

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4310—2023

## 饲料中吡啶甲酸铬的测定 高效液相色谱法

Determination of chromium picolinate in feeds—  
High performance liquid chromatography

2023-02-17 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：浙江省兽药饲料监察所。

本文件主要起草人：任玉琴、吴望君、罗成江、侯轩、王彬、裘丞军、陈晓林、黄娟。



## 饲料中吡啶甲酸铬的测定 高效液相色谱法

### 1 范围

本文件描述了饲料中吡啶甲酸铬的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中吡啶甲酸铬的测定。

本文件配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限为 0.05 mg/kg、定量限为 0.1 mg/kg, 添加剂预混合饲料的检出限为 0.1 mg/kg、定量限为 0.5 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

试样中的吡啶甲酸铬用乙腈提取, 经浓缩净化后, 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, 仅使用分析纯试剂。

5.1 水: GB/T 6682, 一级。

5.2 乙腈: 色谱纯。

5.3 甲醇。

5.4 10%乙腈溶液: 量取 10 mL 乙腈, 加水至 100 mL, 混匀。

5.5 乙腈溶液饱和的正己烷: 量取正己烷 200 mL, 加 10%乙腈溶液(5.4) 50 mL, 混匀, 静置, 取上层溶液。

5.6 磷酸盐缓冲液(pH 7.0): 称取三水合磷酸氢二钾 5.7 g, 无水磷酸二氢钾 3.4 g, 加水溶解并定容至 1 000 mL, 混匀。

5.7 标准储备溶液(250  $\mu\text{g/mL}$ ): 称取吡啶甲酸铬标准品(CAS 号: 14639-25-9, 纯度 $\geq 98.0\%$ ) 25 mg (精确至 0.01 mg), 置于 100 mL 容量瓶中, 加乙腈(5.2) 超声溶解, 用乙腈定容, 混匀。2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  保存, 有效期 6 个月。

5.8 标准中间溶液(25  $\mu\text{g/mL}$ ): 准确移取标准储备溶液(5.7) 10 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用水定容, 摇匀。临用现配。

5.9 标准系列溶液: 准确移取标准中间溶液(5.8) 适量, 用水定容, 配制成浓度分别为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ 、0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、2.0  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$  标准系列溶液。临用现配。

5.10 固相萃取柱: 混合型阴离子交换柱, 500 mg/6 mL。

5.11 微孔滤膜: 0.45  $\mu\text{m}$ , 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 0.01 mg、0.1 mg 和 1 mg。
- 6.3 离心机:转速不低于 8 000 r/min。
- 6.4 氮吹仪。
- 6.5 超声波清洗器。
- 6.6 涡旋混合器。

7 样品

按 GB/T 20195 制备样品,粉碎使其全部通过 0.45 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中,备用。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做 2 份试验。称取配合饲料约 5 g、浓缩饲料和精料补充料 3 g~5 g、添加剂预混合饲料约 1 g,精确至 0.1 mg,置于 50 mL 离心管中,加入乙腈(5.2)25 mL,涡旋或超声(超声温度不超过 50 ℃)20 min,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,置于容量瓶中。残渣用乙腈(5.2)25 mL 重复提取 1 次,合并 2 次提取液,用乙腈(5.2)定容至 50 mL,混匀。

8.2 浓缩、净化

8.2.1 配合饲料、浓缩饲料、精料补充料

准确移取提取液(8.1)5 mL~50 mL( $V_1$ ,相当于吡啶甲酸铬 0.5  $\mu\text{g}$ ~50  $\mu\text{g}$ ),于 50 ℃下用氮气吹至近干,加 5.00 mL10%乙腈溶液(5.4),超声或涡旋使溶解,加乙腈溶液饱和的正己烷(5.5)3 mL 除脂,涡旋 10 s,8 000 r/min 离心 3 min,取下层清液 1.00 mL( $V_2$ ),加 3 mL 水,混匀,为试样溶液 A。取固相萃取柱(5.10)依次用 5 mL 甲醇(5.3)和 5 mL 水预淋洗,取试样溶液 A 全部过柱,用 8 mL 乙腈(5.2)洗脱,收集洗脱液,于 50 ℃下用氮气吹至近干,加 2.00 mL( $V_3$ )10%乙腈溶液(5.4)超声或涡旋使溶解,用 0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜(5.11)过滤,滤液为试样溶液。

8.2.2 添加剂预混合饲料

准确移取提取液(8.1)5 mL~50 mL( $V_1$ ,相当于含吡啶甲酸铬 0.25  $\mu\text{g}$ ~25  $\mu\text{g}$ ),置于离心管中,于 50 ℃下用氮气吹至近干,准确加入 5 mL10%乙腈溶液(5.4),超声或涡旋使溶解,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液用 0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜(5.11)过滤,滤液为试样溶液。

8.3 液相色谱参考条件

色谱柱: $\text{C}_{18}$ 柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5  $\mu\text{m}$ ,或性能相当者;

柱温:30 ℃;

检测波长:264 nm;

流速:0.8 mL/min;

进样量:50  $\mu\text{L}$ ;

流动相:A 为乙腈(5.2);B 为磷酸盐缓冲液(5.6),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	流动相 A,%	流动相 B,%
0	7	93
15	7	93
16	30	70

表 1（续）

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
21	30	70
22	7	93
30	7	93

8.4 测定

8.4.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列溶液(5.9)和试样溶液(8.2.1 或 8.2.2)上机测定。吡啶甲酸铬标准溶液的液相色谱图见附录 A。

8.4.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中吡啶甲酸铬色谱峰的保留时间应与标准系列溶液(浓度相当)中吡啶甲酸铬色谱峰的保留时间一致,其相对偏差应在±2.5%。

8.4.3 定量

以吡啶甲酸铬的浓度为横坐标,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 0.99。试样溶液中吡啶甲酸铬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 10%乙腈溶液(5.4)稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中吡啶甲酸铬的峰面积与标准溶液中吡啶甲酸铬的峰面积相差不超过 30%。

9 试验数据处理

配合饲料、浓饲缩饲料、精料补充料试样中吡啶甲酸铬的含量以质量分数  $w$  计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按公式(1)计算,单点校准按公式(2)计算。

$$w = \frac{\rho \times 50 \times 5 \times V_3 \times 1\,000}{m \times V_1 \times V_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $\rho$  ——从标准曲线查得的试样溶液中吡啶甲酸铬质量浓度的数值,单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ );
- 50 ——提取液总体积的数值,单位为毫升(mL);
- 5 ——第一次氮吹后复溶体积的数值,单位为毫升(mL);
- $V_1$  ——移取提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- $V_2$  ——除脂后移取下层清液体积的数值,单位为毫升(mL);
- $V_3$  ——第二次氮吹后复溶体积的数值,单位为毫升(mL);
- $m$  ——试样质量的数值,单位为克(g)。

$$w = \frac{A \times C_s \times 50 \times 5 \times V_3 \times 1\,000}{A_s \times m \times V_1 \times V_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

- $A$  ——试样溶液中吡啶甲酸铬色谱峰面积;
- $A_s$  ——标准溶液中吡啶甲酸铬色谱峰面积;
- $C_s$  ——标准溶液中吡啶甲酸铬质量浓度的数值,单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ );
- 50 ——提取液总体积的数值,单位为毫升(mL);
- 5 ——第一次氮吹后复溶体积的数值,单位为毫升(mL);
- $V_1$  ——移取提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- $V_2$  ——除脂后移取下层清液体积的数值,单位为毫升(mL);
- $V_3$  ——第二次氮吹后复溶体积的数值,单位为毫升(mL);
- $m$  ——试样质量的数值,单位为克(g)。

添加剂预混合饲料试样中吡啶甲酸铬的含量以质量分数  $w$  计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按公式(3)计算,单点校准按公式(4)计算。

$$w = \frac{\rho \times 50 \times 5 \times 1\,000}{m \times V_1 \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

$\rho$  ——从标准曲线查得的试样溶液中吡啶甲酸铬的质量浓度，单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ )；

50 ——提取液总体积的数值，单位为毫升(mL)；

5 ——氮吹后复溶体积的数值，单位为毫升(mL)；

$V_1$  ——移取提取液体积的数值，单位为毫升(mL)；

$m$  ——试样质量的数值，单位为克(g)。

$$w = \frac{A \times C_s \times 50 \times 5 \times 1\,000}{A_s \times m \times V_1 \times 1\,000} \dots\dots\dots (4)$$

$A$  ——试样溶液中吡啶甲酸铬色谱峰面积；

$A_s$  ——标准溶液中吡啶甲酸铬色谱峰面积；

$C_s$  ——标准溶液中吡啶甲酸铬质量浓度的数值，单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ )；

50 ——提取液总体积的数值，单位为毫升(mL)；

5 ——氮吹后复溶体积的数值，单位为毫升(mL)；

$V_1$  ——移取提取液体积的数值，单位为毫升(mL)；

$m$  ——试样质量的数值，单位为克(g)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，结果保留 3 位有效数字。

10 精密度

当吡啶甲酸铬含量 $\leq 0.5\text{ mg/kg}$ 时，在重复性条件下，2 次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 15%。

当吡啶甲酸铬含量 $> 0.5\text{ mg/kg}$ 时，在重复性条件下，2 次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附 录 A  
(资料性)

吡啶甲酸铬标准溶液液相色谱图

吡啶甲酸铬标准溶液液相色谱图见图 A. 1。

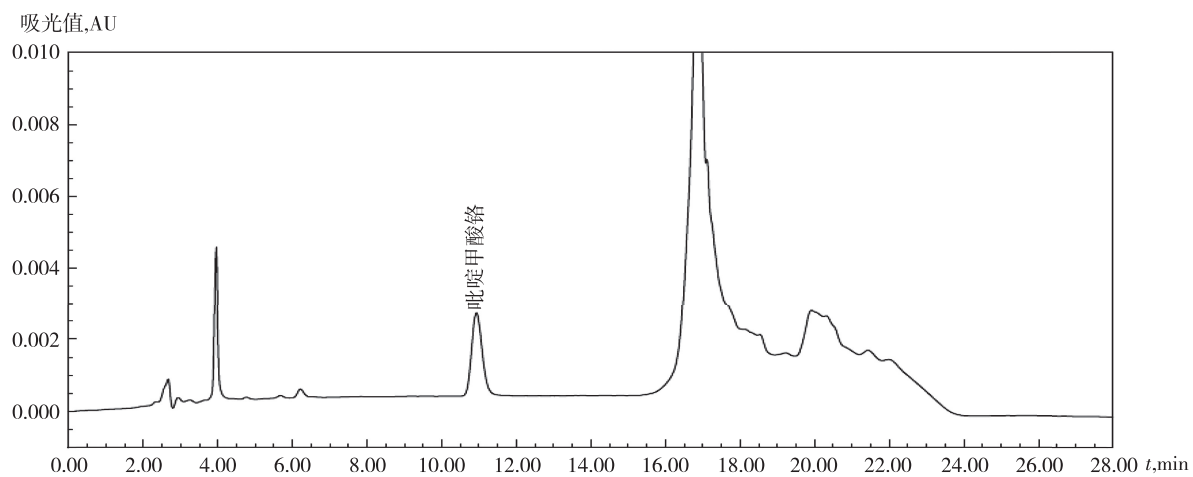


图 A. 1 吡啶甲酸铬标准溶液 (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 液相色谱图