

## 前 言

复合预混料中烟酸、叶酸的测定目前尚无国家标准和国际标准,本标准是在查阅国外文献的基础上,经过试验比较选择了用高效液相色谱法测定复合预混料中烟酸、叶酸。该方法与美国公职分析化学家协会(AOAC)方法比较,简便、快速,准确度、精密度效果相当。

本标准在技术内容上参照国外方法,确定了标准范围、试剂、测定条件,即反相离子色谱条件和反相缓冲液系统条件。在编写格式上依据GB/T 1.1—1993《标准化工作导则 第1单元:标准的起草与表述规则 第1部分:标准编写的基本规定》和GB/T 1.4—1988《标准化工作导则 化学分析方法标准编写规定》。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准由国家饲料质量监督检验中心(北京)负责起草。

本标准主要起草人:陈必芳、李兰、梁冬生。

# 中华人民共和国国家标准

## 复合预混料中烟酸、叶酸的测定 高效液相色谱法

GB/T 17813—1999

Determination of nicotinic acid and folic acid  
in compound premix—  
High-pressure liquid chromatography

### 1 范围

本标准规定了复合预混料中烟酸、叶酸的测定——高效液相色谱法。

本标准适用于复合预混料和维生素预混料中烟酸、叶酸的测定。测量范围为每千克样品中含烟酸的量在 1 000 mg 以上,含叶酸的量在 500 mg 以上。

### 2 引用标准

下列标准中所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 方法原理

试样中的烟酸、叶酸用水-甲醇-乙酸混合溶液提取,将滤液注入高效液相色谱反相柱上进行分离,用紫外检测器在 280 nm 波长处定量测定。

### 4 试剂和材料

除特殊注明外,本标准所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水,色谱用水为去离子水,符合 GB/T 6682 的规定。

4.1 甲醇:优级纯。

4.2 三乙胺。

4.3 冰乙酸。

4.4 己烷磺酸钠 (PICB6):  $c[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{SO}_3\text{Na}] = 0.005 \text{ mol/L}$  {或  $\rho[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{SO}_3\text{Na}] = 941 \text{ mg/L}$ }。

4.5 标准溶液配制

4.5.1 烟酸标准贮备液:称取经过干燥的烟酸标准纯品 25.0 mg,置于 250 mL 棕色容量瓶中,用移动相溶解,稀释至刻度,于冰箱保存,可放置一周。

4.5.2 叶酸标准贮备液:称取经过干燥的叶酸标准纯品 25.0 mg,置于 250 mL 容量瓶中,用碳酸钠溶液(4.8)溶解,调至 pH 7.0 定容至刻度,于冰箱保存。

4.5.3 烟酸、叶酸标准工作液:准确吸取 4.5.1 和 4.5.2 各 10 mL,用移动相稀释至 50 mL 或 100 mL。该混合标准溶液置于带盖小瓶贮存,供液相色谱仪分析用,当日使用。

国家质量技术监督局 1999-08-10 批准

2000-02-01 实施

4.6 提取液:取 500 mL 去离子水,加 10 mL 冰乙酸(4.3),1.3 mL 三乙胺(4.2),用去离子水定容至 1 L,此时 pH 为 3.2,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜,取上述溶液 850 mL 与 150 mL 甲醇(4.1)混合。

4.7 磷酸缓冲液:称取 4.84 g 的磷酸氢二钾( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),9.82 g 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),溶于去离子水中,加 20 mL 乙腈,用去离子水定容至 1 L,混匀用 20%氢氧化钾调节 pH 至 6.5。

4.8 碳酸钠溶液: $c(\text{Na}_2\text{CO}_3)=0.1 \text{ mol/L}$ 。

## 5 仪器、设备

5.1 实验室常用仪器设备。

5.2 超声波水浴。

5.3 超纯水装置(Millipore 或全磨口玻璃蒸馏器)。

5.4 离心机:3 000 r/min。

5.5 高效液相色谱仪:带自动进样器、紫外可调波长检验器。

## 6 试样制备

选取有代表性的样品至少 500 g,四分法缩减至 100 g,磨碎,全部通过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

## 7 分析步骤

### 7.1 试验溶液的制备

称取试样维生素预混料 0.5~1 g 或复合预混料 1~5 g,精确至 0.000 1 g。置于 100 mL 棕色容量瓶中,加 10 mL 碳酸钠溶液(4.8),浸湿试样加 70 mL 提取液(4.6)混匀,于超声波水浴上振荡提取 15 min,用提取液定容至刻度,混合均匀,过滤或离心。再经 0.45  $\mu\text{m}$  过滤膜过滤至带盖小瓶中,调整该试验溶液的浓度 $\leq 5 \mu\text{g/mL}$ ,供高效液相色谱分析用。

### 7.2 测定

#### 7.2.1 色谱条件

##### 7.2.1.1 反相离子对色谱条件

柱长:25 cm、内径 4.0 mm 不锈钢柱。

固定相:ODS( $\text{C}_{18}$ )粒度 5  $\mu\text{m}$ 。

移动相:取 500 mL 去离子水,加 10 mL 冰乙酸,1.3 mL 三乙胺,一小瓶 20 mL 己烷磺酸钠(4.4),用去离子水定容至 1 L,调节 pH 为 3.2,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜,取上述溶液 850 mL 与 150 mL 甲醇混合,脱气。

流速:1.0 mL/min。

温度:30℃。

进样量:20  $\mu\text{L}$ 。

检测器:紫外检测器,使用波长 275 nm。

##### 7.2.1.2 反相色谱

柱长:25 cm,内径 4 mm,不锈钢柱。

固定相:Lichrospher CH-8/11,粒度 5  $\mu\text{m}$ 。

移动相:2%乙腈磷酸缓冲液(4.7)

流速:1.4 mL/min。

温度:室温。

进样体积:20  $\mu\text{L}$ 。

检测器:紫外检测器,使用波长 280 nm。

### 7.2.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数和灵敏度(AUFS),色谱峰分离度符合要求。用两次以上相应标准工作液对系统进行校正。向色谱柱注入相应的烟酸、叶酸标准工作液(4.5.3  $V_{st}$ )和试验溶液(7.1  $V_i$ )得到色谱峰面积响应值( $P_{st}$ 、 $P_i$ ),用外标法定量测定。

## 8 结果的计算与表述

### 8.1 计算公式

结果按式(1)计算:

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

式中: $\omega_i$ ——每千克试样中含烟酸或叶酸的量,mg;

$m$ ——试样质量,g;

$V$ ——提取液的总体积,mL;

$\rho_i$ ——标准溶液中烟酸或叶酸浓度, $\mu\text{g/mL}$ ;

$V_{st}$ ——烟酸或叶酸标准溶液进样体积, $\mu\text{L}$ ;

$V_i$ ——从试验溶液中分取的进样体积, $\mu\text{L}$ ;

$P_{st}$ ——与标准溶液进样体积( $V_{st}$ )相应的峰面积响应值;

$P_i$ ——与从试验溶液中分取的进样体积( $V_i$ )相应的峰面积响应值。

8.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留有效数3位。

## 9 允许差

同一分析者对同一试样同时两次平行测定所得结果相对偏差 $\leq \pm 10\%$ 。