浓缩饲料中除了色氨酸、含硫氨基酸以外 15 种氨基酸的准确测定。

##### 6.2.2.2 测定原理

常规(直接)水解法是使饲料蛋白在 110 ℃ c(HCl)=6 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液作用下, 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。水解过程中色氨酸全部破坏,不能测量。胱氨酸和蛋氨酸部分氧化,测定结果偏低。

#### 6.2.2.3 仪器、设备

- (1)实验室用样品粉碎机。
- (2)样品筛:孔径 0.25 mm(60 目)。
- (3)分析天平:感量 0.000 1 g。
- (4)真空泵。
- (5)喷灯。
- (6)恒温箱或水解炉。
- (7)旋转蒸发器或浓缩器:可在室温至 65 ℃之间调温,控温精度 $\pm 1$  ℃,真空度可低至  $3.3 \times 10^3$  Pa。

(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%。

#### 6.2.2.4 试剂与溶液配制

- (1)盐酸溶液, $c(\text{HCl})=6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ :将优级纯盐酸与水等体积混合。
- (2)液氮或干冰-乙醇(丙酮)。
- (3)稀释用柠檬酸缓冲溶液,pH 值为 2.2, $c(\text{Na}^+)=0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ :称取柠檬酸钠 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)不同 pH 值和离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液:按氨基酸分析仪器说明书配制。

(5)茚三酮溶液:按氨基酸仪器说明书配制。

(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,各氨基酸组分浓度为 2.5(或 2.00) $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(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置于 50 mL 容量瓶中,以稀释用柠檬酸钠缓冲液定容,混匀,使各氨基酸组分浓度为 100 nmol $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 6.2.2.5 试样选取与制备

取具有代表性饲料样品,用四分法缩减分取 25 g 左右,粉碎并过 60 目筛,充分混匀后装入磨口瓶中备用。

#### 6.2.2.6 测定步骤

(1)试样处理。称取 50~100 mg 的试样(含蛋白 7.5~25 mg,准确至

0.1 mg)于20 mL 安瓿管或30 mL 具塞玻璃水解管中,加10.00 mL  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,置液氮或干冰-乙醇(丙酮)中冷冻,然后,抽真空至7 Pa后封口或充氮气,塞紧,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 pH值为2.2稀释上机用柠檬酸钠缓冲液,使样液中氨基酸浓度达 $50 \sim 250 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,摇匀,过滤或离心,取上清液上机测定。

(2)测定。用相应的混合氨基酸标准工作液按仪器说明书,调整仪器操作参数和(或)洗脱用柠檬酸钠缓冲液的pH值,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,组间插入混合氨基酸标准工作液进行校准。

#### 6.2.2.7 计算与分析结果的表述

(1)试样中某氨基酸质量分数按公式6-1计算:

$$w(\text{某氨基酸}) = \frac{\rho(\text{某氨基酸})}{m} \times 10^{-6} \times D \quad 6-1$$

式中: $\rho$ 为某氨基酸上机水解液中氨基酸的质量浓度, $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $m$ 为试样质量,mg;  $D$ 为试样稀释倍数。

以两平行试样测定结果的算术平均值报告,保留两位小数。

(2)允许差。对于氨基酸含量高于0.5%时,两个平行试样测定值的相对偏差不大于5%;含量低于0.5%时,不大于0.2%时,两个平行试样测定值相差不大于0.03%;含量低于等于0.2%,相对偏差不大于5%。

### 6.2.3 氧化水解-酸水解法

#### 6.2.3.1 适用范围

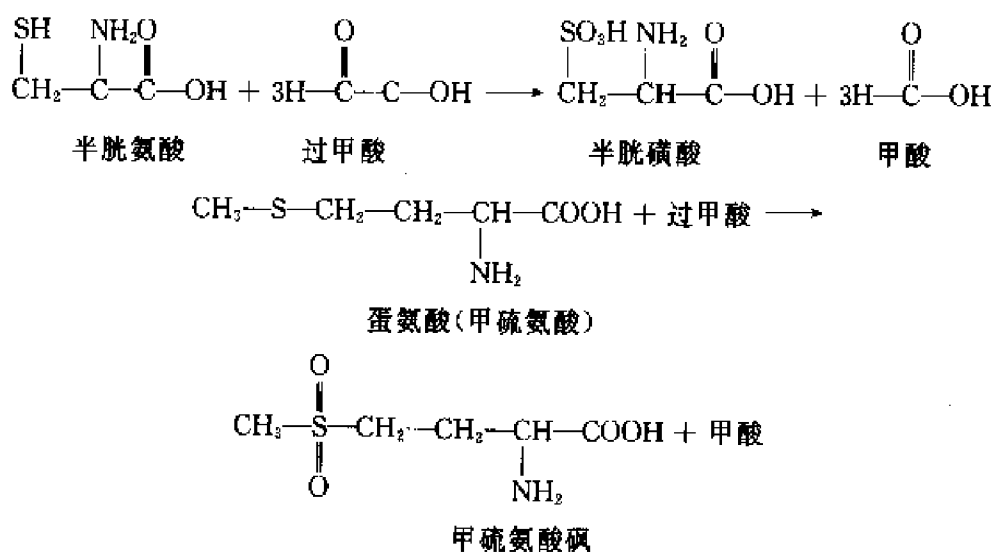
本方法主要适用于含硫氨基酸(胱氨酸和蛋氨酸)的准确分析测定。此法还可以测定芳香氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸)及组氨酸以外的氨基酸。

在以偏重亚硫酸钠做氧化终止剂时,酪氨酸被氧化,不能测准。酪氨酸、苯丙氨酸和组氨酸则在以氢溴酸做终止剂时被氧化,不能测准。

#### 6.2.3.2 测定原理

由于在蛋白质酸水解过程中,常伴有(半)胱氨酸和蛋氨酸的损失。通常可用“过甲酸”氧化,使胱氨酸及蛋氨酸分别转变成半胱磺酸及甲硫氨酸砒,这两种化合物在酸水解中是稳定的,且易于与其他氨基酸分离。然后用氢溴酸或偏重亚硫

酸钠终止反应,再进行普通酸水解,然后经离子交换色谱法分离,并以茚三酮做柱后衍生测定。蛋氨酸、半胱氨酸与过甲酸的反应式如下:



#### 6.2.3.3 仪器、设备

同普通酸水解法。

#### 6.2.3.4 试剂与溶液配制

##### (1) 过甲酸溶液。

① 常规过甲酸溶液:将 30% 过氧化氢与 88% 甲酸按 1:9(V:V) 混合,于室温下放置 1 h,置冰水浴中冷却 30 min,临用前配制。

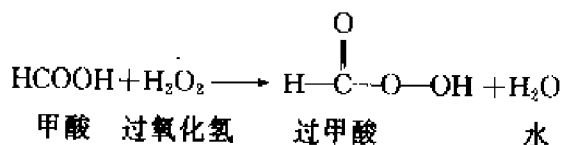
② 浓缩料用过甲酸溶液:将常规过甲酸溶液中按  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  加入硝酸银即可。此溶液适用于氯化钠含量小于 3% 的浓缩料。

③ 当浓缩料中氯化钠含量大于 3% 时,氧化剂中硝酸银浓度可按公式 6-2 计算:

$$\rho_R \geq 1.454 \times m \times w_N \quad 6-2$$

式中: $\rho_R$  为过甲酸中硝酸银的浓度,  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $w_N$  为试样中氯化钠的质量分数,  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{mg}$ 。

甲酸与过甲酸反应式如下:



##### (2) 氧化终止剂。48% 氢溴酸。

偏重亚硫酸钠溶液:33.6 g 偏重亚硫酸钠加水定容至 100 mL。

(3)其他试剂与溶液同普通酸水解法。

#### 6.2.3.5 试样选取与制备

同普通酸水解法。

#### 6.2.3.6 测定步骤

(1)试样处理。称取试样 50~75 mg(含蛋白质 7.5~25 mg)的试样 2 份(精确至 0.000 1 g),置于旋转蒸发器 20 mL 浓缩瓶或浓缩管中,于冰水浴中冷却 30 min 后,加入已经冷却过的过甲酸溶液 2 mL,加液时,需将样品全部浸湿,但不要摇动,盖好瓶塞,连同水浴一道置于 0℃冰箱中,反应 16 h。

(2)氧化反应终止。以下步骤依使用不同的氧化终止剂而不同。

①若以氢溴酸为终止剂,于各管中加入氢溴酸 0.3 mL,振摇,放回水浴,静置 30 min,然后移到旋转蒸发器或浓缩器上,在 60℃、低于  $3.3 \times 10^3$  Pa 下浓缩至干。用  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液约 15 mL 将残渣定量转移到 20 mL 安瓿管中,封口,置恒温烘箱中,  $(110 \pm 1)^\circ\text{C}$  下水解 22~24 h。

取出安瓿管或水解管,冷却,用水将内容物定量转移至 50 mL 容量瓶中,定容。充分混匀,过滤,取 1~2 mL 滤液,置旋转蒸发器或浓缩器中,在低于 50℃ 的条件下,减压蒸发至干。加少许水重复蒸干 2~3 次。准确加入一定体积(2~5 mL)的稀释上机用柠檬酸钠缓冲液振摇,充分溶解后离心,取上清液供仪器测定用。

②若以偏重亚硫酸钠为终止剂,则于试样氧化液中加入偏重亚硫酸钠溶液 0.5 mL,充分摇匀后,直接加入  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 17.5 mL,置于  $(110 \pm 3)^\circ\text{C}$  水解 22~24 h。

取出水解管,冷却,用水将内容物转移到 50 mL 容量瓶中,用氢氧化钠溶液中和至 pH 值约 2.2,并用稀释上机用缓冲液定容,离心,取上清液供仪器测定用。

#### 6.2.3.7 计算与分析结果表示

同普通酸水解法。

### 6.2.4 碱水解法

#### 6.2.4.1 适用范围

本方法适合于饲料原料、配合饲料和浓缩饲料中色氨酸的测定。

#### 6.2.4.2 测定原理

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

高效反相色谱分离测定。

#### 6.2.4.3 仪器、设备

聚四氟乙烯衬管;其他同普通酸水解法。

#### 6.2.4.4 试剂与溶液配制

(1)氢氧化锂溶液,  $c(\text{LiOH})=4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。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气脱气。

(2)液氮或干冰-乙醇(丙酮)。

(3)盐酸溶液,  $c(\text{HCl})=6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将优级纯盐酸与水等体积混合。

(4)稀释用柠檬酸缓冲溶液, pH 值为 4.3,  $c(\text{Na}^+)=0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。称取柠檬酸钠 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 5.0 mL 和辛酸 0.1 mL, 加水定容至 1 000 mL, 摇匀。

(5)不同 pH 值和离子强度的洗脱用柠檬酸钠缓冲液。按氨基酸分析仪器说明书配制。

(6)茚三酮溶液。按氨基酸仪器说明书配制。

(7)*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  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液, 使之溶解, 定量转移至 100 mL 容量瓶中, 加水至刻度。色氨酸浓度为  $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(8)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, 各氨基酸组分浓度为 2.5(或 2.00)  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(9)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, 用 pH 值为 4.3 柠檬酸钠缓冲液定容。该溶液色氨酸浓度为  $200 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 而其他氨基酸浓度为  $100 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 6.2.4.5 试样选取与制备

试样制备同普通酸水解法。对于粗脂肪含量大于或等于 5% 的试样, 需将脱脂后的试样风干、混匀, 装入密闭容器中备用。而对粗脂肪小于 5% 的试样, 则可直接称量未脱脂试样。

#### 6.2.4.6 分析测定

(1)称取 50~100 mg 的试样(准确至 0.000 1 g), 置于聚四氟乙烯衬管中, 加 1.50 mL  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化锂碱解剂, 于液氮或干冰-乙醇(丙酮)中, 冷冻, 而后将衬管插入水解玻管, 抽真空至 7 Pa 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将水解液定时地转移到 10 mL 或 25 mL 容量瓶中, 加入盐酸溶液约 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,待上机测定使用。

(2)测定。用相应的混合氨基酸标准工作液按仪器说明书,调整仪器操作参数和(或)洗脱用柠檬酸钠缓冲液的 pH 值,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。碱解液每 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。

#### 6.2.4.7 分析结果的表述

(1)分别用公式 6-3 和公式 6-4,计算色氨酸在试样中的质量分数。

$$w_1(\text{Trp}) = \frac{\rho_1}{m_1} \times 10^{-6} \times D \quad 6-3$$

$$w_2(\text{Trp}) = \frac{\rho_2}{m_2[1-w(\text{EE})]} \times 10^{-6} \times D \quad 6-4$$

式中: $w_1(\text{Trp})$ 为用未脱脂试样测定的色氨酸质量分数; $w_2(\text{Trp})$ 为用脱脂试样测定的色氨酸质量分数; $\rho_1$ 为未脱脂试样上机水解液中色氨酸质量浓度, $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $\rho_2$ 为脱脂试样上机水解液中色氨酸质量浓度, $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $m_1$ 为未脱脂试样质量,g;  $m_2$ 为脱脂试样质量,g;  $D$ 为试样稀释倍数; $w(\text{EE})$ 为脱脂试样脱脂前脂肪质量分数。

以两平行试样测定结果的算术平均值报告,保留两位小数。

(2)允许差。对于酸解或酸提液测定的氨基酸含量高于 0.5% 时,两个平行试样测定值的相对偏差不大于 5%;含量低于 0.5% 时,高于 0.2% 时,两个平行试样测定值相差不大于 0.03%;含量低于或等于 0.2%,两个平行试样测定值相对偏差不大于 5%。

### 6.2.5 酸提取法

#### 6.2.5.1 适用范围

本方法适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中添加的赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、色氨酸等游离氨基酸的测定。

#### 6.2.5.2 测定原理

饲料中添加的游离氨基酸以稀盐酸溶液提取,经离子交换色谱分离、测定。

#### 6.2.5.3 仪器设备

同普通酸水解法。

#### 6.2.5.4 试剂与溶液配制

(1)提取剂——盐酸溶液, $c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 8.3 mL 优级纯盐酸,

用水定容至 1 000 mL,混匀。

(2)不同 pH 值和离子强度的洗脱用柠檬酸缓冲液。按仪器说明书配制。

(3)茚三酮溶液。按仪器说明书配制。

(4)蛋氨酸、赖氨酸和苏氨酸标准储备液。于 3 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。该液各氨基酸浓度为  $2.50 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(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为  $100 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 6.2.5.5 试样选取与制备

同普通酸水解法。

#### 6.2.5.6 分析步骤

(1)试样处理。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  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸提取剂 30 mL,搅拌提取 15 min,沉放片刻,将上清过滤到 100 mL 容量瓶中,残渣加水 25 mL,搅拌 3 min。重复提取 2 次,再将上清液过滤到容量瓶中,用水冲洗提取瓶和滤纸上的残渣,并定容。摇匀,取上清液供上机测定。若试样提取过程中,过滤太慢,也可离心  $10 \text{ min}(4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1})$ 。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试验,以校准测定结果。

(2)测定。用相应的混合氨基酸标准工作液按仪器说明书,调整仪器操作参数和(或)洗脱用柠檬酸钠缓冲液的 pH 值,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。

#### 6.2.5.7 计算与分析结果表示

同普通酸水解法。

### 6.3 氨基酸高效液相色谱法(HPLC)的分析测定

近年来,由于高效液相色谱技术(HPLC)的迅速发展,为氨基酸分析开辟了新的领域。目前,已有许多学者对柱前、柱后的衍生剂进行了大量研究,提出许多氨基酸的 HPLC 方法。其中主要包括:DNS(dansyl chloride)(丹磺酸法),OPA

(o-phthaldehyde)(邻苯二甲醛法),Fmoc(9-fluorenylmethyl chloroformate)和 PITC(phenylisothiocyanate)(异硫氰酸苯酯)等。1993年,Waters公司的氨基酸分析专家 S. A. Cohen 等人合成了一种新的柱前衍生剂:6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基-氨基甲酸酯(AQC),并将其用于氨基酸分析。这些方法的应用,缩短了氨基酸分析所需要的时间,提高了分析的灵敏度,可在  $1 \times 10^{-9} \text{g}$  水平上进行检测,目前已成为氨基酸的一种有效分离技术,而且这种技术对氨基酸分析者来说,是可以选择的。因此,已受到生物、医学、化学、环保、食品和饲料工业方面的高度重视。

本节主要介绍由国家饲料质量监督检验中心(北京)与 Waters 公司北京办事处共同合作,以 1992 年国际实验室间氨基酸分析联合实验为基础,用其统一发放的样品(具有 9 国 28 个实验室检测数据总均值)做了系统的条件实验和比对实验,建立的以 AQC 为柱前衍生剂,采用 HPLC 对饲料水解液中氨基酸含量的测定方法(简称 AccQ-Tag 法)。该方法具有操作步骤简单,反应速度快,不受介质的影响,衍生产物稳定,过量衍生剂不干扰分析等特点。

### 6.3.1 适用范围

本方法适用于饲料原料、全价配合饲料、浓缩饲料和预混料中除了色氨酸以外 17 种氨基酸的测定。

### 6.3.2 测定原理

水解后的氨基酸,用 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基-氨基甲酸酯(6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC)衍生,形成稳定的荧光(紫外)衍生物,可经 Waters AccQ-Tag 分析柱分离,用荧光或紫外检测器测定。

AQC 柱前衍生反应原理如图 6.4 所示。

### 6.3.3 仪器设备

- (1)分析天平(精确度 0.0001 g)。
- (2)恒温干燥箱[能控温在 55℃ 和  $(110 \pm 1)^\circ\text{C}$ ]。
- (3)旋转蒸发器或浓缩器。
- (4)pH 计。
- (5)超声波水浴。
- (6)涡旋发生器。

(7)液相色谱仪(具二元泵,可做梯度淋洗)。

(8)AccQ-Tag 氨基酸分析柱( $4\ \mu\text{m}$  Nova pak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>  $3.9\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$ )。

(9)微量移液管。

(10)玻璃器皿。水解管、衍生试管( $6\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$ )、量筒、容量瓶、刻度试管、移液管等。

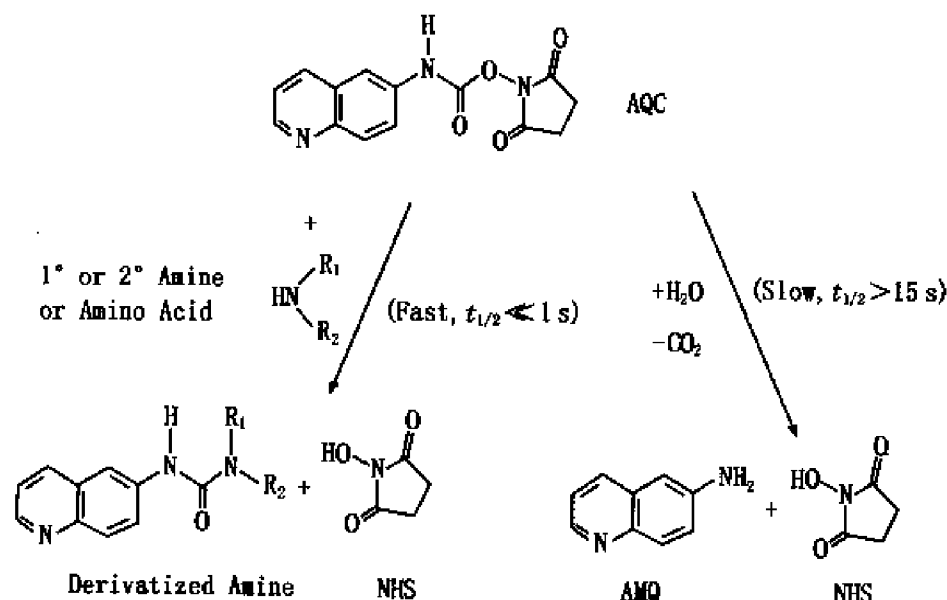


图 6.4 AQC 柱前衍生反应原理

#### 6.3.4 试剂与溶液配制

实验用水均为  $18\ \text{M}\Omega$  高纯水。

(1) Waters 氨基酸水解标样或其他同类产品。17 种氨基酸浓度均为  $2.5\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (胱氨酸浓度为  $1.25\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

(2) 标准储备液的制备

①  $\alpha$ -氨基丁酸(AABA)内标储备液( $2.5\ \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ): 称取  $25.8\ \text{g}$  AABA 置于  $100\ \text{mL}$  容量瓶中, 稀释至刻度。

② 磺基丙氨酸储备液( $2.5\ \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ): 称取  $4.23\ \text{mg}$  磺基丙氨酸于  $10\ \text{mL}$  容量瓶中, 稀释至刻度。

③ 蛋氨酸磺储备液( $2.5\ \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ): 称取  $4.53\ \text{mg}$  蛋氨酸磺于  $10\ \text{mL}$  容量瓶中, 稀释至刻度。

(3) 氨基酸标准液的制备。准确吸取  $1\ \text{mL}$  17 种氨基酸标准,  $1\ \text{mL}$  磺基丙氨酸储备液,  $1\ \text{mL}$  蛋氨酸磺储备液,  $1\ \text{mL}$  水, 制成  $0.5\ \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$  氨基酸标

准液。

(4)标准工作液的制备。将不同体积的氨基酸标准液、AABA 标准储备液和水混合制成一系列不同浓度的氨基酸标准液,如表 6.2 所示。

表 6.2 不同浓度氨基酸标准工作液配制

移液名称	移液体积				
氨基酸标准液/ $\mu\text{L}$	200	800	1 200	1 600	1 800
AABA 内标储备液/ $\mu\text{L}$	200	200	200	200	200
超纯水/ $\mu\text{L}$	1 600	1 000	600	200	0
浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.05	0.20	0.30	0.50	0.45

(5)流动相 A 液。称取 19.04 g 分析纯三水乙酸钠,加 1 L 高纯水溶解,用稀磷酸(1:1,V:V)调 pH 值至 5.2,加 1 mL EDTA 溶液( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),加 0.1 g 叠氮化钠,加 2.37 mL 三乙胺,用稀磷酸调 pH 值至 4.95,用  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤。使用前超声脱气。

(6)流动相 B 液。经  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤的色谱纯乙腈与超纯水按 3:2(V:V)比例配制。在超声水浴中脱气 20 s。

(7) $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸水解液。优级纯盐酸与水按照 1:1(V:V)混合均匀。

(8)过甲酸溶液。88%甲酸与 30%的过氧化氢按 9:1(V:V)混合。室温下放置 1 h 后移至  $0^\circ\text{C}$  下保存。

(9)氢溴酸(40%,分析纯)。

(10)Waters AccQ-fluor。试剂包。

### 6.3.5 测定步骤

#### 6.3.5.1 试样水解

试样水解同本章 6.2 离子交换树脂法。

#### 6.3.5.2 水解工作液的制备

冷却试样水解液并过滤,取 1~2 mL 水解液(根据样品中蛋白质含量而定)置于浓缩管中,在  $50^\circ\text{C}$  条件下浓缩至干。然后向试管中加入  $20 \mu\text{L}$  AABA 储备液,1.8 mL 水,涡旋混合 20 s。此溶液密封, $4^\circ\text{C}$  下贮存备用。

#### 6.3.5.3 衍生

(1)移取  $10 \mu\text{L}$  标准或水解工作液于  $6 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$  试管的底部。

(2)加入  $70 \mu\text{L}$  硼酸盐缓冲溶液,涡旋 10 s。

(3)边涡旋边加入  $20 \mu\text{L}$  AQC,并彻底振摇。

(4)将衍生物移至自动进样器的样品瓶中,密封盖好。

(5)将试样瓶置于 55 ℃烘箱中保温 10 min。

注:衍生剂的配制:在打开 AccQ-fluor 试剂盒中的 2A 瓶之前,轻轻弹击,确保所有粉末全部落入瓶底,由 2B 瓶中吸取 1 mL 稀释剂放入 2A 瓶中,加盖密封,振摇 10 s 后放入 55 ℃加热装置中加热,至衍生剂粉末全部溶解。加热时间不超过 10 min。

该衍生剂于干燥器中,室温下可保存 1 周。

#### 6.3.5.4 色谱条件

柱温:对于一般氨基酸分析,柱温设为 37 ℃;对于含硫氨基酸,柱温设为 47 ℃。

检测器:荧光检测器(激发波长 245 nm;发射波长 395 nm)或紫外检测器(波长 248 nm)。

#### 梯度设置

HPLC 系统配置不同,所用梯度表也不同,请参见 Waters AccQ-Tag 用户手册。

若采用 Millemmum2010 软件,则在“Quickset Control”窗口下设置运行时间为 45 min。

下面给出 510 系统的梯度表,仅供参考(表 6.3)。

表 6.3 用于饲料水解氨基酸测定的梯度表(510×2 系统)

时间/ min	流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	普通氨基酸/%		含硫氨基酸/%		曲线
		A	B	A	B	
0	1.0	100	0	100	0	6
17	1.0	93	7	92	8	6
21	1.0	90	10	83	17	6
32	1.0	66	34	73	27	6
34	1.0	66	34	50	50	6
35	1.0	0	100	50	50	6
37	1.0	0	100	0	100	6
38	1.0	100	0	100	0	6
45	1.0	100	0	100	0	6

进样体积:10  $\mu\text{L}$ ;流速:1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

#### 6.3.6 结果计算

同本章 6.2。

## 6.4 饲料有效赖氨酸的测定

### 6.4.1 适用范围

本方法适用于含有动物或植物性蛋白质的配合(混合)饲料及单一饲料。

### 6.4.2 测定原理

有效赖氨酸是指在规定的测定条件下测得的总赖氨酸和非有效赖氨酸之差。蛋白质中有效赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基可与2,4-二硝基氟苯反应,酸解后生成二硝基苯赖氨酸,而其他非有效部分则生成赖氨酸。因此将不经二硝基氟苯处理的样品和经由二硝基氟苯处理的样品分别水解,用离子交换色谱法测定各自的赖氨酸含量,即可由其差值得出样品中有效赖氨酸的含量。

### 6.4.3 试剂和溶液

所用试剂均为分析纯,水为去离子水。

(1)乙醚(HG 3-1002)。

(2) $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠(GB 640)溶液。

(3)2,4-二硝基氟苯(DNFB)乙醇溶液:

将一定量的DNFB溶于95%乙醇,其体积比为0.15:12(V:V),该溶液用前现配。

(4) $6.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸(GB 622)溶液。

(5) $6.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸(GB 622)溶液。

(6)稀释用柠檬酸钠缓冲液。pH值约2.2。

将下列试剂依次溶于适量水:

20 g 一水柠檬酸(HG 3-1108);

8 g 氢氧化钠(GB 629);

16 mL 浓盐酸(GB 622);

0.1 mL 辛酸;

20 mL 硫二甘醇;

加水稀释至1 000 mL。

(7)层析用柠檬酸钠缓冲液。pH值及配制方法依不同型号的氨基酸测定仪有所区别,请参见仪器说明书配制。

(8)茚三酮试剂。按仪器说明书配制。

(9)赖氨酸标准液:  $50 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$  或其他浓度。

先配制  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$  赖氨酸标准储备液: 称取  $45.6 \text{ mg}$  赖氨酸单盐酸盐溶于  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液中, 稀释至  $100 \text{ mL}$ , 混匀。

用该标准储备液或商品  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准氨基酸混合液, 以  $\text{pH}$  值  $2.2$  柠檬酸钠缓冲液为溶剂配制  $50.0 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$  标准液。也可根据仪器说明书配制成其他最佳使用浓度。

#### 6.4.4 仪器、设备

(1)实验室用样品粉碎机。能快速一致地粉碎样品, 并能避免样品过热和尽可能少与外界接触。

(2)样品筛: 孔径  $0.25 \text{ mm}$  (60 目)。

(3)分析天平: 感量  $0.0001 \text{ g}$ 。

(4)油浴: 温度可稳定于  $120 \sim 130^\circ\text{C}$  之间。

(5)回流水解装置:  $150, 500 \text{ mL}$  短颈烧瓶以玻璃磨口接头与回流冷凝器 (长  $35 \sim 40 \text{ cm}$ ) 相接。

(6)离心机:  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

(7)旋转蒸发器。

(8)氨基酸自动分析仪。

(9)回流水解装置:  $50 \text{ mL}$  水解管或消煮管, 具磨口接头与回流冷凝器相接。

(10)金属块消煮炉: 要求温度保持在  $120 \sim 130^\circ\text{C}$  之间, 必要时可加继电器和接点温度计控制。金属块内消煮管的受热深度应高于或等于  $25 \text{ mL}$  消煮液的液面高度。

(11)水浴。

#### 6.4.5 试样选取与制备

采集具代表性的配合 (混合) 饲料或单一饲料, 按四分法缩分制备实验室样品, 取  $10 \sim 20 \text{ g}$  粉碎, 使其全部通过 60 目样品筛。充分混匀, 装入密闭容器。

#### 6.4.6 分析步骤

##### 6.4.6.1 A 法

(1)总赖氨酸。

①酸水解: 称取约含  $50 \text{ mg}$  粗蛋白质的样品两份, 置于  $500 \text{ mL}$  烧瓶中, 加



入 250 mL  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,装好回流冷凝器,置  $120 \sim 130 \text{ }^{\circ}\text{C}$  油浴中,使其徐徐沸腾,回流水解 24 h。

取下烧瓶,冷却。必要时将酸解液(连同水解后不溶物)重新定容至 250 mL。过滤。吸取 5 mL 滤液,于旋转蒸发器上, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  左右蒸发至干。用水少许,重复蒸干 1~2 次。

将残渣溶于 5 mL 稀释用柠檬酸钠缓冲液。离心  $10 \text{ min}$  ( $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),取上清液上机或贮于具塞小管中冷藏备用。

②测定:打开氨基酸自动分析仪,使柱温,反应柱温度,缓冲液及茚三酮流速等各种操作参数达到预定要求,并按仪器说明书取一定量的赖氨酸标准液进行校准。然后在同样条件下取样品溶液进行测定。

#### (2)非有效赖氨酸。

①二硝基苯化反应:称取约含 50 mg 粗蛋白的样品 2 份,置于 150 mL 烧瓶中,加入 4 mL  $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  碳酸氢钠溶液,放置 10 min,其间需不时振摇。再加入 6 mL DNFB 乙醇溶液,加盖,振摇,注意勿使样品颗粒黏附于瓶壁上。在室温下暗处放置过夜。

②纯化:在旋转蒸发器上,温度不高于  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下,将上述反应物蒸干,加入 35 mL 乙醚,振摇或搅拌后,待固体充分沉降,弃去绝大部分乙醚,小心不要带出固体样品颗粒。重复上述操作两次,每次加 25 mL 乙醚(此步骤乙醚层有时似较浑浊,只要倾倒时不带出样品颗粒,可不离心)。最后,蒸发除去残存乙醚。

③酸水解:边冲洗瓶口瓶壁边加入 75 mL  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,使样品全部浸于酸中,装好回流冷凝器,置于  $120 \sim 130 \text{ }^{\circ}\text{C}$  油浴中,使其徐徐沸腾,回流水解 24 h。

取下烧瓶,冷却。将水解物定量转移至 100 mL 容量瓶中,用水定容,过滤。吸取 5 mL 滤液于旋转蒸发器上, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  左右蒸发至干,加水少许,重复蒸干 1~2 次。

将残渣溶于 3 mL 稀释用柠檬酸钠缓冲液,用离心机离心 10 min,取上清液上机或贮于具塞小管中冷藏备用。

#### ④测定:同 6.4.6.1(1)②。

非有效赖氨酸峰值较低,易受邻峰或杂峰干扰,如某些氨基酸自动分析仪该峰分离不好,需将树脂床(或分析柱)加长,或变换参数与程序。

#### 6.4.6.2 B 法——简化法

(1)总赖氨酸。准确称取约含 50 mg 粗蛋白质的样品 2 份,置于 50 mL 水解管中,加入 25 mL  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,装好回流冷凝器并置于预先热至  $120 \sim 130 \text{ }^{\circ}\text{C}$  金属块消煮炉上,缓缓煮沸水解 24 h。

冷却,将水解液定容至 50 mL,混匀,过滤。吸取滤液 2 mL,于旋转蒸发器,60 ℃浓缩至干,加水少许,重复蒸干 1~2 次。

残渣中加入适量稀释用柠檬酸钠缓冲液(粗蛋白质含量为 10%~20%的样品加 2 mL,粗蛋白质含量为 30%~50%的加 5 mL),充分溶解后离心,取上清液上机。

## (2)非有效赖氨酸。

①二硝基苯化反应:称取含蛋白质 20~25 mg 的样品 2 份,置于 50 mL 水解管中,加入 2 mL  $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  碳酸氢钠溶液,放置 10 min(其间不时振摇),加入 DNFB 乙醇溶液 3 mL,振摇混匀后,在室温下暗处放置过夜。

将上述水解管置 85~90 ℃水浴中蒸去乙醇,直至振摇时不产生泡沫为止。此时水解管内物应失重 2.5~3 g。

②纯化:于去醇的水解管内加入 20 mL 乙醚,加塞,剧烈振摇后令其分层,弃去乙醚层,再用乙醚萃取 2 次,每次 10 mL,弃去乙醚层后,将水解管放入 60~70 ℃水浴,除去残存乙醚。

③酸水解:边冲洗管口管壁边加 23 mL  $6.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,装好冷凝器,与测定总赖氨酸样品一道置于 120~130 ℃金属块消煮炉上,回流水解 24 h。

冷却,将水解液定容至 50 mL,混匀,过滤。吸取滤液 5 mL 于 60 ℃旋转蒸发器上蒸发至干,加水少许,重复蒸干 1~2 次。

残渣中加入适量稀释用柠檬酸钠缓冲液(蛋白质含量 10%~20%加 3 mL,30%~50%加 5 mL),充分溶解后离心,取上清液上机。

## 6.4.7 计算与结果表示

### 6.4.7.1 总赖氨酸

试样中总赖氨酸质量分数按公式 6-5 计算。

$$w(\text{总赖氨酸}) = \frac{\rho_1}{m_1} \times 10^{-6} \times D \quad 6-5$$

式中: $\rho_1$  为上机液中赖氨酸质量浓度,  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $m_1$  为试样质量, mg;  $D$  为稀释倍数。

### 6.4.7.2 非有效赖氨酸

试样中非有效赖氨酸的质量分数按公式 6-6 计算。

$$w(\text{非有效赖氨酸}) = \frac{\rho_2}{m_2} \times 10^{-6} \times D \quad 6-6$$

式中: $\rho_2$  为上机液中氨基酸质量浓度,  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $m_2$  为试样质量, mg;  $D$  为稀释

倍数。

#### 6.4.7.3 有效赖氨酸

试样中有效赖氨酸质量分数按公式 6-7 计算。

$$w(\text{有效赖氨酸}) = w(\text{总赖氨酸}) - w(\text{非有效赖氨酸}) \quad 6-7$$

#### 6.4.7.4 重复性

同一试样两平行测定值的相对偏差,应不超过其平均值的 10%。

注:与生物测定法相比,本法测定结果偏高,在分析评价实验结果时需加以注意。

## 6.5 饲料添加剂氨基酸质量标准与检测

### 6.5.1 饲料级 DL-蛋氨酸的质量标准与检测方法

蛋氨酸是具有旋光性的化合物,分为 *D* 型和 *L* 型。在动物体内,*L* 型易被肠壁吸收,*D* 型要经酶转化成 *L* 型后才能参与蛋白质的合成。工业合成的产品是 *L* 型和 *D* 型混合的外消旋化合物。

分子式: $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ 。

相对分子质量:149.21(按 1983 年国际相对原子质量)。

#### 6.5.1.1 质量标准

(1)理化性状。本品为白色或淡黄色的结晶粉末,具有微弱的含硫化物或蛋氨酸的特殊气味。易溶于水、稀酸或稀碱,微溶于乙醇,不溶于乙醚。有旋光性。熔点为 281℃(分解),其  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的水溶液的 pH 值为 5.6~6.1。

(2)饲料添加剂 DL-蛋氨酸的技术指标(表 6.4)。

表 6.4 饲料添加剂 DL-蛋氨酸的技术指标

指标名称		指 标
含量(以 $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ 干基计)	$\geq$	98.5%
水分	$\leq$	0.5%
氯化物	$\geq$	0.2%
有害元素(以 As 计)	$\leq$	$2\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
重金属(以 pb 计)	$\leq$	$20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

## 6.5.1.2 鉴别方法

(1)取本品 25 mg 于干燥的烧杯中,加入由无水硫酸铜饱和的硫酸 1 mL,应立即显黄色。

(2)称取本品 0.5 g,加入 20 mL 水溶液时,溶液是无色至淡黄色,差不多是澄清液。

## 6.5.1.3 蛋氨酸含量测定

(1)测定原理。在中性介质中准确加入过量的碘溶液,将两个碘原子加到蛋氨酸的硫原子上,过量的碘溶液用硫代硫酸钠标准滴定溶液回滴。

(2)试剂与溶液。

① 500 g · L<sup>-1</sup>磷酸氢二钾溶液。

② 200 g · L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液。

③ 200 g · L<sup>-1</sup>碘化钾溶液。

④ 碘溶液: $c(1/2 I_2)$ 约 0.1 mol · L<sup>-1</sup>。

⑤ 硫代硫酸钠标准滴定溶液: $c(Na_2S_2O_3)$ 约 0.05 mol · L<sup>-1</sup>。

⑥ 10 g · L<sup>-1</sup>淀粉指示液。

(3)测定。称取试样 0.3 g(精确至 0.000 2 g)移入 500 mL 碘量瓶中,加入 100 mL 无离子水,然后分别加入下列试剂:10 mL 磷酸氢二钾溶液、10 mL 磷酸二氢钾溶液、10 mL 碘化钾溶液,待全部溶解后准确加入 50.00 mL 碘溶液,盖上瓶盖,水封,充分摇匀,于暗处放置 30 min,用硫代硫酸钠标准滴定溶液滴定过量的碘,近终点时加入 1 mL 淀粉指示液,滴定至无色并保持 30 s 为终点,同时做空白试验。

(4)计算与结果表示。

①计算公式:试样中蛋氨酸的质量分数按公式 6-8 计算。

$$w(\text{Met}) = \frac{c(V - V_0) \times 0.0746}{m} \quad 6-8$$

式中: $c$  为硫代硫酸钠标准滴定溶液浓度, mol · L<sup>-1</sup>;  $V$  为滴定试样时消耗的硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积, mL;  $V_0$  为空白消耗的硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积, mL;  $m$  试样的质量, g; 0.074 6 为与 1.00 mL 硫代硫酸钠标准滴定溶液  $c[(Na_2S_2O_3) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}]$  相当的、以克表示的 DL-蛋氨酸的质量。

所得结果应表示至一位小数。

②允许差:取平行测定结果的算术平均值为测定结果,两次平行测定结果的

绝对差值不得大于 0.1%。

### 6.5.2 饲料级 *L*-赖氨酸盐酸盐的质量标准与检测方法

本方法适合于以淀粉、糖质为原料,经发酵法提取制得的 *L*-赖氨酸盐酸盐纯度的测定。*L*-赖氨酸盐酸盐是动物体内的必需氨基酸,添加饲料中作为氨基酸的补充剂。

分子式: $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ 。

相对分子质量:182.65(按 1983 年国际相对原子质量)。

#### 6.5.2.1 质量标准

(1)理化性状。本品为白色或淡褐色粉末,无味或有特殊气味。易溶于水,难溶于乙醇及乙醚。有旋光性。本品水溶液  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 pH 值为 5.0~6.0。

(2)饲料级 *L*-赖氨酸盐酸盐技术指标(表 6.5)。

表 6.5 饲料级 *L*-赖氨酸盐酸盐技术指标

项 目	指 标
含量(以 $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ 干基计)	$\geq 98.5\%$
比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$	$+18.0^\circ \sim 21.5^\circ$
干燥失重	$\leq 1.0\%$
灼烧残渣	$\leq 0.3\%$
铵盐(以 $NH_4^+$ )	$\leq 0.04\%$
重金属(以 Pb 计)	$\leq 0.003\%$
有害元素(以 As 计)	$\leq 0.0002\%$

#### 6.5.2.2 试验方法

(1)试剂和溶液。

- ①  $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  茚三酮溶液。
- ②  $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸银溶液。
- ③ 稀硝酸 1:9 溶液(V:V)。
- ④ 氢氧化铵溶液 1:2 溶液(V:V)。

(2)鉴别方法。

①氨基酸的鉴别:称取试样 0.1 g,溶于 100 mL 水中,取此溶液 5 mL,加 1 mL 茚三酮溶液,加热 3 min 后,加水 20 mL,静置溶液呈红紫色。

②氯化物的鉴别:称取试样 1 g,溶于 100 mL 水中,加硝酸银溶液,即产生白色沉淀。取此沉淀加稀硝酸,沉淀不溶解;另取此沉淀加过量的氢氧化铵溶液则溶解。

## 6.5.2.3 含量测定

(1)试剂和溶液。

①甲酸。

②冰乙酸。

③ $0.2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\alpha$ -萘酚苯基甲醇冰乙酸指示液。

④高氯酸溶液:浓度约为 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的冰乙酸标准溶液(配制及标定方法见附录八)。

(2)测定步骤。试样预先在 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重,称取干燥试样约 $0.2\text{ g}$ ,称准至 $0.0002\text{ g}$ ,加 $3\text{ mL}$ 甲酸和 $50\text{ mL}$ 冰乙酸,再加入 $5\text{ mL}$ 乙酸汞的冰乙酸溶液,加入 $10$ 滴 $\alpha$ -萘酚苯基甲醇指示液,用 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸的冰乙酸标准溶液滴定,试样液由橙黄色变为黄绿色即为滴定终点。用同样方法另作空白试验以校正之。

(3)计算与结果表示。

①计算公式: $L$ -赖氨酸盐酸盐( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ )的质量分数按公式 6-9 计算。

$$w(\text{Lys} \cdot \text{HCl}) = \frac{0.09132 \times c(V - V_0)}{m} \quad 6-9$$

式中: $c$ 为高氯酸标准溶液的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$ 为试样消耗高氯酸标准滴定溶液的体积, $\text{mL}$ ;  $V_0$ 为空白试验消耗高氯酸标准溶液的体积, $\text{mL}$ ;  $m$ 为试样质量, $\text{g}$ ;  $0.09132$ 为与 $1.00\text{ mL}$ 高氯酸标准溶液 $[c(\text{HClO}_4)] = 1.000\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当的,以克表示的赖氨酸盐酸盐的质量。

②两个平行试样测定结果之差不得大于 $0.2\%$ ,以其算术平均值报告结果。

## 6.5.3 蛋氨酸羟基类似物(MHA)质量标准与检测方法

分子式: $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3\text{S}$ 。

相对分子质量:150.2(按1983年国际分子量)。

## 6.5.3.1 质量标准

(1)理化性状。本品为褐色或棕色黏液,有含硫基团的特殊气味。易溶于水,比重( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )为 $1.22 \sim 1.23$ ,pH值为 $1 \sim 2$ ,含水量约 $12\%$ ,凝固点 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,黏度 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, $35\text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, $105\text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。

(2)液态羟基蛋氨酸的技术指标(表 6.6)。

表 6.6 液态羟基蛋氨酸的技术指标

指标名称	指 标	指标名称	指 标
含量(以 $C_6H_{10}O_3S$ 干基计)	88%	有害元素(以 As 计)	$2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
铵盐(以 $\text{NH}_4^+$ 计)	1.5%	氰化物	$10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
重金属(以 Pb 计)	$20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		

## 6.5.3.2 鉴别试验

(1)取本品 25 mg 于干燥的烧杯中,加入由无水硫酸铜饱和的硫酸 1 mL,应立即显黄色,继而转变成黄绿色。

(2)取本品 1 滴于干燥试管中,加入新配制的  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  2,7-二羟基萘的浓硫酸试液 2 mL,并在沸水浴中加热 10~15 min,颜色由淡黄色转变红棕色时,检查其比重[按兽药规范附录比重测定法中比重瓶法(2)之规定操作],20℃时应为 1.22~1.23。

## 6.5.3.3 含量的测定

(1)试剂和溶液。

①磷酸氢二钾(分析纯)。

②磷酸二氢钾(分析纯)。

③碘化钾(分析纯)。

④ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碘溶液。

⑤ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠溶液(配制及标定方法见附录八)。

⑥淀粉试剂:将淀粉 1 g 用 10 mL 冷水充分混合,把它边搅拌边徐徐注入到 200 mL 热水中,煮沸到溶液半透明为止,把溶液放置之后用上层澄清液。

(2)测定。用减量法称取试样 0.3 g(准确至 0.000 2 g)于容量瓶中,加水 100 mL,磷酸氢二钾 5 g,磷酸二氢钾 2 g,碘化钾 2 g,充分振荡溶解之后,准确加入碘溶液 50 mL,加塞摇匀,在暗处放 30 min,以淀粉试剂为指示剂,用硫代硫酸钠溶液滴定过量的碘。同时,按同样方法对水进行操作,作为空白试验。

(3)结果计算与表示。试样中羟基蛋氨酸质量分数按公式 6-10 计算。

$$w(\text{MHA}) = \frac{c(V_1 - V_2) \times 0.075}{m} \quad 6-10$$

式中: $c$  为硫代硫酸钠标准溶液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为试样消耗的  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠溶液的体积, mL;  $V_2$  为空白消耗的  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠溶液的体积, mL;  $m$  为试样的质量, g; 0.075 1 为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠溶液 1 mL 相当于 0.075 1 g 的羟基蛋氨酸。

#### 6.5.4 羟基蛋氨酸钙(MHA-Ca)的质量标准与检测方法

羟基蛋氨酸钙盐是液体的羟基蛋氨酸与氧化钙中和,经干燥、粉碎和筛选后制得。

分子式:  $(C_5H_8OS)_2Ca$ 。

相对分子质量 338.4(按 1983 年国际相对原子质量)。

##### 6.5.4.1 质量标准

(1)理化性状为浅褐色粉末或颗粒,粒度为全部通过 18 目筛,40 目筛上物不超过 30%。有含硫基团的特殊气味。可溶于水。

(2)羟基蛋氨酸钙的技术指标(表 6.7)。

表 6.7 羟基蛋氨酸钙的技术指标

指标名称	指标/%	指标名称	指标/ $mg \cdot kg^{-1}$
含量[以 $(C_5H_8OS)_2Ca$ 干基计]	97	重金属(以 Pb 计)	20
无机酸钙盐	1.5	有害元素(以 As 计)	2

##### 6.5.4.2 鉴别试验

(1)取本品 25 mg 于干燥的烧杯中,加入由无水硫酸铜饱和的硫酸 1 mL,应立即显黄色。

(2)取本品 0.5 g 溶于 10 mL 水中,加草酸铵试剂有白色沉淀,分离后,在沉淀中加醋酸不溶,而加稀盐酸则溶解。

##### 6.5.4.3 含量的测定同 DL-蛋氨酸。

#### 思考题

1. 饲料中氨基酸的测定通常采用哪些方法测定,各自的优缺点是什么?
2. 简述采用离子交换色谱法测定饲料氨基酸的原理和主要步骤。
3. 简述饲料级赖氨酸盐酸盐纯度的测定原理和步骤。
4. 简述饲料级蛋氨酸纯度的测定原理和步骤。
5. 简述饲料中有效赖氨酸的测定原理和步骤。



## 7 矿物元素分析

### 【内容提要】

本章系统介绍了饲料中常量和微量矿物质元素的定性与定量检测方法。着重介绍了常量元素钙、磷和食盐的准确和快速定量测定方法;铜、铁、锌、锰、钴、碘、硒等矿物质元素离子的定性化学检测方法,以及锌、铜、铁、锰、碘、钴、镁等离子和硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐离子的点滴试验方法;饲料级硫酸铜、硫酸锌、硫酸亚铁、硫酸锰、亚硒酸钠、氯化钴、碘化钾等饲料添加剂原料中有关元素的化学定量分析方法;原子吸收光谱分析法测定饲料中微量元素的基本原理、方法和基本操作程序;ICAP-9000 型等离子发射光谱仪测定饲料中矿物质元素含量的方法。

### 7.1 饲料中常量元素的分析测定

#### 7.1.1 饲料中钙的测定(高锰酸钾滴定法)

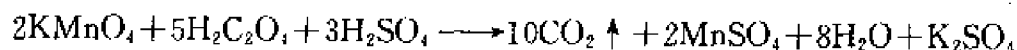
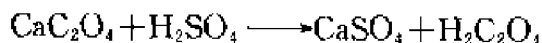
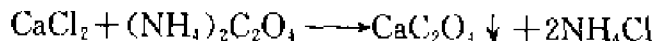
##### 7.1.1.1 适用范围

本方法适用于配合饲料、浓缩饲料和单一饲料中钙的测定。

##### 7.1.1.2 测定原理

将试样有机物破坏,钙变成溶于水的离子,并与盐酸反应生成氯化钙,然后在溶液中加入草酸铵溶液,使钙成为草酸钙白色沉淀,然后用硫酸溶液溶解草酸钙,再用高锰酸钾标准溶液滴定游离的草酸根离子。根据高锰酸钾标准溶液的用量,可计算出试样中钙含量。

主要化学反应式如下:



##### 7.1.1.3 仪器和设备

(1)实验室用样品粉碎机或研钵。

(2)分析筛:孔径 0.45 mm(40 目)。

- (3)分析天平:感量 0.000 1 g。
- (4)高温炉:可控制温度在 $(550 \pm 20)^{\circ}\text{C}$ 。
- (5)坩埚:瓷质。
- (6)容量瓶:100 mL。
- (7)滴定管:酸式,25 或 50 mL。
- (8)玻璃漏斗:6 cm 直径。
- (9)定量滤纸:中速,7~9 cm。
- (10)移液管:10,20 mL。
- (11)烧杯:200 mL。
- (12)凯氏烧瓶:250 或 500 mL。

#### 7.1.1.4 试剂及配制

- (1)盐酸溶液:1 : 3(V : V)。
- (2)硫酸溶液:1 : 3(V : V)。
- (3)氨水溶液:1 : 1(V : V)。
- (4) $42\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 草酸铵溶液:溶解 42 g 分析纯草酸铵(HG 3-976)于水中,稀释至 1 000 mL。
- (5)甲基红指示剂:0.1 g 分析纯甲基红(HG 3-958)溶于 100 mL 的 95%乙醇中。
- (6)浓硝酸。
- (7)氨水溶液:1 : 50(V : V)。
- (8)高锰酸钾标准溶液: $c(1/5\text{KMnO}_4)=0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

称取高锰酸钾(GB 643)约 1.6 g 溶于 800 mL 水中,煮沸 10 min,再用水稀释至 1 000 mL,冷却静置 1~2 d,用烧结玻璃滤器过滤,保存于棕色瓶中。标定方法见附录八。

#### 7.1.1.5 试样的选取与制备

取具有代表性试样用四分法缩减至 200 g,粉碎至 40 目,装入密封容器中,防止试样成分的变化或变质。

#### 7.1.1.6 测定步骤

##### (1)试样分解。

①干法:称取试样 2~5 g 于坩埚中,准确至 0.000 2 g,在电炉上低温炭化至无烟为止。再将其放入高温炉于 $(550 \pm 20)^{\circ}\text{C}$ 下灼烧 3 h。在盛有灰分的坩埚中加入 1 : 3 盐酸溶液 10 mL 和浓硝酸数滴,小心煮沸。将此溶液转入 100 mL 容量瓶中,并以热蒸馏水洗涤坩埚及漏斗中滤纸,冷却至室温后,定容,摇匀,为

试样分解液。

②湿法(用于无机物或液体饲料):称取试样 2~5 g 于凯氏烧瓶中,准确至 0.000 2 g。加入硝酸(GB 626,化学纯)10 mL,加热煮沸,至二氧化氮黄烟逸尽,冷却后加入 70%~72%高氯酸(GB 623,分析纯)10 mL,小心煮沸至无色,不得蒸干(危险!)。冷却后加水 50 mL,并煮沸驱逐二氧化氮,冷却后转入 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,为试样分解液。

(2)试样的测定。

①草酸钙的沉淀及其洗涤:用移液管准确吸取试样液 10~20 mL(含钙量为 20 mg 左右)于烧杯中,加水 100 mL,甲基红指示剂 2 滴,滴加 1:1 氨水溶液至溶液由红变橙黄色,再滴加 1:3 盐酸溶液至溶液又呈红色(pH=2.5~3.0)为止。小心煮沸,慢慢滴加草酸铵溶液 10 mL,且不断搅拌。若溶液由红变橙色,应补滴 1:3 盐酸溶液至红色,煮沸数分钟后,放置过夜使沉淀陈化(或在水浴上加热 2 h)。

用滤纸过滤,用 1:50 的氨水溶液洗沉淀 6~8 次,至无草酸根离子为止(用试管接取滤液 2~3 mL,加 1:3 硫酸溶液数滴,加热至 80 ℃,加高锰酸钾溶液 1 滴,溶液呈微红色,且 30 s 不退色)。

②沉淀的溶解与滴定:将沉淀和滤纸转移入原烧杯中,加 1:3 硫酸溶液 10 mL,蒸馏水 50 mL,加热至 75~85 ℃,立即用 0.05 mol·L<sup>-1</sup>高锰酸钾标准溶液滴定至溶液呈微红色,且 30 s 不退色为止。

③空白:在干净烧杯中加滤纸 1 张,1:3 硫酸溶液 10 mL,蒸馏水 50 mL,加热至 75~85 ℃后,用高锰酸钾标准溶液滴至微红色且 30 s 不退色即可。

#### 7.1.1.7 测定结果的计算

(1)试样中钙的质量分数按公式 7-1 计算。

$$w(\text{Ca}) = \frac{(V_3 - V_0) \times c \times 0.02}{m} \times \frac{V_1}{V_2} \quad 7-1$$

式中: $m$  为试样质量,g; $V_1$  为样品灰化液定容体积,mL; $V_2$  为测定钙时样品溶液移取用量,mL; $V_3$  为滴定时消耗高锰酸钾标准溶液体积,mL; $V_0$  为滴定空白液高锰酸钾标准溶液用量,mL; $c$  为高锰酸钾标准溶液浓度,mol·L<sup>-1</sup>;0.02 为与 1.00 mL 高锰酸钾标准溶液 [ $c(1/5\text{KMnO}_4) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的钙的质量。

(2)重复性。每个试样应取两个平行样进行测定,以其算术平均值为分析结果。

钙含量在 5% 以上,允许相对偏差 3%;

钙含量在 5%~1% 时,允许相对偏差 5%;

钙含量在 1% 以下,允许相对偏差 10%。

#### 7.1.1.8 注意事项

(1)高锰酸钾溶液浓度不稳定,至少每月需要标定 1 次。

(2)每种滤纸空白值不同,消耗高锰酸钾标准溶液的用量不同,至少每盒滤纸做一次空白测定。

(3)洗涤草酸钙沉淀时,必须沿滤纸边缘向下洗,使沉淀集中于滤纸中心,以免损失。每次洗涤过滤时,都必须等上次洗涤液完全滤净后再加,每次洗涤不得超过漏斗体积的 2/3。

## 附 7.1 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)络合滴定快速测钙法

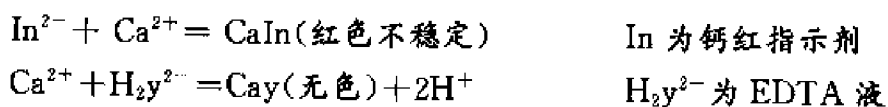
### 一、适用范围

适用于配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和单一饲料中钙的快速测定。

### 二、测定原理

将试样中有机物破坏,使钙溶解制备成溶液,用三乙醇胺、乙二胺、盐酸羟胺和淀粉溶液消除干扰离子的影响,在碱性溶液中,以钙黄绿素为指示剂,用 EDTA 标准溶液络合滴定钙,可快速测定钙的含量。

反应方程式可简写如下:



### 三、试剂及配制

(1)200 g·L<sup>-1</sup>氢氧化钾溶液。

(2)三乙醇胺溶液:1:1 水溶液(V:V)。

(3)乙二胺溶液:1:1 水溶液(V:V)。

(4)钙红指示剂:0.1 g 钙黄绿素与 0.13 g 甲基百里香酚蓝,5 g 氯化钾研细混匀,贮存于磨口瓶中。

(5)盐酸羟胺(分析纯)。

(6)1 g·L<sup>-1</sup>孔雀绿指示剂:0.1 g 指示剂溶于 100 mL 蒸馏水。

(7)  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  淀粉溶液:称取  $1 \text{ g}$  可溶性淀粉于  $200 \text{ mL}$  烧杯中加  $5 \text{ mL}$  水浸湿,加  $95 \text{ mL}$  沸水搅匀,煮沸,冷却备用(现配现用)。

(8)  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 标准溶液。

① 配制:精确称取分析纯乙二胺乙酸二钠盐  $3.7 \text{ g}$  溶于水,稀释成  $1000 \text{ mL}$ ,摇匀备用。

② 标定:含钙  $1 \text{ mg}$  的标准液  $10 \text{ mL}$  按样品测定法进行。

③ 计算:EDTA 对钙的滴定度可按公式 7-2 计算。

$$T = \frac{\rho \times V}{V_0} \quad 7-2$$

式中: $T$  为 EDTA 标准滴定溶液对钙的滴定度,  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V_0$  为 EDTA 标准溶液用量,  $\text{mL}$ ;  $V$  为所取钙标准溶液的体积,  $\text{mL}$ ;  $\rho$  为钙标准溶液的浓度,  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 四、仪器设备

同高锰酸钾法。

#### 五、测定步骤

(一) 试样分解

同高锰酸钾法。

(二) 测定

准确移取吸取试样分解液  $5 \sim 25 \text{ mL}$  (含钙量  $2 \sim 25 \text{ mg}$ ) 于  $150 \text{ mL}$  三角瓶中,蒸馏水  $50 \text{ mL}$ ,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  淀粉溶液  $10 \text{ mL}$ ,三乙醇胺溶液  $2 \text{ mL}$ ,乙二胺溶液  $1 \text{ mL}$ ,每加完一种试剂要充分摇匀,然后加孔雀石绿指示剂  $1$  滴,摇匀,滴加  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钾溶液至无色,再加氢氧化钾溶液  $2 \text{ mL}$ ,加入  $0.1 \text{ g}$  盐酸羟胺,摇匀溶解后,加钙黄指示剂少许,使颜色呈墨绿色,在黑色背景下,立即用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 标准溶液滴定至绿色荧光消失,呈紫红色为滴定终点。同时做试剂空白试验。

#### 六、测定结果的计算

(一) 计算公式

$$w(\text{Ca}) = \frac{T \times (V - V_2)}{m \times V_1 / V_0} = \frac{T \times V_2 \times V_0}{m \times V_1} \quad 7-3$$

式中:  $T$  为 EDTA 标准溶液对钙的滴定度,  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V_0$  为试样分解液总体积,  $\text{mL}$ ;  $V_1$  为分取试样分解液的体积,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为实际消耗的 EDTA 标准滴定溶液的体积,  $\text{mL}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ 。

所得结果应表示至两位小数。

#### (二) 重复性

同高锰酸钾法。

### 7.1.2 饲料中总磷量的测定(钼黄比色法)

#### 7.1.2.1 适用范围

本方法适用于配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和单一饲料中总磷量的测定。测定范围磷含量  $0 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 7.1.2.2 测定原理

将试样中有机物破坏,使磷游离出来,在酸性溶液中,钒钼酸铵处理,生成黄色的  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot \text{NH}_4\text{VO}_3 \cdot 16\text{MoO}_3$  (磷-钒-钼酸复合体),在波长  $420 \text{ nm}$  下进行比色测定。

此法测得结果为总磷量,其中包括动物难以吸收利用的植酸磷。

#### 7.1.2.3 仪器和设备

- (1) 实验室用样品粉碎机或研钵。
- (2) 分析筛:孔径  $0.45 \text{ mm}$  (40 目)。
- (3) 分析天平:感量  $0.0001 \text{ g}$ 。
- (4) 分光光度计,有  $10 \text{ mm}$  比色池,可在  $420 \text{ nm}$  下进行比色测定。
- (5) 高温炉:可控炉温度在  $(550 \pm 20)^\circ\text{C}$ 。
- (6) 坩埚:瓷质。
- (7) 容量瓶:50, 100, 1 000  $\text{mL}$ 。
- (8) 刻度移液管:1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10  $\text{mL}$ 。
- (9) 凯氏烧瓶:250 或 500  $\text{mL}$ 。
- (10) 可调温电炉:1 000  $\text{W}$ 。

#### 7.1.2.4 试剂及配制

- (1) 盐酸(GB 622,化学纯)溶液。1:1 水溶液( $V:V$ )。
- (2) 浓硝酸(GB 626)化学纯。
- (3) 钒钼酸铵显色试剂:称取偏钒酸铵(HG 3-941,分析纯)1.25  $\text{g}$ ,加硝酸 250  $\text{mL}$ ;另取钼酸铵(GB 657,分析纯)25  $\text{g}$ ,加蒸馏水 400  $\text{mL}$  溶解,在冷却条件

下将此溶液倒入上溶液,且加蒸馏水调至 1 000 mL,避光保存。如生成沉淀则不能使用。

(4)磷标准溶液:将磷酸二氢钾在 105 ℃干燥 1 h,在干燥器中冷却后称 0.219 5 g,溶解于蒸馏水中,定量转入 1 000 mL 容量瓶中,加硝酸 3 mL,用蒸馏水稀释到刻度,摇匀,即成  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的磷标准溶液。

#### 7.1.2.5 试样的选取和制备

取有代表性试样用四分法缩减至 200 g,粉碎至 40 目,装入密封容器中,防止试样成分的变化或变质。

#### 7.1.2.6 测定步骤

##### (1)试样的分解。

①干法:称取试样 2~5 g 于坩埚中(准确至 0.000 2 g),在电炉上低温炭化至无烟为止,再将其放入高温炉于  $(550 \pm 20)^\circ\text{C}$  下灼烧 3 h(或测灰分后继续进行),取出冷却,在坩埚中加入 1:1 盐酸溶液 10 mL 和浓硝酸数滴,小心煮沸约 10 min。将此溶液转入 100 mL 容量瓶中,并用热蒸馏水洗涤坩埚及漏斗中滤纸,冷却至室温后,定容,摇匀,为试样分解液。

②湿法:称取试样 2~5 g 于凯氏烧瓶中(准确至 0.000 2 g)。加入硝酸(GB 626,化学纯)30 mL,小心加热煮沸,至二氧化氮黄烟逸尽,冷却后加入 70%~72% 高氯酸(GB 623,分析纯)10 mL,继续加热煮沸至溶液无色,不得蒸干(危险!)。冷却后加蒸馏水 50 mL,并煮沸驱逐二氧化氮,冷却后转入 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,为试样分解液。

(2)标准曲线的绘制。准确移取磷标准溶液( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )0,1.0,2.0,5.0,10.0,15.0 mL 于 50 mL 容量瓶中,各加入钒钼酸铵显色试剂 10 mL,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,放置 10 min 以上。以 0 mL 溶液为参比,用 10 mm 比色池,在 420 nm 波长下,用分光光度计测定各溶液的吸光度。以磷含量为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

(3)试样的测定。准确移取试样分解液 1~10 mL(含磷量 50~750  $\mu\text{g}$ )于 50 mL 容量瓶中,加入钒钼酸铵显色试剂 10 mL,按[7.1.2.6(2)]的方法显色和比色测定,以空白为参比,测得试样分解液的吸光度。用标准曲线查得试样分解液的含磷量。

#### 7.1.2.7 测定结果计算

(1)计算公式。样品中总磷质量分数按式 7-4 计算。

$$w(\text{P}) = \frac{a \times \frac{V}{V_1}}{m}$$

式中:  $m$  为试样质量;  $V$  为试样分解液总体积;  $V_1$  为比色测定时所移取试样分解液体积;  $a$  为由标准曲线查得试样分解液含磷量。

所得结果应精确到两位小数。

(2) 重复性。每个试样称取两个平行样进行测定, 以其算术平均值为结果。

含磷量在 0.5% 以上(含 0.5%), 允许相对偏差 3%;

含磷量在 0.5% 以下, 允许相对偏差 10%。

#### 7.1.2.8 注意事项

(1) 比色时, 待测液磷含量不宜过浓, 最好控制在 1 mL 含磷 0.5 mg 以下。

(2) 待测液在加入试液后应静置 10 min, 再进行比色, 但不能静置过久。

## 附 7.2 饲料中植酸磷的测定(TCA 法)

### 一、测定原理

用  $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三氯乙酸作浸提液提取植酸盐, 其原理是加入铁盐使植酸盐生成植酸铁沉淀, 用氢氧化钠转化为可溶性植酸钠和棕色氢氧化铁沉淀, 用钼黄法直接测出植酸磷含量。

### 二、仪器和设备

- (1) 实验室用样品粉碎机或研钵。
- (2) 分析筛: 孔径 0.45 mm(40 目)。
- (3) 分析天平: 感量 0.000 1 g。
- (4) 分光光度计: 有 10 mm 比色池, 可在 420 nm 下进行比色测定。
- (5) 容量瓶: 50, 100 mL。
- (6) 移液管: 10, 50 mL。
- (7) 吸量管: 5, 10 mL。
- (8) 卧式振荡机。
- (9) 凯氏烧瓶: 100 mL。
- (10) 具塞三角瓶: 200 mL。
- (11) 离心机。

### 三、试剂及配制

- (1)  $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三氯乙酸溶液: 称取 3 g 三氯乙酸(分析纯), 加水溶解至 100



mL,混匀。

(2)三氯化铁溶液:1 mL=2 mg 铁。

称取三氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )0.97 g,用  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的三氯乙酸溶液溶解至 100 mL,混匀。

(3) $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液,称取氢氧化钠(分析纯)60 g,加水溶解至 1 000 mL,混匀。

(4)浓硝酸(分析纯):比重 1.4,煮沸赶去游离二氧化氮( $\text{NO}_2$ ),使其成为无色。

(5)硝酸溶液 1:1(V:V);硝酸溶液 1:3(V:V)。均用上述浓硝酸配制。

(6)混合酸[硝酸:高氯酸=2:1(V:V)],按比例配制。

(7)显色剂。

① $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  钼酸铵溶液:称取分析纯钼酸铵 10 g,加入少量水,加热至  $50 \sim 60^\circ\text{C}$ ,使溶解冷却,再用水稀释至 100 mL,混匀。

② $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  偏钼酸铵溶液:称取分析纯偏钼酸铵 0.3 g,溶于 50 mL 水中,再加 1:3(V:V)硝酸溶液 50 mL 溶解,混匀。

用时将溶液(1)徐徐倒入溶液(2)中,应边加边搅拌,然后再加入已赶尽二氧化氮的浓硝酸 18 mL,混匀。

(8)标准磷溶液。1 mL 相当于  $100 \mu\text{g}$  磷。

精确称取  $105 \sim 110^\circ\text{C}$  烘干 1~2 h 的优级纯磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )0.434 9 g,用水溶解后移入 1 000 mL 容量瓶中,并用水稀释至刻度,摇匀。

#### 四、试样选取与制备

同饲料中总磷量测定方法。

#### 五、测定方法

(1)磷标准曲线的绘制。准确吸取  $1 \text{ mL}=100 \mu\text{g}$  磷的标准溶液 0,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0 mL,分别盛入 50 mL 容量瓶中,用水稀释至 70 mL 左右,各加 1:1 硝酸溶液(V:V)4 mL,显色剂 10 mL,再用水稀释至刻度,混匀。此时系列浓度为每 50 mL 中分别含磷的毫克数为:0,0.05,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mg,静置 20 min,在分光光度计上在波长 420 nm 处,用 10 mm 比色池,进行测定其吸光度。最后,以所加标准磷溶液的含磷量为横坐标,用相应的吸光度为纵坐标,绘制出磷的标准曲线。

(2)试样的测定。

①称取饲料样本 3~6 g(含植酸磷在 5~30 mg 范围内)于干燥的 200 mL

具塞三角瓶中,准确加入  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三氯乙酸溶液 50 mL,机械振荡浸提 30 min,离心(或用于漏斗、干滤纸、干烧杯进行过滤)。准确吸取上层清液 10 mL 于 40 mL 离心管中,迅速加入 ( $1 \text{ mL} = 2 \text{ mg Fe}^{2+}$ ) 三氯化铁溶液 4 mL,置于沸水浴中加热 45 min,冷却后离心 10 min,除去上层清液,加入  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三氯乙酸溶液 20~25 mL,进行洗涤(沉淀必须搅散),水浴加热煮沸 10 min,冷却后离心 10 min,除去上层清液,如此重复 2 次,再用水洗涤 1 次,洗涤后的沉淀加入 3~5 mL 水及  $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 3 mL,摇匀,用水稀释至 30 mL 左右,置沸水中煮沸 30 min,趁热用中速滤纸过滤,滤液用 100 mL 容量瓶盛接,再用热水 60~70 mL,分数次洗涤沉淀。

②滤液经冷却至室温后,稀释至刻度,准确吸取 5~10 mL 滤液(含植酸磷 0.1~0.4 mg)于 100 mL 凯氏烧瓶中,加入硝酸和高氯酸混合酸 3 mL,于电炉上低温消化至冒白烟,使余 0.5 mL 左右溶液为止(切忌蒸干),冷却后用 30 mL 水,分数次洗入 50 mL 容量瓶中,加入 1:1 硝酸溶液(V:V)3 mL,显色剂 10 mL,用水稀释至刻度,混匀,静置 20 min 后,在分光光度计上在波长 420 nm 处测定吸光值。查对磷标准曲线,并计算植酸磷的含量。

## 六、测定结果计算

试样中植酸磷质量分数按公式 7-5 计算。

$$w(\text{植酸磷}) = \frac{a \times \frac{V}{V_1} \times 10^{-6}}{m} \quad 7-5$$

式中: $a$  为由磷标准曲线查得的含磷量  $\mu\text{g}$  数(此数是比色时 50 mL 容量瓶中所含磷的  $\mu\text{g}$  数); $V$  为试样分解液总体积, mL; $V_1$  为比色用吸取的试样消化液体积, mL; $m$  为试样质量, g。

## 七、注意事项

(1)试样粉碎粒度要求不小于 40 目。颗粒太粗造成试样浸提不完全,使分析结果波动太大,重现性差。

(2)在离心法洗涤植酸铁沉淀过程中,注意不要损失铁沉淀物。

(3)显色时的硝酸酸度要求在 5%~8%(V:V)。

(4)显色时温度不能低于 15℃,否则显色缓慢。

## 附 7.3 出口骨肉粉中磷的测定方法

### 一、测定原理

样品经消化后,在酸性条件下,磷与喹钼柠酮生成磷钼酸喹啉沉淀。沉淀物经过滤、洗涤、烘干、称重,求出磷的量。

### 二、仪器设备

- (1)4 号玻璃砂芯坩埚。
- (2)凯氏烧瓶,500 mL。
- (3)烘箱。

### 三、试剂及配制

- (1)盐酸:分析纯。
- (2)硝酸:分析纯。
- (3)钼酸钠:分析纯。
- (4)柠檬酸:分析纯。
- (5)喹啉:分析纯。
- (6)丙酮:分析纯。
- (7)无水硫酸钠:分析纯。
- (8)无水硫酸铜:分析纯。
- (9)硫酸:分析纯。
- (10)喹钼柠酮试剂。

- ①溶解 70 g 钼酸钠于 150 mL 水中;
- ②溶解 60 g 柠檬酸于 85 mL 硝酸和 150 mL 水的混合溶液中,冷却;
- ③在不断搅拌下缓慢将溶液“(1)”加入到溶液“(2)”中;
- ④溶解 5 mg 喹啉于 35 mL 硝酸和 100 mL 水混合液中;
- ⑤缓慢地将溶液“(4)”加入到溶液“(3)”中混合后,放置 24 h,将此溶液过滤,于滤液中加入 280 mL 丙酮,用水稀释至 1 000 mL,混匀,贮存于聚乙烯瓶中。

### 四、测定步骤

- (1)试样处理。称取 0.500 g 试样于 500 mL 凯氏烧瓶中,加入 10 g 无水硫酸钠、0.5 g 无水硫酸铜和 5 mL 硫酸,开始小火加热,经 10 min 后持续加大火

力进行消化,直至试样溶液变成透明无黑炭粒为止。用水将凯氏烧瓶中内容物移入 500 mL 容量瓶中,加水至刻度,混匀。

(2)测定。吸取消化液 25,50 mL 于 400 mL 烧杯中,加入 10 mL 硝酸溶液 (1:1) (V:V),用水稀释至 100 mL,加入 50 mL 喹钼柠酮,盖上表面皿,小火加热煮沸,微沸 1 min,冷却至室温时转动烧杯 3~4 次。然后用预先干燥恒重的 4 号玻璃砂芯坩埚抽滤。先倾去上层清液,然后用倾泻法以水洗涤沉淀物 1~2 次。将沉淀物全部移入坩埚中,再用水洗 4~5 次。将坩埚连同沉淀物放入 180 ℃ 烘箱内烘 45 min,取出,把坩埚移入干燥器中冷却,称至恒重。同时作一试剂空白,步骤同样品测定,磷的含量按五氧化二磷计算。

## 五、结果计算

试样中五氧化二磷质量分数按公式 7-6 计算。

$$w(\text{P}_2\text{O}_5) = \frac{(m_1 - m_2) \times 0.03207}{m \times \frac{V}{500}} \quad 7-6$$

式中: $m_1$  为沉淀物和砂芯坩埚的质量,g; $m_2$  为试剂空白砂芯坩埚的质量,g; $V$  为吸取试样液的体积,mL; $m$  为试样质量,g;0.03207 为磷钼酸喹啉换算为五氧化二磷系数。

### 7.1.3 饲料中水溶性氯化物的测定

#### 7.1.3.1 适用范围

本方法适用于各种配合饲料、浓缩饲料和单一饲料中水溶性氯化物的测定。

#### 7.1.3.2 测定原理

溶液澄清,在酸性条件下,加入过量硝酸银溶液使样品溶液中的氯化物形成氯化银沉淀,用硫氰酸铵溶液回滴过量的硝酸银,根据消耗的硫氰酸铵溶液的量,计算出试样中氯化物的含量。

#### 7.1.3.3 仪器和设备

- (1)实验室用样品粉碎机或研钵。
- (2)分样筛:孔径 0.45 mm (40 目)。
- (3)分析天平:感量 0.000 1 g。
- (4)刻度移液管:2,10 mL。
- (5)滴定管:酸式,25 mL。
- (6)容量瓶:100,1 000 mL。

(7)滤纸:快速,直径 12.5 cm。

#### 7.1.3.4 试剂及配制

(1)硝酸(GB 626)。化学纯。

(2)氯化钠标准储备溶液。基准级氯化钠(GB 1253),于 500 ℃灼烧 1 h,干燥器中冷却保存。称取 5.845 4 g 溶解于水中,转入 1 000 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。此氯化钠标准储备液的浓度为  $0.100\ 0\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(3)氯化钠标准工作液。准确吸取氯化钠标准储备溶液 20.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。此氯化钠标准溶液的浓度为  $0.020\ 0\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(4) $60\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铁溶液:称取分析纯硫酸铁( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) 60 g,加水微热溶解后,调成 1 000 mL。

(5)硫酸铁指示剂。 $250\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铁的水溶液,过滤除去不溶物,与等体积的浓硝酸混合均匀。

(6)氨水(GB 631,化学纯)溶液。1:19(V:V)。

(7)硫氰酸铵  $c(\text{NH}_4\text{CNS})=0.02\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。称取分析纯硫氰酸铵 1.52 g 溶于 1 000 mL 水中。

(8)硝酸银标准溶液  $c(\text{AgNO}_3)=0.02\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。称取分析纯硝酸银 3.4 g 溶于 1 000 mL 水中,贮于棕色瓶中。标定方法见附录八。

(9)体积比。吸取硝酸银溶液 20.00 mL,加硝酸 4 mL,指示剂 2 mL,在剧烈摇动下用硫氰酸铵溶液滴定,滴至终点为持久的淡红色。由此计算两溶液体积比  $F$ 。

$$F = \frac{20.00}{V_2} \quad 7-7$$

式中: $F$  为硝酸银与硫氰酸铵溶液的体积比;20.00 为硝酸银溶液的体积, mL;  
 $V_2$  为硫氰酸铵溶液的体积, mL。

#### 7.1.3.5 试样的选取和制备

选取有代表性的试样,用四分法缩减至 200 g,粉碎至 40 目,密封保存,以防试样组分的变化或变质。

#### 7.1.3.6 测定步骤

(1)氯化物的提取。称取试样适量(氯含量在 0.8%以内,称取试样 5 g 左右;氯含量在 0.8%~1.6%,称取试样 3 g 左右;氯含量在 1.6%以上,称取试样 1 g 左右),准确至 0.000 2 g,准确加入硫酸铁溶液 50 mL,氨水溶液 100 mL,搅拌

数分钟,放置 10 min,用干的快速滤纸过滤。

(2)滴定。准确移取含氯化物的滤液 50 mL,于 100 mL 容量瓶中,加浓硝酸 10 mL,硝酸银标准溶液 25.00 mL,用力振荡使沉淀凝结,用水稀释至刻度,摇匀静置 5 min,干过滤于 150 mL 干锥形瓶中或静置(过夜)沉化。吸取滤液(澄清液)50.00 mL,加硫酸铁指示剂 10 mL,用硫氰酸铵溶液滴定,出现淡橘红色,且 30 s 不退色即为终点。

#### 7.1.3.7 测定结果计算

(1)计算公式。

$$w(\text{Cl}^-) = \frac{(V_1 - V_2 \times F \times 100/50) \times c \times 150 \times 0.0355}{m \times 50} \quad 7-8$$

$$\text{或 } w(\text{NaCl}) = \frac{(V_1 - V_2 \times F \times 100/50) \times c \times 150 \times 0.05845}{m \times 50} \quad 7-9$$

式中: $m$  为试样的质量, g;  $V_1$  为硝酸银溶液体积, mL;  $V_2$  为滴定时硫氰酸铵溶液消耗体积, mL;  $F$  为硝酸银和硫氰酸铵溶液的体积比;  $c$  为硝酸银标准溶液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 0.035 5 为与 1.00 mL 硝酸银标准溶液 [ $c(\text{AgNO}_3) = 1.0000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的氯元素的质量; 0.058 45 为与 1.00 mL 硝酸银标准溶液 [ $c(\text{AgNO}_3) = 1.0000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当于以克表示的氯化钠的质量。

所得结果应表示两位小数。

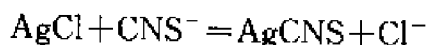
(2)重复性。每个试样取两个平行样进行测定,以其算术平均值为分析结果。

氯化钠含量在 3% 以下(含 3%),允许绝对值差 0.05;氯化钠含量在 3% 以上,允许相对偏差为 3%。

注:本法测定中是根据氯离子( $\text{Cl}^-$ )来计算氯化钠含量的,但由于配合饲料或单一饲料(如鱼粉或合成赖氨酸或盐酸硫胺素等)中,都带入氯离子,所以此估测值仅作参考值用。

#### 7.1.3.8 注意事项

(1)在标定硝酸银溶液时,或滴定试样滤液时,速度应快,且又不要过分剧烈摇动,以防下列反应发生:



这样会因氯化银沉淀转化成硫氰酸银沉淀,消耗的硫氰酸铵溶液增加,而使结果偏低。

(2)水溶性氯化物快速测定法。称取试样 5~10 g,准确至 0.001 g,准确加蒸

馏水 200 mL, 搅拌 15 min, 放置 15 min, 准确移取上清液 200 mL, 加蒸馏水 50 mL,  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  铬酸钾指示剂 1 mL, 用硝酸银溶液滴定, 呈现砖红色, 且 1 min 不退色为终点。

计算见公式 7-10:

$$w(\text{NaCl}) = \frac{V_2 \times c \times 200 \times 0.05845}{m \times 20} \quad 7-10$$

式中符号同计算公式 7-9。

## 7.2 微量元素的检测与分析

### 7.2.1 预混料中微量元素的定性检测

本节的目的在于定性检测饲料用微量元素预混料中所含微量元素的种类。

#### 7.2.1.1 样品的制备

用于定性检测的饲料微量元素预混料样品, 可按常规分析要求进行采集和制备, 由于已经制成预混料, 故一般可直接采样, 并按规定要求进行定性检测。

#### 7.2.1.2 试剂与溶液

(1) 铜离子检测用试剂。

①  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸二钠(GB 1401)溶液。

②  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠(GB 629)溶液。

③ 乙酸乙酯(GB 12589)。

④ 铜试剂(二乙基二硫代氨基甲酸钠, GB 10727): 称取铜试剂 5 g, 溶于 100 mL 92% 的乙醇中即可。

(2) 铁离子检测用试剂。

①  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液。

② 氯化亚锡(GB 638)溶液: 称取 1.5 g 氯化亚锡, 加入少量盐酸使之溶解, 再加蒸馏水至 100 mL 即可。

③ 2, 2'-联吡啶乙醇溶液: 称取 2, 2'-联吡啶 2 g, 加入 100 mL 乙醇中溶解即可。

④ 氯仿。

(3) 锌离子检测用试剂。

①  $60 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  冰乙酸溶液(GB 676): 6 mL 乙酸于 100 mL 水中。

②  $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠 (GB 637) 溶液: 25 g 的硫代硫酸钠溶解于 100 mL 水中。

③  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  二硫脲四氯化碳溶液。

④ 氯仿。

(4) 钴离子检测用试剂。

① 乙酸钠-乙酸缓冲溶液: 称取 2.7 g 乙酸钠 (GB 693), 加入 60 mL 冰乙酸, 溶于 100 mL 蒸馏水中。

② 钴试剂 {4-[(5-氯-2-吡啶)偶氮]-1, 3-二氨基苯}: 称取钴试剂 0.1 g, 溶于 100 mL 95% 的乙醇中, 置于棕色试剂瓶中保存。

③ 浓盐酸 (GB 622)。

(5) 锰离子检测用试剂。

① 浓硝酸 (GB 626)。

② 铋酸钠 (GB 635)。

(6) 亚硒酸根检测用试剂。

①  $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  甲酸 (HG 3-1296) 溶液。

②  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸 (GB 622) 溶液。

③  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硒试剂 (盐酸-3, 3-二氨基联苯胺), 须现配现用。

④  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸二钠 (GB 1401) 溶液。

(7) 碘离子检测用试剂。

①  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  可溶性淀粉溶液。

②  $400 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  氨水溶液。

③ 氯仿。

#### 7.2.1.3 检测方法

称取微量元素预混料 50 g, 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入去离子水 100 mL 使之溶解, 加塞放置过夜, 然后过滤并收集滤液备用。

(1) 铜离子的检测。吸取滤液 2 mL 置于试管中, 加入  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$  溶液 5 滴,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液 5 滴, 再加入铜试剂溶液 1 mL 和乙酸乙酯 1 mL, 振摇混合后, 若有机层显黄棕色, 表示有  $\text{Cu}^{2+}$  存在。

(2) 铁离子的检测。吸取滤液 1 mL 置于试管中, 加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液 1 mL, 酸性氯化亚锡溶液 3 滴, 再加入  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的联吡啶乙醇溶液 10 滴, 放置 5 min 后, 加入 1 mL 氯仿, 振摇混合后, 若水层显淡红色, 表示有  $\text{Fe}^{2+}$  存在。

(3) 锌离子的检测。吸取滤液 1 mL 置于试管中, 加入  $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的乙酸溶



液,将 pH 值调节至 4~5,再加入  $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫代硫酸钠溶液 2 滴、 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的二硫脲四氯化碳溶液数滴和氯仿 1 mL,振摇混合后,若有机层显紫红色,表示有  $\text{Zn}^{2+}$  存在。

(4) 钴离子的检测。吸取滤液 2 mL 置于试管中,加入乙酸钠-乙酸缓冲溶液 2 mL,再加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  钴试剂 3 滴和浓盐酸 3 滴,若显现红色,表示有  $\text{Co}^{2+}$  存在。

(5) 锰离子的检测。吸取滤液 3 滴,置于点滴板上,加入浓硝酸 2 滴,再加入少量铈酸钠粉末,若产生紫红色,表示有  $\text{Mn}^{2+}$  存在。

(6) 亚硒酸根的检测。吸取滤液 2 mL 置于试管中,加入  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$  溶液 5 滴和 10% 的甲酸溶液 5 滴,然后用  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液调节 pH 至 2~3,再加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的硒试剂溶液 5 滴,混匀后放置 10~20 min,若有沉淀产生,取 2 滴置于载玻片上,于显微镜下观察,可见灰紫色透明棒状结晶,表示有  $\text{SeO}_3^{2-}$  存在。

(7) 碘离子的检测。吸取滤液 2 mL 置于试管中,加入少量氨试液,碘离子即游离出来。若加入 1 mL 氯仿,振摇混合后,氯仿层显现紫色;若加入 1 mL  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的可溶性淀粉溶液,试液显现蓝色,则表示有  $\text{I}^-$  存在。

## 附 7.4 矿物质及硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐的点滴试验

### 一、矿物质的点滴试验

动物饲料中所使用的矿物质或无机化合物,有天然的或人工化学合成的两大类,它们在动物体内起着重要的生物学作用,除作为动物骨骼、血液、肌肉和脂肪等组织的重要组成成分外,还调节机体内体液的酸碱度、渗透压及神经肌肉的兴奋性等功能。

(1) 样品的制备。混合饲料中的矿物质一般为粉状物或细小颗粒。筛分样品,并将其颗粒较细的部分倒入盛有氯仿的 100 mL 烧杯中,倒去上浮物,然后将剩下的试样用小勺撒到滤纸上,进行点滴试验。

(2) 钴、铜、铁的点滴试验。

① 试剂。

溶液 A:酒石酸钾钠(GB 1288)溶液,将 100 g 酒石酸钾钠溶解于蒸馏水中,定容至 500 mL 即可。

溶液 B:亚硝基 R-盐溶液,将 1 g 1-亚硝基-2-羟基萘 3,6 二磺酸钠盐溶解于

蒸馏水中,定容至 500 mL 即可。

②试验步骤:用 3~4 滴溶液 A 浸润滤纸,然后将待检试样撒到滤纸上,再加 2~3 滴溶液 B,待滤纸干燥后用显微镜仔细检查。

③阳性反应特征:钴离子存在时,显现粉红色;铜离子存在时,显现淡褐色,并呈环状;铁离子存在时,显现深绿色。

(3)锰(二氧化锰、硫酸锰和碳酸锰)的点滴试验。

①试剂。

溶液 A:  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液;

溶液 B:将 0.07 g 二水合氯化联苯胺溶解于 1 mL 冰乙酸中,混匀后,再用蒸馏水稀释至 100 mL。

②试验步骤:先用溶液 A 浸润滤纸,然后将待检试样撒于滤纸上,静置 1 min;加 2~3 滴溶液 B,若不立即发生反应,则再补加溶液 B,但不要溢出。

③阳性反应特征:二氧化锰存在时,显现深蓝色,并带一黑色中心;硫酸锰存在时,很快显现较大的成蓝色斑点。

(4)碘(碘-碘化钾)点滴试验。

①试剂:淀粉试纸。

溴溶液:将 1 mL 饱和溴水,用蒸馏水稀释至 20 mL。

②试验步骤:用溴溶液浸润淀粉试纸,然后将待检试样撒于淀粉试纸上。

③阳性反应特征:有碘化物存在时,显现蓝紫色。

(5)镁(硫酸镁)点滴试验。

①试剂。

溶液 A:  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钾(GB 2306)溶液;

溶液 B:将 12.7 g 碘(GB 675)和 40 g 碘化钾(GB 1272)溶解于 25 mL 蒸馏水中,混匀后,再加蒸馏水稀释至 100 mL。

②试验步骤:将溶液 A 与过量的溶液 B 混合制成深褐色的混合液,然后取少量混合液,加入 2~3 滴溶液 A 至变成淡黄色为止。用此淡黄色溶液浸润滤纸,再将少量试样撒于滤纸上。

③阳性反应特征:有镁存在时,显现黄褐色斑点。

注意:溶液 A 与溶液 B 的混合液变质很快,须现配现用。

(6)锌的点滴试验。

①试剂。

溶液 A:  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠溶液。

溶液 B:将 0.1 g 二硫腈溶解于 100 mL 四氯化碳中。

②试验步骤:用溶液 A 湿润滤纸,然后将少量试样撒于滤纸上,再加 2~3 滴溶液 B。

③阳性反应特征:有锌存在时,显现木莓红色。

## 二、硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐的点滴试验

(1)硝酸盐点滴试验。

①试剂:二苯胺(GB 681);浓硫酸(GB 625);蒸馏水。

②试验步骤:将试样置于白色滴试板上,加入 2~3 颗二苯胺晶粒和 1 滴蒸馏水,再加 1 滴浓硫酸。

③阳性反应特征:有硝酸盐存在时,显现深蓝色。

(2)磷酸盐点滴试验。

①试剂。

溶液 A:将 5 g 钼酸铵(GB 657)溶解于 100 mL 蒸馏水中,加入 35 mL 浓硝酸。

溶液 B:将 0.05 g 联苯胺(采用碱或其氯化物)溶解于 10 mL 冰乙酸中,再用 100 mL 蒸馏水稀释。

溶液 C:饱和乙酸钠(GB 693)溶液。

②试验步骤:先用溶液 A 湿润滤纸,并于烘箱中烘干,然后加入 1~2 滴待检试样,再分别加入 1 滴溶液 B 和 1 滴溶液 C。

③阳性反应特征:有磷酸盐存在时,显现蓝色斑点或环。

(3)硫酸盐点滴试验。

①试剂:50 g · L<sup>-1</sup>的氯化钡(GB 652)溶液,1:1 的盐酸(GB 622)溶液(V:V)。

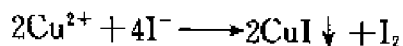
②试验步骤:将试样置于表面玻璃上或培养皿中,然后加入 2~3 滴 1:1 盐酸,再加入 1~2 滴氯化钡溶液。

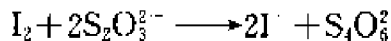
③阳性反应特征:若有硫酸盐存在时,产生白色沉淀物。

### 7.2.2 饲料级矿物质添加剂的测定

#### 7.2.2.1 硫酸铜含量的测定

(1)原理。过量的碘化钾能将二价铜离子还原为一价铜离子,同时还原析出定量的碘,然后用硫代硫酸钠标准溶液滴定所析出的碘,以间接测定铜的含量。其化学反应式如下:





(2)试剂与溶液。

①硫代硫酸钠(GB 637)溶液:约为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫代硫酸钠标准溶液,配制和标定方法见附录八。

②冰乙酸(GB 676)。

③  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  可溶性淀粉(HG 3095)溶液。

④碘化钾(GB 1272)。

(3)测定步骤。准确称取  $0.5 \text{ g}$  试样,精确至  $0.0002 \text{ g}$ ,置于碘量瓶中,加入  $50 \text{ mL}$  蒸馏水使之溶解,再加入  $4 \text{ mL}$  冰乙酸和  $2 \text{ g}$  碘化钾,混匀后,在暗处放置  $10 \text{ min}$ 。然后,用硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色,加入  $2 \text{ mL}$  可溶性淀粉溶液,并继续滴定至蓝色刚刚消失为止,即为反应终点。

(4)结果计算。

①试样中硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )的质量分数按公式 7-11 计算:

$$w(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = \frac{c \cdot V \times 0.2497}{m} \quad 7-11$$

②试样中铜的质量分数按公式 7-12 计算:

$$w(\text{Cu}) = \frac{c \cdot V \times 0.06355}{m} \quad 7-12$$

式中: $c$  为硫代硫酸钠标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为滴定所消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积,  $\text{mL}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ ;  $0.2497$  为  $1 \text{ mmol}$  硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )的质量;  $0.06355$  为  $1 \text{ mmol}$  铜的质量。

#### 7.2.2.2 硫酸锌含量的测定

(1)原理。将硫酸锌溶解于乙酸中,用六次甲基四胺调节溶液的  $\text{pH}$  至  $5 \sim 6$ ,以二甲酚橙为指示剂,用乙二胺四乙酸二钠标准溶液进行滴定,当溶液由紫色变为亮黄色时,即为反应的终点。

(2)试剂与溶液。

①乙酸(GB 676)溶液:  $1:16$  乙酸溶液( $V:V$ ),由 1 份冰乙酸与 16 份蒸馏水混合而成。

②  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  六次甲基四胺(GB 1400)溶液。

③  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  二甲酚橙指示剂溶液。

④乙二胺四乙酸二钠(GB 1401)溶液:浓度约为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA- $2\text{Na}$  标准溶液(标定方法见附录八)。

(3)测定步骤。准确称取 0.3 g 试样,精确至 0.000 2 g,置于 200 mL 三角烧瓶中,加入 3 mL 乙酸使之溶解,再加入 30 mL 水和 2 滴二甲酚橙指示剂。然后滴加 6 次甲基四胺溶液,至反应液呈现稳定的紫红色后,再继续过量加入 5 mL。用乙二胺四乙酸二钠标准溶液滴定,直至溶液由紫红色变为亮黄色时,即为滴定反应的终点。

(4)结果计算。

①试样中七水硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )的质量分数按公式 7-13 计算:

$$w(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = \frac{c \cdot V \times 0.2875}{m} \quad 7-13$$

②试样中一水硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )的质量分数按公式 7-14 计算:

$$w(\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}) = \frac{c \cdot V \times 0.179}{m} \quad 7-14$$

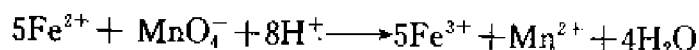
③试样中锌的质量分数按公式 7-15 计算:

$$w(\text{Zn}) = \frac{c \cdot V \times 0.06538}{m} \quad 7-15$$

式中: $c$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为滴定所消耗乙二胺四乙酸二钠标准溶液的体积, mL;  $m$  为试样质量, g; 0.287 5 为 1 mmol 七水硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )的质量; 0.179 为 1 mmol 一水硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )的质量; 0.065 38 为 1 mmol 锌(Zn)的质量。

### 7.2.2.3 硫酸亚铁含量的测定

(1)原理。在酸性介质(硫酸溶液)中,用高锰酸钾滴定硫酸亚铁,其化学反应式如下:



在此反应体系中,反应是迅速而定量地进行的,根据高锰酸钾的消耗量可以计算硫酸亚铁的含量。通常在反应体系中加入磷酸使之与  $\text{Fe}^{3+}$  反应,生成无色络合物来消除  $\text{Fe}^{3+}$  颜色的干扰,以高锰酸钾本身作为指示剂指示滴定反应的终点。

(2)试剂与溶液。

①硫酸(GB 625)。

②磷酸(GB 1282)。

③高锰酸钾(GB 643)溶液: $c(\frac{1}{5}\text{KMnO}_4) = 0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高锰酸钾标准

溶液(标定方法见附录八)。

(3)测定步骤。准确称取 0.5 g 试样,精确至 0.000 2 g,溶于 50 mL 不含氧的蒸馏水中,加入 5 mL 浓硫酸和 2 mL 磷酸,再用高锰酸钾标准溶液进行滴定,直至溶液刚显粉红色且在 30 s 内不退色为止,即为滴定反应的终点。

(4)结果计算。

①试样中硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )的质量分数按公式 7-16 计算:

$$w(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) = \frac{c \cdot V \times 0.278\ 0}{m} \quad 7-16$$

②试样中铁的质量分数按公式 7-17 计算:

$$w(\text{Fe}) = \frac{c \cdot V \times 0.055\ 85}{m} \quad 7-17$$

式中: $c$  为高锰酸钾标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为滴定所消耗高锰酸钾标准溶液的体积, mL;  $m$  为试样质量, g; 0.278 0 为 1 mmol 硫酸亚铁的质量; 0.055 85 为 1 mmol 铁的质量。

#### 7.2.2.4 硫酸锰含量的测定

(1)原理。将硫酸锰溶解于蒸馏水中,以盐酸羟胺为还原剂,防止高价锰的产生;用氨-氯化铵缓冲溶液控制试液 pH 值至 10,以铬黑 T 作为指示剂,用  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$  标准溶液进行滴定,至出现蓝色络合物为止。

因铬黑 T 指示剂易被  $\text{Mn}^{2+}$  氧化而退色,且干扰测定的因素很多,故本法只适用于硫酸锰( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )含量在 98% 以上的纯样品测定。

(2)试剂与溶液。

①盐酸羟胺(GB 6685)。

②氟化铵(GB 1276)。

③氨-氯化铵缓冲溶液:称取氯化铵(GB 658)5.4 g,加入蒸馏水 20 mL 使之溶解,再加入浓氨水(GB 631)35 mL,并用水稀释至 100 mL,此溶液的 pH 值为 10。

④铬黑 T 指示剂:5 g  $\cdot \text{L}^{-1}$  的水溶液。

⑤乙二胺四乙酸二钠(GB 1401)溶液:浓度为 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$  标准溶液(标定方法见附录八)。

(3)测定步骤。准确称取 0.3 g 试样,精确至 0.000 2 g,置于 250 mL 三角烧瓶中,加入 150 mL 蒸馏水使之溶解,再加入 0.5 g 盐酸羟胺,待溶解后,加入 3 g 氟化铵掩蔽剂。加热至 63~65  $^{\circ}\text{C}$ ,立即加入 10 mL 氨-氯化铵缓冲溶液,混匀后,用乙二胺四乙酸二钠标准溶液进行滴定,待接近反应终点时,加入 3~4 滴铬

黑 T 指示剂,继续滴定至反应液由紫红色变为蓝色为止,即为滴定反应的终点。注意滴定时须保持 60 ℃ 的试液温度。

(4)结果计算。

①试样中硫酸锰( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )的质量分数按公式 7-18 计算:

$$w(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}) = \frac{c \cdot V \times 0.1690}{m} \quad 7-18$$

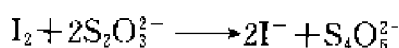
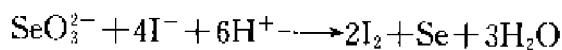
②试样中锰(Mn)的质量分数按公式 7-19 计算:

$$w(\text{Mn}) = \frac{c \cdot V \times 0.05494}{m} \quad 7-19$$

式中: $c$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为滴定所消耗乙二胺四乙酸二钠标准溶液的体积, mL;  $m$  为试样质量, g; 0.169 0 为 1 mmol 硫酸锰( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )的质量; 0.054 94 为 1 mmol 锰(Mn)的质量。

#### 7.2.2.5 亚硒酸钠含量的测定

(1)原理。在酸性条件下,亚硒酸钠与碘化钾发生氧化-还原反应,生成游离的碘,再用硫代硫酸钠将游离碘重新还原为碘离子,此过程以淀粉作为指示剂,根据反应液的颜色变化可以判定反应的终点。其化学反应式如下:



(2)试剂与溶液。

①碘化钾(GB 1272)。

②盐酸(GB 622)。

③ $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 可溶性淀粉(HG 3095)溶液。

④硫代硫酸钠(GB 637)标准溶液:浓度约为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硫代硫酸钠标准溶液(标定方法见附录八)。

⑤二硫化碳(GB 1615)。

(3)测定步骤。准确称取已经 105~110 ℃ 烘干的试样 0.1 g,精确至 0.000 2 g,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 50 mL 蒸馏水使之溶解,再依次加入 1 g 碘化钾、8 mL 二硫化碳和 3 mL 盐酸。混匀后,静置 5 min,然后用硫代硫酸钠标准溶液进行滴定,注意滴定时须用强力振摇混合,待接近反应终点时加入 2 mL 可溶性淀粉溶液,继续滴定至水相中蓝色消失为止(此时二硫化碳层显黄褐色)。并在相同条件下做空白测定。

(4)结果计算。

①试样中亚硒酸钠( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )的质量分数按公式 7-20 计算:

$$w(\text{Na}_2\text{SeO}_3) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \times 0.1729}{4m} \quad 7-20$$

②试样中硒(Se)的质量分数按公式 7-21 计算:

$$w(\text{Se}) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \times 0.07896}{4m} \quad 7-21$$

式中:  $V_1$  为试样测定时所消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积, mL;  $V_2$  为空白测定时所消耗硫代硫酸钠标准溶液的体积, mL;  $c$  为硫代硫酸钠标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为试样的质量, g; 0.1729 为 1 mmol 亚硒酸钠的质量; 0.07896 为 1 mmol 硒的质量。

#### 7.2.2.6 氯化钴含量的测定

(1)原理。在酸性介质中,  $\text{Co}^{2+}$  能与  $\text{SCN}^-$  反应, 生成具有  $[\text{Co}(\text{SCN})_4]^{2-}$  络离子的蓝色络合物。在丙酮存在下, 用乙二胺四乙酸二钠标准溶液滴定,  $\text{Co}^{2+}$  能与乙二胺四乙酸二钠反应生成淡红色络合物, 当到达反应终点时, 蓝色完全消失而变成淡红色。

(2)试剂与溶液。

①盐酸羟胺(GB 6685)。

②硫氰酸铵(GB 660)。

③乙酸铵(GB 1292)饱和溶液。

④丙酮(GB 686)。

⑤乙二胺四乙酸二钠(GB 1401)标准溶液: 浓度约为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA-2Na 标准溶液(标定方法见附录八)。

(3)测定步骤。准确称取 0.3 g 试样, 精确至 0.0002 g, 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 蒸馏水使之溶解, 再依次加入 0.25 g 盐酸羟胺、10 g 硫氰酸铵及 4 mL 的饱和乙酸铵溶液。混匀后, 加入 50 mL 丙酮, 然后用乙二胺四乙酸二钠标准溶液进行滴定, 直至蓝色完全消失为止, 即为滴定反应的终点。

(4)结果计算。

①试样中氯化钴( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )的质量分数按公式 7-22 计算:

$$w(\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}) = \frac{c \times V \times 0.2379}{m} \quad 7-22$$



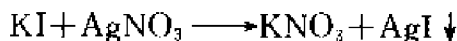
②试样中钴(Co)的质量分数按公式 7-23 计算:

$$w(\text{Co}) = \frac{c \times V \times 0.05893}{m} \quad 7-23$$

式中:  $c$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为滴定所消耗乙二胺四乙酸二钠标准溶液的体积,  $\text{mL}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ ; 0.237 9 为 1 mmol 氯化钴的质量; 0.058 93 为 1 mmol 钴的质量。

#### 7.2.2.7 碘化钾含量的测定

(1)原理。碘化钾能与硝酸银反应,生成淡黄色碘化银沉淀。其化学反应式如下:



(2)试剂与溶液。

①冰乙酸(GB 676)溶液:1:16 的水溶液( $V:V$ ),即由 1 份冰乙酸加 16 份蒸馏水配制而成。

②5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 曙红钠(HG 3-1303)乙醇溶液。

③硝酸银(GB 670)标准溶液:浓度约为 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸银标准溶液(标定方法见附录八)。

(3)测定步骤。准确称取已经 105  $^{\circ}\text{C}$  烘干的试样 0.25  $\text{g}$ ,精确至 0.000 2  $\text{g}$ ,置于 250  $\text{mL}$  锥形瓶中,加入 50  $\text{mL}$  蒸馏水使之溶解,再加入 5  $\text{mL}$  冰乙酸和 3 滴曙红钠溶液,然后在避光条件下用硝酸银标准溶液进行滴定,至反应溶液呈现肉红色为止,即为滴定反应终点。

(4)结果计算。

①试样中碘化钾(KI)的质量分数按公式 7-24 计算:

$$w(\text{KI}) = \frac{c \cdot V \times 0.1660}{m} \quad 7-24$$

②试样中碘(I)的质量分数按公式 7-25 计算:

$$w(\text{I}) = \frac{c \cdot V \times 0.1269}{m} \quad 7-25$$

式中:  $c$  为硝酸银标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为滴定时所消耗硝酸银标准溶液的体积,  $\text{mL}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ ; 0.166 0 为 1 mmol 碘化钾的质量; 0.126 9 为 1 mmol 碘的质量。

### 7.2.3 原子吸收光谱分析法测定饲料中微量元素

#### 7.2.3.1 概述

原子吸收光谱分析法,简称 AAS,是基于光源(空心阴极灯)辐射出具有待测元素特征谱线的光波,当通过试样所产生的原子蒸汽时,被蒸汽中待测元素的基态原子所吸收,根据辐射光强度减弱的程度,即可求出试样中待测元素的含量。即由透射光进入单色器,经过分光后再照射到检测器上,产生直流电信号,经过放大器放大后,就可以从读数器(或记录器)上读出(或记录)吸光度。在一定的实验条件下,试样的吸光度与其中待测元素的含量之间服从朗伯-比尔定律。因此,只需测定试样溶液的吸光度和相应标准溶液的吸光度,即可根据标准溶液的浓度计算出试样中待测元素的含量。这就是原子吸收光谱分析法定量测定的基本原理。

#### 7.2.3.2 仪器的组成及其主要作用

原子吸收光谱分析仪主要由光源、原子化系统、分光系统、测光系统、数据处理系统和显示系统五大部分组成(图 7.1)。

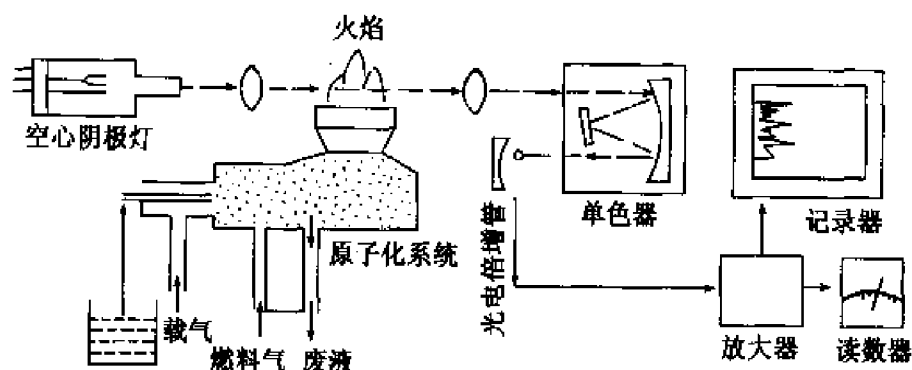


图 7.1 原子吸收光谱分析仪的组成示意图

(1)光源。包括元素灯(空心阴极灯)和灯电源两个部分,其作用是给仪器的光学系统提供一个输出稳定、发射强度大、具有特定波长和谱线宽度窄的锐线光谱。

(2)原子化系统。使待测试样在仪器中变为基态原子的装置,其作用是保证空心阴极灯发射的待测元素特征谱线,能被试样中相应元素的基态原子充分而有效地吸收。包括火焰原子化器和无火焰原子化器两种,可根据具体测定分析的需要选用不同的原子化器。

(3)分光系统。由衍射光栅(或色散棱镜)和反射镜等组成。其主要作用是将透过原子化系统的复合光,经过衍射光栅的色散作用,展开成按照波长顺序排列

的单色光,并通过扫描机构把待测元素的原子吸收信号送入光电倍增管进行检测。

(4)测光系统。包括光电倍增管、负高压电源和放大器等部件,其作用是将分光系统传送过来的原子吸收信号接收下来,转换成光电流并经过放大器放大后输出。

(5)显示系统。主要包括数据处理、显示器和打印机,其作用是将测光系统输出的电信号显示或记录下来,也可以根据特定的数学公式进行计算和处理,并把处理结果用一定的方式显示和打印出来。

原子吸收光谱分析法的测定灵敏度高,干扰少或易于克服,且测定程序简单、快速,可测定的元素有 60~70 种,因此其应用范围相当广泛。

#### 7.2.3.3 定量测定方法

原子吸收光谱法的常用测定方法包括标准曲线法、直接比较法、紧密内插法和标准加入法等,其基本原理都是利用朗伯-比尔定律,由已知浓度的标准溶液求得待测试样溶液的浓度。这些测定方法各有其不同的用途和优缺点,并且在分析测试过程中还存在着不同的干扰问题,因此,在具体应用过程中还应不断摸索,并查阅有关文献书籍。

#### 7.2.3.4 样品的前处理

原子吸收光谱法测定试样之前,必须对试样进行前处理,以破坏其中所包含的有机物质,使待测元素解离出来。样品的前处理有以下两种方法:

(1)干式灰化法。干式灰化法的主要优点是试样量可以很大,且试剂的污染可以被减少到最低程度,而这却是湿式消化法中所存在的严重问题。

干式灰化法常采用陶瓷或铂金坩埚盛放试样,置于高温炉中,在 550~600 °C 温度下灼烧灰化试样。在此温度下,汞将会挥发损失,且损失程度不尽相同;而其他挥发性元素如铅、锌、镉一般可以保留下来。但不可让试样燃烧,以免因挥发而导致上述挥发性元素损失。为了操作方便起见,灰化可安排在夜间进行,炉温一般控制在 500 °C 以上,有时甚至可高达 800~1 000 °C。如果灰化后仍有未氧化的有机质,可以加入数滴浓硝酸,待蒸干后再进行灰化。最终灰化的试样灰分中不应存在黑色炭粒。

在某些试样中硅含量相当高,这些试样的灰化过程中会导致金属元素的损失。此时试样应在铂金坩埚中先用 2~5 mL 氢氟酸(HF)处理,在水浴中蒸干,通过形成氟化硅( $\text{SiF}_4$ )而使硅挥发,从而防止硅对金属元素的吸附作用。

(2)湿式消化法。湿式消化法所用的酸是硝酸( $\text{HNO}_3$ )和高氯酸( $\text{HClO}_4$ ),尽量避免与硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )并用,且必须是优级纯的试剂,以防止试剂中所含杂质的

污染干扰。

加高氯酸消化是很好的方法,但高氯酸是易爆危险试剂,应用时应注意安全。为使易氧化物质先分解,防止高氯酸爆炸,在消化之初应加入过量的浓硝酸(30 mL),煮沸 30~45 min 至二氧化氮黄烟逸尽;冷却后再加入 70%~72%高氯酸 10 mL,小心煮沸至溶液变为无色或冒白烟,但切不可蒸干(危险!)。整个消化过程必须在安全柜(毒气柜)中进行,以便使有害废气排出。

#### 7.2.3.5 采样与分析样品的制备

采样和样品制备的基本原则是代表性,如果待测小试样不能代表全部样品,或大样品不能代表原始样品,则分析结果再准确也毫无价值。关于不同物质的采样方法,EU/VDLUFA(欧洲共同体/德国农业科学院)、AOAC(美国分析化学家协会)、英国的分析化学协会等组织或机构都提出了各自的规则,可供运用时参考。

此外,关于大样品和次级样品的污染问题,在实际工作中也应引起足够的重视。如植物表面的土壤颗粒和尘埃必须用蒸馏水洗净;样品粉碎将会导致源于粉碎机的污染,如铁、锰、钴、镍、铬和铝的污染;食品绞碎机的金属部件与样品接触也会造成污染;样品在贮存过程中也可能带来正的或负的污染。

#### 7.2.3.6 饲料、粪、尿试样分解液的制备

(1)试样分解液的制备。准确称取 10~30 g 风干试样(饲料或粪)或 100 g 尿样置于陶瓷坩埚中,尿样应预先在水浴上蒸干。将坩埚置于高温炉中,或先在电炉上小心炭化后再放入高温炉中,慢慢将炉温上升至 550~600 °C,并保持 4 h 以上。冷却后将试样灰分小心地溶解于 5 mL 浓盐酸中,并在水浴上蒸发至干,然后加入 1 mol·L<sup>-1</sup>的盐酸溶液 10 mL,用玻棒搅拌均匀。将坩埚从水浴中取出,用无灰分滤纸过滤试样溶液,滤液收集于 250 mL 容量瓶中(尿样用 100 mL 容量瓶)。若一次灰化较为完全(通常较难),则用 1 mol·L<sup>-1</sup>的盐酸溶液冲洗滤纸 4~6 次,滤液全部并入容量瓶中,再用同浓度的盐酸定容至刻度,混匀后即為试样分解液。

若灰化不完全,即有“灰色”残余物,则滤纸只需用 1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液冲洗 2 次,再将滤纸和残余物一并移入坩埚中,用“助灰化剂”湿润滤纸。若不是测镁,可加入 20 g·L<sup>-1</sup>的硝酸镁溶液 2~5 mL,否则用 20 g·L<sup>-1</sup>的硝酸铵溶液。然后将此溶液蒸干,再放入高温炉中灰化 4 h,所得试样灰分再按上述程序进行处理。最后将试样分解液贮存于聚氯乙烯(PVC)瓶中待测。注意为了减少试剂中杂质的污染,上述所用的盐酸、硝酸镁和硝酸铵试剂都应为优级纯。

(2)试剂的配制。为减少试剂中杂质的干扰,下面所述试剂均需为优级纯试剂。

① $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸(GB 622—89)溶液:将浓盐酸按 $1:12(V:V)$ 的比例稀释,并充分混合均匀。

② $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液:将浓盐酸按 $1:60(V:V)$ 的比例稀释,并充分混合均匀。

③ $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镧溶液:在 $50\text{ g}$ 的 $\text{La}_2\text{O}_3$ 中慢慢加入 $167\text{ mL}$ 的浓盐酸,注意在此溶解过程中会放出剧热,应小心晃动!待冷却后再用水稀释定容至 $1\,000\text{ mL}$ ,充分混合均匀即可。由于 $\text{La}_2\text{O}_3$ 溶液的浓度大,测定时对酸度有影响,故某些标准溶液需用水,而另一些则需用 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液进行稀释。除钙、镁外,其他标准溶液中不加镧溶液。

④ $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铯溶液:将 $12.67\text{ g}$ 的氯化铯(HG 3-938)溶于适量水中,加入 $20\text{ mL}$ 浓盐酸,并稀释定容至 $1\,000\text{ mL}$ ,充分混合均匀。

⑤ $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸镁溶液:将 $10\text{ g}$ 硝酸镁(HG 3-1077)溶于水中,再稀释定容至 $500\text{ mL}$ ,充分混合均匀即可。

(3)试样溶液的制备。将试样分解液按适宜的倍率稀释,使得待测元素的浓度处于标准曲线的范围之内,以保证测定结果的准确性和精确性。试样分解液的稀释定容须用 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液进行。

当测定钙和镁时,最终试样溶液中须含有 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{La}_2\text{O}_3$ ;当测定钠和钾时,最终试样溶液中须含有 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铯。

(4)标准溶液的配制。

①钙的母液和标准溶液。

a. 钙母液:准确称取基准试剂级碳酸钙(GB 12596) $1.250\text{ g}$ ,用少量 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液使之溶解,将溶液无损失地移入 $500\text{ mL}$ 容量瓶中,再用 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液冲洗数次,并定容至刻度,充分混合均匀即可。该母液的钙浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

b. 钙中间液:用移液管准确吸取钙母液 $50\text{ mL}$ ,置于 $1\,000\text{ mL}$ 容量瓶中,用 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液稀释定容至刻度,充分混匀即可。其钙浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\text{P}$ 。

c. 钙标准溶液:用移液管准确吸取钙中间液 $0, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20\text{ mL}$ ,分别置于 $50\text{ mL}$ 容量瓶中,各加入 $\text{La}_2\text{O}_3$ 溶液 $5\text{ mL}$ ,再加蒸馏水定容至刻度,充分混匀。该溶液的钙浓度为 $2.0\sim 20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

d. 试剂空白:系钙浓度为 $0$ 的标准溶液,用于原子吸收光谱仪的调零。

## ② 镁的母液和标准溶液。

a. 镁母液:准确称取纯金属镁 1.000 g,加入蒸馏水 50 mL,再慢慢加入 10 mL 浓盐酸。待全部溶解后用 400 mL 蒸馏水无损地移入 1 000 mL 容量瓶中,用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液定容至刻度,并充分混匀。该溶液的镁浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 镁中间液:将 5 mL 的镁母液移入 1 000 mL 容量瓶中,用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的镁浓度为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 镁标准溶液:用移液管准确吸取镁中间液 0,2,5,8,10,12,15,18,20 mL,分别放入 50 mL 容量瓶中,各加入  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{La}_2\text{O}_3$  溶液 5 mL,再用蒸馏水稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的镁浓度为  $0.2 \sim 2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

d. 试剂空白:系镁浓度为 0 的标准溶液,用于原子吸收光谱仪的调零。

③ 钠的母液和标准溶液:钠的测定波长通常为 589.0 nm,此系钠的最敏感谱线波长,而对于含钠浓度高的试样,最好在 330.2/330.3 nm 双重波长下测定,此双重波长谱线的不敏感系数为 200。

a. 钠母液:准确称取基准试剂级氯化钠 2.541 g,加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液使之溶解,无损地移入 1 000 mL 容量瓶中,再用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,充分混匀,于塑料瓶中保存备用。该溶液的钠浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 钠中间液:准确吸取 15 mL 钠母液置于 1 000 mL 容量瓶中,用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的钠浓度为  $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 钠标准溶液:当测定波长为 589 nm 时,分别吸取钠中间液 0,1,2,3,4,5 mL;测定波长为 330.2/330.3 nm 时,则分别吸取钠母液 0,0.5,1,2,3,4,5 mL。然后,放入 50 mL 容量瓶中,各加入 5 mL 的铯溶液,再用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,充分混匀即可。此标准溶液的钠浓度前者为  $0.3 \sim 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,后者为  $10 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

e. 试剂空白:系钠浓度为 0 的标准溶液,用于原子吸收光谱仪的调零。

④ 钾的母液和标准溶液:可以在波长 766.5 nm 处进行测定,但在波长 769.9 nm 处测定常有其优势,其敏感度大约为前者的 50%;当试样钾浓度较高时,也可以在 440.4/440.7 nm 双波长谱线下测定,此时敏感度减小系数为 100。

a. 钾母液:准确称取在 105  $^{\circ}\text{C}$  下干燥 2 h 的优级纯氯化钾 1.907 g,加入适量  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液使之溶解,无损失地移入 1 000 mL 容量瓶中,再用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,充分混合均匀后,贮存于塑料瓶中备用。此溶液的钾浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 钾中间液:准确吸取钾母液 15 mL,放入 1 000 mL 容量瓶中,加入 0.2

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸定容至刻度,充分混匀。此溶液的钾浓度为  $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 钾标准溶液:当测定波长为  $766.5 \text{ nm}$  时,分别吸取钾中间液  $0, 1, 2, 3, 4, 5 \text{ mL}$ ;测定波长为  $440.5/440.7 \text{ nm}$  时,则分别吸取钾母液  $0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 \text{ mL}$ 。置于  $50 \text{ mL}$  容量瓶中,各加入  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的铯溶液  $5 \text{ mL}$ ,再用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液定容至刻度,充分混合均匀即可。此标准溶液的钾浓度前者为  $0.3 \sim 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,后者为  $100 \sim 800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

e. 试剂空白:系钾浓度为 0 的标准溶液,用于原子吸收光谱仪的调零。

#### ⑤ 铁的母液和标准溶液。

a. 铁母液:准确称取纯铁丝  $1.000 \text{ g}$ ,加入  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液  $40 \text{ mL}$ ,加热煮沸使之溶解,无损失地移入  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,充分混匀即可。此母液的铁浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 铁中间溶液:准确吸取铁母液  $25 \text{ mL}$ ,放入  $500 \text{ mL}$  容量瓶中,加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,充分混合均匀。此溶液的铁浓度为  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 铁标准溶液:准确吸取铁中间液  $0, 2, 5, 10, 15, 20 \text{ mL}$ ,分别置于  $50 \text{ mL}$  容量瓶中,用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液定容至刻度,充分混匀。此标准溶液的铁浓度为  $2.0 \sim 20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

e. 试剂空白:系铁浓度为 0 的标准溶液,用于原子吸收光谱仪的调零。

#### ⑥ 铜的母液和标准溶液。

a. 铜母液:准确称取纯铜  $1.000 \text{ g}$ ,加入少量浓硝酸使之溶解,加入  $5 \text{ mL}$  浓盐酸蒸干,再用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液溶解残渣,无损失地移入  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中,并定容至刻度,充分混匀。此母液的铜浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 铜中间液:准确吸取铜母液  $10 \text{ mL}$ ,放入  $500 \text{ mL}$  容量瓶中,加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液定容至刻度,充分混合均匀。此溶液的铜浓度为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 铜标准溶液:分别吸取铜中间液  $0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 \text{ mL}$ ,放入  $50 \text{ mL}$  容量瓶中,加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液定容至刻度,充分混匀。此标准溶液的铜浓度为  $0.4 \sim 4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

d. 试剂空白:系铜浓度为 0 的标准溶液,用于原子吸收光谱仪的调零。

#### ⑦ 锌的母液和标准溶液。

a. 锌母液:准确称取纯锌粒  $1.000 \text{ g}$  或基准试剂级氧化锌  $1.245 \text{ g}$ ,用  $40 \text{ mL}$   $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液使之溶解,无损失地移入  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中,加蒸馏水稀释定容至刻度,充分混合均匀。此溶液的  $\text{Zn}$  浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 锌中间液:准确吸取锌母液  $5 \text{ mL}$ ,放入  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中,加入  $0.2$

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,充分混匀。此中间液的锌浓度为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 锌标准溶液:分别吸取锌中间液 0,1,5,10,15,20 mL,放入 50 mL 容量瓶中,加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液定容至刻度,充分混匀。此标准溶液的锌浓度为  $0.1 \sim 2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

d. 试剂空白:系锌浓度为 0 的标准溶液,用于原子吸收光谱仪的调零。

⑧ 锰的母液和标准溶液。

a. 锰母液:准确称取二氧化锰 1.59 g,加入  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液 40 mL,使之溶解并煮沸,无损失地移入 1 000 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,充分混匀。此溶液的锰浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 锰中间液:准确吸取锰母液 10 mL,放入 500 mL 容量瓶中,用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液定容至刻度,充分混匀。此溶液的锰浓度为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 锰标准溶液:分别吸取锰中间液 0,1,2,4,6,8,10 mL,放入 50 mL 容量瓶中,用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液定容至刻度。充分混匀。此标准溶液的锰浓度为  $0.4 \sim 4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

d. 试剂空白:系锰浓度为 0 的标准溶液,用于原子吸收光谱仪的调零。

#### 7.2.3.7 应用实例

(1) 饲料和粪样中铬的测定。

① 仪器:WFX-1 型原子吸收光谱仪( $Y_4$ ),系北京第二光学仪器厂生产。

附件:乙炔发生器(乙炔钢瓶)、空气压缩机、铬空心阴极灯、自动记录仪和常用玻璃仪器等。

② 试剂与溶液。

a. 硫酸(优级纯,GB 625)。

b. 硝酸(优级纯,GB 626)。

c. 高氯酸(优级纯,GB 623)。

d. 氢氟酸(优级纯,GB 620)。

e. 盐酸(优级纯,GB 622)。

f. 去离子水:将蒸馏水再经离子交换柱去离子制得。

g. 铬标准母液:准确称取在  $110^\circ\text{C}$  下干燥 2 h 的优级纯重铬酸钾(GB 1259)0.282 9 g,溶于蒸馏水中,并定容至 1 000 mL。此溶液的铬含量为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

h. 铬标准溶液:准确吸取铬标准母液 25 mL,置于 250 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释定容至刻度。此标准溶液的铬含量为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



### ③仪器工作条件。

测定波长:357.9 nm;灯电流:3 mA;电压:370~380 V;燃烧器高度:0.7 cm;空气流量:320 L·h<sup>-1</sup>;乙炔流量:60 L·h<sup>-1</sup>;提升量:8 mL·min<sup>-1</sup>。

### ④实验步骤。

a. 试样分解液的制备:准确称取饲料或粪样约1 g,精确至0.000 1 g,置于30 mL瓷坩埚中,在电炉上小火加热炭化,待无烟后移至高温炉中,在550~600℃下灰化3 h;或称取试样约5 g,置于100 mL硬质、高型烧杯中进行湿式消化。待冷却后,加入5 mL浓硝酸和1~2 mL浓盐酸,盖上坩埚盖或表面皿,在电砂盘上加热消化,至残渣变为无黑色炭粒为止,再加热至溶液约为1 mL。冷却后,加入3~5 mL蒸馏水,加热至近沸,过滤于25 mL容量瓶中,重复淋洗残渣3~5次,滤液一并回收入容量瓶中,再用蒸馏水定容至刻度。取上清液在原子吸收光谱仪上测定铬的含量。

b. 标准曲线的制作:准确吸取铬标准溶液(10 μg·mL<sup>-1</sup>)0,0.5,1.0,1.5,2.0,3.0,5.0,7.0,9.0,11.0 mL,置于高型烧杯中,按上述步骤a中样品灰化之后的处理程序进行操作。然后绘制吸光度与铬浓度之间的关系曲线,即标准曲线。

### c. 结果计算:

$$w(\text{饲料或粪样的铬}) = \frac{\rho \times V}{m} \quad 7-26$$

式中: $\rho$ 为测定值的平均值,μg·mL<sup>-1</sup>;V为试样定容的体积,mL;m为试样的质量,g。

## (2)动物骨骼和软组织中锰的测定。

### ①仪器工作条件。

单色光狭缝宽度:0.4 nm;测定谱线波长:279.5 nm;灯电流:7.5 mA;空气压力:1.6 kg·cm<sup>-2</sup>;乙炔气压力:0.3 kg·cm<sup>-2</sup>;火焰高度:7.5 cm。

### ②试剂与仪器。

- 试剂:优级纯高氯酸和硝酸、沸石、无离子水。
- 仪器:分析天平、高温炉、瓷坩埚、消化炉、消化管。

### ③实验步骤。

#### a. 试样的前处理。

骨骼的灰化:剥除跖骨外层的附着物,用无离子水洗净,在高温炉中于600℃下灰化6 h,冷却后粉碎。

试样消化:准确称取骨灰试样0.2 g,或新鲜软组织(肝、肾等)0.5 g,放入消化管中,加入8 mL浓硝酸和0.2 mL高氯酸,静置过夜。将消化管置于消化炉中

进行消化,按试样类别确定消化温度,即骨灰和饲料为  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,新鲜软组织为  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。消化至管内试样变为无色、无液体为止。

稀释:于消化管中加入去离子水  $5\text{ mL}$ ,振荡  $5\text{ min}$ ,取上清液直接用于上机测定。

b. 标准溶液系列。

锰母液:用经过烘干的硫酸锰,配制成锰含量为  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的锰母液。

锰中间液:准确吸取锰母液  $2\text{ mL}$ ,置于  $50\text{ mL}$  容量瓶中,加入  $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,此溶液的锰含量为  $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

锰标准溶液:分别吸取锰中间液  $0, 0.25, 0.75, 1.25, 2.5, 5.0\text{ mL}$ ,用  $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的盐酸溶液稀释定容至  $50\text{ mL}$ ,此标准溶液的锰含量为  $0, 0.2, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

c. 上机测定:依次对锰标准溶液、试样溶液进行上机测定,读取吸光度值。然后,根据标准溶液的锰含量与对应吸光度值的数量关系,绘制标准曲线。再根据试样的测定吸光度值,求出待测试样溶液的锰浓度,最后,计算出单位重量试样的锰含量。

(3) 畜禽血清中钙的测定。

① 仪器及其工作条件。

仪器:日立 518 原子吸收光谱仪, Ca 空心阴极灯;测定方法:火焰法;测定波长:  $422.7\text{ nm}$ ;单色光狭缝宽度:  $0.4\text{ nm}$ ;灯电流:  $10\text{ mA}$ ;乙炔气流量:  $2\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;空气流量:  $10\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;测定范围:  $0\sim 1.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

② 标准曲线制作:用钙标准储备液配制钙含量为  $0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的标准溶液系列,于  $50\text{ mL}$  标准溶液中各加入  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{LaCl}_2$  溶液 5 滴。然后按上述仪器工作条件,进行上机测定,根据标准溶液的浓度与对应吸光度值的数量关系绘制标准曲线。

③ 试样处理与测定:准确吸取  $0.02\text{ mL}$  血清,置于  $5\text{ mL}$  离心管底部,加入 10% 的盐酸溶液  $0.2\text{ mL}$  和  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{LaCl}_2$  溶液 5 滴,用蒸馏水稀释至  $5\text{ mL}$ 。于  $2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  下离心  $3\sim 5\text{ min}$ ,使蛋白质沉淀于离心管底部,然后取上清液在空气-乙炔稍富燃的火焰中进行钙的测定。

④ 补充说明:加  $\text{LaCl}_2$  的作用是为了消除  $\text{PO}_4^{3-}$  对 Ca 测定的干扰。

#### 7.2.4 饲料中铁、铜、锰、锌、镁的测定(原子吸收分光光度法)

##### 7.2.4.1 适用范围

本标准适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中铁、铜、锰、锌、

镁的定量测定,试样测定的浓度范围为:铁  $1\sim 16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;铜、锰  $0.5\sim 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;锌、镁  $0.1\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

#### 7.2.4.2 测定原理

用干法灰化待测饲料原料、配合饲料和浓缩饲料样品,在酸性条件下溶解灰分残渣,稀释定容制成试样溶液;用酸浸提法处理待测预混合饲料样品,稀释定容制成试样溶液。将试样溶液导入原子吸收光谱仪中,分别测定待测元素的吸光度值。

#### 7.2.4.3 试剂与标准溶液

实验用水应符合 GB 6682 中二级用水的标准,所用试剂除特别规定外,均为分析纯。

##### (1)试剂。

①盐酸(GB 622—89):优级纯。

②硝酸(GB 626—89):优级纯。

③硫酸(GB 625—89):优级纯。

④乙酸(GB 676—90):优级纯。

⑤乙醇(GB 678—90):优级纯。

⑥丙酮(GB 686—89):优级纯。

⑦乙炔:符合 GB 6819 的规定。

##### (2)标准溶液。

①干扰抑制剂溶液:称取氯化铯  $152.1\ \text{g}$ ,溶于  $420\ \text{mL}$  盐酸中,加入蒸馏水至  $1\ 000\ \text{mL}$ ,混匀后备用。

##### ②铁标准溶液。

a. 铁标准储备液:准确称取  $(1.000\ 0\pm 0.000\ 1)\text{g}$  铁(光谱纯),置于高型烧杯中,加入  $20\ \text{mL}$  浓盐酸和  $50\ \text{mL}$  蒸馏水,加热煮沸使之溶解,冷却后移入  $1\ 000\ \text{mL}$  容量瓶中,用蒸馏水稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的铁含量为  $1.0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

b. 铁标准溶液:准确吸取铁标准储备液  $0, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5\ \text{mL}$ ,分别置于  $100\ \text{mL}$  容量瓶中,用  $1:100$  的盐酸稀释定容至刻度,配制成铁含量为  $0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的铁标准系列。

##### ③铜标准溶液。

a. 铜标准储备液:准确称取依次用  $1:49$  乙酸、蒸馏水和乙醇洗净的铜(光谱纯)  $(1.000\ 0\pm 0.000\ 1)\text{g}$ ,置于高型烧杯中,加入浓硝酸  $5\ \text{mL}$ ,在水浴上加热,待蒸干后加入  $1:1$  的盐酸溶液( $V:V$ )使之溶解。然后无损地移入  $1\ 000\ \text{mL}$  容

量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,充分混匀。此溶液的铜含量为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 铜标准中间液:准确吸取铜标准储备液  $2.0 \text{ mL}$ ,置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,用  $1:100$  的盐酸溶液( $V:V$ )稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的铜含量为  $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 铜标准溶液:准确吸取铜标准中间液  $0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0$  和  $20.0 \text{ mL}$ ,分别置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,用  $1:100$  的盐酸溶液稀释定容至刻度,配成铜含量为  $0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的铜标准系列。

#### ④ 锰标准溶液。

a. 锰标准储备液:准确称取依次用  $1:18$  硫酸和蒸馏水洗净,并烘干的锰(光谱纯)( $1.0000 \pm 0.0001$ )g,置于高型烧杯中,加入  $1:4$  的硫酸溶液( $V:V$ )  $20 \text{ mL}$  使之溶解。无损地移入  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中,用蒸馏水稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的锰含量为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 锰标准中间液:准确吸取锰标准储备液  $2.0 \text{ mL}$ ,置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,用  $1:100$  的盐酸溶液( $V:V$ )稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的锰含量为  $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 锰标准溶液:准确吸取锰标准中间液  $0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0 \text{ mL}$ ,分别置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,各加入干扰抑制剂溶液  $10 \text{ mL}$ ,再用  $1:100$  的盐酸溶液( $V:V$ )稀释定容至刻度,配成锰含量为  $0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的锰标准系列。

#### ⑤ 锌标准溶液。

a. 锌标准储备液:准确称取依次用  $1:3$  盐酸、蒸馏水和丙酮洗净的锌(光谱纯)( $1.0000 \pm 0.0001$ )g,置于高型烧杯中,加入  $10 \text{ mL}$  的浓盐酸使之溶解。无损地移入  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中,再用蒸馏水稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的锌含量为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 锌标准中间液:准确吸取锌标准储备液  $2.0 \text{ mL}$ ,置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,用  $1:100$  的盐酸溶液( $V:V$ )稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的锌含量为  $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 锌标准溶液:准确吸取锌标准中间液  $0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 \text{ mL}$ ,分别置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,用  $1:100$  的盐酸溶液( $V:V$ )稀释定容至刻度,配制成为锌含量为  $0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的锌标准系列。

#### ⑥ 镁标准溶液。

a. 镁标准储备液:准确称取光谱纯的镁( $1.0000 \pm 0.0001$ )g,置于高型烧杯中,加入  $10 \text{ mL}$  的浓盐酸使之溶解,无损地移入  $1000 \text{ mL}$  容量瓶中,用蒸馏

水稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的镁含量为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

b. 镁标准中间液:准确吸取镁标准储备液  $2.0 \text{ mL}$ ,置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,用  $1:100$  的盐酸溶液( $V:V$ )稀释定容至刻度,充分混匀。此溶液的镁含量为  $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

c. 镁标准溶液:准确吸取镁标准中间液  $0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 \text{ mL}$ ,分别置于  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,各加入干扰抑制剂溶液  $10 \text{ mL}$ ,再用  $1:100$  的盐酸溶液( $V:V$ )稀释定容至刻度,配制成镁含量为  $0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的镁标准系列。

#### 7.2.4.4 仪器设备

(1)实验室常用的仪器。

(2)原子吸收分光光度计。波长范围为  $190 \sim 900 \text{ nm}$ 。

(3)离心机。转速为  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

(4)磁力搅拌器。

(5)硬质玻璃烧杯。 $100 \text{ mL}$ 。

(6)具塞锥形瓶。 $250 \text{ mL}$ 。

#### 7.2.4.5 试样的选取与制备

采取具有代表性的试样至少  $2 \text{ kg}$ ,用四分法缩减至约  $250 \text{ g}$ ,粉碎全部通过  $40$  目分析筛,充分混合均匀,然后装入样品瓶中,密闭保存备用。

#### 7.2.4.6 实验步骤

(1)试样的前处理。

①饲料原料、配合饲料、浓缩饲料样品的前处理:准确称取  $2 \sim 5 \text{ g}$  试样,精确至  $0.0001 \text{ g}$ ,置于  $100 \text{ mL}$  硬质玻璃烧杯中,在电炉或电热板上小火加热炭化至无烟,然后移入高温炉中,于  $550 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下灰化  $16 \text{ h}$ 。若仍有少量炭粒,可滴加浓硝酸使残渣湿润,加热烘干后,再置高温炉中灰化至无炭粒。冷却后向残渣中滴加少量蒸馏水使之湿润,加入  $10 \text{ mL}$  浓盐酸和  $30 \text{ mL}$  蒸馏水,煮沸数分钟后冷却,无损失地移入  $100 \text{ mL}$  容量瓶中,再用蒸馏水稀释定容至刻度,充分混匀后过滤,滤液即为待测试样分解液。同时制备试样空白溶液。

②预混合饲料样品的前处理:准确称取  $1 \sim 3 \text{ g}$  试样,精确至  $0.0001 \text{ g}$ ,置于  $250 \text{ mL}$  具塞锥形瓶中,准确加入  $1:10$  的盐酸溶液( $V:V$ )  $100.0 \text{ mL}$ ,在磁力搅拌器上搅拌提取  $30 \text{ min}$ 。然后在  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心  $5 \text{ min}$ ,上清液即为待测试样分解液;或在搅拌提取后,用干滤纸过滤所得溶液,即为待测试样分解液。同时制备试样空白溶液。

(2)仪器的工作条件。由于原子吸收分光光度计的型号有不同,操作者可按

所用仪器的要求,相应地调整仪器的工作条件。

		nm	
元素种类	测定波长	元素种类	测定波长
铁(Fe)	248.3	锌(Zn)	213.8
铜(Cu)	324.8	镁(Mg)	285.2
锰(Mn)	279.5		

(3)标准曲线的制作。将待测元素的标准溶液系列导入原子吸收分光光度计中,按仪器的工作条件测定该标准系列的吸光度值,根据标准溶液的浓度与吸光度值的对应关系,绘制标准曲线。

(4)试样的测定。准确吸取试样分解液  $V_1$  (mL),用 1:100 的盐酸稀释至  $V_2$  (mL)(稀释倍数需根据待测元素的含量与标准曲线的线性范围来确定),即成为试样测定液。若测定锰、镁时,则需按定容体积的 1/10 加入干扰抑制剂溶液。将此试样测定液导入原子吸收分光光度计中,按上述仪器工作条件测定其吸光度值,同时测定试样空白溶液的吸光度值,然后根据标准曲线求出试样测定溶液中待测元素的浓度。

#### 7.2.4.7 分析结果的计算

(1)试样中待测元素的质量分数按公式 7-27 计算。

$$w(\text{待测元素}) = \frac{(c - c_0) \times V_2 \times 100}{m \times V_1} \quad 7-27$$

式中: $c$  为由标准曲线求得的试样测定溶液中待测元素的浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $c_0$  为由标准曲线求得的试样空白溶液中待测元素的浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $m$  为试样的质量, g;  $V_1$  为吸取试样分解液的体积, mL;  $V_2$  为试样测定液的体积, mL; 100 为试样分解液的体积, mL。

所得的结果表示到  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

(2)允许误差范围。每个试样应做 2 份平行测定,以其算术平均值作为分析结果,2 份样品测定结果的相对偏差应不大于下表所列的数值:

		%	
测定元素	允许相对偏差	测定元素	允许相对偏差
Fe	15	Zn	15
Cu	15	Mg	15
Mn	15		

### 7.2.5 ICAP-9000 型等离子发射光谱仪测定饲料中矿物质元素的含量

#### 7.2.5.1 测定原理

利用待测样品中存在的元素在感应线圈、绕等离子炬管构成的氩气等离子磁场中,被激发后能发射出特征波长的光,经光电倍增管放大后,转变成电信号。然后输入计算机中进行处理,最后打印输出测定结果,从而达到测定样品中矿物质元素含量的目的。

#### 7.2.5.2 仪器构造

ICAP-9000 型等离子发射光谱仪由一个 0.75 m 的直读光谱仪、一个 RF 高频发生器、ICAP 激发源和 Apple-11 型计算机检测系统组成。

#### 7.2.5.3 试剂与仪器

(1)试剂。

- ①优级纯的浓硝酸、高氯酸和盐酸。
- ②待测元素的光谱纯试剂:用于标准溶液的配制,如光谱纯氧化镁。
- ③无离子水。

(2)仪器。

- ①ICAP-9000 型等离子发射光谱仪。
- ②电子天平。
- ③电热砂炉或试样消化专用装置。
- ④小三角烧瓶或消化管。
- ⑤无离子水发生装置。

#### 7.2.5.4 仪器主要技术参数

- (1)光学系统。0.75 m 罗兰圆帕森-伦装置,光栅刻线  $1\,510\text{ 线}\cdot\text{mm}^{-1}$ 。
- (2)波长范围。170~800 nm(真空型光谱仪);动态范围  $78\times 10^5$ 。
- (3)线色数。 $0.92\text{ nm}\cdot\text{mm}^{-1}$ 一级; $0.46\text{ nm}\cdot\text{mm}^{-1}$ 二级; $0.31\text{ nm}\cdot\text{mm}^{-1}$ 三级。
- (4)光源。25 kW 射频发生器,工作频率 27.12 MHz,自动功率控制和自动调谐,光源在光谱仪箱内。
- (5)喷雾器。直角气流式气动雾化器。
- (6)炬管。石英。
- (7)氩气流量。 $15\sim 20\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,恒流、恒压控制。
- (8)冷却水流量。大于  $0.4\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

#### 7.2.5.5 操作步骤

(1)标准溶液的配制。配制高、低两种浓度的溶液,其中高浓度溶液是按 ICAP-9000 型所能检测的元素上限浓度配制的标准溶液,对于互不干扰或谱线间干扰很小的元素,可列为一组标准液;低浓度溶液系指空白的无离子水。标准溶液用于制作 ICAP-9000 型光谱仪的标准曲线。

(2)仪器的启动。按 ICAP-9000 型光谱仪、RF 高频发生器、等离子体、计算机的顺序依次启动仪器,具体操作步骤详见 ICAP-9000 型仪器说明书。

(3)ACT 的建立。为了测定实际试样,根据实验所需测定的元素数目,用配制的标准溶液,编辑测定控制表,简称 ACT。具体详见有关仪器说明书。

(4)描述。分自动描述与手动描述两种方式,一般要求每次开机前都应进行手动描述,常以汞灯的第 13 物理通道进行手动描述,待描述图在计算机上显示,图形的最高点所对应的横轴为零时,即为最佳状态,可完成描述步骤。

(5)标准化过程。即给仪器制作标准曲线的过程。根据计算机的提示命令,将所配制的低(空白)、高浓度标准溶液依次输入等离子体中,曝光测定,然后计算机自动存储检测信号。当标准曲线作完后,计算机显示各个元素的斜率和截距,此时即可检查曲线的线性关系。如果线性关系好,则用此标准曲线反过来测定一组高浓度标准溶液时,所测得结果应与所配浓度相接近,此时方可用于测定待测试样的浓度。

(6)试样的测定。在进样的同时,在计算机上以“< . . . >”的形式输入试样编号,如 56 号,可打入<56>,当试样溶液上升到炬管火焰处发光时,打回车键。然后由计算机控制进行曝光测定,最终由计算机根据内存的标准曲线计算并打印出测定结果。

(7)试样的预处理。准确称取待测饲料样品约 0.5 g,置于小三角烧瓶或消化管中,加入 10 mL 浓硝酸,于 100℃以上湿式消化 30 min。再加入 0.5~1 mL 的高氯酸继续消化,至溶液变为无色,仅剩极少量的高氯酸时为止。若消化至干时仍有黑色炭粒,则待冷却后再加少量浓硝酸,继续消化至无色为止。然后无损失地移入容量瓶中(容量瓶体积,视待测样品的元素含量而定),用去离子水定容至刻度,充分混匀后,取上清液直接上机测定。

(8)关机。按照仪器启动相反的顺序,逐一关机。

#### 思考题

1. 测定饲料中钙的主要方法有哪几种,各自的原理是什么?
2. 试分析导致高锰酸钾法测定钙结果偏高的原因有哪些。



3. 饲料中水溶性氯化物的测定原理是什么?
4. 测定矿物质饲料原料中锰和钴的基本原理及其常用的测定掩蔽剂是什么?
5. 原子吸收光谱分析仪的基本构造及其测定饲料中微量元素的基本原理?
6. ICAP-9000 型等离子发射光谱仪测定饲料中矿物质元素含量的基本原理及其与原子吸收光谱分析法的差异?

## 8 维生素的分析测定

### 【内容提要】

本章主要介绍了饲料和预混料中维生素及维生素制剂的分析测定。

### 8.1 概述

维生素是一组化学结构不同,生理作用和营养功能各异的化合物。维生素既非供能物质,也非动物的结构成分,它主要用于控制和调节机体的物质代谢。动物等对维生素的需要量极微,但其生理、营养作用显著。在现代化集约饲养条件下,要求畜禽以最高效率进行生产(如肉用仔鸡、高产性能的蛋鸡、实行早期断奶的仔猪以及高产性能的奶牛等),因此,在现代化全价配合饲料中添加合成的维生素以及其他必需养分(如钙、磷、微量元素和一些必需氨基酸)以补充饲料中这些养分的不足,已经成为绝对不可少的常规技术措施。

当前,已列入饲料添加剂的维生素约有 15 种,一般分为两类:一类是脂溶性维生素包括维生素 A、维生素 D、维生素 E、维生素 K;另一类是水溶性维生素包括 B 族维生素[维生素 B<sub>1</sub>(硫胺素)、B<sub>2</sub>(核黄素)、B<sub>6</sub>(吡哆醇)、B<sub>12</sub>(氰钴胺)、烟酸、泛酸、叶酸、生物素、肌醇和胆碱]和维生素 C(抗坏血酸)等。

由于维生素 A 的主要形式——维生素 A 醇不稳定,常用其较稳定的酯类——乙酸酯和棕榈酸酯。为了进一步提高稳定性还可加入抗氧化剂。后者也常与增效剂和络合剂结合使用。总之,由于基质的复合组分含大量的干扰物质,所以,饲料或预混合饲料中维生素和类胡萝卜素的分析通常要求很高。当试样中的微量营养素浓度范围为  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  水平到  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  水平时,干扰因素则更为突出。

在 20 世纪 70 年代以前,常采用分光光度法或荧光检测法来测定维生素 A。但这两种方法在某种程度上均存在一定的缺陷。分光光度法常由于显色不稳定,结果重复性差,准确性低;而荧光测定法,由于试样中常含有胡萝卜素、维生素 D 和其他具有荧光性质的烯烃类物质,使维生素 A 的测定受到干扰。因此,在近代新的分析技术科学发展中,采用现代分析技术(如 HPLC)来测定配合饲料、预混合饲料和浓缩料以及复合维生素产品中的维生素、添加剂和稳定剂。

同一饲料原料中的维生素含量变化很大,不同分析方法也会有一定的变异。因此,本章介绍了作为饲料添加剂用的维生素制剂的测定方法,也介绍了 HPLC 法检测配合饲料、浓缩饲料、复合预混料和维生素制剂中维生素的测定方法。由于种种干扰因素、含量范围不同,采用的方法也有不同,往往会同时测出饲料中天然存在的和添加的维生素。关于这方面的详细资料请参考有关书籍。

## 8.2 维生素添加剂的分析测定

### 8.2.1 维生素 A 乙酸酯微粒的分析测定

#### 8.2.1.1 适用范围

本测定方法适用于以  $\beta$ -紫罗兰酮为起始原料,经化学合成法制得的维生素 A 乙酸酯,加入适量抗氧化剂,采用明胶等辅料制成的微粒,在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.1.2 定性鉴别

(1)试剂与溶液。

①无水乙醇(GB 678)。

②三氯甲烷(氯仿)(GB 682)。

③三氯化锑(HG 3-1061)溶液:取三氯化锑 1 g,加氯仿制成 4 mL 的溶液。

(2)鉴别方法。称取试样 0.1 g,用无水乙醇湿润后,研磨数分钟,加氯仿 10 mL,振摇过滤,取滤液 2 mL,加三氯化锑的氯仿溶液 0.5 mL,即呈蓝色,并立即退色。

#### 8.2.1.3 定量测定

(1)仪器设备。分光光度计,附 1 cm 比色杯。

(2)试剂与溶液。

①95%乙醇(GB 679)。

②500 g · L<sup>-1</sup>氢氧化钾(GB 2306)溶液。

③乙醚(HG 3-1002):不含过氧化物。

④10 g · L<sup>-1</sup>酚酞(HG B3039)乙醇溶液。

⑤无水硫酸钠(HG 3-123)。

⑥异丙醇(HG 3-1167):光学纯。

⑦甘油淀粉润滑剂:取甘油 22 g,加入可溶性淀粉 9 g,加热至 140 ℃,保持 30 min,并不断搅拌,冷却后即可。

(3)测定方法。准确称取试样适量(使试样稀释成 6 250 mL 后,1 mL 中含维生素 A 乙酸酯 9~15 IU)(准确至 0.000 2 g),置皂化瓶中,加 95%乙醇 30 mL 与氢氧化钾溶液 3 mL,置水浴中煮沸回流 30 min 进行皂化。冷却后自冷凝管顶端用 10 mL 水冲洗冷凝管内部。

将皂化液移至分液漏斗中(分液漏斗活塞涂以甘油淀粉润滑剂),皂化瓶用水 60~100 mL 分数次洗涤,洗液并入分液漏斗中,用不含过氧化物的乙醚振摇提取 4 次,每次振摇约 5 min,第一次 60 mL,以后各次 40 mL,合并乙醚液,用水洗涤数次,每次约 100 mL,洗涤应缓缓旋动,避免乳化,直至水层遇酚酞指示液不再显红色,乙醚液用铺有脱脂棉与无水硫酸钠的滤器滤过,滤器用乙醚洗涤,洗液与乙醚液合并,放入 250 mL 棕色量瓶中,用乙醚稀释至刻度,摇匀。准确吸取 1 mL 提取液,置于减压干燥器中,抽干,迅速加异丙醇溶解并置于 25 mL 棕色量瓶中,用异丙醇稀释至刻度(制成 1 mL 中含 9~15 IU 的溶液),摇匀。用分光光度计测定,以 1 cm 的比色杯在 300, 310, 325 及 334 nm 4 个波长处测定吸收度,并测定吸收峰的波长。所有测定应在半暗室中尽速进行。

(4)计算和结果的表示。维生素 A 含量用 1 g 试样中维生素 A 的单位数(IU·g<sup>-1</sup>)表示,所含维生素 A 相当于标示量质量分数  $w_1$ ,按公式 8-3 计算。

计算方法:测定的吸收峰波长应在 323~327 nm 之间,且 300 nm 波长处的吸收度与 325 nm 波长处的吸收度的比值应不超过 0.73,按公式 8-1 计算校正吸收度:

$$A_{325}(\text{校正}) = 6.815A_{325} - 2.555A_{310} - 4.260A_{334} \quad 8-1$$

如果校正吸收度在未校正吸收度的 3%以内,则仍以未经校正的吸收度计算含量。

$$w(\text{维生素 A}) = \frac{A_{325}(\text{校正}) \times 6\,250}{m \times 100} \times 1\,830 \quad 8-2$$

式中: $A$  为吸收度;6 250 为试样的稀释体积, mL;  $m$  为试样质量, g;1 830 为维生素 A 醇在异丙醇中的百分消光系数。

$$w_1 = \frac{\text{试样中含量 (IU} \cdot \text{g}^{-1}\text{)}}{\text{标示量 (IU} \cdot \text{g}^{-1}\text{)}} \quad 8-3$$

#### 8.2.1.4 干燥失重的测定

(1)测定方法。称取试样 1 g(准确至 0.000 2 g),置于已在 105 ℃烘箱中干

燥至恒重的称量瓶内,打开称量瓶盖,置于 105℃ 烘箱中,干燥至恒重。

(2) 计算和结果表示。干燥失重质量分数按公式 8-4 计算。

$$w(\text{干燥失重}) = \frac{m_1 - m_2}{m} \quad 8-4$$

式中:  $m_1$  为干燥前的试样加称量瓶质量, g;  $m_2$  为干燥后的试样加称量瓶质量, g;  $m$  为试样的质量, g。

### 8.2.2 维生素 D<sub>3</sub> 微粒的分析测定

#### 8.2.2.1 适用范围

本方法适用于以含量为 130 万 IU · g<sup>-1</sup> 以上的维生素 D<sub>3</sub> 原油为原料,配以一定量 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)及乙氧喹啉做稳定剂,采用明胶和淀粉等辅料,经喷雾法制成的微粒。本品在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.2.2 定性鉴别

(1) 试剂与溶液。乙酸酐(GB 677);三氯甲烷(氯仿)(GB 682);硫酸(GB 625)。

(2) 鉴别方法。称取试样 0.1 g,精确到 0.000 2 g,加三氯甲烷(氯仿) 10 mL,研磨数分钟,过滤。取滤液 5 mL,加乙酸酐 0.3 mL,硫酸 0.1 mL,振摇,初显黄色,渐变红色,迅即变为紫色,最后呈绿色。

#### 8.2.2.3 定量测定

(1) 仪器设备。高效液相色谱仪;旋转蒸发仪;其他为实验室一般仪器和设备。

(2) 试剂与溶液。

① 500 g · L<sup>-1</sup> 氢氧化钾(GB 2306)溶液。

② 无水乙醇(GB 678)。

③ 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 乙醇制氢氧化钾液:取氢氧化钾约 35 g,置锥形瓶中,加无水乙醇适量使溶解并稀释成 1 000 mL,用橡皮塞密塞,静置 24 h 后,迅速倾取上清液,置具橡皮塞的棕色玻璃瓶中。

④ 1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠(GB 629)溶液:取氢氧化钠适量,加水振摇使溶解成饱和溶液,冷却后置聚乙烯塑料瓶中,静置数日,澄清后备用。氢氧化钠溶液(1 mol · L<sup>-1</sup>):取澄清的氢氧化钠饱和液 56 mL,加新沸过的冷水使成 1 000 mL,摇匀。

⑤ 抗坏血酸钠溶液:称取 3.5 g 抗坏血酸,溶解于 20 mL 1 mol · L<sup>-1</sup> 的氢氧化钠溶液中即成。

⑥乙醚(HG 3-1002);不含过氧化物。

⑦碱性洗涤剂:称取 1 份  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇制氢氧化钾溶液,与 8 份水、1 份 95% 乙醇混合即成。

⑧酚酞指示液:称取酚酞(HGB 3039)1 g,加 95% 乙醇使成 100 mL 即成。

⑨对-二甲基氨基苯甲醛(内标物)(HGB 3486)。

⑩维生素  $\text{D}_3$  标准品。

⑪维生素  $\text{D}_3$  标准储备液:称取 20 mg 维生素  $\text{D}_3$  标准品,精确到  $0.0002 \text{ g}$ ,于 100 mL 棕色容量瓶中,加正己烷及数粒 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)溶解,并稀释至刻度,混匀即成。

⑫内标储备液:称取  $0.2 \text{ g}$  内标物,精确到  $0.0002 \text{ g}$ ,于 100 mL 棕色容量瓶中,加 5 mL 无水乙醇溶解,并用正己烷稀释至刻度,混匀即成。

⑬内标分析液:精密吸取 10 mL 内标储备液,用正己烷稀释至 100 mL,混匀即成。

⑭丙三醇(甘油)淀粉润滑油:称取 22 g 丙三醇(GB 687),加入可溶性淀粉 9 g,加热至  $140^\circ\text{C}$ ,保持 30 min,并不断搅拌,冷却后即可。

(3)含量测定。

①试样前处理。

a. 称取试样适量,使含维生素  $\text{D}_3$  10 万 IU,精确到  $0.0002 \text{ g}$ ,置皂化瓶中。

b. 加 95% 乙醇 20 mL, 5 mL 抗坏血酸钠溶液(临用新配), 3 mL  $500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钾溶液(临用新配),置  $90^\circ\text{C}$  水浴回流 30 min,迅速冷却。

c. 自冷凝管顶端加水 5 mL 冲洗冷凝管的内壁 2 次,将皂化液移至 500 mL 分液漏斗甲中(分液漏斗活塞涂以甘油淀粉润滑油)。

d. 皂化瓶中分别用 15 mL 水, 10 mL 无水乙醇清洗 2 次,洗液并入分液漏斗甲中。

e. 分液漏斗甲加入不含过氧化物的乙醚 50 mL 2 次,每次振摇 30 s,静置,分层。把水层转移至 250 mL 分液漏斗乙中。

f. 水层用 10 mL 乙醇、50 mL 乙醚振摇 30 s,静置,分层。把水层转移至皂化瓶中,把乙醚层转移至甲分液漏斗中,用 10 mL 乙醚洗涤分液漏斗乙 2 次。洗液合并入分液漏斗甲中。

g. 把水层再转移至分液漏斗乙中,用 50 mL 乙醚提取一次,弃去水层,乙醚层再并入分液漏斗甲中。

h. 合并后的乙醚液用 50 mL 碱性洗涤液洗涤 2 次,振摇,静置,分层。弃去水层。

- i. 乙醚液每次用 50 mL 水洗涤,直至洗液遇酚酞液不显红色为止。
- j. 将乙醚层放入 250 mL 容量瓶中,用适量乙醚洗涤分液漏斗甲,洗液并入容量瓶中,用乙醚稀释至刻度并摇匀。

### ②测定。

测试条件:

- a. 高压液相色谱仪。
- b. 紫外检测器;波长 254 nm。
- c. 分析柱:硅胶柱 lichrosorb sibo 5  $\mu\text{m}$ 。
- d. 流动相:正己烷:正戊醇(1 000 : 3)(V : V)。
- e. 流速:2.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。
- f. 灵敏度:0.05 AUFS。

③测试方法:精密吸取乙醚提取液 20 mL,于 100 mL 茄形瓶中,加数粒 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT),将圆底茄形瓶置于真空蒸发器上,60  $^{\circ}\text{C}$  水浴蒸干,取下冷却后,准确加入 10 mL 内标分析液,溶解残留物,过滤。过滤液进样 100  $\mu\text{L}$ ,记录所得色谱峰。

(4)计算和结果的表示。

试样中维生素 D<sub>3</sub> 质量分数按公式 8-5 计算:

$$w(\text{维生素 D}_3) = \frac{[P_D + (P_{\text{pre}} \times F)] \times F_D \times m_{\text{in}} \times D_s \times 4 \times 10^7}{P_{\text{in}} \times m_s \times D_{\text{in}}} \quad 8-5$$

式中:  $P_D$  为试样中维生素 D<sub>3</sub> 峰的响应值;  $P_{\text{pre}}$  为试样中预维生素 D<sub>3</sub> 峰的响应值;  $F$  为预维生素 D<sub>3</sub> 转换成维生素 D<sub>3</sub> 的转换因子;  $F_D$  为校正因子;  $m_{\text{in}}$  为内标物质量, g;  $D_s$  为试样稀释倍数;  $P_{\text{in}}$  为内标峰的响应值;  $m_s$  为试样质量, g;  $D_{\text{in}}$  为内标稀释倍数。

$F_D$ (校正因子)的测定与计算:

分别准确吸取维生素 D<sub>3</sub> 标准储备液 5 mL 和内标储备液 5 mL,置于 50 mL 棕色容量瓶中,加正己烷稀释至刻度,混匀,过滤,取 100  $\mu\text{L}$  过滤液注入分析柱。计算:

$$F_D = \frac{P_{\text{in}} \times m_r \times D_{\text{in}}}{P_r \times m_{\text{in}} \times D_r} \quad 8-6$$

式中:  $P_{\text{in}}$  为内标峰响应值;  $m_r$  为维生素 D<sub>3</sub> 标准品质量, g;  $D_{\text{in}}$  为内标稀释倍数;  $P_r$  为维生素 D<sub>3</sub> 标准品峰响应值;  $m_{\text{in}}$  为内标物质量, g;  $D_r$  为维生素 D<sub>3</sub> 标准品稀释倍数。

$F_{pre}$ (预维生素  $D_3$  校正因子)的测定与计算:

精确吸取 5 mL 维生素  $D_3$  标准储备液,于 100 mL 皂化瓶中,加数粒 BHT,置 90 °C 水浴,避光回流 45 min,冷却,转移至 50 mL 棕色容量瓶中,加 5 mL 内标储备液,用正己烷稀释至刻度,混匀,取 100  $\mu$ L 注入分析柱。

计算:

$F_{pre}$ (预维生素  $D_3$  校正因子)按式 8-7 计算:

$$F_{pre} = \frac{P \times P_{in} \times m_r \times D_{in}}{P_{pre} \times m_{in} \times D_{pre} \times 100} \quad 8-7$$

式中: $P$  为转化的预维生素  $D_3$  百分含量; $P_{in}$  为内标物响应值; $m_r$  为维生素  $D_3$  标准品质量,g; $D_{in}$  为内标稀释倍数; $P_{pre}$  为预维生素  $D_3$  峰的响应值; $m_{in}$  为内标物质量,g; $D_{pre}$  为维生素  $D_3$  标准品稀释倍数。

未转化维生素  $D_3$  质量分数按公式 8-8 计算:

$$Q = \frac{F_D \times P_D \times m_{in} \times D_r}{P_{in} \times m_r \times D_{in}} \quad 8-8$$

式中: $F_D$  为校正因子; $P_D$  为标准品中未转化的维生素  $D_3$  峰响应值; $m_{in}$  为内标物称量,g; $D_r$  为维生素  $D_3$  标准品稀释倍数; $P_{in}$  为内标峰响应值; $m_r$  为维生素  $D_3$  标准品称量,g; $D_{in}$  为内标稀释倍数。

转化的预维生素  $D_3$  质量分数按公式 8-9 计算:

$$w(\text{转化的预维生素 } D_3) = 100 - w(\text{未转化维生素 } D_3) \quad 8-9$$

$F$ (预维生素  $D_3$  转化成维生素  $D_3$  的转化因子)按公式 8-10 计算:

$$F = \frac{F_{pre}}{F_D} \quad 8-10$$

式中: $F$  为预维生素  $D_3$  转化成维生素  $D_3$  转化因子; $F_{pre}$  为预维生素  $D_3$  校正因子; $F_D$  为校正因子。

#### 8.2.2.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

### 8.2.3 维生素 E 的分析测定

#### 8.2.3.1 适用范围

本方法适用于以维生素 E 为原料,加入适当的吸附剂制成的维生素 E 粉,在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。



## 8.2.3.2 定性鉴别

(1)试剂与溶液。无水乙醇(GB 678);硝酸(GB 626)。

(2)鉴别方法。称取试样约相当于维生素 E 15 mg,加无水乙醇 10 mL 溶解后,加硝酸 2 mL,摇匀,在 75 °C 加热约 15 min,溶液显橙红色。

## 8.2.3.3 维生素 E 含量的测定

(1)试剂和溶液。95%乙醇(GB 679);无水乙醇(GB 678);硫酸(GB 625);10 g · L<sup>-1</sup>二苯胺(GB 681);硫酸溶液;硫酸铈(HG 10-2244);硫酸铈标准液:0.01 mol · L<sup>-1</sup>。

(2)测定方法。称取试样约相当于维生素 E 0.18 g(准确至 0.000 2 g),置于 100 mL 容量瓶中,加无水乙醇至刻度。振摇 30 min,用干燥滤纸滤过,弃去初滤液,精密吸取滤液 50 mL,置于回流瓶中,加硫酸 3 mL,摇匀,加热回流 3 h,放冷,移置于 100 mL 容量瓶中,用无水乙醇洗涤容器,洗液并入容量瓶中,再加无水乙醇稀释至刻度,摇匀。

精密吸取溶液 25 mL,加乙醇 20 mL、水 10 mL、二苯胺硫酸溶液 2 滴,用 0.01 mol · L<sup>-1</sup>硫酸铈标准液滴定,滴定速度以每 10 s 25 滴为宜,至溶液由亮黄色转变为灰紫色,持续 10 s,即为终点,并将滴定结果用空白试验校正。

(3)计算和结果的表示。试样中含维生素 E 质量分数按公式 8-11 计算。

$$w(\text{维生素 E}) = \frac{(V - V_0) \times F \times 0.002\ 364 \times 8}{m} \quad 8-11$$

式中:V 为试样溶液消耗硫酸铈标准液的体积, mL;V<sub>0</sub> 为空白溶液消耗硫酸铈标准液的体积, mL;F 为硫酸铈标准液浓度校正系数;0.002 364 为滴定度(1 mL 的 0.01 mol · L<sup>-1</sup>硫酸铈标准液相当于 0.002 364 g 的 C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O<sub>3</sub>);8 为试样稀释倍数;m 为试样质量,g。

## 8.2.3.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

8.2.4 维生素 K<sub>3</sub>(亚硫酸氢钠甲萘醌)的分析测定

## 8.2.4.1 适用范围

本方法适用于化学合成法制得的维生素 K<sub>3</sub>,在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

## 8.2.4.2 定性鉴别

(1)试剂和溶液。无水碳酸钠(GB 639)溶液:取无水碳酸钠 10 g,加水溶解并稀释到 90 mL;三氯甲烷(氯仿)(GB 682);95%乙醇(GB 679);亚硫酸氢钠

(HG 3-1291);氨水(GB 631);氰乙酸乙酯;氢氧化钠(GB 629)溶液:取氢氧化钠 10 g,加水溶解并稀释至 30 mL; $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸(GB 622)溶液;氨水的乙醇溶液:取氨水与乙醇等体积混合即得。

(2)鉴别方法。

①称取试样约 0.1 g,加水 10 mL 溶解,加碳酸钠溶液 3 mL,即发生甲萘醌的鲜黄色沉淀,用氯仿 5 mL 萃取甲萘醌沉淀,氯仿溶液通过用氯仿洗涤过的滤器过滤,滤液在热水浴中蒸去氯仿,残余物用少量乙醇溶解,并重新蒸干,残渣测其熔点应为  $104\sim 107\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

②称取①项下得到的甲萘醌沉淀约 50 mg,加水 5 mL 后,加亚硫酸氢钠 75 mg,在水浴上加热并剧烈振摇,直到全部溶解呈几乎无色的溶液,用水稀释到 50 mL,摇匀,取 2 mL,加氨水的乙醇溶液 2 mL,振摇,加氰乙酸乙酯 3 滴,即产生深紫蓝色,随即加氢氧化钠溶液 1 mL,溶液转变成绿色,随即变成黄色。

③移取试样 4% 的水溶液 2 mL,加数滴盐酸溶液,并温热,即发生二氧化硫的臭气。

#### 8.2.4.3 亚硫酸氢钠甲萘醌含量的测定

(1)试剂和溶液。三氯甲烷(氯仿)(GB 682);无水乙醇(GB 678);无水碳酸钠(GB 639)溶液:取无水碳酸钠 10 g,加水溶解并稀释到 90 mL;甲萘醌对照品。

标准溶液制备:称取甲萘醌对照品约 0.05 g(准确至 0.000 02 g),置于 250 mL 容量瓶中,用氯仿溶解,并稀释到刻度,摇匀。精密吸取 2 mL 置于 100 mL 容量瓶中,用无水乙醇稀释到刻度,摇匀。

试样溶液制备:称取试样 1.3 g(准确至 0.000 2 g),置于 250 mL 量瓶中,用水溶解并稀释到刻度,摇匀。精密吸取 25 mL 于分液漏斗中,加氯仿 40 mL,碳酸钠溶液 5 mL,剧烈振摇 30 s,静置分层,分出的氯仿层通过预先用氯仿湿润的棉花过滤入 250 mL 容量瓶中,再用氯仿 40 mL 迅速洗涤滤器,洗液并入量瓶中,水层用氯仿萃取二次,每次约 20 mL,萃取液过滤,并用氯仿 20 mL 洗涤滤器,洗液和全部滤液并入容量瓶中,用氯仿稀释到刻度,摇匀。精密吸取 2 mL 置于 100 mL 容量瓶中,用无水乙醇稀释到刻度,摇匀。

(2)仪器和设备。分光光度计,附 1 cm 石英比色杯。

(3)测定方法。标准溶液和试样溶液用分光光度计在  $(250\pm 1)\text{ nm}$  波长处测定吸收度,用 2% 氯仿的无水乙醇溶液作空白。

(4)计算和结果的表示。试样中亚硫酸氢钠甲萘醌质量分数按公式 8-12 计算。

$$w(\text{亚硫酸氢钠甲萘醌}) = \frac{A_2 \times \rho_1}{A_1 \times \rho_2} \times 191.82 \quad 8-12$$

式中:  $A_1$  为标准溶液的吸收度;  $A_2$  为试样溶液的吸收度;  $\rho_1$  为标准溶液的浓度,  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $\rho_2$  为试样溶液的浓度,  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 191.82 为校正系数。

#### 8.2.4.4 亚硫酸氢钠含量的测定

(1) 试剂与溶液。0.1 mol · L<sup>-1</sup> 碘液; 盐酸(GB 622); 硫代硫酸钠(GB 637); 可溶性淀粉(HG B 3095)。

淀粉指示液: 称取可溶性淀粉 0.5 g, 加入 5 mL 水搅匀后, 缓缓倾入 100 mL 沸水中, 随加随搅拌, 继续煮沸 2 min, 冷却后倾取上清液, 即得。

0.1 mol · L<sup>-1</sup> 硫代硫酸钠标准溶液。配制及标定方法见附录八。

(2) 测定方法。称取试样 1.5 g (准确至 0.000 2 g), 置于 100 mL 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀。精确吸取 20 mL 于碘量瓶中, 同时吸取水 20 mL 于另一个碘量瓶中(作空白)。分别加碘液 25 mL, 密塞, 放置 5 min, 分别加盐酸 1 mL, 分别用硫代硫酸钠标准溶液滴定剩余的碘, 用淀粉指示液 3 mL 作指示剂。

(3) 计算和结果的表示。试样中亚硫酸氢钠质量分数按公式 8-13 计算。

$$w(\text{亚硫酸氢钠}) = \frac{(V_0 - V) \times F \times 0.005\ 203}{m \times 1/5} \quad 8-13$$

式中:  $V_0$  为空白溶液消耗的硫代硫酸钠标准溶液体积, mL;  $V$  为试样溶液消耗的硫代硫酸钠标准溶液体积, mL;  $F$  为硫代硫酸钠标准溶液的浓度校正系数; 0.005 203 为滴定度(1 mL 的 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 碘液相当于 0.005 203 g 的亚硫酸氢钠);  $m$  为试样的质量, g。

#### 8.2.4.5 水分的测定

(1) 试剂和溶液。无水甲醇(GB 625)。碘硫溶液(费休氏试液): 按中国药典 1985 五年版、二部附录 41 页配制与标定。

(2) 测定方法。称取试样 0.2 g (准确至 0.000 2 g), 置干燥具塞的玻璃瓶中, 加无水甲醇 10 mL, 不断振摇(或搅拌), 用碘硫溶液滴定至溶液由浅黄色变为红棕色, 或用水停滴定法(见 GB 606)指示终点。另做空白试验校正。

(3) 计算和结果表示。试样中水分质量分数按公式 8-14 计算。

$$w(\text{水分}) = \frac{(V - V_0) \times F}{m} \quad 8-14$$

式中:  $V_0$  为空白消耗的碘硫溶液体积, mL;  $V$  为试样消耗的碘硫溶液体积, mL;

$F$  为滴定度(1 mL 的碘硫溶液相当于水的克数  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ );  $m$  为试样的质量,  $\text{g}$ 。

### 8.2.5 维生素 $B_1$ (盐酸硫胺素)的分析测定

#### 8.2.5.1 适用范围

本方法适用于化学合成法制得的维生素  $B_1$ (盐酸硫胺素),在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.5.2 定性鉴别

(1)试剂和溶液。① $43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠(GB 629)溶液:取氢氧化钠 4.3 g,加水溶解成 100 mL。② $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁氰化钾(GB 644)溶液:取铁氰化钾 1 g,加水 10 mL 使溶解。本液现配现用。③正丁醇(HG 3-1012)。④二氧化锰(HG B 3255)。⑤硫酸(GB 625)。⑥碘化钾(GB 1272)。⑦可溶性淀粉(HG B 3095)。⑧淀粉指示液:称取可溶性淀粉 0.5 g,加水 5 mL 搅匀后,缓缓倾入 100 mL 沸水中,随加随搅拌,继续煮沸 2 min,放冷,倾取上清液,即得。⑨碘化钾淀粉试纸:取滤纸条浸入含有碘化钾 0.5 g 的新配制的淀粉指示液 100 mL 中,湿透后,取出干燥,即得。

(2)鉴别方法。①称取试样约 5 mg,加氢氧化钠溶液 2.5 mL 溶解后,加铁氰化钾溶液 0.5 mL 与正丁醇 5 mL,强力振摇 2 min,放置使分层。上面的醇层显强烈的蓝色荧光,加酸使成酸性,荧光即消失,再加碱使成碱性,荧光又显出。②本品的水溶液呈氯化物的鉴别反应:称取试样 0.5 g,置干燥试管中,加二氧化锰 0.5 g,混匀,加硫酸湿润,缓缓加热,即发生氯气,能使湿润的碘化钾淀粉试纸显蓝色。

#### 8.2.5.3 维生素 $B_1$ (盐酸硫胺素)含量的测定

(1)试剂和溶液。①盐酸(GB 622)。② $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硅钨酸溶液。③盐酸(GB 622)溶液:取盐酸 5 mL,加水稀释至 100 mL。④丙酮(GB 686)。

(2)测定方法。称取试样 0.05 g(准确至 0.000 2 g),加水 50 mL 溶解后,加盐酸 2 mL 煮沸,立即滴加硅钨酸溶液 4 mL,继续煮沸 2 min。用在  $80^\circ\text{C}$  干燥至恒重的 4#垂熔坩埚滤过,沉淀先用煮沸的盐酸溶液 20 mL 分次洗涤,再用水 10 mL 洗涤 1 次,最后用丙酮洗涤 2 次,每次 5 mL,沉淀物在  $80^\circ\text{C}$  干燥至恒重。

(3)计算和结果表示。试样中盐酸硫胺素质量分数按公式 8-15 计算。

$$w(\text{盐酸硫胺素}) = \frac{m_1 \times 0.1939}{m \times (1 - w_1)} \quad 8-15$$

式中:  $m_1$  为干燥后沉淀质量, g;  $m$  为试样的质量, g;  $w_1$  为试样干燥失重质量分数; 0.193 9 为盐酸硫胺硅钨酸盐换算成盐酸硫胺素系数。

#### 8.2.5.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

### 8.2.6 维生素 B<sub>1</sub>(硝酸硫胺素)的分析测定

#### 8.2.6.1 适用范围

本方法适用于化学合成法制得的维生素 B<sub>1</sub>(硝酸硫胺素), 在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.6.2 鉴别方法

(1) 试剂和溶液。①硫酸(GB 625)。②80 g · L<sup>-1</sup>硫酸亚铁(GB 664)溶液: 取硫酸亚铁结晶 8 g, 加新沸过的冷水 100 mL 使溶解, 摇匀, 本液应临用新制。③冰乙酸(GB 676)。④100 g · L<sup>-1</sup>乙酸铅(GB 3-974)溶液: 取乙酸铅 10 g, 加新沸过的冷水溶解后, 滴加冰乙酸使溶液澄清, 再加新沸过的冷水使成 100 mL, 摇匀。⑤氢氧化钠(GB 629)溶液。⑥100 g · L<sup>-1</sup>铁氰化钾(GB 644)溶液: 取铁氰化钾 1 g, 加水 10 mL 使溶解。本液应临用新制。⑦异丁醇。

(2) 鉴别方法。①移取 2% 试样溶液 2 mL, 冷却后缓缓加入硫酸亚铁溶液 2 mL, 两层溶液接触处产生棕色环。②溶解试样约 5 mg 于乙酸铅溶液 1 mL 和氢氧化钠溶液 1 mL 的混合液中, 产生黄色; 再在水浴上加热几分钟, 溶液变成棕色; 放置有硫化铅析出。③称取试样约 5 mg, 加氢氧化钠溶液 2.5 mL, 溶解后, 加铁氰化钾溶液 0.5 mL 与异丁醇 5 mL, 强力振摇 2 min, 放置使分层, 上面的醇层显强烈的蓝色荧光; 加酸使成酸性, 荧光即消失, 再加碱使成碱性, 荧光又显出。

#### 8.2.6.3 维生素 B<sub>1</sub>(硝酸硫胺素)含量的测定

(1) 仪器设备。一般实验室仪器设备。

(2) 试剂和溶液。①盐酸(GB 622)。②100 g · L<sup>-1</sup>硅钨酸溶液。③盐酸(GB 622)溶液: 取盐酸 5 mL, 加水稀释至 100 mL。④丙酮(GB 686)。

(3) 测定方法。称取试样 1.0 g (准确至 0.002 g) 加水 50 mL 溶解后, 加盐酸 2 mL 煮沸, 立即滴加硅钨酸溶液 10 mL, 继续煮沸 2 min。用在 80 °C 干燥至恒重的 4# 垂熔漏斗滤过, 沉淀先用煮沸的盐酸溶液洗涤 2 次, 每次 10 mL, 再用水 10 mL 洗涤 1 次, 最后用丙酮洗涤 2 次, 每次 5 mL, 沉淀物在 80 °C 干燥至恒重。

(4) 计算和结果的表示。试样中硝酸硫胺素质量分数按公式 8-16 计算。

$$w(\text{硝酸硫胺素}) = \frac{m_1 \times 0.1882}{m \times (1 - w_1)} \quad 8-16$$

式中:  $m$  为干燥后沉淀质量,  $g$ ;  $m$  为试样的质量,  $g$ ;  $w_1$  为试样干燥失重质量分数; 0.1882 为硝酸硫胺硅钨酸盐换算成硝酸硫胺素系数。

#### 8.2.6.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

### 8.2.7 维生素 B<sub>2</sub>(核黄素)的分析测定

#### 8.2.7.1 适用范围

本方法适用于生物发酵法或合成法制得的维生素 B<sub>2</sub>, 在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.7.2 定性鉴别

(1)试剂和溶液。①连二亚硫酸钠(GB 2-809)。②冰乙酸(GB 676)。③14 g · L<sup>-1</sup>乙酸钠(GB 693)溶液。

(2)鉴别方法。①称取试样约 1 mg, 加水 100 mL 溶解后, 溶液在透射光下显淡黄绿色并有强烈的黄绿色荧光; 分成 2 份, 1 份中加矿酸或碱溶液, 荧光即消失; 另一份中加连二亚硫酸钠结晶少许, 摇匀后, 黄色即消退, 荧光即消失。②按含量测定制备溶液, 用分光光度计(267 ± 1)nm, (375 ± 1)nm 与 (444 ± 1)nm 的波长处有最大吸收。③吸光度 375 nm 与吸光度 276 nm 的比值为 0.31 ~ 0.33。④吸光度 444 nm 与吸光度 267 nm 的比值为 0.36 ~ 0.39。

#### 8.2.7.3 维生素 B<sub>2</sub>含量的测定

(1)仪器设备。分光光度计, 附 1 cm 比色皿及一般实验室的仪器设备。

(2)试剂和溶液。①冰乙酸(GB 676)。②14 g · L<sup>-1</sup>乙酸钠(GB 693)溶液。

(3)测定方法。避光操作。称取试样约 0.075 g (准确至 0.0002 g), 置烧杯中, 加冰乙酸 1 mL 与水 75 mL, 加热溶解后, 加水稀释, 冷却。移置 500 mL 容量瓶中, 再加水稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 10 mL 置 100 mL 容量瓶中, 加乙酸钠溶液 7 mL, 并用水稀释至刻度, 摇匀; 另取乙酸钠溶液 7 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度, 作为空白对照液, 于 1 cm 比色皿内, 用分光光度计于 (444 ± 1)nm 波长处测定吸光度。

(4)计算和结果表示。试样中维生素 B<sub>2</sub> 质量分数按公式 8-17 计算。

$$w(\text{维生素 B}_2) = \frac{A}{323 \times l \times \rho} \quad 8-17$$

式中:  $A$  为试样在  $(444 \pm 1)\text{nm}$  波长处测得的吸光度;  $323$  为维生素  $B_2$  在  $(444 \pm 1)\text{nm}$  波长处的吸收系数,  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ;  $l$  为光路长度,  $1\text{ cm}$ ;  $\rho$  为  $100\text{ mL}$  溶液中试样的体积质量。

#### 8.2.7.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

### 8.2.8 维生素 $B_6$ 的分析测定

#### 8.2.8.1 适用范围

本方法适用于合成法制得的维生素  $B_6$ , 在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.8.2 定性鉴别

(1) 试剂与溶液。①  $200\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸钠 (GB 693) 溶液。②  $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸 (GB 628) 溶液。③  $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氯亚胺基-2,6-二氯醌乙醇溶液。④ 95% 乙醇 (GB 679)。⑤ 硝酸 (GB 626) 溶液: 取硝酸  $105\text{ mL}$ , 加水稀释至  $1\,000\text{ mL}$ ; ⑥ 氨水 (GB 631) 试液: 取氨水  $40\text{ mL}$ , 加水使成  $100\text{ mL}$ 。⑦  $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸银 (GB 670) 溶液。

(2) 鉴定方法。① 称取试样约  $10\text{ mg}$ , 加水  $100\text{ mL}$  溶解后, 各取  $1\text{ mL}$ , 分别置甲、乙两个试管中, 各加  $200\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸钠溶液  $2\text{ mL}$ , 甲管中加水  $1\text{ mL}$ , 乙管中加  $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硼酸溶液  $1\text{ mL}$ , 混匀, 各迅速加氯亚胺基-2,6-二氯醌乙醇溶液  $1\text{ mL}$ , 甲管中显蓝色, 几分钟后即消失, 并转变为红色, 乙管中不显蓝色。② 取①项下试样的水溶液, 加氨水试液使成碱性, 再加硝酸溶液使成酸性后, 加  $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的硝酸银溶液, 即产生白色凝胶状沉淀; 分离, 加氨水试液, 沉淀即溶解, 再加硝酸, 沉淀复生成。

#### 8.2.8.3 维生素 $B_6$ 含量的测定

(1) 试剂和溶液。① 冰乙酸 (GB 676)。②  $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸汞 (HG 2-1096) 溶液: 取乙酸汞  $5\text{ g}$ , 研细, 加温热的冰乙酸使溶解成  $100\text{ mL}$ 。③  $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  结晶紫 (HG 10-2151) 冰乙酸溶液。④ 高氯酸标准溶液:  $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。配制及标定方法见附录八。

(2) 测定方法。称取试样  $0.15\text{ g}$  (准确至  $0.0002\text{ g}$ ), 加冰乙酸  $20\text{ mL}$  与乙酸汞溶液  $5\text{ mL}$ , 温热溶解后, 冷却后加结晶紫指示液  $1$  滴, 用高氯酸标准液滴定, 至溶液显蓝绿色, 并将滴定结果用空白试验校正。

(3) 计算和结果的表示。试样中维生素  $B_6$  质量分数按公式 8-18 计算。

$$w_1(\text{维生素 } B_6) = \frac{(V - V_0) \times c \times 0.02056}{m} \quad 8-18$$

式中:  $V$  为试样溶液消耗高氯酸标准液的体积, mL;  $V_0$  为空白试验消耗高氯酸标准液的体积, mL;  $c$  为高氯酸标准液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 0.020 56 为滴定度(1 mL 的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  高氯酸标准液相当于 0.020 56 g 维生素  $\text{B}_6$ );  $m$  为试样的质量, g。

#### 8.2.8.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

#### 8.2.9 维生素 $\text{B}_{12}$ (氰钴胺)的分析测定

##### 8.2.9.1 适用范围

本方法适用于以维生素  $\text{B}_{12}$  为原料, 加入玉米淀粉或碳酸钙稀释剂制成的维生素  $\text{B}_{12}$  粉剂, 在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

##### 8.2.9.2 定性鉴别

(1) 试剂与溶液。①甲醇(GB 683)溶液: 甲醇: 水(19: 1)混合液( $V: V$ )。②硅胶 G(薄层层析用): 10~40 目。③  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液: 称取 1 g 羧甲基纤维素钠, 加入 300 mL 水, 加热煮沸溶解。放置 24~48 h 使用。④维生素  $\text{B}_{12}$  对照品。

(2) 测定方法。①最大吸收: 取适量试样, 溶于水中, 用 1 cm 比色杯, 在分光光度计波长 300~600 nm 间测定溶液的吸收光谱, 应在  $(361 \pm 1) \text{ nm}$ 、 $(550 \pm 2) \text{ nm}$  处有最大吸收。②薄层鉴别: 取适量硅胶 G, 用羧甲基纤维素钠溶液调成糊状, 均匀地涂布在  $5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$  的玻璃板上, 在室温下晾干。

称取相当于 2 mg 维生素  $\text{B}_{12}$  的试样, 加入 2 mL 水振摇 10 min, 离心 5 min, 取上清液作为试样溶液。

称取相当于 2 mg 维生素  $\text{B}_{12}$  的对照品, 加入 2 mL 水振摇 10 min, 作为对照品溶液。分别吸取 10 mL 试样溶液和对照品溶液  $10 \mu\text{L}$ , 在距硅胶薄层板底边 2.5 cm 处的基线上点样。用甲醇-水混合液作为展开剂, 当斑点展开至 12 cm 时, 取出硅胶薄层板并在室温下晾干, 使试样溶液和对照品溶液分别显红色斑点, 它们的比移值应当相等。

##### 8.2.9.3 维生素 $\text{B}_{12}$ (氰钴胺)含量的测定

(1) 仪器设备。①分光光度计; ②容量瓶 100 mL, 1 000 mL; ③一般实验室仪器设备。

(2) 试剂和溶液。①维生素  $\text{B}_{12}$  标准溶液; ②维生素  $\text{B}_{12}$  对照品溶液。

(3) 测定方法。准确称取相当于 2 mg 维生素  $\text{B}_{12}$  的试样, 置于 100 mL 容量



瓶中,加入水 80 mL,充分混匀后稀释至刻度,再混匀。经干燥滤纸过滤(必要时可离心),弃去初滤液,收集滤液。

准确称取 20 mg 维生素 B<sub>12</sub>对照品,置于 1 000 mL 容量瓶中,用水溶解并稀释至刻度。

在分光光度计波长(361±1)nm 处,用水作为空白液,测定试样溶液和标准溶液的吸光度。

(4)计算和结果表示。试样中维生素 B<sub>12</sub>(氰钴胺)质量分数按公式 8-19 计算。

$$w(\text{维生素 B}_{12}) = \frac{A_1 \times w_1 \times m_2 \times V_1}{A_2 \times m_1 \times V_2} \quad 8-19$$

式中:  $A_1$  为试样溶液的吸光度;  $A_2$  为标准溶液的吸光度;  $w_1$  为对照品维生素 B<sub>12</sub> 质量分数;  $m_1$  为试样的质量(干基计),g;  $m_2$  为对照品的质量(干基计),g;  $V_1$  为试样溶液的总体积,mL;  $V_2$  为对照品溶液的总体积,mL。

#### 8.2.9.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

### 8.2.10 饲料添加剂叶酸的分析测定

#### 8.2.10.1 适用范围

本方法适用于化学合成法制得的叶酸,在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.10.2 定性鉴别

(1)仪器设备。分光光度计。

(2)试剂与溶液。①0.1 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠(GB 629)溶液。②0.1 mol·L<sup>-1</sup>高锰酸钾(GB 643)溶液。

(3)鉴别方法。①称取试样约 0.2 mg,加氢氧化钠溶液 10 mL,振摇使溶解,加高锰酸钾溶液 1 滴,振摇混匀后,溶液显蓝色,在紫外光灯下,显蓝色荧光。②取试样,加氢氧化钠溶液制成 1 mL 中含 10 μg 试样的溶液,用分光光度计测定,在(256±1)nm,(283±2)nm 及(365±4)nm 的波长处有最大吸收。吸光度 256 nm 与吸光度 365 nm 的比值应为 2.8~3.0。

#### 8.2.10.3 叶酸含量的测定

(1)仪器设备。分光光度计,附 1 cm 比色杯。

(2)试剂与溶液。①0.1 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠(GB 629)溶液。②盐酸(GB

622)溶液;取盐酸 234 mL,加水稀释至 1 000 mL。③锌粉(HG 3-1672)。④ $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠(GB 633)溶液。⑤ $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨基磺酸铵溶液。⑥ $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 二盐酸萘基乙二胺溶液。⑦对照品溶液的制备:称取叶酸对照品(同时测定水分)0.08 g(准确至 0.000 02 g),置 100 mL 容量瓶中,加氢氧化钠溶液使溶解,并稀释至刻度,摇匀。精密吸取 2 mL,置另一 100 mL 容量瓶中,加盐酸溶液 20 mL,用水稀释至刻度,摇匀,即得。1 mL 中约含叶酸对照品  $10\text{ }\mu\text{g}$ 。⑧试样溶液的制备:按对照品溶液的制备法制备。即得。1 mL 中约含叶酸对照品  $16\text{ }\mu\text{g}$ 。

(3)测定方法。精密量取对照品溶液与试样溶液各 60 mL,分别置具塞锥形瓶中,各加锌粉 0.5 g(可稍过量),连续振摇 20 min,用干燥滤纸滤过,弃去初滤液,各精密吸取续滤液 2 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,各依次加水 3 mL、盐酸溶液 1 mL 与亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,放置 2 min,各加氨基磺酸铵溶液 1 mL,混匀,放置 10 min,各加二盐酸萘基乙二胺溶液 1 mL,混匀,放置 10 min,用水稀释至刻度,摇匀。

另精密吸取对照品溶液与试样溶液各 20 mL,分别置 100 mL 容量瓶中,各加盐酸溶液 20 mL,用水稀释至刻度,摇匀。各精密吸取 2 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,自“依次加水 3 mL”起,依法操作。

另取水 2 mL 置 10 mL 容量瓶中,自“依次加水 3 mL”起,依法操作,作为空白。用分光光度计测定,以 1 cm 的比色杯在 550 nm 的波长处测定上述两组溶液的吸光度。

(4)计算和结果的表示。试样中叶酸质量分数按公式 8-20 计算。

$$w(\text{叶酸}) = \frac{(A_2 - A_4/10) \times m_1(1 - w_1)}{(A_1 - A_3/10) \times m_2(1 - w_2)} \quad 8-20$$

式中: $A_1$  为用锌粉还原对照品溶液吸光度; $A_2$  为用锌粉还原的试样溶液吸光度; $A_3$  为未用锌粉还原的对照品溶液吸光度; $A_4$  为未用锌粉还原的试样溶液吸光度; $m_1$  为对照试样质量,g; $m_2$  为试样质量,g; $w_1$  为对照试样干燥失重质量分数; $w_2$  为试样干燥失重质量分数。

#### 8.2.10.4 干燥失重的测定

(1)仪器设备。真空恒温干燥箱。

(2)测定方法。称取试样 1 g(准确至 0.000 2 g),置于已在 100~105℃真空干燥至恒重的称量瓶内,打开称量瓶盖,置于 100~105℃的真空干燥箱中,压力不超过 0.7 kPa,真空干燥 3 h 后取出,放入干燥器内冷却至室温,称量。

(3)计算和结果的表示。试样干燥失重质量分数按公式 8-21 计算。

$$w(\text{干燥失重}) = \frac{m_1 - m_2}{m} \quad 8-21$$

式中： $m_1$  为干燥前的试样加称量瓶质量，g； $m_2$  为干燥后的试样加称量瓶质量，g； $m$  为试样的质量，g。

### 8.2.11 饲料添加剂 *D*-泛酸钙的分析测定

#### 8.2.11.1 适用范围

本方法适用于化学合成法制得的 *D*-泛酸钙，在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.11.2 定性鉴别

(1)试剂和溶液。①43 g · L<sup>-1</sup>氢氧化钠(GB 629)溶液：取氢氧化钠 4.3 g，加水溶解成 100 mL。②12 g · L<sup>-1</sup>硫酸铜(GB 665)溶液：取硫酸铜 12.5 g，加水溶解成 100 mL。③10 g · L<sup>-1</sup>酚酞(HG BN 3039)乙醇溶液。④1 mol · L<sup>-1</sup>盐酸(GB 622)溶液。⑤90 g · L<sup>-1</sup>三氯化铁(GB 1621)溶液。⑥35 g · L<sup>-1</sup>草酸铵(HG 3-976)溶液：另取草酸铵 3.5 g，加水溶解成 100 mL。⑦冰乙酸(GB 676)。

(2)鉴别方法。①称取试样约 50 mg，加氢氧化钠溶液 5 mL，振摇，加硫酸铜溶液 2 滴，即显蓝紫色。②称取试样约 50 mg，加氢氧化钠溶液 5 mL，振摇，煮沸 1 min，冷却后，加酚酞指示液 1 滴，加 1 mol · L<sup>-1</sup>盐酸液至溶液退色，再多加 0.5 mL 盐酸溶液，加三氯化铁溶液 2 滴，即显鲜明的黄色。

本品的水溶液显钙盐的鉴别反应：称取试样 0.5 g，加水 50 mL 溶解，加草酸铵溶液，即发生白色沉淀，分离，所得沉淀不溶于冰乙酸，但溶于盐酸。

#### 8.2.11.3 钙含量的测定

(1)仪器设备。仪器设备为一般实验室仪器设备。

(2)试剂与溶液。①氯化铵(GB 658)。②氨水(GB 631)。③氨-氯化铵缓冲液(pH10.0)：取氯化铵 5.4 g，加水 20 mL 溶解后，加氨水 35 mL，再加水稀释至 100 mL，摇匀。④23 g · L<sup>-1</sup>硫酸镁(GB 671)溶液：取硫酸镁 2.3 g，加水使溶解成 100 mL。⑤铬黑 T(HG 10-2372)。⑥氯化钠(GB 1266)。⑦铬黑 T 指示剂：取铬黑 T 0.1 g，加氯化钠 10 g，研磨均匀，即得。⑧乙二胺四乙酸二钠(GB 1401)。⑨0.05 mol · L<sup>-1</sup>乙二胺四乙酸二钠标准液。配制及标色方法见附录八。

(3)测定方法。称取试样 0.5 g (准确至 0.000 2 g)，置 250 mL 锥形瓶中，加水 10 mL 使溶解；另取水 10 mL，加氨-氯化铵缓冲液 10 mL，硫酸镁溶液 1 滴与铬黑 T 指示剂 50~70 mg，滴加 0.05 mol · L<sup>-1</sup>乙二胺四乙酸二钠标准液至溶液自紫红色转变为纯蓝色。将此溶液倾入上述锥形瓶中，用 0.05 mol · L<sup>-1</sup>乙二

胺四乙酸二钠标准液滴定,至溶液自紫红色转变为纯蓝色。

(4)计算和结果的表示。试样中钙质量分数按公式 8-22 计算。

$$w(\text{Ca}) = \frac{V \times c \times 0.002\ 004}{m \times (1 - w_1)} \quad 8-22$$

式中:  $V$  为试样消耗  $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸二钠标准液体积, mL;  $c$  为  $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸二钠标准液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为试样的质量, g;  $w_1$  为试样干燥失重质量分数; 0.002 004 为滴定度 (1 mL  $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸二钠标准液相当于 0.002 004 g 钙)。

#### 8.2.11.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

### 8.2.12 饲料添加剂 70%氯化胆碱的分析测定

#### 8.2.12.1 适用范围

本方法适用于以三甲胺盐酸水溶液与环氧乙烷反应或三甲胺与氯乙醇反应生成的 70%氯化胆碱水溶液及其粉剂制品。

#### 8.2.12.2 定性鉴别

(1)仪器和设备。一般实验室仪器设备。

(2)试剂与溶液。①硫氰酸铬铵溶液:称取 0.5 g 硫氰酸铬铵,用 20 mL 水溶解,静置 30 min,过滤。用时现配制。保存期 2 d。②碘化汞钾溶液:称取 1.36 g 二氯化汞,用 60 mL 水溶解,另称取 5 g 碘化钾,用 10 mL 水溶解,把两种溶液混匀,用水稀释至 100 mL。③氢氧化钾;(GB 2306)。④高锰酸钾;(GB 643)。⑤红色石蕊试纸:把滤纸裁成条状,浸入石蕊指示剂中,加少量盐酸使滤纸条成红色,取出阴处晾干备用,变色范围为 pH 4.5 ~ 8.0。⑥ 40%氨水溶液。⑦  $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸银溶液。⑧ 5.7%硫酸溶液:取 5.7 mL 浓硫酸,加水稀释至 100 mL。⑨ 10.5%硝酸溶液:取 10.5 mL 浓硝酸,加水稀释至 100 mL。⑩ 淀粉-碘化钾试纸。按 GB 603 中的规定制备。

(3)鉴别方法。①称取 0.5 g 试样,用 50 mL 水溶解,混匀。分取 5 mL,加入 3 mL 硫氰酸铬铵溶液,生成红色沉淀。②称取 0.5 g 试样,用 10 mL 水溶解,混匀。分取 5 mL,加入 2 滴碘化汞钾溶液,生成浅黄色沉淀。③称取 0.5 g 试样,用 5 mL 水溶解,混匀。加入 2 g 氢氧化钾和几粒高锰酸钾,加热时释放出的氨能使湿润的红色石蕊试纸变蓝。

氯化物的鉴别:取适量的试样,加入氨水溶液成碱性溶液。把溶液均分成 2

份,一份中加硝酸溶液成酸性溶液,加入硝酸银溶液,生成白色凝乳状沉淀。分离出的沉淀能在氨水溶液中溶解,再加入硝酸溶液,即刻生成沉淀。另一份加入硫酸溶液成酸性溶液,加入几粒高锰酸钾,加热时释放出的氯化物能使淀粉-碘化钾试纸显变蓝色。

#### 8.2.12.3 70%液态氯化胆碱含量的测定(非水滴定法)

(1)原理。本含量的测定采用非水滴定法。用乙酸汞将氯化胆碱转化为乙酸盐和难电离的氯化汞,在乙酸介质中以高氯酸对生成的乙酸盐进行滴定。

(2)仪器设备。一般试验室仪器设备。

(3)试剂与溶液。①冰乙酸:优级纯[纯度 $\geq 99.6\%$ ]。② $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸汞溶液:称取 $5\text{ g}$ 乙酸汞,研细,用微热的冰乙酸溶解并稀释至 $100\text{ mL}$ 。在棕色瓶内密封保存;③ $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 结晶紫指示剂冰乙酸溶液:取 $0.2\text{ g}$ 结晶紫,加 $100\text{ mL}$ 冰乙酸。④ $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸标准溶液配制标定方法见附录八。

如果标定时的温度与使用时的温度不同,应重新标定或用公式 8-23 对其浓度进行校正。

$$c_1 = \frac{c_0}{1 + 0.0011(t_1 - t_0)} \quad 8-23$$

式中: $c_1$ 为使用时高氯酸标准溶液的浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $c_0$ 为标定时高氯酸标准溶液的浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $t_1$ 为使用时的温度, $^{\circ}\text{C}$ ;  $t_0$ 为标定时的湿度, $^{\circ}\text{C}$ ;  $0.0011$ 为冰乙酸的体膨胀系数。

(4)测定方法。称取 $0.3\text{ g}$ 试样(准确至 $0.0002\text{ g}$ ),置于 $100\text{ mL}$ 锥形瓶中,加入 $20\text{ mL}$ 冰乙酸, $2\text{ mL}$ 乙酸酐, $10\text{ mL}$ 乙酸汞溶液和 $2$ 滴结晶紫指示剂,摇匀。用高氯酸标准溶液滴定至溶液呈纯蓝色。同时做试剂空白试验。

(5)计算和结果表示。试样中氯化胆碱质量分数按公式 8-24 计算。

$$w(\text{氯化胆碱}) = \frac{c(V_1 - V_0) \times 139.63}{m \times 1000} \quad 8-24$$

式中: $c$ 为高氯酸标准溶液的浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为滴定试样溶液时高氯酸标准溶液的消耗体积, $\text{mL}$ ;  $V_0$ 为试剂空白试验时高氯酸标准溶液的消耗体积, $\text{mL}$ ;  $139.63$ 为氯化胆碱的分子量; $m$ 为试样的质量, $\text{g}$ 。

#### 8.2.12.4 70%液态氯化胆碱中乙二醇含量的测定

(1)原理。高碘酸(高碘酸盐)将乙二醇氧化,生成的碘酸(或碘酸盐)及过量的高碘酸均与碘化钾反应,释放出碘。用硫代硫酸钠标准溶液滴定碘。乙二醇的量可由空白试验和试样试验中所消耗硫代硫酸钠标准溶液的差值来求得。

(2)仪器设备。一般实验室仪器设备。

(3)试剂与溶液。① $4\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 高碘酸钠溶液。②5%硫酸溶液。③ $200\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘化钾溶液;用时现配制。④ $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 淀粉指示剂。⑤ $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫代硫酸钠标准溶液。

(4)测定方法。称取 $4.5\text{ g}$ 试样(准确至 $0.0002\text{ g}$ ),置于 $250\text{ mL}$ 锥形瓶中,准确加入 $25\text{ mL}$ 高碘酸钠溶液,加 $25\text{ mL}$ 硫酸溶液,在暗处室温放置 $30\text{ min}$ ,加入 $10\text{ mL}$ 碘化钾溶液,立即用硫代硫酸钠的标准溶液滴定至溶液呈浅黄色,加入 $1\text{ mL}$ 淀粉指示剂,继续滴定至溶液无色即为终点。

同时进行试剂空白试验。

(5)计算和结果表示。试样中乙二醇质量分数按公式 8-25 计算。

$$w(\text{乙二醇}) = \frac{c(V_1 - V_0) \times 62.07}{m \times 20} \quad 8-25$$

式中: $c$ 为硫代硫酸钠标准溶液的浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为滴定试样溶液时硫代硫酸钠标准溶液的消耗体积, $\text{mL}$ ;  $V_0$ 为试剂空白试验时硫代硫酸钠标准溶液的消耗体积, $\text{mL}$ ;  $62.07$ 为乙二醇的相对分子质量; $m$ 为试样质量, $\text{g}$ 。

#### 8.2.12.5 70%液态氯化胆碱中氯乙醇含量的测定

(1)原理。氯化胆碱在水溶液中离解出氯离子,经加入过量硝酸银使沉淀完全;其中氯乙醇分子上的氯在加入碳酸钠的碱性条件下离解出来,而后与硝酸银反应生成氯化银沉淀,与氯离子标准比浊液比浊。

(2)仪器设备。一般实验室仪器设备。

(3)试剂与溶液。①10.5%硝酸溶液。②40%氨水溶液。③ $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液。④无氯离子滤纸:用硝酸溶液反复洗涤直至无氯离子为止。⑤ $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸银溶液。⑥ $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸银溶液。⑦ $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠标准储备液:取适量基准氯化钠试剂,在 $500 \sim 600\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温电炉中灼烧至恒重。准确称取 $0.5845\text{ g}$ ,用水溶解并稀释至 $100\text{ mL}$ ,混匀。⑧ $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠标准使用液:精确量取 $10\text{ mL}$ 氯化钠储备液于容量瓶中,用水稀释至 $100\text{ mL}$ ,混匀。

(4)测定方法。称取 $1\text{ g}$ 试样(准确至 $0.0002\text{ g}$ ),加水 $10\text{ mL}$ ,加 $10\text{ mL}$ 硝酸溶液,加 $10\text{ mL}$ 的 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸银溶液,摇匀使沉淀完全。用无氯离子滤纸过滤到 $250\text{ mL}$ 锥形瓶中,用 $30\text{ mL}$ 水分别洗涤沉淀3次,将洗液并入锥形瓶中,加入 $50\text{ mL}$ 碳酸钠溶液,摇匀,再加入 $10\text{ mL}$ 氨水溶液,在水浴上回流 $20\text{ min}$ ,迅速冷却至室温,把此溶液定量地转入 $1000\text{ mL}$ 容量瓶中,用水稀释至刻度,混匀。

分取 10 mL 置于 50 mL 纳氏比色管中,用硝酸溶液调溶液至中性,再加入 10 mL 硝酸溶液,用水补充至 40 mL,加入 1 mL 的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸银溶液,用水稀释至 50 mL,混匀,在暗处放置 10 min。

另取一支 50 mL 纳氏比色管,加入 2 mL 氯化钠标准使用液,同样按上述方法操作,制成标准比浊液并与试样溶液比较。试样浊度不得大于标准液,氯乙醇含量不超过 0.2%。

#### 8.2.12.6 70%液态氯化胆碱中三甲胺检验

称取 0.1 g 试样,置于 20 mL 试管中,加入 10 mL 碳酸氢钠饱和溶液,煮沸 30 min,不得逸出三甲胺臭味。

#### 8.2.12.7 70%液态氯化胆碱中灼烧残渣测定

(1)试剂。①硫酸(GB 625)。②盐酸溶液:(1:1)溶液(V:V)。

(2)测定方法。用盐酸溶液浸泡瓷坩埚 24 h,洗净烘干。

称取试样 1~2 g (准确至 0.01 g),置于已在 700~800 °C 灼烧至恒重的瓷坩埚中,加硫酸 0.5~1 mL 使湿润,在电炉上小火缓缓加热至试样完全炭化,移入马福炉中,在 700~800 °C 下灼烧 2 h,取出坩埚,在空气中冷却 1~3 min,移入干燥器中冷却至室温,称重至恒重。

(3)计算和结果的表示。试样灼烧残渣质量分数按公式 8-26 计算。

$$w(\text{灼烧残渣}) = \frac{m_1 - m_2}{m} \quad 8-26$$

式中: $m_1$  为坩埚加残渣质量,g; $m_2$  为坩埚质量,g; $m$  为试样质量,g。

#### 8.2.12.8 70%液态氯化胆碱中铵盐的检验

(1)试剂与溶液。①  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酚酞指示剂乙醇溶液。②  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠标准溶液。③ 中性甲醛溶液:吸取 1 mL 甲醛水溶液,置于 50 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 水和 1 滴酚酞指示剂,用氢氧化钠标准溶液滴定溶液至淡粉红色。

(2)测定方法。称取 0.1 g 试样(准确至 0.000 2 g),置于 250 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 新煮沸过的冷水,1 滴酚酞指示剂,1 mL 中性甲醛溶液,用氢氧化钠标准溶液滴定溶液至淡粉红色。所消耗的氢氧化钠标准溶液不得超过 0.3 mL。

#### 8.2.13 50%粉剂氯化胆碱的分析测定

##### 8.2.13.1 适用范围

本方法适用于以 70%液态氯化胆碱为原料,加入适量赋形剂制得的饲料添加剂 50%粉剂氯化胆碱。

### 8.2.13.2 鉴别方法

称取 2 g 试样,用 20 mL 水溶解,过滤,弃去滤渣,然后按照“70%液态氯化胆碱”的鉴别方法操作。

### 8.2.13.3 50%粉剂氯化胆碱含量测定

(1)试剂与溶液。参见“70%液态氯化胆碱”中的 8.2.12.3(3)。

(2)测定方法。取适量试样,在 80 ℃烘箱中干燥 3 h。准确称取 0.5 g 已干燥的试样,置于 250 mL 锥形瓶中,加入 40 mL 甲醇,振摇 30 min 后过滤,再分别用 20,15,15 mL 甲醇分 3 次洗涤沉淀,将洗涤液并入滤液中。在 35~40 ℃水浴中回收甲醇,至残渣呈干状态。

用 20 mL 微热的冰乙酸溶解残渣后,按“70%液态氯化胆碱”中的 8.2.12.3 中(4)进行操作,按 8.2.12.3(5)计算含量。

### 8.2.13.4 干燥失重的测定

(1)测定方法。称取试样 4 g(准确至 0.000 2 g),置于已在 105 ℃烘箱中干燥至恒重的称量瓶内,打开称量瓶盖,置于 105 ℃烘箱中烘干 2 h,取出放入干燥器内冷却到室温,称重。

(2)计算和结果表示。试样干燥失重质量分数按公式 8-27 计算。

$$w(\text{干燥失重}) = \frac{m_1 - m_2}{m} \quad 8-27$$

式中: $m_1$  为干燥前的试样加称量瓶质量,g; $m_2$  为干燥后的试样加称量瓶质量,g; $m$  为试样的质量,g。

## 8.2.14 维生素 C 含量的分析测定

### 8.2.14.1 适用范围

本方法适用于合成法或发酵法制得的维生素 C,在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

### 8.2.14.2 定性鉴别

(1)试剂与溶液。①0.1 mol·L<sup>-1</sup>硝酸银(GB 670)溶液:称取硝酸银 1.7 g,用水溶解并稀释至 100 mL。②1 g·L<sup>-1</sup>2,6-二氯靛酚钠溶液。

(2)鉴别方法。①称取试样 0.2 g,加水 10 mL 溶解后,取溶液 5 mL,加硝酸银溶液 0.5 mL,即发生银的黑色沉淀。②另取溶液 5 mL,加 2,6-二氯靛酚钠溶液 1~3 滴,试液的颜色即消失。

### 8.2.14.3 维生素 C 含量的测定

(1)仪器设备。仪器设备为一般实验室仪器设备。



(2)试剂与溶液。①6%冰乙酸(GB 676)溶液:取冰乙酸 6 mL,加水稀释至 100 mL。②可溶性淀粉(HG B 3095)。③淀粉指示液:取可溶性淀粉 0.5 g,加水 5 mL 搅匀后,缓缓倾入 100 mL 沸水中,随加随搅拌,继续煮沸 2 min,冷却后倾取上层清液,即得。④碘(GB 675)。⑤碘化钾(GB 1272)。⑥ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘标准液。

(3)测定方法。称取试样 0.2 g (准确至 0.000 2 g),加新煮沸过的冷水 100 mL 与冰乙酸溶液 10 mL 使溶解,加淀粉指示剂 1 mL,立即用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碘标准液滴定,至溶液显蓝色在 30 s 内不退。

(4)计算和结果的表示。试样中维生素 C 含量质量分数按公式 8-28 计算。

$$w(\text{维生素 C}) = \frac{V \times c \times 0.008\ 806}{m} \quad 8-28$$

式中: $V$  为试样消耗碘标准液的体积, mL;  $c$  为碘标准液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 0.008 806 为滴定度(每 1 mL 的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碘标准液相当于 0.008 806 g 的维生素 C);  $m$  为试样的质量, g。

### 8.2.15 烟酸的分析测定

#### 8.2.15.1 适用范围

本方法适用于化学合成法制得的烟酸,在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.15.2 定性鉴别

(1)试剂与溶液。①2,4-二硝基氯苯。②95%乙醇(GB 679)。③氢氧化钾(GB 2303)。④ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠(GB 629)溶液。⑤ $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜(GB 665)溶液。⑥ $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾乙醇溶液。

(2)鉴别方法。①称取试样约 4 mg,加 2,4-二硝基氯苯 8 mg,研匀,置试管中,缓缓加热溶化后,再加热数秒钟,冷却后加氢氧化钾乙醇溶液 3 mL,即显紫红色。②称取试样约 50 mg,加水 20 mL 溶解后,滴加氢氧化钠溶液至遇石蕊试纸显中性反应,加硫酸铜溶液 3 mL,即缓缓析出淡蓝色沉淀。

#### 8.2.15.3 饲料添加剂烟酸含量的测定

(1)仪器设备。仪器设备为一般实验室仪器设备。

(2)试剂与溶液。① $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酚酞(HG B3039)乙醇溶液。②氢氧化钠(GB 629)。③ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠标准液。

(3)测定方法。称取试样 0.3 g (准确至 0.000 2 g),加新沸过的冷水 50 mL 溶解后,加酚酞指示液 3 滴,用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠标准液滴定至溶液显粉

红色。

(4)计算和结果的表示。试样中烟酸含量质量分数按公式 8-29 计算。

$$w(\text{烟酸}) = \frac{V \times c \times 0.01231}{m} \quad 8-29$$

式中:  $V$  为试样溶液消耗氢氧化钠标准液的体积, mL;  $c$  为氢氧化钠标准溶液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 0.01231 为滴定度(1 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠标准溶液相当于 0.01231 g 的烟酸);  $m$  为试样的质量, g。

#### 8.2.15.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

### 8.2.16 饲料添加剂烟酰胺的分析测定

#### 8.2.16.1 适用范围

本方法适用于化学合成法制得的烟酰胺,在饲料工业中作为维生素类饲料添加剂。

#### 8.2.16.2 定性鉴别

(1)试剂与溶液。① $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠(GB 629)溶液。② $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酚酞(GB 10729)乙醇溶液。③硫酸(GB 625)溶液:取硫酸 57 mL,加水稀释至 1 000 mL。④ $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜(GB 665)溶液。⑤95%乙醇(GB 679)。

(2)鉴别方法。①称取试样 0.1 g,加水 5 mL 溶解后,加氢氧化钠溶液 5 mL,缓缓煮沸,即发生氨臭(与烟酸区别);继续加热至氨臭完全除去,冷却后加酚酞指示液 1~2 滴,用硫酸溶液中和,加硫酸铜溶液 2 mL,即缓缓析出淡蓝色沉淀,滤过,取沉淀,烧灼,即发出吡啶的臭气。②紫外鉴别:取本品 0.01 g(准确到 0.000 1 g)于 500 mL 容量瓶中,加水制成 1 mL 中含  $20 \mu\text{g}$  试样溶液,进行紫外分光光度测定,在 262 nm 的波长处有最大吸收,在 245 nm 的波长处有最小吸收,245 nm 波长处的吸光度与 262 nm 波长处的吸光度的比值应为 0.63~0.67。

#### 8.2.16.3 烟酰胺含量的测定

(1)仪器设备。一般实验室仪器设备。

(2)试剂与溶液。①冰乙酸(GB 676)。②醋酐(GB 677)。③结晶紫(HG 10-2151)冰乙酸溶液。④高氯酸(GB 623)。⑤ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸标准溶液。配制及标定方法见附录八。

(3)测定方法。称取试样 0.09~0.11 g(准确至 0.000 1 g),加冰乙酸 20 mL 溶解后,加醋酐 5 mL 与结晶紫指示液 1 滴,用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸标准溶液滴

定,至溶液显蓝绿色,并将测定结果用空白试验校正。

(4)计算与结果表示。试样中烟酰胺质量分数按公式 8-30 计算。

$$w(\text{烟酰胺}) = \frac{(V - V_0) \times c \times 0.012\,21}{m} \quad 8-30$$

式中:  $V$  为试样溶液消耗高氯酸标准液的体积, mL;  $V_0$  为空白溶液消耗高氯酸标准液的体积, mL;  $c$  为高氯酸标准溶液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 0.012 21 为滴定度(1 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  高氯酸标准溶液相当于 0.012 21 g 的烟酰胺);  $m$  为试样的质量, g。

#### 8.2.16.4 干燥失重的测定

同 8.2.1.4。

#### 8.2.16.5 水分测定(费休氏法)

(1)试剂和溶液。①无水甲醇。②费休氏试液。

a. 配制: 称取碘(置硫酸干燥器中 48 h 以上)110 g, 置于干燥的具塞烧瓶中, 加无水吡啶 160 mL, 注意冷却, 振摇至碘全部溶解后, 加无水甲醇 300 mL, 称重, 将烧瓶置冰浴中冷却, 通入干燥的二氧化硫至重量增加 72 g, 再加入无水甲醇使成 1 000 mL, 密塞, 摇匀, 在暗处放置 24 h。本溶液应遮光, 密封, 置于阴凉干燥处保存。临用前应标定浓度。

b. 标定: 用水分滴定仪直接标定。

c. 费休氏试液的滴定度(以  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  表示)按公式 8-31 计算:

$$\rho = \frac{m}{V_1 - V_0} \quad 8-31$$

式中:  $\rho$  为 1 mL 费休氏试液相当于水的质量, mg;  $m$  为称取重蒸水的质量, mg;  $V_1$  为滴定所消耗的费休氏试液的体积, mL;  $V_0$  为空白所消耗的费休氏试液的体积, mL。

(2)测定方法。称取试样 2.5~4.0 g (准确至 0.000 1 g), 以无水甲醇为溶剂, 用水分滴定仪直接测定。

(3)计算和结果表示。试样水分质量分数按公式 8-32 计算。

$$w(\text{Moisture}) = \frac{(V_1 - V_0) \times \rho}{m} \quad 8-32$$

式中:  $V_1$  为供试试样滴定所消耗的费休氏试液的体积, mL;  $V_0$  为空白所消耗的费休氏试液的体积, mL;  $\rho$  为 1 mL 费休氏试液相当于水的质量, mg;  $m$  为

试样的质量,mg。

允许误差:取平行测定结果的算术平均值为测定结果,平行测定结果的绝对值之差不超过 0.01%。

### 8.2.17 饲料添加剂生物素的分析测定

#### 8.2.17.1 适用范围

本方法适用于微生物制取的饲料添加剂。

#### 8.2.17.2 鉴别方法

(1)仪器设备。薄层板点样设备全套及一般实验室仪器设备。

(2)试剂与溶液。①95%乙醇。②2%硫酸乙醇溶液。③对二甲胺基苯甲醛溶液:称取 50 mg 对二甲胺基苯甲醛,溶于 100 mL 乙醇,混匀。分取 10 mL,加 1 mL 冰乙酸即可。用时现配制。④展开剂:丙酮:水为 1:1。⑤二氨基联苯溶液:称取 0.1 g 二氨基联苯,溶于 10 mL 乙酸(36%),用水稀释至 100 mL。⑥氯气。

(3)鉴别方法。①称取 0.01 g 试样,溶于 100 mL 乙醇。分取 5 mL,加入 1 mL 硫酸乙醇溶液和 1 mL 对二甲胺基苯甲醛溶液,静置 1 h,溶液呈橙红色。②各称取 0.01 g 试样和生物素标准品,分别溶于 25 mL 乙醇中,加热溶解,混匀。各分取 10 mL,在硅胶(GF 254)薄层板上点样,在展开剂中展开。当展开至 10 cm 时,立即把薄层板置于充满氯气的容器中,放置 15 min,取出。在冷气流中吹 10 min,喷洒二氨基联苯溶液,斑点应呈蓝色,且两斑点比移值( $R_f$ )应相等。

#### 8.2.17.3 生物素含量测定(方法一)

(1)仪器设备。一般试验室仪器设备。

(2)试剂与溶液。①二甲基甲酰胺(DMF);② $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 百里酚蓝指示剂乙醇溶液;③无水乙醇;④金属钠;⑤苯酸;⑥ $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲氧基钠溶液。

a. 配制:切取 2.5 g 金属钠(准确至 0.01 g)置于 150 mL 冰冷的甲醇中,待金属钠完全溶解后,用甲醇稀释至 1 000 mL,混匀。在阴凉处保存。

b. 标定:称取 300 mg 苯酸,溶于 80 mL DMF 中,加入 3 滴百里酚蓝指示剂,用甲氧基钠溶液滴定溶液至蓝色。同时做试剂空白试验。

c. 计算:甲氧基钠浓度按公式 8-33 计算。

$$c(\text{甲氧基钠}) = \frac{m \times 1\,000}{(V_1 - V_0) \times 122.1} \quad 8-33$$

式中: $m$  为苯酸的质量,g; $V_1$  为滴定时甲氧基钠溶液的消耗体积, mL; $V_0$  为试

剂空白试验时甲氧基钠溶液的消耗的体积, mL; 122.1 为滴定度(1 mL 的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲氧基钠溶液相当于 122.1 mg 苯酸)。

(3) 测定方法。称取 0.4 g 试样(准确至 0.000 2 g), 置于 150 mL 锥形瓶中, 加入 10 mL DMF, 在水浴中加热溶解, 冷却至室温。加入 30 mL 无水乙醇, 充分摇匀; 加入 0.4 mL 百里酚蓝指示剂, 用甲氧基钠溶液, 滴定溶液从黄色变为蓝绿色。同时做试剂空白试验。

(4) 计算及结果表示。试样中生物素质量分数按公式 8-34 计算。

$$w(\text{生物素}) = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 24.431}{m} \quad 8-34$$

式中:  $V_1$  为滴定时甲氧基钠标准溶液的消耗体积, mL;  $V_0$  为试剂空白试验时甲氧基钠标准溶液的消耗体积, mL;  $c$  为甲氧基钠标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 24.431 为滴定度(1 mL 的  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲氧基钠标准溶液相当于 24.431 mg  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$ );  $m$  为试样质量, g。

#### 8.2.17.4 生物素含量测定(方法二 HPLC 法)

(1) 试剂和溶液。

① 流动相: 0.05% 三氟醋酸(用  $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调节  $\text{pH}=2.5$ ); 乙腈 = 75 : 25( $V : V$ )。

② 对照品溶液: 精确称取 10 mg 试样(准确至 0.000 01 g) 已知含量的对照品, 置于 50 mL 的容量瓶中, 用流动相溶解并定容。每毫升含有生物素 0.2 mg。

③ 试样溶液: 精确称取试样 500 mg(准确至 0.000 1 g), 置于 50 mL 的容量瓶中, 用约 40 mL 流动相溶液, 在超声波水浴中处理 10 min, 用流动相定容。

(2) 测定方法。

a. 色谱条件:

色谱柱: 不锈钢柱 250 mm × 4 mm Lichospher RP-18, 5  $\mu\text{m}$ 。

流动相流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

检测波长: 210 nm。

进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

b. 测定: 精密量取对照品和试样溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 依次注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积进行计算。

(3) 计算和结果表示。试样中生物素质量分数按公式 8-35 计算。

$$w(\text{生物素}) = \frac{A_i \times m_{st} \times w_{st}}{A_{st} \times w_{ms}} \quad 8-35$$

式中:  $A_s$  为试样溶液中的生物素的峰面积;  $A_{sc}$  为对照品溶液中生物素的峰面积;  $m_s$  为试样的质量, mg;  $w_{sc}$  为对照品的质量, mg;  $w_{ms}$  为对照品中生物素质量分数。

允许误差: 同一试样两次平行测定结果平均偏差不得大于 2%。

(4) 注意。①A 根据试样组分在分离柱上的分离情况, 流动相中乙腈的比例可略做调整。②在流动相的比例改为 92: 8 后, 也适用于预混料中生物素的测定。

#### 8.2.17.5 干燥失重的测定

取试样, 混合均匀(如为较大的结晶, 应先迅速捣碎使成 2 mm 以下的小粒)。分取约 1.0.5 g。该药品项下所规定的质量, 置于已在与试样同样条件下干燥至恒重的扇形称量瓶中, 精确称定, 除另有规定外, 按照该药品项下规定的条件干燥至恒重。一般在 105℃ 下干燥 4 h。根据丢失的质量和取样量计算试样的干燥失重。

### 8.3 饲料中维生素的分析测定

#### 8.3.1 饲料中维生素 A 的测定(HPLC 法)

##### 8.3.1.1 适用范围

本方法适用于配合饲料、浓缩饲料、复合预混料和维生素预混料中维生素 A 的测定。测量范围为每千克试样中含维生素 A 在 1 000 IU 以上。

##### 8.3.1.2 测定原理

用碱溶液皂化试验试样, 乙醚提取未皂化的化合物, 蒸发乙醚并将残渣溶于正己烷中, 将正己烷提取物注入用硅胶填充的高效液相色谱柱, 用紫外检测器测定, 外标法计算维生素 A 含量。

##### 8.3.1.3 试剂和配制

除特殊注明外, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为蒸馏水, 色谱用水为去离子水。

(1) 无水乙醚(无过氧化物)。

①过氧化物检查方法: 用 5 mL 乙醚加 1 mL  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  碘化钾溶液, 振摇 1 min, 如有过氧化物则放出游离碘, 水层呈黄色。若加  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  淀粉指示液, 水层呈蓝色。该乙醚需处理后使用。

②去除过氧化物的方法:乙醚用  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠溶液振摇,静置,分取乙醚层,再用蒸馏水振摇洗涤两次,重蒸,弃去首尾 5% 部分,收集馏出的乙醚,再检查过氧化物,应符合规定。

(2)乙醇。

(3)正己烷:重蒸馏(或光谱纯)。

(4)异丙醇:重蒸馏。

(5)甲醇:优级纯。

(6)2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)。

(7)无水硫酸钠。

(8)  $500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钾溶液。

(9)  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抗坏血酸乙醇溶液:取 0.5 g 抗坏血酸结晶纯品溶解于 4 mL 温热的蒸馏水中,用乙醇稀释至 100 mL,临用前配制。

(10)维生素 A 标准溶液。

①维生素 A 标准储备液:准确称取维生素 A 乙酸酯油剂(每克含  $1.00 \times 10^6$  IU)0.100 0 g 或结晶纯品 0.034 4 g (符合中国药典)于皂化瓶中,皂化和提取,将乙醚提取液全部浓缩蒸发至干,用正己烷溶解残渣置入 100 mL 棕色容量瓶中并稀释至刻度,混匀,4℃ 保存。该储备液浓度为 1 mL 含 1 000 IU 维生素 A。

②维生素 A 标准工作液:准确吸取 1.00 mL 维生素 A 标准储备液,用正己烷稀释 100 倍;若用反相色谱测定,将 1.00 mL 维生素 A 标准储备液置入 10 mL 棕色小容量瓶中,用氮气吹干,用甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,再按 1:10 比例稀释。该标准工作液浓度为 1 mL 含 10 IU 维生素 A。

(11)  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酚酞指示剂乙醇溶液。

(12)氮气(纯度 99.9%)。

#### 8.3.1.4 仪器和设备

(1)实验室常用仪器、设备。

(2)圆底烧瓶,带回流冷凝器。

(3)恒温水浴或电热套。

(4)旋转蒸发器。

(5)超纯水器(或全磨口玻璃蒸馏器)。

(6)高效液相色谱仪,带紫外检测器。

#### 8.3.1.5 试样的选取与制备

选取有代表性的饲料试样至少 500 g,四分法缩减至 100 g,磨碎,全部通过

0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

#### 8.3.1.6 测定步骤

##### (1) 试验溶液的制备。

①皂化。称取配合饲料或浓缩饲料 10 g,精确至 0.001 g。维生素预混料或复合预混料 1~5 g,精确至 0.000 1 g。置入 250 mL 圆底烧瓶中,加 50 mL 抗坏血酸乙醇溶液,使试样完全分散、浸湿,加 10 mL 氢氧化钾溶液,混匀。置于沸水浴上回流 30 min,不时振荡防止试样黏附在瓶壁上,皂化结束,分别用 5 mL 乙醇、5 mL 水自冷凝管顶端冲洗其内部,取出烧瓶冷却至约 40 ℃。

②提取。定量转移全部皂化液于盛有 100 mL 乙醚的 500 mL 分液漏斗中,用 30~50 mL 蒸馏水分 2~3 次冲洗圆底烧瓶并入分液漏斗,加盖、放气、随后混合,激烈振荡 2 min,静置分层。转移水相于第二个分液漏斗中,分次用 100,60 mL 乙醚重复提取两次,弃去水相,合并 3 次乙醚相。用蒸馏水每次 100 mL 洗涤乙醚提取液至中性,初次水洗时轻轻旋摇,防止乳化。乙醚提取液通过无水硫酸钠脱水,转移到 250 mL 棕色容量瓶中,加 100 mg BHT 使之溶解,用乙醚定容至刻度( $V_{\text{ex}}$ )。以上操作均在避光通风柜内进行。

③浓缩。从乙醚提取液( $V_{\text{ex}}$ )中分取一定体积( $V_{\text{al}}$ )(依据试样标示量,称样量和提取液量确定分取量),置于旋转蒸发器烧瓶中,在水浴温度约 50 ℃,部分真空条件下蒸发至干或用氮气吹干,残渣用正己烷溶解(反相色谱用甲醇溶解),并稀释至 10 mL( $V_{\text{in}}$ ),使其维生素 A 最后浓度为每毫升 5~10 IU,离心或通过 0.45  $\mu\text{m}$  过滤膜过滤,收集清液移入 2 mL 小试管中,用于高效液相色谱仪分析。

##### (2) 测定步骤。

##### ① 高效液相色谱条件。

###### a. 正相色谱。

柱长:12.5 cm,内径 4 mm 不锈钢柱。

固定相:硅胶 Lichrosorb Si60,粒度 5  $\mu\text{m}$ 。

移动相:正己烷异丙醇(98:2)( $V:V$ ),恒量流动。

流速:1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。

温度:室温。

进样体积:20  $\mu\text{L}$ 。

检测器:紫外检测器,使用波长 326 nm。

保留时间:3.75 min。

###### b. 反相色谱。



柱长:12.5 cm,内径 4 mm 不锈钢柱。

固定相:ODS(或  $C_{18}$ ),粒度 5  $\mu\text{m}$ 。

移动相:甲醇:水(95:5; $V:V$ )。

流速:1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

温度:室温。

进样体积:20  $\mu\text{L}$ 。

检测器:紫外检测器,使用波长 326 nm。

保留时间:4.57 min。

②定量测定:按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数和灵敏度(AUFS),色谱峰分离度符合要求( $R \geq 1.5$ )(中国药典 1995 附录)。向色谱柱注入相应的维生素 A 标准工作液( $V_{\text{st}}$ )和试验溶液( $V_{\text{i}}$ ),得到色谱峰面积的响应值( $P_{\text{st}}$ 、 $P_{\text{i}}$ ),用外标法定量测定。

#### 8.3.1.7 测定结果计算

(1)试样中  $V_{\text{A}}$  的质量分数按公式 8-36 计算:

$$w(V_{\text{A}}) = \frac{P_{\text{i}} \times V_{\text{ex}} \times V_{\text{en}} \times \rho_{\text{i}} \times V_{\text{st}}}{P_{\text{st}} \times m \times V_{\text{ri}} \times V_{\text{i}} \times f_{\text{i}}} \quad 8-36$$

式中: $m$  为试样质量, g;  $V_{\text{ex}}$  为提取液的总体积, mL;  $V_{\text{ri}}$  为从提取液( $V_{\text{ex}}$ )中分取的溶液体积, mL;  $V_{\text{en}}$  为试验溶液最终体积, mL;  $\rho_{\text{i}}$  为标准溶液浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V_{\text{st}}$  为维生素 A 标准溶液进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $V_{\text{i}}$  为从试验溶液中分取的进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $P_{\text{st}}$  为与标准工作液进样体积( $V_{\text{st}}$ )相应的峰面积响应值;  $P_{\text{i}}$  为与从试验溶液中分取的进样体积( $V_{\text{i}}$ )相应的峰面积响应值;  $f_{\text{i}}$  为转换系数, 1 IU 相当于 0.344  $\mu\text{g}$  维生素 A 乙酸酯, 或 0.300  $\mu\text{g}$  视黄醇活性。

平行测定结果用算术平均值表示, 保留有效数 3 位。

(2)允许差。同一分析者对同一试样同时两次测定(或重复测定)所得结果相对偏差。

每千克试样中含维生素 A 的量/IU	相对偏差/%
$1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^4$	$\pm 20$
$>1.00 \times 10^4 \sim 1.00 \times 10^5$	$\pm 15$
$>1.00 \times 10^5 \sim 1.00 \times 10^6$	$\pm 10$
$>1.00 \times 10^6$	$\pm 5$

### 8.3.2 饲料中维生素 D<sub>3</sub> 的测定(HPLC 法)

#### 8.3.2.1 适用范围

本方法适用于配合饲料、浓缩饲料、复合预混料和维生素预混料中维生素 D<sub>3</sub> 的测定。测量范围为每千克试样中含维生素 D<sub>3</sub>(胆钙化醇)的量在 500 IU 以上。

#### 8.3.2.2 测定原理

用碱溶液皂化试验试样,乙醚提取未皂化的化合物,蒸发乙醚,残渣溶解于甲醇并将部分溶液注入高效液相色谱净化柱中除去干扰物,收集含维生素 D<sub>3</sub> 淋洗液馏分,蒸发至干,溶解于正己烷中,注入高效液相色谱分析柱,用紫外检测器在 264 nm 处测定,通过外标法计算维生素 D<sub>3</sub> 的含量。

当试样中维生素 D<sub>3</sub> 标示量超过每千克 10 000 IU 时,可省去高效液相色谱净化柱,试验溶液直接注入色谱分析柱分析。

#### 8.3.2.3 试剂及配制

除特殊注明外,本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水,色谱用水为去离子水。

(1)无水乙醚:无过氧化物。

①过氧化物检查方法:用 5 mL 乙醚加 1 mL  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  碘化钾溶液,振摇 1 min,如有过氧化物则放出游离碘,水层呈黄色。若加  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  淀粉指示液,水层呈蓝色。该乙醚需处理后使用。

②去除过氧化物的方法:乙醚用  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠溶液振摇,静置,分取乙醚层,再用蒸馏水振摇洗涤两次,重蒸,弃去首尾 5% 部分,收集馏出的乙醚,再检查过氧化物,应符合规定。

(2)乙醇。

(3)正己烷:重蒸馏(或光谱纯)。

(4)1,4-二氧六环。

(5)甲醇:优级纯。

(6)2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)。

(7)无水硫酸钠。

(8) $500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钾溶液。

(9) $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抗坏血酸乙醇溶液:取 0.5 g 抗坏血酸结晶纯品溶解于 4 mL 温热的蒸馏水中,用乙醇稀释至 100 mL,临用前配制。

(10) $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠溶液。

(11)维生素 D<sub>3</sub> 标准溶液。

①维生素 D<sub>3</sub> 标准储备液:准确称取 50.0 mg 维生素 D<sub>3</sub>(胆钙化醇)USP 结晶纯品,于 50 mL 棕色容量瓶中,用正己烷溶解并稀释至刻度,4 ℃ 保存。该储备液的浓度为 1 mL 含 1 mg 维生素 D<sub>3</sub>。

②维生素 D<sub>3</sub> 标准工作液:准确吸取维生素 D<sub>3</sub> 标准储备液,用正己烷按 1 : 100 比例稀释,该标准溶液浓度为 1 mL 含 10 μg (400 IU)维生素 D<sub>3</sub>。

(12)10 g · L<sup>-1</sup> 酚酞指示剂乙醇溶液。

(13)氮气(纯度 99.9%)。

#### 8.3.2.4 仪器和设备

(1)实验室常用设备。

(2)圆底烧瓶,带回流冷凝器。

(3)恒温水浴或电热套。

(4)旋转蒸发器。

(5)超纯水器(或全磨口玻璃蒸馏器)。

(6)高效液相色谱仪(两套),带紫外检测器。

#### 8.3.2.5 试样的选取与制备

选取有代表性的饲料试样至少 500 g,四分法缩减至 100 g,磨碎,全部通过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

#### 8.3.2.6 测定步骤

(1)试验溶液的制备。

①皂化:称取试样,配合饲料 10~20 g,浓缩饲料 10 g,精确至 0.001 g。维生素预混料或复合预混料 1~5 g,精确至 0.000 1 g。置入 250 mL 圆底烧瓶中,加 50~60 mL 抗坏血酸乙醇溶液,使试样完全分散、浸湿,加 10 mL 氢氧化钾溶液,混合均匀。置于沸水浴上回流 30 min,不时振荡防止试样黏附在瓶壁上,皂化结束,分别用 5 mL 乙醇、5 mL 水自冷凝管顶端冲洗其内部,取出烧瓶冷却至约 40 ℃。

②提取:定量转移全部皂化液于盛有 100 mL 乙醚的 500 mL 分液漏斗中,用 30~50 mL 蒸馏水分 2~3 次冲洗圆底烧瓶并入分液漏斗,加盖,放气,随后混合,激烈振荡 2 min,静置分层。转移水相于第二个分液漏斗中,分次用 100, 60 mL 乙醚重复提取两次,弃去水相,合并 3 次乙醚相。用氯化钠溶液 100 mL 洗涤 1 次,再用蒸馏水每次 100 mL 洗涤乙醚提取液至中性,初次水洗时轻轻旋摇,防止乳化。乙醚提取液通过无水硫酸钠脱水,转移到 250 mL 棕色容量瓶中,加 100 mg BHT 使之溶解,用乙醚定容至刻度(V<sub>ex</sub>)。以上操作均在避光通风柜

内进行。

③浓缩:从乙醚提取液( $V_{\text{ex}}$ )中分取一定体积( $V_{\text{a}}$ )(依据试样标示量、称样量和提取液量确定分取量),置于旋转蒸发器烧瓶中,在部分真空,水浴温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下蒸发至干,或用氮气吹干。残渣用正己烷溶解(需净化时用甲醇溶解),并稀释至 $10\text{ mL}$  ( $V_{\text{en}}$ )使其获得的溶液中 $1\text{ mL}$ 含维生素 $\text{D}_3$   $2\sim 10\text{ }\mu\text{g}$  ( $80\sim 400\text{ IU}$ ),离心或通过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 过滤膜过滤,收集清液移入 $2\text{ mL}$ 小试管,用于高效液相色谱分析柱分析。

④使用高效液相色谱净化柱提取:用 $5\text{ mL}$ 甲醇溶解圆底烧瓶中的残渣,向高效液相色谱净化柱中注射 $0.5\text{ mL}$ 甲醇溶液(以维生素 $\text{D}_3$ 标准甲醇溶液流出时间)收集含维生素 $\text{D}_3$ 的馏分于 $50\text{ mL}$ 小容量瓶中,蒸发至干(或用氮气吹干),溶解于正己烷中。

所测试样的维生素 $\text{D}_3$ 标示量在 $1\text{ kg}$ 超过 $10\text{ }000\text{ IU}$ 范围时,可以不使用高效液相色谱净化柱,直接用分析柱分析。

(2)测定。

①高效液相色谱净化条件。

柱和固定相:Lichrosorb RP-8,粒度 $10\text{ }\mu\text{m}$ , $250\text{ mm}\times 10\text{ mm}$ (内径)。

移动相:甲醇:水( $90:10;V:V$ )。

流速: $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

温度:室温。

检测器:紫外检测器,使用波长 $264\text{ nm}$ 。

②高效液相色谱分析条件。

a. 正相色谱。

柱长: $25\text{ cm}$ 、内径 $4\text{ mm}$ 不锈钢柱。

固定相:硅胶 Lichrosorb Si60,粒度 $5\text{ }\mu\text{m}$ 。

移动相:正己烷:1,4-二氧六环( $93:7;V:V$ ),恒量流动。

流速: $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

温度:室温。

进样体积: $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

检测器:紫外检测器,使用波长 $264\text{ nm}$ 。

保留时间: $14.88\text{ min}$

b. 反相色谱。

柱长: $12.5\text{ cm}$ 、内径 $4\text{ mm}$ 不锈钢柱。

固定相:ODS(或 $\text{C}_{18}$ ),粒度 $5\text{ }\mu\text{m}$ 。

移动相:甲醇:水(95:5;V:V),恒量流动。

流速:1 mL · min<sup>-1</sup>

温度:室温。

进样体积:20 μL。

检测器:紫外检测器,使用波长 264 nm。

保留时间:6.88 min。

(3)定量测定:按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数和灵敏度(AUFS),为准确测量按要求对分析柱进行系统适应性试验,使维生素 D<sub>3</sub> 与维生素 D<sub>3</sub> 原或其他峰之间有较好分离度,其  $R \geq 1.0$ 。向色谱柱注入相应的维生素 D<sub>3</sub> 标准工作液( $V_{st}$ )和试验溶液( $V_i$ ),得到色谱峰面积的响应值( $P_{st}$ 、 $P_i$ ),用外标法定量测定。

#### 8.3.2.7 测定结果计算

(1)试样中维生素 D<sub>3</sub> 质量分数按公式 8-37 计算。

$$w(\text{维生素 D}_3) = \frac{P_i \times V_{ex} \times V_{en} \times \rho_i \times V_{st} \times 1.25}{P_{st} \times m \times V_{ri} \times V_i \times f_i} \quad 8-37$$

式中: $m$  为试样质量, g;  $V_{ex}$  为提取液的总体积, mL;  $V_{ri}$  为从乙醚提取液( $V_{ex}$ )中分取的溶液体积, mL;  $V_{en}$  为试验溶液最终体积, mL;  $\rho_i$  为标准溶液浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V_{st}$  为维生素 D<sub>3</sub> 标准溶液进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $V_i$  为从试验溶液中分取的进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $P_{st}$  为与标准工作液进样体积  $V_{st}$  相应的峰面积响应值;  $P_i$  为与从试验溶液中分取的进样体积( $V_i$ )相应的峰面积响应值;  $f_i$  为转换系数, 1 IU 维生素 D<sub>3</sub> 相当于 0.025  $\mu\text{g}$  胆钙化醇; 1.25 为回流皂化时生成维生素 D 原的校正因子。

注:标准维生素 D<sub>3</sub> 结晶纯品与试样同样皂化处理后,所得标准溶液注入高效液相色谱分析柱以维生素 D<sub>3</sub> 峰面积计算时可不乘 1.25。

平行测定结果用算术平均值表示,保留有效数 3 位。

(2)重复性。同一分析者对同一试样同时两次测定(或重复测定)所得结果相对偏差:

每千克试样中含维生素 D <sub>3</sub> 的量/IU	允许相对偏差/%
$1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^5$	±20
$>1.00 \times 10^5 \sim 1.00 \times 10^6$	±15
$>1.00 \times 10^6$	±5

### 8.3.3 饲料中维生素 E 的测定(HPLC 法)

#### 8.3.3.1 适用范围

本方法适用于配合饲料、浓缩饲料、复合预混料、维生素预混料中维生素 E 的测定。检测范围为每千克样品中含维生素 E 的量在 1.11 IU(*DL-α*-生育酚 1 mg)以上。

#### 8.3.3.2 测定原理

用碱溶液皂化试验样品,去除脂肪,使试样中天然生育酚释放出来并水解,添加的生育酚乙酸酯游离的生育酚。乙醚提取未皂化的物质,蒸发乙醚,用正己烷溶解残渣。提取物注入高效液相色谱柱,用紫外检测器在 280 nm 处测定,外标法计算维生素 E(*DL-α*-生育酚)含量。

#### 8.3.3.3 试剂和配制

除特殊注明外,本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水,色谱用水为去离子水。

(1)无水乙醚。无过氧化物。

①过氧化物检查方法:用 5 mL 乙醚加 1 mL  $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  碘化钾溶液,振摇 1 min,如有过氧化物则放出游离碘,水层呈黄色,或加  $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  淀粉指示液,水层呈蓝色。该乙醚需处理后使用。

②去除过氧化物的方法:乙醚用  $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠溶液振摇,静置,分取乙醚层,再用蒸馏水振摇,洗涤两次,重蒸,弃去首尾 5% 部分,收集馏出的乙醚,再检查过氧化物,应符合规定。

(2)乙醇。

(3)正己烷:重蒸馏(或光谱纯)。

(4)1,4-二氧六环。

(5)甲醇:优级纯。

(6)2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)。

(7)无水硫酸钠。

(8) $500\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钾溶液。

(9) $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抗坏血酸乙醇溶液:取 0.5 g 抗坏血酸结晶纯品溶解于 4 mL 温热的蒸馏水中,用乙醇稀释至 100 mL,临用前配制。

(10)维生素 E (*DL-α*-生育酚)标准溶液

①*DL-α*-生育酚标准储备液:准确称取 *DL-α*-生育酚纯品油剂(USP)100.0 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中,用正己烷溶解并稀释至刻度,混匀,4℃ 保存。该

储备液浓度 1 mL 含维生素 E 1.0 mg。

② *DL-α*-生育酚标准工作液：准确吸取 *DL-α*-生育酚储备液，用正己烷按 1 : 20 比例稀释。若用反相色谱测定，将 1.00 mL *DL-α*-生育酚标准储备液置入 10 mL 棕色小容量瓶中，用氮气吹干，用甲醇稀释至刻度，混匀，再按比例稀释。配制工作液浓度为 1 mL 含维生素 E 50 μg。

(11)  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酚酞指示剂乙醇溶液。

(12) 氮气(纯度 99.9%)。

#### 8.3.3.4 仪器和设备

(1) 实验室常用设备。

(2) 圆底烧瓶，带回流冷凝器。

(3) 恒温水浴或电热套。

(4) 旋转蒸发器。

(5) 超纯水器(或全磨口玻璃蒸馏器)。

(6) 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

#### 8.3.3.5 试样的选取与制备

选取有代表性的饲料样品至少 500 g，四分法缩减至 100 g，磨碎，全部通过 0.28 mm 孔筛，混匀，装入密闭容器中，避光低温保存备用。

#### 8.3.3.6 测定步骤

(1) 试验溶液的制备。

① 皂化：称取试样配合饲料或浓缩饲料 10 g，精确至 0.001 g，维生素预混料或复合预混料 1~5 g，精确至 0.000 1 g。置入 250 mL 圆底烧瓶中，加 50 mL 抗坏血酸乙醇溶液，使试样完全分散、浸湿，置于水浴上加热，混合直到沸点，用氮气吹洗稍冷却，加 10 mL 氢氧化钾溶液，混合均匀，在氮气流下沸腾皂化回流 30 min，不时振荡防止试样黏附在瓶壁上，皂化结束，分别用 5 mL 乙醇、5 mL 水自冷凝管顶端冲洗其内部。取出烧瓶冷却至约 40 ℃。

② 提取：定量的转移全部皂化液于盛有 100 mL 乙醚的 500 mL 分液漏斗中，用 30~50 mL 蒸馏水分 2~3 次冲洗圆底烧瓶并入分液漏斗，加盖、放气，随后混合，激烈振荡 2 min，静置、分层。转移水相于第二个分液漏斗中，分次用 100, 60 mL 乙醚重复提取两次，弃去水相，合并 3 次乙醚相。用蒸馏水每次 100 mL 洗涤乙醚提取液至中性，初次水洗时轻轻旋摇，防止乳化。乙醚提取液通过无水硫酸钠脱水，转移到 250 mL 棕色容量瓶中，加 100 mg BHT 使之溶解，用乙醚定容至刻度( $V_{ex}$ )。以上操作均在避光通风柜内进行。

③ 浓缩：从乙醚提取液( $V_{ex}$ )中分取一定体积( $V_n$ )(依据样品标示量、称样量

和提取液量确定分取量)置于旋转蒸发器烧瓶中,在部分真空,水浴温度约 50 ℃的条件下蒸发至干或用氮气吹干。残渣用正己烷溶解(反相色谱用甲醇溶解),并稀释至 10 mL( $V_m$ )使其获得的溶液中每毫升含维生素 E( $DL-\alpha$ -生育酚) 50~100  $\mu\text{g}$ ,离心或通过 0.45  $\mu\text{m}$  过滤膜过滤,收集清液移入 2 mL 小试管中,用于高效液相色谱仪分析。

(2)测定。

①高效液相色谱条件。

a. 正相色谱。

柱长:12.5 cm,内径 4 mm,不锈钢柱。

固定相:硅胶 Lichrosorb Si60,粒度 5  $\mu\text{m}$ 。

移动相:正己烷:1,4-二氧六环(97:3)( $V:V$ ),恒量流动。

流速:1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。

温度:室温。

进样体积:20  $\mu\text{L}$ 。

检测器:紫外检测器,使用波长 280 nm。

保留时间:4.3 min。

b. 反相色谱。

柱长:12.5 cm,内径 4 mm,不锈钢柱。

固定相:ODS(或  $C_{18}$ ),粒度 5  $\mu\text{m}$ 。

移动相:甲醇:水(95:5; $V:V$ )。

流速:1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。

温度:室温。

进样体积:20  $\mu\text{L}$ 。

检测器:紫外检测器,使用波长 280 nm。

保留时间:11.17 min。

(3)定量测定。按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数和灵敏度(AUFS),色谱峰分离度符合要求( $R \geq 1.5$ )(中国药典 1995 版附录)。向色谱柱注入相应的维生素 E( $DL-\alpha$ -生育酚)标准工作液( $V_{st}$ )和试验溶液( $V_i$ )得到色谱峰面积的响应值( $P_{st}$ 、 $P_i$ ),用外标法定量测定。

#### 8.3.3.7 测定结果计算

(1)试样中维生素 E 质量分数按公式 8-38 计算。

$$w(\text{维生素 E}) = \frac{P_i \times V_{ex} \times V_{en} \times \rho_i \times V_{st}}{P_{st} \times m \times V_{ri} \times V_i \times f_i} \quad 8-38$$



式中:  $m$  为试样质量, g;  $V_{\text{ex}}$  为提取液的总体积, mL;  $V_{\text{fi}}$  为从乙醚提取液 ( $V_{\text{ex}}$ ) 中分取的溶液体积, mL;  $V_{\text{en}}$  为试验溶液最终体积, mL;  $\rho_i$  为标准溶液浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V_{\text{si}}$  为维生素 E 标准溶液进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $V_{\text{fi}}$  为从试验溶液中分取的进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $P_{\text{si}}$  为与标准工作液进样体积 ( $V_{\text{si}}$ ) 相应的峰面积响应值;  $P_{\text{fi}}$  为与从试验溶液中分取的进样体积 ( $V_{\text{fi}}$ ) 相应的峰面积响应值;  $f_i$  为转换系数, 1 国际单位 (IU) 维生素 E 相当于 0.909 mg *DL*- $\alpha$ -生育酚或 1.0 mg *DL*- $\alpha$ -生育酚乙酸酯。

平行测定结果用算术平均值表示, 保留有效数 3 位。

(2) 重复性。同一分析者对同一试样同时两次测定 (或重复测定) 所得结果相对偏差。

每千克试样中 <i>DL</i> - $\alpha$ -生育酚含量/mg	允许相对偏差/%
1.00~10	$\pm 20$
$\geq 10$	$\pm 10$

#### 8.3.4 饲料中维生素 $K_3$ 的测定 (HPLC 法)

##### 8.3.4.1 适用范围

本方法适用于配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料和维生素预混合饲料中维生素  $K_3$  (亚硫酸氢钠甲萘醌) 的测定。测量范围为每千克样品中含维生素  $K_3$  在 2.0 mg 以上。

##### 8.3.4.2 测定原理

用三氯甲烷氨溶液提取维生素  $K_3$  并转化成游离甲萘醌, 蒸发三氯甲烷, 残渣溶解于甲醇中。用高效液相色谱测定, 维生素  $K_3$  (甲萘醌) 经反相  $C_{18}$  柱得到分离, 紫外检测器检测, 外标法计算。若以亚硫酸氢钠甲萘醌计需乘以校正系数。

##### 8.3.4.3 试剂和溶液配制

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。

(1) 水, GB/T 6682:1 级用水或相当纯度的超纯水。

(2) 三氯甲烷。

(3) 甲醇, 色谱纯。

(4) 25% 氢氧化氨溶液。

(5) 寅式盐 (硅藻土)。

(6) 无水硫酸钠, 细粉状。

(7) 甲萘醌, 纯度 99.9% (作校准用)。

(8) 甲萘醌标准溶液。

① 标准储备液: 称取约 50 mg 甲萘醌纯品, 准确至  $\pm 0.1$  mg, 溶于 50 mL 甲醇中, 其储备液浓度为每毫升 1 mg, 贮于棕色容量瓶中, 在  $\leq 4$  °C 冰箱中保存 1 周是稳定的。

② 标准工作液: 精确吸取甲萘醌标准储备液, 按 1:200 比例用甲醇稀释, 该标准工作液浓度为每毫升 5  $\mu\text{g}$ 。标准工作液当日配制。

(9) 氮气 (纯度 99.9%)。

#### 8.3.4.4 仪器设备

(1) 实验室常用仪器设备。

(2) 超纯水装置 (Millipore 或全磨口玻璃蒸馏器)。

(3) 旋转振荡器,  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

(4) 旋转蒸发器。

(5) 离心机,  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

(6) 高效液相色谱仪, 带紫外检测器、积分仪、记录仪。

#### 8.3.4.5 试样选取与制备

选取有代表性的饲料样品至少 500 g, 四分法缩减至 100 g, 磨碎, 全部通过 0.28 mm 孔径筛, 混匀, 装入密闭容器中, 避光, 低温保存备用。

#### 8.3.4.6 分析步骤

(1) 总则。因维生素  $\text{K}_3$  对空气和紫外光具敏感性, 而且所用提取剂三氯甲烷溶液有异臭, 所以全部操作均应避光并在通风厨内进行。

(2) 试验溶液的制备。

① 称取试样: 维生素预混合饲料 0.25~0.58 (精确至 0.1 mg) 或复合预混合饲料 1 g 或浓缩饲料、配合饲料 5 g (精确至 1 mg), 置入 100 mL 具塞锥形瓶中, 准确加入 50 mL 三氯甲烷放在旋转振荡器上旋转搅拌 2 min。加 6 mL 氢氧化氨溶液旋转振荡 3 min。再加 10 g 硅藻土和无水硫酸钠混合物 (按 3:20,  $m:m$ ) 比例混合, 于旋转振荡器上振荡 30 min, 然后, 用中速滤纸过滤 (或移入离心管, 离心 10 min)。

② 根据三氯甲烷提取液中甲萘醌的预计浓度 (依据样品标示量、称样量和提取液量确定分取量), 吸取一定量的提取液移入蒸发瓶中, 连接旋转蒸发器真空减压浓缩, 水浴温度不超过 40 °C, 小心蒸发至体积约为 0.5 mL, 解除真空时通入氮气避免氧化 (或定量吸取三氯甲烷提取液置入小容量瓶内用氮气流吹干)。用甲醇或移动相溶解残渣, 稀释定容, 使其最后溶液浓度为 1 mL 含甲萘醌 1~5

$\mu\text{g}$ ,如果需要可通过  $0.45\ \mu\text{m}$  滤膜过滤,供注入 HPLC 测定。

(3)测定。

①高效液相色谱条件。

柱: Nova-pak  $\text{C}_{18}$  粒度  $5\ \mu\text{m}$ ,  $15\ \text{cm} \times 3.9\ \text{mm}$ , 或相当的  $\text{C}_{18}$  柱。

移动相: 甲醇: 水为  $3:1(V:V)$ 。

流速:  $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

温度: 室温。

检测器: 紫外检测器, 使用波长  $251\ \text{nm}$ 。

②定量测定: 按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数和灵敏度 (AUFs), 色谱峰分离  $R \geq 1.5$ 。用两次以上相应的标准工作液对系统进行校正, 向色谱柱交替注入相应的甲萘醌标准工作液和试验溶液得到色谱峰面积响应值, 用外标法定量测定。

#### 8.3.4.7 结果计算

(1)计算公式。饲料中维生素  $\text{K}_3$  的含量, 按公式 8-39 计算。

$$w(\text{维生素 } \text{K}_3) = \frac{P_i \times V \times n \times \rho_i \times V_{st} \times f}{P_{st} \times m \times V_i} \quad 8-39$$

式中:  $m$  为样品质量,  $\text{g}$ ;  $V$  为提取液的总体积,  $\text{mL}$ ;  $n$  为提取液稀释倍数;  $\rho_i$  为维生素  $\text{K}_3$  (甲萘醌) 标准溶液浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V_{st}$  为维生素  $\text{K}_3$  (甲萘醌) 标准溶液进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $V_i$  为从试验溶液中分取的进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $P_{st}$  为与标准溶液进样体积 ( $P_{st}$ ) 相应的峰面积响应值;  $P_i$  为与从试验溶液中分取的进样体积 ( $V_i$ ) 相应的峰面积响应值;  $f$  为校正系数, 结果按甲萘醌计时, 系数为 1; 以亚硫酸氢钠甲萘醌计时系数为 1.918 2。

平行测定结果用算术平均值表示, 保留小数后一位。

(2)重复性。同一操作者对同一试样同时两次平行测定所得结果相对偏差。

每千克试样中维生素 $\text{K}_3$ 含量/ $\text{mg}$	相对偏差/ $\%$
$<100$	$\leq \pm 20$
$100 \sim 1\ 000$	$\leq \pm 15$
$>1\ 000$	$\leq \pm 10$

#### 8.3.5 饲料中维生素 $\text{B}_2$ 的测定 (方法一: 荧光分光光度法)

##### 8.3.5.1 适用范围

本方法适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料、复合预混料、维生素预混料中

维生素 B<sub>2</sub> 的测定。待测液中维生素 B<sub>2</sub> 检测浓度为 0.05~0.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 8.3.5.2 测定原理

维生素 B<sub>2</sub> (即核黄素  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ ) 在 440 nm 紫外光激发下产生绿色荧光, 在一定浓度范围内其荧光强度与核黄素浓度成正比。用连二亚硫酸钠还原核黄素成无荧光物质, 由还原前后荧光强度之差与内标荧光强度的比值, 计算样品核黄素的含量。

#### 8.3.5.3 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。

(1) 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液: 将 8.5 mL 盐酸 (GB 622) 用水稀释至 1 000 mL。

(2) 1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液。

(3) 1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠 (GB 629) 溶液。

(4) 冰乙酸 (GB 676)。

(5) 0.02  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  冰乙酸溶液: 将 1.8 mL 冰乙酸用水稀释至 1 000 mL。

(6) 40  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  高锰酸钾 (GB 643) 溶液。

(7) 100  $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$  过氧化氢 (HG 3-1082) 溶液。现用现配。

(8) 核黄素标准溶液。

①核黄素储备液 I: 核黄素 (中国药典参照标准), 于五氧化二磷干燥器中干燥 24 h, 称取 0.050 0 g, 溶解于 0.02  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  冰乙酸溶液中, 在蒸汽浴上恒速搅动直至溶解, 冷却后稀释至 500 mL。盛入棕色瓶滴加甲苯覆盖, 低温 (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 保存。该溶液 1 mL 含 0.1 mg 核黄素。

②核黄素储备液 II: 取核黄素储备液 I 10 mL, 用 0.02  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  冰乙酸溶液稀释至 100 mL, 盛于棕色瓶中滴加甲苯覆盖, 低温 (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 保存。该溶液 1 mL 中含 10  $\mu\text{g}$  核黄素。

③核黄素标准工作液: 取核黄素储备液 II 10 mL, 用水稀释至 100 mL。现用现配。该溶液 1 mL 中含 1  $\mu\text{g}$  核黄素。

(9) 荧光素标准溶液。

①荧光素储备液: 称取荧光素 (Q/HG 22-786) 0.050 0 g, 用水稀释至 1 000 mL, 盛于棕色瓶中, 低温 (4  $^{\circ}\text{C}$ ) 保存。该溶液 1 mL 中含 50  $\mu\text{g}$  荧光素。

②荧光素标准工作液: 取荧光素储备液 1 mL, 用水定容至 1 000 mL, 盛入棕色瓶中, 低温保存。该溶液 1 mL 中含 0.05  $\mu\text{g}$  荧光素。

(10) 溴甲酚绿 pH 指示剂: 取溴甲酚绿 (HGB 3386) 0.1 g, 加 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 2.8 mL 使之溶解, 再加水稀释至 200 mL。变色范围 pH3.6~5.2。

(11)连二亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )(Q/HG 2-001),防止吸潮。

#### 8.3.5.4 仪器设备

(1)荧光分光光度计。

(2)分析天平:感量 0.000 1 g。

(3)电热恒温水浴。

(4)具塞玻璃刻度试管,15 mL。

#### 8.3.5.5 试样的选取与制备

采集具有代表性的样品至少 500 g,四分法缩减至 100 g,磨碎,通过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

#### 8.3.5.6 测定步骤

(1)称样。单一饲料、配合饲料、浓缩饲料称取 1~2 g,精确至 0.001 g。维生素预混料称取 0.25~0.50 g,精确至 0.000 1 g,将试样置于 100 mL 容量瓶中。

(2)样液的制备。向盛试样的容量瓶中加 65 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,于沸水浴中加热 30 min,开始加热 5~10 min 时常摇动容量瓶,以防样品结块。或于 121~123 °C 6.5 kg 高压釜中加热 30 min。冷却至室温后,用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0~6.5,然后立即加  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液使 pH 值约为 4.5(溴甲酚绿指示剂变为草绿色)。用水稀释至刻度。

通过中速无灰滤纸过滤,弃去最初 5~10 mL 溶液,收集滤液于 100 mL 锥形瓶中。取整份清液,滴加稀盐酸检查蛋白质如有沉淀生成,继续加氢氧化钠溶液,剧烈振摇,使之沉淀完全稀释到测量体积。对高含量样品,取整份的澄清液,用水稀释至一定体积,使含核黄素约为  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以下操作避免紫外光照射)。

(3)杂质氧化。于 a、b、c 3 支 15 mL 具塞刻度试管中各吸入样液 10 mL,同时做平行,向试管 a、c 中各加入 1 mL 蒸馏水,向试管 b 中加入 1 mL 核黄素工作液。然后各加入冰乙酸 1 mL,旋摇混匀后逐个加高锰酸钾溶液 0.5 mL,旋摇混匀,静置 2 min,再逐个加入过氧化氢溶液 0.5 mL,旋摇,使高锰酸钾颜色在 10 s 内消退。加盖摇动,使试管中的气体逸尽。

(4)测定。用荧光素工作溶液调整荧光仪,使其稳定于一定数值,作为仪器工作的固定条件。调整激发波长 440 nm,发射波长 525 nm,测定试管 a、b 的荧光强度,样液在仪器中受激发光照射不超过 10 s。在试管 c 中加入 20 mg 连二亚硫酸钠,摇动溶解,并使试管中的气体逸出,迅速测定其荧光强度作为空白。若溶液出现浑浊,不能读数。

### 8.3.5.7 分析结果的计算和表述

(1)试样中核黄素(维生素 B<sub>2</sub>)质量分数按公式 8-40 计算。

$$w(\text{维生素 B}_2) = \frac{A-C}{B-A} \times \frac{M}{m} \times \frac{V}{V_1} \times R \quad 8-40$$

式中:  $A$  为试管 a(试液加水)的荧光强度;  $B$  为试管 b(试液加标样)的荧光强度;  $C$  为试管 c(试液加连二亚硫酸钠)的荧光强度;  $M$  为加入核黄素标样的量,  $\mu\text{g}$ ;  $V$  为试液的初始体积,  $\text{mL}$ ;  $V_1$  为测定时分取试液的体积,  $\text{mL}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ ;  $R$  为稀释倍数。

$\frac{A-C}{B-A}$  值应在 0.66~1.5, 否则需调整样液的浓度。

测定结果用算术平均值表示, 保留有效数 3 位。

(2)重复性。同一试样同时或快速连续进行两次测定, 所得结果之间的差值如下。

在核黄素含量小于或等于  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 相对偏差不得超过 15%。

在核黄素含量大于  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 相对偏差不得超过 10%。

在核黄素含量大于  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 相对偏差不得超过 5%。

### 8.3.6 维生素预混料中维生素 B<sub>12</sub>的测定(HPLC 法)

#### 8.3.6.1 适用范围

本方法适用于维生素预混料、维生素 B<sub>12</sub>预混制剂中维生素 B<sub>12</sub>的测定。检测范围为每千克样品中维生素 B<sub>12</sub>含量大于 0.25 mg。

#### 8.3.6.2 方法原理

试样中维生素 B<sub>12</sub>用水提取, 经高效液相色谱反相柱分离, 其峰面积与维生素 B<sub>12</sub>的含量成正比。

#### 8.3.6.3 试剂和溶液配制

所用试剂除特殊注明外, 均为优级纯, 水为去离子水。

(1)乙腈: 色谱纯。

(2)正磷酸溶液。

(3)25%乙醇溶液。

(4)维生素 B<sub>12</sub>标准溶液。

①维生素 B<sub>12</sub>标准储备溶液: 准确称取 0.1 g 维生素 B<sub>12</sub>纯品(符合 USP), 溶解于 100 mL 25%乙醇溶液中, 并稀释定容至刻度, 摇匀。该标准储备液 1 mL 含维生素 B<sub>12</sub> 1 mg。

②维生素 B<sub>12</sub>标准工作液:准确吸取维生素 B<sub>12</sub>标准储备液 1 mL 于 50 mL 容量瓶中,用移动相稀释定容至刻度,摇匀。该标准工作液 1 mL 含维生素 B<sub>12</sub> 2 μg。

#### 8.3.6.4 仪器、设备

- (1)实验室常用设备。
- (2)超声波水浴。
- (3)高效液相色谱仪,带自动进样器,紫外可调波长检测器。
- (4)超纯水装置。
- (5)离心机:3 000 r · min<sup>-1</sup>。

#### 8.3.6.5 试样选取与制备

取具有代表性样品至少 500 g,用四分法缩分至 100 g,粉碎,全部过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入样品瓶内密闭,避光低温保存备用。

#### 8.3.6.6 分析步骤

##### (1)提取。

①维生素预混料中维生素 B<sub>12</sub>的提取:称取试样 2~3 g(精确至±0.000 1 g),置于 100 mL 棕色容量瓶中,加约 60 mL 去离子水,在超声波水浴中超声提取 15 min,取出,用去离子水定容至刻度,混匀,过滤,滤液过 0.45 μm 滤膜,供高效液相色谱仪分析。

②维生素 B<sub>12</sub>制剂(1%~2%)的提取:称取试样 1 g(精确至±0.000 1 g)于 100 mL 棕色容量瓶中,加入约 60 mL 去离子水,在超声波水浴中超声提取 10 min,取出,用去离子水定容过滤。精确吸取 1 mL 溶液于 50 mL 棕色容量瓶中,用去离子水定容至刻度,该液通过 0.45 μm 滤膜过滤,供高效液相色谱仪分析。

##### (2)测定步骤。

##### ①色谱条件。

柱子:μ-Bondpak NH<sub>2</sub>,粒度 5 μm,3.9 mm×300 mm。

柱温:30 ℃。

流动相:3%正磷酸水溶液 260,700 mL 乙腈混合,超声脱气。

流速:1.7 mL · min<sup>-1</sup>。

检测波长:361 nm。

②定量测定:按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数,用两次以上相应标准工作液,对系统进行校正。

将通过 0.45 μm 滤膜的样液依次分装于自动进样小瓶中,依外标法上液相色谱仪测定。

## 8.3.6.7 测定结果的计算

(1) 试样中维生素 B<sub>12</sub> 质量分数按公式 8-41 计算。

$$w(\text{维生素 B}_{12}) = \frac{P_i \times V \times \rho_i \times V_{st}}{\bar{P}_{st} \times m \times V_i} \quad 8-41$$

式中:  $m$  为试样质量, g;  $V_i$  为试样溶液进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $P_i$  为试样溶液峰面积值;  $V$  为试样稀释的体积, mL;  $\rho_i$  为标准溶液浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V_{st}$  为标准溶液进样体积,  $\mu\text{L}$ ;  $\bar{P}_{st}$  为标准溶液峰面积平均值。

每个试样取 2 份试料, 进行平行测定, 以其算术平均值为测定结果。结果表示到每千克样品中维生素 B<sub>12</sub> 0.01 mg。

(2) 允许误差。同一分析者对同一试样同时两次平行测定结果的相对偏差应不大于 15%。

## 附 8.1 反相离子对高效液相色谱 测定预混料中维生素 B<sub>12</sub>

### 一、测定原理

试样中维生素 B<sub>12</sub> 经水提取后, 注入反相色谱柱上, 由于输入了有机的反相离子对四丁基磷酸铵(PIC-A)和己烷磺酸钠(PIC-B<sub>6</sub>)溶液, 维生素 B<sub>12</sub> 的阳离子与移动相中阴离子形成离子偶化合物, 在移动过程中与固定相分开达到分离。

### 二、试剂和材料

- (1) 甲醇(优级纯)。
- (2) 磷酸。
- (3) 四丁基磷酸铵(PIC-A)。
- (4) 己烷磺酸钠(PIC-B<sub>6</sub>)。

### 三、测定色谱条件

柱子: 150 mm × 4.0 mm (内径) 不锈钢柱。

固定相:  $\mu$ -Bondpak C<sub>18</sub>(ODS) 粒度 5  $\mu\text{m}$ 。

移动相: 甲醇: 水(1: 3)(V: V) 约 980 mL, 加入 PICA、PIC-B<sub>6</sub>(各一小瓶) 20 mL, 用上述 25% 甲醇溶液定容至 1 L, 混匀, 用磷酸调节 pH 3。



流速:  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

柱温: 室温。

检测器: 紫外检测器, 使用波长  $365 \text{ nm}$ 。

进样量:  $20 \mu\text{L}$ 。

保留时间: 约  $7.0 \text{ min}$ 。

#### 四、其 他

各项与正文相同。

#### 思考题

1. 简述各种饲料添加剂原料中维生素含量的测定原理及测定步骤。
2. 简述饲料和预混料中维生素 A、维生素 D<sub>3</sub>、维生素 E 和维生素 B<sub>12</sub> 的测定原理和测定步骤。

## 9 饲料中有毒有害物质的检验

### 【内容提要】

本章主要介绍了饲料中无机有毒有害物质如铅、砷、铬、镉、汞、氟；天然有毒有害物质亚硝酸盐、氰化物、游离棉酚、异硫氰酸酯、噻唑烷硫酮、尿素酶活性；次生有毒有害物质黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>；饲料中微生物细菌总数和霉菌总数的检测方法。

饲料营养成分的质量控制是饲料工业和动物养殖业首要考虑的问题，特别是国家强制性标准《饲料标签》实施以来，对饲料养分的分析已引起充分的重视，但对饲料中有毒有害物质等卫生指标的监测和控制，由于监控手段等方面的原因，未能引起足够的重视。然而，随着饲料工业和动物养殖业的飞速发展，以及饲料资源的广泛开发利用，人们已逐渐对饲料卫生质量指标的监测和控制工作给予了高度重视。1991 年我国颁布了国家标准《饲料卫生标准》，并于 1992 年开始实施，其中，涉及饲料中有毒有害物质的 17 项卫生标准是国家强制性执行标准。2001 年对《饲料卫生标准》进行了修订。随着饲料工业发展的需要不断增加，对现行的卫生标准将进行不断修订和补充。

饲料中有毒有害物质的种类很多，目前知道的有 50 余种。按其来源划分，可分为天然、次生和外源性有毒有害物质；按其性质划分，可分为有机有毒有害物质和无机有毒有害物质两类。目前的分类趋向于采用后者，因为有些有毒有害物质很难区分是天然的还是外源的。有机有毒有害物质主要包括饲料中天然的有毒有害物质如棉子饼粕中的棉酚等、次生性的有毒有害物质、病原微生物如沙门氏菌等和有机农药的残留（六六六、滴滴涕）等。无机有毒有害物质主要包括铅、砷、铬、镉、汞、氟等。动物食入含有毒有害物质的饲料，引起动物性产品质量和产量下降，严重者引起动物的死亡；并且，残留于动物产品中的有毒有害物质还可通过食物链对人类的身体健康造成危害。因此，利用适宜的分析方法严格检测饲料中的各种有毒有害物质含量，使其控制在国家饲料卫生标准规定的允许范围内及其重要。

## 9.1 无机元素类有毒有害物质的分析测定

已经发现,对动物危害性较大的无机元素类有毒有害物质主要包括铅、砷、铬、镉、汞、氟、钼和硒等。但值得注意的是,无机元素类有毒有害物质的划分是相对的,过去曾经认为对动物有毒有害的无机元素如硒、钼和铬,现已证明它们是动物的必需微量元素;而在动物营养上被认为是必需的微量元素如铁、铜、锌等,如果摄入量过多,同样会对动物产生毒害作用。

饲料中无机元素类有毒有害物质的毒性特点主要有5个方面:①无机元素本身不发生分解,某些元素还可在生物体内蓄积,且生物半衰期较长,从而通过生物链危害人类的健康;②体内的生物转化通常不能减弱无机元素的毒性,有的反而转化为毒性更强的化合物;③饲料中无机元素类有毒有害物质的含量与工业污染和农药污染密切相关,其毒性强弱与无机元素的存在形式有关;④不同种类动物对饲料中无机元素类有毒有害物质的敏感性不同;⑤由饲料中无机元素类有毒有害物质引起的动物中毒多是慢性中毒,急性中毒很少见。因此,对各种饲料原料和配合饲料中的无机元素类有毒有害物质进行检测,以控制其符合国家饲料卫生质量标准规定的允许范围内,这对促进我国饲料工业和动物养殖业的持续发展和保证人类健康具有重要的意义。

### 9.1.1 饲料中铅的测定(原子吸收分光光度法)

铅是对动物有毒害作用的无机类金属元素之一。其毒性作用主要表现在对神经系统、造血器官和肾脏的损害;铅也损害机体的免疫系统,使机体的免疫功能降低;铅还可导致动物畸变、突变和癌变。一般情况下,植物性饲料中的铅含量都较低,在 $0.2\sim 3.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围内,不会超出国家饲料卫生标准规定的允许量。但植物性饲料的含铅量变异很大,与土壤中铅的水平和工业污染有关。在富铅土壤上生长的饲料植物含铅量较高。工业污染是造成植物性饲料含铅量增加的重要原因。如正常牧草中的铅含量为 $3.0\sim 7.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,而冶炼厂附近的牧草铅含量可高达 $325\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,而且多积累在叶片和叶片茂盛的叶菜类中,如甘蓝、莴笋等的铅含量可达 $45\sim 1\,200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。石粉、磷酸盐等矿物质饲料的铅含量因产地不同而变异很大,某些地区的矿物质饲料因含有铅杂质,致使铅含量较高。铅在动物体内主要沉积于骨骼,因此骨粉、肉骨粉和含鱼骨较多的鱼粉含铅量较高。据报道骨粉中的铅含量高达 $61.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。工业污染严重的海水水域生产的鱼粉其铅含量也较高。因此,在饲料工业和动物养殖业中,严格检测

饲料原料和配合饲料中的铅含量是非常必要的。

饲料中铅含量的测定可采用原子吸收分光光度法、双硫脲比色法和阳极溶出伏安法。双硫脲比色法是经典的方法,虽结果准确,但操作复杂,干扰因素多,要求严格。阳极溶出伏安法虽可实现铜、铅、锌、镉的同时测定,但操作繁琐,干扰因素多,灵敏度较低。原子吸收分光光度法快速、准确,干扰因素少,是测定饲料中铅含量的常用方法,也是国家规定的标准方法(GB 13080-91)。

#### 9.1.1.1 适用范围

本方法适用于饲料原料(磷酸盐、石粉、鱼粉等)、配合饲料(包括混合饲料)中铅的测定。

#### 9.1.1.2 测定原理

样品经消解处理后,再经萃取分离,然后导入原子吸收分光光度计中,原子化后测量其在 283.3 nm 处的吸光度,与标准系列比较定量。

#### 9.1.1.3 试剂和溶液

除特殊规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为去离子重蒸馏水或相应纯度的水。

(1)硝酸(GB 626),优级纯。

(2)硫酸(GB 625),优级纯。

(3)高氯酸(GB 623),优级纯。

(4)盐酸(GB 622),优级纯。

(5)甲基异丁酮[CH<sub>3</sub>COCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,HG3-1118]。

(6)6 mol·L<sup>-1</sup>硝酸溶液:量取 38 mL 硝酸,加水至 100 mL。

(7)1 mol·L<sup>-1</sup>碘化钾溶液:称取 166 g 碘化钾(GB 1272),溶于 1 000 mL 水中,贮存于棕色瓶中。

(8)1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液:量取 84 mL 盐酸,加水至 1 000 mL。

(9)50 g·L<sup>-1</sup>抗坏血酸溶液:称取 5.0 g 抗坏血酸(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>,GB 15347)溶于水中,稀释至 100 mL,贮存于棕色瓶中。

(10)铅标准储备液:精确称取 0.159 8 g 硝酸铅[Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,HG3-1070],加 6 mol·L<sup>-1</sup>硝酸溶液 10 mL,全部溶解后,转入 1 000 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,该溶液为每毫升 0.1 mg 铅。

(11)铅标准工作液:精确吸取 1 mL 铅标准储备液,加入 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,此溶液为每毫升 1 μg 铅。

#### 9.1.1.4 仪器、设备

(1)消化设备:两平行样所在位置的温度差小于或等于 5℃。

- (2) 高温炉。
- (3) 分析天平:感量 0.000 1 g。
- (4) 实验室用样品粉碎机。
- (5) 振荡器。
- (6) 原子吸收分光光度计。
- (7) 容量瓶:25,50,100,1 000 mL。
- (8) 吸液管:1,2,5,10,15 mL。
- (9) 消化管。
- (10) 瓷坩埚。

#### 9.1.1.5 试样选取和制备

采集具有代表性的饲料样品,至少 2 kg,四分法缩分至 250 g,磨碎,过 1 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,低温保存备用。

#### 9.1.1.6 测定步骤

##### (1) 试样处理。

① 配合饲料及鱼粉试样处理:称取 4 g 试样,精确到 0.001 g,置于瓷坩埚中缓慢加热至炭化,在 500 ℃ 高温下加热 18 h,直至试样呈灰白色。冷却,用少量水将炭化物湿润,加入 5 mL 硝酸、5 mL 高氯酸,将坩埚内的溶液无损地移入烧杯内,用表面皿盖住,在沙浴或加热装置上加热,待消解完全后,去掉表面皿,至近干涸。加  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 10 mL,使盐类溶解,把溶液转入 50 mL 容量瓶中,用水冲洗烧杯多次,加水至刻度。用中速滤纸过滤,待用。

② 磷酸盐、石粉试样处理:称取 5 g 试样,精确到 0.001 g,放入消化管中,加入 5 mL 水,使试样湿润,依次加入 20 mL 硝酸,5 mL 硫酸,放置 4 h 后加入 5 mL 高氯酸,放在消化装置上加热消化。在 150 ℃ 温度恒温消化 2 h,然后将温度缓缓升到 300 ℃,在 300 ℃ 下恒温消化,直至试样发白近干为止,取下消化管,冷却。加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 10 mL,在 150 ℃ 温度下加热,使试样中盐类溶解后将溶液转入 50 mL 容量瓶中,用水冲洗消化管,将冲洗液并入容量瓶中,加水至刻度。用中速滤纸过滤,备作原子吸收用。

同时于相同条件下,做试剂空白溶液。

(2) 标准曲线绘制。精确吸取  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的铅标准工作液 0,4,8,12,16,20 mL,分别加到 25 mL 容量瓶中,加水至 20 mL。准确加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的碘化钾溶液 2 mL,振荡摇匀;加入 1 mL 抗坏血酸溶液,振荡摇匀;准确加入 2 mL 甲基异丁酮溶液,激烈振动 3 min,静置萃取后,将有机相导入原子吸收分光光度计。在 283.3 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲

线。

(3)测定。精确吸取 5~10 mL 试样溶液和试剂空白液分别加入到 25 mL 容量瓶中,按绘制标准曲线的步骤进行测定,测出相应吸光值和标准曲线比较定量。

#### 9.1.1.7 计算和结果表示

(1)试样中铅的质量分数按公式 9-1 计算。

$$w(\text{Pb}) = \frac{V_1(m_1 - m_2)}{m \times V_2} \quad 9-1$$

式中: $m$  为试样质量,  $g$ ;  $V_1$  为试样消化液总体积,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为测定用试样消化液体积,  $\text{mL}$ ;  $m_1$  为测定用试样消化液铅含量,  $\mu\text{g}$ ;  $m_2$  为空白试液中铅含量,  $\mu\text{g}$ 。

(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  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

(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如下。

在铅含量  $\leq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 20%。

在铅含量为  $5 \sim 15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 15%。

在铅含量为  $15 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 10%。

在铅含量  $\geq 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 5%。

#### 9.1.2 饲料中总砷的测定(银盐法和快速法)

砷是一种损害机体全身组织的毒物,砷与动物体组织中酶的巯基结合,使之灭活而产生毒性,尤其以消化道、肝、肾、脾、肺、皮肤以及神经组织更为敏感。一般自然界中的砷多为五价,环境污染的砷多为三价的无机化合物。其中,三价砷制剂的毒性大于五价砷;元素砷不溶于水,其毒性低;绝大部分砷的氧化物毒性很高;无机砷的毒性大于有机砷。砷可以长期蓄积在机体的表皮组织、毛发、蹄甲及骨骼组织中,并且从体内排出较缓慢。砷也可致使动物癌变、畸变和突变。

一般情况下,植物性饲料中的砷含量均很低,在  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  以下。一些主要饲料原料的砷含量分别为:玉米  $0.07 \sim 0.83 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,大豆饼粕  $0.02 \sim 0.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,麦麸  $0.80 \sim 1.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,棉子饼粕  $0.40 \sim 0.80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,菜子饼粕  $0.80 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,干牧草  $0.05 \sim 0.80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。但植物性饲料中的砷含量主要受到土壤含砷量、农药污染和工业污染的影响。在砷污染的土壤中生

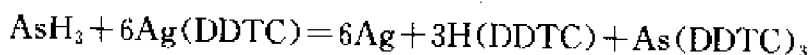
长的饲料植物能吸收累积大量砷。水生生物尤其是海洋生物对砷具有很强的富集能力,某些生物的富集系数可高达3 300倍。一般的鱼类含砷量为 $1.0\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,而被砷污染的海水水域,其贝类的含砷量可高达 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,海藻为 $17.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,海带为 $56.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。据美国报道,被炼铜厂排放的含砷烟尘污染的牧草,其砷含量高达 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。高砷地区产的矿物类饲料中砷的含量也很高。因此,为了减少和避免砷的危害,严格检测饲料原料和配合饲料中的砷含量,具有重要意义。

砷的测定方法有二乙氨基二硫代氨基甲酸银法(银盐法)、硼氢化物还原光度法(快速法)、砷斑法、示波极谱法和原子吸收分光光度法。目前最常用的方法是银盐法和快速法(GB/T13079-1999);砷斑法是半定量方法,可测定痕量砷。应用这些方法测出的是总砷含量,不能区分有机砷和无机砷。本书主要介绍银盐法和快速法。

#### 9.1.2.1 二乙氨基二硫代甲酸银法(银盐法)(方法一)

(1)适用范围。本方法适用于各种配(混)合饲料、浓缩饲料、预混合饲料及饲料原料中总砷的测定。

(2)测定原理。样品经酸消解或干灰化破坏有机物,使砷呈离子状态存在,经碘化钾、氯化亚锡将高价砷还原为三价砷,然后被锌粒和酸产生的新生态氢还原为砷化氢。在密闭装置中,被二乙氨基二硫代甲酸银(Ag-DDTC)的三氯甲烷溶液吸收后,形成黄色或棕红色银溶胶,其颜色深浅与砷含量成正比,用分光光度计比色测定。形成胶体银的反应如下:



(3)试剂和溶液。除特殊规定外,所用试剂均为分析纯,水系蒸馏水或相应纯度的水。

①硝酸(GB 626)。

②硫酸(GB 625)。

③高氯酸(GB 623)。

④盐酸(GB 622)。

⑤抗坏血酸(GB 15347)

⑥无砷锌粒,粒径 $(3.0\pm 0.2)\text{ mm}$ 。

⑦混合酸溶液(A):硝酸:硫酸:高氯酸=23:3:4(V:V:V)。

⑧ $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液:称取20 g氢氧化钠(GB 629),溶于水中,加水稀释至100 mL。

⑨ $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铅溶液:称取 $10.0\text{ g}$ 乙酸铅 $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}, \text{HG} 2603]$ ,溶于 $20\text{ mL } 6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸溶液中,加水至 $100\text{ mL}$ 。

⑩ $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸溶液:量取 $34.8\text{ mL}$ 冰乙酸(GB 676),加水至 $100\text{ mL}$ 。

⑪乙酸铅棉花:将医用脱脂棉在 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铅溶液中浸泡约 $1\text{ h}$ ,压除多余溶液,自然晾干,或在 $90\sim 100\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干,保存于密闭瓶中。

⑫ $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 二乙氨基二硫代氨基甲酸银(Ag-DDTC)-三乙胺-三氯甲烷吸收液:称取 $2.5\text{ g}$ (精确到 $0.0002\text{ g}$ )Ag-DDTC于一干燥的烧杯中,加适量三氯甲烷,待完全溶解后,转入 $1000\text{ mL}$ 容量瓶中,加入 $20\text{ mL}$ 三乙胺使之溶解,用三氯甲烷定容,于棕色瓶中存放在冷暗处。若有沉淀应过滤后使用。

⑬ $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 砷标准储备溶液:精确称取 $0.6600\text{ g}$ 三氧化二砷( $110\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 $2\text{ h}$ ),加 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 $5\text{ mL}$ 使之溶解,然后加入 $25\text{ mL}$ 硫酸溶液( $60\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ )中和,加水定容至 $500\text{ mL}$ 容量瓶中。此溶液每毫升含 $1.00\text{ mg}$ 砷,于塑料瓶中冷贮。

⑭ $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 砷标准工作溶液:精确吸取 $5.0\text{ mL}$ 砷标准储备液于 $100\text{ mL}$ 容量瓶中,加水定容,此溶液每毫升相当于 $1.0\text{ }\mu\text{g}$ 砷。

⑮ $60\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液:吸取 $6.0\text{ mL}$ 硫酸,缓慢加入约 $80\text{ mL}$ 水中,冷却后用水稀释至 $100\text{ mL}$ 。

⑯ $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液:量取 $84.0\text{ mL}$ 盐酸,倒入适量水中,用水稀释至 $1\text{ L}$ 。

⑰ $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液:将1份盐酸与3份水混合。

⑱ $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸镁溶液:称取 $30\text{ g}$ 硝酸镁 $[\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 溶于水中,并稀释至 $200\text{ mL}$ 。

⑲ $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘化钾溶液:称取 $75\text{ g}$ 碘化钾(GB 1272)溶于水中,定容至 $500\text{ mL}$ ,储存于棕色瓶中。

⑳ $400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酸性氯化亚锡溶液:称取 $20\text{ g}$ 氯化亚锡( $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , GB 638)溶于 $50\text{ mL}$ 浓盐酸中,加入数颗锡粒,可用1周。

(4)仪器、设备。

①砷化氢发生及吸收装置(图 9.1)。

a. 砷化氢发生器: $100\text{ mL}$ 带 $30, 40, 50\text{ mL}$ 刻度线和侧管的锥型瓶。

b. 导气管:管径直径为 $8.0\sim 8.5\text{ mm}$ ;尖端孔直径为 $2.5\sim 3.0\text{ mm}$ 。

c. 吸收瓶,下部带 $5\text{ mL}$ 刻度线。

②分光光度计:波长范围 $360\sim 800\text{ nm}$ 。

③分析天平:感量 $0.0002\text{ g}$ 。



- ④可调温电炉:六联和二联各一个。
- ⑤玻璃器皿:凯氏瓶,各种刻度吸液管、容量瓶和高型烧杯。
- ⑥瓷坩埚:30 mL。
- ⑦高温炉:温控  $0\sim 950\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

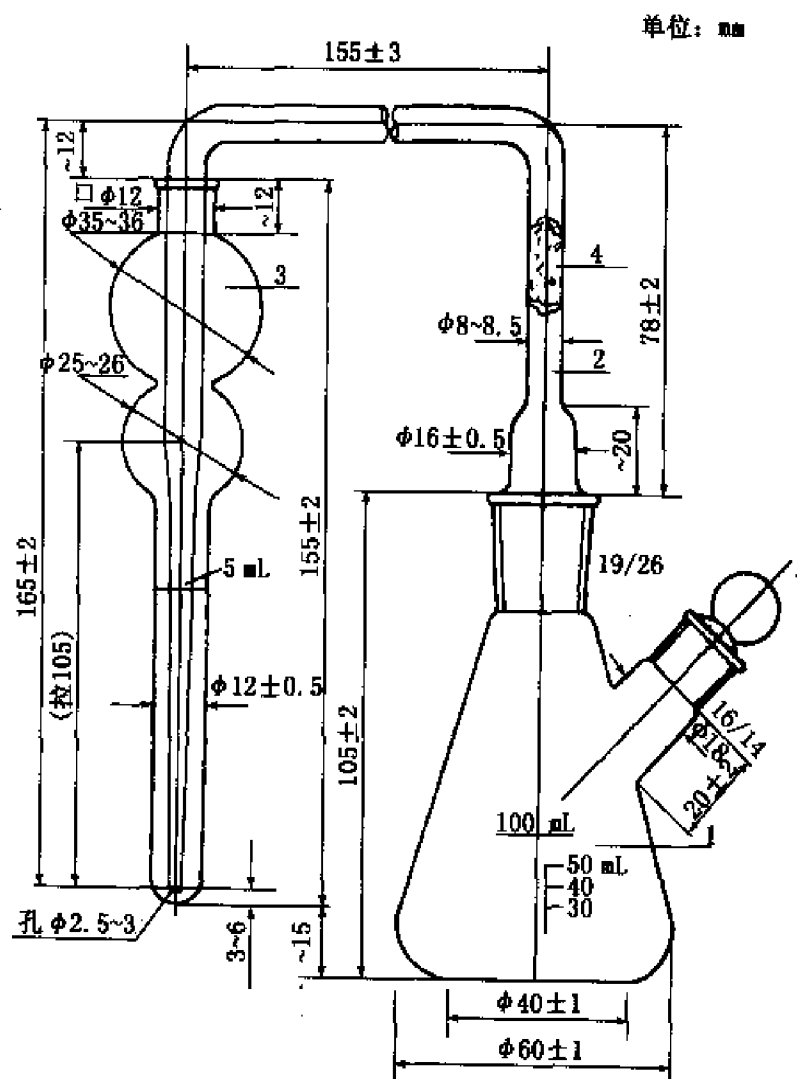


图 9.1 砷化氢发生及吸收装置

(5)试样选取和制备。选择有代表性的饲料样品 1.0 kg,用四分法缩减至 250 g,磨碎,过 0.42 mm 孔筛,存于密封瓶中,待用。

(6)测定步骤。

①试样处理。

a. 混合酸消解法:对配合饲料及植物性单一饲料,宜采用硝酸-硫酸-高氯酸混合酸消解法。称取试样 3~4 g(精确至 0.001 g),置于 250 mL 凯氏瓶中,加水

少许湿润试样,加 30 mL 混合酸(A),放置 4 h 以上或过夜,置电炉上从室温开始消解。待棕色气体消失后,提高消解温度,至冒白烟( $\text{SO}_3$ )数分钟(务必赶尽硝酸),此时,溶液应清亮无色或淡黄色,瓶内溶液体积近似硫酸用量,残渣为白色。若瓶内溶液呈棕色,冷却后添加适量硝酸和高氯酸,直至消化完全。冷却,加 10 mL  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液并煮沸,稍冷,转移到 50 mL 容量瓶中,洗涤凯氏瓶 3~5 次,洗液并入容量瓶中,然后定容,摇匀,待测。

试样消解液含砷小于  $10 \mu\text{g}$  时,可直接转移到砷化氢发生器中,补加 7.0 mL 盐酸,加水使瓶内溶液体积为 40 mL,从加碘化钾起,以下按(6)③操作步骤进行。

b. 盐酸溶样法:对磷酸盐、碳酸盐和微量元素添加剂试样,不宜加硫酸,应用盐酸溶样。称取试样 1~3 g(精确至  $0.0002 \text{ g}$ )于 100 mL 高型烧杯中,加水少许湿润试样,漫漫滴加 10 mL  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,待激烈反应过后,再缓慢加入 8 mL  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,用水稀释至约 30 mL 并煮沸。转移到 50 mL 容量瓶中,洗涤烧杯 3~4 次,洗液并入容量瓶中,定容,摇匀,待测。

试样消解液含砷小于  $10 \mu\text{g}$  时,可直接在砷化氢发生器中溶样,用水稀释至 40 mL 并煮沸,从加碘化钾起,以下按(6)③操作步骤进行。

另外,少数矿物质饲料富含硫,严重干扰砷的测定,可用盐酸溶解样品后(6.1.2),往高型杯中加入 5 mL  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铅溶液并煮沸,静置 20 min,形成的硫化铅沉淀过滤除之,滤液定容至 50 mL,以下按(6)③操作步骤进行。

c. 干灰化法:对预混料、浓缩饲料(配合饲料)样品,可选择干灰化法。称取试样 2~3 g(精确至  $0.0002 \text{ g}$ )于 30 mL 瓷坩埚,低温炭化至无烟后,加入 5 mL  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸镁溶液,混匀,于低温或沸水浴中蒸干,然后转入高温炉于  $550^\circ\text{C}$  恒温灰化 3.5~4.0 h。取出冷却,缓慢加入 10 mL  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,待激烈反应过后,煮沸并转移到 50 mL 容量瓶中,洗涤坩埚 3~5 次,洗液并入容量瓶中,定容,摇匀,待测。

所称试样含砷小于  $10 \mu\text{g}$  时,煮沸后转移到砷化氢发生器中,补加 8.0 mL 盐酸,加水至 40 mL 左右,加入 1.0 g 抗坏血酸溶解后,按(6)③操作步骤进行。同时,于相同条件下,做试剂空白试验。

②标准曲线绘制:精确吸取  $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  砷标准工作液 0.00, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00 mL 于发生瓶中,加 10 mL 盐酸,加水稀释至 40 mL。从加入碘化钾起,以下按(6)③规定步骤操作,测其吸光度,求出回归方程各参数或绘制出标准曲线。当更换锌粒批号或者新配制 Ag-DDTC 吸收液、碘化钾溶液和氯化亚锡溶液时,均应重新绘制标准曲线。

③还原反应与比色测定:从(6)①a、b、c 处理好的待测液中,准确吸取适量溶液(含砷量应 $\geq 1.0 \mu\text{g}$ )于砷化氢发生器中,补加盐酸至总量为 10 mL,并用水稀释至 40 mL,使溶液中盐酸浓度为  $3.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,然后,向试样溶液、试剂空白溶液、标准系列溶液各发生器中,加入 2.0 mL 碘化钾溶液,摇匀,加入 1.0 mL 氯化亚锡溶液,摇匀,静置 15 min。

准确吸取 5.00 mL Ag-DDTC 吸收液于吸收瓶中,连接好砷化氢发生吸收装置(勿漏气,导管塞有蓬松的乙酸铅棉花),使导管尖端插入盛有银盐溶液的刻度试管中的液面下。从发生器侧管迅速加入 4.0 g 无砷锌粒,反应 45 min,使发生的砷化氢气流通入吸收液中。当室温低于  $15^\circ\text{C}$  时,反应延长至 1 h。反应中轻摇发生瓶 2 次,反应结束后,取下吸收瓶,用三氯甲烷定容至 5 mL,摇匀(避光时溶液颜色稳定 2 h)。将溶液倒入 1 cm 比色杯中,以试剂空白为参比,于波长 520 nm 处测吸光度,和标准曲线比较,以确定试样中砷的含量。

注:Ag-DDTC 吸收液系有机溶剂,凡与之接触的器皿务必干燥。

(7)计算和结果表示。

①试样中砷的质量分数按公式 9-2 计算。

$$w(\text{As}) = \frac{(m_1 - m_0) \times V_1}{m \times V_2} \quad 9-2$$

式中: $m$  为试样质量,g; $V_1$  为试样消解液总体积,mL; $V_2$  为测定用试样消解液体积,mL; $m_1$  为测定用试样消解液中的砷含量, $\mu\text{g}$ ; $m_0$  为试剂空白液中砷的质量, $\mu\text{g}$ 。

若试样中砷含量很高,需进行稀释。

②结果表示:每个试样取 2 个平行进行测定,以其算术平均值为分析结果,结果表示至小数点后两位。当试样中含砷量 $\leq 1.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,结果保留三位有效数字。

③允许误差:分析结果的相对偏差应为:

在砷含量 $\leq 1.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,允许相对偏差 $\leq 20\%$ ;

在砷含量为  $1.00 \sim 5.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,允许相对偏差 $\leq 10\%$ ;

在砷含量为  $5 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,允许相对偏差 $\leq 5\%$ ;

在砷含量 $\geq 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,允许相对偏差 $\leq 3\%$ 。

(8)注意事项。

①新玻璃器皿中常含有不同的砷,对所使用的新玻璃器皿,需经消解处理几次后再用,以减少空白。

②吸取消化液的量根据试样含砷量而定,一般要求砷含量在  $1 \sim 5.0 \mu\text{g}$  之间。

③无砷锌粒不可用锌粉替代,否则反应太快,吸收不完全,结果偏低。

④在导气之前每加一种试剂均需摇匀,导气管每次用完后需用氯仿洗净,并保持干燥。

⑤室温过高或过低,影响反应速度,必要时可将反应瓶置于水浴中,以控制反应温度。

#### 9.1.2.2 硼氢化物还原光度法(快速法)(方法二)

(1)适用范围。本方法适用于各种配(混)合饲料、浓缩饲料、预混合饲料及饲料原料中总砷的测定。

(2)测定原理。样品经消解或干灰化破坏有机物后,使砷呈离子状态,在酒石酸环境中,硼氢化钾还原成氢化砷( $\text{AsH}_3$ )气体。在密闭装置中,被 Ag-DDTC 三氯甲烷溶液吸收,形成黄色或棕红色银溶胶,其颜色深浅与砷含量成正比,用分光光度计比色测定。

(3)试剂和溶液。除下列试剂外,其他试剂同银盐法。

①混合酸溶液(B):硝酸:硫酸:高氯酸 =  $20:2:3(V:V:V)$ 。

②  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  甲基橙水溶液: pH 3.0(红)~4.4(橙)。

③ 1:1 氨水溶液( $V:V$ )。

④  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酒石酸溶液:称取 100 g 酒石酸(GB 1294),加水适量,稍加热溶解,冷却后定容至 500 mL。

⑤硼氢化钾片:硼氢化钾:氯化钠 =  $1:5(m:m)$ 。将硼氢化钾( $\text{KBH}_4$ )和氯化钠(GB 1266)按质量比 1:5 比例混匀,于  $90 \sim 100^\circ\text{C}$  干燥 2 h,压力为 2 kPa 条件下,压制成直径 10 mm,厚 5 mm,每片质量为  $(1.0 \pm 0.1) \text{ g}$ 。压制及贮存中应防潮湿。

(4)仪器、设备。同银盐法。

(5)试样制备。同银盐法。

(6)测定步骤。

①试样处理。

a. 混合酸消解法:对配、混合饲料及植物性单一饲料,宜采用硝酸-硫酸-高氯酸混合酸消解法。称取试样  $2.0 \sim 3.0 \text{ g}$  (精确至  $0.0002 \text{ g}$ ),置于 250 mL 凯氏瓶中,加水少许湿润试样,加 25 mL 混合酸(B),置电炉上从室温开始消解,待样液煮沸后,关闭电炉 10~15 min,继续加热消解,直至冒白烟( $\text{SO}_3$ )数分钟(务必赶尽硝酸,否则结果偏低),此时,溶液应清亮无色或淡黄色,瓶内溶液体积近似

硫酸用量,残渣为白色。稍冷,转移到 100 mL 砷化氢发生器中,洗涤凯氏瓶 3~4 次,洗液并入发生器中,使瓶内溶液体积为 30 mL 左右。以下按(6)③、④操作步骤进行。

b. 盐酸溶样法:对磷酸盐、碳酸盐和微量元素添加剂试样,不宜加硫酸,应用盐酸溶样法。称取试样 0.5~2.0 g(精确至 0.000 2 g)于发生器中,慢慢滴加 5 mL  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,待激烈反应过后,再缓慢加入 3~4 mL  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,用水稀释至约 30 mL 并煮沸。试样溶解后,以下按(6)③、④操作步骤进行。

c. 干灰化法:对预混料、浓缩饲料(配合饲料)样品,可选择干灰化法。称取试样 1.0~2.0 g(精确至 0.000 2 g)于 30 mL 瓷坩埚中,低温炭化完全后,于高温炉中  $550^{\circ}\text{C}$  恒温灰化 3 h。取出冷却,缓慢加入 10 mL  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,待激烈反应过后,煮沸并转移到砷化氢发生器中,加水至 30 mL 左右,加入 1 g 抗坏血酸溶解后,以下按(6)③、④操作步骤进行。

同时于相同条件下,做试剂空白试验。

②标准曲线绘制:准确吸取  $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  砷标准工作液 0.00, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 mL 于发生器中,加水稀释至 40 mL,加入 6.0 mL  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酒石酸溶液,以下按(6)④规定步骤操作,测其吸光度,求出回归方程各参数或绘制出标准曲线。当新配制 Ag-DDTC 吸收液和氯化亚锡溶液时,应重新绘制标准曲线。

③氨水(1:1)调溶液 pH 值:发生器中加入 2 滴甲基橙指示剂,用 1:1 氨水(V:V)溶液调 pH 值至橙黄色,再滴加  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液至刚好变红色。加入 6.0 mL  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酒石酸溶液,用水稀释至 50 mL。

④还原反应与比色测定:准确吸取 5.00 mL Ag-DDTC 吸收液于吸收瓶中,连接好砷化氢发生吸收装置(勿漏气,导管塞有蓬松的乙酸铅棉花),使导管尖端插入盛有银盐溶液的刻度试管中的液面下。从发生器侧管迅速加入硼氢化钾一片,立即盖紧塞子,反应完毕后再加第二片。反应时轻轻摇动发生器 2~3 次,待反应结束后,取下吸收瓶,以试剂空白为参比,于波长 520 nm 处用 1 cm 比色池测定吸光度,与标准曲线比较,以确定试样中砷的含量。

(7)计算和结果表示。计算公式、结果表示及允许误差均同银盐法。

### 9.1.3 饲料中汞的测定(冷原子吸收法)

汞在自然界主要以元素汞和汞化合物两种状态存在,汞化合物又分为无机汞和有机汞两类。汞对动物的毒性很大,它是一种蓄积性毒物,因此可通过食物

链危害人体健康。甲基汞除能蓄积于肝和肾外,更重要的是它可通过血脑屏障蓄积于脑内,引起严重的神经系统症状,而且,甲基汞从体内的排出要比无机汞慢得多,因此其蓄积性和毒性更大。

正常情况下,植物类饲料中汞的含量都很低,在  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  以下,不会导致动物的汞中毒。但植物性饲料中汞的含量与农药污染和工业污染密切相关。用含汞的工业废水浇灌农田或农作物施用含汞的农药,均会导致饲料的汞含量异常增高,而且,被汞污染的饲料通过各种加工均不能清除所含的汞。水体的汞含量一般很低,但水体生物可富集汞,因此鱼、虾等体内的汞含量较高,尤其在汞污染严重的水域中,水生生物的汞含量更高。如我国渤海湾某海域所产鱼类的汞含量达  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,蟹类的汞含量达  $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;而正常情况下,鱼粉的平均汞含量为  $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。日本水俣市的一家工厂,因将含有甲基汞的工业废水排放到海湾,使其鱼体汞含量剧增,由其制得的鱼粉汞含量比正常鱼粉高 4 倍以上。值得注意的是水体中的无机汞在微生物作用下,可转化成毒性更强的有机汞;鱼体不仅可通过食物链蓄积有机汞,还能利用无机汞合成有机汞,因此鱼体内所含的汞大部分是毒性更强的有机汞。自然界的岩石及矿石含汞量为  $5 \sim 1400 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,变化幅度特别大,因此利用汞含量高的岩石及矿石生产的矿物质饲料如石粉和磷酸盐中汞含量较高。因此,严格检测某些饲料原料和配合饲料中的汞含量,把好饲料卫生质量关具有重要的意义。

饲料中汞的测定方法有冷原子吸收法和双硫脲比色法。双硫脲比色法是经典方法,干扰因素多,需分离或掩蔽干扰离子,操作繁琐,要求严格,适合于汞含量大于  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的饲料样品测定。冷原子吸收法灵敏度较高、干扰少、应用简便,对汞含量低于  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的饲料样品也可进行测定,因而应用较广,是目前规定的国家标准方法(GB 13081-1991)。

#### 9.1.3.1 适用范围

本方法适用于各类饲料中汞的测定。

#### 9.1.3.2 测定原理

在原子吸收光谱中,汞原子对波长  $253.7 \text{ nm}$  的共振线有强烈的吸收作用。试样经硝酸-硫酸消化,使汞转为离子状态。在强酸中,氯化亚锡将汞离子还原成元素汞,以干燥清洁的空气为载体吹出,进行冷原子吸收,与标准系列比较定量。

#### 9.1.3.3 试剂和溶液

除特殊规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为重蒸馏水或相应纯度的水。

(1)硝酸(GB 626)。

(2)硫酸(GB 625)。

(3)  $300\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化亚锡溶液:称取  $30\text{ g}$  氯化亚锡(GB 638),加少量水,再加  $2\text{ mL}$  硫酸使之溶解后,加水稀释至  $100\text{ mL}$ 。放置于冰箱中备用。

(4) 混合酸液:量取  $10\text{ mL}$  硫酸,加入  $10\text{ mL}$  硝酸,慢慢倒入  $50\text{ mL}$  水中,冷却后加水稀释至  $100\text{ mL}$ 。

(5) 汞标准储备液:准确称取干燥器内干燥过的二氯化汞(HG3-1068)  $0.1354\text{ g}$ ,用混合酸液溶解后,移入  $100\text{ mL}$  容量瓶中,稀释至刻度,混匀。此溶液每毫升相当于  $1\text{ mg}$  汞,冷藏备用。

(6) 汞标准工作液:吸取  $1.0\text{ mL}$  汞标准储备液,置于  $100\text{ mL}$  容量瓶中,加混合酸液稀释至刻度,此溶液每毫升相当于  $10\text{ }\mu\text{g}$  汞。再吸取此液  $1.0\text{ mL}$ ,置于  $100\text{ mL}$  容量瓶中,加混合酸液稀释至刻度,此溶液每毫升相当于  $0.1\text{ }\mu\text{g}$  汞,临时现配。

#### 9.1.3.4 仪器、设备

- (1) 分析天平:感量  $0.0001\text{ g}$ 。
- (2) 实验室用样品粉碎机或研钵。
- (3) 消化装置。
- (4) 测汞仪。
- (5) 三角烧瓶:  $250\text{ mL}$ 。
- (6) 容量瓶:  $100\text{ mL}$ 。
- (7) 还原瓶:  $50\text{ mL}$  (测汞仪附件)。

#### 9.1.3.5 试样选取和制备

采集具有代表性的饲料原料样品,至少  $2\text{ kg}$ ,四分法缩分至  $250\text{ g}$ ,磨碎,过  $1\text{ mm}$  孔筛,混匀,装入密闭容器,低温保存备用。

#### 9.1.3.6 测定步骤

(1) 试样处理。称取  $1\sim5\text{ g}$  试样,精确到  $0.001\text{ g}$ ,置于  $250\text{ mL}$  的三角烧瓶中。加玻璃珠数粒,加入  $25\text{ mL}$  硝酸和  $5\text{ mL}$  硫酸,并转动三角烧瓶防止局部炭化。装上冷凝管,小火加热,待开始发泡即停止加热;发泡停止后,再加热回流  $2\text{ h}$ 。放冷后从冷凝管上端小心加  $20\text{ mL}$  水,继续加热回流  $10\text{ min}$ ;冷却后用适量水冲洗冷凝管,洗液并入消化液。消化液经玻璃棉或滤纸滤于  $100\text{ mL}$  容量瓶内,用少量水洗三角烧瓶和滤器,洗液并入容量瓶内,加水定容至刻度,混匀。取与消化试样用量相同的硝酸、硫酸,同法做试剂空白试验。

若为石粉,称取约  $1\text{ g}$  试样,精确到  $0.001\text{ g}$ ,置于  $250\text{ mL}$  三角烧瓶中。加玻璃珠数粒,装上冷凝管后,从冷凝管上端加入  $15\text{ mL}$  硝酸。用小火加热  $15\text{ min}$ ,放冷,用适量水冲洗冷凝管,移入  $100\text{ mL}$  容量瓶内,加水定容至刻度,混匀。

(2)标准曲线绘制。分别吸取汞标准工作液 0.00, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 mL (相当于 0.00, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05  $\mu\text{g}$  的汞), 置于 50 mL 还原瓶内, 各加入 10 mL 混合酸液, 和 2 mL 氯化亚锡溶液后, 立即盖紧还原瓶 2 min, 记录测汞仪读数指示器最大吸光度。以吸光度为纵坐标, 汞浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

(3)试样测定。准确吸取 10 mL 试样消化液于 50 mL 还原瓶内, 加入 2 mL 氯化亚锡溶液后, 立即盖紧还原瓶 2 min, 记录测汞仪读数指示器最大吸光度。

#### 9.1.3.7 计算和结果表示

(1)试样中汞的质量分数按公式 9-3 计算。

$$w(\text{Hg}) = \frac{V_1(m_1 - m_0)}{V_2 \times m} \quad 9-3$$

式中:  $m$  为试样质量, g;  $V_1$  为试样消化液总体积, mL;  $V_2$  为测定用试样消化液体积, mL;  $m_1$  为测定用试样消化液中汞质量,  $\mu\text{g}$ ;  $m_0$  为试剂空白液中汞质量,  $\mu\text{g}$ 。

(2)结果表示。每个试样平行进行测定 2 次, 以其算术平均值为分析结果, 结果表示到  $0.001 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

(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:

在汞含量  $\leq 0.020 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 不得超过平均值的 100%;

在汞含量为  $0.020 \sim 0.100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 不得超过平均值的 50%;

在汞含量  $\geq 0.100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 不得超过平均值的 20%。

#### 9.1.3.8 注意事项

(1)玻璃对汞吸附较强, 因此在配制汞标准溶液时, 最好先在容量瓶中加入部分混合酸, 再加入汞标准液。

(2)玻璃对汞有吸附作用, 因此锥形瓶、反应瓶、容量瓶等玻璃器皿每次使用后都需用 10% 硝酸浸泡, 随后用水洗净备用。

#### 9.1.4 饲料中镉的测定(碘化钾-甲基异丁酮法)

镉对动物生长有明显的毒害作用。镉被动物吸收后主要与金属硫蛋白结合贮存于肝、肾和骨骼中。镉的生物半衰期长达 10 年以上, 而且体内的镉排泄很慢, 因此镉在动物体内有明显的蓄积性; 长期摄入低浓度的镉或被镉污染的饲草和饮水, 就会引起慢性镉中毒; 同时, 镉还可在动物产品中残留和富集, 并通过食



物链危及人类的健康。

一般情况下,饲料中的镉含量低于  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 平均  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 不会对动物造成危害。如正常地区的牧草镉含量为  $0.1 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 稻草为  $0.1 \sim 0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 稻谷、玉米和小麦分别为  $0.03 \sim 0.11$ 、 $0.1$  和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。但是, 镉在工农业中用途广泛, 环境污染较为普遍, 而且镉在外界环境中非常稳定, 因此, 工业污染是造成饲料镉污染的主要途径。污染的土壤中镉含量为  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 比正常土壤  $0.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  高 800 倍, 因而在镉污染的土壤上生长的牧草或饲料镉含量明显增加。如稻谷为  $0.36 \sim 4.17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 平均  $1.41 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 稻草为  $0.7 \sim 3.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。污染的水体中镉的含量为  $0.2 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 比正常水体的镉含量  $0.1 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  高 1 000~2 000 倍; 水体镉可被水生生物藻类富集 11~20 倍, 鱼类富集 103~105 倍, 贝类富集 105~106 倍。如非污染水域中的贝类和鱼粉镉含量分别为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 而在污染区高达  $420 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

因此, 在饲料工业和动物养殖业, 严格检测饲料中的镉含量, 合理调配饲料资源, 使其镉含量控制在国家饲料卫生标准规定的范围内是非常必要的。目前, 镉的测定方法主要有原子吸收法和比色法。比色法主要是利用镉离子与镉试剂生成红色络合物, 其颜色深浅与镉含量成正比来测定。原子吸收法快速准确, 是最常用的方法; 根据使用的萃取剂不同, 又分为碘化钾-甲基异丁酮法和双硫脲-乙酸乙酯法, 前者为国家规定的标准方法(GB 13082-1991)。

#### 9.1.4.1 适用范围

本方法适用于饲料中镉的测定。

#### 9.1.4.2 测定原理

以干灰化法分解样品, 在酸性条件下, 有碘化钾存在时, 镉离子与碘离子形成络合物, 被甲基异丁酮萃取分离, 将有机相喷入空气-乙炔火焰, 使镉原子化, 测定其对特征共振线  $228.8 \text{ nm}$  处的吸光度, 与标准系列比较求得镉的含量。

#### 9.1.4.3 试剂和溶液

除特殊规定外, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为重蒸馏水。

(1) 硝酸(GB 626), 优级纯。

(2) 盐酸(GB 622), 优级纯。

(3)  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碘化钾溶液: 称取  $322 \text{ g}$  碘化钾(GB 1272), 溶于水, 加水稀释至  $1\,000 \text{ mL}$ 。

(4)  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抗坏血酸溶液: 称取  $5 \text{ g}$  抗坏血酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , GB 15347), 溶于水, 加水稀释至  $100 \text{ mL}$  (临用时配制)。

(5)  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液:量取 10 mL 盐酸,加入 110 mL 水,摇匀。

(6) 甲基异丁酮 [ $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , HG 3-1118]。

(7) 镉标准储备液:称取高纯金属镉(Cd, 99.99%) 0.100 0 g 于 250 mL 三角烧瓶中,加入 1:1 硝酸溶液(V:V) 10 mL,在电热板上加热溶解完全后,蒸干。取下冷却,加入 1:1 盐酸溶液(V:V) 20 mL 及 20 mL 水,继续加热溶解,取下冷却后,移入 1 000 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,此溶液每毫升相当于  $100 \mu\text{g}$  镉。

(8) 镉标准中间液:吸取 10 mL 镉标准储备液于 100 mL 容量瓶中,以  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液稀释至刻度;摇匀,此溶液每毫升相当于  $10 \mu\text{g}$  镉。

(9)  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  镉标准工作液:吸取 10 mL 镉标准中间液于 100 mL 容量瓶中,以  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,此溶液每毫升相当于  $1 \mu\text{g}$  镉。

#### 9.1.4.4 仪器、设备

(1) 分析天平:感量  $0.000 1 \text{ g}$ 。

(2) 高温电炉。

(3) 原子吸收分光光度计。

(4) 硬质烧杯:100 mL。

(5) 容量瓶:50 mL。

(6) 具塞比色管:25 mL。

(7) 吸量管:1, 2, 5, 10 mL。

(8) 移液管:5, 10, 15, 20 mL。

#### 9.1.4.5 试样选取和制备

采集具有代表性的饲料样品,至少 2 kg,四分法缩分至约 250 g,磨碎,过 1 mm 筛,混匀,装入密闭广口试样瓶中,防止试样变质,低温保存备用。

#### 9.1.4.6 测定步骤

(1) 试样处理:准确称取 5~10 g 试样于 100 mL 硬质烧杯中,置于高温电炉内,微开炉门,由低温开始,先升至  $200^\circ\text{C}$  保持 1 h,再升至  $300^\circ\text{C}$  保持 1 h,最后升温至  $500^\circ\text{C}$  灼烧 16 h,直至试样成白色或灰白色,无炭粒为止。取出冷却,加水润湿,加 10 mL 硝酸,在电热板或砂浴上加热分解试样至近干,冷却后加  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 10 mL,将盐类加热溶解,内容物移入 50 mL 容量瓶中,再以  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液反复洗涤烧杯,洗液并入容量瓶中,以  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液稀释至刻度,摇匀备用。

若为石粉、磷酸盐等矿物试样,可不用干灰化法。称样后加 10~15 mL 硝酸或盐酸,在电热板或砂浴上加热分解试样至近干,其余步骤同上。

同时,于相同条件下做试剂空白溶液。

(2)标准曲线绘制:精确吸取镉标准工作液 0.00,1.25,2.50,5.00,7.50,10.00 mL,分别置于 25 mL 具塞比色管中,以  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液稀释至 15 mL,依次加入 2 mL 碘化钾溶液摇匀,加 1 mL  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抗坏血酸溶液,摇匀,准确加入 5 mL 甲基异丁酮。振动萃取 3~5 min,静置分层后,有机相导入原子吸收分光光度计,在波长 228.8 nm 处测其吸光度;以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线。

(3)试样测定:精确吸取 15~20 mL 待测试样溶液及同量试剂空白溶液于 25 mL 具塞比色管中,依次加入 2 mL 碘化钾溶液,以下步骤同标准曲线绘制。

#### 9.1.4.7 计算和结果表示

(1)试样中镉的质量分数按公式 9-4 计算。

$$w(\text{Cd}) = \frac{V_1(m_1 - m_2)}{m \times V_2} \quad 9-4$$

式中: $m$  为试样质量,g; $V_1$  为试样消化液总体积,mL; $V_2$  为测定用试样消化液体积,mL; $m_1$  为测定用试样消化液中镉质量, $\mu\text{g}$ ; $m_2$  为试剂空白液中镉质量, $\mu\text{g}$ 。

(2)结果表示:每个试样取 2 个平行样进行测定,以其算术值作为测定结果,结果表示到  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

(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:

在镉含量  $\leq 0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 50%;

在镉含量为  $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 30%;

在镉含量  $\geq 1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 20%。

#### 9.1.4.8 注意事项

(1)干灰化法处理试样时,要防止高温下镉与器皿之间的黏滞损失,尤其当试样成分呈碱性时,黏滞损失加剧。蔬菜类含有较多的碱金属阳离子,而磷酸根离子较少,谷物及肉类则正好相反,因此在干灰化蔬菜类试样时,加少量磷酸,可减少黏滞损失。在  $500^\circ\text{C}$  灰化试样,要达到完全灰化往往是困难的,提高灰化温度固然可达到完全灰化的目的,但镉的损失加剧,若灰化不彻底又会造成镉的吸附和被包被,为此,对灰分再加入少量混合酸消解,以弥补此缺陷。

(2)一般试样溶解的镉浓度往往很低,要用灵敏度扩张装置提高其灵敏度 2~5 倍进行测定。

### 9.1.5 饲料中铬的测定(比色法)

铬是动物的必需微量元素,但当饲料中铬含量过高时,就会引起动物铬中毒。一般动物体内存在的铬主要是三价铬,它可与六价铬进行转换,六价铬对动物的危害性较大,而且动物对六价铬的吸收率高于三价铬。铬被动物吸收后主要分布于肝、肾、脾和骨骼组织中。

通常,饲料中的天然铬含量很低,不会引起动物中毒;牧草为  $0.10 \sim 0.55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,陆生植物为  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,谷类子实为  $0.017 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,叶菜类为  $0.035 \sim 0.182 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,根茎类为  $0.022 \sim 0.277 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,水生植物为  $0.02 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。铬及其化合物在工业中的用途极为广泛,因此,工业污染是造成饲料铬含量增加的重要原因。研究发现,在用含铬废水浇灌的农田上生长的胡萝卜和甘蓝,其铬含量分别比正常情况下高3倍和10倍。

动物组织对铬有富集作用,因此动物性饲料的铬含量一般高于植物性饲料,尤其是利用铬污染区域的水生生物生产的动物性饲料,其铬含量明显增加。如国家饲料监督检验中心测定的某批西班牙进口鱼粉中铬的含量高达  $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。皮革粉未经脱铬处理,含有很高的铬,必须经脱铬处理后,使其铬含量控制在  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  以下方可用做饲料。因此,为了减少铬的危害,对各种饲料中的铬含量进行严格检测具有重要的意义。

饲料中铬的含量一般甚微,因此分析取样量少,灵敏度达不到;分析取样量多,给前处理带来困难,并产生严重的干扰,所以,饲料样品的消解和处理是影响分析结果的主要因素。目前,测定铬的常用方法有比色法和原子吸收法。比色法常采用二苯卡巴肼作显色剂,该法反应灵敏,专一性较强,是国家规定的标准方法(GB 13088-1991),但易受一些因素的干扰,超过一定量时,需分离或萃取后测定。原子吸收法简便、快速,具有较高的灵敏度,也广泛使用。

#### 9.1.5.1 适用范围

本方法适用于饲料用水解皮革粉和配合饲料中铬的测定。

#### 9.1.5.2 测定原理

以干灰化法分解样品,在碱性条件下用高锰酸钾将灰分溶液中的铬离子氧化为六价铬离子,再将溶液调至酸性,使六价铬离子与二苯卡巴肼生成玫瑰红色络合物,其颜色深浅与铬的含量呈正比,通过比色测定,求得铬的含量。

#### 9.1.5.3 试剂和溶液

本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

(1)  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸溶液:量取 28 mL 浓硫酸(GB 625),徐徐加入水中,再加水稀释至 1 000 mL。

(2) 1:6 硫酸溶液(V:V):量取 100 mL 浓硫酸,徐徐加入 600 mL 水中,并加入 1 滴  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  高锰酸钾溶液,使溶液呈粉红色。

(3)  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液:称取 32 g 氢氧化钠(GB 629),溶于水中,加水稀释至 200 mL。

(4)  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  高锰酸钾溶液:称取 2 g 高锰酸钾(GB 643),溶于水中,加水稀释至 100 mL。

(5) 二苯卡巴肼溶液:称取 0.5 g 二苯卡巴肼 $[(\text{C}_6\text{H}_5)_2 \cdot (\text{NH})_4 \cdot \text{CO}]$ ,HG3-964],溶解于 100 mL 丙酮(GB 686)中。

(6) 95%乙醇(GB 679)。

(7) 铬标准储备液:称取 0.283 0 g 经  $100 \sim 110^\circ\text{C}$  烘至恒重的重铬酸钾(GB 642),用水溶解,移入 1 000 mL 容量瓶中,稀释至刻度,此溶液每毫升相当于 0.10 mg 铬。

(8) 铬标准溶液:吸取 1.00 mL 铬标准储备液于 50 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度。此溶液每毫升相当于  $2 \mu\text{g}$  铬。

#### 9.1.5.4 仪器、设备

(1) 分析天平:感量  $0.0001 \text{ g}$ 。

(2) 高温电炉。

(3) 实验用样品粉碎机或研钵。

(4) 电炉:600 W。

(5) 容量瓶:50,100,1 000 mL。

(6) 吸量管:1,5,10 mL。

(7) 移液管:5,10,15,20,25,30 mL。

(8) 三角烧瓶:150 mL。

(9) 短颈漏斗:直径 6 cm。

(10) 瓷坩埚:60 mL。

(11) 滤纸:11 cm,定性,快速。

(12) 分光光度计:有 10 mm 比色皿,可在 540 nm 处测量吸光度。

#### 9.1.5.5 试样选取和制备

采集具有代表性的饲料用水解皮革粉或配合饲料样品,至少 2 kg,四分法缩至 250 g 左右,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。

#### 9.1.5.6 测定步骤

(1)试样处理。称取 1.0~1.5 g 试样,精确到 0.001 g,置于 60 mL 瓷坩埚中,在电炉上炭化完全后,置于高温炉内,由室温开始,徐徐升温,至 600 ℃灼烧 5 h,直至试样呈白色或灰白色无炭粒为止。取出冷却,加入 0.5 mol·L<sup>-1</sup>硫酸溶液 5 mL,在电炉上微沸,内容物全部移入 150 mL 三角瓶中,并用热水反复洗涤坩埚 3~4 次,洗涤液并入三角瓶中,加入 4 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液 1.5 mL,再加入 2 滴 20 g·L<sup>-1</sup>高锰酸钾溶液,加水使瓶内溶液总体积为 60~70 mL,摇匀,溶液呈紫红色,在电炉上加热煮沸 20 min(在煮沸过程中,如紫红色消退,应及时补加高锰酸钾溶液,使溶液保持紫红色),然后沿壁加入 3 mL 95%的乙醇,摇匀,趁热过滤,滤液置于 100 mL 容量瓶中,并用少量热水洗涤三角瓶和滤纸 3~4 次,洗涤液并入容量瓶中,此滤液即为试样溶液,备用。

(2)标准曲线绘制。吸取铬标准溶液 0.00, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00, 25.00, 30.00 mL,分别置于 100 mL 容量瓶中,加入适量水稀释,依次加入 4 mL 1:6 硫酸溶液(V:V),再加入 2.0 mL 二苯卡巴肼溶液,用水稀释至刻度,摇匀,静置 30 min,以空白溶液作为参比,用 10 mm 比色皿,在波长 540 nm 处用分光光度计测量其吸光度,以吸光度为纵坐标,铬标准溶液浓度为横坐标绘制标准曲线。

(3)试样测定。在装有试样溶液的 100 mL 容量瓶中,依次加入 4 mL 1:6 硫酸溶液(V:V)和 2.0 mL 二苯卡巴肼溶液,用水稀释至刻度,摇匀,静置 30 min,按(2)步骤测定其吸光度,求得试样溶液中铬的浓度。

#### 9.1.5.7 计算和结果表示

(1)试样中铬的质量分数按公式 9-5 计算。

$$w(\text{Cr}) = \frac{\rho \times V}{m} \quad 9-5$$

式中: $\rho$  为测定用试样溶液中铬的浓度,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $V$  为试样溶液的定容体积, mL;  $m$  为试样质量, g。

(2)结果表示。每个试样取 2 个平行样进行测定,以其算术平均值为分析结果。结果表示到 0.01  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

(3)重复性。同一分析者对同一试样同时或快速连续地进行 2 次测定,所得结果之间的差值:

在铬含量  $< 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 50%;

在铬含量  $\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,不得超过平均值的 20%。

### 9.1.6 饲料中氟的测定(离子选择性电极法)

氟是动物机体必需的微量元素之一,缺乏会引起动物缺乏症,但同时也是一种有毒元素,因此过量会导致动物氟中毒。一般在生产上常见的是长期由饲料或饮水摄入过量的氟引起的慢性氟中毒,主要表现为氟斑牙和氟骨症,而一次性大剂量摄入过量的氟引起的氟中毒很少见,其临床症状多表现为胃肠炎,严重者几小时内死亡。

通常植物性饲料中含氟量较低,在  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  以下,而且除少数几种植物外,绝大多数植物一般不吸收大量的氟,即使是在含氟很高的土壤上生长的植物及其子实中氟含量也增加极少。但在氟污染区生产的植物性饲料(主要是牧草)中氟含量较高,可达几十至几百  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;因为高的空气氟浓度是牧草中氟含量较高( $50 \sim 90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )的主要原因,但植物子实受空气氟浓度的影响较小。据测定内蒙古乌梁素海水草龙须眼子菜的氟含量高达  $225 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

氟主要沉积于动物的骨骼组织和牙齿中,正常动物的骨骼中氟含量可达  $129 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,高氟地区受氟危害的动物,其干燥脱脂的骨骼氟含量高于  $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。工业污染严重的水域所生产的鱼粉,其氟含量也较高。1988年,朱蓓蕾测定全国43个鱼粉样,平均含氟量  $220.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,而在氟污染的水域生产的鱼粉氟含量高达  $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。氟在岩石中也自然存在,大多数磷酸石含氟较高,利用这些矿石生产的饲料级磷酸盐必需经过脱氟工艺,否则,含氟量很高,对动物的危害很大。因此必须严格检测饲料原料和配合饲料的氟含量,并根据检测结果和动物种类合理利用饲料原料,以保证配合饲料的氟含量在国家饲料卫生标准规定的允许范围内。

氟的测定方法有比色法和离子选择性电极法。比色法又分为扩散-氟试剂比色法和灰化蒸馏-氟试剂比色法。比色法具有灵敏度高、色泽稳定、重现性好、结果准确等特点。离子选择性电极法测定范围宽,干扰小,简便,是国家规定的标准方法(GB 13083-1991),适用于含量较高、变化范围较大和干扰大的饲料;当氟含量低时,会出现非线性关系,宜选用比色法测定。

#### 9.1.6.1 适用范围

本方法适用于饲料原料(磷酸盐、石粉、鱼粉等)、配合饲料(包括混合饲料)中氟的测定。

#### 9.1.6.2 测定原理

氟离子选择电极的氟化镧单晶膜对氟离子产生选择性的对数响应,氟电极和饱和甘汞电极在被测试液中,电位差可随溶液中氟离子的活度的变化而改变,

电位变化规律符合能斯特方程式。

$$E = E^{\circ} - \frac{2.303RT}{F} \lg c_{F^{-}}$$

$E$  与  $\lg c_{F^{-}}$  呈线性关系。 $2.303RT/F$  为该直线的斜率(25℃时为 59.16)。

与氟离子形成络合物的  $Fe^{3+}$ 、 $Al^{3+}$  及  $SiO_3^{2-}$  等干扰测定,其他常见离子无影响。测量溶液的酸度为 pH 5~6,用总离子强度调节缓冲液消除干扰离子及酸度的影响。

#### 9.1.6.3 试剂和溶液

本方法所用试剂均为分析纯,水均为不含氟的去离子水。全部溶液贮于聚乙烯塑料瓶中。

(1) 3 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸钠溶液:称取 204 g 乙酸钠( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ , GB 693),溶于约 300 mL 水中,待溶液温度恢复到室温后,以 1 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸(GB 676)调节 pH 至 7.0,移入 500 mL 容量瓶,加水至刻度。

(2) 0.75 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠溶液:称取 110 g 柠檬酸钠( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ , HG 3-1298)溶于约 300 mL 水中,加高氯酸( $HClO_4$ , GB 623)14 mL,移入 500 mL 容量瓶,加水至刻度。

(3) 总离子强度调节缓冲液:3 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸钠溶液与 0.75 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠溶液等量混合,临用时配制。

(4) 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液:量取 10 mL 盐酸(GB 622),加水稀释至 120 mL。

(5) 氟标准溶液。

① 氟标准储备液:称取经 100℃干燥 4 h 冷却的氟化钠(GB1264)0.221 0 g,溶于水,移入 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,混匀,置冰箱内保存,此液相当于 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> 氟。

② 氟标准溶液:临用时准确吸取氟储备液 10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,混匀。此液相当于 100 μg·mL<sup>-1</sup> 氟。

③ 氟标准稀溶液:准确吸取氟标准溶液 10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,混匀。此液相当于 10 μg·mL<sup>-1</sup> 氟。

#### 9.1.6.4 仪器、设备

(1) 氟离子选择电极:测量范围  $10^{-1} \sim 5 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup>, CSB-F-1 型或与之相当的电极。

(2) 甘汞电极:232 型或与之相当的电极。

(3) 磁力搅拌器。



(4)离子计:测量范围  $0 \sim -1\,400\text{ mV}$ , PHS-2 型或与之相当的酸度计或电位差计。

(5)分析天平:感量  $0.000\,1\text{ g}$ 。

(6)纳氏比色管:50 mL。

#### 9.1.6.5 试样选取和制备

采集具有代表性的饲料样品,至少  $2\text{ kg}$ ,以四分法缩分至约  $250\text{ g}$ ,磨碎,过  $1\text{ mm}$  孔筛,混匀,装入密闭容器,防止试样变质,低温保存备用。

#### 9.1.6.6 测定步骤

(1)氟标准工作液的制备。吸取氟标准稀溶液  $0.0, 1.0, 2.5, 5.0$  和  $10.0\text{ mL}$  (相当于  $0, 10, 25, 50$  和  $100\text{ }\mu\text{g}$  氟),再吸取氟标准溶液  $2.5, 5.0, 10.0\text{ mL}$  和氟标准储备液  $2.5\text{ mL}$  (相当于  $250, 500, 1\,000$  和  $2\,500\text{ }\mu\text{g}$  氟),分别置于  $50\text{ mL}$  容量瓶中,于各容量瓶中分别加入  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液  $10\text{ mL}$ ,总离子强度调节缓冲液  $25\text{ mL}$ ,加水至刻度,混匀。上述两组标准工作液的浓度分别为每毫升相当于  $0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0$  和  $50.0\text{ }\mu\text{g}$  氟。

(2)试液制备。称取  $0.5\sim 1\text{ g}$  试样,精确到  $0.001\text{ g}$ ,置  $50\text{ mL}$  纳氏比色管 1 中,加入  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液  $10\text{ mL}$ ,密闭提取  $1\text{ h}$  (不时轻轻摇动比色管),应尽量避免试样粘于管壁上。提取后加总离子强度调节缓冲液  $25\text{ mL}$ ,加水至刻度混匀,以滤纸过滤,滤液供测定使用。

(3)测定。将氟电极和甘汞电极与测定仪器的负端和正端连接,将电极插入盛有水的  $50\text{ mL}$  聚乙烯塑料烧杯中,并预热仪器,在磁力搅拌器上以恒速搅拌,读取平衡电位值,更换  $2\sim 3$  次水,待电位值平衡后,即可进行标准工作液和样液的电位测定。

按浓度由低到高的顺序依次测定氟标准工作液的平衡电位。以电动势作纵坐标,氟离子浓度作横坐标,在半对数坐标纸上绘制标准曲线。同法测定试液的平衡电位,从标准曲线上读取试液的含氟量。

#### 9.1.6.7 计算和结果表示

(1)试样中氟的质量分数按公式 9-6 计算。

$$w(\text{F}) = \frac{\rho \times V}{m} \quad 9-6$$

式中: $\rho$  为试液中氟的浓度,  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ ;  $V$  为试液总体积,  $\text{mL}$ 。

(2)结果表示。每个试样取 2 个平行样进行测定,以其算术平均值作为测定结果,结果表示到  $0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

(3)重复性。同一分析者对同一试样同时或快速连续地进行2次测定,所得结果之间的差值:

在F 含量 $\leq 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,不得超过平均值的10%;

在F 含量 $> 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,不得超过平均值的5%。

#### 9.1.6.8 注意事项

(1)此法较快速,也可避免灰化过程引入的误差。但植物性饲料样品中,尚有微量有机氟。如欲测定总氟量时,可将样品灰化后,使有机氟转化为无机氟,再进行测定。

(2)每次氟电极使用前,应在水中浸泡(活化)数小时,至电位为340 mV以上(不同生产厂家的氟电极,其要求不一致,请依据产品说明),然后泡在含低浓度氟(0.1或0.5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )的0.4  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠溶液中适应20 min,再洗至320 mV后进行测定。以后每次测定均应洗至320 mV,再进行下一次测定。经常使用的氟电极应泡在去离子水中,若长期不用,则应干放保存。

(3)电极长期使用后,会发生迟钝现象,可用金相纸擦或牙膏擦,以活化表面。

(4)根据Nernst公式可知,当浓度改变10倍,电位值只改变59.16 mV(25℃),也即理论斜率为59.16,据此可知氟电极的性能好坏。一般实际中,电极工作曲线斜率 $\geq 57 \text{ mV}$ 时,即可认为电极性能良好,否则需查明原因。

(5)为了保持电位计的稳定性,最好使用电子交流稳压电源,如在夏、冬季或在室温波动大时,应在恒温室或空调室进行测量。

## 9.2 天然有毒有害物质的分析测定

饲料中的天然有毒有害物质主要指饲料中天然存在的特征性的有害物质,其种类较多。本节主要介绍饲料中几种常见的、对动物危害性较大的天然有毒有害物质亚硝酸盐、氰化物、游离棉酚、异硫氰酸酯、噻唑烷硫酮、大豆制品中的尿酶活性的测定方法。

### 9.2.1 饲料中亚硝酸盐的测定(盐酸萘乙二胺法)

饲料中的亚硝酸盐是一种较强的氧化剂,其毒性作用主要是使红细胞内正常的氧合血红蛋白中的二价铁氧化为三价铁,形成高铁血红蛋白,丧失了携氧功能,导致机体组织缺氧,造成全身组织特别是脑组织的急性损害,严重的则引起窒息死亡。然而,在正常情况下,植物类饲料中的亚硝酸盐含量均很低,动物性饲

料鱼粉中的亚硝酸盐含量虽然较高,但也在国家饲料卫生标准规定的允许范围内。如冯学勤(1989)对我国市场上42个鱼粉样品的亚硝酸盐含量进行了样品检测,其平均含量为 $1.34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

通常青绿饲料如未成熟的绿燕麦、大麦、小麦、苏丹草、玉米秸秆和高粱秸秆等富含硝酸盐,用其制成的干草硝酸盐含量也高;树叶类和根茎类饲料也富含硝酸盐。萧学成(1980)测定了芹菜、白菜等15种蔬菜中的硝酸盐和亚硝酸盐含量,其中,硝酸盐含量平均为 $1979.43 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,以白菜( $3030.16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )和包菜( $3020.16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )的含量最高;而亚硝酸盐含量极低,平均为 $3.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。饲料中的硝酸盐本身对动物无毒害作用,只有转化为亚硝酸盐才有害;其转化方式有体内和体外转化两种。在正常的情况下,单胃动物从饲料中摄入的硝酸盐在体内很少转化成亚硝酸盐,反刍动物也不会在瘤胃内引起亚硝酸盐蓄积而中毒。因此,在实际生产中出现的动物亚硝酸盐中毒大多是由于富含硝酸盐的饲料贮存或处理方法不当导致亚硝酸盐含量剧增而引起的。所以,在饲料工业和动物养殖业,必须严格检测和控制饲料中的亚硝酸盐含量。

饲料中亚硝酸盐含量的测定常采用重氮偶合比色法。根据使用的试剂不同又分为 $\alpha$ -萘胺法和盐酸萘乙二胺法,其中盐酸萘乙二胺法为国标法(GB 13085-1991)。

#### 9.2.1.1 适用范围

本方法适用于饲料原料(鱼粉)、配合饲料(包括混合饲料)中亚硝酸盐的测定。

#### 9.2.1.2 测定原理

样品在微碱性条件下除去蛋白质,在酸性条件下试样中的亚硝酸盐与对氨基苯磺酸反应,生成重氮化合物,再与N-1-萘乙二胺盐酸盐偶合形成红色物质,进行比色测定。

#### 9.2.1.3 试剂和溶液

本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

(1)四硼酸钠饱和溶液。称取25g四硼酸钠( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , GB 632),溶于500 mL温水中,冷却后备用。

(2) $106 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚铁氰化钾溶液。称取53g亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , GBL273],溶于水,加水稀释至500 mL。

(3) $220 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸锌溶液。称取110g乙酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , HG 3-1098],溶于适量水和15 mL冰乙酸(GB 676)中,加水稀释至500 mL。

(4) $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对氨基苯磺酸溶液。称取0.5g对氨基苯磺酸( $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ ·

H<sub>2</sub>O, HG3-992), 溶于 10% 盐酸溶液中, 边加边搅, 再加 10% 盐酸溶液稀释至 100 mL, 贮于暗棕色试剂瓶中, 密闭保存, 一周内有效。

(5) 1 g · L<sup>-1</sup> N-1-萘乙二胺盐酸盐溶液。称取 0.1 g N-1-萘乙二胺盐酸盐 (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> · 2HCl), 用少量水研磨溶解, 加水稀释至 100 mL, 贮于暗棕色试剂瓶中密闭保存, 一周内有效。

(6) 5 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液。量取 445 mL 盐酸 (GB 622), 加水稀释至 1 000 mL。

(7) 亚硝酸钠标准储备液。称取经 (115 ± 5) °C 烘至恒重的亚硝酸钠 (GB 633) 0.300 0 g, 用水溶解, 移入 500 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 此溶液每毫升相当于 400 μg 亚硝酸根离子。

(8) 亚硝酸钠标准工作液。吸取 5.00 mL 亚硝酸钠标准储备液, 置于 200 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 此溶液每毫升相当于 10 μg 亚硝酸根离子。

#### 9.2.1.4 仪器、设备

(1) 分光光度计: 有 10 mm 比色池, 可在 538 nm 处测量吸光度。

(2) 分析天平: 感量 0.000 1 g。

(3) 恒温水浴锅。

(4) 实验室用样品粉碎机或研钵。

(5) 容量瓶: 50 (棕色), 100, 150, 500 mL。

(6) 烧杯: 100, 200, 500 mL。

(7) 量筒: 100, 200, 1 000 mL。

(8) 长颈漏斗: 直径 75~90 mm。

(9) 吸量管: 1, 2, 5 mL。

(10) 移液管: 5, 10, 15, 20 mL。

#### 9.2.1.5 试样选取和制备

采集具有代表性的饲料样品, 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。

#### 9.2.1.6 测定步骤

(1) 试液制备。称取约 5 g 试样, 精确到 0.001 g, 置于 200 mL 烧杯中, 加约 70 mL 温水 (60 ± 5) °C 和 5 mL 四硼酸钠饱和溶液, 在水浴上加热 15 min (85 ± 5) °C, 取出, 稍凉, 依次加入 2 mL 106 g · L<sup>-1</sup> 亚铁氰化钾溶液、2 mL 220 g · L<sup>-1</sup> 乙酸锌溶液, 每一步须充分搅拌, 将烧杯内溶液全部转移至 150 mL 容量瓶中, 用水洗涤烧杯数次, 并入容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 静置澄清, 用滤纸过滤, 滤液为试液备用。

(2)标准曲线绘制。吸取 0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 mL 亚硝酸钠标准工作液, 分别置于 50 mL 棕色容量瓶中, 加水约 30 mL, 依次加入 2 mL  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对氨基苯磺酸溶液、2 mL  $5.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液, 混匀, 在闭光处放置 3~5 min, 加入 2 mL  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  N-1-萘乙二胺盐酸盐溶液, 加水稀释至刻度, 混匀, 在闭光处放置 15 min, 以容量瓶液 0 mL 亚硝酸钠标准工作液为参比, 用 10 mm 比色池, 在波长 538 nm 处, 用分光光度计测其他各溶液的吸光度, 以吸光度为纵坐标, 各溶液中所含亚硝酸根离子质量为横坐标, 绘制标准曲线或计算回归方程。

(3)试样测定。准确吸取试液约 30 mL, 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 从“依次加入 2 mL  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对氨基苯磺酸溶液、2 mL  $5.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液”起, 按(2)的方法显色并测量试液的吸光度。

#### 9.2.1.7 计算和结果表示

(1)试样中亚硝酸钠质量分数按公式 9-7 计算。

$$w(\text{亚硝酸钠}) = m_1 \times \frac{V}{V_1 \times m} \times 1.5 \quad 9-7$$

式中:  $V$  为试样溶液总体积, mL;  $V_1$  为试样测定时吸取试液的体积, mL;  $m_1$  为测定用试液中所含亚硝酸根离子质量,  $\mu\text{g}$  (由标准曲线读得或由回归方程求出);  $m$  为试样质量, g; 1.5 为亚硝酸钠质量和亚硝酸根离子质量的比值。

(2)结果表示。每个试样取 2 个平行样进行测定, 以其算术平均值为分析结果。结果表示到  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

(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:

在亚硝酸盐含量  $\leq 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 不得超过平均值的 50%;

在亚硝酸盐含量  $> 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 不得超过平均值的 20%。

#### 9.2.2 饲料中游离棉酚的测定(苯胺比色法和间苯三酚法)

棉子饼粕是畜牧业生产中重要的蛋白质饲料, 但由于其含有游离棉酚而限制了这一资源的充分利用。游离棉酚具有活性羟基和活性醛基, 对动物毒性较强, 而且在体内比较稳定, 有明显的蓄积作用。对单胃动物, 游离棉酚在体内大量蓄积, 损害肝、心、骨骼肌和神经细胞; 对成年反刍动物, 由于瘤胃特殊的消化环境, 游离棉酚可转化为结合棉酚, 因而有较强的耐受性。动物在短时间内因大量采食棉子饼粕引起的急性中毒极为罕见, 生产上发生的多是由于长期采食棉子

饼粕,致使游离棉酚在体内蓄积而产生的慢性中毒。

棉子饼粕中游离棉酚的含量与棉子的棉酚含量和棉子的制油工艺有关。中国农业科学院畜牧所(1984)报道了不同工艺制得的棉子饼粕中游离棉酚的含量,有许多超出了国家饲料卫生标准。如螺旋压榨法为 0.030%~0.162%,土榨法为 0.014%~0.523%,直接浸提法为 0.065%,预压浸出法为 0.011%~0.151%。因此,必须严格检测棉子饼粕中的游离棉酚含量,根据检测结果合理控制棉子饼粕的用量,以保证配合饲料中的游离棉酚含量在国家饲料卫生标准规定的范围内。

目前,测定棉酚的方法有比色法和高效液相色谱法,比色法又包括苯胺法、间苯三酚法、三氯化锑法和紫外分光光度法等。间苯三酚法快速、简便、灵敏度高,但精密度稍差,是目前常用的快速分析方法。苯胺法准确度高,精密度好,是目前常用的测定方法,也是国家标准方法(GB 13086-1991)。高效液相色谱法准确度高,干扰少,但设备昂贵。

#### 9.2.2.1 苯胺比色法(方法一)

(1)适用范围。本方法适用于棉子粉、棉子饼(粕)和含有这些物质的配合饲料(包括混合饲料)中游离棉酚的测定。

(2)测定原理。在 3-氨基-1 丙醇存在下,用异丙醇与正己烷的混合溶剂提取游离棉酚,用苯胺使棉酚转化为苯胺棉酚,在最大吸收波长 440 nm 处进行比色测定。

(3)试剂和溶液。除特殊规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

①异丙醇[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH, HG 3-1167]。

②正己烷。

③冰乙酸(GB 676)。

④苯胺(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>, GB 691):如果测定的空白试验吸收值超过 0.022 时,在苯胺中加入锌粉进行蒸馏,弃去开始和最后的 10%蒸馏部分,放入棕色的玻璃瓶内贮存在(0~4 ℃)冰箱中,该试剂可稳定几个月。

⑤3-氨基-1 丙醇(H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)。

⑥异丙醇-正己烷混合溶剂:6:4(V:V)。

⑦溶剂 A:量取约 500 mL 异丙醇、正己烷混合溶剂、2 mL 3-氨基-1 丙醇、8 mL 冰乙酸和 50 mL 水于 1 000 mL 的容量瓶中,再用异丙醇-正己烷混合试剂定容至刻度。

(4) 仪器、设备。

①分光光度计:有 10 mm 比色池,可在 440 nm 处测量吸光度。

②振荡器:振荡频率 120~130 次·min<sup>-1</sup>(往复)。

③恒温水浴。

④具塞三角瓶:100,250 mL。

⑤容量瓶:25 mL(棕色)。

⑥吸量管:1,3,10 mL。

⑦移液管:10,50 mL。

⑧漏斗:直径 50 mm。

⑨表玻璃:直径 60 mm。

(5) 试样选取和制备。采集具有代表性的棉子饼粕样品至少 2 kg,四分法缩分至约 250 g,磨碎,过 2.8 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。

①称取 1~2 g 试样(精确到 0.001 g),置于 250 mL 具塞三角瓶中,加入 20 粒玻璃珠,用移液管准确加入 50 mL 溶剂 A,塞紧瓶塞,放入振荡器内振荡 1 h(每分钟 120 次左右)。用干燥的定量滤纸过滤,过滤时在漏斗上加盖一玻璃以减少溶剂挥发,弃去最初几滴滤液,收集滤液于 100 mL 三角瓶中。

②用吸量管吸取等量 2 份滤液 5~10 mL(每份含 50~100 μg 的棉酚)分别至两个 25 mL 棕色容量瓶 a 和 b 中,如果需要,用溶剂 A 补充至 10 mL。

③用异丙醇-正己烷混合溶剂稀释 a 至刻度,摇匀,该溶液用做试样测定液的参比溶液。

④用移液管吸取 2 份 10 mL 的溶剂 A 分别至两个 25 mL 棕色容量瓶 a<sub>0</sub> 和 b<sub>0</sub> 中。

⑤用异丙醇-正己烷混合溶剂补充容量瓶 a<sub>0</sub> 至刻度,摇匀,该溶液用做空白测定液的参比溶液。

⑥加 2.0 mL 苯胺于容量瓶 b 和 b<sub>0</sub> 中,在沸水浴上加热 30 min 显色。

⑦冷却至室温,用异丙醇-正己烷混合溶剂定容,摇匀并静置 1 h。

⑧用 10 mm 比色池在波长 440 nm 处,用分光光度计以 a<sub>0</sub> 为参比溶液测定空白测定液 b<sub>0</sub> 的吸光度,以 a 为参比溶液测定试样测定液 b 的吸光度,从试样测定液的吸光度值中减去空白测定液的吸光度值,得到校正吸光度 A。

(7) 计算和结果表示。

①试样中游离棉酚质量分数按公式 9-8 计算。

$$w(\text{游离棉酚}) = \frac{A \times 1\,250 \times 1\,000}{a \times m \times V} = \frac{A \times 1.25}{a \times m \times V} \times 10^6 \quad 9-8$$

式中:  $A$  为校正吸光度;  $m$  为试样质量, g;  $V$  为测定用滤液的体积, mL;  $a$  为游离棉酚的质量吸收系数, 其值为 62.5。

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  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

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:

在游离棉酚含量  $< 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 不得超过平均值的 15%;

在游离棉酚含量为  $500 \sim 750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 绝对相差不得超过  $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;

在游离棉酚含量  $> 750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, 不得超过平均值的 10%。

#### 9.2.2.2 间苯三酚法(快速法)(方法二)

(1)测定原理。饲料中棉酚经 70% 丙酮水溶液提取后, 在酸性及乙醇介质中与间苯三酚显色, 置分光光度计上于 555 nm 处测定其吸光度, 参照标准曲线, 计算样品棉酚的含量。棉酚含量在  $0 \sim 140 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内遵循比尔定律。

(2)仪器设备。

①721 型分光光度计。

②容量瓶: 1 000 mL、50 mL。

③三角瓶: 150 mL。

④样品粉碎机。

⑤分析天平: 0.000 1 g。

(3)试剂及配制。

①纯棉酚; ②间苯三酚; ③95% 乙醇; ④丙酮; ⑤浓盐酸; 混合试剂: 用浓盐酸与  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的间苯三酚乙醇溶液以 5:1 的比例(V:V)混合, 存于冰箱中备用。

(4)测定步骤。

①标准曲线的绘制: 准确称取 10 mg 纯棉酚, 用 70% 的丙酮水溶液定容至 1 000 mL, 按表 9.1 顺序和数量配制标准系列。

加完全部试剂后摇匀, 在室温下放置 25 min, 用乙醇稀释至 10 mL, 于 550 nm 波长处, 用 1 cm 比色皿, 以试剂为空白测定吸光度。以吸光度为纵坐标, 纯棉酚的微克数为横坐标作图, 得标准曲线。

②试样分析: 将混合饲料, 自然干燥后研碎, 过 20 目筛, 精确称取混合饲料



3~5 g 至一只空三角瓶中,加 70%的丙酮水溶液约 35 mL,置电磁搅拌器上,搅拌提取 1 h,将提取液过滤到 50 mL 容量瓶中,用少量 70%丙酮水溶液洗涤滤渣数次,定容至 50 mL。

表 9.1 标准系列的制备

	比色管编号					
	0	1	2	3	4	5
棉酚标准液/mL	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00
70%丙酮水溶液/mL	1.00	0.80	0.60	0.40	0.20	0.00
混合试剂/mL	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00

吸取滤液 1.00 mL,放入 10 mL 的比色管中,加 2.00 mL 混合试剂,摇匀,放置 25 min,用乙醇定容至 10 mL,于 550 nm 波长处测定其吸光度。参照标准曲线相应吸光度的棉酚微克数,以计算试样的棉酚含量。

### 9.2.3 饲料中异硫氰酸酯的测定(气相色谱法和银盐法)

菜子饼粕是动物生产中的重要蛋白质饲料,但由于含有硫葡萄糖甙及其降解产物等抗营养因子,因而限制了其充分利用。硫葡萄糖甙本身无毒性,但在饲料本身所含的硫葡萄糖苷酶(芥子酶)或胃肠道细菌酶的催化作用下,产生异硫氰酸酯(ITC)、噻唑烷硫酮(OZT)、硫氰酸酯(SCN)和腈(RCN)等 4 种主要的有毒化合物;根据其毒性大小、含量及其特异性,目前我国及许多国家都以异硫氰酸酯和噻唑烷硫酮作为衡量菜子饼粕含毒量的重要指标。菜子饼粕中异硫氰酸酯的含量随油菜品种、产地及制油工艺不同而异。双高油菜品种(高芥酸、高硫葡萄糖甙)的菜子饼粕中异硫氰酸酯含量高于双低品种。湿热压榨法、干热压榨法和冷热压榨法制得的双高品种菜子饼粕中异硫氰酸酯含量均较高,分别为 1.63%,1.63%和 1.94%。长期或大量饲喂异硫氰酸酯含量高的菜子饼粕,就会对动物的皮肤黏膜和消化道表面有破坏作用,并导致甲状腺肿大。因此,必须严格检测菜子饼粕和配合饲料中的异硫氰酸酯含量,控制其含量在国家饲料卫生质量标准规定的允许范围内,以避免其毒害作用的发生。

饲料中异硫氰酸酯的测定方法主要有气相色谱法和银盐法(GB 13087-1991)。异硫氰酸酯在高温下易挥发,因此采用气相色谱法测定,准确度和精密度均较好。

#### 9.2.3.1 气相色谱法(方法一)

(1)适用范围。本方法适用于配合饲料(包括混合饲料)和菜子油后的饼粕中异硫氰酸酯的测定。

(2)测定原理。配合饲料或菜子饼粕中存在的硫葡萄糖甙,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,本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

①二氯甲烷或氯仿(GB 682)。

②丙酮(GB 686)。

③pH7 缓冲液:市售或按下法配制。量取 35.3 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )溶液( $21.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),于 200 mL 容量瓶中,用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , GB1263)稀释至刻度,配制后检查 pH 值。

④无水硫酸钠(GB 9853)。

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 2 年)粉碎后,称取 100 g,用 300 mL 丙酮分 10 次脱脂,滤纸过滤,真空干燥脱脂的白芥子粉,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 丙酮沉淀芥子酶,弃去上清液,用丙酮洗沉淀 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。

⑥丁基异硫氰酸酯内标溶液:配制  $0.100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  丁基异硫氰酸酯 [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NCS}$ ]二氯甲烷或氯仿溶液,贮于  $4^\circ\text{C}$ ,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。

①气相色谱仪:具有氢焰检测器。

②氮气钢瓶:其中氮气纯度为 99.99%。

③微量注射器:5  $\mu\text{L}$ 。

④分析天平:感量 0.000 1 g。

⑤实验室用样品粉碎机。

⑥振荡器:往复,200 次  $\cdot \text{min}^{-1}$ 。

⑦具塞锥形瓶:25 mL。

⑧离心机。

⑨离心试管:10 mL。

(5)试样选取和制备。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。

①试样的酶解:称取约 2.2 g 试样于具塞锥形瓶中,精确到 0.001 g,加入 5 mL pH7 缓冲液,30 mg 酶制剂,10 mL 丁基异硫氰酸酯内标溶液,用振荡器振荡 2 h,将具塞锥形瓶中内容物转入离心试管中,离心机离心,用滴管吸取少量离心试管下层有机相溶液,通过铺有少量无水硫酸钠层和脱脂棉的漏斗过滤,得澄清滤液备用。

## ②色谱条件。

a. 色谱柱:玻璃,内径 3 mm,长 2 m。

b. 固定液:20% FFAP(或其他效果相同的固定液)。

c. 载体:Chromosorb W,HP,80~100 目(或其他效果相同的载体)。

d. 柱温:100 ℃。

e. 进样口及检测器温度:150 ℃。

f. 载气(氮气)流速:65 mL · min<sup>-1</sup>。

③测定:用微量注射器吸取 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)计算和结果表示。

①试样中异硫氰酸酯的质量分数按公式 9-9 计算。

$$w(\text{异硫氰酸酯}) = \frac{m_e}{115.19 \times S_e \times m} [4/3 \times 99.15 \times S_a + (4/4 \times 113.18 \times S_b) + (4/5 \times 127.21 \times S_c)] \times 1000 \quad 9-9$$

式中: $m$  为试样质量,g; $m_e$  为 10 mL 丁基异硫氰酸酯内标溶液中丁基异硫氰酸酯的质量,mg; $S_a$  为丁基异硫氰酸酯的峰面积; $S_b$  为丙烯基异硫氰酸酯的峰面积; $S_c$  为丁烯基异硫氰酸酯的峰面积; $S_d$  为戊烯基异硫氰酸酯的峰面积。

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<sup>-1</sup>。

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 ≤ 100 mg · kg<sup>-1</sup> 时,不超过平均值的 15%。

在异硫氰酸酯含量 > 100 mg · kg<sup>-1</sup> 时,不超过平均值的 10%。

## 9.2.3.2 银量法(方法二)

(1)适用范围。本方法适用于配合饲料(包括混合饲料)和菜子提取油后的饼

粕中异硫氰酸酯的测定。

(2)测定原理。菜子饼粕中存在的硫葡萄糖甙,在芥子酶作用下可生成相应的异硫氰酸酯。用水汽蒸出后再用硝酸银-氢氧化铵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。

(3)试剂和溶液。除特殊规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

①95%乙醇(GB 679)。

②去泡剂:正辛醇( $C_8H_{17}OH$ )。

③ $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸溶液:量取 195 mL 浓硝酸(GB 626),加水稀释至 500 mL。

④10%氢氧化铵溶液:取氨水(30%,GB 631)100 mL,加 200 mL 水混匀。

⑤硫酸铁铵溶液:称取 100 g 硫酸铁铵 $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ ,溶于 500 mL 水中。

⑥ $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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(GB 12595)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。

⑦ $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫氰酸铵标准储备液:称取 76 g 硫氰酸铵( $\text{NH}_4\text{CNS}$ , GB 660),溶于 1 000 mL 水中。标定方法见附录八。

⑧ $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫氰酸铵标准工作液:临用前将  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫氰酸铵标准储备液用水稀释 10 倍,摇匀。

⑨pH4 缓冲液:称取 42 g 柠檬酸( $C_6H_8O_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ ,GB 9855),溶于 1 L 水中,用浓氢氧化钠溶液调节 pH 至 4。

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。

(4)仪器、设备。

①分析天平:感量 0.000 1 g。

②恒温箱:温度范围 30~60℃,精度 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

③异硫氰酸酯蒸馏装置(图 9.2),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)。

④冰水浴。

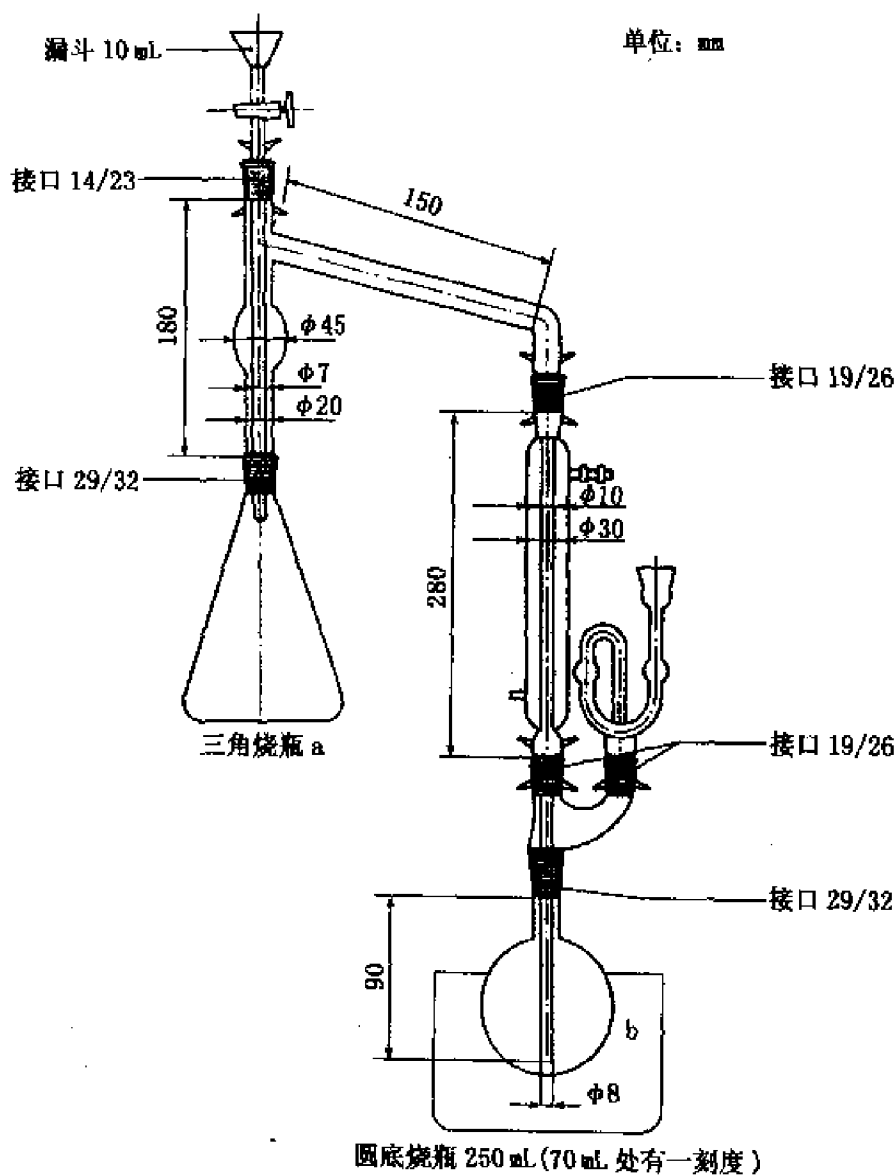


图 9.2 异硫氰酸酯蒸馏装置

- ⑤沸水浴。
- ⑥三角烧瓶:100,500(具塞)mL。
- ⑦容量瓶:100 mL。
- ⑧移液管:10,25 mL。
- ⑨吸量管:5,10 mL。
- ⑩半自动滴定管:5 mL,最小分度为 0.02 mL。
- ⑪滤纸。
- ⑫回流冷凝器,可与瓶 b 相配。

(5) 试样选取和制备。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 筛,混匀,装入密闭容器中,置 -15℃ 保存备用。

#### (6) 测定步骤。

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,  $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$  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。

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,同时加入 0.5 g 粗酶制剂。另取 1 个 500 mL 三角烧瓶加入 100 mL pH4 缓冲液和 0.5 g 粗酶制剂。将三角烧瓶塞好塞子,置 40℃ 恒温箱中保温 3 h, 中间不时轻摇几次。

③蒸馏接收瓶准备:准确量取 10.00 mL 硝酸银标准溶液至 250 mL 圆底烧瓶 b 中,并加入 2.5 mL 氢氧化铵溶液。将此瓶 b 与蒸馏装置相连并置于冰水浴中,冷凝器末端必须没于硝酸银-氢氧化铵液中。

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,然后与蒸馏装置相连,从上面漏斗中加入 10 mL 95% 乙醇,另加 3 mL 95% 乙醇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。

⑤试样测定:取下接收瓶 b,将安全管中的乙醇倒入此瓶中,将它与回流冷凝器连接,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 三角烧瓶中,用移液管取 25 mL 滤液于另一 100 mL 三角烧瓶中,加 1 mL  $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硝酸溶液和 0.5 mL 硫酸铁铵指示剂,用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫氰酸铵标准工作液滴定过量的硝酸银,直到稳定的淡红色出现为终点。

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。

#### (7) 计算和结果表示。

①试样中异硫氰酸酯质量分数按公式 9-10 计算。

$$w(\text{异硫氰酸酯}) = \frac{4 \times (V_1 - V_2) \times c \times 56.59}{m} \quad 9-10$$

式中:  $V_1$  为空白测定所耗硫氰酸铵标准工作液的体积, mL;  $V_2$  为试样测定所耗硫氰酸铵标准工作液的体积, mL;  $c$  为硫氰酸铵标准工作液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为干试样的绝干质量, g。

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  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

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 $\leq 0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,不得超过平均值的 20%;

在异硫氰酸酯含量为  $0.50 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时,不得超过平均值的 15%;

在异硫氰酸酯含量 $> 1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,不得超过平均值的 10%。

#### 9.2.4 饲料中噁唑烷硫酮的测定(紫外分光光度法)

噁唑烷硫酮(OZT)是菜子饼粕中的硫葡萄糖甙经酶解后形成的主要有毒物质之一,其毒害作用是阻碍甲状腺素的合成,导致甲状腺肿大,故又被称为甲状腺肿因子。菜子饼粕中的噁唑烷硫酮含量因油菜品种、产地和制油工艺不同而异。徐义俊等(1982)的分析结果表明,利用甘蓝型、白菜型及芥菜型等双高油菜制得的菜子饼粕中噁唑烷硫酮的含量分别为 7.42%、0.47%和 0.99%;而利用双低品种制得的菜子饼粕中噁唑烷硫酮的含量为 2.31%。用湿热压榨法、干热压榨法和冷压榨法制得的菜子饼粕中噁唑烷硫酮的含量分别为 1.62%、2.17%和 7.42%。各种动物对噁唑烷硫酮均有一定的敏感性,长期或大量饲喂均会引起毒害作用。因此,在饲料工业和动物养殖业,必须严格检测菜子饼粕和配合饲料中的噁唑烷硫酮含量,保证其安全使用。

噁唑烷硫酮不易挥发,并在 245 nm 处有最大吸收,因此一般采用紫外分光光度法测定(GB 13089-1991)。

##### 9.2.4.1 适用范围

本方法适用于菜子饼粕和配合饲料中噁唑烷硫酮的测定。

##### 9.2.4.2 测定原理

饲料中的硫葡萄糖甙被硫葡萄糖苷酶(芥子酶 EC 3.2.3.1)水解,再用乙醚萃取生成的噁唑烷硫酮,用紫外分光光度计测定。

##### 9.2.4.3 试剂和溶液

除特殊规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

(1)乙醚:光谱纯或分析纯。

(2)去泡剂:正辛醇( $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OH}$ )。

(3)pH7 缓冲液:量取 35.3 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , HG3-1108)溶液( $21.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),于 200 mL 容量瓶中,再用  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , GB1263)溶液调节 pH 值至 7.0。

(4)酶源:用白芥(*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)制备。将白芥子磨细,使 80%通过 0.28 mm 孔径筛子,用正己

烷或石油醚(沸程 40~60 ℃)提取其中脂肪,使残油不大于 2%,操作温度保持在 30 ℃以下,放通风橱于室温下使溶剂挥发。此酶源置具塞玻璃瓶中 4 ℃下保存,可用 6 周。

#### 9.2.4.4 仪器、设备

- (1)分析天平:感量 0.000 1 g。
- (2)样品筛:孔径 0.28 mm。
- (3)样品磨。
- (4)玻璃干燥器。
- (5)恒温干燥箱:(103±2)℃。
- (6)三角烧瓶:25,100,250 mL。
- (7)容量瓶:25,100 mL。
- (8)烧杯:50 mL。
- (9)分液漏斗:50 mL。
- (10)移液管:2 mL。
- (11)振荡器:振荡频率 100 次·min<sup>-1</sup>(往复)。
- (12)分光光度计:有 10 mm 石英比色池,可在 200~300 nm 处测量吸光度。

#### 9.2.4.5 试样选取和制备

采集具有代表性的样品至少 500 g,四分法缩分至 50 g,再磨细,使其 80% 能通过 0.28 mm 筛。

#### 9.2.4.6 测定步骤

(1)称取试样(菜子饼粕 1.1 g,配合饲料 5.5 g)于事先干燥称重(精确到 0.001 g)的烧杯中,放入恒温干燥箱,在(103±2)℃下烘烤至少 8 h,取出置于干燥器中冷却至室温,再称重,精确到 0.001 g。

(2)试样的酶解。将干燥称重的试样全部倒入 250 mL 的三角烧瓶中,加入 70 mL 沸缓冲液,并用少许冲洗烧杯;使冷却至 30 ℃,然后加入 0.5 g 酶源和几滴去泡剂,于室温下振荡 2 h。立即将内容物定量转移至 100 mL 容量瓶中,用水洗涤三角烧瓶,并稀释至刻度。过滤至 100 mL 三角烧瓶中,滤液备用。

(3)试样测定。取上述滤液(菜子饼粕 1.0 mL,配合饲料 2.0 mL),至 50 mL 分液漏斗中,每次用 10 mL 乙醚提取 2 次,每次小心从上面取出上层乙醚。合并乙醚层于 25 mL 容量瓶中,用乙醚定容至刻度。从 200~280 nm 测定其吸光度值,用最大吸光度值减去 280 nm 处的吸光度值得试样测定吸光度值  $A_E$ 。

(4)试样空白测定(菜子饼粕此项免去, $A_B$  为零)按(1)、(2)、(3)同样操作,只加试样不加酶源,测得值为试样空白吸光度值  $A_B$ 。



(5)酶源空白测定。按(1)、(2)、(3)同样操作,不加试样只加酶源,测得值为酶源空白吸光度值  $A_c$ 。

#### 9.2.4.7 计算和结果表示

(1)试样中噻唑烷硫酮的质量分数按公式 9-11 计算。

$$w(\text{噻唑烷硫酮}) = \frac{(A_E - A_B - A_C) \times C_p \times V_2 \times V}{m \times V_1} \quad 9-11$$

式中:  $A_E$  为试样测定吸光度值;  $A_B$  为试样空白吸光度值;  $A_C$  为酶源空白吸光度值;  $C_p$  为转换因素,吸光度为 1 时,每升溶液中噻唑烷硫酮的毫克数,其值为 8.2;  $V$  为试样的滤液总体积, mL;  $V_1$  为试样测定用的滤液体积, mL;  $V_2$  为试样测定液的乙醚相总体积, mL;  $m$  为绝干试样质量, g。

若试样测定液经过稀释,计算时应予考虑。

(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  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

(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:

在噻唑烷硫酮  $\leq 0.20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时,不得超过平均值的 20%;

在噻唑烷硫酮含量为  $0.20 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时,不得超过平均值的 15%;

在噻唑烷硫酮含量  $> 0.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  时,不得超过平均值的 10%。

#### 9.2.5 大豆制品中胰酶活性的测定(滴定法和酚红法)

大豆制品是营养价值很高的蛋白质饲料。饲料中常用的大豆制品主要有大豆饼、粕及膨化大豆粉。但大豆制品中含有对动物有害的胰蛋白酶抑制因子、血球凝集素、皂角苷、甲状腺肿诱发因子以及抗凝固因子等抗营养因子,从而导致其蛋白质适口性下降、生物学价值降低、引起动物腹泻、胰腺肿大,以至影响到动物的正常生长发育,其中最主要的抗营养因子是胰蛋白酶抑制因子。这些有害因子来源于生大豆子实,大都不耐热,在生产过程中,只要经适当的加热就可被灭活,使其在大豆制品中的残留量大大减少。因此残留于大豆制品中的抗营养因子含量与生产加工工艺密切相关。一般利用冷压工艺和萃取工艺生产的大豆饼粕中残留的抗营养因子含量较高,而利用热压工艺生产的则较少。但是,在生产加工过程中,过度的加热在灭活抗营养因子的同时,导致某些蛋白质变性,特别是赖氨酸、精氨酸及胱氨酸等严重变性,大大降低了大豆制品的消化率及生物学价值。为此,在大豆制品的生产加工过程中,保证适宜的加热程度,既可使大部分抗

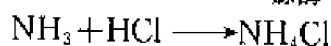
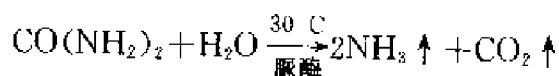
营养因子灭活,又不致使蛋白质变性是非常重要的。目前,可采用多种指标评价大豆制品的受热处理程度及其抗营养因子的灭活程度,如抗胰蛋白酶活性、水溶性氮指数和脲酶活性指标等。抗胰蛋白酶活性是直接反映大豆制品中抗营养因子水平及加热程度的可靠指标,但由于该法费时、所用试剂昂贵,因此在生产上不适用。大豆制品中的脲酶对单胃动物并非抗营养因子,但其活性与抗胰蛋白酶活性呈高度正相关,而且脲酶活性的测定方法与测定其他抗营养因子相比较有简便、快速和经济的优点,国内外常用脲酶活性作为检验大豆制品加热程度和抗营养因子水平的判断指标。因此,在饲料工业和动物养殖业,为了合理利用大豆制品,提高其饲用价值,严格检测其脲酶活性是非常重要的。

脲酶的测定有定性法和定量法。定性法简单、快速,可迅速地检测大豆制品的脲酶活性,从而判断大豆制品的加热程度和抗营养因子的水平,因此易于在生产中应用,但不宜用做仲裁法,其中,酚红法是目前常用的定性测定方法。定量法又包括比色法、滴定法和 pH 增值法。比色法简单、快速,干扰较小,也是常用的测定方法,滴定法原理严谨,对酶活性的表示方式直观、准确,操作容易,是国际标准法,也是我国规定的标准方法(GB8622-1988)。本书主要介绍酚红法和滴定-pH 法,并附 pH 增值法。

#### 9.2.5.1 滴定-pH 法(方法一)

(1)适用范围。本法适用于大豆制品及其副产品中脲酶活性的测定,可确认大豆制品的湿热处理程度和抗胰蛋白酶等抗营养因子的水平。

(2)测定原理。大豆制品中的脲酶在一定条件下(pH、温度),可以将尿素水解为氨,用过量的已知浓度的盐酸吸收后生成氯化铵,再用氢氧化钠标准液滴定剩余的盐酸,根据消耗的氢氧化钠标准溶液数量,即可计算出由脲酶水解放出的氨氮含量,从而计算得出脲酶活性。等当点时,pH 值为 4.7 左右。其反应如下:



(3)试剂和溶液。除特殊规定外,本方法所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相应纯度的水。

①尿素(GB 696)。

②磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , GB 1263)。

③磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , GB 1274)。

④尿素缓冲溶液(pH6.9~7.0):准确称取 3.40 g 经 110 °C 烘干的磷酸二

氢钾和 4.45 g 磷酸氢二钠,用蒸馏水溶解后定容至 1 000 mL;再将 30.0 g 尿素溶解在此缓冲液中,可保存一个月。

⑤  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液:用量筒量取 8.4 mL 浓盐酸(GB 622),注入 1 000 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度(边稀释边摇匀)。

⑥  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠(GB 629)标准溶液:按 GB 601 的规定配制(附录八)。

(4) 仪器、设备。

① 样品筛:孔径 200  $\mu\text{m}$ 。

② 酸度计:精度 0.02 mV,附有磁力搅拌器和滴定装置。

③ 恒温水浴:可控温  $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。

④ 具塞刻度试管:直径 18 mm,长 150 mm。

⑤ 精密计时器。

⑥ 粉碎机:粉碎时应不生强热(如球磨机)。

⑦ 分析天平:感量 0.000 1 g。

⑧ 移液管:10 mL。

(5) 试样选取和制备。用粉碎机将 10 g 试样粉碎,使之全部通过 60 目样品筛。对特殊试样(水分或挥发物含量较高而无法粉碎的产品)应先在实验室温度下进行预干燥,再进行粉碎,当计算结果时,干燥失重计算在内。

(6) 测定步骤。

① 样品中脲酶活性的测定:准确称取已粉碎的试样约 0.2 g(精确至 0.000 1 g),置于刻度试管中(如活性很高,只称 0.05 g)。加入 10 mL 尿素缓冲溶液,立即盖好试管并剧烈摇动,马上置于  $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  恒温水浴中,准确计时保持 30 min。取下后立即加入 10 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,并速冷至  $20^\circ\text{C}$ 。将试管中内容物无损地移入 50 mL 烧杯中,用 5 mL 蒸馏水冲洗试管 2 次,立即用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠标准液滴定至 pH 为 4.70。记录氢氧化钠标准溶液消耗量。

② 空白测定:另取试管作空白试验,加入 10 mL 尿素缓冲溶液、10 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的盐酸溶液。准确称取与上述试样量相当的试样(精确至 0.000 1 g),迅速加入此试管中。立即盖好试管并剧烈摇动。将试管置于  $(30 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  恒温水浴中,同样精确保持 30 min 取下后,冷却至  $20^\circ\text{C}$ ,将试管内容物无损失转移至 50 mL 烧杯中,用 5 mL 蒸馏水冲洗试管 2 次,立即用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠标准溶液滴定至 pH 为 4.70。记录氢氧化钠标准溶液消耗量。

(7) 计算和结果表示。

① 计算公式:测定结果以每分钟每克大豆制品在  $30^\circ\text{C}$  和 pH7 的条件下释

放出的氨态氮的毫克数表示。

$$UA = \frac{(V_0 - V) \times c \times 0.014 \times 1\,000}{m \times 30} \quad 9-12$$

式中:  $UA$  为试样的脲酶活性,  $\text{mgN} \cdot (\text{g} \cdot \text{min} \cdot 30\text{ }^\circ\text{C})^{-1}$ ;  $c$  为氢氧化钠标准溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_0$  为滴定空白反应液消耗的氢氧化钠溶液体积,  $\text{mL}$ ;  $V$  为滴定试样反应液消耗的氢氧化钠溶液体积,  $\text{mL}$ ;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ ;  $0.014$  为 1 摩尔质量氢氧化钠相当于  $0.014\text{ g}$  氮;  $30$  为反应时间,  $\text{min}$ 。如果试样在粉碎前经预干燥处理时, 则:

$$UA = \frac{(V_0 - V) \times c \times 0.014 \times 1\,000}{m \times 30} \times (1 - S) \quad 9-13$$

式中:  $S$  为预干燥时试样失重的百分率。

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。

③重复性: 同一分析者对同一试样同时或快速连续地进行 2 次测定, 所得结果之间的差值不超过平均值的 10%。

(8) 注意事项。

①若试样粗脂肪含量高于 10%, 则应先进行不加热的脱脂处理后, 再测定脲酶活性。

②若测得试样的脲酶活性大于  $1\text{ mg N} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ , 则样品称量应减少到  $0.05\text{ g}$ 。

#### 9.2.5.2 定性法(酚红法)(方法二)

(1) 适用范围。本方法适用于大豆制品中脲酶活性的快速测定, 定性地判断大豆制品的生熟程度, 但不能作为仲裁法。

(2) 测定原理。酚红指示剂在  $\text{pH}6.4 \sim 8.2$  时由黄变红, 大豆制品中所含的脲酶, 在室温下可将尿素水解产生氨。释放的氨可使酚红指示剂变红, 根据变红的时间长短来判断脲酶活性的大小。

(3) 溶液和试剂。除特殊规定外, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为蒸馏水或相应纯度的水。

①尿素(GB 696)。

②酚红指示剂(HG B-959):  $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇(20%)溶液。

(4) 仪器、设备。

①粉碎装置: 粉碎时应不产生强烈发热(如研钵、球磨机)。

②天平: 感量  $0.01\text{ g}$ 。

③具塞试管:直径 1.8 mm,长 150 mm。

(5)试样制备。用粉碎机(4.1)将试样粉碎。对特殊试样(水分或挥发物含量较高而无法粉碎的产品)应先在实验室温度下进行预干燥,再进行粉碎。

(6)测定步骤。称取 0.02 g 试样(准确至 0.01 g),转入试管中。加入 0.02 g 结晶尿素及 2 滴酚红指示剂,加 20~30 mL 蒸馏水,摇动 10 s。观察溶液颜色,并记下呈粉红色的时间。

(7)计算和结果表示。

1 min 呈粉红色为:活性很强;

1~5 min 呈粉红色:活性强;

5~15 min 呈粉红色:有点活性;

15~30 min 呈粉红色:没有活性。

一般认为,10 min 以上不显粉红色或红色的大豆制品,其脲酶活性即认为合格,生熟度适中。脲酶活性与呈色时间对照表如下:

脲酶活性与呈色时间对照表

时间/min	脲酶活性	时间/min	脲酶活性
0~1	0.9 以上	5~6	0.2~0.15
1~2	0.9~0.7	6~7	0.15~0.1
2~3	0.7~0.5	7~9	0.1~0.05
3~4	0.5~0.3	>15 无色	0
4~5	0.3~0.2		

## 附 9.1 pH 增值法

### 一、测定原理

大豆制品与中性尿素缓冲溶液混合,脲酶催化尿素水解产生的氨是碱性的,可使溶液 pH 值升高。试样与空白溶液的 pH 值之差值可间接表示氨的量。

### 二、测定步骤

准确称取(0.200±0.001) g 试样于试管中,加入 10 mL 尿素缓冲溶液,立即盖好试管并剧烈摇动,马上置于(30±0.5)℃恒温水浴中。

空白试验需准确称取(0.200±0.001) g 试样于试管中,加入 10 mL 盐酸缓

冲溶液,立即盖好试管并剧烈摇动,马上置于 30℃ 恒温水浴中。

以上每项实验须间隔 5 min,每 5 min 搅拌试管内容物一次。

准确保持 30 min 后,相间 5 min 将试管从水浴中取出,将上层液体移入 5 mL 烧杯,在自水浴中取出刚达 5 min 时,分别测定其 pH 值。

试样与空白试验的 pH 之差,即为尿酶活性(UA)的指数。

## 9.3 次生性有毒有害物质的分析测定

### 9.3.1 饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定(酶联免疫吸附法与薄层层析法)

黄曲霉毒素(aflatoxin,缩写 AF)主要是由黄曲霉和寄生曲霉产毒菌株的代谢产物,温特曲霉也能产生,但产量较少,主要污染玉米、花生、棉子及其饼粕。黄曲霉毒素是一类结构十分相似的化合物,而不是单一的一种物质,根据其在紫外线下产生荧光的颜色、在层析板上的  $R_f$  值及化学结构,分别被命名为 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、P<sub>1</sub>、Q<sub>1</sub>、毒醇等。在自然条件下,饲料污染的黄曲霉毒素主要有 4 种,即黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>,其中以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量最高,毒性最大,因此,我国以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 作为饲料黄曲霉毒素污染的卫生指标。我国大部分地区,特别是长江以南地区,夏季温度高,湿度大,饲料易发生霉变,饲料霉菌毒素污染现象十分普遍。黄曲霉毒素毒性强,并具有致癌作用,对动物健康和生产性能影响极大,还可在动物产品中蓄积,影响人体健康,因此,已成为饲料产品质量控制中的必检项目。目前,饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定方法主要有酶联免疫吸附法、薄层层析法、快速筛选法等,其中前两种是国家推荐的标准检测方法(GB/T17480-1998 和 GB 8381-1981)。酶联免疫吸附法最低检出量可达  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,但有一定比例的假阳性结果;薄层层析法假阳性结果少,但属于半定量方法,最低检出量为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;快速筛选法简便快速,适合饲料企业生产现场条件下使用,但不能准确定量,这些都是在检测工作中应注意的。

#### 9.3.1.1 酶联免疫吸附法(方法一)

(1)适用范围。本方法适用于各种饲料原料、配(混)合饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)的测定。

(2)测定原理。利用固相酶联免疫吸附原理,将 AFB<sub>1</sub> 特异性抗体包被于聚苯乙烯微量反应板的孔穴中,再加入样品提取液(未知抗原)及酶标 AFB<sub>1</sub> 抗原(已知抗原),使两者与抗体之间进行免疫竞争反应,然后加酶底物显色,颜色的深浅取决于抗体和酶标 AFB<sub>1</sub> 抗原结合的量,即样品中 AFB<sub>1</sub> 多,则被抗体结合

酶标 AFB<sub>1</sub> 抗原少,颜色浅,反之则深。用目测法或仪器法与 AFB<sub>1</sub> 标样比较来判断样品中 AFB<sub>1</sub> 的含量。

(3)试剂和材料。

①AFB<sub>1</sub> 酶联免疫测试盒组成

- a. 包被抗体的聚苯乙烯微量反应板:24 孔或 48 孔。
- b. A 试剂:稀释液,甲醇:蒸馏水为 7:93(V:V)。
- c. B 试剂:AFB<sub>1</sub> 标准物质(Sigma 公司,纯度 100%)溶液,1.00  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。
- d. C 试剂:酶标 AFB<sub>1</sub> 抗原(AFB<sub>1</sub>-辣根过氧化物酶交联物,AFB<sub>1</sub>-HRP), AFB<sub>1</sub>:HRP(摩尔比) $<2:1$ 。
- e. D 试剂:酶标 AFB<sub>1</sub> 抗原稀释液,含 0.1%牛血清白蛋白(BSA)的 pH7.5 磷酸盐缓冲液(PBS)。  
pH7.5 磷酸盐缓冲液的配制:称取 3.01 g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ),0.25 g 磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),8.76 g 氯化钠( $\text{NaCl}$ )加水溶解至 1 L。
- f. E 试剂:洗涤母液,含 0.05%吐温-20 的 PBS 溶液。
- g. F 试剂:底物液 a,四甲基联苯胺(TMB),用 pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液配成浓度为 0.2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。  
pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液配制:称取 15.09 g 乙酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ),1.56 g 柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )加水溶解至 1 L。
- h. G 试剂:底物液 b,1 mL pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液中加入 0.3%过氧化氢溶液 28  $\mu\text{L}$ 。
- i. H 试剂:终止液, $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液。
- j. I 试剂:AFB<sub>1</sub> 标准物质(Sigma 公司,纯度 100%)溶液,50.00  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

②测试盒中试剂的配制。

a. C 试剂中加入 1.5 mL D 试剂,溶解,混匀,配成试验用酶标 AFB<sub>1</sub> 抗原溶液,冰箱中保存。

b. E 试剂中加 300 mL 蒸馏水配成试验用洗涤液。

③甲醇水溶液:甲醇:水为 5:5(V:V)。

(4)仪器、设备。

①小型粉碎机。

②分样筛:内孔径 0.995 mm(20 目)。

③分析天平:感量 0.01 g。

④滤纸:快速定性滤纸,直径 9~10 cm。

⑤微量连续可调取液器及配套吸头:10~100  $\mu\text{L}$ 。

⑥培养箱:[(0~50) $\pm$ 1] $^{\circ}\text{C}$ ,可调。

⑦冰箱:4~8  $^{\circ}\text{C}$ 。

⑧ $\text{AFB}_1$ 测定仪或酶标测定仪,含有波长 450 nm 的滤光片。

(5)分析步骤。

①取样。

a. 根据规定检取有代表性的样品。

样品中污染黄曲霉毒素高的毒粒可以左右结果测定。而且有毒粒的比例小,同时分布不均匀。为避免取样带来的误差必须大量取样,并将该大量粉碎样品混合均匀,才有可能得到确能代表一批样品的相对可靠的结果,因此采样必须注意。

b. 对局部发霉变质的样品要检验时,应单独取样检验。

c. 每份分析测定用的样品应用大样经粗碎与连续多次四分法缩减至 0.5~1 kg,全部粉碎。样品全部通过 20 目筛,混匀,取样时应搅拌均匀。必要时,每批样品可采取 3 份大样作样品制备及分析测定用。以观察所采样品是否具有一定的代表性。

如果样品脂肪含量超过 10%,粉碎前应用乙醚脱脂,再制成分析用试样,但分析结果以未脱脂计算。

②试样提取:称取 5 g 试样,精确至 0.01 g,于 50 mL 磨口试管中,加入甲醇水溶液 25 mL,加塞振荡 10 min,过滤,弃去 1/4 初滤液,再收集适量试样滤液。

根据各种饲料的限量规定和 B 试剂浓度,按表 9.2 用 A 试剂将试样滤液稀释,制成待测试样稀释液。

表 9.2

每千克饲料中 $\text{AFB}_1$ 限量/ $\mu\text{g}$	试样滤液量/mL	A 试剂量/mL	稀释倍数
$\leq 10$	0.10	0.10	2
$\leq 20$	0.05	0.15	4
$\leq 30$	0.05	0.25	6
$\leq 40$	0.05	0.35	8
$\leq 50$	0.05	0.45	10

③限量测定。

a. 洗涤包被抗体的聚苯乙烯微量反应板:每次测定需要标准对照孔 3 个,其余按测定试样数,截取相应的板孔数。用 E 洗涤液洗板 2 次,洗液不得溢出,每



次间隔 1 min,并放在吸水纸上拍干。

b. 加试剂:按表 9.3 所列,依次加入试剂和待测试样稀释液。

表 9.3

次序	加入量 $\mu\text{L}$	孔 号											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	50	A	A	B	-----待测试样稀释液-----								
2	—					摇		匀					
3	50	D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
4	-					摇		匀					

注:表中 1 号孔为空白孔,2 号孔为阴性孔,3 号孔为限量孔,4~12 号孔为试样孔。

c. 反应:放在 37℃ 恒温培养箱中反应 30 min。

d. 洗涤:将反应板从培养箱中取出,用 E 洗涤液洗板 5 次,洗液不得溢出,每次间隔 2 min,在吸水纸上拍干。

e. 显色:每孔各加入底物 F 试剂和底物 G 试剂各 50  $\mu\text{L}$ ,摇匀,在 37℃ 恒温培养箱中反应 15 min。目测法判定。

f. 终止:每孔加终止液 H 试剂 50  $\mu\text{L}$ 。仪器法判定。

g. 结果判定

目测法:先比较 1~3 号孔颜色,若 1 号孔接近无色(空白),2 号孔最深,3 号孔次之(限量孔,即标准对照孔),说明测定无误。这时比较试样孔与 3 号孔颜色,若浅者,为超标;若相当或深者为合格。

仪器法:用 AFB<sub>1</sub> 测定仪或酶标测定仪,在 450 nm 处用 1 号孔调零点后测定标准孔及试样孔吸光度 A 值,若 A<sub>试样孔</sub> 小于 A<sub>3号孔</sub> 为超标,若 A<sub>试样孔</sub> 大于或等于 A<sub>3号孔</sub> 为合格。

试样若超标,则根据试样提取液的稀释倍数,推算 AFB<sub>1</sub> 的含量(表 9.4)。

表 9.4

		$\mu\text{g}$	
稀释倍数	每千克试样中 AFB <sub>1</sub> 含量	稀释倍数	每千克试样中 AFB <sub>1</sub> 含量
2	>10	8	>40
4	>20	10	>50
6	>30		

④定量测定:若试样超标,则用 AFB<sub>1</sub> 测定仪或酶标测定仪在 450 nm 波长处进行定量测定,通过绘制 AFB<sub>1</sub> 的标准曲线来确定试样中 AFB<sub>1</sub> 的含量。将 50.00  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 AFB<sub>1</sub> 标准溶液用 A 试剂稀释成 0.00,0.01,0.10,1.00,5.00,10.00,

20.00, 50.00  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的标准工作溶液, 分别作为 B 试剂系列, 按限量法测定步骤测得相应的吸光度值  $A$ ; 以 0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  AFB<sub>1</sub> 浓度的  $A_0$  值为分母, 其他标准浓度的  $A$  值为分子的比值, 再乘以 100 为纵坐标, 对应的 AFB<sub>1</sub> 标准浓度为横坐标, 在半对数坐标纸上绘制标准曲线。根据试样的  $A$  值/ $A_0$  值, 乘以 100 的值在标准曲线上查得对应的 AFB<sub>1</sub> 量, 并按式 9-14 计算出试样中 AFB<sub>1</sub> 的含量。

$$w(\text{AFB}_1) = \frac{\rho \times V \times n}{m} \quad 9-14$$

式中:  $\rho$  为从标准曲线上查得的试样提取液中 AFB<sub>1</sub> 含量,  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为试样提取液的体积, mL;  $n$  为试样稀释倍数;  $m$  为试样的质量, g。

(6) 精确度。重复测定结果相对偏差不得超过 10%。

(7) 注意事项。

①测定试剂盒在 4~8℃ 冰箱中保存, 不得放在 0℃ 以下的冷冻室内保存。

②测定试剂盒有效期为 6 个月。

③凡接触 AFB<sub>1</sub> 的容器, 需浸入 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  次氯酸钠 ( $\text{NaClO}_2$ ) 溶液, 0.5 d 后清洗备用。

④为保证分析人员安全, 操作时要带上医用乳胶手套。

#### 9.3.1.2 薄层层析法(方法二)

(1) 适用范围。本方法适用于各种单一饲料和配(混)合饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定。

(2) 原理。样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 经提取、柱层析、洗脱、浓缩、薄层分离后, 在 365 nm 波长紫外灯下产生蓝紫色荧光, 根据其在薄层板上显示荧光的最低检出量来测定含量。

(3) 试剂。

①三氯甲烷(GB 682)。

②正己烷(HG 3-1003)。

③甲醇(GB 683)。

④苯(GB 690)。

⑤乙腈(HG B 3329)。

⑥无水乙醚或乙醚经无水硫酸钠脱水(HG B 1002)。

⑦丙酮(GB 686)。

以上试剂于试验时先进行一次试剂空白试验, 如不干扰测定即可使用。否则需逐一检查进行重蒸馏。

- ⑧苯-乙腈混合液:量取 98 mL 苯,2 mL 乙腈混匀。
- ⑨三氯甲烷-甲醇混合液:取 97 mL 三氯甲烷,3 mL 甲醇混匀。
- ⑩硅胶:柱层析用 80~200 目。
- ⑪硅胶 G:薄层色谱用。
- ⑫三氟乙酸。
- ⑬无水硫酸钠(HG 3-123)。
- ⑭硅藻土。
- ⑮黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准溶液

a. 仪器校正:测定重铬酸钾溶液的摩尔吸光系数,以求出使用仪器的校正因素。精密称取 25 mg 经干燥的基准级重铬酸钾。用 0.009 mol·L<sup>-1</sup>硫酸溶液溶解后准确稀释至 200 mL(相当于 0.000 4 mol·L<sup>-1</sup>的溶液)。再吸取 25 mL 此稀释液于 50 mL 容量瓶中,加入 0.009 mol·L<sup>-1</sup>硫酸溶液稀释至刻度(相当于 0.000 2 mol·L<sup>-1</sup>溶液)。再吸取 25 mL 此稀释液于 50 mL 容量瓶中,加 0.009 mol·L<sup>-1</sup>硫酸溶液稀释至刻度(相当于 0.000 1 mol·L<sup>-1</sup>溶液)。用 1 cm 石英杯,在最大吸收峰的波长处(接近 350 nm)用 0.009 mol·L<sup>-1</sup>硫酸溶液作空白,测得以上三种不同浓度溶液的吸光度。并按公式 9-15 计算出以上三种浓度的摩尔吸光系数的平均值。

$$E_1 = \frac{A}{m} \quad 9-15$$

式中: $E_1$  为重铬酸钾溶液的摩尔吸光系数; $A$  为测得重铬酸钾溶液的吸光度; $m$  为重铬酸钾溶液的摩尔浓度。

再以此平均值与重铬酸钾的摩尔吸光系数值 3 160 比较,按公式 9-16 求出使用仪器的校正因素。

$$f = \frac{3\ 160}{M} \quad 9-16$$

式中: $f$  为使用仪器的校正因素; $M$  为测得重铬酸钾摩尔吸光系数平均值。

若  $f$  大于 0.95 而小于 1.05,则使用仪器的校正因素可略而不计。

b. 10 μg·mL<sup>-1</sup>黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准溶液的制备:精密称取 1~1.2 mg 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准品,先加入 2 mL 乙腈溶解后,再用苯稀释至 100 mL,置于 4℃ 冰箱保存。

用紫外分光光度计测此标准溶液的最大吸收峰的波长及该波长的吸光度值,并按下式计算该标准溶液的浓度。

$$\rho = \frac{A \times M \times 1\,000 \times f}{E_2} \quad 9-17$$

式中： $\rho$  为黄曲霉毒素  $B_1$  标准溶液的浓度， $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ； $A$  为测得的吸光度值； $M$  为黄曲霉毒素  $B_1$  的相对分子质量，312； $E_2$  为黄曲霉毒素  $B_1$  在苯-乙腈混合液中的摩尔吸光系数，19 800； $f$  为仪器的校正因素。

根据计算，用苯-乙腈混合液调到标准液浓度恰为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，并用分光光度计核对其浓度。

c. 纯度的测定：取  $5 \mu\text{L}$   $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $B_1$  标准溶液滴加于涂层厚度  $0.25 \text{ mm}$  的硅胶 G 薄层板上。用甲醇-氯仿（4：96）（ $V:V$ ）与丙酮-氯仿（8：92）（ $V:V$ ）展开剂展开，在紫外灯下观察荧光的产生，必须符合以下条件：

在展开后，只有单一的荧光点，无其他杂质荧光点。

原点上的没有任何残留的荧光物质。

⑩黄曲霉毒素  $B_1$  标准使用液：精密吸取  $1 \text{ mL}$   $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  标准溶液于  $10 \text{ mL}$  容量瓶中，加苯-乙腈混合液至刻度，混匀，此溶液每毫升相当于  $1 \mu\text{g}$  黄曲霉毒素  $B_1$ 。吸取  $1.0 \text{ mL}$  此稀释液置于  $5 \text{ mL}$  容量瓶中，加苯-乙腈混合液稀释至刻度，此溶液每毫升相当于  $0.2 \mu\text{g}$  黄曲霉毒素  $B_1$ 。另吸取  $1.0 \text{ mL}$  此溶液置于  $5 \text{ mL}$  容量瓶中，加苯-乙腈混合液稀释至刻度。此溶液每毫升相当于  $0.04 \mu\text{g}$  黄曲霉毒素  $B_1$ 。

⑪次氯酸钠溶液（消毒用）：取  $100 \text{ g}$  漂白粉，加入  $500 \text{ mL}$  水，搅拌均匀。另将  $80 \text{ g}$  工业用碳酸钠（ $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ）溶于  $500 \text{ mL}$  温水中，再将两液混合，搅拌，澄清后过滤。此滤液含次氯酸钠约为  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。若用漂白粉精制备则碳酸钠的量可以加倍，所得溶液约为  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。污染的玻璃仪器用  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  次氯酸钠溶液浸泡  $0.5 \text{ d}$  或用  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  次氯酸钠溶液浸泡片刻后即可达到去毒效果。

（4）仪器。

①小型粉碎机。

②分样筛一套。

③电动振荡器。

④层析管：内径  $22 \text{ mm}$ ，长  $300 \text{ mm}$ ，下带活塞，上有贮液器。

⑤玻璃板： $5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 。

⑥薄层板涂布器。

⑦展开槽：内长  $25 \text{ cm}$ ，宽  $6 \text{ cm}$ ，高  $4 \text{ cm}$ 。

⑧紫外光灯：波长  $365 \text{ nm}$ 。

⑨天平。

⑩具塞刻度试管 10.0, 2.0 mL。

⑪旋转蒸发器或蒸发皿。

⑫微量注射器或血色素吸管。

⑬分液漏斗: 250 mL。

(5)操作方法。

①取样和样品的制备: 同酶联吸附法。

②样品提取: 取 20 g 制备样品, 置于磨口锥型瓶中, 加硅藻土 10 g, 水 10 mL, 三氯甲烷 100 mL, 加塞, 在振荡器上振荡 30 min, 用滤纸过滤, 滤液至少 50 mL。

③柱层析纯化。

a. 柱的制备: 柱中加三氯甲烷约 2/3, 加无水硫酸钠 5 g, 使表面平整, 小量慢加柱层析硅胶 10 g, 小心排除气泡, 静止 15 min, 再慢慢加入 10 g 无水硫酸钠, 打开活塞, 让液体流下, 直至液体到达硫酸钠层上表面, 关闭活塞。

b. 纯化: 用移液管取 50 mL 滤液, 放入烧杯中, 加正己烷 100 mL, 混合均匀, 把混合液定量转移至层析柱中, 用正己烷洗涤烧杯倒入柱中。打开活塞, 使液体以  $8 \sim 12 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  流下, 直至到达硫酸钠层上表面, 再把 100 mL 乙醚倒入柱子, 使液体再流至硫酸钠层上表面, 弃去以上收集液体。整个过程保证柱不干。

用三氯甲烷-甲醇液 150 mL 洗脱柱子, 用旋转蒸发器烧瓶收集全部洗脱液。在 50 °C 以下减压蒸馏, 用苯-乙腈混合液定量转移残留物到刻度试管中, 经 50 °C 以下水浴气流挥发, 使液体体积到 2.0 mL 为止。洗脱液也可在蒸发皿中经 50 °C 以下水浴气流挥发干, 再用苯-乙腈转移至具塞刻度试管中。

如用小口径层析管进行层析, 则全部试剂按层析管内径平方之比缩小。

④单向展开法测定。

a. 薄层板的制备: 称取约 3 g 硅胶 G, 加相当于硅胶量 2~3 倍的水, 用力研磨 1~2 min 至成糊状后立即倒入涂布器内, 堆成 5 cm × 20 cm, 厚度约 0.25 mm 的薄层板 3 块。在空气中干燥约 15 min, 在 100 °C 活化 2 h, 取出放干, 于干燥器中保存。一般可保存 2~3 d, 若放置时间较长, 可再活化后使用。

b. 点样: 将薄层板边缘附着的吸附剂刮净, 在距薄层板下端 3 cm 的基线上用微量注射器或血色素吸管滴加样液。一块板可滴加四个点, 点距边缘和点间距约为 1 cm, 点直径约 3 mm。在同一块上滴加点的大小应一致, 滴加时可用吹风机用冷风边吹边加。滴加样式如下。

第一点:  $10 \mu\text{L } 0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准使用液。

第二点:16  $\mu\text{L}$  样液。

第三点:16  $\mu\text{L}$  样液+10  $\mu\text{L}$   $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液。

第四点:16  $\mu\text{L}$  样液+10  $\mu\text{L}$   $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液。

c. 展开与观察:在展开槽内加 10 mL 无水乙醚预展 12 cm,取出挥干,再于另一展开槽内加 10 mL 丙酮-三氯甲烷(8:92),展开 10~12 cm,取出,在紫外灯下观察结果,方法如下。

由于样液点上滴加黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液,可使黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准点与样液中的黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  荧光点重叠。如样液为阴性,薄层板上的第三点中黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  为  $0.0004 \mu\text{g}$ ,可用做检查在样液内黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  最低检出量是否正常出现;如为阳性,则起定位作用。薄层板上的第四点中黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  为  $0.002 \mu\text{g}$ ,主要起定位作用。

若第二点在与黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准点的相应位置上无蓝紫色荧光点,表示样品中黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  含量在  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  以下;如在相应位置上有蓝紫色荧光点,则需进行确证试验。

d. 确证试验:为了证实薄层板上样液荧光系由黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  产生的,加滴三氟乙酸,产生黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  的衍生物,展开后此衍生物的比移值在 0.1 左右。

方法:

于薄层板左边依次滴加两个点。

第一点:16  $\mu\text{L}$  样液。

第二点:10  $\mu\text{L}$   $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液。

于以上两点各加 1 滴三氟乙酸盖于样点上,反应 5 min 后,用吹风机吹热风 2 min,使热风吹到薄层板上的温度不高于  $40^\circ\text{C}$ 。再于薄层板上滴加以下两个点。

第三点:16  $\mu\text{L}$  样液。

第四点:10  $\mu\text{L}$   $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液。

再展开,同前。在紫外灯下观察样液是否产生与黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准点相同的衍生物。未加三氟乙酸的三、四两点,可依次作为样液与标准的衍生物空白对照。

e. 稀释定量:样液中的黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  荧光点的荧光强度与黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准点的最低检出量( $0.0004 \mu\text{g}$ )的荧光强度一致,则样品中黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  含量即为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。如样液中荧光强度比最低检出量强,则根据其强度估计减少滴加微升数或将样液稀释后再滴加不同的微升数,直至样液点的荧光强度与最低检出量的荧光强度一致为止。滴加式样如下。

第一点:10  $\mu\text{L}$  0.04  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液。

第二点:根据情况滴加 10  $\mu\text{L}$  样液。

第三点:根据情况滴加 15  $\mu\text{L}$  样液。

第四点:根据情况滴加 20  $\mu\text{L}$  样液。

f. 计算和结果的表示。

$$w(\text{AFB}_1) = 0.000\ 4 \times \frac{V_1 \times D \times 1\ 000}{V_2 \times m} \quad 9-18$$

式中:  $V_1$  为加入苯-乙腈混合液的体积,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为出现最低荧光时滴加样液的体积,  $\text{mL}$ ;  $D$  为样液的总稀释倍数;  $m$  为加苯-乙腈混合液溶解时相当试样的质量,  $\text{g}$ ; 0.000 4 为黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  的最低检出量,  $\mu\text{g}$ 。

⑤双向展开法测定:如用单向展开法展开后,薄层色谱由于杂质干扰掩盖了黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  的荧光强度,需采用双向展开法。薄层板先用无水乙醚作横向展开,将干扰的杂质展至样液点的一边而黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  不动,然后再用丙酮-三氯甲烷(8:92)作纵向展开,样品在黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  相应处的杂质底色大量减少,因而提高了方法灵敏度。如用双向展开法中滴加两点法,展开仍有杂质干扰时则可改用滴加一点法。

a. 滴加两点法。

点样:取薄层板 3 块,在距下端 3  $\text{cm}$  基线上滴加黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准溶液与样液。即在 3 块板的距左边缘 0.8~1  $\text{cm}$  处各滴加 10  $\mu\text{L}$  0.04  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液,在距左边缘 2.8~3  $\text{cm}$  处各滴加 16  $\mu\text{L}$  样液,然后在第二块板的样液点上滴加 10  $\mu\text{L}$  0.04  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液。在第三块板的样液点上滴加 10  $\mu\text{L}$  0.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准使用液。

展开:包括横向展开和纵向展开。

横向展开:在展开槽内的长边置一玻璃支架,加入 10  $\text{mL}$  无水乙醚。将上述点好的薄层板靠标准点的长边置于展开槽内展开,展至板端后,取出挥干,或根据情况需要时可再重复展开 1~2 次。

纵向展开:挥干的薄层板以丙酮:三氯甲烷(8:92)( $V:V$ )展开至 10~12  $\text{cm}$  为止。丙酮与三氯甲烷的比例根据不同条件自行调节。

观察及评定结果:在紫外灯下观察第一、二板。若第二板的第二点在黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  标准点的相应处出现最低检出量,而第一板在与第二板的相同位置上未出现荧光点,则样品中黄曲霉毒素  $\text{B}_1$  含量在 5  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  以下。

若第一板在与第二板的相同位置上出现荧光点,则将第二块板与第三块板

比较,看第三块板上第二点与第一板上第二点的相同位置上的荧光点是否与黄曲霉毒素  $B_1$  标准点重叠,如果重叠,再进行确证试验。在具体测定中,第一、二、三板可以同时做,也可按照顺序做。如果按顺序做,当在第一板出现阴性时,第三板可以省略。如第一板为阳性,则第二板可以省略,直接作第三板。

确证试验:另取两块薄层板。于第四、第五两块板距边缘  $0.8\sim 1\text{ cm}$  处各滴加  $10\text{ }\mu\text{L}$   $0.04\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $B_1$  标准使用液及一小滴三氟乙酸;距左边缘  $2.8\sim 3\text{ cm}$  处,第四板滴加  $16\text{ }\mu\text{L}$  样液及一小滴三氟乙酸。第五板滴加  $16\text{ }\mu\text{L}$  样液,  $10\text{ }\mu\text{L}$   $0.04\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $B_1$  标准使用液及一小滴三氟乙酸,产生衍生物的步骤同单向展开法,再用双向展开法展开后,观察样液是否产生与黄曲霉毒素  $B_1$  标准点重叠的衍生物。观察时,可将第一板作为样液的衍生物空白板。

如样液黄曲霉毒素  $B_1$  含量高时,则将样液稀释后,按④d 作确证试验。

稀释定量:如样液黄曲霉毒素  $B_1$  含量高时,按④e 稀释定量操作,如黄曲霉毒素  $B_1$  含量低稀释倍数小,在定量的纵向展开板上仍有杂质干扰,影响结果的判定,可将样液作双向展开测定,以确定含量。

计算:同④f。

b. 滴加一点法。

点样:取薄层板 3 块,在距下端  $3\text{ cm}$  基线上滴加黄曲霉毒素  $B_1$  标准使用液与样液。即在 3 块板距左边缘  $0.8\sim 1\text{ cm}$  处各滴加  $16\text{ }\mu\text{L}$  样液,在第二块板的点上加滴  $10\text{ }\mu\text{L}$   $0.04\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $B_1$  标准使用液,在第三块板的点上加滴  $10\text{ }\mu\text{L}$   $0.2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $B_1$  标准使用液。

展开:同⑤a 的横向展开与纵向展开。

观察及评定结果:在紫外灯下观察第一、二板,如第二板出现最低检出量的黄曲霉毒素  $B_1$  标准点,而第一板与其相同位置上未出现荧光点,样品中黄曲霉毒素  $B_1$  在  $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  以下。如第一块板在与第二块板黄曲霉毒素  $B_1$  标准点相同位置上出现荧光点,则将第一块板与第三块板比较,看第三块板上与第一块板相同位置上的荧光点是否与黄曲霉毒素  $B_1$  标准点重叠,如果重叠,再进行以下确证试验。

确证试验:于距左边缘  $0.8\sim 1\text{ cm}$  处,第四板滴加  $16\text{ }\mu\text{L}$  样液及一小滴三氟乙酸;第五板滴加  $16\text{ }\mu\text{L}$  样液,  $10\text{ }\mu\text{L}$   $0.04\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  黄曲霉毒素  $B_1$  标准使用液及一小滴三氟乙酸。产生衍生物及展开方式同⑤a。再将以上二块板在紫外线灯下观察以确定样液点是否产生与黄曲霉毒素  $B_1$  标准点重叠的衍生物,观察时可将第一板作为样液的衍生物的空白板。

经过以上确证试验定为阳性后,再进行稀释定量,如含黄曲霉毒素  $B_1$  低不



需稀释或稀释倍数小,杂质荧光仍有严重干扰,可根据样液中黄曲霉毒素  $B_1$  荧光的强弱,直接用双向展开法定量,或与单向展开法结合,方法同上。

计算:同④f。

(6)注意事项。

①黄曲霉毒素  $B_1$  毒性极大,并具有强烈致癌性,操作者应严密注意个人防护。干燥时,黄曲霉毒素  $B_1$  带有很强的静电荷,容易吸附在其他物质表面,很难洗脱掉,同时所用试剂均有一定毒性,因此,所有操作应在通风橱中进行,被玷污的玻璃仪器及蒸发皿应在  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的次氯酸钠溶液中浸泡 6 h 以上。

②展开剂中的丙酮与三氯甲烷的比例影响黄曲霉毒素  $B_1$  在层析板上的  $R_f$  值。丙酮比例高, $R_f$  值大;反之, $R_f$  值小,因此可根据情况适当调整丙酮与三氯甲烷的比例。同一次测定中,展开剂应一次配足。

③展开剂在层析缸空气中的饱和度影响展开效果,因此应先将展开剂加入层析缸,振摇,30 min 后再对层析板进行展开。

④点样斑点大小影响检出量及结果判定,点样斑点大小最好控制在 3 mm 以内。

⑤在空气潮湿的环境里,薄层板活性降低,因此点样操作最好在盛有干燥剂的盒内进行。

#### 9.3.1.3 黄曲霉毒素快速筛选法(紫外-荧光法)

(1)适用范围。本方法适用于玉米及猪鸡配(混)合饲料的快速检测。

(2)原理。被黄曲霉毒素污染的霉粒在 160 nm 紫外线下呈亮黄绿色荧光,根据荧光粒多少来概略评估饲料受黄曲霉毒素污染状况。

(3)仪器。

①小型植物粉碎机。

②紫外分析仪:波长 360 nm。

(4)测定方法。将被检样品粉碎过 20 目筛,用四分法取 20 g 平铺在纸上,于 360 nm 紫外线下观察,细心查看有无亮黄绿色荧光,并记录荧光粒个数。

(5)结果判定。

①样品中无荧光粒,饲料中黄曲霉毒素  $B_1$  含量在  $5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  以下。

②样品中有 1~4 个荧光粒,为可疑黄曲霉毒素  $B_1$  污染。

③样品中有 4 个以上荧光粒,可基本确定饲料中黄曲霉毒素  $B_1$  含量在  $5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  以上。

(6)注意事项。本方法为概略分析方法,不能准确定量,对仲裁检验及定量分析需用国家标准检测方法。

### 9.3.2 油脂过氧化物值和酸价的测定

油脂在不适宜条件下长期贮存时,会在空气、阳光、水及生物酶等因素作用下发生生物酶解、化学水解及不饱和脂肪酸的自动氧化,产生游离脂肪酸、过氧化物、氧化物及醛酮等物质,这一过程称为油脂酸败。严重酸败的油脂可产生强烈辛辣滋味和不愉快气味,影响适口性。严重酸败的油脂不仅自身不饱和脂肪酸缺乏,添加在饲料中时还会造成其他对氧化剂不稳定的营养物质如维生素 A、D、E 等的氧化失活,使饲料营养价值降低。油脂过氧化物值和酸价的变化可出现在油脂感官性状恶化之前,是油脂酸败的早期指标,而过氧化物值的改变更是早于酸价变化。测定油脂过氧化物值及酸价可评价油脂变质程度及确定其是否适宜在饲料中添加使用。

#### 9.3.2.1 过氧化物值的测定

(1)适用范围。本方法适用于油脂及油脂含量高的饲料原料中过氧化物值的测定。

(2)原理。油脂氧化过程中产生过氧化物,与碘化钾作用生成游离碘,以硫代硫酸钠标准溶液滴定,根据消耗硫代硫酸钠标准溶液的量,计算油脂过氧化物值。

(3)试剂。

①碘化钾(GB 1272)。

②三氯甲烷(GB 682)。

③冰乙酸(GB 676)。

④硫代硫酸钠(GB 637)。

⑤饱和碘化钾溶液:称取 14 g 碘化钾,加 10 mL 水溶解,必要时微热使其溶解,冷却后贮于棕色瓶中。

⑥三氯甲烷-冰乙酸混合液:量取 40 mL 三氯甲烷,加 60 mL 冰乙酸,混匀。

⑦硫代硫酸钠标准滴定溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]。溶液标定参见附录八。

⑧淀粉指示剂( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):称取可溶性淀粉 0.5 g,加少许水,调成糊状,倒入 50 mL 沸水中调匀,煮沸。临用时现配。

(4)分析步骤。称取 2.00~3.00 g 混匀(必要时过滤)的样品,置于 250 mL 碘瓶中,加 30 mL 三氯甲烷-冰乙酸混合液,使样品完全溶解。加入 1.00 mL 饱和碘化钾溶液,紧密塞好瓶盖,并轻轻振摇 0.5 min,然后在暗处放置 3 min。取出加 100 mL 水,摇匀,立即用硫代硫酸钠标准滴定溶液( $0.002 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )滴定,至淡黄色时,加 1 mL 淀粉指示液,继续滴定至蓝色消失为终点,取相同量三

氯甲烷-冰乙酸溶液、碘化钾溶液、水,按同一方法,做试剂空白试验。

(5)计算。试样中过氧化物(POV)值按公式 9-19 计算。

$$POV = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 0.1269}{m} \quad 9-19$$

式中:  $V_2$  为试样消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积, mL;  $V_1$  为试剂空白消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液体积, mL;  $c$  为硫代硫酸钠标准滴定溶液的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为试样质量, g; 0.1269 为与 1.00 mL 硫代硫酸钠标准滴定溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的碘的质量, g。

结果的表述: 报告算术平均值的二位有效数。

(6)重复性。两平行样结果之差值不得大于平均值的 10%, 即相对相差  $\leq 10\%$ 。

(7)注意事项。

①过氧化物值(peroxide value, 缩写为 POV)可用每 100 g 油脂析出碘的质量(克)或 1 kg 油脂析出碘的 meq 数来表示。其换算关系如下:

$$POV(\text{meq} \cdot \text{kg}^{-1}) = POV \times 78.8 \quad 9-20$$

我国采用每 100 g 油脂析出碘的 g 数表示过氧化物值。

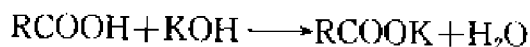
②固态油样可微热溶解, 并适当多加溶剂。

③硫代硫酸钠溶液不稳定, 每次滴定时应准确标定其浓度。

#### 9.3.2.2 酸价的测定

(1)适用范围。本法适用于商品植物油脂酸价的测定。

(2)原理。油脂中的游离脂肪酸与氢氧化钾发生中和反应, 从消耗氢氧化钾标准溶液的量计算出游离脂肪酸的量。化学反应式如下:



酸价是指中和 1 g 油脂中的游离脂肪酸所需氢氧化钾的质量(mg)。

(3)仪器、设备。

①碱式滴定管: 25 mL。

②锥形瓶: 250 mL。

③分析天平。

(4)试剂。

①乙醚(HGB 1002)。

②95%乙醇(GB 679)。

③氢氧化钾(GB 2306)。

④乙醚-乙醇混合液:按乙醚:乙醇(2:1)(V:V)混合。用氢氧化钾溶液( $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )中和至对酚酞指示液呈中性。

⑤ $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾标准滴定溶液:取 $5.6\text{ g}$ 氢氧化钾溶于 $1\text{ L}$ 煮沸后冷却的蒸馏水中,此溶液浓度约为 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其标定方法同方法一。然后用此溶液稀释成 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钾标准滴定溶液。

⑥酚酞指示液: $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙醇溶液。

(5)分析步骤。准确称取 $3.00\sim 5.00\text{ g}$ 样品,置于锥形瓶中,加入 $50\text{ mL}$ 中性乙醚-乙醇混合液,振摇使油样溶解,必要时可置热水中,温热促其溶解。冷至室温,加入酚酞指示液 $2\sim 3$ 滴,以氢氧化钾标准滴定溶液( $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )滴定,至初现微红色,且 $30\text{ s}$ 内不退色为终点。

(6)计算。试样酸价(AV)按公式 9-21 计算。

$$AV = \frac{V \times c \times 56.11}{m} \quad 9-21$$

式中: $V$ 为试样消耗氢氧化钾标准滴定溶液的体积, $\text{mL}$ ;  $c$ 为氢氧化钾标准滴定溶液的实际浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $m$ 为试样质量, $\text{g}$ ;  $56.11$ 为与 $1.0\text{ mL}$ 氢氧化钾标准滴定溶液 [ $c(\text{KOH})=1.00\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ] 相当的氢氧化钾的毫克数。

结果表示:以两次平行测定结果的算术平均值表示,取两位有效数字。

(7)重复性。相对相差不大于 $10\%$ 。

## 9.4 饲料中微生物检验

### 9.4.1 概述

#### 9.4.1.1 饲料微生物检验的意义

饲料微生物学检验是饲料品质控制的一个重要方面。正常条件下,饲料中微生物数量有限,但当饲料因加工不当、贮藏不善或因意外事故受到微生物污染时,微生物数量会有大幅度提高,并可有致病性微生物出现。微生物污染饲料后会带来以下几个方面的危害。

(1)微生物繁殖过程中产生特殊的颜色和刺激性物质,使饲料具有不良的外观、滋味和气味,影响饲料的适口性。

(2)微生物繁殖过程中会消耗大量的营养物质,使饲料营养价值降低。

(3)微生物繁殖过程中会产生大量有毒代谢产物,如细菌可产生内毒素或外毒素,霉菌可产生霉菌毒素,因而造成动物细菌毒素或霉菌毒素中毒,并可通过食物链影响人体健康。

(4)造成动物细菌性感染或霉菌性感染。

(5)扰乱动物消化道正常菌群,破坏动物消化道微生态平衡,使动物出现消化功能紊乱。

因此,检测饲料微生物指标,控制饲料微生物数量,对保证饲料卫生安全具有重要意义。

#### 9.4.1.2 饲料微生物的种类及形态

饲料中常见的微生物主要包括霉菌和细菌。霉菌(mold)并不是生物分类学名称,而是指能在基质上长成绒毛状、棉絮状或蜘蛛网状真菌的俗称,是真菌的一部分。真菌是指有细胞壁、不含叶绿素、无根茎、叶,以寄生或腐生方式生存,仅少数类群为单细胞、其他都有分枝或不分枝的丝状体,能进行有性或无性繁殖的一类生物。真菌的形态有单细胞和多细胞两种类型,霉菌为多细胞类型。在分类学上,霉菌分属于真菌的藻状菌纲(Phycomycetes)、子囊菌纲(Ascomycetes)和半知菌类(Fungi Imperfecti)。污染饲料的霉菌主要是曲霉菌属、镰刀菌属和青霉菌属的霉菌,可产生近 200 种霉菌毒素,其中比较重要的有黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、杂色曲霉毒素、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮、二氢雪腐镰刀菌烯酮、岛青霉素、橘青霉素、黄绿青霉素等。值得注意的是,并非所有的霉菌都能产毒,或者说能产毒的霉菌只是霉菌中的一少部分,同时还应注意,即便是产毒霉菌,也是在其生长到一定阶段才会产毒,并不是在其整个生命期都能产毒。

细菌(bacterium)是一类具有细胞壁的单细胞微生物。它结构简单,无典型的细胞核,只有核质,无核膜和核仁,不进行有丝分裂,除核蛋白体外无其他细胞器,属原核生物界。细菌的外形有球形、杆形、螺形,分别称为球菌、杆菌、螺形菌(包括弧菌与螺菌)。细菌个体很小,需用显微镜放大数百倍才能看见,一般以  $\mu\text{m}$  作为测量大小的单位。不同种类的细菌大小各异,同一种细菌的大小也可因菌龄和环境因素影响而有所差异。大多数球菌直径约  $1\ \mu\text{m}$ ,杆菌长  $2\sim 3\ \mu\text{m}$ ,宽  $0.3\sim 0.5\ \mu\text{m}$ 。

自然界细菌多种多样,饲料中存在的细菌只是自然界细菌的一部分,其中包括致病性、相对致病性和非致病性细菌。它们是评价饲料卫生质量的重要指标之一。

#### 9.4.1.3 饲料微生物检验的一般方法

目前,饲料微生物学检测主要包括细菌总数检测、大肠杆菌群检测、沙门氏菌检测及霉菌总数检测。

饲料细菌总数是指 1 g(或 mL)饲料中细菌的个数,但不考虑细菌的种类。细菌总数的高低反映了饲料的清洁程度及对动物潜在的危险性。细菌总数越高,表明饲料卫生状况越差,动物受细菌危害的可能性越大。根据检测计数方法不同,饲料细菌数量有两种表示方法。一种是在严格规定的条件下,经处理的样品直接用平皿培养或经微孔滤器过滤再行培养,使适应培养条件下的活菌细胞必须而且只能生成一个肉眼可见的菌落,根据菌落数计算结果,称为菌落总数;另一种方法是将样品适当处理后,经涂片染色或放入托马氏细胞计数室,在显微镜下对菌体细胞直接计数,其中包括活菌,也包括还未消亡的死菌,称为细菌总数。我国采用前者,即采用营养琼脂培养——菌落计数法测定。因此,我们所说的饲料细菌总数实际为菌落总数,即饲料中的活菌数。

科学研究证明,大肠菌群都是直接或间接来自于人和温血动物的粪便,因此,如在饲料中检出大肠菌群,表明饲料曾受到过人或温血动物粪便的污染。由于大肠菌群与肠道致病菌来源相同,而且在一般条件下,大肠菌群对外界的抵抗力及在环境中的生存时间与主要肠道致病菌一致,所以,大肠菌群既可作为饲料是否受到人或温血动物粪便污染的标志,也可作为饲料是否受到肠道致病菌污染的指示菌。大肠菌群在环境中广泛存在,饲料中检出大肠菌群,仅说明饲料曾受到过人或温血动物粪便的污染,但并不表示一定有致病菌存在,这存在一个污染程度即菌量问题。大肠菌群污染程度越高,致病菌存在的可能性就越大,因此,我国食品卫生和饮水卫生都对大肠菌群菌量作了严格限制。目前,大肠菌群检测多采用发酵法,即根据大肠菌群的培养特性,运用统计学方法推算出样品中大肠菌群的最可能数(maximum probable number,简写 MPN)。

沙门氏菌是重要的肠道致病菌,在饲料中不得检出。饲料中沙门氏菌的检测是根据其生化特性并结合血清学鉴定方法进行的。

霉菌总数的检测采用适合霉菌生长而不适宜细菌生长的高渗培养基培养,菌落计数法测定,结果表示的是饲料中的活菌孢子数。霉菌毒素对动物具有强烈的毒害作用,直接检测饲料中的霉菌毒素具有重要意义,但由于霉菌毒素种类繁多,检测过程比较麻烦,有些霉菌毒素还没有理想的检测方法,甚至在某些霉变饲料中现在还根本不清楚都存在着哪些霉菌毒素,所以检测饲料霉菌污染程度即霉菌总数就显得非常必要。霉菌毒素是霉菌的有毒代谢产物,饲料霉菌总数越高,饲料受霉菌毒素污染的可能性就越大,同时,考虑到饲料霉变的其他危害,因此,在监测饲料质量及评价其饲用价值时,检测饲料霉菌总数就具有十分

重要的意义。

饲料微生物检测中,一个重要的原则是无菌观念。从采样、制样到分离培养、生化鉴定等过程都必须坚持无菌操作。

#### 9.4.2 饲料中细菌总数的检验方法

##### 9.4.2.1 适用范围

本方法适用于饲料中细菌总数的测定。

##### 9.4.2.2 原理

将试样稀释至适当浓度,用特定的培养基,在 $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 下培养 $(72\pm 3)\text{h}$ ,计数平板中长出的菌落数,计算1g试样中的细菌数量。

##### 9.4.2.3 仪器、设备

- (1)天平:感量为0.1g。
- (2)振荡器:往复式。
- (3)干热灭菌箱: $[(50\sim 200)\pm 1]^{\circ}\text{C}$ 。
- (4)高压灭菌锅。
- (5)冰箱:普通冰箱。
- (6)恒温箱: $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。
- (7)电炉:可调式。
- (8)平皿:直径为9cm。
- (9)吸管:容量为1,10mL。
- (10)三角烧瓶:容量为250,500mL。
- (11)玻璃珠。
- (12)试管:18mm $\times$ 180mm。
- (13)水浴锅: $(46\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。
- (14)酒精灯。
- (15)试管架。
- (16)橡皮乳头。

##### 9.4.2.4 操作步骤

(1)采样。采样时必须特别注意样品的代表性和避免采样时的污染。首先准备好灭菌容器和采样工具,如灭菌牛皮纸袋或广口瓶、金属勺和刀,在卫生学调查基础上,采取有代表性的样品,样品采集后应尽快检验,否则应将样品放在低温干燥处。

根据饲料仓库、饲料垛的大小和类型,分层定点采样,一般可分三层五点或

分层随机采样,不同点的样品,充分混合后,取 500 g 左右送检,小量存贮的饲料可使用金属小勺采取上、中、下各部位的样品混合。

海运进口饲料采样:每一船舱采取表层、上层、中层及下层 4 个样品,每层从五点取样混合,如船舱盛饲料超过 10 000 t,则应加采 1 个样品。必要时采取有疑问的样品送检。

#### (2) 试样稀释及培养。

① 无菌称取试样 10.0 g,放入含有 90 mL 稀释液的灭菌三角烧瓶内(瓶内预先加有适当数量的玻璃珠)。经充分振摇,制成 1:10 的均匀稀释液。最好置振荡器中以  $8\,000\sim 10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度处理 2~3 min。

② 用 1 mL 灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 1 mL,沿管壁慢慢注入含有 9 mL 稀释液的试管内(注意吸管尖端不要触及管内稀释液),振摇试管,混合均匀,作成 1:100 的稀释液。

③ 另取一支 1 mL 灭菌吸管,按上述操作顺序,作 10 倍递增稀释,如此每递增稀释一次,即更换一支吸管。

④ 根据饲料卫生标准要求或对试样污染程度的估计,选择 2~3 个适宜稀释度,分别在作 10 倍递增稀释的同时,即以吸取该稀释度的吸管移 1 mL 稀释液于灭菌平皿内,每个稀释度作两个平皿。

⑤ 稀释液移入平皿后,应及时将凉至  $(46\pm 1)^{\circ}\text{C}$  的平板计数用培养基[可放置  $(46\pm 1)^{\circ}\text{C}$  水浴锅内保温]注入平皿约 15 mL,小心转动平皿使试样与培养基充分混匀。从稀释试样到倾注培养基之间,时间不能超过 15 min。

如估计到试样中所含微生物可能在琼脂平板表面生长时,待琼脂完全凝固后,可在培养基表面倾注凉至  $(46\pm 1)^{\circ}\text{C}$  的水琼脂培养基 4 mL。

⑥ 待琼脂凝固后,倒置平皿于  $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$  恒温箱内培养  $(72\pm 3)\text{ h}$  取出,计数平板内菌落数目,菌落数乘以稀释倍数,即得每克试样所含细菌总数。

(3) 菌落计数方法。作平板菌落计数时,可用肉眼观察,必要时借助于放大镜检查,以防遗漏。在计数出各平板菌落数后,求出同一稀释度两个平板菌落的平均数。

#### 9.4.2.5 菌落计数的报告

(1) 计数原则。选取菌落数在 30~300 之间的平板作为菌落计数标准。每一稀释度采用两个平板菌落的平均数,如两个平板其中一个有较大片状菌落生长时,则不宜采用,而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数,如片状菌落不到平板的一半,而另一半菌落分布又很均匀,即可计算半个平板后乘以 2 代表全平板菌落数。



(2)稀释度的选择。

①应选择平均菌落数在 30~300 之间的稀释度,乘以稀释倍数报告之。

②如有两个稀释度,其生长的菌落数均在 30~300 之间,视两者之比如何来决定,如其比值小于 2,应报告其平均数;如大于 2,则报告其中较小的数字。

③如所有稀释度的平均菌落数均大于 300,则应按稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

④如所有稀释度的平均菌落数均小于 30,则应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

⑤如所有稀释度均无菌落生长,则以小于(<)1 乘以最低稀释倍数报告之。

⑥如所有稀释度的平均菌落数均不在 30~300 之间,其中一部分大于 300 或小于 30 时,则以最接近 30 或 300 的平均菌落数乘以稀释倍数报告之。

(3)结果报告。菌落在 100 以内时,按其实有数报告;大于 100 时,采用两位有效数字,在两位有效数字后面的数值,以四舍五入方法计算。为了缩短数字后面的零数;也可用 10 的指数来表示。

## 附 9.2 稀释液和培养基制备

除特殊规定外,本标准所用化学试剂为分析纯;生物制剂为细菌培养用;水为蒸馏水或无离子水。要求在试验条件下,所用试剂应无抑制细菌生长的物质存在。

### 一、稀 释 液

(一)成分

氯化钠(GB 1266)8.5 g;蛋白胨 1.0 g;蒸馏水 1 000 mL。

(二)制法

将上述成分加热溶解,校正 pH 值使其在灭菌后保持  $7.0 \pm 2$ ,按 9 mL/支分装于试管,90 mL/瓶分装于三角烧瓶中,塞上棉塞包扎后  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  高压灭菌 20 min。

### 二、平板计数用培养基

(一)成分

蛋白胨 5.0 g;酵母浸膏 2.5 g;无水 D-葡萄糖 1.0 g;琼脂 9~18 g;蒸馏水 1 000 mL。

### (二)制法

将上述成分加热溶化,校正 pH 值使其在灭菌后保持  $7.0 \pm 2$ 。过滤、分装三角烧瓶中,包扎后  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  高压灭菌 20 min。

## 三、水琼脂培养基

### (一)成分

琼脂 9~18 g;蒸馏水 1 000 mL。

### (二)制法

加热使琼脂溶化,校正 pH 值使其在灭菌后保持  $7.0 \pm 2$ 。分装三角烧瓶中,包扎后  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  高压灭菌 20 min。

上述稀释液和培养基如不马上使用,应保存在  $0 \sim 5^\circ\text{C}$  下,时间不超过 1 个月。

## 9.4.3 饲料中霉菌的检验方法

### 9.4.3.1 适用范围

本方法适用于饲料中霉菌的检验。

### 9.4.3.2 原理

根据霉菌生理特性,选择适宜于霉菌生长而不适宜于细菌生长的培养基,采用平皿计数方法,测定霉菌数。

### 9.4.3.3 设备及材料

- (1)天平:感量 1 g,最大称量 1 000 g。
- (2)显微镜:1 500 倍。
- (3)温箱:  $[(25 \sim 28) \pm 1]^\circ\text{C}$ 。
- (4)冰箱:普通冰箱。
- (5)高压灭菌器:2.5 kg。
- (6)干燥箱:  $[(50 \sim 250) \pm 1]^\circ\text{C}$ 。
- (7)水浴锅:  $[(45 \sim 77) \pm 1]^\circ\text{C}$ 。
- (8)振荡器:往复式。
- (9)微型混合器:  $2\,900\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。
- (10)电炉。
- (11)酒精灯。
- (12)接种棒:镍铬丝。
- (13)温度计:  $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

- (14)载玻片。
- (15)盖玻片。
- (16)乳钵。
- (17)试管架。
- (18)玻璃三角瓶:250,500 mL。
- (19)试管:15 mm×150 mm。
- (20)平皿:直径9 cm。
- (21)吸管:1,10 mL。
- (22)玻珠:直径5 mm。
- (23)广口瓶:100,500 mL。
- (24)金属勺、刀等。
- (25)橡皮乳头。

#### 9.4.3.4 培养基和稀释液

- (1)高盐察氏培养基,见附录9.3。
- (2)稀释液,见附录9.3。
- (3)实验室常用消毒药品。

#### 9.4.3.5 操作步骤

(1)采样。采样时必须特别注意样品的代表性和避免采样时的污染。预先准备好灭菌容器和采样工具,如灭菌牛皮纸袋或广口瓶、金属勺和刀,在卫生学调查基础上,采取有代表性的样品,样品采集后应尽快检验,否则应将样品放在低温干燥处。

根据饲料仓库、饲料垛的大小和类型,分层定点采样,一般可分三层五点或分层随机采样,不同点的样品,充分混合后,取500 g左右送检,小量存贮的饲料可使用金属小勺采取上、中、下各部位的样品的混合。

海运进口饲料采样:每一船舱采取表层、上层、中层及下层4个样品,每层从五点取样混合,如船舱盛饲料超过10 000 t,则应加采一样品。必要时采取有疑问的样品送检。

(2)以无菌操作称取样品25 g(或25 mL)放入含有225 mL灭菌稀释液的玻璃三角瓶中,置振荡器上,振摇30 min,即为1:10的稀释液。

(3)用灭菌吸管吸取1:10稀释液1 mL,注入带玻璃珠的试管中,置微型混合器上混合3 min,或注入试管中,另用带橡皮乳头的1 mL灭菌吸管反复吹吸50次,使霉菌孢子分散开。

(4)取1 mL 1:10稀释液,注入含有9 mL灭菌稀释液试管中,另换一支吸

管吹吸 5 次,此液为 1:100 稀释液。

(5)按上述操作顺序作 10 倍递增稀释液,每稀释一次,换用一支 1 mL 灭菌吸管,根据对样品污染情况的估计,选择 3 个合适稀释度,分别在作 10 倍稀释的同时,吸取 1 mL 稀释液于灭菌平皿中,每个稀释度作两个平皿,然后将凉至 45℃左右的高盐察氏培养基注入平皿中,每皿 15 mL 左右,充分混合,待琼脂凝固后,倒置于 $[(25\sim 28)\pm 1]^\circ\text{C}$ 温箱中,培养 3 d 后开始观察,应培养观察 1 周。

(6)计算方法。通常选择菌落数在 30~100 个之间的平皿进行计数,同稀释度的 2 个平皿的菌落平均数乘以稀释倍数,即为每克(或每毫升)检样中所含霉菌数。

(7)结果报告。每克(或每毫升)饲料中含霉菌数以 $\text{个}\cdot\text{g}^{-1}$ ( $\text{个}\cdot\text{mL}^{-1}$ )表示。

### 附 9.3 培养基和稀释液制备

除特殊规定外,本标准所用化学试剂为分析纯或化学纯;生物制剂为细菌培养用;水为蒸馏水。

#### 一、高盐察氏培养基

##### (一)成分

硝酸钠(GB 636)	2 g
磷酸二氢钾(GB 1274)	1 g
硫酸镁( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,GB 761)	0.5 g
氯化钾(GB 646)	0.5 g
硫酸亚铁(GB 664)	0.01 g
氯化钠(GB 1266)	60 g
蔗糖(HG3-1001)	30 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

##### (二)制法

加热溶解,分装后,115℃高压灭菌 30 min。必要时,可酌量增加琼脂。

## 二、稀 释 液

### (一)成分

氯化钠(GB 1266)	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

### (二)制法

加热溶解,分装后,121℃高压灭菌 30 min。

## 思考题

1. 测定饲料中无机元素类有毒有害物质的意义是什么?
2. 简述测定饲料中总砷含量的基本原理和主要步骤。
3. 简述测定饲料中氟含量的基本原理和主要步骤。
4. 简述测定饲料中铬含量的基本原理和主要步骤。
5. 简述测定饲料中亚硝酸盐的意义、基本原理及主要步骤。
6. 简述测定饲料中氢氰酸的基本原理及主要步骤。
7. 测定饲料中异硫氰酸酯和噻唑烷硫酮的意义、基本原理是什么?
8. 简述测定饲料中游离棉酚的意义、原理及基本步骤。
9. 简述测定大豆制品中脲酶活性的意义。
10. 简述利用滴定法测定大豆制品中脲酶活性的基本原理及主要步骤。
11. 霉菌总数与霉菌毒素的检测结果在评价饲料卫生状况上各有何意义?
12. 细菌总数检测结果有何卫生学价值?
13. 在微生物学检验操作中如何实现无菌原则?
14. 一般情况下,油脂过氧化物值升高的主要原因是什么?分析过程中应注意哪些关键环节?

## 10 饲料中违禁药物和加药饲料中药物的检验

### 【内容提要】

本章主要介绍了饲料中违禁药物和其他药物及检测方法的概况和特点,并介绍了饲料中盐酸克仑特罗、己烯雌酚、金霉素、噻乙醇的检测方法。

### 10.1 概述

#### 10.1.1 饲料中违禁药物

为了确保动物和人类的安全和健康,在1999年5月我国颁布的《饲料和饲料添加剂管理条例》第十一条中明确规定,企业生产饲料、饲料添加剂,不得直接添加兽药和其他禁用品,允许添加的兽药,必须制成动物添加剂后,方可添加,生产药物饲料添加剂不得添加激素类药品。

目前,通常意义上所谓的违禁药物是指不允许往饲料、饲料添加剂中添加的激素类添加剂(性激素、生长激素和类激素物质)、 $\beta$ -兴奋剂(盐酸克仑特罗等)和某些药物添加剂如某些抗生素、人工合成抗菌药物和镇静剂等。目前,农业部、卫生部、国家药品监督管理局发布了《禁止在动物饲料和饮水中使用的药物的目录》(176号公告),共5类32项(表10.1)。

##### 10.1.1.1 $\beta$ -肾上腺素受体激动剂(简称 $\beta$ -兴奋剂)

$\beta$ -肾上腺素受体激动剂,简称 $\beta$ -兴奋剂,是20世纪80年代以来研究开发的一类作用于肾上腺能受体的类激素添加剂物质,属儿茶酚胺类化合物,在动物体内具有类似肾上腺素的生理作用。

大量的研究已完全表明,尽管 $\beta$ -兴奋剂添加于饲料中可改善牛、猪、禽等的屠宰率,胴体体质量、胴体瘦肉率和降低胴体脂肪含量,但使用这类添加剂后,猪屠体的肌糖原水平下降,屠后肌肉的pH值提高,产生DFD肉(深色、坚韧、干燥肉)。此外,其易在动物产品中残留,尤其是肝脏和肺脏等内脏器官,从而对人类的健康产生严重危害,可引起心跳加快,血压下降等现象。

表 10.1 禁止在动物饲料和饮水中使用的药物品种

类 别	种 类
肾上腺素受体激动剂	盐酸克仑特罗 (clenbuterol hydrochloride), 沙丁胺醇 (salbutamol), 硫酸沙丁胺醇 (salbutamol sulfate), 莱克多巴胺 (ractopamine), 盐酸多巴胺 (dopamine hydrochloride), 西马特罗 (cimaterol), 硫酸特布他林 (terbutaline sulfate)
性激素	己烯雌酚 (diethylstilbestrol), 雌二醇 (estradiol), 戊酸雌二醇 (estradiol valerate), 苯甲酸雌二醇 (estradiol benzoate), 氯烯雌醚 (chlorotrianisene), 炔诺醇 (ethinylestradiol), 炔诺醚 (quinestrol), 醋酸氯地孕酮 (chlormadinone acetate), 左炔诺孕酮 (levonorgestrel), 炔诺酮 (norethisterone), 绒毛膜促性腺激素 (绒促性素) (chorionic gonadotrophin), 促卵泡生长激素 (尿促性素主要含卵泡刺激 FSHT 和黄体生成素 LH) (menotropins)
蛋白同化激素	碘化酪蛋白 (iodinated casein), 苯丙酸诺龙及苯丙酸诺龙注射液 (nandrolone phenylpropionate)
镇静剂	(盐酸)氯丙嗪 (chlorpromazine hydrochloride), 盐酸异丙嗪 (promethazine hydrochloride), 安定 (地西洋) (diazepam), 安眠酮, 苯巴比妥 (phenobarbital), 苯巴比妥钠, 巴比妥 (barbital), 异戊巴比妥 (amobarbital), 异戊巴比妥钠 (amobarbital sodium), 利血平 (reserpine)
各种抗生素滤渣	抗生素滤渣。

来源:卫生部、农业部和国家药品监督管理局 176 号公告。

$\beta$ -兴奋剂的种类很多,有十几种。目前研究比较多的兴奋剂化合物有西马特罗 (息喘宁, cimaterol), 克仑特罗 (克喘素, clenbuterol), 莱克多巴胺 (ractopamine), 沙丁胺醇 (舒喘宁, salbutamol) 等。

#### 10.1.1.2 性激素

性激素是通过调节机体代谢,尤其是蛋白质和脂肪的合成与分解代谢而起到促进生长肥育,增加胴体蛋白质含量,降低脂肪含量,提高饲料转化效率。用于生长促进剂的性激素主要包括雌激素、孕激素和雄激素及其类似物。该类激素属甾醇类化合物,即使通过消化道,也不能被消化液所降解,因此可通过饲料投给,也可通过埋植方式投给。目前,国外多通过埋植方式用于肉牛和养羊生产。

此类激素及其类似物曾是应用最为广泛、效果显著的一类生长促进剂。20 世纪 60—70 年代,美国肥育牛 80%~90% 应用了此类制剂。直到今天,除了已

烯雌酚 (DES) 等人工合成类雌激素化合物于 1980 年华沙国际学术讨论会和同年的联合国粮农组织与世界卫生组织联席会议决定完全禁用外, 其他性激素类仍在美国等国家和地区使用。欧洲经济共同体已于 1988 年 1 月 1 日开始完全禁止在动物生产中使用甾醇类激素。我国禁用。

使用性激素及其类似物, 可导致其在动物产品中的残留, 进而通过食物链对人的健康产生危害, 如普遍反映怀疑儿童的早熟与食用了含性激素的鸡肉等动物产品有关。这将扰乱人的正常生长繁育周期。

#### 10.1.1.3 蛋白同化激素

目前我国禁用的该类药物主要有碘化酪蛋白和苯丙酸诺龙。动物甲状腺分泌的甲状腺素是维持动物正常生长发育的重要激素, 全面调控机体代谢。适当增加甲状腺素水平, 可提高动物基础代谢, 使动物保持较高的生产水平。碘化酪蛋白属合成甲状腺素前驱物, 在动物体内能起到类似甲状腺素的作用。我国禁用。

#### 10.1.1.4 镇静剂

镇静剂又称作运动抑制剂, 其作用使抑制动物的中枢神经, 使动物处于安静、睡眠或半睡眠状态。由于活动量减少, 能量的消耗降低至最小程度, 以达到催肥, 节约饲料的目的。

常用的镇静剂如利血平 (人用降压药)、盐酸氯丙嗪、水合氯醛、盐酸异丙嗪等均系目前人临床上普遍用镇静剂药物。该类物质在动物产品中的残留将影响人的健康, 并可导致临床用药效果下降。我国目前未批准镇静剂作为饲料添加剂使用。

#### 10.1.1.5 各种抗生素滤渣

该类物质是抗生素类产品生产过程中产生的工业三废, 因含有微量的抗生素成分, 在饲料和饲养过程中使用后对动物有一定的促生长作用, 但对养殖业的危害很大, 一是容易引起耐药性, 二是由于其未做安全试验存在各种安全隐患。

### 10.1.2 饲料中其他药物

目前, 用做饲料添加剂的其他药物主要包括抗生素和人工合成的抗菌药物。在多数国家和地区, 目前抗生素类仅仅某些品种被禁用, 如欧洲禁止使用泰乐菌素。有些个别国家地区完全禁用抗生素如瑞典。多数抗生素作为添加剂使用时, 限制了其使用对象和使用时间, 并对停药期有明确的严格规定。

人工合成的具有抑菌促生长作用的抗菌药物, 目前用做抑菌促生长使用的主要有磺胺类、呋喃类和喹啉类。这类药物尽管有抑菌促生长作用, 但多数有



副作用,特别是对肾脏毒性大,有的甚至有致癌作用。

磺胺类药物主要用于短期预防和治疗某些细菌性疾病和驱虫。仅少数几种如磺胺二甲基嘧啶、磺胺噻唑等毒性小的与其他抗生素如金霉素等合用。目前磺胺类抗菌剂长期低剂量用于饲料,一般不单独使用。呋喃类也由于毒性大,目前已不作为促生长剂使用。喹啉类由于抗菌谱广,同时对氮的滞留作用和蛋白质同化作用,故对改善饲料转化效率和促进生长有益效果,但有的因致癌作用,如卡巴氧等已被许多国家禁止使用。1997年我国农业部发布了《允许作饲料药物添加剂的兽药品种及使用规定》。

### 10.1.3 饲料中药物检测方法标准制定的现状及特点

我国有关加药饲料中药物的检测方法标准很不健全,目前正在制、修订。1999—2000年农业部下达的制标任务主要有饲料中盐酸克仑特罗、金霉素、喹乙醇、呋喃唑酮、己烯雌酚等的检测方法标准制订。2000年国家技术质量监督局下达了17项违禁药物的检测方法标准的制定任务。我国于2001年已公布饲料中盐酸克仑特罗的检测方法标准(NY438)。2002年,饲料中喹乙醇、金霉素、呋喃唑酮、己烯雌酚等检测标准已上报农业部进行审批。

关于饲料中碘化酪蛋白、盐酸氯丙嗪、盐酸异丙嗪、沙丁胺醇等的检测方法的检测方法正在制定,预计2002年底完成标准的研制工作。

关于 $\beta$ -兴奋剂的检测方法,目前尽管已制定了饲料中盐酸克仑特罗的检测方法标准,但关于其他兴奋剂,尽管它们都列为违禁添加物,由于目前缺乏有效的检测方法标准,很难对他们加以有效控制。另外,将来市场上使用的兴奋剂种类可能出现多样化。因此利用现代化分析设备,建立各种常用兴奋剂的单一检测方法及多种可能使用的兴奋剂同时进行检测的方法非常必要。

饲料中违禁药物的分析一般分三步进行:快速定性或半定量分析、准确定量分析和确认检验。首先用酶联免疫试剂盒对待检试样进行初选,对于阳性试样需要带回实验室,借助先进的大型分析仪器如高效液相色谱仪(HPLC)或气相色谱仪(GC)进行准确定量分析,借助气相色谱-质谱仪(GC-MS)和液相色谱-质谱仪(LC-MS)进行确认性检验。饲料中其他药物的检验一般借助于HPLC或GC即可。

本章主要以饲料中盐酸克仑特罗、己烯雌酚、金霉素、喹乙醇为代表,介绍饲料中药物的检测方法。其他药物的检测方法请参考新颁布的国家和行业标准或国际权威机构如AOAC或权威学术刊物公布的方法。

## 10.2 饲料中盐酸克仑特罗的检验

配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中盐酸克仑特罗的测定与确证可分别采用 HPLC 法和 GC-MS 法。HPLC 法的最低检测限为 0.5 ng, (取试样 5 g 时, 最低检测浓度为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。GC-MS 法最低检测限为 0.025 ng (取试样 5 g 时, 最低检测浓度为  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。其中 GC-MS 法为仲裁法。

### 10.2.1 高效液相色谱法(HPLC 法)

#### 10.2.1.1 方法原理

用加有甲醇的稀酸溶液将试样中的克仑特罗盐酸盐溶出, 溶液碱化, 经液液萃取和固相萃取柱净化后, 在 HPLC 仪上分离、测定。

#### 10.2.1.2 试剂和材料

以下所用的试剂和水, 除特别注明者外均为分析纯试剂, 水为符合 GB/T 6682 中规定的三级水。

(1) 甲醇: 色谱纯, 过  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜。

(2) 乙腈: 色谱纯, 过  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜。

(3) 提取液:  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  偏磷酸溶液 (14.29 g 偏磷酸溶解于水, 并稀释至 1 L): 甲醇 = 80 : 20 (V : V)。

(4) 氢氧化钠溶液,  $c(\text{NaOH})$  约  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 20 g 氢氧化钠溶于 250 mL 水中。

(5) 液液萃取用试剂。

① 乙醚。

② 无水硫酸钠。

(6) 氮气。

(7) 盐酸溶液  $c(\text{HCl})$  约  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 1.67 mL 盐酸用于定容至 1 L。

(8) 固相萃取 (SPE) 用试剂。

① 30 mg/lcc Oasis<sup>®</sup> HLB 固相萃取小柱 (Waters Corporation, 34 Maple Street Milford MA, USA) 或同等效果净化柱。

② SPE 淋洗液。

淋洗液-1: 含 2% 氨水的 5% 甲醇水溶液。

淋洗液-2: 含 2% 氨水的 30% 甲醇水溶液。

(9) HPLC 专用试剂。

① HPLC 流动相: 1 mL 1 : 1 磷酸 (优级纯) 溶液 (V : V) 用实验室二级水稀

释至 1 L,并按 100:12 的比例和乙腈混合(V:V),用前超声脱气 5 min。

②盐酸克仑特罗标准溶液。

a. 储备液,  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ : 10.00 mg 盐酸克仑特罗(含  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\cdot\text{HCl}$  不少于 98.5%)溶于  $0.02\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液并定容至 50 mL, 贮于冰箱中。有效期 1 个月。

b. 工作液,  $2.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ : 用微量移液器移取储备液 500  $\mu\text{L}$  以  $0.02\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液稀至 50 mL, 贮于冰箱中。

c. 标准系列: 用微量移液器移取工作液 25, 50, 100, 500, 1 000  $\mu\text{L}$ , 以  $0.02\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液稀释至 2 mL, 该标准系列中盐酸克仑特罗的相应浓度分别为: 0.025, 0.050, 0.100, 0.500, 1.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 贮于冰箱中。

10.2.1.3 仪器、设备

(1) 实验室常用仪器设备。

(2) 分析天平: 感量 0.001 g; 感量 0.000 01 g。

(3) 超声水浴。

(4) 离心机: 能达  $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

(5) 分液漏斗: 150 mL。

(6) 电热块或沙浴: 可控制温度至  $[(50\sim70)\pm5]^\circ\text{C}$ 。

(7) 烘箱: 温度可控制在  $(70\pm5)^\circ\text{C}$ 。

(8) 高效液相色谱仪: 具有  $\text{C}_{18}$  柱 4  $\mu\text{m}$  (如  $150\ \text{mm}\times 3.9\ \text{mm ID}$ ) 或类似的分析柱和 UV 检测器或二极管阵列检测器。

10.2.1.4 试样选取与制备

取具代表性的试样, 用四分法缩减分取 200 g 左右, 粉碎过 0.45 mm 孔径的筛, 充分混匀, 装入磨口瓶中备用。

10.2.1.5 分析步骤

(1) 提取。称取适量试样(配合饲料 5 g, 预混料、浓缩料 2 g)精确至 0.001 g, 置于 100 mL 三角瓶中, 准确加入提取液 50 mL, 振摇使全部润湿, 放在超声水浴中超声提取 15 min, 每 5 min 取出用手振摇一次。超声结束后, 手摇至少 10 s, 并取上层液于离心机  $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  下离心 10 min。

(2) 净化。准确吸取上清液 10.00 mL, 置 150 mL 分液漏斗中滴加氢氧化钠溶液, 充分振摇, 将 pH 值调至 11~12。该过程反应较慢, 放置 3~5 min 后, 检查 pH 值, 若 pH 值降低需再加碱调节。溶液用 30, 25 mL 乙醚萃取两次, 令醚层通过无水硫酸钠干燥, 用少许乙醚淋洗分液漏斗和无水硫酸钠, 并用乙醚定容至 50 mL。准确吸取 25.00 mL 于 50 mL 烧杯中, 置通风橱内( $50^\circ\text{C}$  加热块或沙浴

上蒸干,残渣溶于 2.00 mL 盐酸溶液,取 1.00 mL 置于预先已分别用 1 mL 甲醇和 1 mL 去离子水处理过的 SPE 小柱上,用注射器稍试加压,使其过柱速度不超过  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,再先后分别用 1 mL SPE 淋洗液-1 和-2 淋洗,最后用甲醇洗脱,洗脱液置  $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$  加热块或沙浴上,用氮气吹干。

(3)测定。

①于净化、吹干的样品残渣中准确加入 1.00~2.00 mL  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液,充分振摇、超声,使残渣溶解,必要时过  $0.45 \mu\text{m}$  的滤膜,上清液上机测定,用盐酸克仑特罗标准系列进行单点或多点校准。

②HPLC 测定参数设定:

色谱柱: $\text{C}_{18}$ 柱,  $150 \text{ mm} \times 3.9 \text{ mm ID}$ ,粒度  $4 \mu\text{m}$  或类似的分析柱。

柱温:室温。

流动相:0.05%磷酸水溶液:乙腈=100:12(V:V),流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

检测器:二极管阵列或 UV 检测器。

检测波长:210 nm 或 243 nm。

进样量:20~50  $\mu\text{L}$ 。

③定性定量方法。

定性方法:除了用保留时间定性外,还可用二极管阵列测定盐酸克仑特罗紫外光区的特征光谱,即在 210,243,296 nm 有 3 个峰值依次变低的吸收峰。

定量方法:积分得到峰面积,而后用单点或多点校准法定量。

#### 10.2.1.6 分析结果的表述

(1)试样中盐酸克仑特罗的质量分数按公式 10-1 计算。

$$w(\text{盐酸克仑特罗}) = \frac{m_1}{m} \times D \times 10^{-6} \quad 10-1$$

式中: $m_1$  为 HPLC 色谱峰的面积对应的盐酸克仑特罗的质量,  $\mu\text{g}$ ;  $D$  为稀释倍数;  $m$  为试样质量 g。

结果表示至小数点后一位。

(2)允许差。取平行测定结果的算术平均值为测定结果,两个平行测定的相对偏差不大于 10%。

#### 10.2.2 气相色谱-质谱法 GC-MS 法(仲裁法)

##### 10.2.2.1 方法原理

用加有甲醇的稀酸溶液将饲料中的克仑特罗盐酸盐溶出,溶液碱化,经液液萃取和固相萃取柱净化后,在 GC-MS 联用仪上分离、测定。

#### 10.2.2.2 试剂和材料

以下所用的试剂和水,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 中规定的三级水。

(1)提取净化用试剂:同 HPLC 法。

(2)衍生剂:N,O-双三甲基甲硅烷三氟乙酰胺(BSTFA)。

(3)甲苯。

(4)盐酸克仑特罗标准溶液。

①储备液, $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ : $10.00\text{ mg}$  盐酸克仑特罗(含  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_{12}\text{N}_{20}\cdot\text{HCl}$  不少于 98.5%)溶于甲醇并定容至  $50\text{ mL}$ ,贮于冰箱中。有效期 3 个月。

②工作液, $2.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ :用微量移液器移取储备液  $500\text{ }\mu\text{L}$  以甲醇稀释至  $50\text{ mL}$ ,贮于冰箱中。

③标准系列:用微量移液器移取工作液  $25,50,100,500,1\,000\text{ }\mu\text{L}$ ,以甲醇稀释至  $2\text{ mL}$ ,该标准系列中盐酸克仑特罗的相应浓度为: $0.025,0.050,0.100,0.500,1.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,贮于冰箱中。

#### 10.2.2.3 仪器、设备

(1)试样前处理设备同 HPLC 法。

(2)GC-MS 联用仪。装有弱极性或非极性的毛细管柱的气相色谱仪和具电子轰击离子源和检测器。

#### 10.2.2.4 试样选取与制备

同 HPLC 法。

#### 10.2.2.5 分析步骤

(1)提取同 HPLC 法。

(2)净化同 HPLC 法。

(3)测定。

①衍生:于净化、吹干的试样残渣中加入衍生剂 BSTFA  $50\text{ }\mu\text{L}$ ,充分涡旋混合后,置  $(70\pm 5)^{\circ}\text{C}$  烘箱中,衍生反应  $30\text{ min}$ 。用氮气吹干,加甲苯  $100\text{ }\mu\text{L}$ ,混匀,上 GC-MS 联用仪测定。同时用盐酸克仑特罗标准系列做同步衍生。

②GC-MS 测定参数设定。

色谱柱:DB-5MS, $30\text{ m}\times 0.25\text{ mm ID}$ , $0.25\text{ }\mu\text{m}$ 。

载气:氮气,柱头压: $50\text{ Pa}$ 。

进样口温度: $260^{\circ}\text{C}$ 。

进样量: $1\text{ }\mu\text{L}$ ,不分流。

柱温程序: $70^{\circ}\text{C}$  保持  $1\text{ min}$ ,以  $25^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  速度升至  $200^{\circ}\text{C}$ ,于  $200^{\circ}\text{C}$  保

持 6 min,再以  $25\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度升至  $280\text{ }^{\circ}\text{C}$  并保持 2 min。

EI 源电子轰击能:70 eV。

检测器温度:200  $^{\circ}\text{C}$ 。

接口温度:250  $^{\circ}\text{C}$ 。

质量扫描范围:60~400 AMU。

溶剂延迟:7 min。

检测用克仑特罗三甲基硅烷衍生物的特征质谱峰:

$$m/z=86,187,243,262。$$

### ③定性定量方法

定性方法:试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 0.5%。特征离子基峰百分数与标准品相差不大于 20%。

定量方法:选择离子监测(SIM)法计算峰面积,单点或多点校准法定量。

#### 10.2.2.6 分析结果的表述

(1)试样中盐酸克仑特罗的质量分数按公式 10-2 计算。

$$w(\text{盐酸克仑特罗})=\frac{m_2}{m}\times D\times 10^{-6} \quad 10-2$$

式中: $m_2$  为 GC-MS 色谱峰的面积对应的盐酸克仑特罗的质量,  $\mu\text{g}$ ;  $D$  为稀释倍数;  $m$  为试样质量,  $\text{g}$ 。

结果表示至小数点后一位。

(2)允许差。取平行测定结果的算术平均值为测定结果,两个平行测定的相对偏差不大于 20%。

## 10.3 饲料中己烯雌酚的检验

配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中己烯雌酚的测定可采用 HPLC 法和 LC-MS 法。HPLC 法的最低检测限为 4 ng(取样 10 g 时,最低检测浓度为  $0.1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),LC-MS 法的最低检测限为 0.5 ng(取样 10 g 时,最低检测浓度为  $0.025\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。其中 LC-MS 法为仲裁法。

### 10.3.1 高效液相色谱法(HPLC 法)

#### 10.3.1.1 方法原理

试样中的己烯雌酚用乙酸乙酯提取,减压蒸干后,经不同 pH 值的液液分配净化,再于 HPLC 仪器上分离、测定。

### 10.3.1.2 试剂和材料

除特殊注明外,本法所用的试剂均为分析纯,水为去离子水,符合二级用水的规定。

- (1)抗坏血酸。
- (2)乙酸乙酯。
- (3)三氯甲烷。
- (4)甲醇。
- (5)氢氧化钠溶液:  $c(\text{NaOH})=1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。
- (6)碳酸氢钠溶液:  $c(\text{NaHCO}_3)=1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。
- (7)无水硫酸钠。
- (8)己烯雌酚(DES)标准溶液。

①DES 标准储备液:准确称取 DES 标准品(含量 $>99\%$ ) $0.010\ 00 \text{ g}$ ,置于  $10 \text{ mL}$  容量瓶中,用甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀,其浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,贮于  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中,有效期 1 个月。

②DES 标准工作液:分别准确吸取标准储备液  $1.00, 0.500, 0.10 \text{ mL}$ ,置于  $10 \text{ mL}$  容量瓶中,用甲醇稀释、定容。其对应的浓度为  $100, 50, 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,再以此稀释液配制  $2, 0.5, 0.25, 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准工作液。

(9)HPLC 流动相: $0.5 \text{ mL } 1:1$  磷酸(优级纯)溶液( $V:V$ )用实验室二级用水稀释至  $1 \text{ L}$ ,并按  $40:60(V:V)$  的比例和甲醇混合。用前超声或做其他脱气处理。

### 10.3.1.3 仪器、设备

- (1)实验室常用仪器、设备。
- (2)分析天平:感量为  $0.000\ 1, 0.000\ 01 \text{ g}$  的各一台。
- (3)超声水浴。
- (4)离心机:能达  $4\ 000\sim 5\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。
- (5)旋转蒸发器。
- (6)分液漏斗: $150 \text{ mL}$ 。

(7)高效液相色谱仪:具有  $\text{C}_{18}$  柱(如  $150 \text{ mm} \times 3.9 \text{ mm ID}$ , 粒度  $4 \mu\text{m}$ )和紫外(UV)或二极管阵列检测器。

### 10.3.1.4 试样选取和制备

采取有代表性的样品,四分法缩减至  $200 \text{ g}$ ,粉碎,使全部通过  $0.45 \text{ mm}$  孔径的筛,充分混匀,贮于磨口瓶中备用。

### 10.3.1.5 分析步骤

(1)提取。称取配合饲料 10 g(准确至 0.001 g)和抗坏血酸 2 g,置于 50 mL 离心管中,加乙酸乙酯 60 mL,盖好管盖,充分振摇约 1 min,再置超声水浴中超声提取 2 min,其间用手回旋摇动两次。取出后于离心机上,4 000~5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,倒出上清液,再分别用 50,40 mL 乙酸乙酯重复提取两次,汇集上清液,置旋转蒸发器上,68~72 °C 减压蒸发至干。

浓缩饲料和添加剂预混合饲料提取过程相同,只是浓缩饲料需称取 3~4 g,添加剂预混合饲料 2 g(称量准确至 0.000 1 g),提取用的乙酸乙酯量也相应减至 40,30,20 mL。

(2)净化。将蒸干的乙酸乙酯提取物用三氯甲烷溶解,分 3 次定量转移至 150 mL 的分液漏斗中(共用三氯甲烷约 60 mL),加少许抗坏血酸(0.3~0.5 g),用氢氧化钠溶液 10 mL,将 DES 萃取至水相(回旋振摇 30 s),并用三氯甲烷洗涤水相 2~3 次,每次 20 mL,回旋振摇 10 s。然后用碳酸氢钠溶液 12~15 mL 将 pH 调至 10.3~10.6,用 30,30,20 mL 三氯甲烷萃取 3 次,将 DES 回提至三氯甲烷中,并令三氯甲烷层通过无水硫酸钠(30~35 g)干燥。将干燥过的三氯甲烷溶液置旋转蒸发器上,在 55~57 °C 下减压蒸发至干。以适量的甲醇溶解后,上机测定。

(3)测定。

①HPLC 测定参数的设定:

色谱柱:C<sub>18</sub>柱,150 mm×3.9 mm ID,粒度 4 μm 或性能类似的分析柱。

柱温:室温。

流动相:0.025%磷酸水溶液:甲醇=40:60(V:V),流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

检测器:UV 或二极管阵列检测器。

检测波长:240 nm。

进样量:8~20 μL。

②定性、定量测定:按仪器说明书操作,取适量由获得的试样制备液和相应浓度的 DES 标准工作液进行测定。以保留时间和 DES 的紫外光区特征光谱定性(DES 在 240 nm 有一吸收峰,而后在约 280 nm 处有一肩峰)。以色谱峰面积积分值做单点或多点校准定量。

### 10.3.1.6 结果计算

(1)试样中己烯雌酚的质量分数按公式 10-3 计算。



$$w(\text{己烯雌酚}) = \frac{m_1}{m} \times D \times 10^{-6} \quad 10-3$$

式中： $m_1$  为 HPLC 试样色谱峰对应的己烯雌酚质量， $\mu\text{g}$ ； $m$  为试样质量， $\text{g}$ ； $D$  为稀释倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留至小数点后一位。

(2) 允许差。两个平行测定的相对偏差不大于 7%。

### 10.3.2 液相色谱-质谱法(LC-MS 法)

#### 10.3.2.1 方法原理

试样中的 DES 用乙酸乙酯提取，减压蒸干后，经不同 pH 值下的液液分配净化，再于 LC-MS 仪器上分离、测定。

#### 10.3.2.2 试剂和材料

(1) LC 流动相：甲醇：水 = 70 : 30 (V : V)。

(2) 其他同 HPLC 法。

#### 10.3.2.3 仪器、设备

(1) LC-MS 联用仪。

(2) 其他仪器设备同 HPLC 法。

#### 10.3.2.4 试样制备

同 HPLC 法。

#### 10.3.2.5 分析步骤

(1) 提取：同 HPLC 法。

(2) 净化：同 HPLC 法。

(3) 测定。

LC-MS 测定参数的设定：

液相色谱(LC)部分：

LC 色谱柱： $\text{C}_{18}$ ，柱长 150 mm × 2.1 mm ID，粒度 3.5 ~ 5  $\mu\text{m}$ 。

柱温：30  $^{\circ}\text{C}$ 。

流动相：甲醇：水 = 70 : 30 (V : V)。

流动相流速：0.2  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

质谱(MS)部分：

负离子电喷雾电离源(ESI)。

电离电压：3.0 kV。

取样锥孔电压：60 V。

二级锥孔电压:4~5 V。

源温度:103 ℃

脱溶剂温度:180 ℃。

脱溶剂氮气:260 L·h<sup>-1</sup>。

锥孔反吹氮气:50 L·h<sup>-1</sup>。

(4)定性定量方法。

定性方法:以试样与标准品保留时间和特征质谱离子峰定性,DES 应有准分子离子峰  $m/z=267$  和 251、237 两个离子碎片。

定量方法:以选择准分子离子峰( $m/z=267$ )计算色谱峰面积,单点或多点校准法定量。

#### 10.3.2.6 结果计算

(1)试样中己烯雌酚的质量分数按公式 10-4 公式计算。

$$w(\text{己烯雌酚}) = \frac{m_2}{m} \times D \times 10^{-6} \quad 10-4$$

式中: $m_2$  为 LC-MS 试样色谱峰对应的己烯雌酚质量,μg; $m$  为试样质量,g; $D$  为稀释倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留至小数点后一位。

(2)允许差。两个平行测定的相对偏差不大于 10%。

## 10.4 饲料中金霉素的测定

### 10.4.1 适用范围

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中金霉素的测定,检测限为 1 ng,最低检出浓度为 4 mg·kg<sup>-1</sup>。

### 10.4.2 方法原理

使用盐酸-丙酮溶液提取饲料中的金霉素,调至 pH 1.0~1.2,振荡,过滤,注入反相柱分离,紫外检测器检测,外标法定量分析。

### 10.4.3 试剂和材料

本标准所用试剂,除特别注明外,均为分析纯。水为蒸馏水,色谱用水为去离

子水,符合 GB/T 6682 用水的规定。

(1)氢氧化钠溶液:400 g · L<sup>-1</sup>。

(2)乙二酸(草酸)溶液:1/2c(H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)=0.01 mol · L<sup>-1</sup>。

(3)4 mol · L<sup>-1</sup>盐酸溶液。

(4)提取液:丙酮:4 mol · L<sup>-1</sup>盐酸溶液:水=13:1:6(V:V:V)。

(5)流动相:乙二酸溶液:乙腈(色谱纯):甲醇(色谱纯)=10:3:2(V:V:V)。

(6)金霉素标准液。

①金霉素标准储备液:准确称取金霉素标准品 0.012 90 g(含量大于 96.9%,贮存于硅胶干燥器中),精确至 0.1 mg,置于 50 mL 容量瓶中,用提取液溶解并定容至刻度,摇匀,其浓度为 250 g · L<sup>-1</sup>,贮于 4~6 ℃冰箱中,有效期为 1 周。

②金霉素标准工作液:准确移取 4 mL 金霉素标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用超纯水稀释至刻度,摇匀,其浓度为 100 g · L<sup>-1</sup>,现用现配。

#### 10.4.4 仪器、设备

(1)离心机:3 000 r · min<sup>-1</sup>。

(2)pH 计:精度 0.01 mV。

(3)恒温振荡器:300 r · min<sup>-1</sup>。

(4)微孔滤膜(孔径 0.45 μm)。

(5)分析天平:感量 0.1 mg。

(6)分析天平:感量 0.01 mg。

(7)高效液相色谱仪。

#### 10.4.5 试样的选取和制备

选取有代表性样品 200~500 g,用四分法缩至 100 g,粉碎通过 0.45 mm 孔径筛,充分混匀,贮于磨口瓶中备用。

#### 10.4.6 分析步骤

(1)称取试样 1~10 g(金霉素含量≥40 mg · kg<sup>-1</sup>),准确至 0.1 mg,置于具塞锥形瓶中,加入 100 mL 提取液,手摇 2 min,再用盐酸溶液调 pH 至 1.0~1.2(记录盐酸溶液的消耗量,作为稀释倍数),具塞,恒温振荡器振荡速度 110 r · min<sup>-1</sup>,振荡 30 min。

(2)将提取液倒入离心管,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min。

(3)取离心上清液用滤膜过滤,滤液作为样品液。

(4)HPLC 测定参数的设定。

分析柱 C<sub>18</sub>;柱长 150 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm(或类似分析柱)。

柱温:室温。

检测器:紫外检测器,检测波长 375 nm。

流动相速度:1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

进样量:10~20 μL。

(5)定量测定:采用多点外标法,根据浓度与峰面积的线性回归方程计算金霉素的含量。

#### 10.4.7 测定结果的计算

(1)试样中所含金霉素的质量分数按公式 10-5 计算。

$$w(\text{金霉素}) = \frac{m_1}{m} \times D \times 10^{-6} \quad 10-5$$

式中: $m_1$  为 HPLC 试样色谱峰对应的金霉素质量,μg; $m$  为试样质量,g; $D$  为稀释倍数。

测定结果用平行样测定的算术平均值表示,保留至小数点后一位。

(2)允许差:两个平行测定的相对偏差不大于 7%。

### 10.5 饲料中喹乙醇的测定

#### 10.5.1 适用范围

本方法适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中喹乙醇的测定,检测限 0.65 ng,最低检出浓度为 2 mg·kg<sup>-1</sup>。

#### 10.5.2 方法原理

饲料样品中的喹乙醇以甲醇溶液提取,过滤后用反相液相色谱柱分离测定,紫外检测器检测,外标法定量分析。

#### 10.5.3 试剂和材料

本标准所用试剂,除特别注明外,均为分析纯。水为蒸馏水,色谱用水为去离

子水,符合 GB/T 6682 用水的规定。

(1)乙酸。

(2)提取液:5%甲醇(色谱纯)溶液。

(3)碳酸钾。

(4)流动相:15%甲醇(色谱纯)溶液(用乙酸调 pH 2.2)。

(5)喹乙醇标准溶液。

①喹乙醇标准储备液:准确称取喹乙醇标准品 0.012 55 g(含量 $>99.6\%$ ,使用前于 105℃烘箱中干燥 2 h,贮存于硅胶干燥器中),精确至 0.01 mg,置于 50 mL 棕色容量瓶中,用提取液在 60℃超声波水浴超声振荡 15 min 溶解并定容至刻度,摇匀,其溶液浓度为  $250\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,贮于 4~6℃冰箱中,有效期为 1 周。

②喹乙醇标准工作液:准确移取 4 mL 喹乙醇标准储备液于 10 mL 棕色容量瓶中,用提取液稀释至刻度,摇匀,其浓度为  $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,现用现配。

#### 10.5.4 仪器、设备

(1)离心机: $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

(2)超声波振荡器。

(3)微孔滤膜(孔径  $0.45\text{ }\mu\text{m}$ )。

(4)pH 计:精度 0.01 mV。

(5)恒温振荡器: $300\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

(6)分析天平:感量 0.1 mg。

(7)分析天平:感量 0.01 mg。

(8)高效液相色谱仪。

#### 10.5.5 试样的选取和制备

选取有代表性样品 200~500 g,用四分法缩至 100 g,粉碎通过 0.45 mm 孔径筛,充分混匀,贮于磨口瓶中备用。

#### 10.5.6 分析步骤

(1)称取试样 1~5 g,准确至 0.1 mg(喹乙醇含量 $\geq 20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),置于具塞锥形瓶中,加入 0.5 g 碳酸钾和 50 mL 提取液,具塞置于摇床中,恒温振荡器振荡速度  $110\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,振荡 30 min(避光操作)。

(2)将提取液倒入离心管, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min。

(3)取离心上清液用滤膜过滤,滤液作为样品液。

(4)HPLC 测定参数的设定。

分析柱  $C_{18}$ :柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒度 5  $\mu\text{m}$ (或类似分析柱)。

柱温:室温。

检测器:紫外检测器,检测波长 260 nm。

流动相速度:0.9  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

进样量:5~10  $\mu\text{L}$ 。

(5)定量测定:采用多点外标法,根据浓度与峰面积的线性回归方程计算喹乙醇的含量。

#### 10.5.7 测定结果的计算

(1)试样中所含喹乙醇的质量分数按公式 10-6 计算。

$$w(\text{喹乙醇}) = \frac{m_1}{m} \times D \times 10^{-6} \quad 10-6$$

式中: $m_1$  为 HPLC 试样色谱峰对应的喹乙醇质量, $\mu\text{g}$ ;  $m$  为试样质量,g;  $D$  为稀释倍数。

(2)测定结果用平行样测定的算术平均值表示,保留至小数点后一位。

#### 10.5.8 允许差

两个平行测定的相对偏差不大于 7%。

### 思考题

1. 我国目前禁止在动物饲料和饮水中使用的药物有哪些类别?
2. 饲料中违禁药物的检测一般采用哪几种方法,他们之间的关系如何?
3. 简述饲料中盐酸克仑特罗检测方法的原理和主要步骤。
4. 简述饲料中己烯雌酚测定方法的原理和主要步骤。

## 11 配合饲料加工质量检测

### 【内容提要】

衡量饲料加工质量的主要指标包括混合均匀度、粉碎粒度、颗粒硬度、颗粒粉化率、淀粉糊化度、水中稳定性和体外消化率等。本章主要介绍了用氯离子选择电极法和甲基紫色素法测定配合饲料混合均匀度;微量元素预混料混合均匀度测定方法、配合饲料粉碎粒度的测定、颗粒饲料硬度和粉化率的测定、水产饲料水中稳定性、蛋白质溶解度和动物性蛋白质饲料体外消化率的测定。

要生产一个质优价廉的饲料产品,仅仅靠选用优质稳定的原料,并根据原料的实际蛋白质、氨基酸和主要矿物元素钙、磷等养分的含量,设计一个科学合理的配方是不够的,还必须通过合理的加工工艺,才能达到预期的目标。衡量配合饲料加工质量的主要指标通常包括配合饲料混合均匀度、配合饲料粉碎粒度、颗粒的硬度、颗粒粉化率、颗粒料的淀粉糊化度等。目前,在我国颁布的猪、鸡配合饲料产品质量标准中规定的加工指标主要包括混合均匀度和粉碎粒度。

混合均匀度,即饲料混合的均匀一致性,是饲料混合工艺质量的一项重要指标。配合饲料的混合均匀度一般要求变异系数不超过10%,预混合饲料的混合均匀度变异系数不大于7%。变异系数越大,则表明饲料的成分在产品中的分布越不均匀。特别是添加到饲料中的微量添加剂成分,如果不能比较均匀分布在产品中,一方面会降低产品的使用效果,另一方面可导致一部分动物食入不足或食入过量,严重时可能导致动物的中毒。如马杜拉霉素的有效剂量与中毒剂量之间差别非常小,在养禽生产中时常发生马杜拉霉素中毒事件的一个主要原因之一是饲料混合不均匀。因此,保证饲料产品的混合均匀度,对确保饲料产品的质量至关重要。

粉碎粒度是衡量颗粒大小和颗粒数量多少的技术指标。不同动物以及同一动物在不同生产时期对配合饲料粉碎粒度有不同的要求。近年来,许多研究表明,日粮中谷物的粉碎粒度与动物的生产性能密切相关。多数研究表明,对于猪,粉碎粒度在700  $\mu\text{m}$ 左右为宜。

淀粉糊化度是指淀粉中糊化淀粉量与全部淀粉量之比的百分数。动物特别是幼龄动物如仔猪对淀粉的消化率与原料中淀粉的糊化度有密切关系。水产动

物对饲料中的淀粉糊化度要求更高。

## 11.1 配合饲料粉碎粒度的测定

### 11.1.1 适用范围

本测定法适用于规定的标准编织筛测定配合饲料成品的粉碎粒度。

### 11.1.2 仪器设备

(1)标准编织筛。

筛目:4,6,8,12,16。

净孔边长(mm):5.00,3.20,2.50,1.60,1.25。

(2)摇筛机:统一型号电动摇筛机。

(3)天平:感量为0.01 g。

### 11.1.3 测定步骤

从原始样品中称取试样100 g,放入规定筛层的标准编织筛内,开动电动机连续筛10 min,筛完后将各层底物筛上物分别称重。

计算公式:

$$\text{该筛层上留存百分率} = \frac{\text{该筛层上留存粉料的质量}}{\text{试样质量}} \times 100\%$$

检验结果计算到小数点后第一位,第二位四舍五入。

过筛的损失量不得超过1%,双试验允许误差不超过1%,求其平均数即为检验结果。

### 11.1.4 注意事项

(1)测定结果以统一型号的电动摇筛机为准,在该摇筛机未定型与普及前,各地暂用测定面粉粗细度的电动筛筛理(或手工筛5 min计算结果)。

(2)筛分时若发现未经粉碎的谷粒与种子时,应加以称重并记载。

## 11.2 配合饲料混合均匀度的测定

配合饲料混合均匀度的测定方法有两种:氯离子选择性电极法和甲基紫法。



### 11.2.1 氯离子选择性电极法

#### 11.2.1.1 适用范围

本方法适用于各种配合饲料的质量检测,也适用于混合机和饲料加工工艺中混合均匀度的测试。

#### 11.2.1.2 方法原理

本法通过氯离子选择性电极的电位对溶液中氯离子的选择性响应来测定氯离子的含量,以饲料中氯离子含量的差异来反映饲料的混合均匀度。

#### 11.2.1.3 仪器

- (1)氯离子选择性电极。
- (2)双盐桥甘汞电极。
- (3)离子计或酸度计:精度 0.2 mV。
- (4)磁力搅拌器。
- (5)烧杯:100,250 mL。
- (6)移液管:1,5,10 mL。
- (7)容量瓶:50 mL。
- (8)分析天平:感量为 0.1 mg。

#### 11.2.1.4 试剂与溶液

本标准所用试剂和水,在没有注明其他要求时,均指分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的三级水。

(1)0.5 mol·L<sup>-1</sup>硝酸(GB 626)溶液:吸取浓硝酸 35 mL,用水稀释至 1 000 mL。

(2)2.5 mol·L<sup>-1</sup>硝酸钾(GB 647)溶液:称取 252.75 g 硝酸钾于烧杯中,加水加热溶解,用水稀释至 1 000 mL。

(3)氯离子标准液:称取经 500℃灼烧 1 h 冷却后的氯化钠(GB 1253) 8.244 0 g 于烧杯中,加水并微热溶解,转入 1 000 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,溶液中含氯离子 5 mg·mL<sup>-1</sup>。

#### 11.2.1.5 试样选取与制备

(1)本法所需的试样系配合饲料成品,必须单独采制。

(2)每一批饲料至少抽取 10 个有代表性的样品。每个样品的数量应以畜禽的平均一日采食量为准,即肉用仔鸡前期饲料取样 50 g;肉用仔鸡后期饲料与产蛋鸡饲料取样 100 g;生长肥育猪饲料取样 500 g。样品的布点必须考虑各方位深度、袋数或料流的代表性,但每一个样品必须由一点集中取样。取样时不允许有

任何翻动或混合。

(3)将上述每个样品在化验室充分混匀,以四分法从中分取 10 g 试样进行测定。对颗粒饲料与较粗的粉状饲料需将样品粉碎后再取试样。

#### 11.2.1.6 测定步骤

(1)标准曲线的绘制。吸取氯离子标准液 0.1,0.2,0.4,0.6,1.2,2.0,4.0,6.0 mL,分别加入 50 mL 容量瓶中,加入 5 mL 硝酸溶液,10 mL 硝酸钾溶液,用水稀释至刻度,摇匀,即可得到 0.50,1.00,2.00,3.00,6.00,10.00,20.00,30.00 的 mg/50 mL 氯离子标准系列溶液,将它们分别倒入 100 mL 的干燥烧杯中,放入磁性搅拌子一粒,以氯离子选择性电极为指示电极,双盐桥甘汞电极为参比电极,用磁力搅拌器搅拌 3 min(转速恒定),在酸度计或电位计上读取指示值(mV),以溶液的电位值(mV)为纵坐标,氯离子浓度为横坐标,在半对数坐标纸上绘制标准曲线。

(2)试样的测定。称取试样 10 g(准确至 0.000 2 g)置于 250 mL 烧杯中,准确加入 100 mL 水,搅拌 10 min,静置 10 min 后用干燥的中速定性滤纸过滤。吸取试样滤液 10 mL 置于 50 mL 容量瓶中,加入 5 mL 硝酸溶液及 10 mL 硝酸钾溶液,用水稀释至刻度,摇匀,按标准曲线的操作步骤进行测定,读取电位值,从标准曲线上求得氯离子含量的对应值。

#### 11.2.1.7 混合均匀度的计算

以各次测定的氯离子含量的对应值为  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_{10}$ , 其平均值  $\bar{x}$ , 标准差  $S$  与变异系数  $CV$  按公式 11-1 至公式 11-4 计算。

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_{10}}{10} \quad 11-1$$

其标准差  $S$  为:

$$S = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + \dots + (x_{10} - \bar{x})^2}{10 - 1}} \quad 11-2$$

或

$$S = \sqrt{\frac{x_1^2 + x_2^2 + x_3^2 + \dots + x_{10}^2 - 10\bar{x}^2}{10 - 1}} \quad 11-3$$

由平均值  $\bar{x}$  与标准差  $S$  计算变异系数  $CV$ :

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\% \quad 11-4$$

若需求得饲料中的氯离子质量分数时,可按公式 11-5 计算。

$$w(\text{Cl}^-) = \frac{m_1}{m \times \frac{V_1}{V} \times 1\,000} \quad 11-5$$

式中:  $m_1$  为从标准曲线上求得的氯离子( $\text{Cl}^-$ )含量, mg;  $m$  为测定时试样的质量, g;  $V_1$  为测定时试样滤液的用量, mL;  $V$  为试样溶液总体积, mL。

注: 配合饲料的混合均匀度(CV)不超过 10%。

### 11.2.2 甲基紫法

#### 11.2.2.1 适用范围

本法主要适用于混合机和饲料加工工艺中混合均匀度的测试。

#### 11.2.2.2 方法原理

本法以甲基紫色素作为示踪物, 将其与添加剂一起加入, 预先混合于饲料中, 然后以比色法测定样品中甲基紫含量, 以饲料中甲基紫含量的差异来反映饲料的混合均匀度。

#### 11.2.2.3 仪器

- (1) 分光光度计: 有 5 mm 比色皿。
- (2) 标准铜丝网筛: 筛孔基本尺寸 100  $\mu\text{m}$ 。

#### 11.2.2.4 试剂

- (1) 甲基紫(生物染色剂)。
- (2) 无水乙醇(GB 678)。
- (3) 示踪物的制备与添加。

将测定用的甲基紫混匀并充分研磨, 使其全部通过 100  $\mu\text{m}$  标准筛。按照配合饲料成品量十万分之一的用量, 在加入添加剂的工段投入甲基紫。

#### 11.2.2.5 试样的采集与制备

试样的采集与制备与氯离子选择电极法相同。

#### 11.2.2.6 测定步骤

称取试样 10 g (准确至 0.000 2 g), 放在 100 mL 的小烧杯中, 加入 30 mL 无水乙醇, 不时地加以搅动, 烧杯上盖一表面玻璃, 30 min 后用滤纸过滤(定性滤纸, 中速), 以无水乙醇作空白调节零点, 用分光光度计, 以 5 mm 比色皿在 590 nm 的波长下测定滤液的吸光度。

以各次测定的吸光度值为  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_{10}$ , 其平均值  $\bar{x}$ , 标准差  $S$  与变异系数 CV 按氯离子选择性电极法中公式 11-1 至公式 11-4 计算。

#### 11.2.2.7 注意事项

(1)同一批饲料的10个试样测定时应尽量保持操作的一致性,以保证测定值的稳定性和重复性。

(2)由于出厂的各批甲基紫的甲基化程度不同,色调可能有差别,因此,测定混合均匀度所用的甲基紫,必须用同一批次的并加以混匀,才能保持同一批饲料中各样品测定值的可比性。

(3)配合饲料中若添加苜蓿草粉、槐叶粉等含有色素的组分时,则不能用甲基紫法测定混合均匀度。

### 11.3 微量元素预混合饲料混合均匀度的测定

#### 11.3.1 适用范围

本测定方法适用于含有铁源的微量元素的预混合饲料混合均匀度的测定。

#### 11.3.2 测定原理

本方法通过预混合饲料中铁含量的差异来反映各组分分布的均匀性。

本方法通过盐酸羟胺将样品中的铁还原成二价铁,再与显色剂邻菲罗啉反应,生成橙红色的络合物,以比色法测定铁的含量。

#### 11.3.3 仪器设备

- (1)分析天平:感量为0.1 mg。
- (2)可见分光光度计。
- (3)容量瓶:100,50 mL各1个。
- (4)三角瓶、吸量管、量筒等。

#### 11.3.4 试剂及配制

(1)乙酸盐缓冲溶液( $\text{pH}=4.6$ )。称取8.3 g分析纯无水乙酸钠(GB 693)于水中,加入12 mL乙酸(GB 676,分析纯),并用蒸馏水稀释至100 mL。

(2)盐酸羟胺溶液。溶解10 g的盐酸羟胺(HGB 3044)于水中,并用水稀释至100 mL,保存在棕色瓶中,并置于冰箱内可稳定数周。

(3)邻菲罗啉溶液。取0.1 g邻菲罗啉(GB 1293)加入约80 mL 80 ℃的水中,冷却后用水稀释至100 mL,保存在棕色瓶中,并置于冰箱内可稳定数周。

(4)浓盐酸(GB 622)。化学纯。

### 11.3.5 测定步骤

称取试样 1~10 g (准确至 0.000 2 g),放入烧杯中,加入 20 mL 浓盐酸,加入 30 mL 水稀释,充分搅拌溶解,过滤到 100 mL 容量瓶中,定容到刻度。取过滤的试样液 1 mL,放置到 25 mL 容量瓶中,加入盐酸羟胺 1 mL,充分混匀后放置 5 min 充分反应 ( $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ),向 25 mL 容量瓶中加入 5 mL 乙酸盐缓冲液,摇匀,加入 1 mL 邻菲罗啉,用水稀释至 25 mL,充分混匀,放置 30 min,以蒸馏水作参比溶液,用分光光度计在 510 nm 波长处测定其吸光度。

### 11.3.6 结果计算

变异系数 CV:

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\% \quad 11-6$$

$$\text{式中: } S = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + \cdots + (x_{10} - \bar{x})^2}{10 - 1}}$$

或

$$S = \sqrt{\frac{x_1^2 + x_2^2 + x_3^2 + \cdots + x_{10}^2 - 10\bar{x}^2}{10 - 1}}$$

$x_1, x_2, x_3, \cdots, x_{10}$  为 10 个试样的测定的吸光度值; $\bar{x}$  为试样吸光度的平均值; $S$  为试样吸光度的标准差。

### 11.3.7 注意事项

- (1)试样加入浓盐酸时必须慢慢滴加,以防样液溅出。
- (2)试样必须充分搅拌。
- (3)对于高铜的预混合饲料可适当将邻菲罗啉溶液的用量增加 3~5 mL。

## 11.4 颗粒饲料硬度的测定

### 11.4.1 适用范围

颗粒饲料硬度是指颗粒对外压力所引起变形的抵抗能力。

本方法适用于一般经挤压制得的硬颗粒饲料。

#### 11.4.2 测定原理

用对单颗粒径向加压的方法,使其破碎。以此时的压力表示该颗粒的硬度。用多个颗粒的硬度的平均值表示该样品的硬度。

#### 11.4.3 仪器设备

本屋式硬度计。

#### 11.4.4 试样选取与制备

从每批颗粒饲料中取出具有代表性的实验室样品约 20 g。用四分法从各部分选取长度 6 mm 以上,大体上同样大小、长度的(以颗粒两头最凹处计算)颗粒 20 粒。

#### 11.4.5 测定步骤

将硬度计的压力指针调整至零点,用镊子将颗粒横放到载物台上,正对压杆下方。转动手轮,使压杆下降,速度中等、均匀。颗粒破碎后读取压力数值( $x_1, x_2, x_3, \dots, x_{20}$ )。清扫载物台上碎屑。将压力计指针重新调整至零,开始下一样品的测定。

#### 11.4.6 结果计算

##### 11.4.6.1 计算

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_{20}}{20} \quad 11-7$$

式中: $\bar{x}$  为试样硬度,kg; $x_1, x_2, \dots, x_{20}$  为各单粒试样的硬度,kg。

如果颗粒长不足 6 mm,则在硬度数值后注明平均长度。例如硬度  $x=3.0$  kg,颗粒平均长度  $L=5$  mm,则将试样硬度记为  $3.0 \text{ kg}(L=5 \text{ mm})$ 。

##### 11.4.6.2 允许差

2 份试样的绝对误差不大于 1 kg。

## 11.5 颗粒饲料淀粉糊化度的测定

### 11.5.1 适用范围

本方法适用于经挤压、膨化等工艺制得的各种颗粒饲料中淀粉糊化度的测定。

### 11.5.2 测定原理

$\beta$ -淀粉酶在适当的 pH 值和温度下,能在一定的时间内,定量地将糊化淀粉转化成还原糖,转化的糖量与淀粉的糊化程度成比例关系。用铁氰化钾法测其还原糖量,即可计算出淀粉的糊化度。

### 11.5.3 仪器和设备

- (1)分析天平:感量 0.1 mg。
- (2)多孔恒温水浴锅:可控温度( $40 \pm 1$ )℃。
- (3)定性滤纸:中速,直径 7~9 cm。
- (4)碱式滴定管:25 mL (刻度 0.1 mL)。
- (5)移液管:2,5,15,25 mL。
- (6)玻璃漏斗。
- (7)容量瓶:100 mL。

### 11.5.4 试剂和溶液

- (1)10%(V:V)磷酸盐缓冲液(pH=6.8)

甲液:溶解 71.64 g 磷酸氢二钠(GB 1263,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )于蒸馏水中,并稀释至 1 000 mL。

乙液:溶解 31.21 g 磷酸二氢钠(GB 1267,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )于蒸馏水中,并稀释至 1 000 mL。

取甲液 49 mL 与乙液 51 mL 合并为 100 mL,再加入 900 mL 蒸馏水即为 10%(V/V)磷酸盐缓冲液。

- (2)60 g · L<sup>-1</sup>  $\beta$ -淀粉酶溶液:溶解 6.0 g · L<sup>-1</sup>  $\beta$ -淀粉酶(pH=6.8, 40℃时活力大于 10 万 IU,细度为 80%以上通过 60 目)于 100 mL 10%磷酸盐缓冲液中成乳浊液( $\beta$ -淀粉酶贮于冰箱内,用时现配)。

- (3)10%硫酸(GB 625-89)溶液:将 10 mL 浓硫酸用水稀释至 100 mL。

(4)  $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  钨酸钠(分析纯)溶液:溶解 12.0 g 钨酸钠于 100 mL 水中。

(5)  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  碱性铁氰化钾(GB 644)溶液:溶解 32.9 g 铁氰化钾和 44.0 g 无水碳酸钠(GB 1255)于水中并稀释至 1 000 mL,贮于棕色瓶内。

(6) 醋酸盐溶液:溶解 70.0 g 氯化钾(GB 645)和 40.0 g 硫酸锌(GB 666)于水中加热溶解,冷却至室温,再缓缓加入 200 mL 冰乙酸(GB 676)并稀释至 1 000 mL。

(7)  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  碘化钾(GB 1272)溶液:溶解 10.0 g 碘化钾于 100 mL 水中,加入几滴饱和氢氧化钠(GB 629)溶液,防止氧化,贮于棕色瓶内。

(8)  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠(GB 637)溶液:溶解 24.82 g 硫代硫酸钠和 3.8 g 硼酸钠(GB 632)于水中,并稀释至 1 000 mL,贮于棕色瓶内(此液放置 2 周后使用)。

(9)  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  淀粉指示剂:溶解 1.0 g 可溶性淀粉于煮沸的水中,再煮沸 1 min,冷却,稀释至 100 mL。

#### 11.5.5 试样的选取和制备

取要检测的颗粒饲料样品 50 g 左右,在实验室样品磨中粉碎,其细度通过 40 目分析筛,混匀,放于密闭容器内,贴上标签作为试样。试样应低温保存( $4 \sim 10^\circ \text{C}$ )。

#### 11.5.6 测定步骤

(1) 分别称取试样 1 g 准确至 0.2 mg(淀粉含量不大于 0.5 g) 2 份,置于 2 只 150 mL 三角瓶中,标上 A、B。另取一只 150 mL 三角瓶,不加试样,作空白,并标上 C。在这 3 只三角瓶中各用 50 mL 量筒加入 40 mL 10% 磷酸盐缓冲液。

(2) 将 A 置于沸水浴中煮沸 30 min,取出快速冷却至  $60^\circ \text{C}$  以下。

(3) 将 A、B、C 置于  $(40 \pm 1)^\circ \text{C}$  恒温水浴锅中预热 3 min 后,各用 5 mL 移液管加入  $(5 \pm 0.1) \text{ mL}$   $\beta$ -淀粉酶溶液,保温  $[(40 \pm 1)^\circ \text{C}]$  1 h(每隔 15 min 轻轻摇匀一次)。

(4) 1 h 后,将 3 只三角瓶取出,用移液管分别加入 2 mL 硫酸溶液,摇匀,再加入 2 mL  $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  钨酸钠溶液摇匀,并将它们全部转移到 3 只 100 mL 容量瓶中(用蒸馏水荡洗三角瓶 3 次以上,荡洗液也转移至相应的容量瓶内)。最后用蒸馏水定容至 100 mL,并贴上标签。

(5) 振摇容量瓶,静置 2 min 后,用中速定性滤纸过滤。留滤液作为下面测定试样。



(6)用 5 mL 移液管分别吸取上述滤液 5 mL,放入洁净的 150 mL 三角瓶内,再用 15 mL 移液管加入 15 mL 碱性铁氰化钾溶液,摇匀后置于沸水浴中准确加热 20 min 后取出,用冷水快速冷却至室温,用 25 mL 移液管缓慢加入 25 mL 醋酸盐溶液,并摇匀。

(7)用 5 mL 移液管加入 5 mL 碘化钾溶液摇匀,立即用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫代硫酸钠溶液滴定,当溶液颜色变成淡黄色时,加入几滴淀粉指示剂,继续滴定到蓝色消失。各三角瓶分别逐一滴定,并记下相应的滴定量。

### 11.5.7 结果计算

(1)所测试样糊化度按公式 11-8 计算。

$$\text{糊化度} = \frac{V - V_2}{V - V_1} \quad 11-8$$

式中:  $V$  为空白滴定量, mL;  $V_1$  为完全糊化试样溶液滴定量, mL;  $V_2$  为试样溶液滴定量, mL。

(2)精密度。每个试样取两个平行样进行测定,以其算术平均值为结果。

双试验的相对误差:糊化度在 50% 以下时,不超过 10%;糊化度在 50% 以上时,不超过 5%。

### 11.5.8 注意事项

(1) $\beta$ -淀粉酶在贮存期间内会有不同程度的失活,一般每贮藏 3 个月需测一次酶活力。为了保证样品酶解完全,以酶活力 8 万 IU,酶用量 300 mg 为准,如酶的活力降低,酶用量则按比例加大。

(2)在滴定时,指示剂不要过早地加入,否则会影响测定结果,同一样品滴定时,应在变到一样的淡黄色时加入淀粉指示剂。

## 附 11.1 饲料淀粉糊化度测定简易方法

该方法是由美国大豆协会熊易强博士根据美国饲料工业界普遍采用的测定淀粉饲料热加工程度的方法简化而成的。通过调质制粒,淀粉糊化度一般在 20%~40% 之间,而挤压膨化糊化度则可上升至 30%(110℃)、550%(130℃)和 90%(160℃)。

现将该简易方法介绍如下。

## 一、原 理

该法是根据糊化后的淀粉易被酶解释放出葡萄糖的原理测定的。具体做法是称出4份相同质量的加工过的饲料样品,两份加缓冲液,置沸水浴中,加热,令其充分糊化,即成为全糊化样品,立即冷却,然后与另两份样品一道在同样的缓冲液、同样的温度下,用淀粉酶水解,将糊化的淀粉转化为葡萄糖,再用比色法测定,比较各自的葡萄糖含量。与全糊化样品相比,加工样品酶解得到的葡萄糖越多,说明其加工的熟化度越好;反之则差。

## 二、仪 器 设 备

- (1)天平,感量0.0001 g。
- (2)恒温水浴:可调控在 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。
- (3)沸水浴。
- (4)分光光度计或比色计。

## 三、试剂与溶液

(1)缓冲液。将4.1 g无水乙酸钠(或6.8 g  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )溶于约100 mL水中,加3.7 mL冰乙酸,用水定容至1 L,混匀,测定并用乙酸或乙酸钠将pH调至 $4.5 \pm 0.05$ 。

(2)酶溶液。将750 mg脱支酶(amyloglucosidase, Sigma,  $12\,100\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ )溶于50 mL蒸馏水中,也可根据自己用量,配制成上述浓度( $15\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或 $180\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的酶溶液。注意该液最好临用前配制,当日有效。

(3)蛋白沉淀剂。

① $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸锌( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )溶液。

② $0.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液。

(4)铜试剂。将40 g无水碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )溶于约400 mL蒸馏水中,加7.5 g酒石酸,溶解后加4.5 g硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),溶解并定容至1 L。

(5)磷钼酸试剂。取70 g钼酸和10 g钨酸钠,加入400 mL  $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液和400 mL蒸馏水。煮沸20~40 min,冷却,加蒸馏水至约700 mL,加250 mL浓的正磷酸(85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ),稀释至1 L。

## 四、测 定 步 骤

将风干样品粉碎,过1 mm筛孔的筛。根据样品中淀粉的含量,称取质量相

等的4份样品(取样量与淀粉含量的关系可参见表11.1)置于25 mL刻度试管中。其中2份用做“全糊化试样”,另2份用做“测定试样”,具体操作步骤可参见图11.1。

表 11.1 称样量推荐表

样品类型	淀粉含量/%	推荐称样量/mg
纯淀粉	100	100
谷 物	70 以上	150
一般饲料	30~60	200
某些饲料	45 以下	400

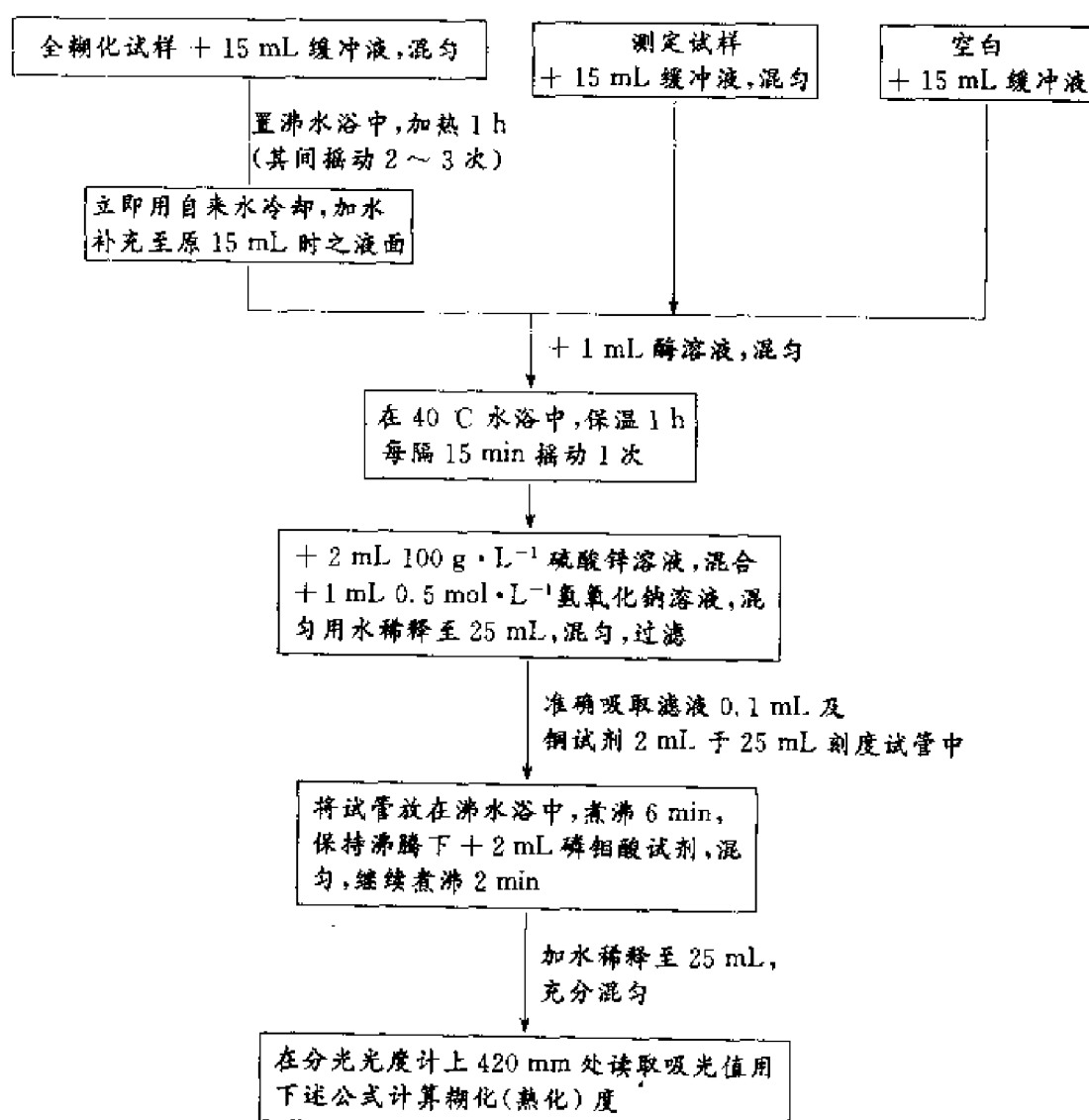


图 11.1 样品糊化度(熟化)测定步骤

## 五、结果计算

计算公式:

$$\text{糊化(熟化)度} = \frac{\text{测定试样的吸光度} - \text{空白吸光度}}{\text{全糊化试样吸光度} - \text{空白吸光度}} \quad 11-9$$

## 11.6 颗粒饲料粉化率的测定

### 11.6.1 适用范围

颗粒饲料粉化率是指颗粒饲料在特定条件下产生的粉末质量占其总质量百分比。含粉率是指颗粒饲料中所含粉料质量占其总质量的百分比。

本方法适用于一般硬颗粒饲料的粉化率、含粉率测定。

### 11.6.2 原理

本法通过粉化仪对颗粒产品的翻转摩擦后成粉量的测定,反映颗粒的坚实程度。

### 11.6.3 仪器设备

- (1)瑞士 RETCH-API 型粉化仪,两箱体式。
- (2)国产 SFCX<sub>2</sub> 型粉化仪,两箱体式。
- (3)标准筛一套,GB6004。
- (4)SDB-200 顶击式标准筛振筛机。

### 11.6.4 试样选取与制备

(1)颗粒冷却 1 h 以后测定,从各批颗粒饲料中取出有代表性的实验室样品 1.5 kg 左右。

(2)将实验室样品(试样)用规定筛号的金属筛(表 11.2)分 3 次用筛机预筛 1 min,将筛下物称重。

计算 3 次筛下物总重占试样总重的百分数,即为含粉率,然后将筛上物用四分法称取 2 份试料,每份 500 g。

表 11.2 不同颗粒直径采用的筛孔尺寸表

颗粒直径/mm	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00	4.50
筛孔尺寸/mm	1.00	1.40	2.00	2.36	2.80	2.80	3.35
颗粒直径/mm	5.00	6.00	8.00	10.00	12.00	16.00	20.00
筛孔尺寸/mm	4.00	4.00	5.60	8.00	8.00	11.20	16.00

#### 11.6.5 测定步骤

将称好的 2 份试样分装入粉化仪的回转箱内,盖紧箱盖,开动机器,使箱体回转 10 min ( $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),停止后取出试样,用规定筛格在振筛机上筛理 1 min,称取筛上物质量,计算 2 份试样测定结果的平均值。

#### 11.6.6 结果计算

(1)含粉率( $w_1$ )与粉化率( $w_2$ )的计算:

$$w_1 = \frac{m_1}{m_2} \quad 11-10$$

式中: $w_1$  为试样含粉率; $m_1$  为预筛后筛下物总质量,g; $m_2$  为预筛试样总质量,g。

$$w_2 = 1 - \frac{m}{500} \quad 11-11$$

式中: $w_2$  为试样粉化率; $m$  为回转后筛上物质量,g。

所得结果表示至小数点后一位。

(2)允许差。2 份试样测定结果绝对差不大于 1,在仲裁分析时绝对差不大于 1.5。

#### 11.6.7 补充说明

在样品量不足 500 g 时,也可用 250 g 样品,回转 5 min,测定粉化率。

### 11.7 渔用配合饲料水中稳定性的测定

#### 11.7.1 适用范围

本测定方法适用于渔用粉末配合饲料、颗粒配合饲料与膨化配合饲料水中稳定性测定。

### 11.7.2 测定原理

本方法通过对渔用粉末、颗粒饲料和膨化饲料在一定的温度水中浸泡一定时间后测定其在水中的溶失率来评定饲料在水中的稳定性。

### 11.7.3 仪器设备

(1)分析天平:感量为 0.1 g。

(2)电热鼓风干燥箱。

(3)恒温水浴箱。

(4)立式搅拌器。

(5)量筒:20,500 mL。

(6)温度计:精度为 0.1 ℃。

(7)圆筒型网筛(自制):网筛框高 6.5 cm,直径为 10 cm,金属筛网孔径应小于被测饲料的直径。

(8)秒表。

### 11.7.4 试剂

蒸馏水。

### 11.7.5 测定步骤

#### 11.7.5.1 粉末饲料水中稳定性的测定

准确称取 2 份试样各 200 g(准确到 0.1 g),倒入盛有 200~240 mL 蒸馏水的搅拌器中,在室温条件下低速( $105 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )搅拌 10 min。搅拌完毕后取出,平分 2 份,取其中一份放置静水中,在水温( $25 \pm 2$ )℃浸泡 1 h,捞出后与另一份对照样同时放入烘箱中在 105 ℃恒温下烘至恒重后,分别准确称重。饲料水中溶失率质量分数按公式(11-12)计算。

$$w(\text{水中溶失率}) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \quad 11-12$$

式中: $w$  为溶失率; $m_1$  为对照料烘干后的质量,g; $m_2$  为浸泡料烘干后的质量,g。

#### 11.7.5.2 颗粒饲料水中稳定性测定

称取试样 10 g(准确至 0.1 g),放入已备好的圆筒形网筛内。网筛置于盛有水深为 5.5 cm 的容器中,水温为( $25 \pm 2$ )℃,浸泡(硬颗粒饲料浸泡时间 5 min,

膨化饲料浸泡时间为 20 min)后,把网筛从水中缓慢提至水面,又缓慢沉入水中,使饲料离开筛底,如此反复 3 次后取出网筛,斜放沥干吸附水,把网筛内饲料置于 105 ℃烘箱内烘干至恒重,称重( $m_2$ )。同时,称一份未浸水的同样饲料,置于 105 ℃烘箱内烘干至恒重,称重( $m_1$ )。按公式 11-12 计算。

#### 11.7.5.3 说明

每个试样应取两个平行样进行测定,以其算术平均值为结果,结果表示至一位小数,允许相对误差 $\leq 4\%$ 。

## 11.8 蛋白质溶解度的测定

脲酶活性和蛋白溶解度(PS)是评定豆粕加工质量的两种重要指标。但在生产中对加热过度的豆粕脲酶测定值不是一个可靠的指标,蛋白溶解度可以区别不同程度的过度加热。蛋白质溶解度测定值随加热时间的增加而递减。

蛋白溶解度是根据蛋白质在一定量的氢氧化钾溶液中溶解蛋白质质量。分析结果:生大豆粕的 PS 达到 100%,在日常分析中,当 PS 大于 85%则认为大豆粕过生,当 PS 小于 75%时则认为大豆粕过熟。当 PS 在 80%左右时大豆粕加工适度。

### 11.8.1 试剂和溶液

(1)  $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钾(GB/T 2306)溶液。

(2) 其他试剂与凯氏定氮时所用的标准试剂相同。

### 11.8.2 测定步骤

称取经粉细(防止过热)后 1.5 g 大豆饼粕粉放入 250 mL 烧杯中,加入 75 mL 的氢氧化钾溶液,用磁力搅拌器搅拌 20 min,再将搅拌好的液体转至离心管中,用  $2\,700\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  速度离心 10 min,吸取上清液 15 mL,放入消化管中,用凯氏定氮法测定其中的蛋白质含量,此含量相当于 0.3 g 试样中溶解的蛋白质量。

### 11.8.3 结果计算

试样中蛋白质溶解度按公式 11-13 计算。

$$\text{蛋白质溶解度} = \frac{15\text{ mL 上清液中粗蛋白质的质量}}{0.3\text{ g 试样中粗蛋白质的质量}} \quad 11-13$$

## 11.9 动物蛋白质饲料体外消化率的测定——胃蛋白酶法

### 11.9.1 适用范围

本方法适用于所有动物性蛋白质饲料,不适用于植物性蛋白质或混合饲料消化率的胃蛋白酶测定方法。

### 11.9.2 测定原理

脱过脂的试样,用温热的胃蛋白酶溶液,在恒温、持续不断地搅拌下消化 16 h,过滤分离不溶性残渣,洗涤、干燥,测定残渣的粗蛋白含量。同时,测定空白和脱脂未酶解试样的粗蛋白含量。

### 11.9.3 试剂与溶液

本标准所用试剂,除特殊说明外,均为分析纯。

(1)  $2\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胃蛋白酶溶液:将 6.1 mL 浓盐酸稀释至 1 000 mL 水中(溶液 pH 1~2),加热至  $42\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,加入 2 g 活性为 1:10 000 生化级胃蛋白酶[若活性不是 1:10 000,可使用活性 1:3 000 生化级胃蛋白酶(不可使用非生化级胃蛋白酶),应注意胃蛋白酶溶液中胃蛋白酶浓度应为  $20\text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ],并缓慢搅拌直至溶解。勿在加热板上加热胃蛋白酶溶液或配制时过热。临用前配制。

(2) 乙醚(GB 12591)。

(3) 丙酮(GB 686)。

(4) 定氮试剂:按粗蛋白质测定中所用试剂及配制方法准备。

### 11.9.4 仪器与设备

(1) 恒温式平转摇床:温控范围  $20\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,水浴式或空气浴式均可,转速可调( $15\sim 300\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )。

(2) 实验室用样品粉碎机。

(3) 索氏抽提器、脱脂设备:同粗脂肪测定。

(4) 定氮仪器、设备:同粗蛋白测定。

(5) 实验室常用仪器、设备。

### 11.9.5 试样选取与制备

取具有代表性试样,用四分法缩分至 200 g,然后粉碎至全部过 0.90 mm 孔



径筛(20目),混匀装于密封容器,保存备用。

#### 11.9.6 测定步骤

(1)脱脂:称取1~2 g试样用乙醚脱脂(含脂肪小于1%可不脱脂,含脂肪1%~10%建议脱脂,含脂肪大于10%则必须脱脂)。脱脂方法可参照粗脂肪抽提方法进行。脱脂后的样品需烘干。

(2)胃蛋白酶消化:称取脱脂烘干后的试样若干克(精确至0.000 2 g,含氮量5~80 mg)于250 mL带盖磨口瓶中,加150 mL新配制的并已预热至42~45℃的胃蛋白酶溶液,要确保样品完全被胃蛋白酶溶液浸湿,盖紧瓶盖,将瓶夹于恒温摇床上,于45℃恒定搅动16 h进行保温消化。

(3)消化残渣的处理:从搅动器上取下磨口瓶,呈45°角放置,让残渣沉淀15 min以上,随后在铺有快速滤纸的布氏漏斗上抽滤,先用少量水将瓶盖上的残渣洗至滤纸上,再将磨口瓶保持沉淀时的角度移至布氏漏斗上,慢慢倾出内容物,使之通过滤纸后形成连续的细流,避免任何不必要的搅动。液体通过滤纸的速度应与倾入的速度相同。

当上层液体通过滤纸后,于瓶中加入15 mL丙酮,用拇指盖住瓶口剧烈振摇,放开。再用拇指堵住瓶口,在滤纸上方将瓶倒置振摇,放开拇指让丙酮和残渣流到滤纸上。再用一份15 mL的丙酮进行洗涤,照上法振摇和倒出。检查瓶子,并用丙酮再次洗涤。当全部液体通过滤器后,用洗瓶以少量丙酮洗涤漏斗壁上残渣两次,并抽干。从布氏漏斗上小心取下载有残渣的滤纸,无损地移入凯氏烧瓶中,并将凯氏烧瓶置于105℃烘箱内烘干。

(4)粗蛋白的测定:将上述烘干的残渣按本书4.3方法测定粗蛋白的质量分数( $w_2$ )。同时,称取脱脂烘干后的样品若干克(精确至0.000 2 g,含氮量5~80 mg),直接按凯氏定氮方法测定脱脂未酶解的试样中粗蛋白的质量分数( $w_1$ )。

#### 11.9.7 结果计算

##### 11.9.7.1 结果按下式计算

$$\text{胃蛋白酶消化率} = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \quad 11-14$$

式中: $w_1$ 为脱脂未酶解的原试样中粗蛋白的平均质量分数; $w_2$ 为脱脂酶解后残渣中粗蛋白的平均质量分数。

所得结果表示到小数点后一位。

#### 11.9.7.2 允许差

每个试样脱脂后取 2 份试料进行平行测定,以其算术平均值为测定结果。

测定结果的相对偏差允许范围同粗蛋白测定。

### 思考题

1. 试比较配合饲料混合均匀度测定与预混料混合均匀度测定方法的异同点?
2. 如何用蛋白质溶解度(*PS*)来评价大豆粕产品的质量?
3. 为什么要对饲料的加工质量进行检测?
4. 渔用配合饲料水中稳定性测定的意义?

## 12 现代近红外光谱分析在饲料工业中的应用

### 【内容提要】

通过本章的学习,了解近红外光谱分析的发展过程,掌握近红外光谱的测定原理及特点、分析测定过程,并了解该技术在饲料工业中的应用和研究进展情况。

20 世纪 80 年代中后期,随着计算机技术的发展和化学计量学研究的深入,加之近红外光谱(near infrared spectroscopy, NIR)仪器制造技术的日趋完善,促进了现代近红外光谱分析技术的发展。由于现代 NIR 分析技术所独具的特点,NIR 已成为近年来发展最快的快速分析测试技术,尤其在工业在线分析中的应用,产生了巨大的经济和社会效益。尽管 NIR 技术在饲料工业上的应用起步较晚,但越来越多被人们所重视。为了使大家对 NIR 及其在饲料工业中的应用情况有所了解,下面分别就 NIR 分析发展概况、测定原理及特点、分析测定过程及在饲料工业中的应用等几个方面进行介绍。

### 12.1 近红外光谱分析的进展

自 1800 年 Herschel 第一次发现 NIR 区域至今已有 200 多年的历史,19 世纪末,Abney 和 Festing 在 NIR 短波区域首次记录了有机化合物的近红外光谱,1928 年,Brachet 测得第一张高分辨的 NIR 图,并对有关基团的光谱特征进行解释。由于缺乏可靠的仪器基础,20 世纪 50 年代以前,NIR 的研究工作只局限在为数不多的几个实验室中,很少有实际应用。20 世纪 50 年代中期,Kaye 首先研制出能准确得到 NIR 光谱的仪器,一些公司相继开发了商品化的仪器。Norrise 等人在 NIR 的应用方面做了大量的工作,如他们采用 NIR 测量了农副产品(包括谷物、饲料、蛋类及动物体等)中的水分、油脂及蛋白含量,同时 NIR 也被用于有机化学、聚合物及药物化学等领域。直到今日,农副产品及食品的质量分析仍然是 NIR 应用最多的领域。20 世纪 60 年代中期,(中)近红外光谱商品化仪器的出现及其在化合物结构表征中起到巨大作用,但对 NIR 在分析测试中表现的灵敏度低、抗干扰性差的弱点,使人们淡漠了该技术的应用。在此后约 20 年中,NIR 技术几乎处于一种徘徊不前的状态,Wetzel 称 NIR 在这段时期是光

谱技术中的沉睡者。尽管如此,一些 NIR 技术的先驱们仍然不懈地努力,Norrise 等发展了漫反射分析技术,它使 NIR 可以直接对复杂固体样品进行分析,并提出采用多元校正方程处理相对弥散、灵敏度低的近红外光谱,这为现代 NIR 分析的发展奠定了良好的基础。

20 世纪 80 年代以来,由于计算机技术的发展和化学计量学的应用,高性能的计算机与准确、合理的计量学方法相结合,使光谱工作者能在较短的时间内完成大量的光谱数据的处理,NIR 分析得到迅速发展,有关 NIR 研究及应用的文献呈指数增长。NIR 仪器性能和生产规模都得到很大的提高,其应用已由传统的农副产品分析扩展到石油化工、精细化工、轻工食品、环境、生化、聚合物合成与加工、医药临床、纺织品等众多领域。近 10 年来,随着光纤技术在 NIR 中的应用,使 NIR 实现了远程测试,NIR 技术在工业生产过程中在线分析方面显示了强大的生命力,并取得了可观的经济效益。

NIR 是一种无损的分析技术,采用透射或漫反射方式可以直接对样品分析,不需要预处理样品。在测量过程中不产生污染,通过光纤可对危险环境中的样品进行遥测。因此,NIR 可称为环境友好的绿色快速分析技术,在人们日益注重生存环境的今天,NIR 技术的这一特点更引起人们的重视。

1988 年建立了国际近红外光谱协会(CNIRS),该协会的北美分会对 NIR 的文献(1905—1990)做了全面的汇编(CBIBL)。20 世纪 90 年代初,近红外研究及应用的专门杂志 *J. Near Infrared Spectroscopy* 和 *Near Infrared News* 分别创刊。自 1987 年举办的第一届 NIR 研究与应用的国际会议以来,至今已举行了 9 届,最近一届于 2001 年 6 月在韩国汉城举行,每次会议都出版了相应的文集,登摘了大量涉及 NIR 仪器、计量学方法研究及应用方面的文章。除此之外,光谱分析杂志,如 *Applied Spectroscopy*, 美国 *Analytical Chemistry* 及其他一些专业性杂志和专刊上都有大量的 NIR 基础研究及应用的文章。

我国在 NIR 技术的研究及应用方面起步较晚,但近年来在仪器的研制、软件开发、基础研究及应用研究方面已取得了可喜的进展,在有些领域已进入实质应用阶段,并创造了可观的经济效益。NIR 技术在我国饲料工业的应用刚刚起步,越来越多受到重视。可以预见,随着人们对 NIR 技术认识的逐步深入,其应用及发展将有广阔的前景。

## 12.2 近红外分析技术的基本原理

近红外光谱的波长范围是 780~2 500 nm,通常又将这个范围划分为近红

外短波区(780~1 100 nm, 又称 Herschel 光谱区)和近红外长波区域(1 100~2 500 nm)。近红外光谱源于化合物中含氢基团, 如 C—H, O—H, N—H, S—H 等振动光谱的倍频及合频的吸收。

近红外光谱方法(NIRS)利用有机物中含有 C—H、N—H、O—H、C—C 等化学键的泛频振动或转动, 以漫反射方式获得在近红外区的吸收光谱, 通过主成分分析、偏最小二乘法、人工神经网络等现代化学计量学的手段, 建立物质光谱与待测成分含量间的线性或非线性模型, 从而实现用物质近红外光谱信息对待测成分含量的快速计算。

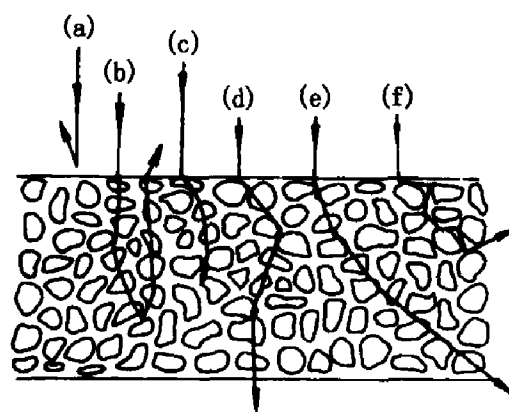


图 12.1 近红外光与固体样品作用示意图

(a)全反射 (b)漫反射 (c)吸收  
(d)漫透射 (e)折射 (f)散射

近红外光与固体试样作用时, 会出现 6 种情形: 全反射、漫反射、吸收、漫透射、折射和散射, 如图 12.1 所示。

近红外光谱的获得通常有两种基本方式, 即漫透射方式(transmittance)和漫反射方式(diffuse reflectance)(图 12.2 和图 12.3)。透射测定方法与常见的分光光度法类似, 用透射率( $T$ )或吸光度( $A$ )表示样品对光的吸收程度, 吸收度的大小符合比耳-郎伯定律。透射光谱一般用于均匀透明的真溶液或固体样品。

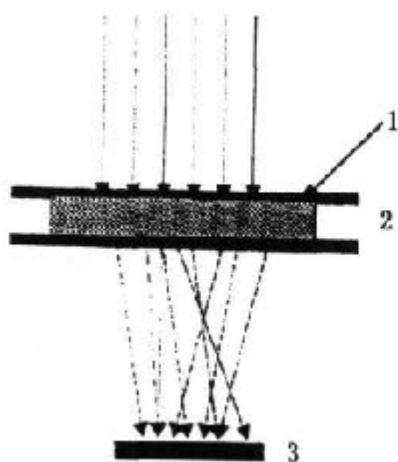


图 12.2 漫透射方式示意图

1. 样品 2. 样品池架 3. 检测器

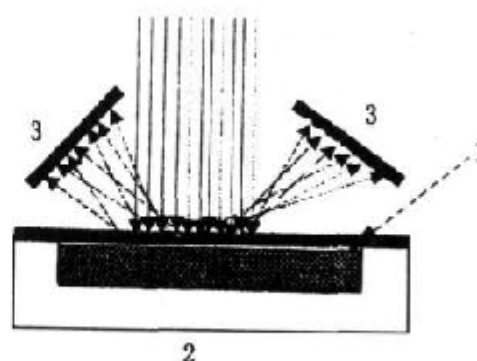


图 12.3 漫反射方式示意图

1. 样品 2. 样品池架 3. 检测器

$$A_i = \lg \frac{1}{T_i} = \epsilon_i b c_i$$

式中： $A_i$  为样品中  $i$  组分的吸光度； $T_i$  为样品中  $i$  组分的透光率； $\epsilon_i$  为摩尔吸光系数； $c_i$  为  $i$  组分的浓度； $b$  为样品池厚度。

漫反射法是对固体样品进行近红外测定的常用的方法，当光源垂直于样品表面，有一部分漫反射光会向各个方向散射，将检测器放在与垂直光成  $45^\circ$  角，测定的散射光强称为漫反射。

光的反射有两种，一种是表面反射，另一种是漫反射。所谓表面反射，就是光线照射在光滑物体表面上被有规则地反射出来的现象，它没有携带入射光与样品相互作用的信息，与样品相互作用无关。所谓漫反射，就是光线照射到粗糙物体表面被无规则反射现象。当光线照射到由一定厚度颗粒物质组成的样品层时，一部分被吸收，一部分被反射出来，反射出来的光线反映了样品的吸收特性，更多地携带有样品的化学信息。

反射光强度与反射率  $R$  的关系为：

$$R = \frac{\text{反射光强}}{\text{完全不吸收的表面反射光强}}$$

反射光强度  $A$  与反射率  $R$  的关系为：

$$A (\text{反射光强度}) = \lg \frac{1}{R}$$

因此，样品在近红外区的不同波长处便会产生相应的漫反射强度，反射强度的大小与样品某成分的含量有关。用波长及其对应的反射强度便可绘出样品的光谱图。光谱中峰位置与样品中组分结构有关。一组玉米粉的漫反射近红外光谱图如图 12.4 所示。

近红外漫反射分析的基础在于不同样品的不同组分在近红外区有特征吸收。被测组分含量与特征吸收波长处漫反射率倒数的对数成线性关系，即：吸光度  $(A) = \lg(1/R) \propto C$ 。事实上，这种方法是相对简单和容易理解的。首先我们作一个简单的类比：想想你花园中的绿草，我们假定它是绿色的，为什么它看起来是绿色的？因为当光照射到草上时，它吸收了红色的光谱区段，把黄色光和蓝色光反射回去，而反射回去的黄色光和蓝色光就形成了我们所看到的绿色。如果草是稀疏时，你看到的是一点点的绿色，如果是生长旺盛而浓密的草地，你看到的是深绿色。草越多，绿色越深。你不仅得到草越多绿色越深的概念，而且你同样

可以根据物体反射光的颜色把草与其他物体区分开来。

被测饲料样品的光谱特征是多种组分的吸收光谱的综合表现。对其中一个组分便可建立一个回归方程：

$$y = C_0 + C_1x_1 + C_2x_2 + \cdots C_nx_n$$

式中： $y$  为有机物某成分的百分含量； $C_0, C_1, \cdots, C_n$  代表回归系数； $x_1, x_2, \cdots, x_n$  代表各有机成分的反射吸光度值。

$y$  值可通过常规法求得。 $x_1, x_2, \cdots, x_n$  值可用近红外光谱仪获得。

利用一套定标样品(50 个左右),利用常规法求得的化学分析值及其在近红外光谱区的吸收吸光度值,通过多元回归计算,求出上述公式的回归系数,即可建立定标方程,即某饲料某成分的定标软件,对未知饲料样品进行检测。

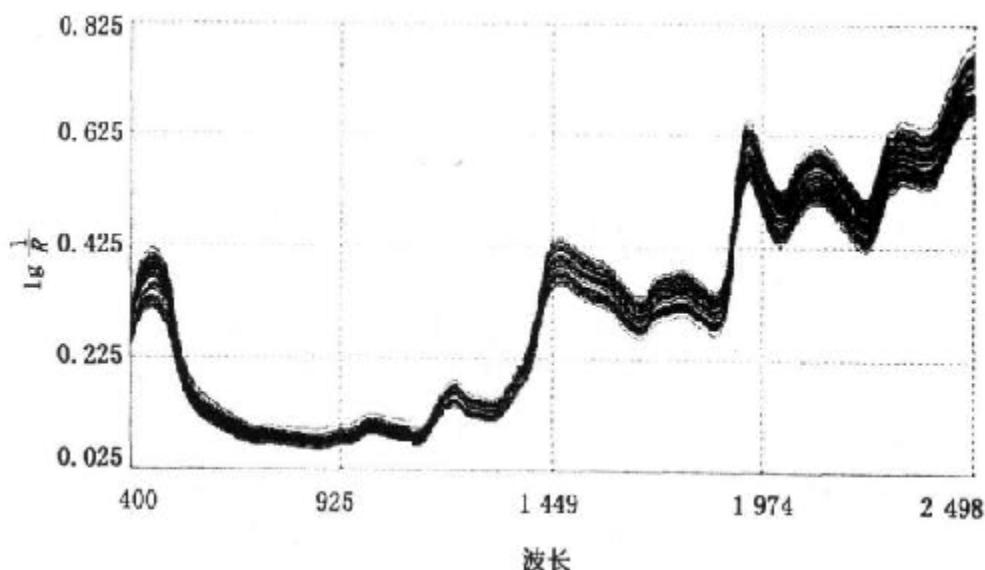


图 12.4 一组玉米粉的漫反射近红外光谱图

### 12.3 近红外光谱仪的典型类型及进展

NIR 仪器一般由光源、分光系统、样品池、检测器和数据处理五部分构成。近红外光谱仪器示意图如图 12.5。

根据分光方式,NIR 仪器可分为滤光片型、光栅扫描型、固定光路多通道检测、傅里叶变换和声光调谐滤光器等几种类型。现分别简要介绍各类型的特点和进展情况。

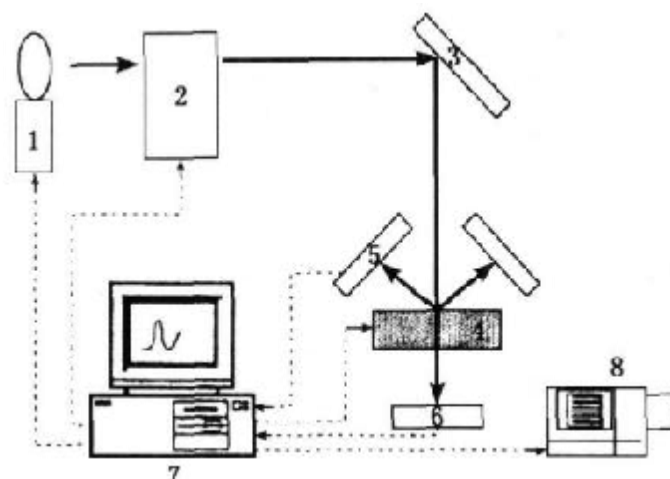


图 12.5 近红外光谱仪器示意图

1. 光源 2. 分光系统 3. 反光镜 4. 测样器件 5. 漫反射检测器  
6. 透射检测器 7. 控制及数据处理分析系统 8. 打印机

### 12.3.1 滤光片型近红外光谱仪

滤光片型仪器可分为固定滤光片和可调滤光片两种形式。固定滤光片型光谱仪设计最早。这种仪器要根据测定样品的光谱特征选择适当波长的滤光片。测量过程是由光源发出的光经滤光片得到一定带宽的单色光,通过样品池与样品作用后由检测器检测。该类仪器的特点是设计简单、成本低、光通量大、信号记录快、坚固耐用;但这类仪器只能在单一波长下测定,灵活性较差,如样品基体变化,往往会引起较大的测量误差。为了多波长测定,获得更多的样品信息,提高分析结果的准确性,有些仪器配备了两个固定滤光片和双通道检测器。还有些仪器配备了将 8 个滤光片安装在一个轮子上构成的一个滤光轮,这种仪器可以根据需要比较方便地在一个或多个波长下进行测定。滤光片型的 NIR 仪器其检测波长一般在近红外长波区域,定量方法多用一元或多元线性回归分析。

### 12.3.2 扫描型近红外光谱仪

扫描型 NIR 仪器很早就得到使用,分光元件可以是棱镜或光栅。为获得较高的分辨率,现代扫描型仪器中多使用全息光栅作为分光元件,通过光栅的转动,使单色光按波长长短依次通过测样器件,进入检测器检测。根据样品形态不同,可选择不同的测样器件进行透射或漫反射分析。这类仪器的特点是可进行全谱扫描,分辨率较高,仪器价格适中,便于维护;其最大弱点是光栅的机械轴长时间使用容易磨损,影响波长的精度和重现性,一般抗振性较差,特别不适于作为



在线仪器使用。

采用全谱校正,可以从 NIR 谱图中提取大量的样品信息,通过合理的计量学方法将光谱数据与校正集样品的组成或性质数据关联可得到相应的校正模型。对未知样品分析时,根据测定的未知样的谱图和已建立的数学模型,即可预测未知样的组成或性质。

### 12.3.3 傅里叶变换近红外光谱仪

进入 20 世纪 80 年代,傅里叶变换红外光谱成为近红外光谱仪器的主导产品。该类型 NIR 仪器的主要光学元件是 Michelson 干涉仪,其作用是使光源发出的光分成两束后,造成一定的光程差,再使之复合以产生干涉,所得的干涉图函数包含了光源的全部频率和强度信息,用计算机将样品干涉图函数及光源干涉图函数经傅里叶变换为强度按频率分布图,两者的比值即样品的近红外谱图。与扫描型仪器相比,该类型仪器的扫描速度快、波长精度高、分辨率好,短时间内即可进行多次扫描,可使信号做累加处理,光能利用率高、输出能量大,仪器的信噪比和测定灵敏度较高,可对样品中的微量成分进行分析;这类仪器的缺点是干涉仪中有移动性部件,需要较稳定的工作环境。定性和定量分析采用全谱校正技术。从近期几次国内外仪器展览会看,该类型的仪器将成为 NIR 仪器的主导产品。

### 12.3.4 固定光路多通道检测近红外光谱仪

固定光路多通道检测 NIR 仪器是 20 世纪 90 年代新发展的一类 NIR 仪器。其原理是光源发出的光先经过样品池,再由光栅分光,光栅不需转动,经光栅色散的光聚焦在多通道检测器的焦面上,同时被检测。这类仪器采用全息光栅分光,加之检测器的通道数达 1 024 或 2 048 个,可获得很好的分辨率。由于检测器对所有波长的单色光同时检测,在瞬间可完成几十次甚至上百次的扫描累加,因而可得到较高的信噪比和灵敏度。采用全谱校正,可以方便地进行定性和定量分析。仪器光路固定,波长精度和重现性得到保证。仪器内无移动性部件,其耐久性和可靠性都得到提高。因此,这类仪器适合现场分析和在线分析。

### 12.3.5 声光可调滤光器近红外光谱

声光 NIR 仪器被认为是 20 世纪 90 年代 NIR 最突出的进展。其分光器件为声光可调滤光器。声光光谱的工作原理是根据各向异性双折射晶体的声光衍射原理,采用具有较高的声光品质因素和较低的声衰减的双折射晶体制成分光器

件。晶体对一固定的超声频率,仅有很窄的光谱带被衍射,因而连续改变超声频率就能实现衍射光波长的快速扫描。该仪器的最大特点是无机械移动部件,测量速度快、精度高、准确性好,可以长时间稳定地工作,且可以消除光路中各种材料的吸收、反射等干扰。

## 12.4 近红外光谱分析过程

近红外光谱分析过程可分为定标和预测两个部分。

### 12.4.1 定标的程序

运用一套定标用样品,根据其化学测定值和特征波长处的吸光度值,运用多元回归计算求出定标方程的系数,即求出定标方程的过程,它包括以下几步。

#### 12.4.1.1 标样筛选

从大量样品中筛选出一套用于定标用的样品。筛选出的样品必须具有代表性,即需含将来所要分析样品的特性,包括物理学、化学、植物学特性和加工贮藏方法。选样的方法可根据样品的含量分布、结构特性或样品光谱特性随机选样。创建一个新的校正模型,至少需要 50 个样品,通常以 70~150 个样品为宜。样品过少,将导致模型的欠拟和性;样品过多,将导致模型的过拟和性。

#### 12.4.1.2 稳定样品组

为了使定标模型具有较好的稳定性,即其预测性能不受仪器本身波动和样品温度发生变化的影响。在定标中加上温度发生变化和仪器发生变化的样品。

#### 12.4.1.3 定标样品选择的方法

对于定标样品的选择应使用主成分分析法 PCA (Principal Component Analysis) 和聚类分析(Cluster Analysis)。根据某样品 NIR 光谱与其他样品光谱的相似性,仅选择其 NIR 光谱有代表性的样品,去除光谱非常接近的样品。

对于 PCA 方法,通常是选用 12 个目标值(Score Value)用于选择定标样品组。或者将每一 PCA 中选择具有最大和最小目标值的样品(Min/Max);或者将每一 PCA 中的样品分为等同两组,从每一组中选择等同数量的代表性样品参与定标。两种方法中 Min/Max 法是最常用的方法。

聚类分析方法,使用马哈拉诺比斯距离(或 H 值)等度量样品光谱间的相似性。通常选择有代表性样品的边界 H 值为 0.6,即如果某样品 NIR 光谱与其他样品统计值大于或等于 0.6,则将其选择进入定标样品;如果某样品 NIR 光谱与其他样品的 H 值小于 0.6,则不将其选入定标样品集。

#### 12.4.1.4 常规化学法测定成分含量

采用 GB 或其他公认的化学法测定样品某成分含量。

#### 12.4.1.5 获取光谱数据

用近红外光谱分析仪获取定标样品的光谱数据,并对其进行数学转换(一阶或二阶导数形式)。

#### 12.4.1.6 定标方程建立

利用样品成分含量及样品的光谱数据,通过主成分分析、偏最小二乘法、人工神经网络等现代化学计量学手段,建立物质光谱与待测成分间的线性或非线性模型,以实现用现代近红外光谱信息对待测成分含量的快速计算。

(1)逐步回归(stepwise multiple linear regression, SMLR) 选择回归变量,产生最优回归方程的一种常用数学方法。它首先通过单波长点的回归校正,误差最小的波长点的光谱读数即为多元线性回归模型中的第一独立变量;以第一变量进行二元回归模型比较,误差最小的波长所对应的光谱读数则为第二独立变量;以此类推获得第三独立变量……。但是独立变量的总数不超过 $[(N/10)+3]$ ,  $N$  为定标系中样品的数量,否则将产生模型的过适应性。

(2)主成分回归法(principal components regression, PCR) 如果在回归中应用所有的 100 个(NIT)或 700 个(NIR)波长点光谱的信息,建立回归模型时,至少需要 101 或 701 个样品建立 101 或 701 个线性方程。该方法可用于压缩所需样品数量,同时又采用了光谱所有的信息。它将高度相关的波长点归于一个独立变量中,进而以为数不多的独立变量建立回归方程,独立变量内高度相关的波长可用于主成分得分,将其联系起来。内部的检验(Cross Validation, CV)用于防止过模型现象发生。

(3)偏最小二乘法(partial least square regression, PLSR) 偏最小偏差回归法是 20 世纪 80 年代末应用到近红外光谱分析上的。该法与 PCR 很相似,仅在确定独立变量时,不仅考虑了光谱的信息,还考虑了化学分析值。该法是目前近红外光谱分析上应用最多的回归方法。在制定饲料中水分、粗蛋白、粗纤维、粗脂肪、赖氨酸和蛋氨酸测定的定标模型时多采用此法。

#### 12.4.1.7 定标方程准确性的检验

定标方程优劣的评判:可选用定标标准差  $SEC$  (standard error of calibration)、变异系数( $CV$ )、定标相关系数  $R_c$  和  $F$  检验的  $F$  值等对定标结果做初步评价,如  $SEC$ ,  $CV$  比较低而  $R_c$ 、 $F$  值高说明其准确性较好;否则不好。这些参数的具体含义如下:

标准分析误差( $SEC$  或  $SEP$ ):样品 NIR 与经典分析间残差的标准差,表

达为:

$$SEC = \sqrt{\sum (Y_{Nci} - Y_{Rci})^2 / (n_c - n_w - 1)}$$

标样品常以  $SEC$  表示, 检验样品常用  $SEP$  表示。

相对标准分析误差 [ $SEC(C)$ ]: 样品标准分析误差中扣除偏差的部分, 表达为:

$$SEC(C) = \sqrt{SEC^2 - Bias^2}$$

偏差 ( $Bias$ ): 残差的平均值;

相关系数 ( $r$ ): NIR 测定值与真值的相关性, 通常定标样品相关系数以  $R$  表示, 检验相关系数以  $r$  表示。

异常样品: 样品 NIR 光谱与定标样品差别过大, 即当样品的  $H$  值大于 0.6, 则该样品被视为异常。

残差的平均值:

$$R_c = \sqrt{1 - SEC^2 (n_c - n_w - 1) / SD_{ic}^2 (n_c - 1)}$$

$$F = R_c^2 (n_c - n_w - 1) / (1 - R_c^2 n_w)$$

式中:  $n_c$  和  $n_w$  分别为定标样品数和波长数;  $Y_{Nci}$ : 第  $i$  个样品某成分近红外预测值;  $Y_{Rci}$ : 第  $i$  个样品某成分的化学分析值;  $SD_{ic}$ : 定标样品某成分化学分析值的分布标准差。

变异系数为  $SEC$  占平均数的百分比。

#### 12.4.2 预测

预测是指考察定标方程用于测定未参与定标样品的准确性。预测所选样品应能代表被测样品的大致含量范围。用预测标准差  $SEP$  (standard error of performance)、变异系数、预测相关系数  $R_p$  和偏差 ( $Bias$ ) 对定标方程做最终评价。若预测样品的特性与定标样品相近, 则预测效果好, 否则效果差。

如果预测标准差和相关系数与定标值两者相差不大, 则说明定标是可行的。

$$SEP = \sqrt{\sum (Y_{NFi} - Y_{RFi})^2 / (n_p - 1)}$$

$$R_p = \sqrt{1 - SEP^2 / SD_{Rp}^2}$$

式中:  $n_p$  为被测样品数;  $Y_{NPI}$  为第  $i$  个预测样品某成分含量的近红外分析值;  $Y_{RPI}$  为第  $i$  个预测样品某成分含量的化学分析值;  $SD_{RP}$  为预测样品某成分化学分析值的分布标准差。

#### 12.4.3 实际测定

如果预效果较好,就可把定标方程用于生产,进行实际监测。近红外光谱分析过程如图 12.6 所示。

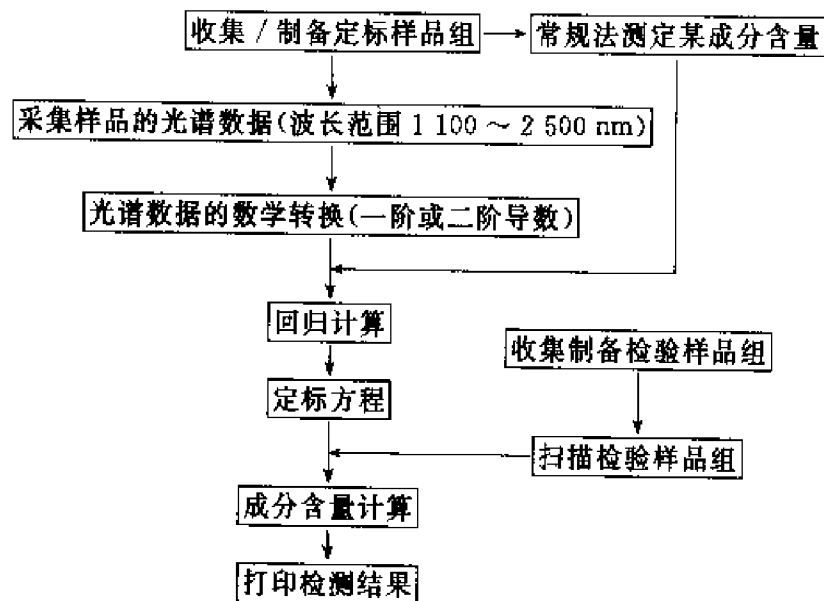


图 12.6 近红外光谱分析过程

#### 12.4.4 定标模型的更新

定标是一个由小样品估计整体的计量过程,因此定标模型预测能力的高低取决于定标样品的代表性和化学分析方法的准确性。由于预测样品的不确定性,因此,很难一下选择到大量的适宜定标样品。所以,在实际分析工作中,通常采用动态定标模型方法来解决这个问题。所谓动态定标模型方法就是在日常分析中边分析边选择异常样品,定期进行定标模型的升级,具体可概括为以下几个步骤。

- (1) 定标设计。
- (2) 分析测定。
- (3) 定标运算。
- (4) 实际预测。

- (5)异常数据检查。
- (6)再定标设计。
- (7)再分析测定。
- (8)再定标运算。

## 附 12.1 近红外分析典型步骤举例

### 一、仪器设备

(一)近红外光谱仪 可扫描 1 100~2 500 nm 范围的漫反射型近红外光谱仪。

(二)定标软件 为 DOS 或 WINDOWS 版本,具有 NIR 光谱数据的收集、存储、分析、选择样品、数据处理、模型建立、检验、数据的统计分析。

(三)样品磨 旋风磨,筛片孔径为 0.42 mm,或同类产品。

(四)样品杯 与仪器配套的样品杯。

### 二、试样的处理

将试样粉碎,使之全部通过 0.42 mm 孔径(内径)分析筛,并混合均匀。

### 三、分析步骤

(一)一般要求 每次测定前应对仪器进行以下诊断。

(1)仪器噪声。32 次(或更多)扫描仪器内部陶瓷参比,以多次扫描光谱吸光度残差的标准差来反映仪器的噪声。残差的标准差应控制在  $30 \lg(1/R)10^{-6}$  以下。

(2)波长的准确度和重现性。用加盖的聚苯乙烯来测定仪器的波长准确度和重现性。以陶瓷参比作对照,测定聚苯乙烯皿中聚苯乙烯的 3 个吸收峰的位置,即 1 680.3,2 164.9,2 304.2 nm,该 3 个吸收峰位置的漂移应小于 0.5 nm,每个波长处漂移的标准差应小于 0.05 nm。

(3)仪器外用检测样品的测定。将一个饲料样品(通常为豆粕)密封在样品槽中作为仪器外用的检验样品,测定该样品中粗蛋白、粗纤维、粗脂肪和水分含量并做 T 检验,应无显著差异。

(二)定标 NIR 的准确性在一定程度上取决于定标工作,定标的总则和程

序参见近红外光谱仪操作说明。

(1)定标模型的选择。定标模型的选择原则为定标样品的 NIR 光谱能代表被测定样品的 NIR 光谱。操作上是比较它们光谱间的  $H$  值,如果待测样品  $H$  值  $\leq 0.6$ ,则可选用该定标模型;如果待测样品  $H$  值  $> 0.6$ ,则不能选用该定标模型;如果没有现有的定标模型,则需要对现有模型进行升级。

(2)标模型的升级。定标模型升级的目的是为了使该模型在 NIR 光谱上能适应于待测样品。操作上是选择 25~45 个当地样品,扫描其 NIR 光谱,并用经典方法测定水分、粗蛋白、粗纤维、粗脂肪或赖氨酸和蛋氨酸含量,然后将这些样品加入到定标样品中,用原有的定标方法进行计算,即获得升级的定标模型。

(三)对未知样品进行测定 根据待测样品 NIR 光谱选用对应的定标模型,对样品进行扫描,然后进行待测样品 NIR 光谱与定标样品间的比较。如果待测样品  $H$  值  $\leq 0.6$ ,则仪器将直接给出样品的测定结果,如果待测样品  $H$  值  $> 0.6$ ,则说明该样品已超出了该定标模型的分析能力,对于该定标模型,该样品被称为异常样品。

(1)异常样品的分类。异常样品可分为“好”、“坏”两类。“好”的异常样品加入定标模型后可增加该模型的分析能力,而“坏”的异常样品加入定标模型后降低模型的准确度。甄别样品的标准有二:一是  $H$  值,好的异常样品  $0.6 < H \leq 5$ ,通常“坏”的异常样品  $H > 5$ ;二是  $SEC$ ,通常好的异常样品加入定标模型后, $SEC$  不会显著增加,而坏的异常样品加入定标模型后, $SEC$  将显著增加。

(2)异常样品的处理。NIR 分析中发现异常样品后,要用经典方法对该样品进行分析,同时对该异常样品类型进行确定。属于好的异常样品则保留,并加入到定标模型中,对定标模型进行升级;属于坏的样品则放弃。

#### 四、注意事项

漫反射分析检测器所检测到的信号是分析光与样品间经过多次反射、折射、衍射及吸收后返回样品表面的光。光与样品作用,在反射、折射、衍射等方面的差异都将影响漫反射系数,而这些差异又源于样品的粒径大小及分布和外观形态等方面的差异。另外,样品基体的变化对漫反射光的强度也有很大影响。其中,样品的粒径大小和均匀度对光漫反射强度影响很大。因此,要求待测样品的粒径大小、均匀度和基体与用于定标样品尽可能相同。

## 12.5 NIR 分析的特点及在饲料工业中的应用

### 12.5.1 近红外光谱的特点

#### 12.5.1.1 近红外光谱分析的优点

- (1)各种不同物态的样品不需处理可直接测量,且不消耗样品。
- (2)谱带较弱,故测量光程较长,光程的精确度要求不高。
- (3)所用光学材料便宜,一般石英或玻璃即可满足要求,并可用较强的辐射源,使信号的强度增加,提高信噪比。
- (4)近红外光的散射效应较强,可以做固体、半固体、液体的漫反射或散射分析。
- (5)近红外短波区域由于吸光系数非常小,在固体样品中的穿透深度可达几厘米,因而可以用透射模式直接分析固体样品。
- (6)适用于近红外的光导纤维易得,利用光纤可实现在线分析或遥测,极适于生产过程控制和恶劣环境下的样品分析。
- (7)分析速度快。
- (8)除了含有氢原子的化学键外,其他基团的振动频率均不在近红外区域产生吸收,减少了干扰。有可能在其他基团组成的物质中检测极微量的含氢基团的物质,如谷物中微量水的分析。
- (9)从一个光谱可以获得样品的多方面信息。
- (10)仪器的构造比较简单,易于维护。

由于近红外光谱的以上特点,与传统方法相比,在测量精度上有很大改善;与标准实验方法相比,NIR 提供数据的速度快;其应用一般会使实验成本降低,提高分析效率,并取得可观的经济效益。

#### 12.5.1.2 近红外光谱分析的缺点

近红外分析也有其固有的缺点,主要表现在以下几点:

- (1)由于测定的是倍频及合频吸收,灵敏度差,特别在近红外短波区域,需要较长的光程。对微量组分的分析仍较困难。
- (2)红外光谱分析不是一个直接测定方法,而是将未知样品测得的光谱通过定标模型来预测其组成或性质。因此定标模型的适用范围、基础数据的准确性及选择计量学方法的合理性,都将直接影响最终的分析结果。



### 12.5.2 近红外光谱技术在饲料工业中的应用

由于现代近红外光谱分析所独具的特点,加之仪器的制造水平,光谱化学计量学软件的开发及各种测样附件的研制均已达到较高的水平,自20世纪80年代中后期以来,近红外光谱已由传统的农副产品分析扩展到众多的其他领域。目前应用的领域已包括农产品与食品、石油化工产品、生命科学与医药、聚合物合成与加工、化学品分析、纺织品行业、轻工行业、环境等。在饲料工业中,目前近红外光谱技术不仅能测定饲料中的常规成分,如水分、粗蛋白、粗纤维、粗脂肪,而且能测定饲料中的微量成分,如氨基酸、维生素、有毒有害物质(棉酚、植酸)等,还可进行饲料营养价值评定,如消化能、代谢能、可利用氨基酸、有机物消化率等,也可用于在线品质控制,此外,在饲料原料的真伪鉴别方面也存在很大潜力。

#### 思考题

1. 近红外的光谱区段。
2. 简述采用近红外光谱进行定量测定的原理。
3. 简述近红外光谱定标的过程和注意事项。
4. 简述近红外光谱分析技术的特点。

## 附录一

国际相对原子质量表

元素	符号	相对原子质量	元素	符号	相对原子质量	元素	符号	相对原子质量
银	Ag	107.868	汞	Hg	200.59	铑	Rh	102.1055
铝	Al	26.98154	铊	Tl	164.9304	钌	Ru	101.07
氩	Ar	39.948	碘	I	126.9045	硫	S	32.06
砷	As	74.9216	铟	In	114.82	锑	Sb	121.75
金	Au	196.9665	铯	Kr	192.22	钪	Sc	44.9559
硼	B	10.81	钾	K	89.0983	硒	Se	78.96
钡	Ba	9.01218	氪	Kr	83.80	硅	Si	28.0855
铍	Be	9.01218	镧	La	138.9055	钐	Sm	150.4
铋	Bi	208.9804	锂	Li	6.941	锡	Sn	118.69
溴	Br	79.904	镱	Lu	174.97	锶	Sr	87.62
碳	C	12.011	镁	Mg	24.305	钽	Ta	180.9479
钙	Ca	40.08	锰	Mn	54.9380	铽	Tb	158.9254
镉	Cd	112.41	钼	Mo	95.94	碲	Te	127.60
铈	Ce	140.12	氮	N	14.0067	钍	Th	232.0381
氯	Cl	35.453	钠	Na	22.98977	钛	Ti	47.90
钴	Co	58.9332	铌	Nb	92.9064	铊	Tl	204.37
铬	Cr	51.996	钕	Nd	144.24	铥	Tm	168.9342
铯	Cs	132.9054	氖	Ne	20.179	铀	U	238.029
铜	Cu	63.546	镍	Ni	58.70	钒	V	50.91414
镅	Am	162.50	铈	Np	237.0482	钨	W	183.85
铒	Er	167.26	氧	O	15.9994	氙	Xe	131.30
铕	Eu	151.96	铱	Os	190.2	钇	Y	88.9059
氟	F	18.998403	磷	P	30.97376	镱	Yb	173.04
铁	Fe	55.847	铋	Pb	207.2	锌	Zn	65.38
镓	Ga	69.72	钯	Pd	106.4	锆	Zr	91.22
钆	Gd	157.25	镨	Pr	140.9077			
锗	Ge	72.59	铂	Pt	195.09			
氢	H	1.0079	镭	Ra	226.0234			
氦	He	4.00260	铷	Rb	85.4678			
铪	Hf	178.49	铼	Re	186.207			

## 附录二

常用酸碱指示剂

指 示 剂	$pK_a$	变色范围 pH	酸色	碱色	配制方法
百里酚蓝 (麝香草酚蓝)	1.65	1.2~2.8	红	黄	$1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 20%乙醇溶液
甲基橙	3.4	3.1~4.4	红	橙黄	$0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液
溴甲酚绿	4.9	3.8~5.4	黄	蓝	$1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 20%乙醇溶液 或 $0.1\text{ g}$ 指示剂溶于 $2.9\text{ mL}$ $0.05\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液,加水稀释至 $100\text{ mL}$
甲基红	5.0	4.4~6.2	红	黄	$1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 60%乙醇溶液
溴百里酚蓝 (麝香草酚蓝)	7.3	6.2~7.3	黄	蓝	$1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 20%乙醇溶液
中性红	7.4	6.8~8.0	红	黄橙	$1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 60%乙醇溶液
百里酚蓝 (第二变色范围)	9.2	8.0~9.6	黄	蓝	$1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 20%乙醇溶液
酚酞	9.4	8.0~10.0	无色	红	$5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 90%乙醇溶液
百里酚蓝	10.0	9.4~10.6	无色	蓝	$1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 90%乙醇溶液

## 附录三

混合酸碱指示剂

指示剂组成 (体积比)	变色点 pH	酸色	碱色	备 注
1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基橙水溶液 1 份 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 靛蓝二磺酸钠水溶液	4.1	紫	绿	灯光下可滴定
1 份 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基橙水溶液 1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴甲酚绿钠盐水溶液	4.3	橙	蓝紫	pH 3.5 黄色 pH 4.05 绿黄 pH 4.3 浅绿
3 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴甲酚绿 20% 乙醇溶液 1 份 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基红 60% 乙醇溶液	5.1	酒红	绿	颜色变化明显
1 份 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基红乙醇溶液 1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 次甲基蓝乙醇溶液	5.4	红紫	绿	pH 5.2 红紫 pH 5.4 暗蓝 pH 5.6 绿色
1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴甲酚钠盐水溶液 1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯酚红钠盐水溶液	6.1	黄绿	蓝紫	pH 5.6 蓝绿 pH 5.8 蓝色 pH 6.0 浅紫 pH 6.2 蓝紫
1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴甲紫钠盐水溶液 1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴百里酚蓝盐水溶液	6.7	黄	紫蓝	pH 6.2 黄紫 pH 6.6 紫色 pH 6.8 蓝紫
1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 中性红乙醇溶液 1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 次甲基蓝乙醇溶液	7.0	蓝紫	紫蓝	pH 7.0 为蓝紫时必须保存在棕色瓶中
1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酚红钠盐水溶液 3 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 百里酚蓝钠盐水溶液	8.3	黄	绿	pH 8.2 玫瑰色 pH 8.4 紫色
1 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 百里酚蓝 50% 乙醇溶液 3 份 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酚酞 50% 水溶液	9.0	黄	紫	pH 9.0 绿色

## 附录四

## 普通酸碱溶液的配制

名 称 (分子式)	密度 ( $\rho$ )	质量分数 ( $w$ )	近似浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	欲配溶液的浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
				6	3	2	1
				配制 1 L 溶液所需的 mL 数(或 g 数)			
盐酸 (HCl)	1.18~1.19	36~38	12	500	250	167	83
硝酸 (HNO <sub>3</sub> )	1.39~1.40	65~68	15	381	191	128	64
硫酸 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1.83~1.84	95~98	18	84	42	28	14
冰醋酸 (HAc)	1.05	99.9	17	358	177	118	59
磷酸 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	1.69	85	15	39	19	12	6
氨水 (NH <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O)	0.90~0.91	28	15	400	200	134	77
氢氧化钠 (NaOH)				(240)	(120)	(80)	(40)
氢氧化钾 (KOH)				(339)	(170)	(113)	(56.5)

## 附录五

容量分析基准物质的干燥条件

基准物质	干燥温度和时间	基准物质	干燥温度和时间
碳酸钠 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	270~300 ℃, 40~50 min	氯化物 ( $\text{NaCl}$ )	500~650 ℃, 干燥 40~50 min
草酸钠 ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ )	130 ℃ 1~1.5 h	硝酸银 ( $\text{AgNO}_3$ )	室温,硫酸干燥器中至 恒重
草酸 ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	室温,空气 干燥 2 h	碳酸钙 ( $\text{CaCO}_3$ )	120 ℃,干燥至恒重
四硼酸钠 ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )	室温,在 $\text{NaCl}$ 和蔗糖饱和 液的干燥器中,4 h	氧化锌 ( $\text{ZnO}$ )	800 ℃灼烧至恒重
邻苯二酸氢钾 ( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ )	100~120 ℃,干燥至恒重	锌 ( $\text{Zn}$ )	室温,干燥器 24 h 以上
重铬酸钾 ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )	100~110 ℃,干燥 3~4 h	氧化镁 ( $\text{MgO}$ )	800 ℃灼烧至恒重

## 附录六

筛号与筛孔直径对照表

筛号	孔径	网线直径/mm	筛号	孔径/mm	网线直径/mm
3.5	5.66	1.448	35	0.50	0.290
4	4.76	1.270	40	0.42	0.249
5	4.00	1.117	45	0.35	0.221
6	3.36	1.016	50	0.297	0.188
8	2.38	0.841	60	0.250	0.163
10	2.00	0.759	70	0.210	0.140
12	1.68	0.691	80	0.171	0.119
14	1.41	0.610	100	0.149	0.102
16	1.19	0.541	120	0.125	0.086
18	1.10	0.480	140	0.105	0.074
20	0.84	0.419	170	0.088	0.063
25	0.71	0.371	200	0.074	0.053
30	0.59	0.330	230	0.062	0.046

## 附录七

## 缓冲溶液的配制

## 1. 氯化钾-盐酸缓冲溶液

0.2 mol · L <sup>-1</sup> KCl/mL	50	50	50	50	50	50	50
0.2 mol · L <sup>-1</sup> HCl/mL	97.0	64.3	41.5	26.3	16.6	10.6	6.7
水/mL	53.0	85.5	108.5	123.7	133.4	139.4	143.3
pH (20 ℃)	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2

## 2. 邻苯二氢钾-氢氧化钾缓冲溶液

0.2 mol · L <sup>-1</sup> KHC <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> /mL	50	50	50	50	50
0.2 mol · L <sup>-1</sup> HCl/mL	46.70	32.95	20.32	9.90	2.63
水/mL	103.30	117.05	129.68	140.10	147.37
pH (20 ℃)	2.2	2.6	3.0	3.4	3.8

## 3. 邻苯二氢钾-氢氧化钾缓冲溶液

0.2 mol · L <sup>-1</sup> KHC <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> /mL	50	50	50	50	50
0.2 mol · L <sup>-1</sup> NaOH/mL	0.40	7.50	17.70	29.95	39.85
水/mL	149.60	142.50	132.20	120.05	110.15
pH (20 ℃)	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6

## 4. 乙酸-乙酸钠缓冲溶液

0.2 mol · L <sup>-1</sup> HAc/mL	185	164	126	80	42	19
0.2 mol · L <sup>-1</sup> NaAc/mL	15	36	74	120	158	181
pH (20 ℃)	3.6	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6

## 5. 磷酸二氢钾-氢氧化钾缓冲溶液

0.2 mol · L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /mL	50	50	50	50	50	50
0.2 mol · L <sup>-1</sup> NaOH/mL	3.72	8.60	17.80	29.63	39.50	45.20
水/mL	146.26	141.20	132.20	120.37	110.50	104.80
pH (20 ℃)	5.8	6.2	6.6	7.0	7.4	7.8



## 6. 硼砂-氢氧化钠缓冲溶液

$0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂/mL	90	80	70	60	50	40
$0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH/mL	10	20	30	40	50	60
pH (20 °C)	9.35	9.48	9.66	9.94	11.04	12.32

## 7. 氢氧化氨缓冲溶液

$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ /mL	1	1	1	1	1	1
$\text{NH}_4\text{Cl}$ $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ /mL	32	8	2	1	1	1
pH (20 °C)	8.0	8.58	9.1	9.8	10.4	11.0

## 8. 常用缓冲溶液的配制

pH	配 制 方 法
3.6	NaAc $\cdot$ $3\text{H}_2\text{O}$ 8 g, 溶于适量水中, 加 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc 134 mL, 稀释至 500 mL
4.0	NaAc $\cdot$ $3\text{H}_2\text{O}$ 20 g, 溶于适量水中, 加 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc 134 mL, 稀释至 500 mL
4.5	NaAc $\cdot$ $3\text{H}_2\text{O}$ 32 g, 溶于适量水中, 加 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc 68 mL, 稀释至 500 mL
5.0	NaAc $\cdot$ $3\text{H}_2\text{O}$ 50 g, 溶于适量水中, 加 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HAc 34 mL, 稀释至 500 mL
8.0	$\text{NH}_4\text{Cl}$ 50 g, 溶于适量水中, 加 $15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.5 mL, 稀释至 500 mL
8.5	$\text{NH}_4\text{Cl}$ 40 g, 溶于适量水中, 加 $15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 8.8 mL, 稀释至 500 mL
9.0	$\text{NH}_4\text{Cl}$ 35 g, 溶于适量水中, 加 $15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 24 mL, 稀释至 500 mL
9.5	$\text{NH}_4\text{Cl}$ 30 g, 溶于适量水中, 加 $15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 65 mL, 稀释至 500 mL
10	$\text{NH}_4\text{Cl}$ 27 g, 溶于适量水中, 加 $15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 197 mL, 稀释至 500 mL

## 附录八

中华人民共和国国家标准 UDC 543.06:54-41

## 化学试剂

GB 601-88

## 滴定分析(容量分析)用标准溶液的制备

## 1 主题内容与适用范围

本标准规定了滴定分析(容量分析)用标准溶液的配制和标定方法。

本标准适用于制备准确浓度之溶液,应用于滴定法测定化学试剂的纯度及杂质含量,也可供其他的化工产品标准选用。

## 2 引用标准

GB 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备。

GB 6682 实验室用水规格。

GB 9725 化学试剂 电位滴定法通则。

## 3 一般规定

3.1 本标准中所用水,在没有注明其他要求时,应符合 GB 6682 中三级水的规格。

3.2 本标准中所用试剂的纯度都在分析纯以上。

3.3 工作中所用分析天平的砝码、滴定管、容量瓶及移液管均需定期校正。

3.4 本标准中标定时所用的基准试剂为容量分析工作基准试剂;制备标准溶液时所用的试剂为分析纯以上试剂。

3.5 本标准中所制备的标准溶液的浓度均指 20℃时的浓度。在标定和使用时,如温度有差异,应按附录 A(补充件)补正。

3.6 “标定”或“比较”标准溶液浓度时,平行试验不得少于 8 次,两人各作 4 个平行,每人 4 个平行测定结果的极差与平均值之比不得大于 0.1%。两人测定结果平均值之差不得大于 0.1%,结果取平均值。浓度值取 4 位有效数字。

3.7 本标准中凡规定用“标定”和“比较”两种方法测定浓度时,不得略去其中任何一种,且两种方法测得的浓度值之差不得大于 0.2%,以标定结果为准。

3.8 制备的标准溶液浓度与规定浓度相对误差不得大于 5%

3.9 配制浓度等于或低于  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  标准溶液时,应于临用前将浓度高的标准溶液用煮沸并冷却的水稀释,必要时重新标定。

3.10 碘量法反应时,溶液的温度不能过高,一般在 15~20 ℃ 之间进行滴定。

3.11 滴定分析(容量分析)用标准溶液在室温(15~25 ℃)下,保存时间一般不得超过 2 个月。

#### 4 标准溶液的配制与标定

##### 4.1 氢氧化钠标准溶液

$$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(\text{NaOH}) = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(\text{NaOH}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.1.1 配制

称取 100 g 氢氧化钠,溶于 100 mL 水中,摇匀,注入聚乙烯容器中,密闭放置至溶液清亮。用塑料管虹吸下述规定体积的上层清液,注入 1 000 mL 无二氧化碳的水中,摇匀。

$c(\text{NaOH})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	氢氧化钠饱和溶液/mL
1	52
0.5	26
0.1	5

##### 4.1.2 标定

##### 4.1.2.1 测定方法

称取下述规定量的于 105~110 ℃ 烘至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾,称准至 0.000 1 g,溶于下述规定体积的无二氧化碳的水中,加 2 滴酚酞指示液(10 g · L<sup>-1</sup>),用配制好的氢氧化钠溶液滴定至溶液呈粉红色,同时做空白试验。

$c(\text{NaOH})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	基准邻苯二甲酸氢钾/g	无二氧化碳的水/mL
1	6	80
0.5	3	80
0.1	0.6	50

##### 4.1.2.2 计算

氢氧化钠标准溶液浓度按式(1)计算:

$$c(\text{NaOH}) = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.2042} \quad (1)$$

式中: $c(\text{NaOH})$ 为氢氧化钠标准溶液之物质的量浓度, mol · L<sup>-1</sup>;  $m$  为邻苯二甲

酸氢钾之质量, g;  $V_1$  为氢氧化钠溶液之用量, mL;  $V_2$  为空白试验氢氧化钠溶液之用量, mL; 0.204 2 为与 1.00 mL 氢氧化钠标准溶液 [ $c(\text{NaOH}) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的苯二甲酸氢钾的质量。

#### 4.1.3 比较

##### 4.1.3.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 下述规定浓度的盐酸标准溶液, 加 50 mL 无二氧化碳的水及 2 滴酚酞指示液 ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用配制好的氢氧化钠溶液滴定, 近终点时加热至于  $80^\circ\text{C}$ , 继续滴定至溶液呈粉红色。

$c(\text{NaOH})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c(\text{HCl})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	1
0.5	0.5
0.1	0.1

##### 4.1.3.2 计算

氢氧化钠标准溶液浓度按式(2)计算:

$$c(\text{NaOH}) = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (2)$$

式中:  $c(\text{NaOH})$  为氢氧化钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为盐酸标准溶液之用量, mL;  $c_1$  为盐酸标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为氢氧化钠溶液之用量, mL。

#### 4.2 盐酸标准溶液

$$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(\text{HCl}) = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.2.1 配制

量取下述规定体积的盐酸, 注入 1 000 mL 水中, 摇匀。

$c(\text{HCl})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	盐酸/mL
1	90
0.5	45
0.1	9

## 4.2.2 标定

## 4.2.2.1 测定方法

称取下述规定量的于 270~300 °C 灼烧至恒重的基准无水碳酸钠,称准至 0.000 1 g。溶于 50 mL 水中,加 10 滴溴甲酚绿-甲基红混合指示液,用配制好的盐酸溶液滴定至溶液由绿色变为暗红色,煮沸 2 min,冷却后继续滴定至溶液呈暗红色。同时做空白试验。

$c(\text{NaOH})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	基准无水碳酸钠/g
1	1.6
0.5	0.8
0.1	0.2

## 4.2.2.2 计算

盐酸标准溶液浓度按式(3)计算:

$$c(\text{HCl}) = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.05299} \quad (3)$$

式中: $c(\text{HCl})$ 为盐酸标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$ 为无水碳酸钠之质量,g;  $V_1$ 为盐酸溶液之用量,mL;  $V_2$ 为空白试验盐酸溶液之用量,mL; 0.05299 为与 1.00 mL 盐酸标准溶液 [ $c(\text{HCl}) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的无水碳酸钠的质量。

## 4.2.3 比较

## 4.2.3.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 下述配制好的盐酸溶液,加 50 mL 无二氧化碳的水及 2 滴酚酞指示液 ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),用下述规定浓度的氢氧化钠标准溶液滴定,近终点时加热至 80 °C,继续滴定至溶液呈粉红色。

$c(\text{HCl})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c(\text{NaOH})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	1
0.5	0.5
0.1	0.1

## 4.2.3.2 计算

盐酸标准溶液浓度按式(4)计算:

$$c(\text{HCl}) = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (4)$$

式中:  $c(\text{HCl})$  为盐酸标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为氢氧化钠标准溶液之用量  $\text{mL}$ ;  $c_1$  为氢氧化钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为盐酸溶液之用量,  $\text{mL}$ 。

#### 4.3 硫酸标准溶液

$$c(1/2\text{H}_2\text{SO}_4) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(1/2\text{H}_2\text{SO}_4) = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(1/2\text{H}_2\text{SO}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.3.1 配制

量取下述规定体积的硫酸, 缓缓注入 1 000 mL 水中, 冷却, 摇匀。

$c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	硫酸/ $\text{mL}$
1	30
0.5	15
0.1	3

##### 4.3.2 标定

###### 4.3.2.1 测定方法

称取下述规定量的 270~300 °C 灼烧至恒重的基准无水碳酸钠, 称准至 0.000 1 g。溶于 50 mL 水中, 加 10 滴溴甲酚绿-甲基红混合指示液, 用配制好的硫酸溶液滴定至溶液由绿色变为暗红色, 煮沸 2 min, 冷却后继续滴定至溶液再呈暗红色。同时做空白试验。

$c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	基准无水碳酸钠/g
1	1.6
0.5	0.8
0.1	0.2

###### 4.3.2.2 计算

硫酸标准溶液浓度按式(5)计算:

$$c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4) = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.05299} \quad (5)$$

式中:  $c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4)$  为硫酸标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为无水碳酸钠之质量, g;  $V_1$  为硫酸溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为空白试验硫酸溶液之用量,  $\text{mL}$ ; 0.052 99 为与 1.00 mL 硫酸标准溶液 [ $c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4) = 1.000 \text{ mol} \cdot$

$\text{L}^{-1}$ ]相当的以克表示的无水碳酸钠的质量。

#### 4.3.3 比较

##### 4.3.3.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 下述配制好的硫酸溶液,加 50 mL 无二氧化碳的水及 2 滴酚酞指示液( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),用下述规定浓度的氢氧化钠标准溶液滴定,近终点时加热至  $80^\circ\text{C}$ ,继续滴定溶液呈粉红色。

$c(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c(\text{NaOH})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	1
0.5	0.5
0.1	0.1

##### 4.3.3.2 计算

硫酸标准溶液浓度按式(6)计算

$$c(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4) = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (6)$$

式中: $c(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4)$ 为硫酸标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为氢氧化钠标准溶液之用量,mL; $c_1$ 为氢氧化钠标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$ 为硫酸溶液之用量,mL。

#### 4.4 碳酸钠标准溶液

$$c(1/2 \text{ Na}_2\text{CO}_3) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(1/2 \text{ Na}_2\text{CO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.4.1 配制

称取下述规定量的无水碳酸钠,溶于 1 000 mL 水中,摇匀。

$c(1/2 \text{ Na}_2\text{CO}_3)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	无水碳酸钠/g
1	53
0.1	5.3

##### 4.4.2 标定

##### 4.4.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 下述配制好的碳酸钠溶液,加下述规定量的水,加 10 滴溴甲酚绿-甲基红混合指示液,用下述规定浓度的盐酸标准溶液滴定至溶液由绿色变为暗红色,煮沸 2 min,冷却后继续滴定至溶液再呈红色。

$c(1/2 \text{Na}_2\text{CO}_3)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	水/mL	$c(\text{HCl})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	50	1
0.1	20	0.1

#### 4.4.2.2 计算

碳酸钠标准溶液浓度按式(7)计算:

$$c(1/2 \text{Na}_2\text{CO}_3) = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (7)$$

式中: $c(1/2 \text{Na}_2\text{CO}_3)$ 为碳酸钠标准之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为盐酸标准溶液之用量,mL; $c_1$ 为盐酸标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$ 为碳酸钠溶液之用量,mL。

#### 4.5 重铬酸钾标准溶液

$$c(1/6 \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.5.1 配制

称取 5 g 重铬酸钾,溶于 1 000 mL 水中,摇匀。

##### 4.5.2 标定

##### 4.5.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的重铬酸钾溶液 [ $c(1/6 \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ],置于碘量瓶中,加 2 g 碘化钾及 20 mL 硫酸溶液(20%),摇匀,于暗处放置 10 min。加 150 mL 水中,用硫代硫酸钠标准溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]滴定,近终点时加 3 mL 淀粉指示液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),继续滴定至溶液由蓝色变为亮绿色。同时做空白试验。

##### 4.5.2.2 计算

重铬酸钾标准溶液浓度按式(8)计算:

$$c(1/6 \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (8)$$

式中: $c(1/6 \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)$ 为重铬酸钾标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为硫代硫酸钠标准溶液之用量,mL;  $V_2$ 为空白试验硫代硫酸钠标准溶液之用量,mL;  $c_1$ 为硫代硫酸钠标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$ 为重铬酸钾溶液之用量,mL。



#### 4.6 硫代硫酸钠标准溶液

$$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$$

##### 4.6.1 配制

称取 26 g 硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )(或 16 g 无水硫代硫酸钠),溶于 1 000 mL 水中,缓缓煮沸 10 min,冷却。放置 2 周后过滤备用。

##### 4.6.2 标定

###### 4.6.2.1 测定方法

称取 0.15 g 于 120 °C 烘至恒重的基准重铬酸钾,称准至 0.000 1 g,置于碘瓶中,溶于 25 mL 水,加 2 g 碘化钾及 20 mL 硫酸溶液(20%),摇匀,于暗处放置 10 min。加 150 mL 水,用配制好的硫代硫酸钠溶液[ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]滴定。近终点时加 3 mL 淀粉指示液( $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),继续滴定至溶液由蓝色变为亮绿色。同时做空白试验。

###### 4.6.2.2 计算

硫代硫酸钠标准溶液浓度按式(9)计算:

$$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=\frac{m}{(V_1-V_2)\times 0.049\ 03}\quad (9)$$

式中: $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$ 为硫代硫酸钠标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $m$ 为重铬酸钾之质量,g;  $V_1$ 为硫代硫酸钠溶液之用量,mL;  $V_2$ 为空白试验硫代硫酸钠溶液之用量,mL; 0.049 03 为与 1.00 mL 硫代硫酸钠标准溶液[ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=1.000\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]相当的以克表示的重铬酸钾的质量。

##### 4.6.3 比较

###### 4.6.3.1 测定方法

准确量取 30.00~35.00 mL 碘标准溶液[ $c(1/2\text{ I}_2)=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ],置于碘量瓶中,加 150 mL 水,用配制好的硫代硫酸钠溶液[ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]滴定,近终点时加 3 mL 淀粉指示液( $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),继续滴定至溶液蓝色消失。

同时作水所消耗碘的空白试验:取 250 mL 水,加 0.05 mL 碘标准溶液[ $c(1/2\text{ I}_2)=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]及 3 mL 淀粉指示液( $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),用配制好的硫代硫酸钠溶液[ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]滴定至溶液蓝色消失。

###### 4.6.3.2 计算

硫代硫酸钠标准溶液浓度按式(10)计算:

$$c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = \frac{(V_1 - 0.05) \cdot c_1}{V - V_2} \quad (10)$$

式中:  $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$  为硫代硫酸钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为碘标准溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $c_1$  为碘标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为硫代硫酸钠溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为空白试验硫代硫酸钠溶液之用量,  $\text{mL}$ ; 0.05 为空白试验中加入碘标准溶液之用量,  $\text{mL}$ 。

#### 4.7 溴标准溶液

$$c(1/6 \text{ KBrO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.7.1 配制

称取 3 g 溴酸钾及 25 g 溴化钾, 溶于 1 000 mL 水中, 摇匀。

##### 4.7.2 标定

###### 4.7.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的溴溶液 [ $c(1/6 \text{ KBrO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 置于碘量瓶中, 加 2 g 碘化钾及 5 mL 盐酸溶液(20%), 摇匀。于暗处放置 5 min。加 150 mL 水, 用硫代硫酸钠标准溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定, 近终点时加 3 mL 淀粉指示液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续滴定至溶液蓝色消失。同时做空白试验。

###### 4.7.2.2 计算

溴标准溶液浓度按式(11)计算:

$$c(1/6 \text{ KBrO}_3) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (11)$$

式中:  $c(1/6 \text{ KBrO}_3)$  为溴标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为硫代硫酸钠标准溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为空白试验硫代硫酸钠标准溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $c_1$  为硫代硫酸钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为溴溶液之用量,  $\text{mL}$ 。

#### 4.8 溴酸钾标准溶液

$$c(1/6 \text{ KBrO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.8.1 配制

称取 3 g 溴酸钾, 溶于 1 000 mL 水中, 摇匀。

##### 4.8.2 标定

###### 4.8.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的溴酸钾溶液 [ $c(1/6 \text{ KBrO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot$

$\text{L}^{-1}$ ], 置于碘量瓶中, 加 2 g 碘化钾及 5 mL 盐酸溶液 (20%) 摇匀, 于暗处放置 5 min。加 150 mL, 用硫代硫酸钠标准溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定, 近终点时加 3 mL 淀粉指示液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续滴定至溶液蓝色消失。同时做空白试验。

#### 4.8.2.2 计算

溴酸钾标准溶液浓度按式(12)计算:

$$c(1/6 \text{ KBrO}_3) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (12)$$

式中:  $c(1/6 \text{ KBrO}_3)$  为溴酸钾标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为硫代硫酸钠标准溶液之用量, mL;  $V_2$  为空白试验硫代硫酸钠标准溶液之用量, mL;  $c_1$  为硫代硫酸钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为溴酸钾溶液之用量, mL。

#### 4.9 碘标准溶液

$$c(1/2 \text{ I}_2) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.9.1 配制

称取 13 g 碘及 35 g 碘化钾, 溶于 100 mL 水中, 稀释至 1 000 mL, 摇匀, 保存于棕色具塞瓶中。

##### 4.9.2 标定

##### 4.9.2.1 测定方法

称取 0.15 g 预先在硫酸干燥器中干燥至恒重的基准三氧化二砷, 称准至 0.000 1 g。置于碘量瓶中, 加 4 mL 氢氧化钠溶液 [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 溶液, 加 50 mL 水, 加 2 滴酚酞指示液 ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用硫酸溶液 [ $c(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 中和, 加 3 g 碳酸氢钠及 3 mL 淀粉指示液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用配制好碘溶液 [ $c(1/2 \text{ I}_2) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定至溶液呈浅蓝色。同时做空白试验。

##### 4.9.2.2 计算

碘标准溶液浓度按式(13)计算:

$$c(1/2 \text{ I}_2) = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.04946} \quad (13)$$

式中:  $c(1/2 \text{ I}_2)$  为碘标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为三氧化二砷质量, g;  $V_1$  为碘溶液之用量, mL;  $V_2$  为空白试验碘溶液之用量, mL; 0.049 46 为与 1.00 mL 碘标准溶液 [ $c(1/2 \text{ I}_2) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的

以克表示三氧化二砷的质量。

#### 4.9.3 比较

##### 4.9.3.1 测定方法

准确量取 30.00~35.00 mL 配制好的碘溶液 [ $c(1/2 I_2)=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 置于碘量瓶中, 加 150 mL 水中, 用硫代硫酸钠标准溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定, 近终点时加 3 mL 淀粉指示液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续滴定至溶液蓝色消失。

同时作水所消耗碘的空白试验: 取 250 mL 水, 加 0.05 mL 配制好的碘溶液 [ $c(1/2 I_2)=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 及 3 mL 淀粉指示液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用硫代硫酸钠标准溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定至溶液蓝色消失。

##### 4.9.3.2 计算

碘标准溶液浓度按(14)计算:

$$c(1/2 I_2) = \frac{(V - V_2) \cdot c_1}{V_1 - 0.05} \quad (14)$$

式中:  $c(1/2 I_2)$  为硫代硫酸钠之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为硫代硫酸钠标准溶液之用量, mL;  $V_2$  为空白试验硫代硫酸钠标准溶液之用量, mL;  $c_1$  为硫代硫酸标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为碘溶液之用量, mL。0.05 为空白试验中加入碘溶液之用量, mL。

#### 4.10 碘酸钾标准溶液

$$c(1/6 \text{ KIO}_3) = 0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(1/6 \text{ KIO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.10.1 配制

称取下述规定量的碘酸钾, 溶于 1 000 mL 水中, 摇匀。

$c(1/6 \text{ KIO}_3)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	碘酸钾/g
0.3	11
0.1	3.6

##### 4.10.2 标定

###### 4.10.2.1 测定方法

按下述规定体积量取配制好的碘酸钾溶液, 置于碘量瓶中, 加规定体积的水及规定量的碘化钾, 加 5 mL 盐酸溶液 (20%), 摇匀, 于暗处放置 5 min。加 150 mL 水, 用硫代硫酸钠标准溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定, 近终点时加

3 mL 淀粉指示液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),继续滴定至溶液蓝色消失。同时做空白试验。

$c(1/6 \text{ KIO}_3)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	碘酸钾/mL	水/mL	碘化钾/g
0.3	11.00~13.00	20	3
0.1	30.00~35.00	0	2

#### 4.10.2.2 计算

碘酸钾标准溶液浓度按式(15)计算:

$$c(1/6 \text{ KIO}_3) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (15)$$

式中: $c(1/6 \text{ KIO}_3)$ 为碘酸钾标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为硫代硫酸钠标准溶液之用量,mL;  $V_2$ 为空白试验硫代硫酸钠标准溶液之用量,mL;  $c_1$ 为硫代硫酸钠标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$ 为碘酸钾溶液之用量,mL。

#### 4.11 草酸标准溶液

$$c(1/2 \text{ C}_2\text{H}_2\text{O}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.11.1 配制

称取 6.4 g 草酸( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),溶于 1 000 mL 水中,摇匀。

##### 4.11.2 标定

##### 4.11.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的草酸溶液 [ $c(1/2 \text{ C}_2\text{H}_2\text{O}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ],加 100 mL 硫酸溶液(8+92),用高锰酸钾标准溶液 [ $c(1/5 \text{ KMnO}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]滴定,近终点时加热至  $65^\circ\text{C}$ ,继续滴定至溶液呈粉红色保持 30 s。同时做空白试验。

##### 4.11.2.2 计算

草酸标准溶液浓度按式(16)计算:

$$c(1/2 \text{ C}_2\text{H}_2\text{O}_4) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (16)$$

式中: $c(1/2 \text{ C}_2\text{H}_2\text{O}_4)$ 为草酸标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为高锰酸钾标准溶液之用量,mL;  $V_2$ 为空白试验高锰酸钾标准溶液之用量,mL;  $c_1$ 为高锰酸钾标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$ 为草酸溶液之用量,mL。

## 4.12 高锰酸钾标准溶液

$$c(1/5 \text{ KMnO}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

## 4.12.1 配制

称取 3.3 g 高锰酸钾,溶于 1 050 mL 水中,缓缓煮沸 15 min,冷却后置于暗处保存 2 周。玻璃坩过滤于干燥的棕色瓶中。

注:过滤高锰酸钾溶液所使用的 4 号玻璃滤坩预先应以同样的高锰酸钾溶液缓缓煮沸 5 min,收集瓶也要用此高锰酸钾溶液洗涤 2~3 次。

## 4.12.2.1 测定方法

称取 0.2 g 于 105~110 °C 烘至恒重的基准草酸钠,称准至 0.000 1 g。溶于 100 mL 硫酸溶液中,用配制好的高锰酸钾溶液 [ $c(1/5 \text{ KMnO}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定,近终点时加热至 65 °C,继续滴定至溶液呈粉红色保持 30 s。同时做空白试验。

## 4.12.2.2 计算

高锰酸钾标准溶液浓度按式(17)计算:

$$c(1/5 \text{ KMnO}_4) = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.067\ 00} \quad (17)$$

式中: $c(1/5 \text{ KMnO}_4)$  为高锰酸钾标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为草酸钠之质量, g;  $V_1$  为高锰酸钾溶液之用量, mL;  $V_2$  为空白试验高锰酸钾溶液之用量, mL; 0.067 00 为与 1.00 mL 高锰酸钾标准溶液 [ $c(1/5 \text{ KMnO}_4) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的草酸钠的质量。

## 4.12.3 比较

## 4.12.3.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的高锰酸钾溶液 [ $c(1/5 \text{ KMnO}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 置于碘量瓶,加 2 g 碘化钾及 20 mL 硫酸溶液(20%),摇匀,于暗处放置 5 min。加 150 mL 水,用硫代硫酸钠标准溶液 [ $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定,近终点时加 3 mL 淀粉指示液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),继续滴定至溶液蓝色消失。同时做空白试验。

## 4.12.3.2 计算

高锰酸钾标准溶液浓度按式(18)计算:

$$c(1/5 \text{ KMnO}_4) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (18)$$

式中: $c(1/5 \text{ KMnO}_4)$ 为高锰酸钾标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为硫代硫酸钠标准溶液之用量, mL;  $V_2$ 为空白试验硫代硫酸钠标准溶液之用量, mL;  $c_1$ 为硫代硫酸钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$ 为高锰酸钾溶液之用量, mL。

#### 4.13 硫酸亚铁铵溶液

$$c[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.13.1 配制

称取 40 g 硫酸亚铁铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 溶于 300 mL 硫酸溶液(20%)中,加 700 mL 水,摇匀。

##### 4.13.2 标定

###### 4.13.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的硫酸亚铁铵溶液 $\{c[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\}$ ,加 25 mL 无氧的水,用高锰酸钾标准溶液 $[c(1/5 \text{ KMnO}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ 滴定至溶液呈粉红色,保持 30 s。

###### 4.13.2.2 计算

硫酸亚铁铵标准溶液浓度按式(19)计算:

$$c[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (19)$$

式中: $c[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ 为硫酸亚铁标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$ 为高锰酸钾标准溶液之用量, mL;  $c_1$ 为高锰酸钾标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$ 为硫酸亚铁铵溶液之用量, mL。

注:本标准溶液使用前标定。

#### 4.14 硫酸铈(或硫酸铈铵)标准溶液

$$c[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2] = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.14.1 配制

称取 40 g 硫酸铈 $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ {或 67 g 硫酸铈铵 $[2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ },加 31 mL 水及 28 mL 硫酸,再加 300 mL 水,加热溶解,再加入 650 mL 水,摇匀。

##### 4.14.2 标定

###### 4.14.2.1 测定方法

称取 0.2 g 于 105~110 °C 烘至恒重的基准草酸钠,称准至 0.000 1 g。溶于

75 mL 水中,加 4 mL 硫酸溶液(20%)及 10 mL 盐酸,加热至 65~70 °C,用配制好的硫酸铈(或硫酸铈铵)溶液 $\{c[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\}$ 滴定至溶液呈浅黄色。加入 3 滴亚铁-邻菲罗啉指示液<sup>(1)</sup>使溶液变为橘红色,继续滴定至溶液呈浅蓝色。同时做空白试验。

注(1)亚铁-邻菲罗啉指示液的配制,称取 0.7 g 硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )置于小烧杯中,加 30 mL 硫酸溶液 $[c(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4)=0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ 溶解,再加入 1.5 g 邻菲罗啉振摇溶解后,用硫酸溶液 $[c(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4)=0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ 冲稀至 100 mL。

#### 4.14.2.2 计算

硫酸铈(或硫酸铈铵)标准溶液按式(20)计算:

$$c[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2] = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.06700} \quad (20)$$

式中: $c[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]$ 为硫酸铈标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为草酸钠质量,g; $V_1$  为硫酸铈溶液之用量,mL; $V_2$  为空白试验硫酸铈溶液之用量,mL;0.06700 为与 1.00 mL 硫酸铈标准溶液 $\{c[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\}$ 相当的以克表示草酸钠的质量。

#### 4.14.3 比较

##### 4.14.3.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的硫酸铈(或硫酸铈铵)溶液 $\{c[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\}$ 置于碘量瓶中,加 2 g 碘化钾及 20 mL 硫酸溶液(20%),摇匀,于暗处放置 5 min。加 150 mL 水,用硫代硫酸钠标准溶液 $[c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ 滴定近终点时加 3 mL 淀粉指示液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),继续滴定至溶液蓝色消失。同时做空白试验。

##### 4.14.3.2 计算

硫酸铈(或硫酸铈铵)标准溶液浓度按式(21)计算:

$$c[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2] = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (21)$$

式中: $c[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]$ 为硫酸铈标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为硫代硫酸钠标准溶液之用量,mL; $V_2$  为空白试验硫代硫酸钠标准溶液之用量,mL; $c_1$  为硫代硫酸钠标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为硫酸铈溶液用量,mL。



## 4.15 乙二胺四乙酸二钠标准溶液

$$c(\text{EDTA}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(\text{EDTA}) = 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(\text{EDTA}) = 0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

## 4.15.1 配制

称取下述规定量的乙二胺四乙酸二钠,加热溶于 1 000 mL 水中,冷却,摇匀。

$c(\text{EDTA})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	乙二胺四乙酸二钠/g
0.1	40
0.05	20
0.02	8

## 4.15.2 标定

## 4.15.2.1 测定方法

(1)乙二胺四乙酸二钠标准溶液 [ $c(\text{EDTA}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]:称到 0.25 g 于 800 °C 灼烧至恒重的基准氧化锌,称准至 0.000 1 g。用少量水湿润,加 2 mL 盐酸溶液(20%)使样品溶解,加 100 mL 水,用氨水溶液(10%)中和至 pH 7~8,加 10 mL 氨-氯化铵缓冲溶液甲(pH  $\approx$  10)及 5 滴铬黑 T 指示液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),用配制好的乙二胺四乙酸二钠溶液 [ $c(\text{EDTA}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]滴定至溶液由紫色变为纯蓝色。同时做空白试验。

(2)乙二胺四乙酸二钠标准溶液 [ $c(\text{EDTA}) = 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $c(\text{EDTA}) = 0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]:称取下述规定量的于 800 °C 灼烧至恒重的基准氧化锌,称准至 0.000 2 g。用少量水湿润,加盐酸溶液(20%)至样品溶解,移入 250 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀。到 30.00~35.00 mL,加入 700 mL 水,用氨水溶液(10%)中和至 pH 7~8,加 10 mL 氨-氯化铵缓冲溶液甲(pH = 10)及 5 滴铬黑 T 指示液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),用配制好的乙二胺四乙酸二钠溶液滴定至溶液由紫色变为纯蓝色。同时做空白试验。

$c(\text{EDTA})/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	基准氧化锌/g
0.05	1
0.02	0.4

## 4.15.2.2 计算

乙二胺四乙酸二钠标准溶液浓度按式(22)计算:

$$c(\text{EDTA}) = \frac{m}{(V_1 - V_2) \times 0.081\ 38} \quad (22)$$

式中:  $c(\text{EDTA})$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为氧化锌之质量,  $\text{g}$ ;  $V_1$  为乙二胺四乙酸二钠溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为空白试验乙二胺四乙酸二钠溶液之用量,  $\text{mL}$ ; 0.081 38 为与 1.00 mL 乙二胺四乙酸二钠标准溶液 [ $c(\text{EDTA}) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的氧化锌的质量。

#### 4.16 氯化锌标准溶液

$$c(\text{ZnCl}_2) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.16.1 配制

称取 14 g 氯化锌, 溶于 1 000 mL 盐酸溶液 [0.05%] 中, 摇匀。

##### 4.16.2 标定

###### 4.16.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的氯化锌溶液 [ $c(\text{ZnCl}_2) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 加入 70 mL 水及 10 mL 氨-氯化铵缓冲溶液 ( $\text{pH} \approx 10$ ), 加 5 滴络黑 T 指示液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用乙二胺四乙酸二钠标准溶液 [ $c(\text{EDTA}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定至溶液由紫色变为纯蓝色。同时做空白试验。

###### 4.16.2.2 计算

氯化锌标准溶液浓度按式(23)计算:

$$c(\text{ZnCl}_2) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (23)$$

式中:  $c(\text{ZnCl}_2)$  为氯化锌标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为空白试验乙二胺四乙酸二钠标准溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $c_1$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为氯化锌溶液之用量,  $\text{mL}$ 。

#### 4.17 氯化镁(或硫酸镁)标准溶液

$$c(\text{MgCl}_2) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.17.1 配制

氯化镁 ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) [或 25 g 硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )] 溶于 1 000 mL 盐酸 (0.5 : 999.5) ( $V : V$ ) 中, 放置 1 个月后, 用 3 号玻璃滤坩过滤, 摇匀。

## 4.17.2 标定

## 4.17.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的氯化镁溶液 [ $c(\text{MgCl}_2)=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 加 70 mL 水及 10 mL 氨-氯化铵缓冲溶液甲 ( $\text{pH}=10$ ), 加 5 滴铬黑 T 指示液 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用乙二胺四乙酸二钠标准溶液 [ $c(\text{EDTA})=0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定至溶液由紫色变为纯蓝色。同时做空白试验。

## 4.17.2.2 计算

氯化镁(或硫酸镁)标准溶液浓度按式(24)计算:

$$c(\text{MgCl}_2) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c_1}{V} \quad (24)$$

式中:  $c(\text{MgCl}_2)$  为氯化镁标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液之用量, mL;  $V_2$  为空白试验乙二胺四乙酸二钠标准溶液之用量, mL;  $c_1$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为氯化镁溶液之用量, mL。

## 4.18 硝酸铅标准溶液

$$c[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2] = 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

## 4.18.2 配制

称取 17 g 硝酸铅, 溶于 1 000 mL 硝酸溶液 (0.5 : 999.5) ( $V:V$ ) 中, 摇匀。

## 4.18.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的硝酸铅溶液 [ $c(\text{Pb}(\text{NO}_3)_2)=0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 加 3 mL 冰乙酸及 5 g 六次甲基四胺, 加 70 mL 水及 2 滴二甲酚橙指示液 ( $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用乙二胺四乙酸二钠标准溶液 [ $c(\text{EDTA})=0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定至溶液呈亮黄色。

## 4.18.2.2 计算

硝酸铅标准溶液浓度按式(25)计算:

$$c[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2] = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (25)$$

式中:  $c[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$  为硝酸铅标准溶液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液用量, mL;  $c_1$  为乙二胺四乙酸二钠标准溶液浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为硝酸铅溶液用量, mL。

## 4.19 氯化钠标准溶液

$$c(\text{NaCl}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

#### 4.19.1 配制

称取 5.9 g 氯化钠,溶于 1 000 mL 水中,摇匀。

#### 4.19.2 标定

##### 4.19.2.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的氯化钠溶液 [ $c(\text{NaCl}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 加 40 mL 水及 10 mL 淀粉溶液 ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用硝酸银标准溶液 [ $c(\text{AgNO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定。用 216 型银电极作指示电极, 用 217 型双盐桥饱和甘汞电极作参比电极。按 GB 9725 中二级微商法之规定确定终点。

##### 4.19.2.2 计算

氯化钠标准溶液浓度按式(26)计算:

$$c(\text{NaCl}) = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (26)$$

式中:  $c(\text{NaCl})$  为氯化钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为硝酸银标准溶液之用量, mL;  $c_1$  为硝酸银标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为氯化钠溶液之用量, mL。

#### 4.20 硫氰酸钠(或硫氰酸钾)标准溶液

$$c(\text{NaCNS}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

#### 4.20.1 配制

称取 8.2 g 硫氰酸钠(或 9.7 g 硫氰酸钾)溶于 1 000 mL 水中,摇匀。

#### 4.20.2 标定

##### 4.20.2.1 测定方法

称取 0.5 g 于硫酸干燥器中干燥至恒重的基准硝酸银,称准至 0.000 1 g 溶于 100 mL 水中,加 2 mL 硫酸铁铵指示液 ( $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及 10 mL 硝酸溶液 (25%), 在摇动下用配制好的硫氰酸钠(或硫氰酸钾)溶液 [ $c(\text{NaCNS}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定。终点前摇动溶液至完全清亮后,继续滴定至溶液所呈浅棕红色保持 30 s。

##### 4.20.2.2 计算

硫氰酸钠(或硫氰酸钾)标准溶液浓度按式(27)计算:

$$c(\text{NaCNS}) = \frac{m}{V \times 0.1699} \quad (27)$$

式中:  $c(\text{NaCNS})$  为硫氰酸钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为硝酸银质量,  $\text{g}$ ;  $V$  为硫氰酸钠溶液的用量,  $\text{mL}$ ; 0.169 9 为与 1.00 mL 硫氰酸钠标准溶液 [ $c(\text{NaCNS}) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的硝酸银的质量。

#### 4.20.3 比较

##### 4.20.3.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 硝酸银标准溶液 [ $c(\text{AgNO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 加 70 mL 水、1 mL 硫酸铁铵指示液 ( $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及 10 mL 硝酸溶液 (25%), 在摇动下用配制好的硫氰酸钠 (或硫氰酸钾) 溶液 [ $c(\text{NaCNS}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定。终点前摇动溶液至完全清亮后, 继续滴定至溶液所呈浅棕红色保持 30 s。

##### 4.20.3.2 计算

硫氰酸钠 (或硫氰酸钾) 标准溶液浓度按式 (28) 计算:

$$c(\text{NaCNS}) = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (28)$$

式中:  $c(\text{NaCNS})$  为硫氰酸钠标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为硝酸银标准溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $c_1$  为硝酸银标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为硫氰酸的溶液之用量,  $\text{mL}$ 。

#### 4.21 硝酸银标准溶液

$$c(\text{AgNO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.21.1 配制

称取 17.5 g 硝酸银, 溶于 1 000 mL 水中, 摇匀。溶液保存于棕色瓶中。

##### 4.21.2 标定

##### 4.21.2.1 测定方法

称取 0.2 g 于 500~600 °C 的烧至恒重的基准氯化钠, 称准至 0.000 1 g。溶于 70 mL 水中, 加 10 mL 淀粉溶液 ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 用配制好的硝酸银溶液 [ $c(\text{AgNO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定。用 216 型银电极作指示电极, 用 217 型双盐桥饱和甘汞电极作参比电极。按 GB 9725 中二级微商法之规定确定终点。

##### 4.21.2.2 计算

硝酸银标准溶液浓度按式 (29) 计算:

$$c(\text{AgNO}_3) = \frac{m}{V \times 0.05844} \quad (29)$$

式中:  $c(\text{AgNO}_3)$  为硝酸银标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$  为氯化钠质量,  $\text{g}$ ;  $V$  为硝酸银溶液的用量,  $\text{mL}$ ; 0.058 44 为与 1.00 mL 硝酸银标准溶液 [ $c(\text{AgNO}_3) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的氯化钠质量。

#### 4.21.3 比较

##### 4.21.3.1 测定方法

量取 30.00~35.00 mL 配制好的硝酸银溶液 [ $c(\text{AgNO}_3) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 加 40 mL 水、1 mL 硝酸, 用硫氰酸钾标准溶液 [ $c(\text{KCNS}) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] 滴定。用 216 型银电极作指示电极, 217 型双盐桥饱和甘汞电极作参比电极。按 GB 9725 中二级微商法之规定确定终点。

##### 4.21.3.2 计算

硝酸银标准溶液浓度按式(30)计算:

$$c(\text{AgNO}_3) = \frac{V_1 \cdot c_1}{V} \quad (30)$$

式中:  $c(\text{AgNO}_3)$  为硝酸银标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_1$  为硫氰酸钾标准溶液之用量,  $\text{mL}$ ;  $c_1$  为硫氰酸钾标准溶液之浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V$  为硝酸银溶液之用量,  $\text{mL}$ 。

#### 4.22 亚硝酸钠标准溶液

$$c(\text{NaNO}_2) = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$c(\text{NaNO}_2) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

##### 4.22.1 配制

称取下述规定量的亚硝酸钠、氢氧化钠及无水碳酸钠, 溶于 1 000 mL 水中, 摇匀。

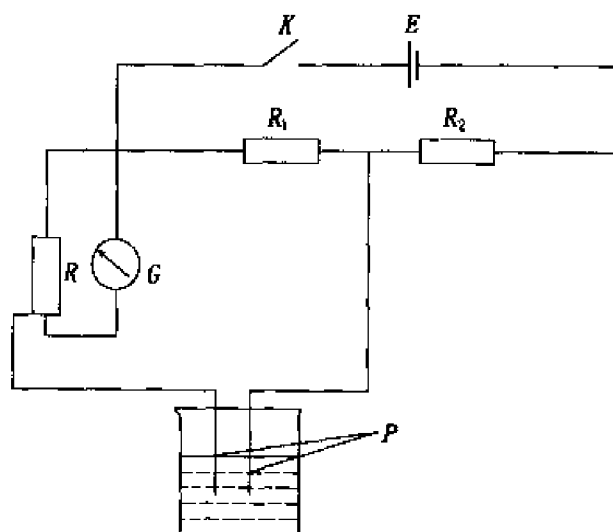
$c(\text{NaNO}_2)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	亚硝酸钠/g	氢氧化钠/g	无水碳酸钠/g
0.5	36	0.5	1
0.1	7.2	0.1	0.2

##### 4.22.2 标定

###### 4.22.2.1 测定方法

称取下述规定量的于 120 ℃ 烘至恒重的基准无水对氨基苯磺酸, 称准至 0.000 1 g。加下述规定体积的水溶解, 加 200 mL 水及 20 mL 盐酸, 按永停滴定法安装好电极和测量仪表(见图)。将装有配制好的亚硝酸钠溶液的滴管下口插入溶液内约 10 mm 处, 在搅拌下于 15~20 ℃ 进行滴定, 近终点时, 将滴管的尖

端提出液面,用少量水淋洗尖端,洗液并入溶液中,继续慢慢滴定,并观察检流计读数和指针偏转情况,直至加入滴定液搅拌后电流突增,并不再回复时为滴定终点。



测定仪表安装示意图

$R$ . 电阻,其阻值与检流计临界阻尼电阻值近似; $R_1$ . 电阻,60~70  $\Omega$ (或用可变电阻),使加于二电极上的电压约为 50 mV; $R_2$ . 电阻,2 000  $\Omega$ ;  $E$ . 1.5 V 干电池; $K$ . 开关; $G$ . 检流计,灵敏度为  $10^{-9}$  A/格; $P$ . 铂电极

$c(\text{NaNO}_2)/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	基准无水对氨基苯磺酸/g	氨水/mL
0.5	2.5	3
0.1	0.5	2

#### 4.22.2.2 计算

亚硝酸钠标准溶液浓度按式(31)计算:

$$c(\text{NaNO}_2) = \frac{m}{V \times 0.1732} \quad (31)$$

式中: $c(\text{NaNO}_2)$ 为亚硝酸钠标准溶液之物质的量浓度, $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $m$ 为无水对氨基苯磺酸质量,g; $V$ 为亚硝酸钠溶液之用量,mL;0.1732为与1.00 mL亚硝酸钠标准溶液 [ $c(\text{NaNO}_2) = 1.000 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]相当的以克表示的无水对氨基苯磺酸的质量。

注:本标准溶液使用前标定。

#### 4.23 高氯酸标准溶液

$$c(\text{HClO}_4) = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

#### 4.23.1 配制

量取 8.5 mL 高氯酸,在搅拌下注入 500 mL 冰乙酸中,混匀。在室温下滴加 20 mL 乙酸酐,搅拌至溶液均匀。冷却后用冰乙酸稀释至 1 000 mL,摇匀。

#### 4.23.2 标定

##### 4.23.2.1 测定方法

称取 0.6 g 于 105~110 °C 烘至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾,称准至 0.000 1 g。置于干燥的锥形瓶中,加入 50 mL 冰乙酸,温热溶解。加 2~3 滴结晶紫指示液( $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),用配制好的高氯酸溶液 [ $c(\text{HClO}_4)=0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ] 滴定至溶液由紫色变为蓝色(微带紫色)。

##### 4.23.2.2 计算

高氯酸标准溶液浓度按式(32)计算:

$$c(\text{HClO}_4)=\frac{m}{V\times 0.2042} \quad (32)$$

式中: $c(\text{HClO}_4)$  为高氯酸标准溶液之物质的量浓度,  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $m$  为邻苯二甲酸氢钾质量, g;  $V$  高氯酸溶液之用量, mL; 0.204 2 为与 1.00 mL 高氯酸标准溶液 [ $c(\text{HClO}_4)=1.000\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ] 相当的以克表示的邻苯二甲酸氢钾的质量。

注:本溶液使用前标定。标定高氯酸标准溶液时的温度应与使用该标准溶液滴定时的温度相同。



附录九

微量元素饲料添加剂原料质量标准

化合物		元 素		性 状	重 金 属 (Pb) mg · kg <sup>-1</sup>	砷 mg · kg <sup>-1</sup>	w(水不 溶物或水 分)/%	w (氯化物等) mg · kg <sup>-1</sup>	细 度
名 称	w/%	元素名称	w/%						
硫酸铜(CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	≥98.5	Cu	≥25.0	淡蓝色结晶性 粉末	≤10	≤5	≤0.2		通过φ=800 μm 试验筛≥95%
硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	≥99.0	Mg	≥9.7	无色结晶或白 色粉末	≤10	≤2		w(Cl)≤140	通过φ=400 μm 试验筛≥95%
硫酸锌(ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	≥98.0	Zn	≥35.0	白色结晶性粉 末	≤20	≤5	≤0.05		通过φ=250 μm 试验筛≥95%
硫酸亚铁(FeSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	≥99.0	Zn	≥22.5		≤10	≤5	≤0.05		通过φ=300 μm 试验筛≥95%
硫酸亚铁(FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	≥98.0	Fe	≥19.68	浅绿色结晶	≤20	≤2	≤0.2		通过φ=2.8 mm 试验筛≥95%
硫酸锰(MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	≥98.0	Mn	≥31.8	白色或略带粉 红色结晶	≤15	≤5	≤0.05		通过φ=250 μm 试验筛≥95%
亚硒酸钠(Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	≥98.0	Se	≥44.7	无色结晶粉末			水分≤2		
氯化钴(CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	≥98.0	Co	≥24.3	红色或红紫色 结晶	≤10	≤5	≤0.03		通过φ=800 μm 试验筛≥95%
碘化钾(KI)	≥99.0	I	≥75.7	白色结晶	≤10	≤2	水分≤1.0	w(Ba)≤10	通过φ=800 μm 试验筛≥95%
轻质碳酸钙(CaCO <sub>3</sub> )	≥98.3	Ca	≥39.2	白色粉末	≤30	≤2	水分≤1.0	w(Ba)≤50	
磷酸氢钙 (CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)		Ca	≥21.0	白色粉末	≤20	≤30		w(F)≤1 800	通过φ=400 μm 试验筛≥95%
		P	≥16.0						

## 附录十

维生素饲料添加剂标准

名称	含量	外观和性状	$w$ (重金属 (Pb))/%	$w$ (水分) /%	折光率、 比旋光度 及其他	$w$ (炽灼残 渣)/%	分子式
维生素 A 乙酸酯明胶微粒	以 $C_{22}H_{32}O_2$ 计, 标示量(30 万, 40 万, 50 万 $IU \cdot g^{-1}$ ) 的 90%~120%	灰黄色至淡褐色颗粒, 易吸湿, 遇热、酸性气体、见光或吸湿后分解		$\leq 5.0$			$C_{22}H_{32}O_2$
维生素 D <sub>3</sub> 明胶和淀粉喷雾法微粒	标示量(50 万, 40 万, 30 万 $IU \cdot g^{-1}$ ) 的 85.0%~120.0%	米黄色或黄棕色微粒, 遇热, 见光或吸湿后易分解, 降解		$\leq 5.0$			
维生素 AD <sub>3</sub> 明胶和淀粉喷雾法微粒	标示量的 85.0%~102.0%	黄色或棕色微粒, 遇热, 见光或吸湿分解, 降解		$\leq 5.0$			
维生素 E (原料)	以 $C_{31}H_{52}O_3$ 计 $\geq 96\%$	微绿黄色或黄色黏稠液体, 遇光, 色渐变深	$< 0.002$	游离生育酚(耗硫酸铈液 $\leq 1$ mL) $0.01 \text{ mol} \cdot L^{-1}$	$n_D^{20} 1.494 \sim 1.499$		$C_{31}H_{52}O_3$
维生素 E 吸附性粉剂	以 $C_{31}H_{52}O_3$ 计, 标示量的 90.0%~110.0%	类白色或淡黄色粉末, 易吸湿		$\leq 5.0$			$C_{31}H_{52}O_3$
维生素 K <sub>3</sub> (亚硫酸氢钠甲萘醌)	以 $C_{11}H_8O_2 \cdot NaHSO_3 \cdot 3H_2O$ 计; 60.0% 75.0%, $NaHSO_3$ 28.0%~42.0%	白色或灰黄褐色结晶性粉末, 无臭或微有特殊臭, 有吸湿性, 遇光易分解	$\leq 0.002$	7.0~13.0			$C_{11}H_8O_2 \cdot NaHSO_3 \cdot 3H_2O$

续表附录十(表1)

名 称	含 量	外观和性状	$w$ (重金属 (Pb))/%	$w$ (水分) /%	折光率、 比旋光度 及其他	$w$ (炽灼残 渣)/%	分子式
维生素 B <sub>1</sub> (盐酸硫胺)	以 C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS · HCl 计 98.5%~101.0%	白色结晶或结晶性粉 末,有微弱的特臭,味 苦,干燥品在空气中迅 速吸收约4%水分	≤5.0	≤5.0	硫酸盐,以 SO <sub>4</sub> 计,≤0.03%	≤0.1	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS ·HCl
维生素 B <sub>1</sub> (硝酸硫胺)	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S 计 98.0%~101.0%	白色或微黄色结晶性 粉末,有微弱的特臭	≤1.0	≤1.0		≤0.2	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S
维生素 B <sub>2</sub> (核黄素)	以 C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> 干燥 品计 96.0%~ 102.0%	黄色至橙黄色结晶性 粉末,微臭,味微苦,溶 液易变质,碱性溶液中 遇光变质更快	≤1.5	≤1.5	比旋光度 [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup> -120°~-140°	≤0.3	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
维生素 B <sub>6</sub>	以 C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl 干燥品计 98.0%~ 101.0%	白色至微黄色的结晶 性粉末,无臭,味酸苦, 遇光渐变质	≤0.003	≤0.5		≤0.1	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl
D-泛酸钙	含 Ca:8.2%~8.6% N:5.7%~6.0%	类白色粉末,无臭,味 微苦,有吸湿性	≤0.002	≤5.0	比旋光度 [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup> +24°~+28.5°		C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub>
烟酸	以 C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> 干燥品 计 99%~101.0%	白色至微黄色结晶性 粉末,无臭或微臭,味 微酸	≤0.002	≤0.5	硫酸盐,以 SO <sub>4</sub> 计,≤0.02%	≤0.1	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
烟酰胺	以 C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O 干燥品 计 98.5%~101.0%	白色至微黄色结晶性 粉末,无或几乎无臭, 味苦	≤0.002	≤0.5		≤0.1	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O
叶酸	以 C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> 计 95.0%~102.0%	黄色或橙黄色结晶性 粉末,无臭无味		≤8.5		≤0.5	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>

续表附录十(表2)

名称	含量	外观和性状	$w$ (重金属 (Pb))/%	$w$ (水分) /%	折光率、 比旋光度 及其他	$w$ (炽灼残 渣)/%	分子式
维生素 B <sub>12</sub> 粉剂	以 C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P 计, 标示量(1%, 5%, 10%)的90%~130%	浅红至橙色细微粉末, 具有吸湿性		以玉米淀粉稀 释者≤12.0, 碳 酸钙稀释者≤ 5.0			C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P
氯化胆碱水溶 液	≥70.0%	无色透明的黏性液体, 稍具特异臭味, 有吸湿 性, 吸收二氧化碳, 放 出胺臭味	≤0.002		乙二醇, ≤ 0.50%	≤0.2	C <sub>3</sub> H <sub>13</sub> NCIO
氯化胆碱粉剂	≥50%	白色或黄褐色干燥的 流动性粉末或颗粒, 具 有吸湿性, 有特异臭味		≤4.0			
抗坏血酸	以 C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> 计≥ 99.0%~101.0%	白色或类白色结晶性 粉末, 无臭, 味酸, 久置 渐变微黄色	≤0.002		比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ +20.5°~+ 21.5°	≤0.1	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>

## 附录十一

饲料卫生标准(GB 13078-2001)

序号	卫生指标项目	产品名称	指标	试验方法	备 注
1	砷(以总砷计)的允许量(每千克产品中) mg	石粉	≤2.0	GB/T 13079	不包括国家主管部门批准使用的有机砷制剂中的砷含量
		硫酸亚铁、硫酸镁			
		磷酸盐	≤20.0		
		沸石粉、膨润土、麦饭石	≤10.0		
		硫酸铜、硫酸锰、硫酸锌、碘化钾、碘酸钙、氯化钴	≤5.0		
		氧化锌	≤10.0		
		鱼粉、肉粉、肉骨粉	≤10.0		
		家禽、猪配合饲料	≤2.0		
		牛、羊精料补充料	≤10.0		
		猪、家禽浓缩饲料			以在配合饲料中20%的添加量计
		猪、家禽添加剂预混合饲料			以在配合饲料中1%的添加量计
2	铅(以Pb计)的允许量(每千克产品中) mg	生长鸭、产蛋鸭、肉鸭配合饲料、鸡配合饲料、猪配合饲料	≤5	GB/T 13080	
		奶牛、肉牛精料补充料	≤8		
		产蛋鸡、肉用仔鸡浓缩饲料、仔猪、生长肥育猪浓缩饲料	≤13		以在配合饲料中20%的添加量计
		骨粉、肉骨粉、鱼粉、石粉	≤10		
		磷酸盐	≤30		
		产蛋鸡、肉用仔鸡复合预混合饲料、仔猪、生长肥育猪复合预混合饲料	≤40		以在配合饲料中1%的添加量计

续表附录十一(表1)

序号	卫生指标项目	产品名称	指标	试验方法	备 注
3	氟(以 F 计)的 允许量(每千克 产品中) mg	鱼粉	≤500	GB/T 13083	高氟饲料用 HG 2636—1994 中 4.4 条
		石粉	≤2 000		
		磷酸盐	≤1 800	HG 2636	
		肉用仔鸡、生长鸡配合饲料	≤250	GB/T 13083	
		产蛋鸡配合饲料	≤350		
		猪配合饲料	≤100		
		骨粉、肉骨粉	≤1 800		
		生长鸭、肉鸭配合饲料	≤200		
		产蛋鸭配合饲料	≤250		
		牛(奶牛、肉牛)精料补充料	≤50		
		猪、禽添加剂预混合饲料	≤1 000	GB/T 13083	以在配合饲料中 1%的添加量计
		猪、禽浓缩饲料	按添加比例 折算后,与相 应猪、禽配合 饲料规定值 相同		
4	霉菌的允许量 (每千克产品 中) 霉菌总数×10 <sup>3</sup> 个	玉米	<40	GB/T 13092	限量饲用: 40~100 禁用:>100
		小麦麸、米糠			限量饲用: 40~80 禁用:>80
		豆饼(粕)、棉子饼(粕)、 菜子饼(粕)	<50		限量饲用: 50~100 禁用:>100
		鱼粉、肉骨粉	<20		限量饲用: 20~50 禁用:>50
		鸭配合饲料	<35		
		猪、鸡配合饲料 猪、鸡浓缩饲料 奶、肉牛精料补充料	<45		

续表附录十一(表 2)

序号	卫生指标项目	产品名称	指标	试验方法	备 注
5	黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> 允许量(每千克 产品中) μg	玉米 花生饼(粕)、棉子饼 (粕)、菜子饼(粕)	≤50	GB/T 17480 或 GB/T 8381	
		豆粕	≤30		
		仔猪配合饲料及浓缩饲料	≤10		
		生长肥育猪、种猪配合饲料及浓缩饲料	≤20		
		肉用仔鸡前期、雏鸡配合饲料及浓缩饲料	≤10		
		肉用仔鸡后期、生长鸡、产蛋鸡配合饲料及浓缩饲料	≤20		
		肉用仔鸭前期、雏鸭配合饲料及浓缩饲料	≤10		
		肉用仔鸭后期、生长鸭、产蛋鸭配合饲料及浓缩饲料	≤15		
		鹌鹑配合饲料及浓缩饲料	≤20		
		奶牛精料补充料	≤10		
		肉牛精料补充料	≤50		
6	铬(以 Cr 计)的 允许量(每千克 产品中) mg	皮革蛋白粉	≤200	GB/T 13088	
		鸡、猪配合饲料	≤10		
7	汞(以 Hg 计)的 允许量(每千 克产品中) mg	鱼粉	≤0.5	GB/T 13081	
		石粉 鸡配合饲料,猪配合饲料	≤0.1		
8	镉(以 Cd 计)的 允许量(每千克 产品中) mg	米糠	≤1.0	GB/T 13082	
		鱼粉	≤2.0		
		石粉	≤0.75		
		鸡配合饲料,猪配合饲料	≤0.5		
9	氰化物(以 HCN 计)的允许量(每 千克产品中) mg	木薯干	≤100	GB/T 13084	
		胡麻饼、粕	≤350		
		鸡配合饲料,猪配合饲料	≤50		

续表附录十一(表 3)

序号	卫生指标项目	产品名称	指标	试验方法	备 注
10	亚硝酸盐(以 NaNO <sub>2</sub> 计)的 允许量(每千克 产品中) mg	鱼粉	≤50	GB/T 13085	
		鸡配合饲料,猪配合饲料	≤15		
11	游离棉酚的允 许量(每千克产 品中) mg	棉子饼、粕	≤1 200	GB/T 13086	
		肉用仔鸡、生长鸡配合饲料	≤100		
		产蛋鸡配合饲料	≤20		
		生长肥育猪配合饲料	≤60		
12	异硫氰酸酯(以 丙烯基异硫氰酸 酯计)的允许量 (每千克产品中) mg	菜子饼、粕	≤4 000	GB/T 13087	
		鸡配合饲料 生长肥育猪配合饲料	≤500		
13	噻唑烷硫酮的 允许量(每千克 产品中) mg	肉用仔鸡、生长鸡配合饲 料	≤1 000	GB/T 13089	
		产蛋鸡配合饲料	≤800		
14	六六六的允许 量(每千克产品 中) mg	米糠 小麦麸 大豆饼、粕 鱼粉	≤0.05	GB/T 13090	
		肉用仔鸡、生长鸡配合 饲料	≤0.3		
		产蛋鸡配合饲料			
		生长肥育猪配合饲料	≤0.4		
15	滴滴涕的允许 量(每千克产品 中) mg	米糠 小麦麸 大豆饼、粕 鱼粉	≤0.02	GB/T 13090	
		鸡配合饲料,猪配合饲料	≤0.2		
16	沙门氏杆菌	饲料	不得检出	GB/T 13091	



续表附录十一(表 4)

序号	卫生指标项目	产品名称	指标	试验方法	备 注
17	细菌总数的允许量(每克产品中) 细菌总数 $\times 10^6$ 个	鱼粉	$<2$	GB/T 13093	限量饲用: 2~5 禁用: $>5$
注: 1 所列允许量均为以干物质含量为 88% 的饲料为基础计算。 2 浓缩饲料、添加剂预混合饲料添加比例与本标准备注不同时,其卫生指标允许量可进行折算。					

## 参考文献

- 1 白元生. 饲料原科学. 北京: 中国农业出版社, 1999
- 2 北京农业大学. 家畜饲养学实验指导. 北京: 农业出版社, 1988
- 3 柏秋圃编著. 实用饲料添加剂学. 郑州: 河南科学技术出版社, 1993
- 4 常碧影, 闫惠文, 张明, 李静梅. 2001. 饲料氨基酸的测定国标研制. 饲料工业, 21 卷第 2 期, 1~4
- 5 陈义风, 封朝璧, 程世国. 饲养分析. 四川民族出版社, 1984
- 6 丁丽敏等. 近红外光谱技术(NIRS)可实现对氨基酸和可利用氨基酸的快速检测. 饲料工业, 1998(1)41~44
- 7 丁丽敏等. 近红外光谱分析技术及其在评定饲料营养价值中的应用. 中国饲料, 1997, 1: 11~13; 2: 8~11
- 8 李德发, 范石军. 饲料工业手册. 北京: 中国农业大学出版社, 2002
- 9 姜武. 饲料原料简易检测掺假认识. 辽宁科学技术出版社, 1997
- 10 顾君华. 饲料分析. 学术书刊出版社, 1990
- 11 化学工业部化学试剂标准化归口单位, 化学工业部化学试剂质量监测中心. 化学试剂标准大全. 北京: 化学工业出版社, 1995
- 12 侯文璞, 汪哲夫. 对虾配合饲科学. 北京: 海洋出版社, 1990
- 13 黄泽元. 配合饲料及饲料检验(下册). 武汉: 武汉大学出版社, 1990
- 14 黄伟坤等. 食品检验与分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1989
- 15 李德发, 王若军. 动物营养与饲料加工技术. 北京: 中国农业大学出版社, 1997
- 16 梁邢文, 王成章, 齐胜利. 饲料原料与品质检测. 北京: 中国林业出版社, 1999
- 17 陆婉珍, 等. 现代近红外光谱分析技术. 北京: 中国石化出版社, 1999
- 18 宁正祥. 食品成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- 19 宁开桂. 实用饲料分析手册. 北京: 中国农业科技出版社, 1993
- 20 饲料标准资料委员会. 饲料标准资料汇编(上). 北京: 中国标准出版社, 1996
- 21 饲料标准资料委员会. 饲料标准资料汇编(1996—1999). 北京: 中国标准出版社, 2000
- 22 饲料工业职工培训系列教材编审委员会编. 饲料分析. 北京: 中国农业出版社, 1998
- 23 饲料显微镜检查图谱. 中华人民共和国行业标准 SB/T10274-1996
- 24 食品卫生国家标准汇编(一). 北京: 中国标准出版社, 1992
- 25 汪尔康. 21 世纪的分析化学. 北京: 科学出版社, 1999
- 26 汪徽. 饲料毒物与抗营养因子研究进展. 北京: 西北大学出版社, 1997
- 27 王叔淳. 食品卫生检验技术手册. 北京: 化学工业出版社, 1996
- 28 王和民. 维生素营养研究进展. 北京: 中国科学技术出版社, 1993
- 29 卫生部、农业部和国家药品监督管理局 176 号公告. 禁止在饲料和动物饮水中使用的药物品种目录, 2002