附件 8

NYSL

新饲料和新饲料添加剂产品标准

NYSL—1013—2024

饲料中阿魏酸的测定 高效液相色谱法

Determination of ferulic acid in feeds

— High performance liquid chromatography

2024-12-20 发布　　2024-12-20 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前　言

本文件依照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。

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这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出，由全国饲料评审委员会归口。

本文件由广州市科虎生物技术有限公司、四川农业大学、广东新科农生物科技有限公司，由国家饲料质量检验检测中心（北京）复核。

本文件主要起草人：韩永权、冯琳、徐述明、刘燕、史合群。

饲料中阿魏酸的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了饲料中阿魏酸测定的高效液相色谱测法。

本文件适用于添加了饲料添加剂阿魏酸的配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料中阿魏酸含量的测定。

本文件检出限为 0.3 mg/kg，定量限为 1.0 mg/kg。

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 原理

试样中的阿魏酸经甲醇溶液提取，固相萃取柱净化，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅适用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 甲醇溶液：取 700 mL 甲醇（5.2）与 300 mL 水混匀。

5.5 乙酸钠溶液（10 mmol/L）：称取 0.820 g 无水乙酸钠，加 800 mL 水溶解，加冰乙酸调节 pH 至 4.20，用水定容至 1000 mL，混匀，0.45 μm 水系微孔滤膜过滤。

5.6 标准储备溶液：准确称取适量的阿魏酸（CAS 号：537-98-4，纯度≥98.0%）于 25 mL 容量瓶中，加甲醇（5.2）溶解并定容至刻度，配制成浓度为 1000 μg/mL 的阿魏酸标准储备溶液。于 10℃以下密封保存，有效期为 3 个月。

5.7 标准系列溶液：准确移取适量的阿魏酸标准储备溶液（5.6）于 25 mL 容量瓶中，用甲醇溶液（5.4）定容至刻度，配制成阿魏酸浓度分别为 0.04 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的标准系列溶液。临用现配。

5.8　Prime HLB[1)] 固相萃取柱，60 mg/3 mL。

5.9　针式微孔滤膜：0.45 μm，有机系。

6　仪器设备

6.1　高效液相色谱仪：配备紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2　分析天平：精度为 0.0001 g。

6.3　超声波清洗器

6.4　固相萃取装置。

7　样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的试验筛，充分混匀，装入磨口瓶中，备用。

8　试验步骤

8.1　试样溶液制备

准确称取试样约 2 g（精确至 0.0001 g）于 50 mL 容量瓶中，加入甲醇溶液（5.4）约 30 mL，超声 20 min，冷却至室温后用甲醇溶液（5.4）定容至刻度，摇匀，静置 10 min，取 2 mL 上清液过 Prime HLB 固相萃取柱（5.8），滤液过膜（5.9），待测。

8.2　液相色谱参考条件

a）色谱柱：C_{18}柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，或者性能相当者；
b）柱温：40℃；
c）检测波长：321 nm；
d）流速：1.0 mL/min；
e）进样量：10 μL；
f）流动相：A相：乙酸钠溶液（5.5）；B相：乙腈（5.3）。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.0	90	10
3.0	90	10
10.0	75	25
20.0	10	90
25.0	10	90
25.1	90	10
30.0	90	10

1）Prime HLB 是由美国 waters 公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本文本使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果，那么可使用这些等效产品。

8.3 测定

8.3.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器最佳条件下，分别移取标准系列溶液（5.7）和试样溶液（7.1）上机测定。阿魏酸标准溶液的液相色谱图见附录A。

8.3.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中阿魏酸的保留时间应与标准系列溶液中阿魏酸的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

8.3.2 定量

以阿魏酸标准系列溶液中的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用甲醇溶液（5.4）稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中阿魏酸的含量以质量分数w计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按式（1）计算，单点校准按式（2）计算：

$$w = \frac{\rho \times V \times n \times 1000}{m \times 1000} \quad \text{（1）}$$

式中：

ρ——由标准曲线查得的试样溶液中阿魏酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

n——超出标准曲线后的稀释倍数；

m——试样质量，单位为克（g）。

$$w = \frac{A \times \rho_{st} \times V \times n}{A_{st} \times m \times 1000} \times 1000 \quad \text{（2）}$$

式中：

A——试样溶液中阿魏酸峰面积；

n——超出标准曲线后的稀释倍数；

ρ_{st}——标准溶液中阿魏酸浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

A_{st}——标准溶液中阿魏酸峰面积；

M——试样质量，单位为克（g）。

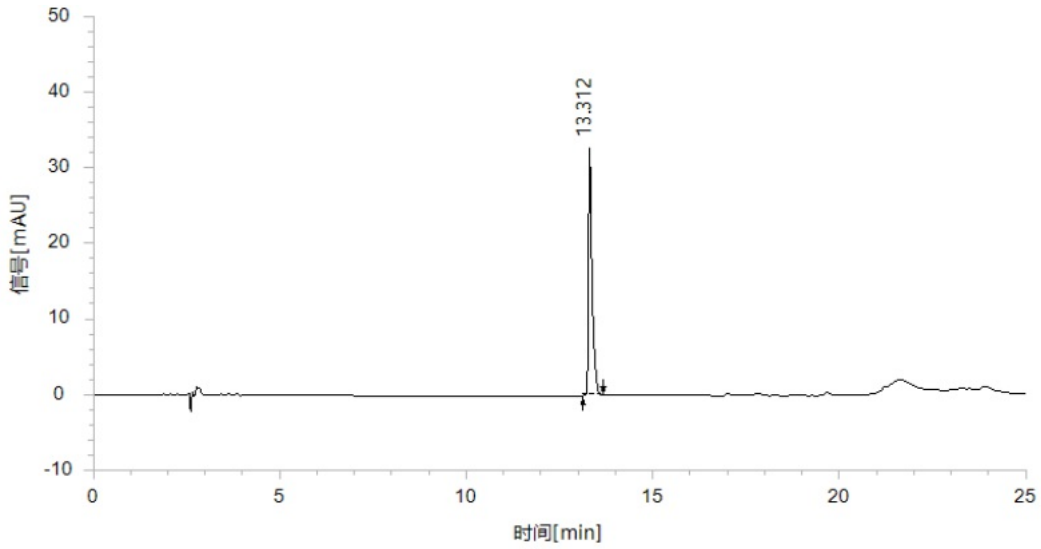
测定结果以两次平行测定结果的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于其算术平均值的10%。

附 录 A
（资料性）
阿魏酸标准溶液的高效液相色谱图

阿魏酸标准溶液的高效液相色谱图见图A. 1。



图A.1 阿魏酸标准溶液（5 μg/mL）的高效液相色谱图

附件 9

饲料添加剂贝莱斯芽孢杆菌（CECT 5940 / CICC 11068s）信息表

申请单位	赢创运营有限公司	
通用名称	贝莱斯芽孢杆菌（CECT 5940 / CICC 11068s）	
英文名称	*Bacillus velezensis*（CECT 5940 / CICC 11068s)	
主要成分	贝莱斯芽孢杆菌	
产品类别	微生物	
产品来源	以贝莱斯芽孢杆菌（CECT 5940 / CICC 11068s）为菌种，经液体发酵、固液分离、干燥、添加载体等工艺制得	
适用范围	肉鸡	
在配合饲料中的推荐添加量（以干物质含量为88%的配合饲料为基础）	1000 mg/kg（10^9 CFU/kg）	
质量要求	外观与性状	奶油色至白色颗粒
	贝莱斯芽孢杆菌/（CFU/g）	≥1×10^9
	水分/%	≤1.0
	粒度（425 μm 孔径试验筛通过率）/%	≥78
	总砷（以 As 计）/（mg/kg）	≤2.0
	铅/（mg/kg）	≤5.0
	汞/（mg/kg）	≤0.1
	镉/（mg/kg）	≤0.5
	黄曲霉毒素 B_1/（μg/kg）	≤10
	霉菌总数/（CFU/g）	≤2×10^4
	大肠菌群/（MPN/100 g）	≤1×10^4
	沙门氏菌（25 g 中）	不得检出

附件 10

饲料添加剂甜菊糖苷信息表

通用名称	甜菊糖苷	
英文名称	Steviol glycosides	
主要成分	甜菊糖苷	
产品类别	甜味物质	
产品来源	以甜叶菊为原料，经水提、树脂吸附、解析、浓缩、干燥等工艺制得	
适用范围	犊牛、断奶仔猪	
在配合饲料或全混合日粮中的推荐添加量(以干物质含量为 88%的配合饲料或全混合日粮为基础)	犊牛：200 mg/kg（以产品计） 断奶仔猪：100～150 mg/kg（以产品计）	
质量要求	外观与性状	白色至淡黄色粉末、晶体、颗粒或片状
	甜菊糖苷含量（以干基计）/%	≥90.0
	粗灰分/%	≤1.0
	水分/%	≤6.0
	pH 值（1%水溶液）	4.5～7.0
	甲醇/（mg/kg）	≤200
	乙醇/（mg/kg）	≤5000
	总砷(以 As 计)/(mg/kg)	≤1.0
	铅/（mg/kg）	≤1.0