

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2297—2012

饲料中苯甲酸和山梨酸的测定 高效液相色谱法

Determination of benzoic acid and sorbic acid in feeds—
High performance liquid chromatography

2012-12-24 发布

2013-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:农业部饲料质量监督检验测试中心(成都)。

本标准主要起草人:张静、魏敏、王宇萍、赵立军、林顺全、高庆军、冯娅、陈红、程传民。

饲料中苯甲酸和山梨酸的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中苯甲酸和山梨酸的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中苯甲酸和山梨酸的测定。

本标准的检测限：苯甲酸和山梨酸均为 20 mg/kg。

本标准的定量限：苯甲酸和山梨酸均为 50 mg/kg。

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 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

饲料中的苯甲酸和山梨酸经提取液提取、离心后，取部分上清液经混合型阴离子固相萃取柱净化，用高效液相色谱仪—紫外检测器检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用分析纯的试剂，色谱分析用水符合 GB/T 6682 中二级水的规定。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 甲酸：色谱纯。

4.3 氨水。

4.4 亚铁氰化钾溶液(0.25 mol/L)：称取亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 10.6 g，加水溶解并稀释至 100 mL。

4.5 乙酸锌溶液(1.0 mol/L)：称取乙酸锌 $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ 22 g，加入冰乙酸 3 mL，加水稀释至 100 mL。

4.6 磷酸盐缓冲液(pH=6.7)：分别称取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)2.5 g 和磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)2.5 g，用水溶解后定容至 1 000 mL。

4.7 2%氨水溶液：量取氨水 2 mL，加水至 100 mL，混匀。

4.8 5%甲酸甲醇溶液：量取甲酸 5 mL，加甲醇至 100 mL，混匀。

4.9 流动相：量取磷酸盐缓冲液(4.6)900 mL，加入甲醇 100 mL，混匀。

4.10 苯甲酸对照品： $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ ，纯度 $\geq 98\%$ 。

4.11 山梨酸对照品： $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$ ，纯度 $\geq 98\%$ 。

4.12 标准溶液的配制

4.12.1 标准溶液贮备液：准确称取适量苯甲酸和山梨酸对照品各 50.0 mg，用甲醇溶解并定容至

50 mL。此贮备液浓度为 1.0 mg/mL, 2℃~8℃冷藏保存, 有效期为 3 个月。

4.12.2 混合标准工作溶液: 分别准确吸取适量苯甲酸和山梨酸标准溶液贮备液(4.12.1), 用流动相(4.9)配制成浓度分别为 2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、25.0 μg/mL 和 50.0 μg/mL 的混合标准工作溶液, 2℃~8℃冷藏保存, 有效期为 1 个月。

4.13 固相萃取小柱: 混合型阴离子交换柱, 60 mg/3 mL, 或性能相当者。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪: 配备紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.2 实验用样品粉碎机。

5.3 天平: 感量 0.01 g。

5.4 分析天平: 感量 0.1 mg。

5.5 离心机: 转速为 5 000 r/min 及以上。

5.6 超声波清洗器。

5.7 涡旋混合器。

5.8 振荡器。

5.9 密封盖塑料离心管: 50 mL。

5.10 固相萃取装置。

5.11 滤膜: 0.45 μm, 有机系。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 的规定采集试样后, 按 GB/T 20195 的规定选取具有代表性的实验室样品 1 kg, 四分法缩减分取 200 g 左右, 粉碎过 0.45 mm 孔筛, 混匀装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

准确称取试样 2 g(精确至 0.01 g), 置于离心管(5.9)中, 准确加入 2%氨水溶液(4.7)21 mL, 超声提取 10 min, 振荡提取 10 min, 准确加入亚铁氰化钾溶液(4.4)2 mL、乙酸锌溶液(4.5)2 mL, 涡旋混匀, 以 5 000 r/min 离心 5 min。精密吸取上清液 5 mL 于 25 mL 容量瓶, 用 2%氨水溶液(4.7)定容, 备用。

7.2 净化

依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化固相萃取小柱(4.13), 精密吸取提取液 5.0 mL 过此小柱。再依次用 2%氨水溶液(4.7)3 mL 和甲醇 3 mL 淋洗, 抽干小柱, 用 5%甲酸甲醇溶液(4.8)2.0 mL 洗脱, 洗脱液过 0.45 μm 滤膜后, 供高效液相色谱测定。

7.3 高效液相色谱条件

色谱柱: C₁₈柱, 柱长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm, 或性能相当者。

流动相: 磷酸盐缓冲液(4.6)+甲醇=90+10。

流速: 1.0 mL/min。

检测波长: 230 nm。

柱温: 30℃。

进样量: 10 μL。

7.4 高效液相色谱测定

将试样制备液(7.2)和混合标准工作溶液(4.12.2)分别注入高效液相色谱仪, 单点或多点校正外标

法定量,标准色谱图参见附录 A。若分析物浓度不在线性范围内时,应将分析物稀释再进行检测。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

饲料中苯甲酸或山梨酸的含量 X_i ,以毫克每千克(mg/kg)表示,单点校正按式(1)计算。

$$X_i = \frac{A_i \times C_s \times V_s \times V \times 1000}{A_s \times m \times V_i \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A_i ——试样溶液峰面积值;

C_s ——标准工作液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_s ——标准工作液进样体积,单位为微升(μL);

A_s ——标准工作液峰面积值;

m ——称取试样的质量,单位为克(g);

V ——洗脱液体积,单位为毫升(mL);

V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μL);

n ——稀释倍数。

多点校正按式(2)计算:

$$X_i = \frac{C_x \times V \times 1000}{m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_x ——标准曲线上查得的试样中苯甲酸或山梨酸的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

m ——称取试样的质量,单位为克(g);

V ——洗脱液体积,单位为毫升(mL);

n ——稀释倍数。

8.2 结果表示

按平行测定的算术平均值表示,计算结果保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次测定结果的绝对偏差值不得超过算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性附录)
苯甲酸和山梨酸标准液相色谱图

苯甲酸和山梨酸(10.0 $\mu\text{g/mL}$)标准液相色谱图见图 A. 1。

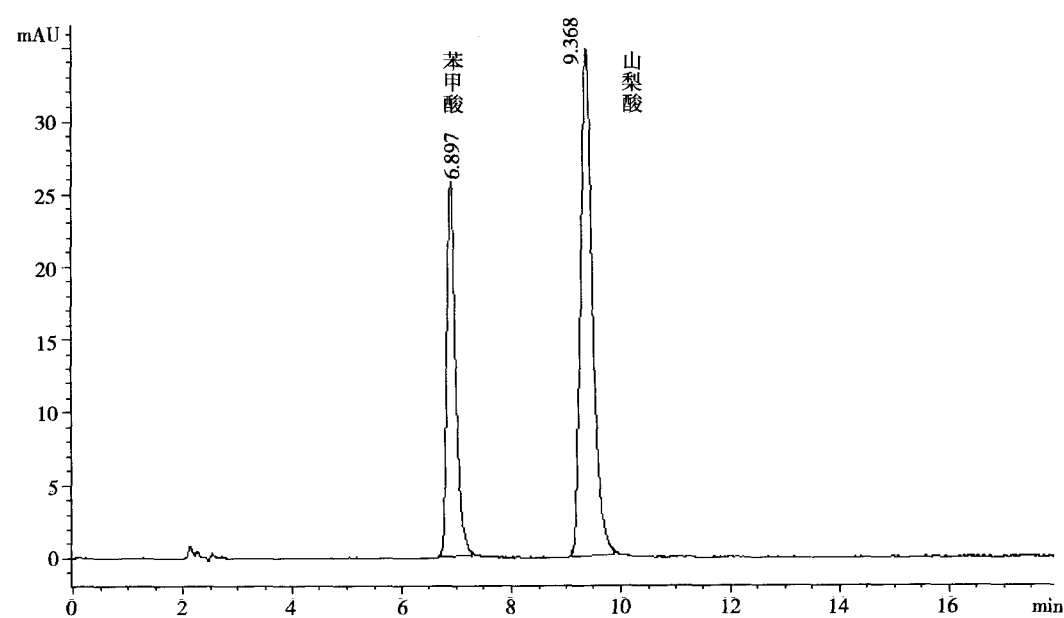


图 A. 1 苯甲酸和山梨酸(10.0 $\mu\text{g/mL}$)标准液相色谱图