



中华人民共和国国家标准

GB/T 18246—2019
代替 GB/T 18246—2000

饲料中氨基酸的测定

Determination of amino acids in feeds

2019-12-10 发布

2020-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
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 18246—2000《饲料中氨基酸的测定》。

本标准与 GB/T 18246—2000 相比,除了编辑性修改外,主要技术内容变化如下:

- 修改了标准的适用范围,增加了精料补充料,明确了不同处理方法所测定的氨基酸种类,增加了各种氨基酸的摩尔质量和定量限(见第 1 章和附录 A,2000 年版的第 1 章)。
- 将标准方法分四章表述,分别为“常规酸水解法”“氧化酸水解法”“碱水解法”“酸提取法”(见第 3 章、第 4 章、第 5 章、第 6 章)。
- 修改了常规酸水解法盐酸水解溶液配方(见 3.2.3,2000 年版的 4.1.1.1)。
- 增加了氧化酸水解测定含硫氨基酸以外其他氨基酸的方法(见 4.2)。
- 修改了盐酸提取溶液配方(见 6.2.3,2000 年版的 4.3.1)。
- 增加了酸提取法中配合饲料、浓缩饲料和精料补充料样品的净化步骤(见 6.5.1.2,2000 年版的 7.1.3)。
- 修改了试验数据处理中的计算公式[见式(1)、式(3),2000 年版的式(1)、式(2)]。
- 修改了精密度的表述(见 3.7、6.7,2000 年版的第 9 章)。
- 修改了附录 A 的内容,修改为各种氨基酸的摩尔质量和定量限(见附录 A,2000 年版的附录 A)。
- 增加了氨基酸标准溶液色谱图(见附录 B)。

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)]。

本标准主要起草人:贾铮、赵根龙、李兰、樊霞、肖志明、李阳、刘晓露。

本标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 18246—2000。

饲料中氨基酸的测定

1 范围

本标准规定了饲料中总氨基酸(肽键结合和游离的)和游离氨基酸(天然和添加的)测定方法,包括常规酸水解法、氧化酸水解法、碱水解法和酸提取法。

常规酸水解法适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中含硫氨基酸(胱氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸)和色氨酸以外的其他氨基酸(天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸)含量的测定。

氧化酸水解法适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中含硫氨基酸(胱氨酸、半胱氨酸和蛋氨酸)的测定。以偏重亚硫酸钠为氧化终止剂时,可测定除酪氨酸、色氨酸以外的其他蛋白水解氨基酸;以氢溴酸为终止剂时,可测定除酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和色氨酸以外的其他蛋白水解氨基酸。

碱水解法适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中色氨酸的测定。

酸提取法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中游离氨基酸的测定。

各氨基酸的定量限见附录 A 中表 A.1。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 15399 饲料中含硫氨基酸的测定 离子交换色谱法
GB/T 15400 饲料中色氨酸的测定
GB/T 20195 动物饲料试样的制备
JJG 1064 氨基酸分析仪

3 常规酸水解法

3.1 原理

饲料中蛋白质在 110 °C、6 mol/L 盐酸溶液作用下水解成氨基酸,经离子交换色谱分离和茚三酮柱后衍生化,脯氨酸于 440 nm 波长处测定,其他氨基酸于 570 nm 波长处测定。

3.2 试剂或材料

除特殊说明外,本标准所用试剂均为分析纯。

3.2.1 水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

3.2.2 盐酸:优级纯。

3.2.3 盐酸水解溶液(6 mol/L):将 500 mL 盐酸(3.2.2)与 500 mL 水混合,加 1g 苯酚,混匀。

3.2.4 柠檬酸钠缓冲溶液[pH=2.2, $c(\text{Na}^+) = 0.2 \text{ mol/L}$]:称取柠檬酸三钠 19.6 g 于 1 000 mL 容量瓶中,加水溶解后加入盐酸(3.2.2)16.5 mL,硫二甘醇 5.0 mL,苯酚 1 g,用水定容并过滤。

3.2.5 氨基酸标准储备溶液: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。

3.2.6 氨基酸标准工作溶液:准确移取 2 mL 的氨基酸标准储备溶液(3.2.5)置于 50 mL 容量瓶中,以柠檬酸钠缓冲溶液(3.2.4)定容,各氨基酸组分浓度为 100 nmol/mL ,用安瓿分装密封,每支约 1 mL,在 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 下保存,有效期 3 个月。

3.2.7 不同 pH 值和离子强度的柠檬酸钠缓冲溶液与茚三酮溶液:按照仪器说明书配制或购买。

3.2.8 液氮。

3.3 仪器设备

3.3.1 氨基酸自动分析仪:具备阳离子交换柱、茚三酮柱后衍生装置及 570 nm 和 440 nm 光度检测器。

3.3.2 天平:感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

3.3.3 真空泵。

3.3.4 喷灯。

3.3.5 恒温干燥箱:温度可达 $110^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 。

3.3.6 离心机:转速不低于 $4\,000 \text{ r/min}$ 。

3.3.7 旋转蒸发器或浓缩器:可在室温至 65°C 间调温,控温精度 $\pm 1^\circ\text{C}$,真空度可低至 $3.3 \times 10^3 \text{ Pa}$ (25 mmHg)。

3.4 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,装入密闭容器中保存,备用。

对于粗脂肪含量大于或等于 5% 的样品,需将脱脂后的样品风干、混匀,装入密闭容器中备用。对于粗脂肪小于 5% 的样品,可直接称样。

3.5 试验步骤

3.5.1 样品前处理

平行做两份试验。称取试样 $50 \text{ mg} \sim 100 \text{ mg}$ (含蛋白质约 $7.5 \text{ mg} \sim 25 \text{ mg}$,精确至 0.1 mg) 于 20 mL 安瓿或水解管中,准确加入 10 mL 盐酸水解溶液(3.2.3),置液氮(3.2.8)中冷冻,使用真空泵抽真空至 7 Pa ($\leq 5 \times 10^{-2} \text{ mmHg}$) 后用喷灯封口或充氮气 1 min 后旋紧管盖。将安瓿或水解管放在 $110^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 恒温干燥箱中,水解 22 h $\sim$ 24 h。冷却,混匀,开管,过滤,用移液管精确吸取适量的滤液,置于旋转蒸发器或浓缩器中, 60°C 下抽真空蒸发至干,必要时,加少许水,重复蒸干 1 次 $\sim$ 2 次。加入 3 mL $\sim$ 5 mL 柠檬酸钠缓冲溶液(3.2.4)复溶,使试样溶液中氨基酸浓度达到 $50 \text{ nmol/mL} \sim 250 \text{ nmol/mL}$,摇匀,过滤或离心,上清液待上机测定。

3.5.2 测定

将氨基酸标准工作溶液(3.2.6)注入氨基酸自动分析仪,以不同 pH 和离子强度的柠檬酸钠缓冲溶液与茚三酮溶液(3.2.7)作为流动相和衍生剂,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,并保证苏氨酸-丝氨酸、甘氨酸-丙氨酸以及亮氨酸-异亮氨酸分离度分别不得小于 85%、90%和 80%,其标准溶液色谱图参见附录 B 的图 B.1、图 B.2。注入制备好的试样溶液和相应的氨基酸标准工作溶液进行测定,每 5 个样品(即 10 个单样)为一组,组间插入氨基酸标准工作溶液(3.2.6)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标准工作溶液相应峰面积的 30%~200%,否则应用柠檬酸钠缓冲溶液(3.2.4)稀释后重测。

3.6 试验数据处理

试样中氨基酸含量以其质量分数 $w(\%)$ 计,未脱脂试样按式(1)计算,脱脂试样按式(2)计算:

$$w = \frac{n \times A_i \times V \times c \times M \times V_{st}}{A_{st} \times m \times V_i \times 10^6} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$
$$w = \frac{n \times A_i \times V \times c \times M \times V_{st}}{A_{st} \times m \times V_i \times 10^6} \times 100 \times (1 - F) \dots\dots\dots(2)$$

- 式中:
- n ——试样水解溶液稀释倍数;
 - A_i ——试样溶液中对对应氨基酸的峰面积;
 - V ——试样水解溶液体积,单位为毫升(mL);
 - c ——标准工作溶液中对对应氨基酸的浓度,单位为纳摩尔每毫升(nmol/mL);
 - M ——氨基酸的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol),各氨基酸摩尔质量见表 A.1;
 - V_{st} ——氨基酸标准溶液进样体积,单位为微升(μ L);
 - A_{st} ——氨基酸标准溶液中对对应氨基酸的峰面积;
 - m ——试样质量,单位为毫克(mg);
 - V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μ L);
 - F ——粗脂肪含量,%。

以两个平行试样测定结果的算术平均值报告结果,保留两位小数。

3.7 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绝对差值,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%。

4 氧化酸水解法

4.1 含硫氨基酸的测定

按 GB/T 15399 的规定执行。

4.2 其他氨基酸的测定

4.2.1 原理

以偏重亚硫酸钠为氧化终止剂时,可测定除酪氨酸、色氨酸以外的其他蛋白水解氨基酸;以氢溴酸

为终止剂时,可测定除酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和色氨酸以外的、包括含硫氨基酸在内的其他氨基酸的含量。

4.2.2 样品前处理

样品前处理按 GB/T 15399 的规定执行。

4.2.3 测定

将含有磺基丙氨酸、蛋氨酸砷与氨基酸标准溶液注入氨基酸自动分析仪,以不同 pH 和离子强度的柠檬酸钠缓冲溶液与茚三酮溶液(3.2.7)作为流动相和衍生剂,调整仪器操作程序及参数、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苏氨酸-丝氨酸、甘氨酸-丙氨酸、亮氨酸-异亮氨酸和蛋氨酸砷-天门冬氨酸的分离度分别不得小于 85%、90%、80%和 85%,其标准溶液色谱图见附录 B 的图 B.3。测定中每 5 个样品(即 10 个单样)为一组,组间插入磺基丙氨酸、蛋氨酸砷与氨基酸标准溶液进行校准。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标准工作溶液相应峰面积的 30%~200%,否则应用柠檬酸钠缓冲溶液(3.2.4)稀释后重测。

4.2.4 试验数据处理

试样中胱氨酸(含半胱氨酸)和蛋氨酸含量的计算同 GB/T 15399。

其他氨基酸的计算,同式(1)、式(2)。

4.2.5 精密度

同 3.7。

5 碱水解法

按 GB/T 15400 的规定执行。

6 酸提取法

6.1 原理

饲料中游离氨基酸以稀盐酸提取,经离子交换色谱分离、茚三酮柱后衍生测定。

6.2 试剂或材料

除特殊说明外,本标准所用试剂均为分析纯。

6.2.1 水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

6.2.2 氢氧化钠:优级纯。

6.2.3 盐酸提取溶液(0.1 mol/L):取 8.3 mL 盐酸(3.2.2)于 1 000 mL 容量瓶中,加 20 mL 硫二甘醇,用水定容,摇匀。

6.2.4 5-磺基水杨酸溶液:称取 6 g 5-磺基水杨酸,加水溶解并定容至 100 mL。

6.2.5 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 4 g 氢氧化钠,溶解于 100 mL 水中。

6.2.6 柠檬酸钠缓冲溶液[pH=2.2, $c(\text{Na}^+)=0.2 \text{ mol/L}$]:同 3.2.4。

6.2.7 氨基酸标准储备溶液:同 3.2.5。

- 6.2.8 氨基酸标准工作溶液:同 3.2.6。
- 6.2.9 不同 pH 和离子强度的柠檬酸钠缓冲溶液与茚三酮溶液:同 3.2.7。

6.3 仪器设备

- 6.3.1 氨基酸自动分析仪:同 3.3.1。
- 6.3.2 天平:同 3.3.2。
- 6.3.3 离心机:同 3.3.6。
- 6.3.4 超声波振荡器。

6.4 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,装入密闭容器中保存,备用。

6.5 试验步骤

6.5.1 样品前处理

6.5.1.1 添加剂预混合饲料

平行做两份试验。称取 1 g~2 g 试样(精确到 0.2 mg),加入盐酸提取溶液(6.2.3)30 mL,用超声波振荡器超声提取 15 min,静置片刻,将上清液过滤至 100 mL 容量瓶中,再用 15 mL~20 mL 水重复提取两次,将上清液过滤到上述容量瓶中,用水冲洗提取瓶和滤纸上的残渣,并定容。若试样提取过程中过滤太慢,也可离心 10 min(4 000 r/min)合并上清液并加水定容。摇匀,滤液供上机测定。

6.5.1.2 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

平行做两份试验。称取试样 2 g~5 g(精确到 0.5 mg) 100 mL 离心管中,加入盐酸提取溶液(6.2.3)50 mL,用超声波振荡器超声提取 30 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液移至 100 mL 容量瓶中,残渣用 45 mL 盐酸提取溶液(6.2.3)重复提取一次,离心后合并上清液,加水定容;准确移取 10 mL 滤液于 50 mL 烧杯中,加 5 mL 5-磺基水杨酸溶液(6.2.4),搅拌 5 min,过滤或离心,除去沉淀,用氢氧化钠溶液(6.2.5)调节滤液或上清液 pH 至 2.2,用柠檬酸钠缓冲溶液(6.2.6)定容至 100 mL,供上机测定。

6.5.2 测定

同 3.5.2。

6.6 试验数据处理

试样中氨基酸含量以其质量分数 $w(\%)$ 计,按式(3)计算:

$$w = \frac{n \times A_i \times V \times c \times M \times V_{st}}{A_{st} \times m \times V_i \times 10^9} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

- 式中:
- n ——试样提取溶液稀释倍数;
 - A_i ——试样溶液中对应氨基酸的峰面积;
 - V ——试样提取溶液体积,单位为毫升(mL);
 - c ——标准工作溶液中对应氨基酸的浓度,单位为纳摩尔每毫升(nmol/mL);
 - M ——氨基酸的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol),各氨基酸摩尔质量见附录中表 A.1;

V_{st} ——氨基酸标准溶液进样体积,单位为微升(μL);

A_{st} ——氨基酸标准溶液中对应氨基酸的峰面积;

m ——试样质量,单位为克(g);

V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μL);

以两个平行试样测定结果的算术平均值报告结果,保留两位小数。

6.7 精密度

同 3.7。



附 录 A
(规范性附录)
各氨基酸的摩尔质量和定量限

各氨基酸的摩尔质量和定量限见表 A.1。

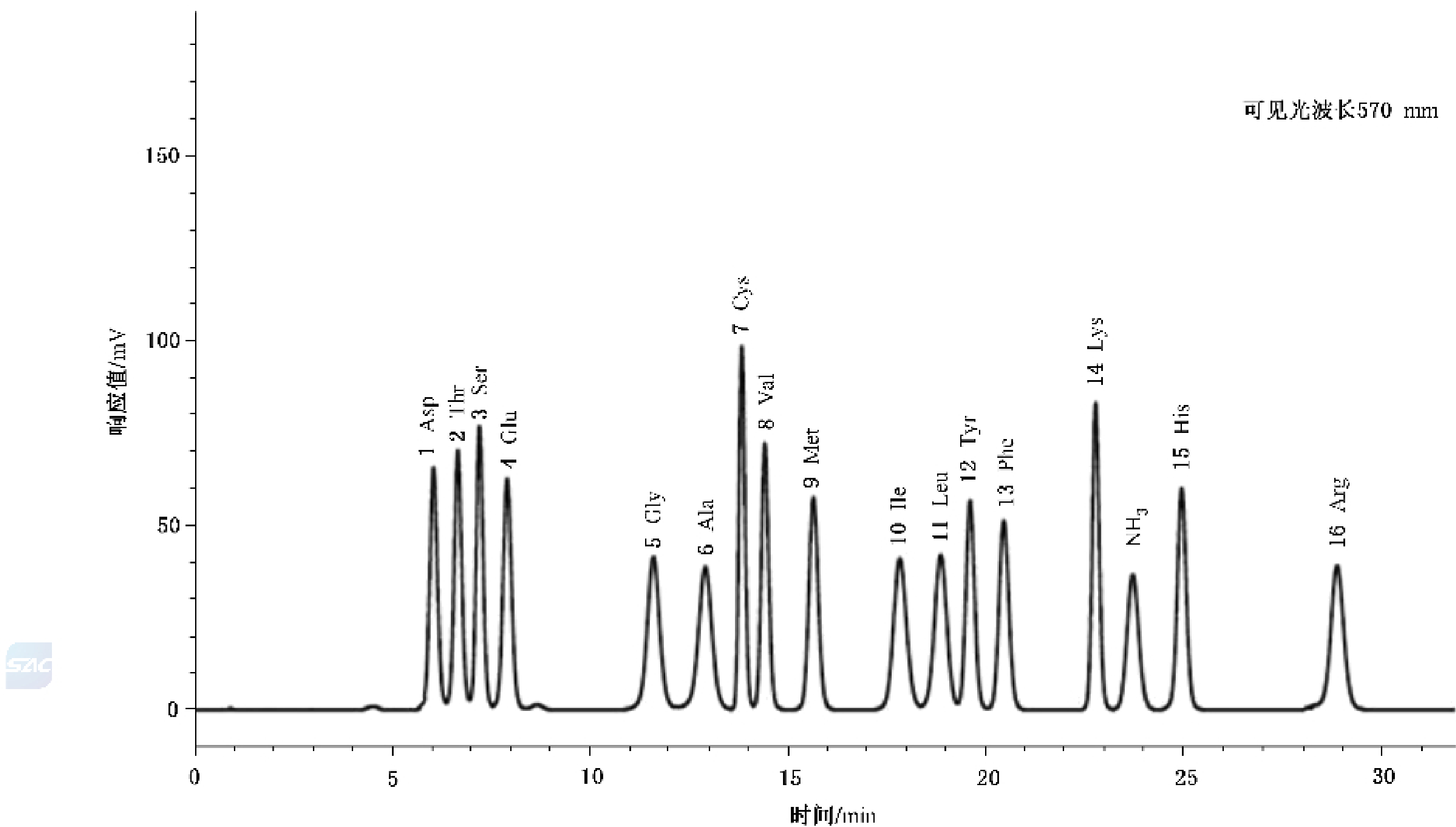
表 A.1 各种氨基酸的摩尔质量和定量限

氨基酸名称	摩尔质量/(g/mol)	定量限/%
天门冬氨酸	133.1	0.04
苏氨酸	119.1	0.03
丝氨酸	105.1	0.03
谷氨酸	147.1	0.03
脯氨酸	115.1	0.06
甘氨酸	75.1	0.02
丙氨酸	89.1	0.02
胱氨酸	240.3	0.01
缬氨酸	117.2	0.03
蛋氨酸	149.2	0.01
异亮氨酸	131.2	0.04
亮氨酸	131.2	0.04
酪氨酸	181.2	0.05
苯丙氨酸	165.2	0.04
赖氨酸	146.2	0.04
组氨酸	155.2	0.04
色氨酸	204.2	0.02(液相色谱法) 0.04(分光光度法)
精氨酸	174.2	0.05

附 录 B
(资料性附录)

氨基酸标准溶液色谱图

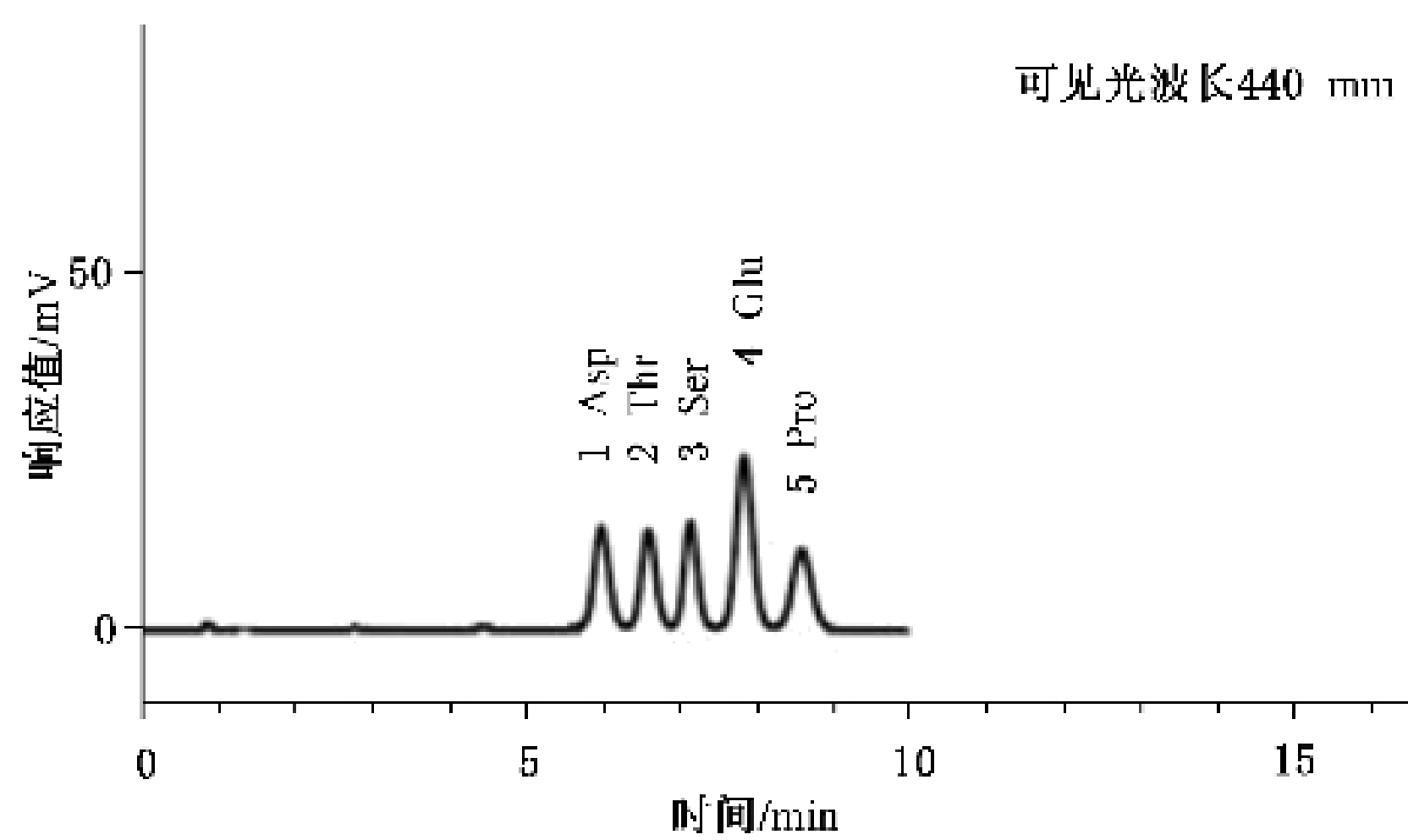
氨基酸标准溶液色谱图(570 nm)、氨基酸标准溶液色谱图(440 nm)和磺基丙氨酸、蛋氨酸砷与氨基酸标准溶液色谱图分别见图 B.1、图 B.2 和图 B.3。



说明:

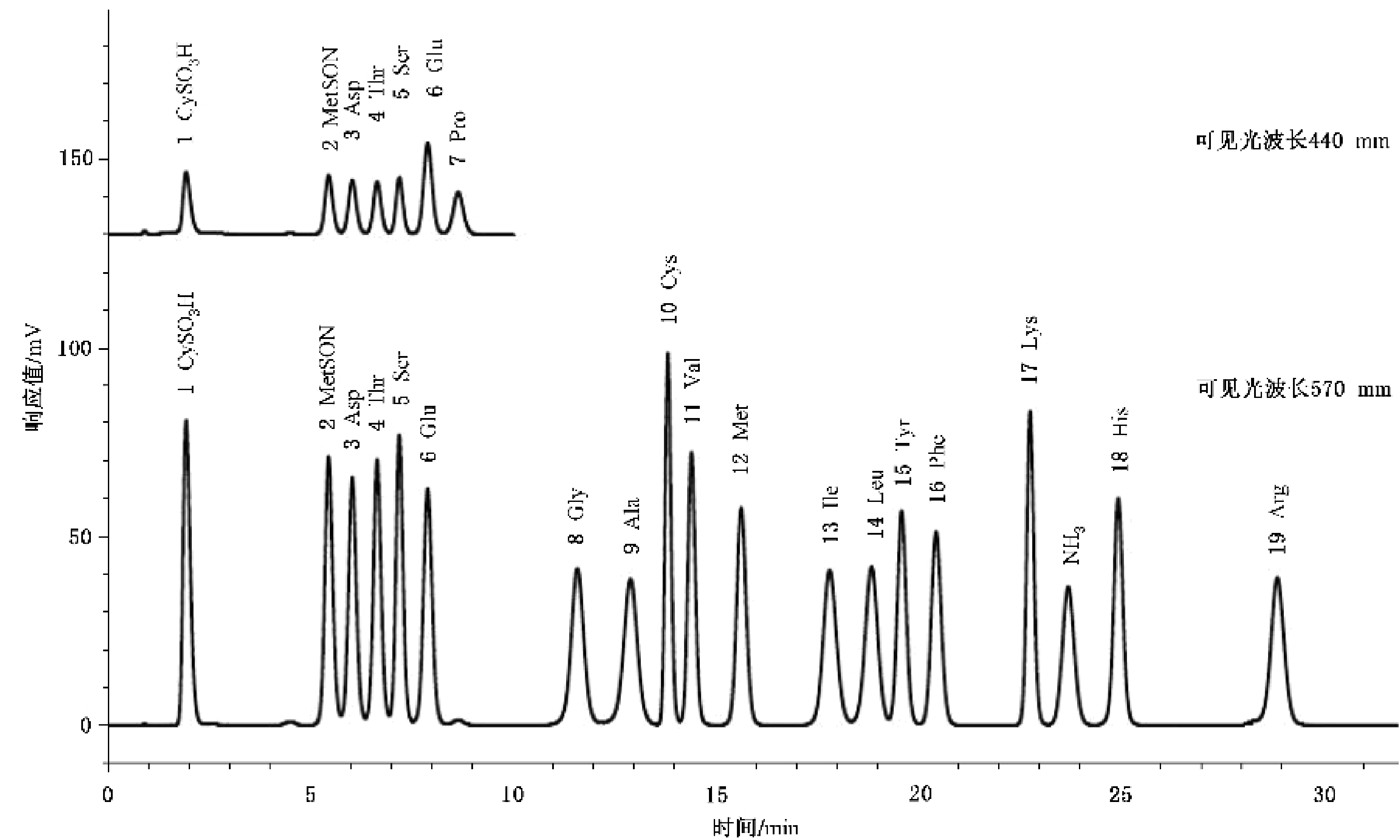
- 1 ——天门冬氨酸(Asp);
- 2 ——苏氨酸(Thr);
- 3 ——丝氨酸(Ser);
- 4 ——谷氨酸(Glu);
- 5 ——甘氨酸(Gly);
- 6 ——丙氨酸(Ala);
- 7 ——胱氨酸(Cys);
- 8 ——缬氨酸(Val);
- 9 ——蛋氨酸(Met);
- 10——异亮氨酸(Ile);
- 11——亮氨酸(Leu);
- 12——酪氨酸(Tyr);
- 13——苯丙氨酸(Phe);
- 14——赖氨酸(Lys);
- 15——组氨酸(His);
- 16——精氨酸(Arg)。

图 B.1 氨基酸标准溶液(100 nmol/mL,570 nm)色谱图



说明：
1——天门冬氨酸(Asp)；
2——苏氨酸(Thr)；
3——丝氨酸(Ser)；
4——谷氨酸(Glu)；
5——脯氨酸(Pro)。

图 B.2 氨基酸标准溶液(100 nmol/mL,440 nm)色谱图



说明：

1 —— 磺基丙氨酸(CySO₃H)；

2 —— 蛋氨酸磺(MetSON)；

3 —— 天门冬氨酸(Asp)；

4 —— 苏氨酸(Thr)；

5 —— 丝氨酸(Ser)；

6 —— 谷氨酸(Glu)；

7 —— 脯氨酸(Pro)；

8 —— 甘氨酸(Gly)；

9 —— 丙氨酸(Ala)；

10—— 胱氨酸(Cys)；

11—— 缬氨酸(Val)；

12—— 蛋氨酸(Met)；

13—— 异亮氨酸(Ile)；

14—— 亮氨酸(Leu)；

15—— 酪氨酸(Tyr)；

16—— 苯丙氨酸(Phe)；

17—— 赖氨酸(Lys)；

18—— 组氨酸(His)；

19—— 精氨酸(Arg)。

图 B.3 磺基丙氨酸、蛋氨酸磺与氨基酸标准溶液色谱图

