ICS 65.120
CCS B 46

中华人民共和国国家标准

GB/T ××××××—202×

饲料中淀粉总含量的测定　酶法

Enzymatic determination of total starch content in feeds

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

（公开征求意见稿）

202×-××-××发布　　202×-××-××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章条编号变化对照一览表见附录A。

本文件与ISO 15914:2004相比，主要技术变化如下：

a) 修改了适用范围（见第1章）；

b) 增加了酶的种类（见第5章）；

c) 根据我国分析纯乙醇试剂实际情况，40%乙醇溶液配制使用的96%乙醇更改为95%乙醇，使用量由417 mL更改为421 mL（见5.1）；

d) 删去部分仪器（见第6章）；

e) 更改了样品制备方法（见第7章）；

f) 将试验步骤中8.1、8.2、8.3合并成8.1（见8.1）；

g) 水解中100℃水浴增加了振荡速度150 r/min，将试验步骤中8.4.1、8.4.2及8.4.3简化并合成为8.2.1和8.2.2（见8.2）；

h) 淀粉测定结果由“以克每千克（g/kg）计”更改为“以百分含量（%）计”（见9.2）；

i) 增加了精密度的表述和要求（见10.4）。

本文件做了下列编辑性改动：

a) 标准名称更改为“饲料中淀粉总含量的测定 酶法”；

b) 用“本文件”代替ISO标准文件提及自身时的表述；

c) 用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”；

d) 删除了国际标准的前言；

e) 增加了本文件的前言；

f) 规范性引用文件引用了GB/T 6682-2008（ISO 3696:1987，MOD）和GB/T 20195-2006 （ISO 6498:1998，IDT）；

g) 增加了附录A；

h) 增加了附录B。

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）归口。

本文件起草单位：广州汇标检测技术中心、广东省农科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：×××、×××、×××、×××。

本文件为首次发布。

饲料中淀粉总含量的测定　酶法

1　范围

本文件描述了饲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。

本文件同时适用于纯淀粉的含量测定。

本文件不适用于含有在340 nm波长时影响吸光度的成分的试样。

本文件定量限为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 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682－2008，ISO 3696:1987，MOD）

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：淀粉含量以%表示。

4　原理

先将试样中的可溶性糖用 40 %乙醇除去，再用 90%二甲基亚砜溶液 100 ℃处理，并用浓盐酸 60 ℃溶解和部分分解试样中的淀粉，再用淀粉葡萄糖苷酶进一步酶解为葡萄糖，葡萄糖量经己糖激酶法测定后，换算成淀粉含量[1,2]。

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 6682，三级。

5.2　40%乙醇溶液：量取95 %乙醇（C_2H_5OH）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（NaOH）40 g，溶于约50 mL水中，冷却后，定量转移至250 mL容量瓶中，用水稀释并定容至250 mL，混匀。

5.5　乙酸溶液（2 mol/L）：量取59 mL冰乙酸（CH_3COOH），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（CH_3COONa）82.0 g，加水溶解并定容至500 mL，混匀。

5.7　乙酸钠缓冲液（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，现配现用。

5.8　90%二甲基亚砜（C_2H_6OS，DMSO）水溶液：二甲基亚砜+水=9：1。

5.9　澄清溶液，根据Carrez配制如下：

5.9.1　亚铁氰化钾溶液（0.25 mol/L）：称取亚铁氰化钾三水合物[$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] 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）：取219.5 g乙酸锌 [$Zn(CH_3CO_2)_2 \cdot 2H_2O$]和30 g冰乙酸溶于水，用水稀释并定容至1 000 mL，混匀。

5.10　碘-碘化钾溶液：称取碘（I_2）12.7 g和碘化钾（KI）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：

5.11.1　葡萄糖标准溶液Ⅰ：对于淀粉含量大于20%的试样，制备三个葡萄糖标准溶液（c=0.019 4 mol/L）。分别称取350 mg无水葡萄糖（$C_6H_{12}O_6$）（精确至1 mg）于100 mL的容量瓶中，用水稀释至刻度，现配现用。

5.11.2　葡萄糖标准溶液Ⅱ：对于淀粉含量在4%至20%的试样，制备三个葡萄糖标准溶液（c=0.003 9 mol/L）。分别称取350 mg无水葡萄糖（$C_6H_{12}O_6$）（精确至1 mg）于500 mL容量瓶中，用水稀释至刻度，现配现用。

5.12　淀粉葡萄糖苷酶溶液（160 U/mL AMG）

称取淀粉葡萄糖苷酶[AMG，EC 3.2.1.3（Roche Diagnostics，No.1 202 367，6 U/mg，称取267 mg；或Sigma，No.10115，根据测定的酶活调整酶的称取量）[1)]]，溶于9 mL水与1mL乙酸钠缓冲液（5.7）混合液中。酶应根据供应商的建议妥善贮存和使用。

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。本标准中AMG的活性单位定义如下：在25℃，pH4.75条件下，1 min从糖原中释放1μmol葡萄糖的AMG的量即为1单位AMG。

注2：10 mL酶溶液足可以测定75个试样。

5.13　D-葡萄糖紫外测试试剂盒，使用已糖激酶法定量测定葡萄糖（R-Biopharm，No. 716251[2)]），使用方法按5.13.1和5.13.2 所述。根据厂商提供信息，未开封的试剂盒在4℃可保存一年。

5.13.1　缓冲液/底物溶液（试剂1）

用新制蒸馏水45 mL溶解瓶1内容物，此为试剂1。试剂1在暗处、4 ℃条件下可保存4周，使用前取适量回温至室温。

5.13.2　酶溶液（试剂2）

该试剂可直接使用。

1） Roche Diagnostics, No.1 202 367 和 Sigma，No.10115 是其中两种适用于本方法的市售产品。本文本所述试剂、试剂盒信息是为给方法使用者提供方便，在使用方法时不做限定。

2） R-Biopharm，No. 716251 是其中一种适用于本方法的市售产品。本文本所述试剂、试剂盒信息是为给方法使用者提供方便，在使用方法时不做限定。

5.13.3　显色剂

取试剂1（5.13.1）22.5 mL，水95 mL和试剂2（5.13.2）0.45 mL，混合。该体积可满足40个测定，若测定数多于或少于40个，可以按比例调整配制体积。现配现用。

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6000 r/min。
6.3　恒温水浴锅：可调精度±2℃。
6.4　恒温水浴锅：可调精度±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。
6.8　振荡器：转速大于50 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　恒温振荡器：可调精度±2℃，每分钟振动150 - 200次，振幅2 cm，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 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　糖的提取

平行做两份试验。称取试样约0.2 g，精确到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1300 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。同时用空白离心管做空白对照。

8.2　淀粉溶解和部分分解

8.2.1　分散

向试样（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。

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　水解

将离心管水平放置在恒温振荡器中，100℃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±1）℃水浴振荡水解 30 min。

8.2.3 调节pH

冷却后定量转移到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（5.4）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）充分摇匀后，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±1）℃水浴保温16 h以上。沸水浴15 min灭活AMG酶，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。离心管中溶液的量为5.375 mL，6000 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

分别取0.5 mL试样溶液（8.3）、试样空白（8.1）、三个葡萄糖标准溶液Ⅰ（5.11.1）和水空白溶液（5.1）加水（5.1）9.5 mL稀释至10 mL，混匀。

8.4.2 淀粉含量在4 %~20 %试样

分别取0.5 mL试样溶液（8.3）、试样空白（8.1）、三个葡萄糖标准溶液Ⅱ（5.11.2）和水空白（5.1）加水（5.1）1.5 mL稀释至2 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及葡萄糖标准溶液，以使测定结果更加准确。

8.4.3 用移液器准确吸取0.4 mL稀释溶液置于干净离心管中，加入2.62 mL显色剂（5.13.3），混合均匀。测量溶液在340 nm处对水的吸光度。

9 试验数据处理

9.1 绘制校准图

使用以下公式计算每个葡萄糖标准溶液的校正吸光度值：

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

公式中：

E_{1gs}——为葡萄糖标准溶液的校正吸光度数值；

E_{0gs}——为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的数值。

水空白的平均校正吸光度值等于零

使用线性回归分析，根据校正后的吸光度值与标准葡萄糖溶液的葡萄糖含量（以 g/L为单位）计算校正吸光度值的校准图。见附录C。

使用以下公式计算每个试样溶液的校正吸光度值：

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

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}——试样空白吸光度平均值的数值。

9.2 淀粉含量

试样的淀粉含量由下式计算：

$$w_s = \frac{\rho_g \times \frac{100}{V_1} \times V_2 \times 0.9}{1000 \times m_0} \times 100 \qquad (3)$$

式中：

w_s——试样中淀粉的含量，单位为百分数（%）；

ρ_g——根据标准曲线算出的试样溶液的葡萄糖含量，单位为克每升（g/L）；

V_1——8.3中所用的淀粉溶液体积（= 5.00），单位为毫升（mL）；

V_2——用酶将淀粉转化维葡萄糖时的溶液总体积（= 5.375），单位为毫升（mL）；

m_0——试样质量，单位为克（g）。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，结果保留至小数点后一位。

用上述公式计算淀粉含量时必须考虑试样在8.3和葡萄糖标准溶液在5.11中的稀释倍数。

10 精密度

10.1 实验室间对比试验

本方法实验室间测定精密度的详细情况参见附录D。该实验室间比对测定的结果，可能不适用于超出给定的浓度范围和不同基质的试样。

10.2 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重复性限：1.4 %；

—小猪饲料重复性限：1.7 %；

—蛋鸡饲料：4.8%（见附录D）。

10.3 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 %（见附录 D）。

10.4 允许相对偏差

在重复性条件下，两次独立测定结果之间的绝对差值与该算术平均值的比值应符合下列要求。

—豌豆：≤3%；

—小猪饲料：≤4%；

—牛饲料：：≤6%；

—脱水木薯：≤2%；

—蛋鸡料：≤12%。

11 检验报告

检验报告应包括：

——识别样品所需的全部信息；

——如果知道，应说明所用的采样方法；

——所使用的测定方法，参考的国际标准；

——对本标准未指明的或可共选择的所有操作细节，以及可能影响实验结果的任何偶发事件的细节加以说明；

——所得到的测定结果，如果进行了重复性检验，则给出所获得的两个试验结果。

附录A
（资料性）
本文件与ISO15914:2004相比的结构变化差异对照表

本文件与 ISO15914:2004 相比在结构上有所调整，章条编号差异对照情况见表 A.1。

表A.1本文件与ISO15914:2004的章条编号差异对照表

本文件章条编号	ISO15914:2004 章条编号
—	6.9
—	6.10
—	6.11
6.9	6.12
6.10	6.13
6.11	6.14
6.12	6.15
6.13	6.16
8.1	8.1
	8.2
	8.3
8.2.1	8.4.1
8.2.2	8.4.2
	8.4.3
8.2.3	8.4.4
8.3	8.5
8.4	8.6
10.4	—
附录 A	—
附录 B	—
附录 C	附录 A
附录 D	附录 B

附录 B
（规范性）
淀粉葡萄糖苷酶酶活测定方法

B.1 原理

以糖原作为底物，加酶后 25℃水浴 5 min，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）：量取 59 mL 冰乙酸（CH3COOH），用水稀释并定容至 500 mL，混匀。
B.2.2 乙酸钠溶液（2 mol/L）：称取无水乙酸钠（CH3COONa）82 g，加水溶解并定容至 500 mL，混匀。
B.2.3 乙酸钠缓冲液（2 mol/L，pH4.8）：取乙酸溶液（D1.3.1）41 mL，与乙酸钠溶液（D1.3.2）59 mL 混合，现配现用。
B.2.4 乙酸钠缓冲液（0.2 mol/L）：2 mol/L pH4.75 乙酸钠缓冲液与水以 1:9 的比例混合，用乙酸或乙酸钠溶液调节 pH 至 4.75，现配现用。
B.2.5 糖原溶液：牡蛎中提取的糖原 80 mg 溶于 10 mL 水中。
B.2.6 0.3 mol/L Tris（羟甲基）氨基甲烷溶液；取 Tris（羟甲基）氨基甲烷（C4H11NO3，分子量：121.1）363 mg 溶于 10 mL 水中。

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6000 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 μL，1 000 μL，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：量取 0.2 mol/L 乙酸钠缓冲液（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，加试样 0.01mL，混合，25℃中精确计时反应 5 min，迅速，准确地加入 0.3 mol/L Tris（羟甲基）氨基甲烷溶液（B.2.6） 0.2 mL，于 100℃水浴 5min，停止反应。测定葡萄糖含量 M_1。
B.4.2 空白：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（羟甲基）氨基甲烷溶液（B.2.6） 0.2 mL，混合，加试样 0.01 mL，于 100℃水浴 5 min，停止反应。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：

$$X = \frac{(M_1 - M_0) \times N}{180 \times 5 \times 0.01 \times m} \qquad (B.1)$$

M_1——试样中葡萄糖的含量，单位为微克（μg）；
M_0——空白中葡萄糖的含量，单位为微克（μg）；
180——葡萄糖的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）；
5——反应时间，单位为分钟（min）；
0.01——反应的酶液的体系，单位为毫升（mL）；
N——酶的稀释倍数；
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、5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。按5.13.3 但无酶制备比色溶液，取0.4 mL稀释过的试样溶液（按8.4.3），同时准备一个试样空白于玻璃试管中，加2.6 mL的无酶比色剂，30~60 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，均可满足此要求。

附录D
（资料性）
实验室间对比试验结果

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。给出的精密度实验结果见表D.1.

D.1　实验室间对比试验的统计结果

	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 x 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 x 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					

参考文献

[1] 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

[2] Method of enzymatic bioanalysis and food analysis. Boehringer Mannheim, 1995, pp. 46-49 and 126-129

[3] ISO 5725-1:1994, Accuracy（trueness and precision） of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions

[4] ISO 5725-2:1994, 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

[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