



中华人民共和国国家标准

GB/T 17813—2018
代替 GB/T 17813—1999

添加剂预混合饲料中烟酸与叶酸的测定 高效液相色谱法

Determination of nicotinic acid and folic acid in premix—
High performance liquid chromatography

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 17813—1999《复合预混料中烟酸、叶酸的测定 高效液相色谱法》。

本标准与 GB/T 17813—1999 相比,除编辑性修改外,主要技术内容修改如下:

- 修改了方法的检测限,增加了定量限(见第 1 章,1999 年版的第 1 章);
- 修改了标准名称;
- 修改了烟酸、叶酸测定原理(见第 3 章和第 4 章,1999 年版的第 3 章);
- 修改了烟酸和叶酸的提取液组成(见第 3 章和第 4 章,1999 年版的 4.6);
- 修改了烟酸和叶酸流动相与色谱条件(见 3.2.7、3.5.2 和 4.5.2,1999 年版的 7.2.1.1);
- 修改了烟酸标准溶液的配制方法(见 3.2.9,1999 年版的 4.5.1);
- 复合预混合饲料提取方法中,增加了二水合乙二胺四乙酸二钠(EDTA)使用(见 3.5.1.2 和 4.5.1.2,1999 年版的 7.1);
- 增加了烟酸、叶酸的标准色谱图(见附录 A)。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]。

本标准主要起草人:李兰、贾铮、索德成。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 17813—1999。

添加剂预混合饲料中烟酸与叶酸的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了添加剂预混合饲料中烟酸、叶酸含量测定的高效液相色谱法。
本标准适用于维生素预混合饲料及复合预混合饲料中烟酸、叶酸的测定。
烟酸的检测限为 100 mg/kg,定量限为 300 mg/kg;叶酸的检测限为 15 mg/kg,定量限为 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 烟酸的测定

3.1 原理

试样中烟酸用酸性甲醇水溶液提取,采用高效液相色谱仪分离,紫外检测,外标法定量。

3.2 试剂或溶液

除特殊注明外,本标准所用试剂均为分析纯,水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

- 3.2.1 冰乙酸:优级纯。
- 3.2.2 庚烷磺酸钠:色谱纯。
- 3.2.3 三乙胺:优级纯。
- 3.2.4 甲醇:色谱纯。
- 3.2.5 0.1% 三氟乙酸溶液:移取 1 mL 三氟乙酸于 1 000 mL 水中。
- 3.2.6 提取液:称取 50 mg 二水合乙二胺四乙酸二钠(以下简称 EDTA)溶于约 800 mL 水中,加入 20 mL 冰乙酸(3.2.1)、5 mL 三乙胺(3.2.3),混匀后与 200 mL 甲醇混合,该溶液 pH 值约为 3~4。
- 3.2.7 流动相:称取 1.1 g 庚烷磺酸钠(3.2.2)、50 mg EDTA 溶于约 1 000 mL 水中,加入 20 mL 冰乙酸(3.2.1)、5 mL 三乙胺(3.2.3),混匀,用冰乙酸、三乙胺调节溶液 pH 值为 4.0,过 0.45 μm 滤膜。取上述溶液 800 mL 与 200 mL 甲醇(3.2.4)混合,备用。
- 3.2.8 烟酸标准品:烟酸含量≥98.0%。
- 3.2.9 烟酸标准储备溶液:准确称取 0.1 g(精确到 0.000 1 g)烟酸标准品(3.2.8),置于 100 mL 棕色容量瓶中,加水使其溶解,并加入 1 mL 0.1%三氟乙酸溶液(3.2.5),用水定容至刻度,摇匀。该标准储备液中烟酸含量约为 1 mg/mL,2℃~8℃保存,有效期为 6 个月。
- 3.2.10 烟酸标准工作液:根据试样种类(维生素预混合饲料、复合预混合饲料)调整稀释倍数,使标准

工作液浓度在 10 μg/mL~150 μg/mL,用提取液(3.2.6)稀释定容。当日制备并使用。

3.3 仪器设备

3.3.1 天平:感量 0.000 1 g、感量 0.001 g。

3.3.2 离心机:转速不低于 8 000 r/min(相对离心力不低于 6 010*g*)。

3.3.3 超声波水浴。

3.3.4 高效液相色谱仪:配紫外可调波长检测器(或二极管矩阵检测器)。

3.4 样品

按照 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按 GB/T 20195 制备试样,粉碎过 0.425 mm 孔径筛,充分混匀,储存在密闭容器中,避光保存。

3.5 试验步骤

3.5.1 试样的提取

3.5.1.1 维生素预混合饲料的提取

称取试样 0.5 g(精确到 0.001 g),置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入提取液(3.2.6)约 70 mL,边加边摇匀后置于超声水浴中超声提取 15 min,期间摇动 2 次,待冷却后用提取液(3.2.6)定容至刻度,摇匀。取约 25 mL 上述溶液于离心机 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液用提取液(3.2.6)稀释 10 倍后过 0.45 μm 微孔滤膜,上机测定。

3.5.1.2 复合预混合饲料的提取

称取试样约 1 g(精确到 0.001 g),置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入 1 g EDTA 钠盐,边摇动边加入提取液(3.2.6)约 70 mL,置于超声水浴中超声提取 15 min,期间摇动 2 次,待冷却后用提取液(3.2.6)定容至刻度,摇匀。取适量溶液于离心机 8 000 r/min 离心 5 min 或过滤,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,上机测定。

3.5.2 参考色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm 或性能相当者。

流动相:见 3.2.7。

流速:1.0 mL/min。

温度:室温。

检测波长:262 nm。

进样量:20 μL。

3.5.3 测定

取烟酸标准工作液(3.2.10)和试样溶液(3.5.1)分别进样,得到色谱峰面积响应值,在线性范围内,用外标法单点校正,测定,以保留时间定性,峰面积定量。烟酸标准色谱图参见附录 A 中图 A.1。

3.6 试验数据处理

试样中烟酸的含量,以质量分数 ω 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$\omega = \frac{P_i \times V \times c \times V_{st}}{P_{st} \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

P_i ——试样溶液峰面积值；

V ——试样稀释体积，单位为毫升(mL)；

c ——烟酸标准溶液浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；

V_i ——试样溶液进样体积，单位为微升(μL)；

V_{st} ——烟酸标准溶液进样体积，单位为微升(μL)；

P_{st} ——烟酸标准溶液峰面积平均值；

m ——试样质量，单位为克(g)；

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

3.7 精密度

对于烟酸含量小于或等于 500 mg/kg 的添加剂预混合饲料，在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的差值不大于这两个测定值算术平均值的 10%。

对于烟酸含量大于 500 mg/kg 的添加剂预混合饲料，在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的差值不大于这两个测定值算术平均值的 5%。

4 叶酸的测定

4.1 原理

试样中叶酸用弱碱液提取，采用高效液相色谱仪分离检测，紫外检测，外标法定量。

4.2 试剂或溶液

除特殊注明外，本标准所用试剂均为分析纯，水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.2.1 0.1 mol/L 碳酸钠溶液：称取 5.3 g 无水碳酸钠，溶解于 500 mL 水中。

4.2.2 2 mol/L 碳酸钠溶液：称取 106 g 无水碳酸钠，溶解于 500 mL 水中。

4.2.3 饱和 EDTA 溶液：称取 120 g EDTA 于 1 000 mL 烧杯中，加水 1 000 mL，搅拌并超声溶解 1 h，即得。

4.2.4 复合预混料提取液：饱和 EDTA 溶液+2 mol/L 碳酸钠溶液溶液=80+25，pH=9。

4.2.5 叶酸标准品：叶酸含量 $\geq 95.0\%$ 。

4.2.6 叶酸标准储备溶液：准确称取 0.05 g(精确到 0.000 1 g)叶酸标准品(4.2.5)，置于 100 mL 棕色容量瓶中，加入 0.1 mol/L 碳酸钠溶液(4.2.1)，超声使其溶解，稀释定容至刻度，摇匀。该标准储备液中叶酸含量为 500 $\mu\text{g/mL}$ ，2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期 6 个月。

4.2.7 叶酸标准工作液：根据样品种类(维生素预混合饲料、复合预混合饲料)调整稀释倍数，使标准工作液中叶酸浓度约为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ ~10.0 $\mu\text{g/mL}$ ，用 0.1 mol/L 碳酸钠溶液(4.2.1)稀释定容。当日制备并使用。

4.3 仪器设备

同 3.3。

4.4 样品

同 3.4。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样的提取

4.5.1.1 维生素预混料的提取

称取试样 0.25 g~0.5 g(精确到 0.001 g),置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入约 70 mL 水,4 mL 2 mol/L 碳酸钠溶液(4.2.2),置于超声水浴中超声提取 10 min,期间摇动 2 次,待冷却后加水至约 95 mL,再次检查试样溶液 pH 值,确认 pH 值为 8~9,否则滴加少量碳酸钠溶液(4.2.2)调节,用水定容至刻度,摇匀。取部分试液于离心机上 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,待上机测定。

4.5.1.2 复合预混料的提取

称取试样 1 g(精确到 0.001 g),置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入提取液(4.2.4)约 80 mL,置于超声水浴中超声提取 10 min,期间摇动 2 次,待冷却后用提取液定容至刻度,摇匀。取少量试液于离心机上 8 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,待上机测定。

4.5.2 参考色谱条件

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

流动相:3.2.7。

流速:1.0 mL/min。

温度:室温。

检测波长:282 nm。

进样量:20 μL。

4.5.3 定量测定

按方法规定平衡色谱柱,向色谱柱注入相应的叶酸标准工作液(4.2.7)和试样溶液(4.5.1),得到色谱峰面积响应值,在线性范围内,用外标法单点校正,定量测定,叶酸标准色谱图参见附录 A 中图 A.2。

4.6 试验数据处理

试样中叶酸的含量,以质量分数 ω 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(2)计算:

$$\omega = \frac{P_i \times V \times c \times V_{st}}{P_{st} \times m \times V_i} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

P_i ——试样溶液峰面积值;

V ——试样稀释体积,单位为毫升(mL);

c ——叶酸标准溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μL);

V_{st} ——叶酸标准溶液进样体积,单位为微升(μL);

P_{st} ——叶酸标准溶液峰面积平均值;

m ——试样质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的差值不大于这两个测定值算术平均值的 10%。

附 录 A
(资料性附录)
烟酸和叶酸标准色谱图

烟酸标准色谱图见图 A.1,叶酸标准色谱图见 A.2。

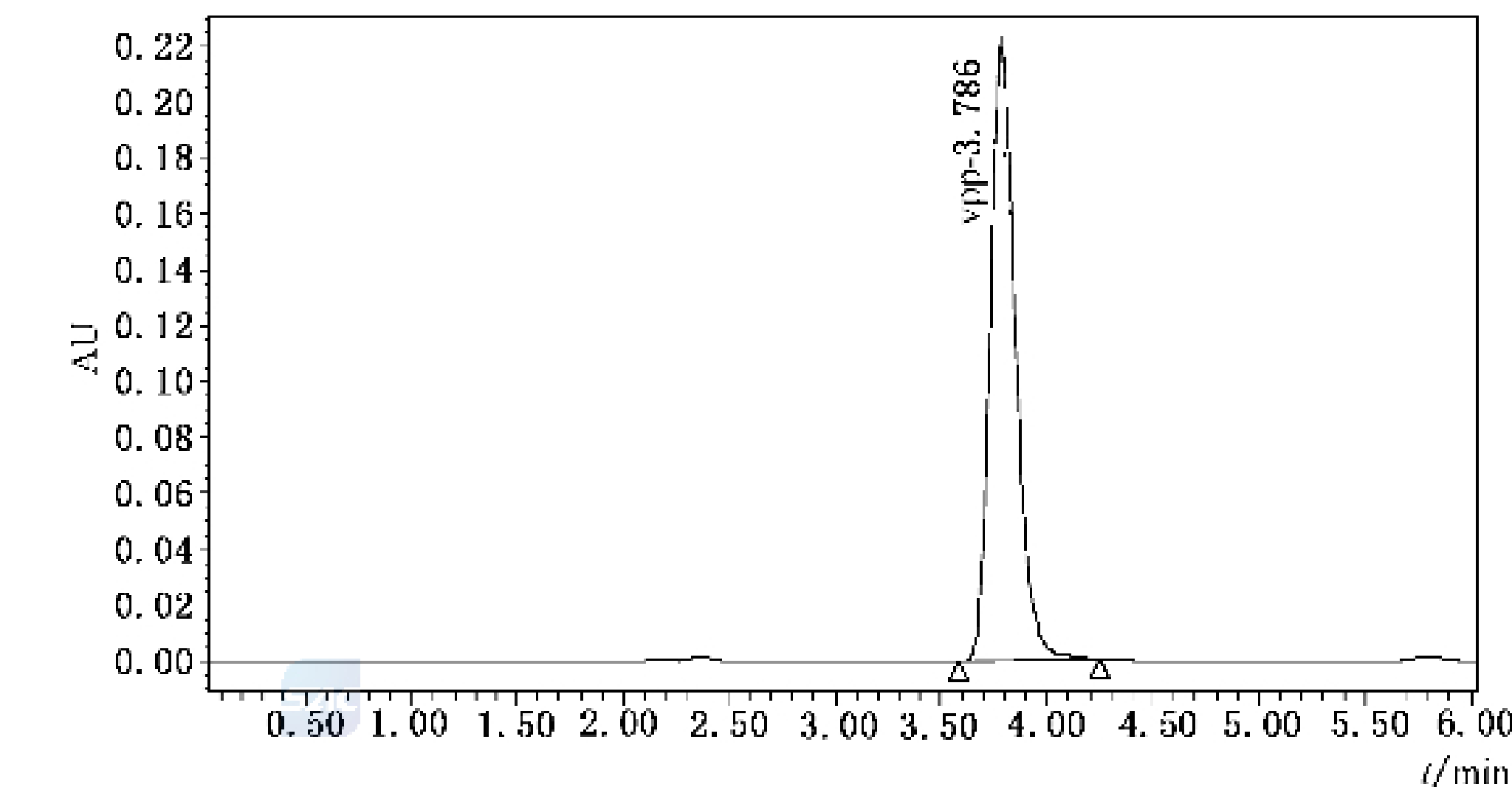


图 A.1 烟酸标准溶液(15 µg/mL)色谱图

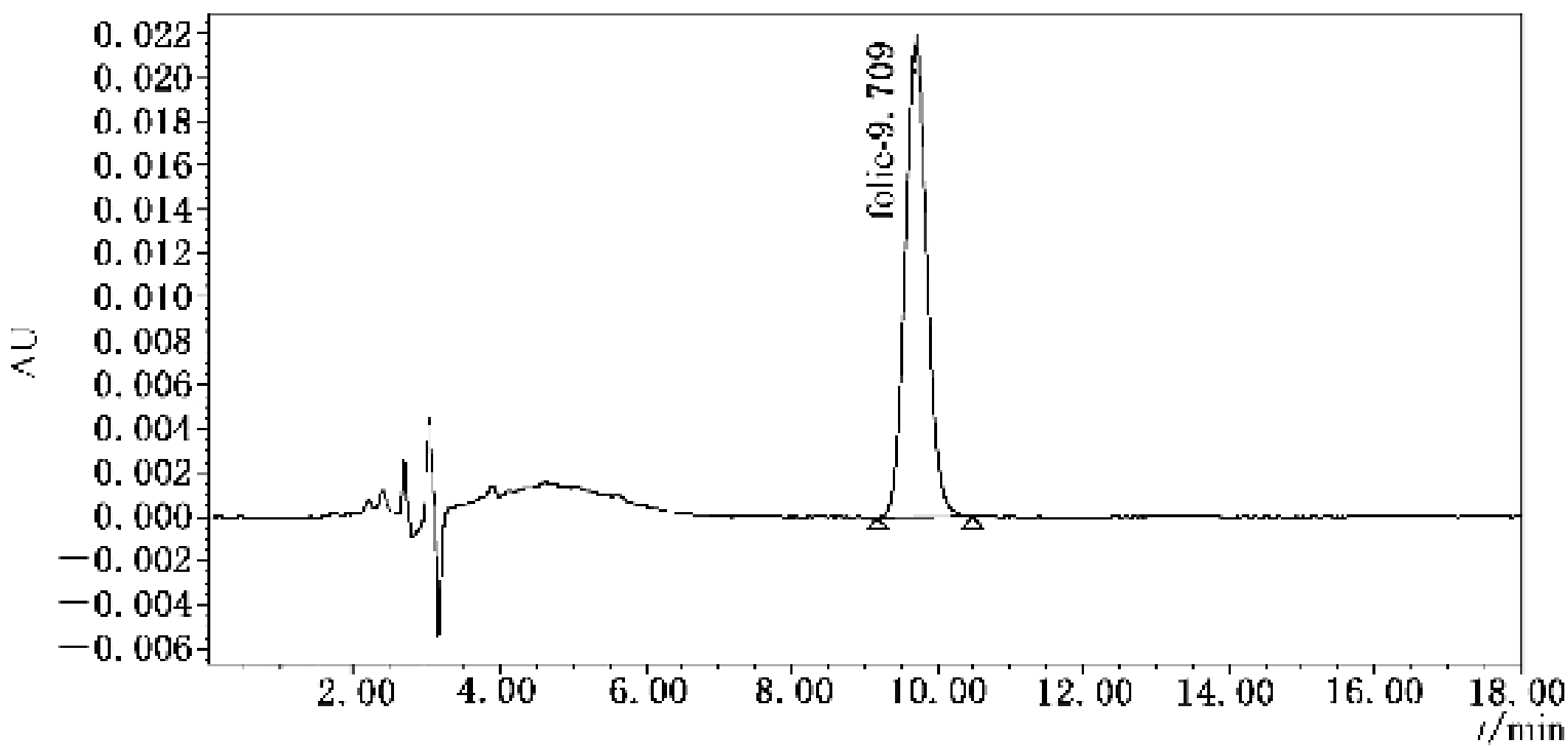


图 A.2 叶酸标准溶液(6 µg/mL)色谱图