

**发布**

国家市场监督管理总局

**中国国家标准化管理委员会**

××××-××-××实施

××××-××-××发布

**饲料中游离棉酚的测定 分光光度法**

**Determination of free gossypol in feeds—**

**Spectrophotometric method**

（送审稿）

 GB/T 13086-××××

 代替GB/T 13086-1991

中华人民共和国国家标准

ICS 65.120

B46

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 13086-1991《饲料中游离棉酚的测定方法》。

本标准与 GB/T 13086-1991 相比，除编辑性修改外，主要技术差异如下：

── 适用范围修改为“棉籽、棉籽蛋白、其他棉籽加工产品和含有这些物质的配合饲料、精料补充料中游离棉酚的测定”（见1，1991年版的1）。

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这些专利的责任。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC76）提出并归口。

本标准起草单位：江西兽药饲料监察所[农业农村部饲料质量监督检验测试中心（南昌）]。

本标准主要起草人：

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

── GB/T 13086-1991。

**饲料中游离棉酚的测定方法 分光光度法**

1 范围

本标准规定了饲料中游离棉酚的分光光度测定方法。

本标准适用于棉籽、棉籽蛋白、其他棉籽加工产品和含有这些物质的配合饲料、精料补充料中游离棉酚的测定。

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 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的游离棉酚用含3-氨基-1丙醇的异丙醇-正己烷混合溶剂提取，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。

4 试剂或材料

除特殊说明外，所有使用的试剂均为分析纯。

4.1 水： GB/T 6682，二级。

1. 4.2 异丙醇。
2. 4.3 正己烷。
3. 4.4 冰乙酸。
4. 4.5 苯胺：如果测定的空白试剂吸光度超过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（2～4℃）冰箱中。
5. 4.6 3-氨基-1-丙醇。
6. 4.7 异丙醇-正己烷混合溶液：异丙醇+正己烷 = 6+4。
7. 4.8 溶剂A：量取约500 mL异丙醇-正己烷混合溶液（4.7）、2 mL3-氨基-1-丙醇（4.6）、8 mL冰乙酸（4.4）和50 mL水于1000 mL容量瓶中，再用异丙醇-正己烷混合溶液（4.7）定容至刻度。

5 仪器设备

5.1分光光度计：带10 mm比色皿，可在440 nm处测定吸光度。

5.2 分析天平：感量0.000 1 g和0.01 g。

5.3振荡器：可放置250 mL锥形瓶，往复，不低于120次/min。。

5.4实验用粉碎机。

5.5 水浴锅：温度可控，温控精度：±1 ℃，温度范围：室温～100 ℃，可放置25 mL容量瓶。

1. 5.6 具塞锥形瓶：250 mL、100 mL。
2. 5.7 容量瓶：25 mL，棕色。
3. 5.8 移液管：5 mL、10 mL。

5.9 玻璃表面皿：直径60 mm。

1. 5.10 定量滤纸：中速，直径11 cm。

6 试样的制备

按照GB/T 20195规定制备试样，至少200 g，粉碎使其全部过2.8 mm孔径分析筛，混合均匀，装入密闭容器中，备用。

7 试验步骤

7.1 试样溶液提取

平行做两份试验。准确称取1~2 g（精确到0.000 1 g）试样，置于250 mL 具塞锥形瓶中，加入玻璃珠20粒；准确加入50 mL 溶剂A（4.8），于室温下120 次/min振荡提取1 h。用中速定量滤纸过滤，过滤时在漏斗上加盖玻璃表面皿，弃去最初的5 mL滤液，收集滤液至100 mL具塞锥形瓶，作为试样溶液备用。

7.2 试样溶液制备

7.2.1 用移液管（5.8）吸取双等份滤液（7.1）5~10 mL（每份约含50~100 μg的棉酚）分别至两个25 mL棕色容量瓶（5.7）a和b中，如果需要，用溶剂A（4.8）补充至10 mL。

7.2.2 用异丙醇-正己烷混合溶液（4.7）稀释瓶a至刻度，摇匀，该溶液用作试样测定溶液的参比溶液。

7.2.3 用移液管吸取两份10 mL的提取溶剂（4.8）分别至两个25 mL棕色容量瓶（5.7）a0和b0中。

7.2.4 用异丙醇-正己烷混合溶液（4.7）稀释瓶a0至刻度，摇匀，该溶液用作空白测定溶液的参比溶液。

7.2.5 加2.0 mL苯胺（4.5）于容量瓶b和b0中，在沸水浴上加热30 min显色。取出，冷却至室温，用异丙醇-正己烷混合溶液（4.7）定容，摇匀，静置1 h。

7.3 样品测定

用10 mm比色皿，在波长440 nm处，用分光光度计（5.1）以a0为参比溶液测定空白溶液b0的吸光度A1，以a为参比溶液测定试样溶液b的吸光度A2，从试样溶液的吸光度值减去空白溶液的吸光度值，得到校正吸光度A。

试样溶液的校正吸光度计算按照公式（1）计算：

*A=A2-A1*………………………………………………………（1）

式中：

*A*——试样溶液校正吸光度；

*A2*——试样溶液的吸光度；

*A1*——空白溶液的吸光度。

8 试验数据处理

8.1 计算公式

试样中游离棉酚的含量以质量分数 *w* 计，单位以毫克每千克（mg/kg）表示，按公式（2）计算：

……………（2）

式中：

*A* —— 试样溶液校正吸光度；

*V* —— 测定用滤液的体积，单位为毫升（mL）；

*m* —— 试样质量，单位为克（g）；

*a* —— 质量吸收系数，游离棉酚为62.5 cm-1.g-1.L.

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字，结果表示到20 mg/kg。

8.2 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果之间的绝对差值：

在游离棉酚含量小于500 mg/kg时，不得超过算术平均值的15 %；

在游离棉酚含量大于500 mg/kg而小于750 mg/kg时，不得超过75mg/kg；

在游离棉酚含量大于750 mg/kg时，不得超过算术平均值的10 %。