ICS 65.120
B 25
备案号：59997-2018

DB15

内 蒙 古 自 治 区 地 方 标 准

DB 15/ T 1458—2018

青贮饲料 pH 值、有机酸、氨态氮测定方法

Determination of pH value, organic acid and ammonium nitrogen in silage

2018－07－25 发布　　2018－10－25 实施

内蒙古自治区市场监督管理局　发布

前　言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国农业科学院草原研究所提出。

本标准由内蒙古自治区畜牧业标准化技术委员会（SAM/T 19）归口。

本标准起草单位：中国农业科学院草原研究所、内蒙古自治区农牧业科学院、沈阳农业大学、中国农业大学、中国农业科学院科技管理局。

本标准主要起草人：孙娟娟、阿拉木斯、薛艳林、白春生、赵金梅、玉柱、任卫波、武自念、刘振虎、刘洪林、常春、吴洪新、卫媛、尹强、李薇。

青贮饲料 pH 值、有机酸、氨态氮测定方法

1 范围

本标准规定了以水为浸提剂，采用电位法测定青贮饲料 pH 值、采用高效液相色谱法测定青贮饲料中有机酸（乳酸、乙酸、丙酸、丁酸）含量、采用比色法测定青贮饲料中氨态氮含量的方法。

本标准适用于青贮饲料中 pH 值、有机酸含量、氨态氮含量的测定。

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，仅所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 5009.237 食品安全国家标准 食品 pH 值的测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 2129 饲草产品抽样技术规程

3 浸提液制备及保存

3.1 按照 NY/T 2129 的规定，抽取青贮饲料样品。

3.2 取青贮样品 20.00g，加入 180mL 的蒸馏水，或青贮饲料与水的质量体积比为 1：9。经高速粉碎机（5000r/min）粉碎匀浆 1min，先后通过四层纱布和定性滤纸过滤、分装。

3.3 pH 值在浸提液制备后及时测定，有机酸和氨态氮在浸提液制备后 24 h 内测定完毕。

4 pH 值的测定

4.1 方法

电位法。

4.2 原理

当把 pH 计玻璃电极和甘汞电极插入青贮饲料浸提液时，构成一电池反应，两者之间产生电位差的大小决定于浸提液中的氢离子活度，其负对数即为 pH 值。

4.3 试剂和材料

所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级以上水。

4.3.1 试剂

4.3.1.1 邻苯二甲酸氢钾（$C_6H_4CO_2HCO_2K$）

4.3.1.2　磷酸二氢钾（KH_2PO_4）

4.3.1.3　磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）

4.3.2　pH 标准缓冲液配置

4.3.2.1　pH=4.00 的缓冲液，参照 GB 5009.237 中的 3.2.2。

4.3.2.2　pH=6.88 的缓冲液，参照 GB 5009.237 中的 3.2.5。

4.3.2.3　配置好的 pH 标准缓冲液贮存于密闭的聚乙烯瓶中，可稳定一个月，发现有浑浊、发霉或沉淀等现象时，不能继续使用。不同温度下各标准缓冲溶液的 pH 见附录 A。

4.4　仪器和设备

4.4.1　pH 计：精度高于 0.1 单位。

4.4.2　电极：玻璃电极和饱和甘汞电极，或 pH 复合电极。

4.4.3　磁力搅拌器。

4.4.4　电子天平：感量 0.01g。

4.5　分析步骤

4.5.1　pH 计的校正

4.5.1.1　依照仪器说明书，用中性和酸性两种 pH 标准缓冲溶液进行 pH 计的校正。将盛有缓冲溶液并内置搅拌子的烧杯置于磁力搅拌器上，开启磁力搅拌器。

4.5.1.2　用温度计测量缓冲溶液，并将 pH 计的温度补偿旋钮调节到该温度上。有自动温度补偿功能的仪器，此步骤可省略。

4.5.1.3　搅拌平稳后将电极插入缓冲液中，读数稳定后读取 pH 值。

4.5.2　浸提液 pH 值的测定

浸提液的温度与标准缓冲溶液的温度之差不超过 1℃。pH 值测量时，充分搅拌或摇动浸提液后，将电极插入试样溶液中，读数稳定后读取 pH 值。

4.6　测定结果

直接读取 pH 值，结果保留两位小数。

4.7　精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于 0.1。

不同实验室测定结果的绝对差值不大于 0.2。

5　有机酸的测定

5.1　方法

高效液相色谱法。

5.2 原理

根据根据浸提液中离子交换体和离子溶质的静电相互作用（排斥）进行分离，以保留时间定性，外标法定量。

5.3 试剂和材料

试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.3.1 试剂

5.3.1.1 高氯酸（$HClO_4$）

5.3.2 试剂配置

5.3.2.1 高氯酸溶液（3mmol/L）：称取高氯酸 0.8493g，加水定容至 2000mL，混匀。

5.3.3 标准品

5.3.3.1 乳酸标准品（$CH_3CHCOOH$），纯度≥ 99 %。

5.3.3.2 乙酸标准品（CH_3COOH），纯度≥ 99 %。

5.3.3.3 丙酸标准品（CH_3CH_2COOH），纯度≥ 99 %。

5.3.3.4 丁酸标准品（$CH_3CH_2CH_2COOH$），纯度≥ 99 %。

5.3.4 标准溶液配置

5.3.4.1 乳酸标准储备溶液(10mg/mL)：称取按其纯度折算为 100%质量的乳酸 0.1g(精确到 0.0001g)，置于 10mL 容量瓶中，加超纯水至刻度，混匀，于 4℃保存。

5.3.4.2 乙酸标准储备溶液(10mg/mL)：称取按其纯度折算为 100%质量的乙酸 0.1g(精确到 0.0001g)，置于 10mL 容量瓶中，加超纯水至刻度，混匀，于 4℃保存。

5.3.4.3 丙酸标准储备溶液(5 mg/mL)：称取按其纯度折算为 100%质量的丙酸 0.05g(精确到 0.0001g)，置于 10mL 容量瓶中，加超纯水至刻度，混匀，于 4℃保存。

5.3.4.4 丁酸标准储备溶液(5 mg/mL)：称取按其纯度折算为 100%质量的丁酸 0.05g(精确到 0.0001g)，置于 10mL 容量瓶中，加超纯水至刻度，混匀，于 4℃保存。

5.3.4.5 乳酸、乙酸、丙酸、丁酸混合标准曲线工作液：分别吸取各单标储备溶液 0.25mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL 和 2.5 mL 于 6 个 10 mL 容量瓶中，用超纯水定容至刻度，混匀，于 4℃保存。

5.3.5 材料

离子排阻色谱柱。

5.4 仪器和设备

5.4.1 高效液相色谱仪，带二极管阵列检测器或紫外检测器。

5.4.2 天平：感量为 0.0001g 和 0.01g。

5.4.3 玻璃砂芯真空过滤装置。

5.4.4 水相型微孔滤膜：孔径≤0.45μm。

5.4.5 注射器。

5.4.6 水系针筒过滤器：孔径≤0.45μm。

5.4.7 超声波清洗机：用于流动相脱气。

5.4.8 台式高速离心机。

5.5 分析步骤

5.5.1 试样处理

青贮饲料浸提液12000r/min离心3min，取上清液经水相滤膜过滤，注入高效液相色谱仪分析。

5.5.2 仪器参考条件

5.5.2.1 色谱柱：Shodex Rspark KC-811 柱，8mm×300mm，或同等性能的色谱柱。

5.5.2.2 流动相：用 3mmol 的高氯酸溶液，经水相滤膜过滤，脱气。

5.5.2.3 柱温：50℃。

5.5.2.4 进样量：5μL。

5.5.2.5 检测波长：210nm。

5.5.2.6 流速：1mL/min。

5.5.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰高或峰面积。以标准工作液的浓度为横坐标，以色谱峰高或峰面积为纵坐标，绘制标准曲线（标准图谱见附录 B）。

5.5.4 试样溶液的测定

将待测液注入高效液相色谱仪中，得到峰高或峰面积，根据标准曲线得到待测液中有机酸的浓度。

5.6 结果计算

试样中的有机酸含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times (V + m \times w) \times 1000}{m \times 1000} \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

式中：

X——试样中有机酸的含量，单位为克每千克（g/kg）；

C——由标准曲线求得试样溶液中某有机酸的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V——制备青贮饲料浸提液时水的体积，单位为毫升（mL）；

m——制备青贮饲料浸提液用青贮饲料质量，单位为克（g）；

w——青贮饲料中水的质量分数；

1000——换算系数。

5.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值的10%。

6 氨态氮的测定

6.1 方法

比色法。

6.2 原理

试样直接用水提取后，浸提液中 NH_4^+在强碱性介质中与次氯酸盐和苯酚发生反应，生成水溶性染料靛酚蓝，其颜色深浅与溶液中的 NH_4^+含量呈正比。

6.3 试剂和材料

试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级以上用水。

6.3.1 试剂

6.3.1.1 亚硝基铁氰化钠（$Na_2Fe(CN)_5NO{\cdot}2H_2O$）。

6.3.1.2 苯酚溶液或结晶苯酚（C_6H_5OH）。

6.3.1.3 氢氧化钠（NaOH）。

6.3.1.4 磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4.7H_2O$）。

6.3.1.5 次氯酸钠（NaClO）。

6.3.1.6 硫酸铵（$(NH_4)_2SO_4$）。

6.3.2 试剂配置

6.3.2.1 苯酚试剂

将 0.05g 亚硝基铁氰化钠溶解在 500mL 蒸馏水中，再加入 11mL 苯酚溶液或 9.9g 结晶苯酚，混合均匀后定容到 1000mL，贮藏于棕色试剂瓶中，低温避光保存。

6.3.2.2 次氯酸盐溶液

将5.0g氢氧化钠溶解在700mL的蒸馏水中，再加入20.1g磷酸氢二钠，中火加热并不断搅拌至完全溶解。冷却后加入14.7mL含8.5%活性氯的次氯酸钠溶液并混匀，定容到1000mL，贮藏于棕色试剂瓶中，低温避光保存。

6.3.2.3 标准铵溶液

称取 0.6607g 经 100℃条件下烘干 24h 的$(NH_4)_2SO_4$溶于蒸馏水中，定容至 100mL，配制成 0.1mol/L 的铵储备液。将上述储备液稀释配制成 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mmol/L 五种不同浓度梯度的标准液。

6.4 仪器

6.4.1 分光光度计：配 1cm 石英比色皿。

6.4.2 天平：感量为 0.0001g 和 0.01g。

6.5 分析步骤

6.5.1 标准曲线的制作

取 6 个 50mL 容量瓶，分别吸取铵储备液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL，定容。配制成 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mmol/L 五种不同浓度梯度的标准工作液。取 6 支试管，分别向每支试管中加入 50μL 标准工作液，空白为 50μL 蒸馏水；向每支试管中加入 2.5mL 的苯酚试剂，摇匀；再向每支试管中加入 2mL 次氯酸钠试剂，混匀；将混合液在 95℃水浴中加热显色反应 5min；冷却后，在 630nm 波长下比色。以吸光度和标准液浓度为坐标轴绘制标准曲线。

6.5.2 试样溶液的测定

向每支试管中加入 50μL 经适当倍数稀释的试样溶液，重复 2 次，空白为 50μL 蒸馏水。按标准曲线的检测步骤测定试样溶液的吸光度。样品的吸光度与标准曲线比较求出含量。

6.6 结果计算

试样中氨态氮含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times (V + m \times w) \times n \times 18}{m \times 1000} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中：

X——试样中氨态氮的含量，单位为克每千克（g/kg）；

C——由标准曲线求得试样溶液中氨态氮的浓度，单位为毫摩尔每升（mmol/L）；

V——制备青贮饲料浸提液时水的体积，单位为毫升（mL）；

m——制备青贮饲料浸提液用青贮饲料质量，单位为克（g）；

w——青贮饲料中水的质量分数；

n——样品稀释倍数；

1000——换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算数平均值表示，结果保留两位有效数字。

6.7 精密度

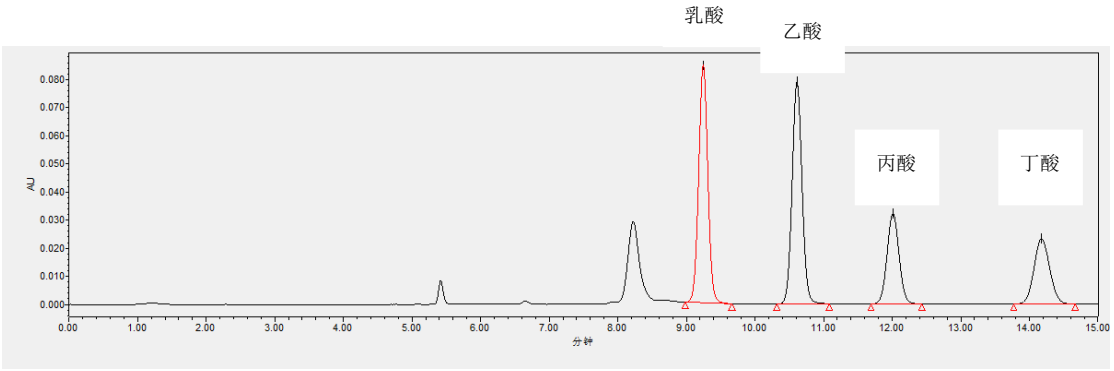
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值的 10%。

附 录 A
（规范性附录）
不同温度下各标准缓冲溶液的 pH 值

表A.1 不同温度下各标准缓冲溶液的 pH 值

温度	邻苯二甲酸盐标准缓冲溶液	磷酸盐标准缓冲溶液
10℃	4.00	6.92
15℃	4.00	6.90
20℃	4.00	6.88
25℃	4.01	6.86
30℃	4.01	6.85

附 录 B
（规范性附录）
4 种有机酸的标准色谱图



[a] 乳酸—2.626mg/mL、乙酸—2.553mg/mL、丙酸—1.213mg/mL、丁酸—1.177mg/mL

图B. 1 4 中有机酸的标准色谱图