

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×

饲料添加剂酸化剂中有机酸的测定 高效  
液相色谱法

Determination of organic acids in acidifier as feed additive  
—High performance liquid chromatography

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

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。

本文件由中华人民共和国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、通威股份有限公司、广东酸动力生物科技有限公司、上海正正生物技术有限公司。

本文件主要起草人：



# 饲料添加剂酸化剂中有机酸的测定 高效液相色谱法

## 1 范围

本文件描述了饲料添加剂酸化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、液体型和脂肪酸酯包被型饲料添加剂酸化剂中柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸（二甲酸钾和甲酸铵以甲酸计）、乙酸、富马酸、丙酸、丁酸、苯甲酸和山梨酸的测定。

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 200 mg/kg、定量限均为 600 mg/kg，富马酸的检出限为 1 mg/kg、定量限为 3 mg/kg，苯甲酸和山梨酸的检出限均为 10 mg/kg、定量限均为 30 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 22141—2018 混合型饲料添加剂酸化剂通用要求

## 3 术语和定义

GB/T 22141—2018中的定义适用于本文件。

## 4 原理

试样中的柠檬酸、酒石酸、苹果酸、富马酸、乳酸、甲酸、乙酸、丙酸和丁酸用硫酸溶液超声提取，苯甲酸和山梨酸用甲醇超声提取，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 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

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，不断搅拌，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，不断搅拌，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 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 和 2.5 g 磷酸氢二钾 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )，加入适量水溶解，用水定容至 1 000 mL，混匀。

5.7 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 (CAS: 5949-29-1, 纯度 $\geq$ 99%)、酒石酸 (CAS: 133-37-9, 纯度 $\geq$ 99%)、苹果酸 (CAS: 6915-15-7, 纯度 $\geq$ 99%)、乳酸 (CAS: 50-21-5, 纯度 $\geq$ 88%)、甲酸 (CAS: 64-18-6, 纯度 $\geq$ 98%)、乙酸 (CAS: 64-19-7, 纯度 $\geq$ 99%)、富马酸 (CAS: 110-17-8, 纯度 $\geq$ 99%)、丙酸 (CAS: 79-09-4, 纯度 $\geq$ 99%) 和丁酸 (CAS: 107-92-6, 纯度 $\geq$ 99%) 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。

5.8 苯甲酸、山梨酸标准储备溶液 (1 mg/mL)：准确称取苯甲酸 (CAS: 65-85-0, 纯度 $\geq$ 99%)、山梨酸 (CAS: 110-44-1, 纯度 $\geq$ 99%) 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。

5.9 富马酸标准中间溶液 (200  $\mu\text{g/mL}$ )：准确移取 1.0 mL 富马酸标准储备溶液 (5.7) 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。

5.10 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 (5.7)，用硫酸溶液 I (5.3) 稀释定容，配制成浓度分别为 5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 、500  $\mu\text{g/mL}$  混合标准系列溶液。临用现配。

5.11 富马酸标准系列溶液：准确移取适量富马酸标准中间溶液 (5.9)，用硫酸溶液 I (5.3) 稀释定容，配制成浓度分别为 0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、0.4  $\mu\text{g/mL}$ 、1  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$ 、4  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$  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量的富马酸，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，以免影响样品中富马酸的定量。

5.12 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 (5.8)，用磷酸盐缓冲溶液 (5.6) 稀释、定容，配制成浓度分别为 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、2  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$  苯甲酸、山梨酸混合标准系列溶液。临用现配。

5.13 微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ ，水系。

5.14 微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ ，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 $\pm$ 0.01；或精密试纸。

## 7 样品

取代表性的样品 200 g，装入容器中，密封，应尽快分析。

## 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 粉末型和液体型酸化剂

平行做两份试验。称取0.3 g~1 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（5.13），备用。

注：高浓度乳酸常发生脱水聚合生成乳酸酐，需用强碱将乳酸酐解聚。

#### 8.1.1.2 脂肪酸酯包被型酸化剂

平行做两份试验。称取0.3 g~1 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），80 °C超声提取20 min，冷却至室温。若需要检测乳酸含量<sup>1</sup>，称样后加入30 mL~40 mL水、4 mL氢氧化钠溶液（5.4），80 °C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（5.13），备用。

### 8.1.2 苯甲酸、山梨酸

平行做两份试验。称取0.3 g~1 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（5.14），备用。

## 8.2 测定

### 8.2.1 高效液相色谱参考条件 I

- a) 色谱柱：Bio-Rad Aminex HPX-87H<sup>1</sup>，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 °C；
- e) 检测波长：210 nm；
- f) 进样量：20 μL。

### 8.2.2 高效液相色谱参考条件 II

- a) 色谱柱：C<sub>18</sub>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（V+V）
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：30 °C；
- e) 检测波长：230 nm；
- f) 进样量：20 μL。

<sup>1</sup> Bio-Rad Aminex HPX-87H 离子排斥色谱柱是由Bio-Rad公司提供的产品。给出这一信息是为了方便给本文件的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其它产品具有相同的效果，那么可使用这些等效产品。

### 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（5.10）、富马酸标准系列溶液（5.11）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 A 的 A.1，富马酸液相色谱图见附录 A 的 A.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（5.12）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附录 A 的 A.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±2.5%之内。

### 8.2.5 定量

以有机酸的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）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浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应准确量取适量滤液稀释后重新测定。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

试样中柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸（二甲酸钾和甲酸铵以甲酸计）、乙酸、富马酸、丙酸、丁酸、苯甲酸和山梨酸的含量以质量分数  $w_i$  表示，数值以百分含量表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times n_i}{m \times 1000 \times 1000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\rho_i$ ——由标准曲线计算得到的试样溶液中某种有机酸的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——试样液总体积，单位为毫升（mL）；

$n_i$ ——稀释倍数；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V \times n_i}{A_{si} \times m \times 1000 \times 1000} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$A_i$ ——试样溶液中某种有机酸色谱峰面积；

$A_{si}$ ——标准溶液中某种有机酸的峰面积；

$\rho_{si}$ ——标准溶液某种有机酸浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——试样液总体积，单位为毫升（mL）；

$n_i$ ——稀释倍数；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）。

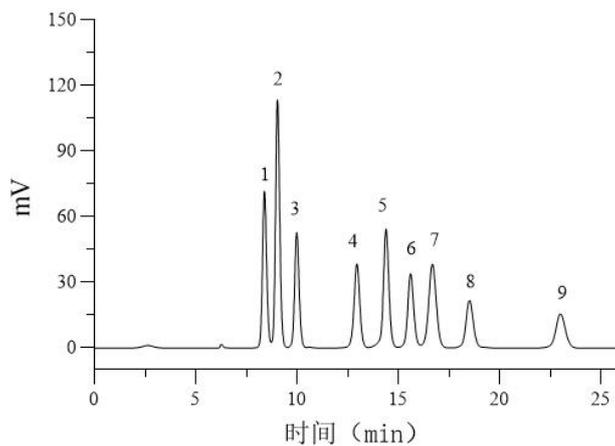
测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

## 10 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5%。

附录A  
(资料性)  
有机酸标准溶液液相色谱图

A.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见图A.1。

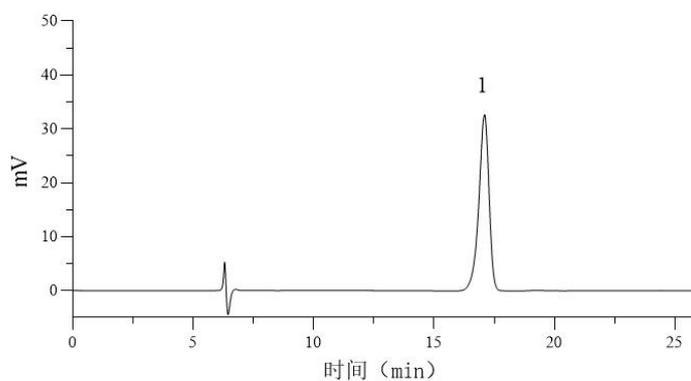


标引序号说明:

- 1——柠檬酸;
- 2——酒石酸;
- 3——苹果酸;
- 4——乳酸;
- 5——甲酸;
- 6——乙酸;
- 7——丙酸;
- 8——丁酸。

图A.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

A.2 富马酸标准溶液液相色谱图见图A.2。

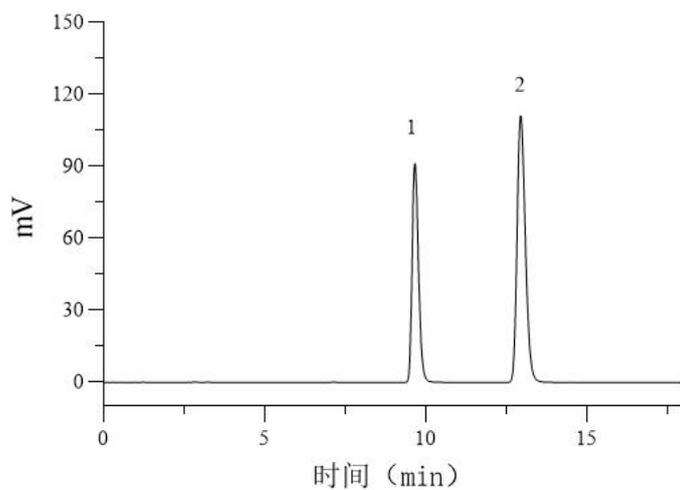


标引序号说明:

- 1——富马酸。

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

A.3 苯甲酸、山梨酸标准溶液液相色谱图见图A.3。



标引序号说明：

1——苯甲酸；

2——山梨酸。

图A.3 苯甲酸、山梨酸标准溶液（10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）液相色谱图