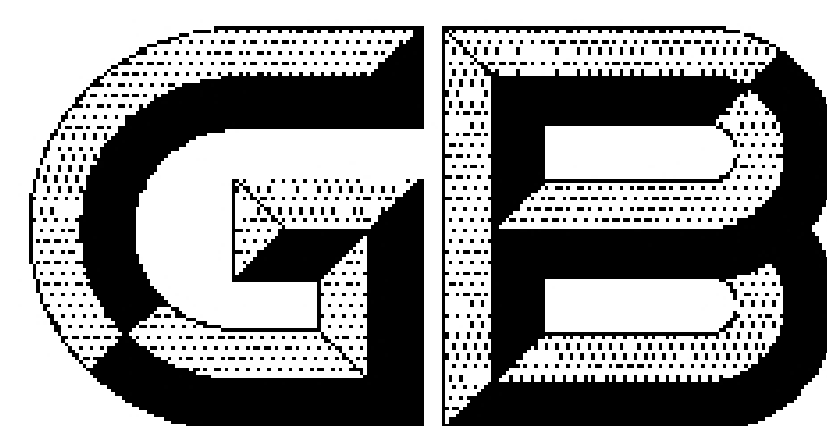




中华人民共和国国家标准

GB/T 15399—2018
代替 GB/T 15399—1994

饲料中含硫氨基酸的测定 离子交换色谱法

Determination of sulfur amino acids in feeds—
Ion exchange chromatography

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 15399—1994《饲料中含硫氨基酸测定方法 离子交换色谱法》。

本标准与 GB/T 15399—1994 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 范围中适用对象增加了精料补充料,并增加了方法的定量限(见第 1 章);
- 修改了原理的表述(见第 3 章,1994 年版的第 3 章);
- 过甲酸氧化溶液中添加了苯酚(见 4.5,1994 年版的 4.1);
- 偏重亚硫酸钠作终止剂水解时给出警示(见 7.1.2);
- 测定中增加了对蛋氨酸砒的分离度及试样峰面积大小的要求(见 7.2);
- 修改了试验数据处理中的计算公式(见第 8 章);
- 增加了氨基酸混合标准溶液的色谱图(见附录 A)。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

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

本标准主要起草人:赵根龙、贾铮、李兰、宋军、赵艳、张凤枰。

本标准所代替标准历次版本发布情况:

- GB/T 15399—1994。

饲料中含硫氨基酸的测定 离子交换色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中含硫氨基酸(蛋氨酸、胱氨酸和半胱氨酸)的离子交换色谱法测定法。
本标准适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中含硫氨基酸的测定。
胱氨酸(含半胱氨酸)和蛋氨酸的定量限均为 0.01%。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6439 饲料中水溶性氯化物的测定
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 14699.1 饲料 采样
GB/T 20195 动物饲料 试样的制备
JJG 1064 氨基酸分析仪

3 原理

饲料中的含硫氨基酸用过甲酸氧化和盐酸溶液水解生成磺基丙氨酸和蛋氨酸磺,经离子交换色谱法分离,茚三酮柱后衍生,分光光度法检测,外标法定量。

4 试剂或材料

除特殊说明外,所用试剂均为分析纯。

- 4.1 水:应符合 GB/T 6682 中一级用水的规定。
- 4.2 盐酸:优级纯。
- 4.3 甲酸:浓度为 88%。
- 4.4 氢氧化钠:优级纯。
- 4.5 过甲酸溶液 I:将过氧化氢+甲酸=1+9,混合,并按每毫升添加 5 mg 比例加入苯酚,于室温下放置 1 h,置冰水浴中冷却 30 min。临用现配。
- 4.6 过甲酸溶液 II:在过甲酸溶液 I (4.5)中按每毫升添加 3 mg 比例加入硝酸银。
- 4.7 过甲酸溶液 III:在过甲酸溶液 I (4.5)中加入适量硝酸银,每毫升添加量按式(1)计算:

$$m_R \geq 1.454 \times m \times C_N \dots\dots\dots (1)$$

式中:

m_R ——每毫升过甲酸中硝酸银的量,单位为毫克(mg);

C_N ——样品中氯化钠含量,%;

m ——样品质量,单位为毫克(mg)。

- 4.8 盐酸溶液(6 mol/L):量取盐酸(4.2)500 mL,用水稀释至 1 000 mL,混匀。
- 4.9 盐酸溶液(6.8 mol/L):量取盐酸(4.2)1 133 mL 用水稀释至 2 000 mL,混匀。
- 4.10 氢氧化钠溶液(7.5 mol/L):取氢氧化钠 30 g,加水溶解并定容至 100 mL。
- 4.11 柠檬酸钠缓冲液:称取柠檬酸三钠 19.6 g,用水溶解后加入盐酸 16.5 mL,硫二甘醇 5.0 mL,苯酚 1 g,最后加水定容至 1 000 mL,过滤。
- 4.12 偏重亚硫酸钠溶液:称取 33.6 g 偏重亚硫酸钠加水溶解并定容至 100 mL。
- 4.13 洗脱用柠檬酸钠缓冲溶液:按仪器说明书配制或购买。
- 4.14 茚三酮溶液:取茚三酮适量,按仪器说明书配制或购买。
- 4.15 磺基丙氨酸-蛋氨酸砷标准贮备液:准确称取磺基丙氨酸(纯度 $\geq 99.0\%$)105.7 mg 和蛋氨酸砷(纯度 $\geq 99.0\%$)113.3 mg,加水溶解并定容至 250 mL,浓度均为 2.50 $\mu\text{mol/mL}$,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 年。
- 4.16 氨基酸标准储备液:含 17 种常规蛋白水解液分析用氨基酸(天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸),各组分浓度均为 2.50 $\mu\text{mol/mL}$,应使用有证标准溶液。
- 4.17 混合氨基酸标准工作液:吸取磺基丙氨酸-蛋氨酸砷标准贮备液(4.15)和氨基酸标准贮备液(4.16)各 1.00 mL 置于 50 mL 容量瓶中,加柠檬酸钠缓冲液(4.11)定容,混匀。有关各组分浓度均为 50 nmol/mL,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 3 个月。

5 仪器设备

- 5.1 氨基酸自动分析仪:具有阳离子交换柱、茚三酮柱后衍生装置及 570 nm 和 440 nm 光度检测器。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 mg。
- 5.3 喷灯。
- 5.4 旋转蒸发器或浓缩器:可在室温至 65 $^{\circ}\text{C}$ 间调温,控温精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$,真空度可低至 3.3×10^3 Pa (25 mm Hg)。
- 5.5 恒温干燥箱:温度可达 110 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

6 样品

按 GB/T 14699.1 采集有代表性的样品,按 GB/T 20195 进行样品制备。粉碎过 0.25 mm 孔径筛,混合均匀,装入密闭容器,备用。

浓缩饲料应首先按 GB/T 6439 测定其 NaCl 含量。

7 试验步骤

7.1 氧化和水解

平行做两份试验,称取试样 50 mg~75 mg(约含蛋白质 7.5 mg~25 mg,精确至 0.1 mg),置于 20 mL 试管中,于冰水浴中冷却 30 min 后加入已冷却的过甲酸溶液 I(4.5),如样品是浓缩饲料,视其氯化钠含量加过甲酸溶液[氯化钠含量小于等于 3%的加入过甲酸溶液 II(4.6),氯化钠含量大于 3%加入过甲酸溶液 III(4.7)]2 mL,加液时需将样品全部润湿,但不要摇动,盖好瓶塞,连同冰浴一道置于

0℃~4℃ 冰箱中,反应 16 h。

以下步骤依使用不同的氧化终止剂而不同:

- a) 若以氢溴酸为终止剂:于各管中加入氢溴酸 0.3 mL 振摇,放回冰浴,静置 30 min,然后移到旋转蒸发器或浓缩器(5.4)上,在 60℃、低于 3.3×10^3 Pa (25 mm Hg)下浓缩至干。用盐酸溶液(4.8)约 15 mL 将残渣定量转移到 20 mL 安瓿瓶或水解管中,封口或旋紧管盖,置恒温箱中,110℃±2℃下水解 22 h~24 h。

取出安瓶或水解管,冷却,用水将内容物定量地转移至 50 mL 容量瓶中,定容。充分混匀,过滤,取 1 mL~2 mL 滤液,置于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 次~3 次。准确加入一定体积(2 mL~5 mL)的柠檬酸钠缓冲液(4.11)振摇,充分溶解后离心,取上清液供仪器测定用。

- b) 若以偏重亚硫酸钠为终止剂:则于样品氧化液中加入偏重亚硫酸钠溶液(4.12) 0.5 mL,充分摇匀后,直接加入盐酸溶液(4.9)17.5 mL 置 110℃±2℃恒温箱中水解,水解 22 h~24 h。

警示——在水解开始时,不要封安瓿瓶瓶口,或旋动水解管的管帽,待水解 1 h 后再封口或旋紧管帽,否则容易引起水解管爆裂。



取出安瓿瓶或水解管,冷却,用水将内容物转移到 50 mL 容量瓶中,用氢氧化钠溶液(4.10)中和至 pH 约 2.2,并用稀释上机用柠檬酸钠缓冲液(4.11)定容,离心,取上清液供仪器测定用。

注:有些氨基酸分析仪,上机试样溶液的 Na⁺ 浓度会影响色谱峰出峰时间或氨基酸的分离,对此需先将水解液定容过滤,取 2 mL~5 mL 滤液,于 50℃下,减压蒸发至约 0.5 mL(切勿蒸干),用稀释上机用柠檬酸钠缓冲液(4.11)将其转移至 10 mL 容量瓶中,加氢氧化钠溶液(4.10)调至 pH 2.2,并用稀释缓冲液(4.11)定容。混匀,离心,取上清液供仪器测定用。

7.2 测定

使用混合氨基酸标准工作液(4.17)注入氨基酸自动分析仪,适当调整仪器操作程序及参数和洗脱用缓冲溶液试剂配比,应符合 JJG 1064 氨基酸分析仪检定规程的要求并保证蛋氨酸与天门冬氨酸的分辨率大于 85%,其标准溶液色谱图参照附录 A 的图 A.1。测定中每 5 个样品(即 10 个单样)为一组,组间插入混合氨基酸标准工作液(4.17)进行校准。以保留时间定性,单点外标法定量。试样中氨基酸的峰面积应在相应标准工作液该峰面积的 30%~200%之间,否则应用柠檬酸钠缓冲液(4.11)稀释后重测。

8 试验数据处理

试样中胱氨酸(蛋氨酸)含量以其质量分数 ω 表示,数值以克每 100 克表示,按式(2)计算:

$$\omega = \frac{n \times A_i \times V \times c \times M \times V_{st}}{A_{st} \times m \times V_i \times 10^6} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A_i ——试样溶液中磺基丙氨酸(蛋氨酸)的峰面积;
- V ——试样水解液体积,单位为毫升(mL);
- c ——标准工作液中磺基丙氨酸(蛋氨酸)浓度,单位为纳摩尔每毫升(nmol/mL);
- V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μ L);
- n ——试样水解液稀释倍数;
- V_{st} ——氨基酸标准溶液进样体积,单位为微升(μ L);

A_{st} ——氨基酸标准溶液中磺基丙氨酸(蛋氨酸砒)的峰面积;

m ——试样质量,单位为毫克(mg);

M ——胱氨酸(蛋氨酸)的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol)。(胱氨酸实为胱氨酸与半胱氨酸之和,以胱氨酸计;其 $M_{\text{胱氨酸}} = 120.2$; $M_{\text{蛋氨酸}} = 149.2$)。

以两个平行样品测定结果的算术平均值报告结果,保留两位小数。

9 精密度

在重复性条件下,获得的两次独立测定结果与其算术平均值的差值,当含量不大于 0.5% 时,不超过这两个测定值算术平均值的 5%;含量大于 0.5% 时,不超过 4%。

附 录 A
(资料性附录)
氨基酸混合标准溶液的色谱图

磺基丙氨酸和蛋氨酸与氨基酸混合标准溶液的色谱图见图 A.1。

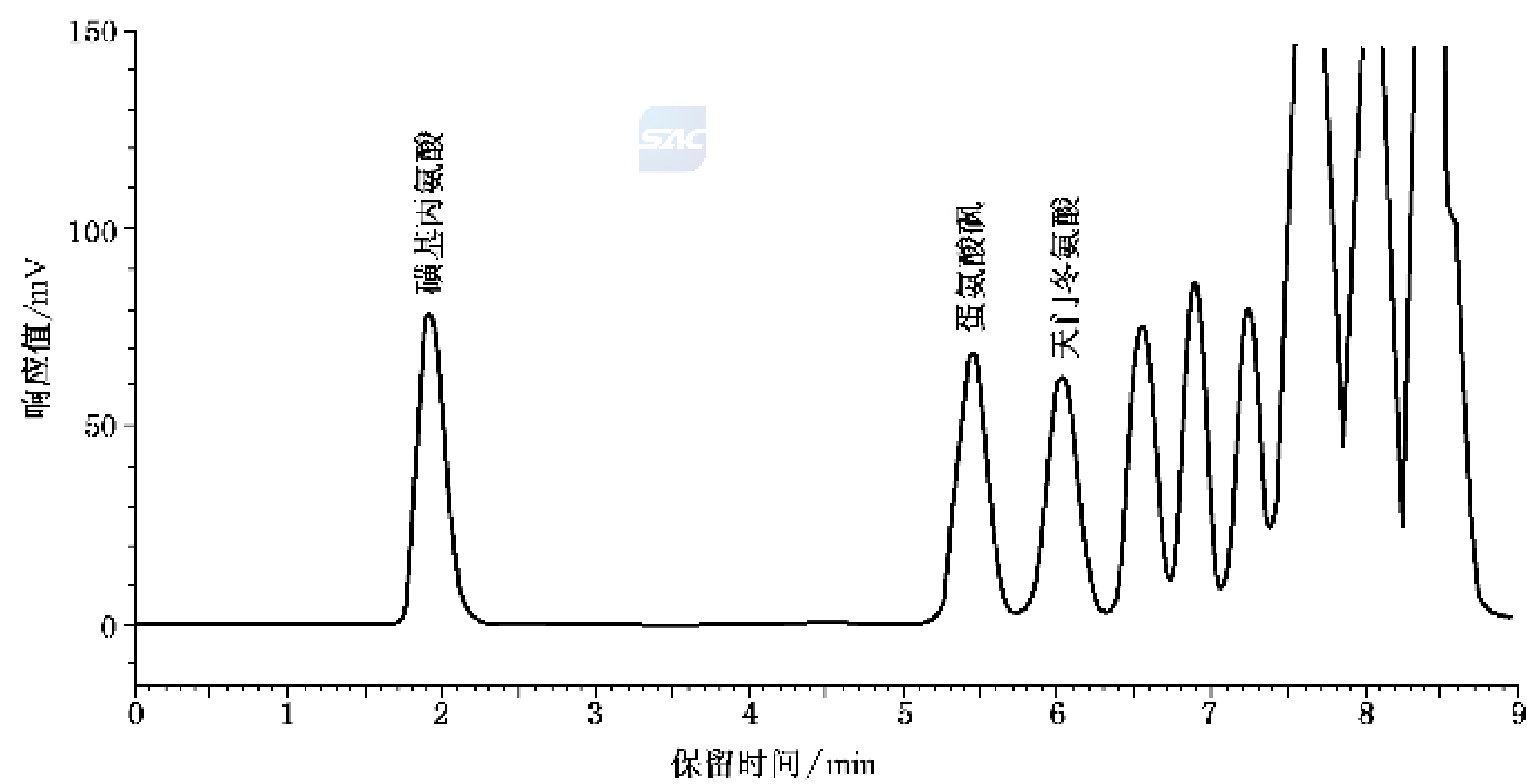


图 A.1 磺基丙氨酸和蛋氨酸与氨基酸混合标准溶液(50 nmol/mL)的色谱图