



中华人民共和国国家标准

GB/T 42491—2023

饲料中淀粉总含量的测定 酶法

Determination of total starch content in feeds—Enzymatic method

(ISO 15914:2004, Animal feeding stuffs—Enzymatic determination of total starch content, MOD)

2023-03-17 发布

2023-10-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

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

本文件修改采用 ISO 15914:2004《动物饲料 总淀粉含量的酶催化测定》。

本文件与 ISO 15914:2004 相比，在结构上有较多调整。本文件与 ISO 15914:2004 结构编号对照一览表见附录 A。

本文件与 ISO 15914:2004 的技术差异及其原因如下：

- a) 更改了适用范围(见第1章)，细化了饲料产品类型；
- b) 更改了淀粉含量定义(注)中含量的表示(见3.2)，将 g/kg 修改为%，并对本文件中葡萄糖标准溶液浓度和计算公式做了相应更改，以适应我国业内的习惯表示；
- c) 增加了淀粉葡萄糖苷酶活测定方法(见附录 B)和酶用量调整说明以及对酶的要求(见5.12)，为方法使用者提供便利；
- d) 更改了40%乙醇溶液配制(见5.2)，以符合我国常用分析纯乙醇试剂的实际情况；
- e) 更改了己糖激酶法定量测定葡萄糖试剂盒的规定(见5.13)，便于方法的使用；
- f) 增加了样品制备的细度要求(见第7章)，符合我国样品制备要求；
- g) 更改、简化了二甲亚砷分散处理试样的程序(见8.2)，为方法使用者提供便利；
- h) 增加了水解振荡速率要求(见8.2.2)，有利于方法的应用；
- i) 更改了精密度的表述和要求(见第10章)，有利于方法的应用；
- j) 删除了检验报告，符合我国标准结构。

本文件做了下列编辑性改动：

——将文件名称更改为《饲料中淀粉总含量的测定 酶法》。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：广州汇标检测技术中心、广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所、广东农科监测科技有限公司。

本文件主要起草人：潘浣钰、王智民、万凯、王威利、周振新、卢丽枝、商方方、郝燕娟、陈诗欣、刘海燕、闵曼、冯敬宾、刘芳芳、何绮霞。

饲料中淀粉总含量的测定 酶法

1 范围

本文件描述了饲料和饲料原料中淀粉总含量的酶法测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料中淀粉总含量的测定,同时适用于纯淀粉的含量测定。

本文件不适用于基质中含有在 340 nm 波长处影响吸光度的成分的试样。

本文件方法定量限为 4%。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法(ISO 3696:1987,MOD)

注:GB/T 6682—2008 被引用的内容与 ISO 3696:1987 被引用的内容没有技术上的差异。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

淀粉 starch

由 1,4- α -D-葡萄糖单位组成的无分支长直链(直链淀粉)和/或在 α -1,6 位形成支链的 α -1,4-糖苷键连接的葡萄糖单位(支链淀粉)组成的天然植物性多聚物。

3.2

淀粉含量 starch content

根据本文件测定的不溶于 40% 乙醇的淀粉及其高分子降解产物的质量分数。

注:以百分数(%)表示。

4 原理

试样用 40% 乙醇除去可溶性糖,经 90% 二甲基亚砷溶液 100 °C 分散,用浓盐酸 60 °C 溶解并部分分解,试样中的淀粉再用淀粉葡萄糖苷酶进一步定量酶解为葡萄糖,葡萄糖的量用己糖激酶法测定,换算成淀粉含量^[3,4]。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682—2008,三级水。

5.2 乙醇溶液(40%):量取95%乙醇421 mL,加水稀释至1 000 mL,混匀。

5.3 盐酸(HCl)(12 mol/L)。

5.4 氢氧化钠溶液(4 mol/L):称取氢氧化钠40 g,溶于约50 mL水中,冷却后,定量转移至250 mL容量瓶中,用水稀释至刻度,混匀。

5.5 乙酸溶液(2 mol/L):量取59 mL冰乙酸,用水稀释并定容至500 mL,混匀。

5.6 乙酸钠溶液(2 mol/L):称取无水乙酸钠82.0 g,加水溶解并定容至500 mL,混匀。

5.7 乙酸钠缓冲溶液(2 mol/L, pH4.8):取乙酸溶液(5.5)41 mL,与乙酸钠溶液(5.6)59 mL混合,用乙酸或乙酸钠溶液调节pH至4.8,临用现配。

5.8 二甲基亚砜(DMSO)水溶液(90%):二甲基亚砜+水=9+1。

5.9 Carrez澄清溶液,配制方法如下。

5.9.1 亚铁氰化钾溶液(0.25 mol/L):称取三水合亚铁氰化钾106 g,加水溶解并定容至1 000 mL,混匀。

5.9.2 乙酸锌溶液(1 mol/L,溶于0.5 mol/L乙酸):称取二水合乙酸锌219.5 g置于1 000 mL容量瓶中,加水溶解,加冰乙酸30 g溶于水,用水稀释并定容至1 000 mL,混匀。

5.10 碘-碘化钾溶液:称取碘12.7 g和碘化钾24.0 g,用水溶解并稀释至1 000 mL,棕色瓶保存。临用前稀释10倍使用。

5.11 葡萄糖标准溶液的配制包括以下两种。

5.11.1 葡萄糖标准溶液I(用于淀粉含量大于20%的试样):葡萄糖标准溶液($\rho=3.5$ g/L):称取三份350 mg无水葡萄糖(精确至1 mg)分别置于100 mL的容量瓶中,用水稀释至刻度,临用现配。

5.11.2 葡萄糖标准溶液II(用于淀粉含量在4%~20%的试样):葡萄糖标准溶液($\rho=0.7$ g/L):称取三份350 mg无水葡萄糖(精确至1 mg)分别置于500 mL容量瓶中,用水稀释至刻度,临用现配。

5.12 淀粉葡萄糖苷酶溶液,含量160 U/mL。

称取适量淀粉葡萄糖苷酶(AMG)[EC 3.2.1.3(源于黑曲霉)],溶于9 mL水与1 mL乙酸钠缓冲溶液(5.7)混合溶液。应使用不含游离葡萄糖的AMG,先依注1的酶活定义测定酶活,具体方法见附录B,并根据酶活调整酶的称取量。AMG的贮存和使用见产品说明书。

酶活按照附录B进行测定,并根据酶活调整酶的称取量。

注1:不同供应商供应的酶酶活定义不同。本文件中AMG的活性单位定义为在25℃、pH4.75条件下,1 min从糖原中释放1 μ mol葡萄糖的AMG的量即为1单位AMG。

注2:10 mL酶溶液能测定75个试样。

5.13 D-葡萄糖紫外测试试剂盒,用于定量测定葡萄糖含量,使用己糖激酶法,按试剂盒说明书进行配制、操作和保存。

5.13.1 底物-缓冲溶液:按照试剂盒说明书配制。

5.13.2 酶溶液:按照试剂盒说明书配制。

5.13.3 显色剂:按照试剂盒说明书配制。

6 仪器设备

6.1 分析天平:精度0.1 mg。

6.2 离心机:最大转速不低于6 000 r/min。

6.3 恒温水浴锅:控温精度 ± 2 ℃。

6.4 恒温水浴锅:控温精度 ± 1 ℃。

6.5 pH计:精度 ± 0.01 。

- 6.6 可调移液器:100 μL 、1 000 μL 、5 mL。
- 6.7 紫外可见分光光度计(带 1 cm 石英比色皿)或酶标仪。
- 6.8 振荡器:转速大于或等于 100 r/min。
- 6.9 比色管:100 mL,可用于复合玻璃电极测量 pH,宽颈,配备磨砂玻璃接头。
- 6.10 旋涡混合器。
- 6.11 恒温水浴振荡器:控温精度 $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,150 r/min~200 r/min,而且能使试管在水浴中固定并平放。
- 6.12 离心管:塑料或玻璃离心管,带盖,可密封,大于 20 mL。
- 6.13 玻璃珠:直径 3 mm。

7 样品

按 GB/T 20195—2006 制备试样,至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入容器中,密闭保存,备用。

8 试验步骤

8.1 可溶性糖的去除

平行做两份试验。称取试样约 0.2 g,精确至 0.1 mg。分别放入两支离心管(6.12)中,加入 10 mL 乙醇溶液(5.2),水平放置在振荡器上,以 100 r/min 振荡 10 min 后,用 1 300 r/min 离心 10 min,弃去上清液,残渣重复提取一次,弃去上清液,残渣按 8.2 继续操作。

8.2 淀粉溶解和部分分解

8.2.1 分散

向残渣(8.1)中加入 15 颗玻璃珠(6.13),边涡旋边向试样中加入 10.0 mL DMSO 水溶液(5.8),继续涡旋混合直至悬浮液均匀无结块,旋紧管盖。同时取一支洁净的离心管作为试样空白溶液,除不加试样外,与试样平行进行操作。

注:在添加二甲基亚砜的过程中,确保样品均质化,防止形成微凝胶和结块。微凝胶和结块会导致结果偏低。

8.2.2 部分水解

将离心管水平放置在恒温振荡器中,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 150 r/min,振荡 30 min,冷却后,加入 1.7 mL 盐酸(5.3),混匀。盖好管盖,置 $(60\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡水解 30 min。

8.2.3 调节 pH

冷却后,将 8.2.2 离心管内容物定量转移至 100 mL 比色管,加入氢氧化钠溶液(5.4)5.0 mL 和乙酸钠缓冲液(5.7)2.5 mL,混匀,用 pH 计准确测定溶液的 pH 后,用稀盐酸溶液或氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.8 ± 0.1 ,用水冲洗 pH 电极,洗液并入比色管中,用水稀释至刻度。

8.3 将淀粉酶解为葡萄糖

将比色管中的试样溶液(8.2.3)充分摇匀,迅速用移液管取 5.00 mL 置于干净离心管中,加入 0.125 mL AMG 酶溶液(5.12),旋紧管盖,混匀,在 $(60\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 16 h 以上,于沸水浴中灭活 15 min,取出冷却至室温,加入亚铁氰化钾溶液(5.9.1)0.125 mL 涡旋 1 min,再加入乙酸锌溶液(5.9.2)0.125 mL 涡旋 1 min。离心管中溶液的量 5.375 mL,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

向离心管剩余残渣中加入少量水,煮沸 10 min,冷却,加碘溶液(5.10)0.2 mL,若出现蓝色,说明淀粉酶解不完全,应重新从 8.1 检测该试样。

8.4 用酶法测定葡萄糖的含量

8.4.1 淀粉含量在 20% 以上试样:分别准确移取试样溶液(8.3)、试样空白溶液(8.2.1)、三个葡萄糖标准溶液 I (5.11.1)和水空白溶液各 0.5 mL,准确加水 9.5 mL,混匀。

8.4.2 淀粉含量在 4%~20% 试样:分别准确移取试样溶液(8.3)、试样空白溶液(8.2.1)、三个葡萄糖标准溶液 II (5.11.2)和水空白溶液各 0.5 mL,准确加水 1.5 mL,混匀。

如果预期试样淀粉含量较低(<20%),酶解淀粉时,可用其他的稀释比例,以提高测定的灵敏度。此时需用相同比例稀释试样空白溶液及葡萄糖标准溶液,确保测定结果更加准确。

8.4.3 按试剂盒说明书进行操作,以水作对照,在 340 nm 处测定吸光度。

9 试验数据处理

9.1 标准校正

使用公式(1)计算每个葡萄糖标准溶液的校正吸光度值。

$$E_{1gs} = E_{0gs} - E_{0wb} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

E_{1gs} ——葡萄糖标准溶液的校正吸光度数值;

E_{0gs} ——葡萄糖标准溶液的吸光度数值;

E_{0wb} ——水空白溶液的吸光度平均值。

水空白溶液的平均校正吸光度值(根据定义)等于零。

使用线性回归分析,根据校正后的吸光度值与未稀释的标准葡萄糖溶液的葡萄糖含量(以 g/L 为单位)计算校正吸光度值到葡萄糖含量的转换值 K (K 值等于未稀释的标准葡萄糖溶液的葡萄糖含量与校正吸光度数值的比值),三个葡萄糖标准溶液所求得的 K 值取平均值进行试样溶液的葡萄糖含量(ρ_g)计算。

使用公式(2)计算每个试样溶液的校正吸光度值。

$$E_{1s} = E_{0s} - E_{0sb} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

E_{1s} ——试样溶液的校正吸光度的数值;

E_{0s} ——试样溶液的吸光度;

E_{0sb} ——试样空白溶液吸光度平均值。

用 E_{1s} 从葡萄糖标准溶液线性校准图查出或线性回归方程计算得出试样溶液中葡萄糖的浓度 ρ_g 。

校准曲线的可靠性说明及排除试样基质对试样吸收影响的方法见附录 C。

9.2 淀粉含量

淀粉含量 w_s 以 % 表示,按公式(3)计算。

$$w_s = \frac{\rho_g \times \frac{V}{V_1} \times V_2 \times 0.9}{1\,000 \times m_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

ρ_g ——根据标准图或回归方程算出的试样溶液的葡萄糖含量,单位为克每升(g/L);

V ——8.2.3 试样调节 pH 后定容的体积(100 mL),单位为毫升(mL);

V_1 ——8.3 中所用的淀粉溶液体积(5.00 mL),单位为毫升(mL);
 V_2 ——用酶将淀粉转化为葡萄糖时的溶液总体积(5.375 mL),单位为毫升(mL);
0.9 ——葡萄糖折算成淀粉的换算系数;
 m_0 ——试样质量,单位为克(g)。
结果四舍五入,保留至小数点后一位。
用公式(3)计算淀粉含量时,应对 8.4 的试样进行与 5.11 的葡萄糖标准溶液相一致的稀释。

10 精密度

综合附录 D 实验室间联合试验的结果及本文件试验研究中测试的数据,认定在重复性条件下,两次独立测试结果的绝对差值,与其算术平均值的比值 d 应符合表 1 要求。

表 1 精密度要求

淀粉含量(w_s)/%	d /%
$4 \leq w_s < 20$	≤ 15
$20 \leq w_s < 50$	≤ 12
$w_s \geq 50$	≤ 5

附 录 A

(资料性)

本文件与 ISO 15914:2004 结构编号对照表

本文件与 ISO 15914:2004 相比在结构上有所调整,结构编号对照情况见表 A.1。

表 A.1 本文件与 ISO 15914:2004 的结构编号对照表

本文件结构编号	ISO 15914:2004 结构编号
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
6.1	6.1
6.2	6.2
6.3	6.3
6.4	6.4
6.5	6.5
6.6	6.6
6.7	6.7
6.8	6.8
6.9	6.12
6.10	6.13
6.11	6.14
6.12	6.15
6.13	6.16
7	7
8	8
8.1	8.1,8.2,8.3
8.2	8.4
8.2.1	8.4.1,8.4.2,8.4.3
8.2.2	8.4.2,8.4.3
8.2.3	8.4.4
8.3	8.5
8.4	8.6
8.4.1	8.6.1

表 A.1 本文件与 ISO 15914:2004 的结构编号对照表（续）

本文件结构编号	ISO 15914:2004 结构编号
8.4.2	8.6.2
8.4.3	8.6.2
9	9
10	—
—	11
附录 A	—
附录 B	—
附录 C	附录 C
附录 D	附录 B,10.1,10.2,10.3

附 录 B

(规范性)

淀粉葡萄糖苷酶酶活测定方法

B.1 原理

在 pH4.75 的缓冲溶液中,以糖原作为底物,加入待测的淀粉葡萄糖苷酶,于 25 ℃ 水浴中准确孵育 5 min,之后终止反应,测定葡萄糖含量。

B.2 试剂或材料

B.2.1 乙酸溶液(2 mol/L):同 5.5。

B.2.2 乙酸钠溶液(2 mol/L):同 5.6。

B.2.3 乙酸钠缓冲溶液 I (2 mol/L, pH4.8):同 5.7。

B.2.4 乙酸钠缓冲液 II (0.2 mol/L):取乙酸钠缓冲液 I (B.2.3)与水以 1:9 的比例混合,用乙酸或乙酸钠溶液调节 pH 至 4.75,临用现配。

B.2.5 糖原溶液:称取牡蛎源糖原 80 mg 溶于 10 mL 水中,混匀。

B.2.6 Tris 溶液(0.3 mol/L):取 Tris 试剂(三羟甲基氨基甲烷, $C_4H_{11}NO_3$) 363 mg 溶于 10 mL 水中,混匀。

B.3 仪器设备

B.3.1 分析天平:精度 0.1 mg。

B.3.2 离心机:最大转速不低于 6 000 r/min。

B.3.3 具塞试管。

B.3.4 恒温水浴锅:可调精度 ± 1 ℃。

B.3.5 pH 计:精确至 0.01。

B.3.6 可调移液器:100 μ L、1 000 μ L、5 mL。

B.3.7 紫外可见分光光度计:带 1 cm 石英比色皿。

B.3.8 旋涡混合器。

B.3.9 秒表或定时器。

B.4 试验步骤

B.4.1 样品:平行做两份试验,量取 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲溶液(B.2.4)0.54 mL 和糖原溶液(B.2.5)0.25 mL,置具塞试管中,混合,置于 25 ℃ 水浴中预热 5 min,加淀粉葡萄糖苷酶试样 0.01 mL,混合,置于 25 ℃ 水浴中精确计时反应 5 min,迅速、准确地加入 0.3 mol/L Tris 溶液(B.2.6)0.2 mL,于沸水浴中加热 5 min,停止反应。参照 8.4 的方法测定葡萄糖含量 m_1 。

B.4.2 空白溶液:量取 0.2 mol/L 乙酸缓冲液(B.2.4)0.54 mL 和糖原溶液(B.2.5)0.25 mL,置具塞试管中,混合,置于 25 ℃ 水浴中预热 5 min,随后加入 0.3 mol/L Tris 溶液(B.2.6)0.2 mL,混合,加淀粉葡萄糖苷酶试样 0.01 mL,于沸水浴加热 5 min,停止反应。参照 8.4 的方法测定葡萄糖含量 m_0 。

B.5 酶活计算

试样中淀粉葡萄糖苷酶酶活以 X 表示,按式(B.1)计算。

$$X = \frac{(m_1 - m_0) \times N}{180 \times 5 \times 0.01 \times m}$$

..... (B.1)

- 式中：
- m_1 —— 试样中葡萄糖的含量,单位为微克(μg)；
 - m_0 —— 空白溶液中葡萄糖的含量,单位为微克(μg)；
 - N —— 酶的稀释倍数；
 - 180 —— 葡萄糖的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol)；
 - 5 —— 反应时间,单位为分(min)；
 - 0.01 —— 反应的酶液的体积,单位为毫升(mL)；
 - m —— 试样的质量或体积,单位为毫克(mg)或毫升(mL)。

附 录 C

(资料性)

操作程序中的注意事项

C.1 从统计学角度看,基于一个空白溶液和一个标准溶液,每个测定做三个重复,以线性回归方法计算得到的校准曲线,比用一个空白溶液和五个不同浓度的标准溶液,每个测定做一次得到的校准曲线的可靠性要好。

C.2 本方法假设试样基质对试样的吸收无影响,但每次做新基质的试样时都需要按下述方法证明这一点。

制备不含己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸一脱氢酶的显色剂(5.13.3),取稀释过的试样溶液(按 8.4.3),同时准备一个试样空白溶液于玻璃试管中,按测定方法将试样溶液与试样空白溶液分别和不含己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸一脱氢酶的显色液混合,反应 30 min~60 min 后于 340 nm 处,测定其吸光度,试样溶液与试样空白溶液吸光度之差不应超过 0.002,如差异大于此值,则本方法不能用于该试样。本文件研究的试样基质,包括淀粉、动物饲料、谷物(玉米、小麦、印第安粟)、冷冻干燥的马铃薯,均能满足此要求。

附 录 D
(资料性)
实验室间联合试验结果

D.1 实验室间试验是在 1998 年根据 ISO 5725-2 进行的,有 12 个实验室参加试验,研究的试样包括脱水木薯、蛋鸡料、小猪料、豌豆和奶牛复合饲料。统计得出的精密度试验结果见表 D.1。

表 D.1 实验室间对比试验的统计结果

统计项目	样 品				
	1	2	3	4	5
剔除界外值后保留的实验室数	9	10	9	8	10
可接受的结果数	18	20	18	16	20
淀粉含量平均值/%	45.6	44.7	23.3	70.4	39.4
重复性标准偏差(s_r)/%	0.5	0.6	0.5	0.5	1.7
重复性变异系数/%	1.1	1.3	2.1	0.7	4.3
重复性限(r) $[2.8\times s_r]$	1.4	1.7	1.4	1.4	4.8
再现性标准偏差(s_R)/%	1.8	0.9	1.3	1.2	1.7
再现性变异系数/%	3.9	2.0	5.6	1.7	4.3
再现性限(r) $[2.8\times s_R]$	5.0	2.5	3.6	3.4	4.8
1——豌豆; 2——小猪料; 3——牛饲料; 4——脱水木薯; 5——蛋鸡料。					

D.2 根据 D.1 提出的精密度要求

D.2.1 重复性

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测定方法,在短时间内,对同一被测试样,相互独立进行测定获得两个测定结果之间的绝对偏差,超过以下给出的重复性限 r 值的情况不大于 5%。

- 豌豆、奶牛复合饲料和木薯:1.4%;
- 小猪饲料:1.7%;
- 蛋鸡饲料:4.8%。

D.2.2 再现性

在不同实验室,由不同的操作者使用不同的设备,按相同的测定方法,对同一被测试样,相互独立进行测定获得两个测定结果之间的绝对偏差,超过以下给出的重复性限 R 值的情况不大于 5%:

- 小猪料:2.5%;
- 木薯:3.4%;
- 奶牛复合饲料:3.6%;
- 蛋鸡饲料:4.8%;
- 豌豆:5.0%。

参 考 文 献

- [1] ISO 5725-1:1994 Accuracy(trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions
- [2] ISO 5725-2 Accuracy(trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
- [3] BRUNT K., SANDERS P. and ROZEMA T. The enzymatic determination of starch in food, feed and raw materials of the starch industry. *Starch/Stärke*, 50, 1998, pp.413-419
- [4] Method of enzymatic bioanalysis and food analysis. Boehringer Mannheim, 1995, pp. 46-49 and 126-129
- [5] MILLER J.C. and MILLER J.N. Statistics for analytical chemistry, 2nd edition, 1992, pp.112-115, Ellis Horwood, New York, London, Toronto, Sydney, Tokyo, Singapore
- [6] BRUNT K. Collaborative study concerning the enzymatic determination of starch in food, feed, and raw material for the starch industry. *Starch/Stärke*, 52, 2000, pp.73-75
-