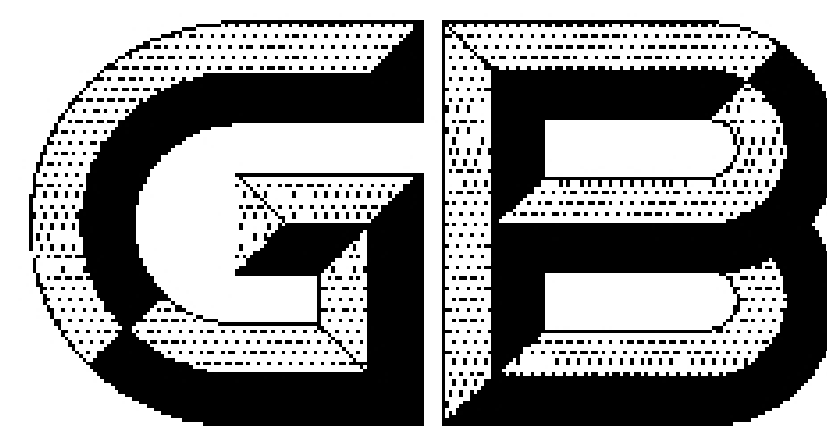




中华人民共和国国家标准

GB/T 17814—2022

代替 GB/T 17814—2011

饲料中丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、 特丁基对苯二酚、乙氧基喹啉和没食子酸 丙酯的测定

Determination of butyl hydroxy anisole, dibutyl hydroxy toluene,
tertiary butyl hydroquinone, ethoxyquin and propyl gallate in feeds

2022-12-30 发布

2023-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 17814—2011《饲料中丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、乙氧基喹和没食子酸丙酯的测定》，与 GB/T 17814—2011 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 将高效液相色谱法适用范围扩大至精料补充料、饲料原料(见第 1 章,2011 年版的第 1 章)；
- b) 更改了高效液相色谱法测定丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、乙氧基喹啉、没食子酸丙酯的检出限和定量限(见第 1 章和附录 A,2011 年版的第 1 章)，增加了高效液相色谱法测定特丁基对苯二酚和气相色谱法测定丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯和乙氧基喹啉的检出限和定量限(见第 1 章和附录 A)；
- c) 增加了高效液相色谱法测定特丁基对苯二酚(见第 4 章)；
- d) 增加了油脂类试样溶液的制备(见 4.5.1.1)；
- e) 删除了气相色谱法中填充柱法(见 2011 年版的 4.2.4.1.2)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：上海市动物疫病预防控制中心、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究院。

本文件主要起草人：商军、黄土新、张浩然、曹莹、宋荣、田恺、华贤辉、黄家莺、徐汀、孙冰清、姜芹、张亦菲、张好。

本文件于 1999 年首次发布，2011 年第一次修订，本次为第二次修订。

饲料中丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、 特丁基对苯二酚、乙氧基喹啉和没食子酸 丙酯的测定

1 范围

本文件描述了饲料中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、特丁基对苯二酚(TBHQ)、乙氧基喹啉(EQ)和没食子酸丙酯(PG)的高效液相色谱测定方法以及饲料中 BHA、BHT、EQ 的气相色谱测定方法。

本文件中“高效液相色谱法”适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料、饲料原料中 BHA、BHT、TBHQ、EQ 和 PG 含量的测定,“气相色谱法”适用于配合饲料、鱼粉中 BHA、BHT 和 EQ 含量的测定。

本文件中 BHA、BHT、TBHQ、EQ 和 PG 的检出限、定量限按附录 A 执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 高效液相色谱法(仲裁法)

注意:测定全过程,尽可能避光(或不在强光下)操作。

4.1 原理

试样中的 BHA、BHT、TBHQ、EQ 和 PG 用乙腈超声提取,高效液相色谱法测定,外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2.2 乙腈:色谱纯。

4.2.3 乙酸:色谱纯。

4.2.4 2%乙酸溶液:准确移取 20 mL 乙酸(4.2.3),加水稀释至 1 000 mL,摇匀。

4.2.5 标准品:BHA、BHT、TBHQ、PG 纯度均不小于 98%,EQ 纯度不小于 95%,具体信息见附录 B。

4.2.6 混合标准储备溶液:分别称取 BHA、BHT、TBHQ、EQ 100 mg 和 PG 50 mg(精确至 0.01 mg)于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(4.2.2)溶解并定容。于 2℃~8℃避光保存,有效期为 2 周。

4.2.7 混合标准中间溶液:准确移取混合标准储备溶液(4.2.6)20 mL 于 200 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(4.2.2)定容,使 PG 浓度为 0.05 mg/mL,BHA、BHT、TBHQ、EQ 浓度为 0.1 mg/mL。

4.2.8 混合标准系列溶液:准确移取适量混合标准中间溶液(4.2.7)于 50 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(4.2.2)稀释定容配成混合标准系列溶液,PG 的质量浓度分别为:0.50 μg/mL、2.00 μg/mL、4.00 μg/mL、8.00 μg/mL、16.0 μg/mL、20.0 μg/mL 和 25.0 μg/mL;BHA、BHT、TBHQ、EQ 的质量浓度分别为 1.00 μg/mL、4.00 μg/mL、8.00 μg/mL、16.0 μg/mL、32.0 μg/mL、40.0 μg/mL 和 50.0 μg/mL。临用现配。

4.2.9 针式滤器:0.45 μm,有机相。

4.2.10 微孔滤膜:0.22 μm,有机相。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.3.2 分析天平:感量 0.01 mg 和 1 mg。

4.3.3 超声波清洗器。

4.3.4 恒温水浴锅。

4.3.5 离心机:转速不低于 9 000 r/min。

4.4 样品

按 GB/T 20195 制备试样,至少约 200 g,固体样品粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛,充分混匀,立即装入密闭容器中,避光保存,备用。液体、膏状样品,立即装入密闭容器中,避光保存,备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样溶液的制备

4.5.1.1 油脂类试样

平行做两份试验。称取试样 5 g,精确至 1 mg,置于 250 mL 具塞三角瓶中(如为凝固状,置 65℃水浴中加热 7 min,使融化),准确加入 50 mL 乙腈,55℃超声提取 40 min。冷却至室温,取上层溶液 20 mL 于 50 mL 离心管中,9 000 r/min 离心 5 min(4.3.5),用针式滤器(4.2.9)过滤,滤液再经 0.22 μm 滤膜(4.2.10)过滤,备用。

4.5.1.2 其他类试样

平行做两份试验。称取试样 5 g,精确至 1 mg,置于 250 mL 具塞三角瓶中,准确加入乙腈(4.2.2) 50 mL,摇匀,超声提取 40 min,期间振摇 2 次~3 次。摇匀静置至室温。吸取上述提取液适量,用针式滤器(4.2.9)过滤,滤液再经 0.22 μm 滤膜(4.2.10)过滤,备用。

4.5.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:C₁₈柱,长 150 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或性能相当者;
- b) 流动相:乙腈(4.2.2)+乙酸溶液(4.2.4)=65+35;
- c) 流速:0.5 mL/min;

- d) 柱温:20℃~30℃;
- e) 进样量:20 μL;
- f) 检测波长:280 nm。

4.5.3 测定

4.5.3.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取混合标准系列溶液(4.2.8)和试样溶液(4.5.1)上机测定。混合标准溶液的液相色谱图见附录 C。

4.5.3.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中待测物的保留时间应与质量浓度相近的混合标准系列溶液中 BHA、BHT、TBHQ、EQ 及 PG 的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.3.3 定量

以 BHA、BHT、TBHQ、EQ 和 PG 的质量浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应大于 0.99。试样溶液(4.5.1)中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围,应将试样溶液用乙腈(4.2.2)稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数 w_{1i} 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按公式(1)计算;单点校准按公式(2)计算。

$$w_{1i} = \frac{\rho_{1i} \times V_1 \times n \times 1\,000}{m_1 \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:
 ρ_{1i} ——从标准曲线查得的试样液中待测物的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 V_1 ——试样溶液的体积,单位为毫升(mL);
 n ——上机测定的试样溶液中待测物的质量浓度超出线性范围后,进一步稀释的倍数;
1 000 ——换算系数;
 m_1 ——试样质量,单位为克(g)。

$$w_{1i} = \frac{A_{1i} \times \rho_{s1i} \times V_1 \times n \times 1\,000}{A_{s1i} \times m_1 \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:
 A_{1i} ——试样溶液中待测物的峰面积;
 ρ_{s1i} ——标准溶液中 BHA、BHT、TBHQ、EQ 及 PG 的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 V_1 ——试样溶液的体积,单位为毫升(mL);
 n ——上机测定的试样溶液中待测物的质量浓度超出线性范围后,进一步稀释的倍数;
1 000 ——换算系数;
 A_{s1i} ——标准溶液中 BHA、BHT、TBHQ、EQ 及 PG 的峰面积;
 m_1 ——试样质量,单位为克(g)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下,两次独立测定结果与其算数平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 5%。

5 气相色谱法

注意：测定全过程，尽可能避光(或不在强光下)操作。

5.1 原理

试样中 BHA、BHT 和 EQ 用正己烷提取，离心分离，或离心分离后柱层析净化，气相色谱仪测定，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 正己烷：色谱纯。

5.2.2 丙酮。

5.2.3 二氯甲烷。

5.2.4 无水硫酸钠：500 °C 烘 4 h，于干燥器中保存，有效期 3 d。

5.2.5 二氯甲烷-丙酮混合液：9+1。

5.2.6 标准品：BHA、BHT 纯度均不小于 98%，EQ 纯度不小于 95%，具体信息见附录 B。

5.2.7 混合标准系列溶液：分别称取 BHA、BHT 和 EQ 50 mg(精确至 0.01 mg)于 50 mL 棕色容量瓶中，用正己烷(5.2.1)溶解并定容，准确移取适量此溶液于 50 mL 棕色容量瓶中，正己烷(5.2.1)稀释定容配成混合标准系列液，使 BHA、BHT 和 EQ 的质量浓度分别为 5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

5.2.8 弗罗里硅土：孔径 177 μm ~149 μm ，550 °C 烘 4 h，于干燥器中保存。

注：如用柱层析净化时，需注意弗罗里硅土的活性。550 °C 烘 4 h，于干燥器中保存，有效期 3 d。3 d 后，用前需于 130 °C 烘 4 h(特别是夏天湿度大时，更需注意)。

5.2.9 硅藻土：20 μm ~45 μm 。

5.2.10 医用脱脂棉。

5.3 仪器设备

5.3.1 气相色谱仪：配氢火焰离子化检测器(FID)。

5.3.2 分析天平：感量 0.01 mg 和 1 mg。

5.3.3 离心机：转速不低于 4 000 r/min。

5.3.4 超声波清洗器。

5.3.5 涡旋混合器。

5.3.6 具活塞层析柱：15 cm(长)×1 cm(内径)。

5.3.7 旋转蒸发器。

5.3.8 马弗炉。

5.4 样品

按 GB/T 20195 制备试样，至少约 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛，充分混匀，立即装入密闭容器中，避光保存，备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样溶液的制备

5.5.1.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g, 精确至 1 mg, 于 10 mL 具塞刻度试管中, 加入约 1 g 无水硫酸钠(5.2.4), 再准确加 5 mL 正己烷(5.2.1), 加塞。在涡旋混合器(5.3.5)上混合 0.5 min, 将试管放到试管架上, 连同试管架一起放入超声波清洗器(5.3.4)槽内, 槽内水位以刚好与试管中试样液位取齐或稍过, 超声提取 15 min。取出, 将试管外水液擦去, 放入离心机(5.3.3), 于 4 000 r/min 离心 2 min, 取上清液, 备用。

如遇干扰待测组分的试样, 提取液由 5.00 mL 正己烷(5.2.1)改为 10.00 mL 正己烷(5.2.1), 先按上述同法提取试样, 再按 5.5.1.2 进行处理。

对于待测物含量接近定量限的试样, 可于前一天称样, 加正己烷浸泡过夜, 第二天再提取测定。

5.5.1.2 净化

5.5.1.2.1 装柱

具活塞层析柱(5.3.6)底先放少许医用脱脂棉(5.2.10), 再加 2 g 无水硫酸钠(5.2.4), 用正己烷(5.2.1)调制弗罗里硅土(5.2.8) 4 g, 湿法填充于具活塞层析柱(5.3.6)中, 上端先加 5 g 硅藻土(5.2.9), 再加 5 g 无水硫酸钠(5.2.4), 铺平。

5.5.1.2.2 淋洗

准确移取 5 mL 上清液(5.5.1.1)上柱。先以 30 mL 正己烷(5.2.1)淋洗, 再以 80 mL 二氯甲烷-丙酮混合液(5.2.5)淋洗, 速度以 2 mL/min 为宜, 收集淋洗液, 用旋转蒸发仪(5.3.7)在 50 °C 下浓缩至近干, 准确加入正己烷(5.2.1) 2 mL 溶解, 立即上机测定。

5.5.2 气相色谱参考条件

气相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: HP-1 石英毛细管柱, 长 25 m, 内径 0.32 mm, 膜厚 0.25 μm 。或性能相当者;
- b) 检测器温度: 240 °C;
- c) 进样口温度: 210 °C;
- d) 柱温: 150 °C 保持 11 min, 25 °C/min 升温至 200 °C, 保持 11 min;
- e) 进样量: 1 μL ;
- f) 分流比: 20 : 1;
- g) 载气: 氮气;
- h) 载气流速: 2.0 mL/min;
- i) 尾吹气流速: 30 mL/min;
- j) 氢气流速: 30 mL/min;
- k) 空气流速: 350 mL/min。

5.5.3 测定

5.5.3.1 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下, 分别取混合标准系列溶液(5.2.7)和试样溶液(5.5.1)上机测定。BHA、BHT

及 EQ 混合标准系列溶液的气相色谱图见附录 D。

5.5.3.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中待测物的保留时间应与质量浓度相近的混合标准系列溶液中 BHA、BHT 和 EQ 的保留时间一致,其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

5.5.3.3 定量

以 BHA、BHT 及 EQ 的质量浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应大于 0.99。试样溶液(5.5.1)中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围,应将试样溶液用正己烷(5.2.1)稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数 w_{2i} 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按公式(3)或公式(4)计算;单点校准按公式(5)或公式(6)计算。

$$w_{2i} = \frac{\rho_{2i} \times V_2 \times n \times 1\,000}{m_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

ρ_{2i} ——从标准曲线查得的试样液中待测物的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_2 ——提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后,进一步稀释的倍数;

1 000 ——换算系数;

m_2 ——试样质量,单位为克(g)。

$$w_{2i} = \frac{\rho_{2i} \times V_2 \times V_4 \times n \times 1\,000}{V_3 \times m_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

ρ_{2i} ——从标准曲线查得的试样液中待测物的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_2 ——提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

V_4 ——浓缩液定容的体积,单位为毫升(mL);

n ——上机测定的试样溶液中待测物的质量浓度超出线性范围后,进一步稀释的倍数;

1 000 ——换算系数;

V_3 ——提取溶液分取过柱的体积,单位为毫升(mL);

m_2 ——试样质量,单位为克(g)。

$$w_{2i} = \frac{A_{2i} \times \rho_{s2i} \times V_2 \times n \times 1\,000}{A_{s2i} \times m_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

A_{2i} ——试样溶液中待测物的峰面积;

ρ_{s2i} ——标准溶液中 BHA、BHT 及 EQ 的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_2 ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

n ——上机测定的试样溶液中待测物的质量浓度超出线性范围后,进一步稀释的倍数;

1 000 ——换算系数;

A_{s2i} ——标准溶液中 BHA、BHT 及 EQ 的峰面积;

m_2 ——试样质量,单位为克(g)。

$$w_{2i} = \frac{A_{2i} \times \rho_{s2i} \times V_2 \times V_4 \times n \times 1\,000}{A_{s2i} \times V_3 \times m_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (6)$$

式中：

- A_{2i} ——试样溶液中待测物的峰面积；
- ρ_{s2i} ——标准溶液中 BHA、BHT 及 EQ 的质量浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；
- V_2 ——提取溶液的体积，单位为毫升(mL)；
- V_4 ——浓缩液定容的体积，单位为毫升(mL)；
- n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后，进一步稀释的倍数；
- 1 000 ——换算系数；
- A_{s2i} ——标准溶液中 BHA、BHT 及 EQ 的峰面积；
- V_3 ——提取溶液分取过柱的体积，单位为毫升(mL)；
- m_2 ——试样质量，单位为克(g)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 7.5%。

附 录 A

(规范性)

高效液相色谱法和气相色谱法的检出限、定量限

高效液相色谱法和气相色谱法的检出限和定量限见表 A.1。

表 A.1 高效液相色谱法和气相色谱法的检出限和定量限

方法	抗氧化剂名称	检出限 mg/kg	定量限 mg/kg
高效液相色谱法	丁基羟基茴香醚(BHA)	1.9	8.7
	特丁基对苯二酚(TBHQ)	1.9	8.6
	乙氧基喹啉(EQ)	2.0	8.9
	没食子酸丙酯(PG)	1.8	8.8
	二丁基羟基甲苯(BHT)	5.0	10.0
气相色谱法	丁基羟基茴香醚(BHA)	5.0	12.5
	乙氧基喹啉(EQ)	5.0	12.5
	二丁基羟基甲苯(BHT)	5.0	12.5

附 录 B
(资料性)

抗氧化剂标准品的中文名称、英文名称、化学分子式和 CAS 号

5 种抗氧化剂标准品的中文名称、英文名称、化学分子式和 CAS 号见表 B.1。

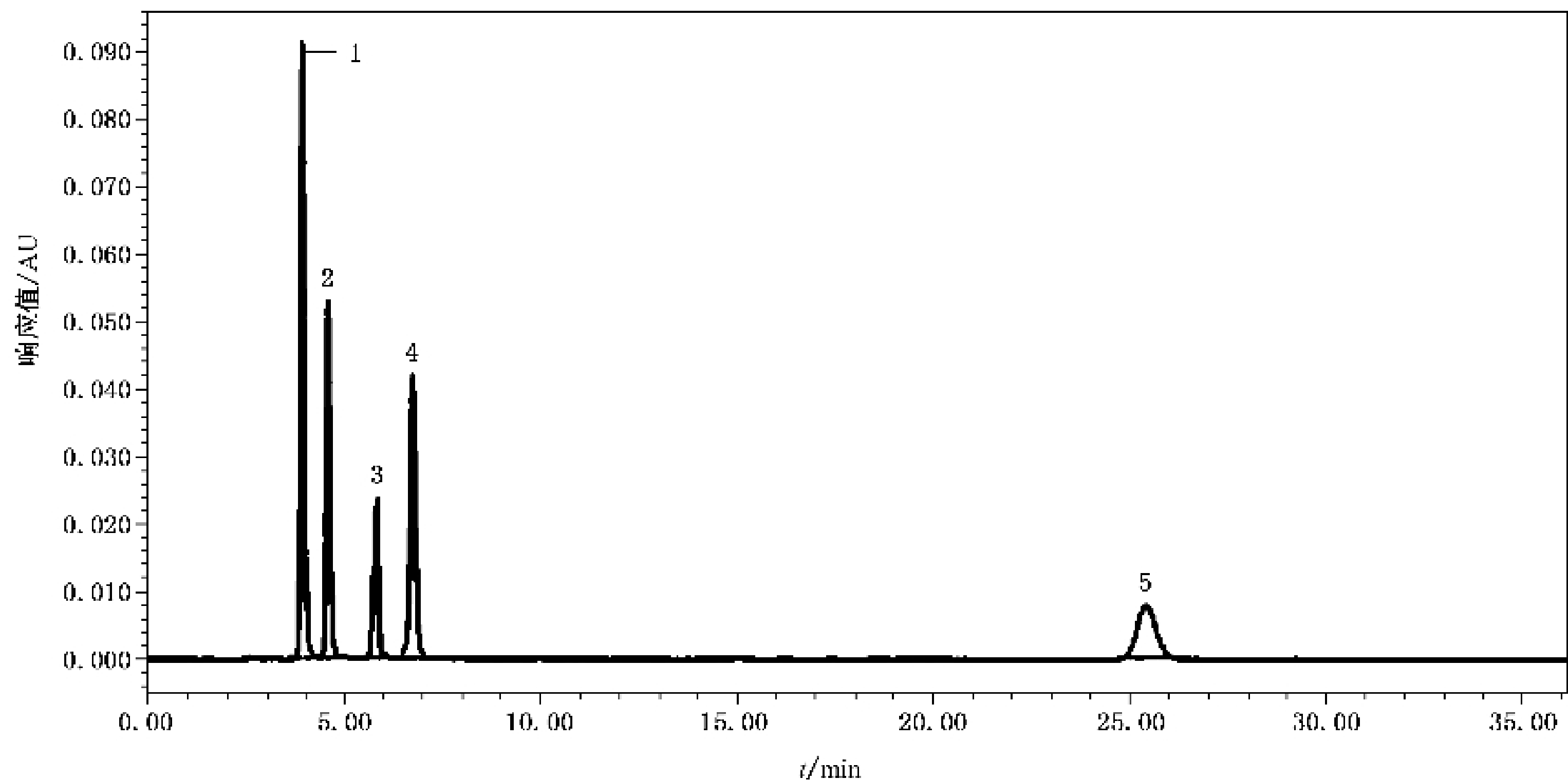
表 B.1 5 种抗氧化剂标准品的中文名称、英文名称、化学分子式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
丁基羟基茴香醚(BHA)	Butyl hydroxy anisole	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	25013-16-5
特丁基对苯二酚(TBHQ)	Tertiary butyl hydroquinone	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	1948-33-0
乙氧基喹啉(EQ)	Ethoxyquin	C ₁₄ H ₁₉ NO	91-53-2
没食子酸丙酯(PG)	Propyl gallate	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	121-79-9
二丁基羟基甲苯(BHT)	Dibutyl hydroxy toluene	C ₁₅ H ₂₄ O	128-37-0

附 录 C
(资料性)

混合标准工作溶液中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、特丁基对苯二酚(TBHQ)、
乙氧基喹啉(EQ)和没食子酸丙酯(PG)的液相色谱图

混合标准工作溶液中 BHA、BHT、TBHQ、EQ(50 $\mu\text{g/mL}$)和 PG(25 $\mu\text{g/mL}$)的液相色谱图见图 C.1。



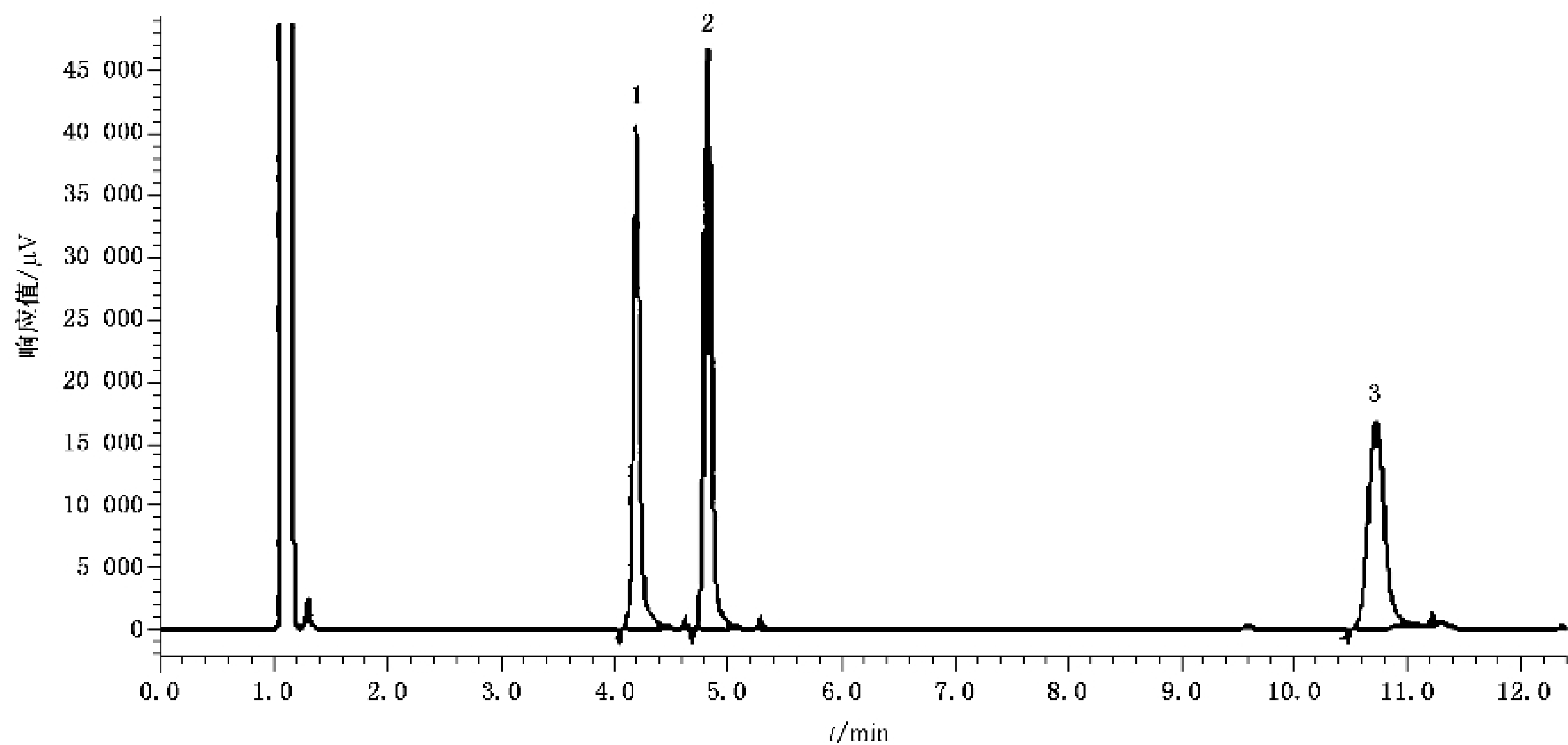
标引序号说明：
1——PG；
2——TBHQ；
3——EQ；
4——BHA；
5——BHT。

图 C.1 混合标准工作溶液中 BHA、BHT、TBHQ、EQ(50 $\mu\text{g/mL}$)和 PG(25 $\mu\text{g/mL}$)的液相色谱图

附 录 D
(资料性)

混合标准工作溶液中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)和乙氧基喹啉(EQ)的
气相色谱图

混合标准工作溶液中 BHA、BHT 和 EQ(100 $\mu\text{g/mL}$)的气相色谱图见图 D.1。



标引序号说明：
1——BHA；
2——BHT；
3——EQ。

图 D.1 混合标准工作溶液中 BHA、BHT 和 EQ(100 $\mu\text{g/mL}$)的气相色谱图