

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4685—2025

混合型饲料添加剂酸度调节剂中有 机酸的测定 高效液相色谱法

Determination of organic acids in acidity regulators as feed additive
blender—High performance liquid chromatography

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：四川威尔检测技术股份有限公司、通威农业发展有限公司、广东酸能生物科技有限公司、上海正正生物技术有限公司。

本文件主要起草人：张凤枰、张艳红、易倩、杨发树、张璐、何谦泰、沈如香、李海蓉。



混合型饲料添加剂酸度调节剂中有机酸的 测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了混合型饲料添加剂酸度调节剂中有机酸的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于粉末型、颗粒型、液体型和脂肪酸酯包被型混合型饲料添加剂酸度调节剂中柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、富马酸、丙酸、丁酸(包括前述有机酸的盐),以及苯甲酸和山梨酸(不包括其盐)的测定。

本文件柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸的检出限均为 0.02%、定量限均为 0.06%,富马酸的检出限为 0.000 1%、定量限为 0.000 3%,苯甲酸和山梨酸的检出限均为 0.001%、定量限均为 0.003%。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

用硫酸溶液超声提取试样中的柠檬酸、酒石酸、苹果酸、富马酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸,用甲醇超声提取苯甲酸和山梨酸,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,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 甲醇:色谱级。

5.3 硫酸溶液 I (30 mmol/L):量取 1.7 mL 硫酸,缓慢注入至 700 mL 水中,边加入边搅拌,冷却至室温,用水稀释至 1 000 mL,混匀。

5.4 氢氧化钠溶液(5 mol/L):称取 200 g 氢氧化钠,缓慢加入约 700 mL 水,搅拌、溶解,冷却至室温,用水稀释至 1 000 mL,混匀。

5.5 硫酸溶液 II:量取 200 mL 硫酸,缓慢注入至 700 mL 水中,边加入边搅拌,冷却至室温,用水稀释至 1 000 mL,混匀。

5.6 磷酸盐缓冲溶液:称取 2.5 g 无水磷酸二氢钾和 2.5 g 三水合磷酸氢二钾,加入适量水溶解,用水定容至 1 000 mL,混匀。

5.7 有机酸标准品:柠檬酸、酒石酸、苹果酸、富马酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、苯甲酸和山梨酸等 11 种有机酸标准品的 CAS 号、纯度等见附录 A。

5.8 柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、富马酸、丙酸、丁酸标准储备溶液(5 mg/mL):准确称取柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、富马酸、丙酸和丁酸标准品各约 50 mg(精确至 0.01 mg),分别置于 10 mL 容量瓶中,用硫酸溶液 I (5.3)溶解、定容,混匀。于 2℃~8℃保存,有效期 3 个月。

5.9 苯甲酸、山梨酸标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取苯甲酸、山梨酸标准品各约 50 mg(精确至 0.01 mg),分别置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇(5.2)溶解、定容,混匀。于 2℃~8℃保存,有效期 6 个月。

5.10 富马酸标准中间溶液(200 μg/mL):准确移取 1 mL 富马酸标准储备溶液(5.8)于 25 mL 容量瓶中,用硫酸溶液 I(5.3)稀释、定容,混匀。临用现配。

5.11 柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸、丁酸混合标准系列溶液:准确移取适量柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸、丁酸储备溶液(5.8),用硫酸溶液 I(5.3)稀释定容,配制成质量浓度分别为 5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、500 μg/mL 混合标准系列溶液。临用现配。

5.12 富马酸标准系列溶液:准确移取适量富马酸标准中间溶液(5.10),用硫酸溶液 I(5.3)稀释定容,配制成质量浓度分别为 0.2 μg/mL、0.4 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、20 μg/mL 富马酸标准系列溶液。临用现配。

注:因苹果酸标准品中含有一定的富马酸,同时富马酸的响应比其他 8 种有机酸高两个数量级,因此需要单独配制富马酸标准系列溶液,以免影响试样溶液中富马酸的定量。

5.13 苯甲酸、山梨酸混合标准系列溶液:分别准确移取适量苯甲酸、山梨酸储备溶液(5.9),用磷酸盐缓冲溶液(5.6)稀释、定容,配制成质量浓度分别为 0.5 μg/mL、2 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 苯甲酸、山梨酸混合标准系列溶液。临用现配。

5.14 微孔滤膜:0.45 μm,水系。

5.15 微孔滤膜:0.45 μm,有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平:精度为 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 超声波清洗器。

6.4 pH 计:精度为 0.01,或使用 pH1.4~3.0 的精密试纸。

7 样品

取代表性的样品 200 g,尽快装入耐酸、耐腐蚀的容器中,立即密封,尽快分析。

8 试验步骤

8.1 试样提取

8.1.1 柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、富马酸、丙酸和丁酸

8.1.1.1 粉末型、颗粒型和液体型

平行做 2 份试验。称取 0.5 g~2 g 试样,精确至 0.1 mg,置于 250 mL 三角瓶中,加入 60 mL 硫酸溶液 I(5.3),超声提取 20 min,冷却至室温。若需要检测乳酸含量,称样后加入 30 mL~40 mL 水、4 mL 氢氧化钠溶液(5.4),超声提取 20 min,冷却至室温,用硫酸溶液 II(5.5)调 pH 至 1.8~2.0。转移至 100 mL 容量瓶中,用少许硫酸溶液 I(5.3)冲洗三角瓶 3 次~5 次,洗液并入容量瓶中,用硫酸溶液 I(5.3)稀释、定容,摇匀,过微孔滤膜(5.14),备用。

注:高浓度乳酸常发生脱水生成丙交酯,需用强碱皂化。

8.1.1.2 脂肪酸酯包被型

除超声温度为 80℃外,其他同 8.1.1.1。

8.1.2 苯甲酸和山梨酸

平行做 2 份试验。称取 0.5 g~2 g 试样,精确至 0.1 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加入 10 mL 甲醇(5.2),超声提取 20 min,冷却至室温,用磷酸盐缓冲溶液(5.6)稀释、定容,摇匀,过微孔滤膜(5.15),

备用。

8.2 测定

8.2.1 高效液相色谱参考条件 I

高效液相色谱参考条件 I 如下：

- a) 色谱柱：离子排斥色谱柱如 Bio-Rad Aminex HPX-87H，长 300 mm，内径 7.8 mm，粒径 9 μm ，或性能相当者；
- b) 流动相：30 mmol/L 硫酸溶液 I (5.3)；
- c) 流速：0.6 mL/min；
- d) 柱温：32 $^{\circ}\text{C}$ ；
- e) 检测波长：210 nm；
- f) 进样量：20 μL 。

注：Bio-Rad Aminex HPX-87H 离子排斥色谱柱是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对该产品的认可。

8.2.2 高效液相色谱参考条件 II

高效液相色谱参考条件 II 如下：

- a) 色谱柱： C_{18} 柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm ，或性能相当者；
- b) 流动相：甲醇(5.2)+磷酸盐缓冲溶液(5.6)=10+90；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；
- e) 检测波长：230 nm；
- f) 进样量：20 μL 。

8.2.3 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，按照高效液相色谱参考条件 I，取柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸、丁酸混合标准系列溶液(5.11)、富马酸标准系列溶液(5.12)和试样溶液(8.1.1)上机测定，柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸、丁酸标准溶液的液相色谱图见附录 B 的 B.1，富马酸液相色谱图见 B.2；按照高效液相色谱参考条件 II，取苯甲酸和山梨酸混合标准系列溶液(5.13)和试样溶液(8.1.2)，上机测定，苯甲酸和山梨酸标准溶液的液相色谱图见 B.3。

8.2.4 定性

以保留时间定性，试样溶液中各种有机酸的保留时间应与质量浓度相当标准系列溶液中有机酸的保留时间一致，其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

8.2.5 定量

以有机酸的质量浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.999。试样溶液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，应准确移取适量滤液(8.1.1 或 8.1.2)用流动相稀释后重新测定。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浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、富马酸、丙酸、丁酸、苯甲酸和山梨酸(其盐以相应的酸计)的含量 w_i 以质量分数计，单位为百分含量(%)。多点校准按公式(1)计算；单点校准按公式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times n}{m \times 1\,000 \times 1\,000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ_i ——由标准曲线计算得到的试样溶液中有机酸质量浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
 V ——试样溶液总体积,单位为毫升(mL);
 n ——超出标准曲线范围后的稀释倍数;
 m ——试样质量,单位为克(g);
1 000 ——换算系数。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V \times n}{A_{si} \times m \times 1\,000 \times 1\,000} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

A_i ——试样溶液中有机酸色谱峰面积;
 A_{si} ——标准溶液中有机酸的色谱峰面积;
 ρ_{si} ——标准溶液有机酸质量浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)。
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。

10 精密度

在重复性条件下,2 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 5%。

附 录 A
(资料性)

11 种有机酸标准品名称、CAS 号和纯度要求

11 种有机酸标准品名称、CAS 号和纯度要求见表 A. 1.

表 A. 1 11 种有机酸标准品名称、CAS 和纯度要求

序号	化合物中文名称	化合物英文名称	CAS 号	纯度要求
1	柠檬酸	citric acid monohydrate	5949-29-1	≥99%
2	酒石酸	DL-tartaric Acid	133-37-9	≥99%
3	苹果酸	malic acid	6915-15-7	≥99%
4	乳酸	2-hydroxypropanoic acid	50-21-5	≥88%
5	甲酸	formic acid	64-18-6	≥98%
6	乙酸	acetic acid	64-19-7	≥99%
7	富马酸	fumaric acid	110-17-8	≥99%
8	丙酸	propionic acid	79-09-4	≥99%
9	丁酸	n-butyric acid	107-92-6	≥99%
10	苯甲酸	benzoic acid	65-85-0	≥99%
11	山梨酸	sorbic acid	110-44-1	≥99%

附 录 B
(资料性)
有机酸标准溶液液相色谱图

B.1 柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸标准溶液液相色谱图

柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸标准溶液(25 $\mu\text{g/mL}$)液相色谱图见图 B.1。

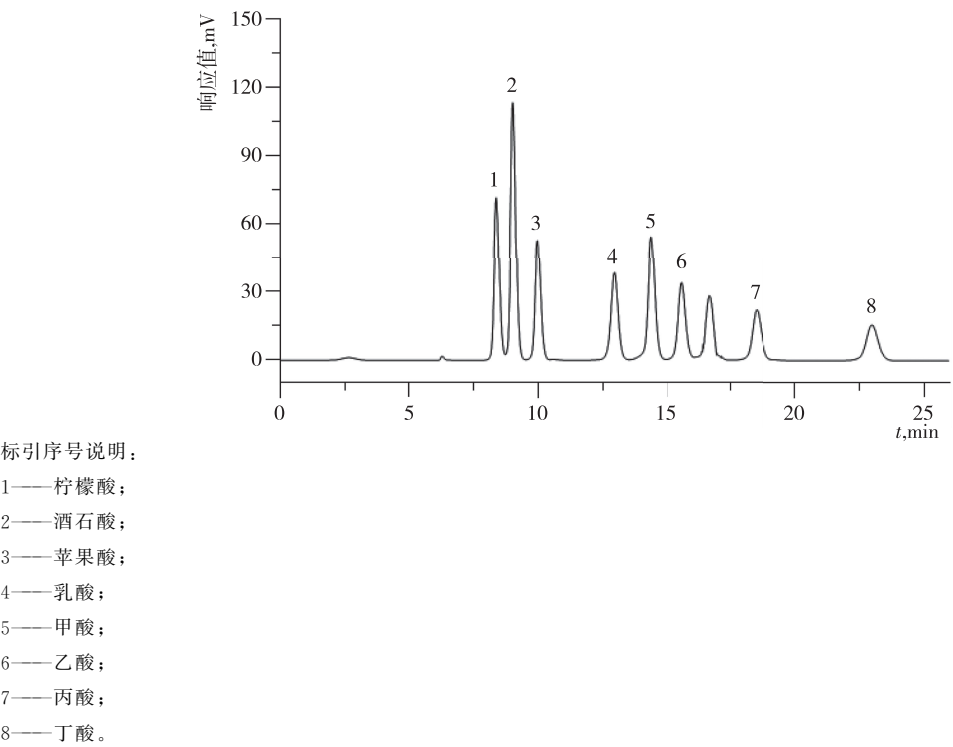


图 B.1 柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸标准溶液(25 $\mu\text{g/mL}$)液相色谱图

B.2 富马酸标准溶液液相色谱图

富马酸标准溶液(0.5 $\mu\text{g/mL}$)液相色谱图见图 B.2。

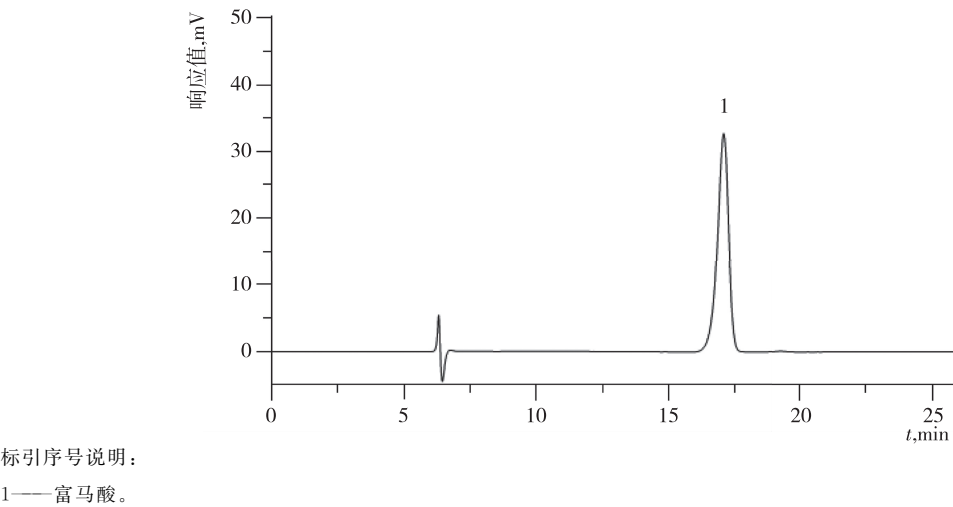
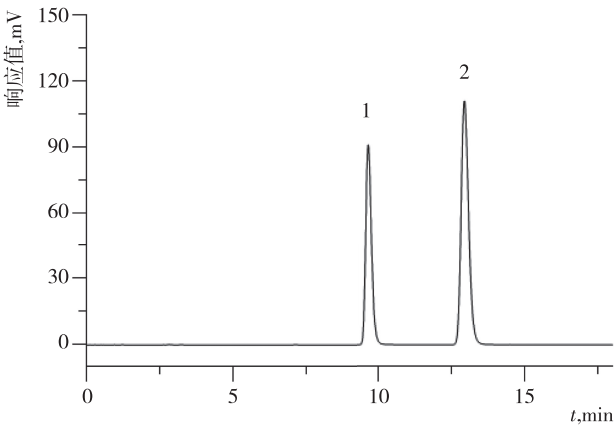


图 B.2 富马酸标准溶液(0.5 μg/mL)液相色谱图

B.3 苯甲酸、山梨酸标准溶液液相色谱图

苯甲酸、山梨酸标准溶液液相色谱图见图 B.3。



标引序号说明：
1——苯甲酸；
2——山梨酸。

图 B.3 苯甲酸、山梨酸标准溶液(10 μg/mL)液相色谱图

