

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3322—2018

饲料中柠檬黄等7种水溶性色素的测定 高效液相色谱法

Determination of tartrazine 7 kinds of water-soluble pigment in feeds—
High performance liquid chromatography

2018-12-19 发布

2019-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:河南省兽药饲料监察所。

本标准主要起草人:吴宁鹏、孟蕾、宋志超、陈小鸽、宋善道、舒畅、刘素梅、巩丹、邱天宝、周小娟、于辉、陈少渠。

饲料中柠檬黄等 7 种水溶性色素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中柠檬黄、苋菜红、胭脂红、靛蓝、亮蓝、日落黄、诱惑红 7 种水溶性色素含量的液相色谱测定方法。

本标准适用于食品动物配合饲料和浓缩饲料、宠物饲料、观赏鱼饲料中柠檬黄、苋菜红、胭脂红、靛蓝、亮蓝、日落黄、诱惑红 7 种水溶性色素的测定。

本标准亮蓝的检出限为 0.25 mg/kg, 定量限为 0.5 mg/kg; 柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、诱惑红的检出限为 0.5 mg/kg, 定量限为 1.0 mg/kg; 靛蓝的检出限为 1.0 mg/kg, 定量限为 2.0 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

用碱性乙腈丙二醇水溶液提取试样中的待测物, 提取液稀释后调 pH, 弱阴离子交换固相萃取柱净化, 高效液相色谱测定, 外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯; 水为 GB/T 6682 规定的二级水。

4.1 柠檬黄、苋菜红、胭脂红、靛蓝、亮蓝、日落黄、诱惑红标准品或对照品, 含量均不低于 95.0%。

4.2 甲醇: 色谱纯。

4.3 乙腈: 色谱纯。

4.4 甲酸: 含量不低于 88%。

4.5 乙酸铵溶液(0.02 mol/L, pH 为 5.0): 称取乙酸铵 0.778 g, 用水溶解并稀释至 500 mL, 混匀, 用乙酸调节 pH 至 5.0。

4.6 提取液: 取乙腈 250 mL、丙二醇 50 mL、水 190 mL、氨水 10 mL, 混匀。

4.7 2%甲酸溶液: 取甲酸 2 mL, 用水稀释至 100 mL。

4.8 1%甲酸溶液: 取甲酸 1 mL, 用水稀释至 100 mL。

4.9 甲酸甲醇溶液: 取甲醇 80 mL, 用 1%甲酸溶液(4.8)稀释至 100 mL。

4.10 10%氨化甲醇溶液: 取氨水 10 mL, 用甲醇稀释至 100 mL。

4.11 标准储备液(1 mg/mL): 分别精密称取柠檬黄、苋菜红、胭脂红、靛蓝、亮蓝、日落黄、诱惑红(4.1)对照品约 10 mg(准确至 0.01 mg), 置 10 mL 棕色容量瓶中, 用水稀释并定容, 分别配制成 1 mg/mL 的标准储备液。0℃~4℃避光保存, 有效期为 6 个月; 靛蓝标准储备液于 0℃~4℃避光保存, 有效期为 1 个月。

4.12 混合标准中间液(100 μg/mL): 分别准确移取标准储备液(4.11)各 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用

水稀释至刻度,混匀。配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液。0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,有效期为 1 周。

4.13 弱阴离子交换固相萃取柱(WAX):含亲水基团的聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物上键合哌嗪基团,500 mg/6 mL,或性能相当的萃取柱。

4.14 微孔滤膜(0.45 μm):尼龙滤膜或性能相当者。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪:配二极管阵列检测器或者可变多波长紫外可见检测器。

5.2 分析天平:感量 0.01 mg。

5.3 天平:感量 0.001 g。

5.4 离心机:转速不低于 10 000 r/min。

5.5 振荡器。

5.6 涡旋振荡器。

5.7 超声波清洗器。

5.8 固相萃取装置。

5.9 氮吹仪。

5.10 酸度计。

6 样品

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按照 GB/T 20195 制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

7 试验步骤

7.1 提取

称取试样约 2 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,准确加入提取液(4.6)20 mL,涡旋混合后,振荡 10 min,水浴超声提取 10 min。10 000 r/min 离心 10 min,移取上清液至另一离心管中。残渣准确加入提取液 20 mL 重复提取,合并上清液。准确移取上清液 10 mL 于另一离心管中,加入水 20 mL,用甲酸调至 pH(2.0 \pm 0.2),混匀后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,备用。

7.2 净化

弱阴离子交换固相萃取柱(4.13)依次用甲醇、水和 2%甲酸溶液(4.7)各 5 mL 活化,将备用液(7.1)全部过柱。依次用 2%甲酸溶液、甲酸甲醇溶液(4.9)和甲醇各 5 mL 淋洗,抽干。再用 10%氨化甲醇溶液(4.10)5 mL 洗脱,将洗脱液置 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干。准确加入水 0.5 mL 溶解残余物,涡旋混匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,供 HPLC 测定。

7.3 标准曲线的制备

准确移取柠檬黄、苋菜红、胭脂红、靛蓝、亮蓝、日落黄、诱惑红混合标准中间液(4.12)适量,用水稀释,制得浓度为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准系列溶液,由低浓度到高浓度进高效液相色谱仪测定。以色谱峰面积为纵坐标、浓度为横坐标,绘制标准曲线。柠檬黄、苋菜红、胭脂红、靛蓝、亮蓝、日落黄、诱惑红 7 种水溶性色素色谱图参见附录 A。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,柱内径 4.6 mm,粒度 5.0 μm ,或相当的分析柱。

流动相:A相为0.02 mol/L 乙酸铵溶液(4.5);B相为乙腈,梯度洗脱,条件见表1。

检测波长:425 nm、500 nm 和 630 nm,波长变化程序见表2。

流速:1.0 mL/min。

进样量:10 μ L。

柱温:30 $^{\circ}$ C。

表1 梯度洗脱条件

时间,min	A相,%	B相,%
0.0	98	2
4.0	88	12
7.5	70	30
11.0	0	100
12.0	0	100
15.0	98	2
18.0	98	2

表2 波长变化程序

时间,min	通道一波长,nm	通道二波长,nm
0.0	425 ^a	630 ^b
7.3	425	630
7.31	500 ^c	630
18.0	500	630

^a 柠檬黄的检测波长为 425 nm;
^b 靛蓝、亮蓝的检测波长为 630 nm;
^c 苋菜红、胭脂红、日落黄、诱惑红的检测波长为 500 nm。

7.4.2 定量测定

取试样溶液和标准工作液上机分析,根据保留时间确定待测物,得到色谱峰面积响应值,通过单一标准溶液作单点校准或通过标准曲线作多点校准,用外标法定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。若试样溶液浓度超过线性范围时,用水稀释后重新测定。

8 试验数据处理

试样中待测物含量以质量分数 X_i 表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)和式(2)计算。

$$X_i = \frac{C_i \times V \times V_2 \times n \times 1000}{m \times V_1 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C_i ——试样溶液中 i 色素浓度,单点校准时由式(2)计算得到,多点校准时从标准曲线查得,单位为微克每毫升(μ g/mL);

V ——溶解残余物的体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——过固相萃取柱的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——提取液总体积,单位为毫升(mL);

n ——稀释倍数;

m ——试样的质量,单位为克(g)。

$$C_i = \frac{C_s A_i}{A_s} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_s ——混合标准工作液中 i 色素浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A_i ——试样溶液中 i 色素的峰面积;

A_s ——混合标准工作液中 i 色素的峰面积。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下,获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不大于这 2 个测定值的算术平均值的 20%,以大于 20%的情况不超过 5%为前提。



附录 A
(资料性附录)

7 种水溶性色素混合标准工作液色谱图

柠檬黄、苋菜红、胭脂红、靛蓝、亮蓝、日落黄、诱惑红 7 种水溶性色素混合标准工作液的色谱图见图 A.1。

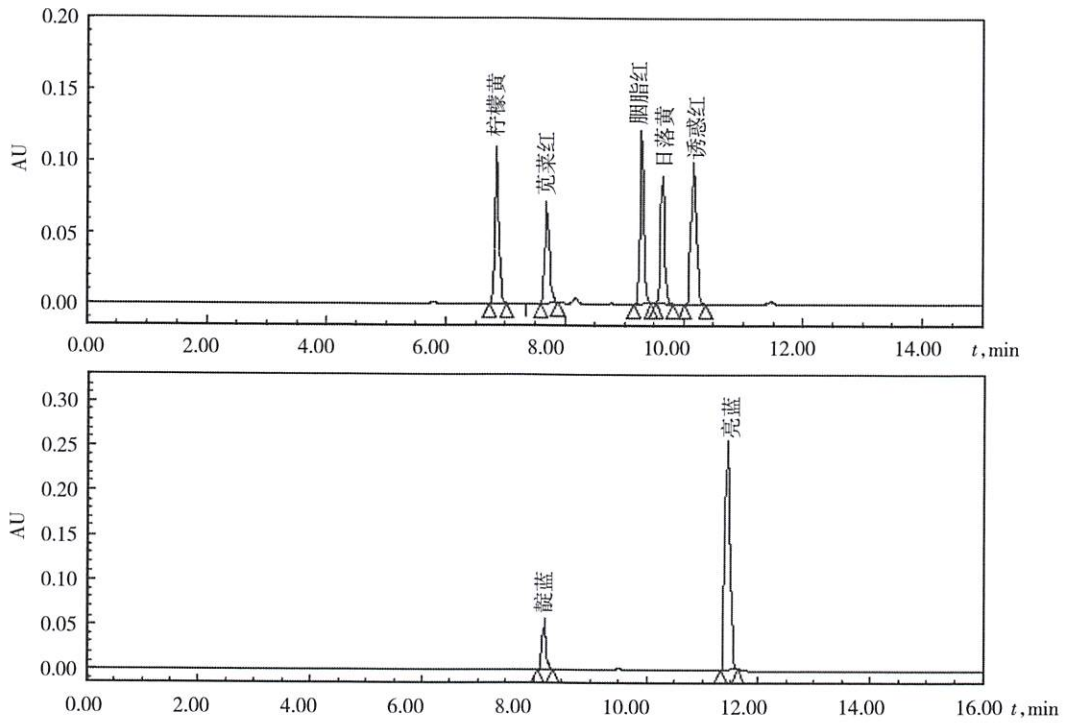


图 A.1 7 种水溶性色素混合标准工作液(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的色谱图

中华人民共和国
农业行业标准
饲料中柠檬黄等7种水溶性色素的测定
高效液相色谱法
NY/T 3322—2018

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15千字

2019年4月第1版 2019年4月北京第1次印刷

书号: 16109·4765

定价: 18.00元



NY/T 3322—2018

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261