



中华人民共和国国家标准

GB/T 36859—2018

饲料中尿素含量的测定

Determination of urea content in feed

(ISO 6654:1991, Animal feeding stuffs—Determination of
urea content, MOD)

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。

本标准使用重新起草法修改采用 ISO 6654:1991《动物饲料 尿素含量的测定》。

本标准与 ISO 6654:1991 相比存在技术性差异,这些差异涉及的条款已通过在其外侧页边空白位置的垂直单线(|)进行了标识,附录 A 中给出了相应技术性差异及其原因的一览表。

本标准与 ISO 6654:1991 相比在结构上有较多调整,附录 B 列出了与 ISO 6654:1991 的章条编号对照一览表。

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)]、新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本标准主要起草人:王石、李丽蓓、朱靖蓉、王成、李胜、王彤。

饲料中尿素含量的测定

1 范围

本标准规定了饲料中尿素含量的测定方法。

本标准适用于饲料原料、精料补充料、配合饲料、浓缩饲料中尿素的测定。

本方法定量限为 0.20%。

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 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

GB/T 14699.1 饲料 采样 (GB/T 14699.1—2005,ISO 6497:2002,IDT)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备 (GB/T 20195—2006,ISO 6498:1998,IDT)

3 原理

试样中的尿素用水提取,经脱色、沉淀蛋白后,与对二甲氨基苯甲醛(DMAB)反应,生成黄色复合物,在 420 nm 波长下测定其吸光度。该吸光度与尿素浓度呈线性关系,通过标准曲线计算试样中尿素的含量。

4 试剂或材料

除特殊注明外,本标准所用试剂均为分析纯和符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.1 活性炭。

4.2 对二甲氨基苯甲醛溶液(DMAB):取 1.6 g DMAB 溶于 100 mL 的无水乙醇中,加入盐酸 10 mL,混匀。贮存在棕色试剂瓶中,常温下有效期为 2 周。

4.3 乙酸锌溶液:溶解 22.0 g 二水合乙酸锌于水中,加 3 mL 冰乙酸,稀释至 100 mL,混匀。

4.4 亚铁氰化钾溶液:溶解 10.6 g 三水合亚铁氰化钾于水中,稀释至 100 mL,混匀。

4.5 磷酸盐缓冲液(pH=7.0):将 3.403 g 无水磷酸二氢钾和 4.355 g 无水磷酸氢二钾分别溶解于约 100 mL 煮沸并冷却的蒸馏水中,合并此溶液用水稀释至 1 000 mL。

4.6 尿素标准储备液:称取 5 g 尿素(优级纯,精确至 0.1 mg)于烧杯中,加水溶解,定量地转移至 500 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度。该溶液浓度为 10 mg/mL。在 4 ℃冰箱中有效期 2 个月。

4.7 尿素标准工作液:临用前准确吸取 10.0 mL 尿素标准储备液(4.6)于 100 mL 容量瓶,用水定容至刻度。该溶液浓度为 1.0 mg/mL。

5 仪器设备

5.1 天平:感量 0.000 1 g。

5.2 分光光度计:配备 30 mm 光径比色皿。

5.3 旋转摇床:30 r/min~40 r/min。

5.4 比色管:25 mL。

5.5 定性滤纸:中速。

6 样品

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的样品,用四分法缩减取样。按照 GB/T 20195 制备试样,粉碎过 0.45 mm 孔径筛,混合均匀,装入密闭容器中保存。

7 试验步骤

7.1 试样溶液制备

平行做两份试样,称取约 1 g 试样(精确至 0.000 1 g),置于 100 mL 容量瓶中,加入 1 g 活性炭(4.1),加水约 70 mL,摇匀,放置 10 min,再分别加入 5 mL 乙酸锌溶液(4.3)和 5 mL 亚铁氰化钾溶液(4.4),振荡提取 30 min。用水定容至刻度,摇匀,静置 10 min。用中速滤纸过滤(5.5),收集滤液。如滤液仍有颜色,应重新称取试样、增加活性炭用量,按上述方法重新振荡提取,直至滤液无色。同时做试样提取溶液的试剂空白。

7.2 标准曲线绘制

准确吸取浓度为 1.0 mg/mL 的标准工作液(4.7)0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL(含尿素 0 mg、0.20 mg、0.40 mg、0.60 mg、0.80 mg、1.00 mg、2.00 mg、5.00 mg)分别置于 25 mL 比色管中(5.4),准确加入 5 mL 磷酸盐缓冲液(4.5),立即加入 5.0 mL 对二甲氨基苯甲醛(DMAB)溶液(4.2),加水至刻度,摇匀,放置 20 min。用 30 mm 光径比色皿,以 0 mL 标准工作液的溶液(试剂空白)为参比,于 420 nm 波长测定吸光度。以尿素含量为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

7.3 试样测定

准确吸取试样溶液(7.1)5 mL~10 mL 于 25 mL 比色管(5.4)中,同 7.2 加入磷酸盐缓冲液和 DMAB 试剂溶液显色,20 min 后,以试剂空白(7.2)为参比,对试样溶液和试样提取溶液的试剂空白(7.1)进行比色测定。测得试样及试样试剂空白的吸光度,在标准曲线上查得其尿素含量,通过计算,即得试样的尿素含量。

8 试验数据处理

试样中尿素含量 w 以质量分数计,数值以%表示,按式(1)计算:

$$w = \frac{(m_1 - m_2) \times V}{m \times V_1 \times 10} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

w ——样品中尿素含量,%;

m_1 ——从标准曲线上查得的试样尿素含量,单位为毫克(mg);

m_2 ——从标准曲线上查得的试样提取溶液试剂空白的尿素含量,单位为毫克(mg);

m ——称取的试样质量,单位为克(g);

V ——试样提取液定容体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——测定时移取试样提取液体积,单位为毫升(mL)。

以两次平行测定结果的算术平均值作为测定结果,保留两位有效数字。

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应符合下述规定:

当试样中尿素含量小于或等于 1.0% 时,不大于这两个测定值算术平均值的 10%;当含量大于 1.0% 时,不大于这两个测定值算术平均值的 5%。

附 录 A

(资料性附录)

本标准与 ISO 6654:1991 的技术性差异及其原因

表 A.1 给出了本标准与 ISO 6654:1991 的技术性差异及其原因。

表 A.1 本标准与 ISO 6654:1991 技术性差异及其原因

本标准章条编号	技术性差异	原因
1	在范围表述上有所调整。将原标准中“饲料”细化为“饲料原料、精料补充料、配合饲料、浓缩饲料”。在范围中增加了方法定量限为 0.20%	适合我国国情。 明确了标准方法的适用性
2	增加了规范性引用文件： GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法 (GB/T 6682—2008, ISO 3696:1987, MOD)； GB/T 14699.1 饲料 采样 (GB/T 14699.1—2005, ISO 6497:2002, IDT)	按照我国标准编写规范，在此添加，以适合我国国情
3	在原理的文字表述上有所调整。方法原理由“试样提取悬浮液在脱色剂存在下进行搅拌。过滤后，滤液中加入 4-二甲氨基苯甲醛(4-DMAB)进行显示反应，在 420 nm 测定的反应溶液的吸光度。”修改为“试样中的尿素用水提取，经脱色、沉淀蛋白后，与对二甲氨基苯甲醛 (DMAB) 反应，生成黄色复合物，在 420 nm 波长下测定其吸光度。该吸光度与尿素浓度呈线性关系，通过标准曲线计算试样中尿素的含量。”	表述更为全面和明确
4.2	对二甲氨基苯甲醛溶液 (DMAB) 的制备过程中使用无水乙醇代替 96% 乙醇对 DMAB 进行溶解	96% 的乙醇与无水乙醇在显色上没有区别，而无水乙醇可直接购买，不需要配制
4.3	乙酸锌溶液制备过程由“取 24 g 二水合乙酸锌，3 g 冰醋酸置于烧杯中，加水溶解并定容至 100 mL”修改为“溶解 22.0 g 二水合乙酸锌于水中，加 3 mL 冰乙酸，稀释至 100 mL，混匀。”	当乙酸锌溶液浓度降低时，提取溶液黏度下降，方法回收率提高。参考 GB/T 19164—2003《鱼粉》中“鱼粉内掺加尿素含量的测定方法”，乙酸锌最佳用量为 22 g
4.5	增加了磷酸缓冲液 (pH = 7.0) 的制备。即“将 3.403 g 无水磷酸二氢钾和 4.355 g 无水磷酸氢二钾分别溶解于约 100 mL 煮沸并冷却的蒸馏水中，合并此溶液用水稀释至 1 000 mL。”	因该溶液在 8.1 中使用，按照我国标准编写规范，应在此添加
4.6	调整了尿素标准溶液配制的表述方式。由“尿素：浓度为 1 g/L。”修改为“尿素标准储备液：称取 5 g 尿素 (优级纯，精确至 0.1 mg) 于烧杯中，加水溶解，定量地转移至 500 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度。该溶液浓度为 10 mg/mL。在 4 ℃ 冰箱中有效期 2 个月。尿素标准工作液：临用前准确吸取 10.0 mL 尿素标准储备液于 100 mL 容量瓶，用水定容至刻度。该溶液浓度为 1.0 mg/mL。”	调整后的表述更加明确和具体，符合我国标准的编写规范

表 A.1 (续)

本标准章条编号	技术性差异	原因
5	增加了天平,中速定性滤纸;删除了水浴	试样称量和提取液过滤同为重要的操作环节,应对该过程使用仪器进行规范;显色反应可在室温下进行,无需用水浴对温度进行控制
5.2	将“厚度为 10 mm 的比色皿”修改为“30 mm 光径比色皿”	调整后的表述更为科学、合理。光径修改为 30 mm 后,检测的灵敏度显著提高,方法的定量限降低
6	添加了“饲料采样”标准	根据我国编写规范进行编写
7.1	将称样量由“称取 2 g(精确到 1 mg)试样。对于尿素含量大于 3%的试样,应将称样量降低至 1 g 或稀释测试溶液,使得样液中尿素含量不超过 0.1 mg/mL(每 500 mL 含 50 mg)。对于低尿素含量的试样,称样量可以相应增加但应保证随后的滤液无色。”修改为“称取约 1 g 试样(精确至 0.000 1 g)”。定容体积由原标准“将试样与 1 g 活性炭转移到 500 mL 容量瓶”修改为“置于 100 mL 容量瓶中。”在振荡提取后,增加了静置 10 min 的步骤	修改后表述更为简练,易操作。 经验证,将称样量调整为 1 g 可满足方法的灵敏度(定量限)和精密度要求。 经验证,将定容体积调整为 100 mL 可满足方法的灵敏度(定量限)和精密度要求。 使样液更易过滤,且该步骤未对检测结果产生影响
7.2	显色反应由“准确移取 5 mL 的无色透明滤液和 5 mL 4-DMAB 溶液放入试管中。混合并在 20 ℃ 水浴中静置 15 min。”修改为“准确吸取浓度为 1.0 mg/mL 的标准工作液……分别置于 25 mL 比色管中,准确加入 5 mL 磷酸盐缓冲液,立即加入 5.0 mL 对二甲氨基苯甲醛(DMAB)溶液,加水至刻度,摇匀,放置 20 min。” 显色反应中出现如下修改: 反应溶液中增加了 5 mL 磷酸缓冲液(pH=7.0)。 反应时间修改为 20 min。 标准曲线由原标准中“加入尿素为 0.05 mg、0.10 mg、0.20 mg、0.25 mg 和 0.50 mg”修改为“含尿素 0 mg、0.20 mg、0.40 mg、0.60 mg、0.80 mg、1.00 mg、2.00 mg、5.00 mg”	在显色反应中加入缓冲液可使显色更稳定,方法精密度得到提升。 经过实验优化,显色反应时间设为 20 min 时,溶液吸光度稳定,满足方法准确性与精密度要求。 线性范围调整,标准适应性提高
7.3	删除原标准中“如果样品中含有小分子的含氮化合物,如氨基酸,可在波长 435 nm 处测量吸光度。”的表述	参考 GB/T 19164—2003 进行修改
8	调整了试验数据处理的表述方式。将表述方式由“试样中尿素含量 X 以质量分数(%)计,按以下公式计算: $c/20 \times m$	调整后的标准更加明确和具体。 根据我国编写规范进行编写

表 A.1 (续)

本标准章条编号	技术性差异	原因
8	其中, c 为从校准曲线查得的样液中的尿素含量, 单位为毫克每毫升(mg/mL); m 是称取试样质量, 单位为克(g)。”修改为“试样中尿素含量 w 以质量分数计, 数值以%表示, 按式(1)计算: $w = \frac{(m_1 - m_2) \times V}{m \times V_1 \times 10}$ 式中: w ——样品中尿素含量, %; m_1 ——从标准曲线上查得的试样尿素含量, 单位为毫克(mg); m_2 ——从标准曲线上查得的试样提取溶液试剂空白的尿素含量, 单位为毫克(mg); m ——称取的试样质量, 单位为克(g); V ——试样提取液定容体积, 单位为毫升(mL); V_1 ——测定时移取试样提取液体积, 单位为毫升(mL)。” 增加了结果保留有效数字的要求	调整后的标准更加明确和具体。 根据我国编写规范进行编写
9	增加了“精密度”一章	适合我国国情

附 录 B
(资料性附录)

本标准与 ISO 6654:1991 相比的结构变化情况

本标准与 ISO 6654:1991 相比在结构上有较多调整,具体章条编号对照情况见表 B.1。

表 B.1 本标准与 ISO 6654:1991 的章条编号对照情况

本标准章条编号	ISO 6654:1991 章条编号
—	3
3	4
4	5
4.1	5.1
4.2	5.2
4.3	5.3
4.4	5.4
4.5	—
4.6	—
4.7	5.5
5.1	—
5.2	6.2
5.3	6.1
5.4	6.3
5.5	—
—	6.4, 6.5
6	7,8
7	9
8	10
9	—
—	11