

中华人民共和国国家标准

GB/T××××× -×××××

畜禽饲料有效性与安全性评价
猪标准回肠可消化氨基酸测定技术规程
(简单 T 型瘻管法)

Regulation for Determination of Standardized Ileal
Digestible Amino Acids for Growing Pig
(Simple T-cannulas)

(送审稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出（SAC/TC76）并归口。

本标准主要起草单位：中国农业大学农业部饲料效价与安全监督检验测试中心（北京），重庆畜牧科学院，中国科学院亚热带农业生态研究所。

本标准主要起草人：谯仕彦、杨飞云、张桂杰、楚丽翠、易学武、王旭、印遇龙。

猪标准回肠可消化氨基酸测定技术规程

(简单 T 型瘘管法)

1 范围

本标准规定了饲料标准可消化氨基酸测定技术的试验设计、试验动物、试验日粮、猪舍要求、测试程序、食糜的收集与处理、样品分析指标及方法和数据统计等方面的技术要求。

本标准适用于各种类型饲料原料（不含青、粗饲料）标准回肠可消化氨基酸的测定。

本规程不适用于药物饲料添加剂的安全性和有效性评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

- NY/T 65-2004 猪饲养标准
- GB/T 6435-2006 饲料中水分和其他挥发性物质含量的测定
- GB/T 6432-1994 饲料中粗蛋白测定方法
- GB/T 15398-1994 饲料有效赖氨酸测定方法
- GB/T 15399-1994 饲料中含硫氨基酸测定方法—离子交换色谱法
- GB/T 15400-1994 饲料中色氨酸测定方法-分光光度法
- GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定

3 术语与定义

无氮日粮法 (Nitrogen-Free Diets): 无氮日粮法是测定猪基础回肠内源氨基酸损失的经典方法，其原理是当动物采食无氮日粮时，回肠食糜中出现的所有含氮化合物均被认为是由动物体自身排泄的内源氮。前提是假设这种方法测得的内源氮和动物采食含氮日粮时的损失氮量及氨基酸组成相似，即不受日粮组成及其物理化学性质的影响。

标准可消化氨基酸 (Standard Digestible Amino Acids): 食糜到达回肠末端时，从肠道消失的日粮氨基酸的比例，叫做回肠表观可消化氨基酸，用无氮日粮法对基础回肠内源氨基酸损失 (Ileal endogenous AA losses, IAAend) 进行校正，从回肠表观氨基酸消化率所去除的回肠氨基酸流失物中减去了基础 IAAend 后得到的氨基酸消化率叫做标准可消化氨基酸。

纯合日粮和半纯合日粮 (Purified-diet and Semipurified-diet): 纯合日粮指配制日粮时不用天然饲料，所有成分都是由纯的营养素组成，如合成氨基酸、纯化的淀粉、葡萄糖或者蔗糖等。但日粮全部由纯化物质组成，成本高昂。因此，只要能满足试验要求，可用半纯合日粮，即采用部分天然饲料，部分纯化饲料。

简单 T 型瘘管法 (Simple T-Cannulation): 是通过外科手术在距回盲瓣前 10~15 cm 处植入一塑料 T 型套管, 再通过套管获取食糜样品的方法。

套算法: 很多能量饲料的养分不平衡、适口性差, 无法单一饲喂, 并且会引起试验动物代谢失调。测定这类饲料的标准回肠可消化氨基酸时, 至少需要使用 2 种日粮, 第一种日粮为基础日粮, 第二种日粮由一定比例的待测饲料替代基础日粮配制而成, 然后, 通过 2 种日粮的标准回肠可消化氨基酸值和待测饲料替代基础日粮的比例来计算待测饲料标准回肠可消化氨基酸值, 该方法称为套算法。

4 试验动物

体重为 35~40 kg、健康去势公猪 (小型猪体重可酌减), 进行免疫驱虫处理后备手术用。

5 试验方法

5.1 试验设计: 依据待测饲料的数量确定试验方法, 试验设计应为交叉设计或拉丁方设计, 每个待测日粮处理至少 6 个重复, 每个重复至少 1 头猪。

5.2 回肠 T 型瘘管安装

5.2.1 试验猪手术前禁食 24 h, 停止饮水 6 h, 麻醉剂采用盐酸氯氨酮, 注射剂量 1 mg/kg 体重, 全身麻醉, 右侧躺卧保定, 剪毛、清洗。术前进行常规外科手术消毒。

5.2.2 手术部位在腹中线上方约 20 cm, 自最后肋骨缘约 4 cm 处, 做一长 5~8 cm 的纵向切口, 腹内及腹外斜肌做钝性分离, 剖开腹腔。

5.2.3 找到回盲肠瓣, 在距回盲肠连接点前 10~15 cm 处的肠壁表层用 4 号外科手术线做双荷包缝合, 内外线间距为 0.5 cm。缝合长度以能装入简单 T 型瘘管为准, 切开荷包内肠壁安装 T 型瘘管, 外露小肠组织用生理盐水纱布包裹浸润, 以免组织失水、失活。管腔塞入消毒的脱脂棉花 (术后取出), 以免食糜流出污染腹腔。

5.2.4 在创口上方最后两肋骨间皮肤上找合适的位置做一约 1.5 cm 左右的纵向切口, 然后将装好的 T 型瘘管从此位置穿出皮肤, 检查小肠走向正确并固定。

5.2.5 腹膜用 4 号肠线做连续缝合, 肌层和皮肤分别用 7 号和 10 号外科手术线作间断结节缝合。

5.2.6 皮肤缝合前, 注意切口污染, 缝合后用镊子整理两侧创缘使之密切接触。创口外部及 T 型瘘管出口处涂 2% 碘酊, 并均匀涂抹凡士林、氧化锌软膏。

5.2.7 术后将猪放在平面地板让其苏醒并自由走动, 以恢复小肠的正常蠕动, 待猪恢复采食, 将其放入代谢笼中。术后可直接给饲糖水, 6~8 h 后可喂适量软化饲料, 逐渐转入正常日粮, 术后 5 d 内需每天注射治疗剂量的青霉素和链霉素, 清洗创口部位并涂抹凡士林、氧化锌软膏。术后 10 d 即可投入正式试验。

5.2.8 试验动物福利按照国家有关行政管理部门规程执行。

6 饲养管理

- 6.1 全封闭式猪舍或半开放式猪舍，符合卫生防疫要求。
- 6.2 饲养于个体代谢笼中。代谢笼面积 $1.40 \times 0.45 \text{ m}^2$ ，装有喷塑地板，不锈钢可调式料槽。
- 6.3 舍温：20~25° C。
- 6.4 光照：猪舍采用自然光照。
- 6.5 在非试验期，每日按试验体重的 3.5%~4.0%喂全价配合料，并自由饮水。
- 6.6 猪舍环境要求按照国家有关行政管理部门规程执行。

7 试验日粮

7.1 配制半纯合日粮的原则

- 7.1.1 测试配合饲料的标准回肠可消化氨基酸时不需配制半纯合日粮。
- 7.1.2 测试蛋白质饲料原料时，适口性好的蛋白质饲料混以适量玉米淀粉、豆油、纤维；适口性不好的蛋白质饲料应混以玉米淀粉、蔗糖和豆油。将日粮的粗蛋白质水平调整到 16%，并参照中华人民共和国农业部行业标准 NY/T 65-2004 猪饲养标准中推荐的 35~40 kg 体重阶段的营养需要量，用钙、磷、食盐及矿物质微量元素、维生素预混剂等配成半纯合日粮。
- 7.1.3 测试能量饲料时，适口性不好的能量饲料采用套算法，适口性好的能量饲料以待测原料为唯一蛋白质来源，半纯合日粮中无需加入玉米淀粉。
- 7.1.4 测试单体氨基酸或其类似物时，半纯合日粮中该氨基酸含量以生长阶段猪需要量的 1.5 倍为宜。
- 7.1.5 半纯合日粮中纤维含量水平以 3%~5%为宜。

7.2 配制无氮日粮的原则

- 7.2.1 纯合无氮日粮应有玉米淀粉 ($N \times 6.25 < 3\%$)、蔗糖、纯纤维素、食盐、矿物质微量元素和维生素预混剂等组成。
- 7.2.2 纯合无氮日粮和半纯合日粮中所加纤维素的化学组成应相同。
- 7.2.3 纯合无氮日粮和半纯合日粮中粗纤维含量应相同。
- 7.2.4 纯合无氮日粮和半纯合日粮中微量元素含量应适当高于 NY/T 65-2004 推荐值。

7.3 试验日粮指示剂种类及含量

- 7.3.1 试验日粮指示剂使用三氧化二铬 (Cr_2O_3) 或氧化钛 (TiO_2)。
- 7.3.2 指示剂含量占日粮的 0.3%。

8 测试程序

- 8.1 试验分适应期、预饲期和正式期试验，试验猪早 (8:00)，晚 (18:00) 各饲喂一次

8.1.1 适应期：喂给全价配合饲料 4 d，观察并记录每头试验猪的健康状况，测定自由采食量。

8.1.2 预饲期：为 5 d，按代谢体重的 4%定量给饲试验日粮。

8.1.3 正式期试验：为 3 d，正式试验期内连续收集每头猪全天内的回肠末端食糜。

8.2 用无氮日粮法进行内源氨基酸校正时测定程序同 8.1

8.3 各试验猪内源性氨基酸校正采用自身对照法。

8.4 试验猪半纯合日粮和纯合日粮给料量应相等。

9 食糜的收集与处理

9.1 正式期试验每日连续收集 12 h 食糜，每次收集后立即放入-20° C 冰柜冷冻。

9.2 食糜常温解冻，各头猪每期食糜经充分混合后，取样，并在冷冻干燥机中冻干，置室温下回潮 24 h，称重、记录、粉碎备用。

9.3 将食糜取样装瓶，测定样品干物质、氨基酸和指示剂含量等。

10 饲料样品分析

分析项目：被测饲料样品分析干物质、粗蛋白质、氨基酸和指示剂含量等。

分析方法：依常规测定干物质（中华人民共和国标准 GB/T 6435-2006）和粗蛋白质（GB/T 6432-1994）。铬测定见附录 2；测定氨基酸采用（GB/T 15398-1994 饲料有效赖氨酸测定方法、GB/T 15399-1994 饲料中含硫氨基酸测定方法—离子交换色谱法、GB/T 15400-1994 饲料中色氨酸测定方法—分光光度法、GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定方法）。

11 数据处理

11.1 有效小数位数：氨基酸含量（%）和标准可消化氨基酸（%）测定结果保留小数点后两位；供试样品干物质含量（%）、粗蛋白质含量（%）和氨基酸消化率（%）测定结果保留小数点后一位。

11.2 各种氨基酸消化率的计算公式

$$\text{氨基酸表观消化率}\% = [1 - \text{食糜氨基酸浓度 (g/kg DM)} / \text{日粮氨基酸浓度 (g/kg DM)}] \times (\text{日粮指示剂浓度 (g/kg DM)} / \text{食糜指示剂浓度 (g/kg DM)}) \times 100$$
$$\text{无氮日粮基础回肠内源氨基酸损失 (g/kg DMI)} = [\text{食糜氨基酸浓度 (g/kg DM)} \times \text{日粮指示剂浓度 (g/kg DM)}] / \text{食糜指示剂浓度 (g/kg DM)}$$
$$\text{标准氨基酸消化率}\% = \text{氨基酸表观消化率} + \text{无氮日粮基础回肠内源氨基酸损失 (g/kg DMI)} / \text{日粮氨基酸浓度 (g/kg DM)}$$

以上各公式中 DM 和 DMI 分别表示干物质含量和干物质摄入量。

11.3 计算待测饲料氨基酸表观（标准）消化率平均数和标准差。

12 终止试验

试验猪群在饲养试验过程中发生疾病等不可抗拒的因素影响试验正常进行时可以终止试验。

13 废弃物的处理

在试验过程中所产生的一切废弃物须按 GB 18596 和 HJ/T 81 的要求进行处理，达标后排放。

14 试验记录与统计分析

14.1 试验数据采集应使用符合国家和试验要求的计量工具，并定期进行校准。

14.2 除测定项目外，还应记录免疫时间和程序、消毒时间、温湿度等可能影响试验结果的情况。

14.3 数据记录应清晰、准确和完整，不得涂改，可以划改，试验记录要妥善保管并存档。

14.4 数据的有效数字以所用仪器的精度为准，并采用国家法定的计量单位。

14.5 试验结束后，根据试验目的和试验设计，以重复为单位，采用相应的方法对试验数据进行整理与统计分析。 P 值达 0.05 为差异显著。

15 试验报告

15.1 试验报告中应包括题目、摘要、试验目的、材料与方法、结果与分析、试验结论等内容。

15.2 试验报告应针对试验目的和要求给出具体的试验结果，在可能的情况下给出明确结论。

15.3 试验报告应对试验方法等可能影响试验结果的情况做简要说明。

附录:

1、无氮日粮参考配方

估测基础回肠内源氨基酸损失 (IAA_{end}) 无氮日粮的建议配方 (%，饲喂基础)

日粮组成	生长猪
玉米淀粉	79.2
蔗糖	10.0
豆油	3.0
羧甲基纤维素	4.0
石灰石粉	0.5
磷酸二氢钙	1.9
TiO ₂ 或 Cr ₂ O ₃	0.3
食盐	0.4
维生素预混料	0.05
微量元素预混料	0.15
碳酸钾	0.4
氧化镁	0.1
总计	100.0

2、日粮或食糜中 TiO₂ 或 Cr₂O₃2.1 日粮或食糜中 TiO₂ 的测定

参照 Libao 等 (2002) 的方法进行。

2.1.1 试剂

(1) 无水 Na₂SO₄

(2) 30%W/V

(3) TiO₂

(4) 标准液的制备

在烘箱中 (102±2 °C) 放置 24 h，干燥器中冷却。称取约 0.0500 g TiO₂ 放入 250 mL 锥形瓶中，加入 15 g 无水 Na₂SO₄。50 mL 浓硫酸，煮沸几分钟，直到溶液变澄清，加入约 200 mL 去离子水，冷却转入 500 mL 容量瓶，用去离子水定容至 500 mL。

(5) TiO₂ 标准曲线制备

取 0, 1, 2, 3, 4, 5 ml 的 0.1 mg/mL 的 TiO₂ 溶液加入 5, 4, 3, 2, 1 及 0 mL 10% 浓硫酸溶液中。

(6) 10%浓硫酸溶液的制备

在 250 mL 派热克斯烧杯中加入大约 75 mL 的去离子水，放入冰水中，缓慢加入 10 mL 浓硫酸，慢慢搅拌冷却，转入 100 mL 容量瓶中，用去离子水定容至刻线。

2.1.2 饲料或食糜中 TiO₂ 含量的测定

准确称取 1.000 g 干燥饲料或食糜样品中放入坩埚中，450 °C 下灰化，参照饲料或粪中灰分含量的测定方法。将灰化后的样品准确转入 150 mL 的锥形瓶中，加入 3.0 g 无水硫酸钠，20 mL 浓硫酸，并加入少许抗沸腾粒。放一玻璃漏斗于锥形瓶中，在电炉上加热 45-60 min，冷却。漂洗漏斗于锥形瓶中，将锥形瓶中溶解物滤入 200 mL 容量瓶中（双层 Whatman No.541 滤纸）。将锥形瓶漂洗干净，用去离子水定容至刻线。取 5 mL 上述溶液，放入 10 mL 试管中，加 0.2 mL 30% 的 H₂O₂ 混匀。同时加入 0.2 mL 30% H₂O₂ 放入标准液中，混匀。将加入 H₂O₂ 的样品液和标准液静置至少 15 min。在可见分光光度计 408 nm 处测定吸光度。以 TiO₂ 浓度和其对应的吸光度做曲线。按曲线读取样品中 TiO₂ 浓度。

2.1.3 结果计算：

$$\text{TiO}_2 \text{ (g/kg)} = 40000 \times X \times 100 / Y \times \text{DM}$$

X: 由表读出的 TiO₂ 的浓度；

Y: 称取的样品重 (g)

2.2 日粮或食糜中 Cr₂O₃ 的测定

参照 GB/T 13088-2006 进行

2.2.1 试剂和溶液

- (1) 硫酸溶液: $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0.5 \text{ mol/L}$ ，量取 28 mL 浓硫酸，徐徐加入水中，再加水稀释至 1000 mL。
- (2) 高锰酸钾溶液: 20 g/L，称取 2 g 高锰酸钾，溶于水中，加水稀释至 100 mL。
- (3) 硫酸溶液: $V(\text{浓硫酸}) + V(\text{蒸馏水}) = 1 + 6$ ，量取 100 mL 浓硫酸，徐徐加入 600 mL 水中，并加入 1 滴 20 g/L 高锰酸钾溶液(2)，使溶液呈粉红色。
- (4) 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/L}$ ，称取 32 g 氢氧化钠，溶于水中，加水稀释至 200 mL。
- (5) 二苯卡巴肼溶液: 5 g/L，称取 0.5 g 二苯卡巴肼，溶解于 100 mL 丙酮。
- (6) 95%乙醇。
- (7) 铬标准储备液: 100 mg/L，称取 0.2830 g 经 100 °C ~ 110 °C 烘至恒量的重铬酸钾，用水溶解，移入 1000 mL 容量瓶中，稀释至刻度，此溶液每毫升相当于 0.1 mg 铬。
- (8) 铬标准溶液: 2 mg/L，量取 1.0 mL 铬标准储备液 (7) 于 50 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，此溶液每毫升相当于 2 μg 铬。

2.2.2 饲料或食糜中 Cr₂O₃ 的测定

2.2.2.1 试样处理

称取 1.0 g ~ 1.5 g 试样（精确到 0.0001 g），置于 60 mL 瓷坩埚中，在可控温电炉炭化完全后，置于马弗炉内，由室温开始，徐徐升温，至 600℃ 灼烧 5 h，直至试样呈白色或灰白色、无炭粒为止。冷却后取出，加入 5 mL 硫酸溶液（1），在电炉上煮沸，内容物全部移入 150 mL 三角瓶中，并用热水反复洗涤坩埚 3 次~4 次，洗涤液并入三角瓶中，加入氢氧化钠溶液（4）1.5 mL，再加入 2 滴高锰酸钾溶液（2），加水使瓶内总体积约为 60 mL ~ 70 mL，摇匀，溶液呈紫红色，在电炉上加热煮沸 20 min（在煮沸过程中，如紫红色消退，应及时补加高锰酸钾溶液，使溶液保持紫红色），然后沿壁加入乙醇（6）3 mL，摇匀，趁热过滤，滤液置于 100 mL 容量瓶中，并用少量热水洗涤三角瓶和滤纸 3 次 ~ 4 次，洗涤液并入容量瓶中，此滤液即为试样溶液，留作备用。

2.2.2.2 标准曲线绘制

吸取铬标准溶液（8）0.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 和 30.0 mL，分别置于 100 mL 容量瓶中，加入适量水稀释，依次加入 4 mL 硫酸溶液（3）和 2.0 mL 二苯卡巴肼溶液（5），用水稀释至刻度，摇匀，静置 30 min，以空白溶液作为参比，用 10 mm 比色皿，在波长 540 nm 处用分光光度计测量吸光度，以吸光度为纵坐标、铬标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

2.2.2.3 试样测定

在装有试样溶液（2.2.2.1）的 100 mL 容量瓶中，依次加入 4 mL 硫酸溶液（3）和 2.0 mL 二苯卡巴肼溶液（5），用水稀释至刻度，摇匀，静置 30 min，按 2.2.2.2 测定其吸光度，求得试样溶液铬的含量。

2.2.3 测定结果

饲料中铬的含量 X ，以质量分数毫克每千克（mg/kg）表示，按下式计算：

$$X = c \times 100/m$$

式中：

X ——试样中铬的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c ——试样溶液中铬的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

m ——试样质量，单位为克（g）

计算结果为同一试样两个平行样的算术平均值，精确到小数点后两位。

3、T 型瘿管参数

T 型瘿管由 4 部分组成（如图 1）：

- a: 内筒（筒部，长 80mm，内径 17mm，
外径 24mm；底部，长 100mm，宽 34mm）
- b: 外环垫（内径 27mm，长 93mm，宽 63mm）
- c: 外环（内径 22mm，外径 58mm）
- d: 帽（内径 17mm，高 13mm）

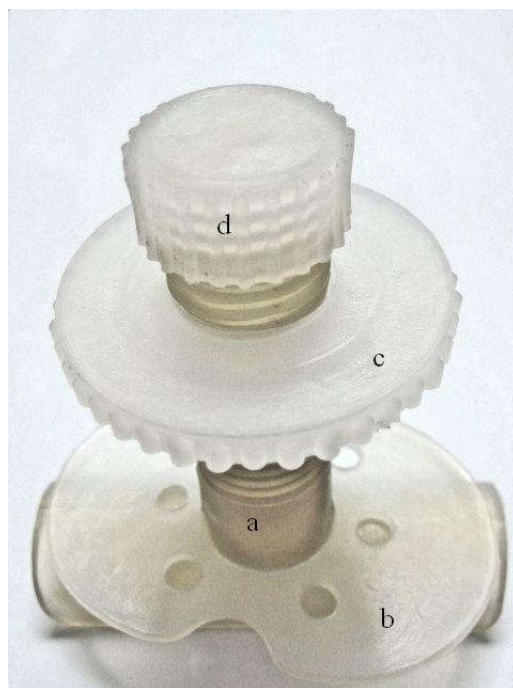


图 1. 简单 T 型瘿管。a: 内筒，b: 外环垫，
c: 外环，d: 帽