



中华人民共和国国家标准

GB/T 17814—2011
代替 GB/T 17814—1999

饲料中丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、 乙氧喹和没食子酸丙酯的测定

Determination of butyl hydroxy anisole, dibutyl hydroxy toluene, ethoxyquin and propyl gallate in feeds

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 17814—1999《饲料中丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯和乙氧喹的测定》。

本标准与 GB/T 17814—1999 相比主要变化如下：

- 标准名称更改为“饲料中丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、乙氧喹和没食子酸丙酯的测定”；
- 增加了用高效液相色谱法测定饲料中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、乙氧喹(EQ)和没食子酸丙酯(PG)含量作为第一法(仲裁法)，原标准中气相色谱法测定饲料中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)和乙氧喹(EQ)含量作为第二法。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位：上海市兽药饲料检测所、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]。

本标准主要起草人：商军、黄士新、王蓓、华贤辉、潘娟、蔡金华、刘雅妮、曹莹、李兰。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 17814—1999。

饲料中丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、 乙氧喹和没食子酸丙酯的测定

1 范围

本标准规定了饲料中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、乙氧喹(EQ)和没食子酸丙酯(PG)的高效液相色谱测定方法和饲料中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、乙氧喹(EQ)的气相色谱测定方法。

本标准高效液相色谱测定方法适用于配合饲料、复合预混合饲料、浓缩饲料、鱼粉和骨粉中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、乙氧喹(EQ)和没食子酸丙酯(PG)含量的测定;气相色谱测定方法适用于配合饲料、鱼粉中丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)和乙氧喹(EQ)含量的测定。

高效液相色谱测定方法的检出限为:丁基羟基茴香醚(BHA)1.1 mg/kg、二丁基羟基甲苯(BHT)1.6 mg/kg、乙氧喹(EQ)1.8 mg/kg、没食子酸丙酯(PG)1.3 mg/kg;定量限为:丁基羟基茴香醚(BHA)5.6 mg/kg、二丁基羟基甲苯(BHT)8.0 mg/kg、乙氧喹(EQ)8.8 mg/kg、没食子酸丙酯(PG)6.5 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

高效液相色谱法:用乙腈超声提取试样中 BHA、BHT、EQ 和 PG,提取液经有机相针式滤器过滤,滤液经 0.22 μm 有机滤膜过滤,滤液经反相柱的高效液相色谱仪分离,紫外检测器检测,外标法定量。

气相色谱法:试样中 BHA、BHT 和 EQ 用正己烷提取,离心分离后(如遇干扰待测组分的样品,则需取上清液,用柱层析净化处理),取上清液用气相色谱、FID 检测器检测,外标法定量。

4 实验方法

本标准所用试剂和水,未注明其要求时,均指分析纯和符合 GB/T 6682 中规定的三级水。色谱分析中所用水均为符合 GB/T 6682 中规定的一级用水。

4.1 第一法 高效液相色谱法(仲裁法)

4.1.1 试剂和溶液

4.1.1.1 乙腈:色谱纯。

4.1.1.2 乙酸。

4.1.1.3 乙酸溶液(2%):量取 20.0 mL 乙酸(4.1.1.2),用水稀释至 1 000 mL,摇匀,即得。

4.1.1.4 丁基羟基茴香醚标准品(BHA):含量 $\geq 96.0\%$ 。

4.1.1.5 二丁基羟基甲苯标准品(BHT):含量 $\geq 96.0\%$ 。

4.1.1.6 乙氧喹标准品(EQ):含量 $\geq 96.0\%$ 。

4.1.1.7 没食子酸丙酯标准品(PG):含量 $\geq 96.0\%$ 。

4.1.1.8 混合标准储备液:分别称取 BHA(4.1.1.4)、BHT(4.1.1.5)、EQ(4.1.1.6)0.250 g(精确至 0.0001 g,视其含量,换算成 100%再称样)和 PG(4.1.1.7)0.125 g(精确至 0.0001 g,视其含量,换算成 100%再称样),置 250 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(4.1.1.1)溶解,定容至刻度,摇匀;精密量取该液 20.00 mL,置 200 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(4.1.1.1)定容至刻度,摇匀。使 PG 浓度为 0.05 mg/mL, BHA、BHT、EQ 浓度为 0.1 mg/mL,贮存于 4 °C 冰箱中,有效期为 2 周。

4.1.1.9 混合标准工作液:分别精密量取混合标准储备液(4.1.1.8)0.50 mL,2.00 mL,4.00 mL,8.00 mL,16.00 mL,20.00 mL,25.00 mL 置 50 mL 棕色容量瓶中,用乙腈定容至刻度,摇匀,配制成 PG 为 0.50 $\mu\text{g/mL}$,2.00 $\mu\text{g/mL}$,4.00 $\mu\text{g/mL}$,8.00 $\mu\text{g/mL}$,16.0 $\mu\text{g/mL}$,20.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液,BHA、BHT、EQ 为 1.00 $\mu\text{g/mL}$,4.00 $\mu\text{g/mL}$,8.00 $\mu\text{g/mL}$,16.0 $\mu\text{g/mL}$,32.0 $\mu\text{g/mL}$,40.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液。临用现配。

4.1.2 仪器和设备

4.1.2.1 实验室常用仪器设备。

4.1.2.2 分析天平:感量为 0.0001 g。

4.1.2.3 具塞三角瓶:250 mL。

4.1.2.4 超声波清洗器。

4.1.2.5 一次性注射器,10 mL。

4.1.2.6 有机相针式滤器:直径 25 mm,孔径 0.45 μm 。

4.1.2.7 微孔滤膜:有机相,孔径 0.22 μm 。

4.1.2.8 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.1.3 试样制备

按 GB/T 14699.1 采样,按 GB/T 20195 制备试样,磨碎,通过 0.45 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

4.1.4 分析步骤

4.1.4.1 试样溶液制备

称取试样 2 g~5 g(精确至 0.0001 g),置 250 mL 具塞三角瓶(4.1.2.3)中,精密加入乙腈(4.1.1.1)50.00 mL,摇匀,置超声波清洗器(4.1.2.4)中提取 40 min,在提取过程中振摇 2 次~3 次。冷却至室温,摇匀,静置。用一次性注射器(4.1.2.5)吸取上述提取液 10 mL,用有机相针式滤器(4.1.2.6)过滤,滤液经 0.22 μm 微孔滤膜(4.1.2.7)滤过,滤液作为试样溶液,供液相色谱测定。

4.1.4.2 测定

4.1.4.2.1 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,长 150 mm,内径 3.9 mm,粒径 5 μm ,或性能相当者;
柱温:室温;

流动相:乙腈(4.1.1.1)+乙酸溶液(4.1.1.3)=68+32(体积比);

流速:0.5 mL/min;

检测波长:280 nm;

进样量:20 μ L;

色谱图:参见附录 A。

4.1.4.2.2 标准曲线绘制

按液相色谱参考条件(4.1.4.2.1),向基线平稳的高效液相色谱仪(4.1.2.8)连续注入混合标准工作液(4.1.1.9),浓度由低到高,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作图,得到标准曲线回归方程。

4.1.4.2.3 定量测定

注入试样溶液(4.1.4.1),其中 PG、BHA、EQ 和 BHT 的峰面积响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应稀释后再进行分析。依峰面积,从标准曲线中得到试样溶液(4.1.4.1)中 PG、BHA、EQ 或 BHT 的浓度。

4.1.4.2.4 结果计算

试样中 PG、BHA、EQ 和 BHT 的含量 X_1 ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$X_1 = \frac{c \times V \times D}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c ——由标准曲线而得的试样液中 PG、BHA、EQ 或 BHT 的浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);

V ——试样定容体积,单位毫升(mL);

D ——试样稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

4.1.4.2.5 结果表述

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留到小数点后一位。

4.1.5 重复性

在重复性条件下,同一分析者对同一试样同时两次平行测定所得结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

4.2 第二法 气相色谱法

注:检测全过程,尽可能避光(或不在强光下)操作,以减少损失。

4.2.1 试剂和溶液

4.2.1.1 正己烷。

4.2.1.2 丙酮。

4.2.1.3 二氯甲烷。

4.2.1.4 二氯甲烷-丙酮混合液:9+1,体积比。

4.2.1.5 无水硫酸钠:500 $^{\circ}$ C 烘 4 h。

4.2.1.6 氟罗里硅土:孔径 177 μ m~149 μ m(80 目~100 目),550 $^{\circ}$ C 烘 4 h,存于干燥器中。

4.2.1.7 助滤剂: Celite545, 20 μm ~45 μm 。

4.2.1.8 医用脱脂棉。

4.2.1.9 混合标准溶液: 分别称取 BHA(4.1.1.4)、BHT(4.1.1.5)、EQ(4.1.1.6) 0.5 g(精确至 0.0001 g, 视其含量, 换算成 100% 再称样), 置于 50 mL 棕色容量瓶中, 以正己烷(4.2.1.1) 溶解并定容。此液为 10 mg/mL。然后稀释成系列标准液: 1.00 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.10 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.01 mg/mL。

4.2.2 仪器和设备

4.2.2.1 气相色谱仪: 配置氢火焰离子化检测器(FID)。

4.2.2.2 氮气钢瓶: 氮气纯度为 99.99%。

4.2.2.3 氢气发生器: 氢气纯度为 99.99%。

4.2.2.4 空气钢瓶: 一般压缩空气。

4.2.2.5 离心机: 4 000 r/min。

4.2.2.6 粉碎机: 粉碎粒度达 380 μm (40 目)。

4.2.2.7 超声波处理机。

4.2.2.8 微型混合器。

4.2.2.9 分析天平: 感量 0.000 1 g。

4.2.2.10 具塞刻度玻璃试管: 10 mL。

4.2.2.11 铝制试管架。

4.2.2.12 具活塞层析柱: 15 cm \times ϕ 1 cm。

4.2.2.13 旋转蒸发器: 带抽真空装置(或真空泵)。

4.2.2.14 浓缩烧瓶: 150 mL, 带 5 mL 刻度尾接管。

4.2.3 试样制备

按 GB/T 14699.1 采样, 按 GB/T 20195 制备试样, 磨碎, 通过 0.45 mm 孔筛, 混匀, 装入密闭容器中, 避光低温保存备用。

4.2.4 分析步骤

4.2.4.1 试样溶液制备

4.2.4.1.1 提取

称取试样 2 g(精确至 0.000 1 g)于 10 mL 具塞刻度试管中, 加入少许无水硫酸钠(4.2.1.5), 再加 5.0 mL 正己烷(4.2.1.1), 加塞。在微型混合器(4.2.2.8)上混合 0.5 min, 将试管放到试管架上, 连同试管架一起放入超声波(4.2.2.7)处理槽内, 槽内水位以刚好与试管中试样液面取齐或稍过, 超声提取 15 min。取出, 将试管外水液擦去, 放入离心机(4.2.2.5), 以 4 000 r/min 离心 2 min, 取出试管。上清液为待测溶液。

注 1: 如遇较难提取的试样, 可于前一天称样, 加正己烷浸泡过夜, 第二天再提取测定。

注 2: 也适合于维生素预混料、单组分抗氧化剂 BHA、BHT、EQ 的测定, 而且可免除程序升温, 节省时间。

4.2.4.1.2 净化

4.2.4.1.2.1 如遇干扰待测组分的样品, 须作如下柱层析净化处理: 首先按 4.2.4.1.1 提取样品, 只是提取液由 5.0 mL 正己烷(4.2.1.1)改为 10.0 mL 正己烷(4.2.1.1)。

注: 本方法是以程序升温去除色谱图后面可能出现的杂质峰(避免干扰后续上机样品的测定)。如色谱图中, 前面

各待测组分不受杂峰干扰,则尽可不必采用净化处理,避繁求简。但要常注意清洗进样器。

4.2.4.1.2.2 装柱:层析柱(4.2.2.12)底先放少许脱脂棉(4.2.1.8),再加少许(约2 g)无水硫酸钠(4.2.1.5),用正己烷(4.2.1.1)调制氟罗里硅土(4.2.1.6)适量(约4 g,以装满柱为准),湿法填充于层析柱(4.2.2.12)中,上端先加约5 g助滤剂(4.2.1.7),再加约5 g无水硫酸钠(4.2.1.5),铺平。

注:如用柱层析净化时,一定要注意氟罗里硅土的活性。550℃烘4 h能保持3 d,3 d后,用前需在130℃烘4 h(特别是夏天湿度大时,更需注意);活性太强,EQ过柱洗脱不下来时,可加分析用水脱活(加氟罗里硅土质量的2%的水,摇匀,过夜平衡)。

4.2.4.1.2.3 淋洗:用移液管准确吸取4.2.4.1.2.1所得上清液5.0 mL上柱。先以30 mL正己烷(4.2.1.1)淋洗,再以80 mL二氯甲烷-丙酮混合液(4.2.1.4)淋洗,速度以大约每分钟2 mL为宜。用旋转蒸发器(4.2.2.13)浓缩至约1 mL,用正己烷(4.2.1.1)定容至2.0 mL,待测。

4.2.4.2 测定

4.2.4.2.1 气相色谱参考条件

4.2.4.2.1.1 毛细管柱法

色谱柱:HP-1石英毛细管柱,25 m×φ0.32 mm。

载气:氮气;2.0 mL/min;尾吹气;30 mL/min;氢气;30 mL/min;空气;350 mL/min。

隔垫吹扫:6 mL/min。

分流比:20:1。

检测器温度:240℃。

进样口温度:210℃。

柱温:参见附录B。

色谱图:参见附录C。

4.2.4.2.1.2 填充柱法

色谱柱:5%SE-30玻璃填充柱,2.5 m×φ3.5 mm。

气体流速:氮气;40 mL/min;氢气;25 mL/min;空气;250 mL/min。

进样口、检测器温度:230℃。

柱温:参见附录B。

色谱图:参见附录C。

4.2.4.2.2 定量测定

分别取系列混合标准溶液(4.2.1.9)1 μL进样,测得不同浓度BHA、BHT、EQ的峰面积(或峰高),以浓度为横坐标,峰面积(或峰高)为纵坐标,分别绘制工作曲线。同时取试样溶液(4.2.4.1)1 μL进样,测得峰面积(或峰高)分别与工作曲线相比较定量,按式(2)或式(3)计算求得。

4.2.4.2.3 结果计算

试样中BHA、EQ和BHT的含量 X_2 ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(2)计算。

$$X_2 = \frac{A_s \times m_{st} \times V}{A_{st} \times m \times V_i} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

A_s ——进样样液中BHA、BHT、EQ峰面积或峰高,单位为微伏·秒或毫米($\mu V \cdot s$ 或mm);

m_{st} ——BHA、BHT、EQ 标准品进样的绝对量,单位为纳克(ng);

V ——样品提取定容体积,单位为毫升(mL);

A_{st} ——标准液的 BHA、BHT、EQ 峰面积或峰高,单位为微伏·秒或毫米($\mu V \cdot s$ 或 mm);

m ——称样量,单位为克(g);

V_i ——样液的进样体积,单位为微升(μL)。

如样品用柱层析净化处理,试样中 BHA、EQ 和 BHT 的含量 X_3 ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(3)计算。

$$X_3 = \frac{A_s \times m_{st} \times V}{A_{st} \times m \times V_i} \times \frac{V_2}{V_1} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

V_2 ——样液进样前定容体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——样品提取液分取过柱体积,单位为毫升(mL)。

4.2.4.2.4 结果表述

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留到小数点后一位。

4.2.5 重复性

在重复性条件下,同一分析者对同一试样同时两次平行测定所得结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

附录 A

(资料性附录)

丁羟基茴香醚、二丁羟基甲苯、乙氧喹和没食子酸丙酯标准品的高效液相色谱色谱图

丁羟基茴香醚、二丁羟基甲苯、乙氧喹和没食子酸丙酯标准品的高效液相色谱图见图 A.1。

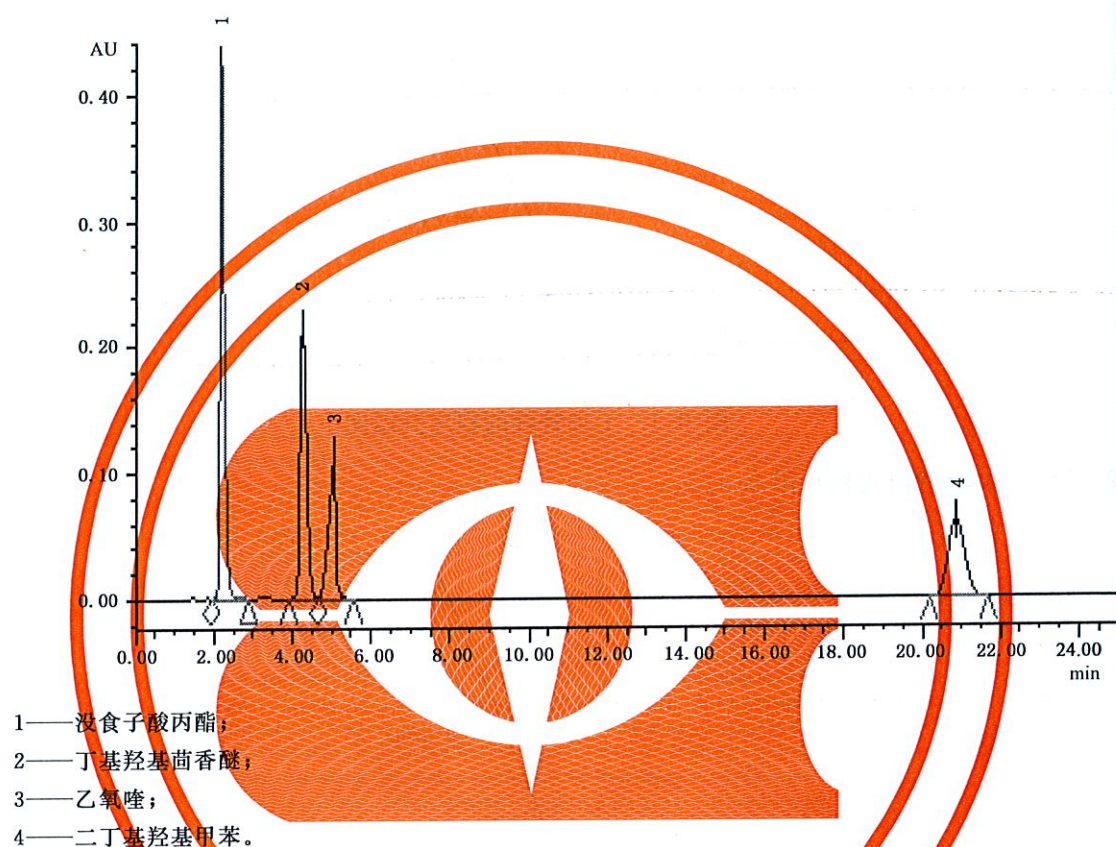


图 A.1 标准溶液的高效液相色谱图

附录 B
(资料性附录)
气相色谱法的程序升温图

B.1 毛细管柱的程序升温图见图 B.1。

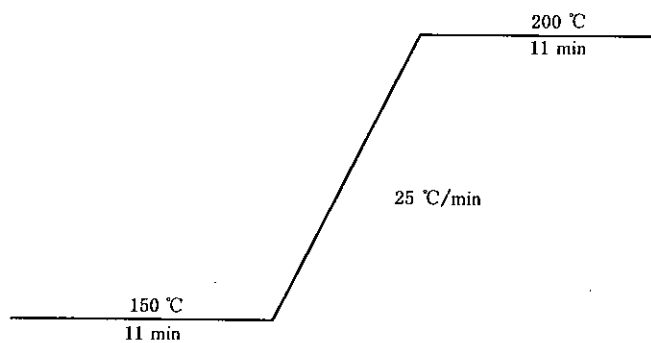


图 B.1 毛细管柱的程序升温图

B.2 填充柱的程序升温图见图 B.2。

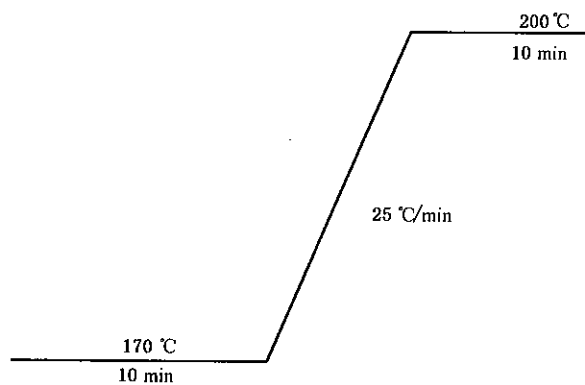


图 B.2 填充柱的程序升温图

附录 C
(资料性附录)

丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯和乙氧喹标准品的气相色谱图

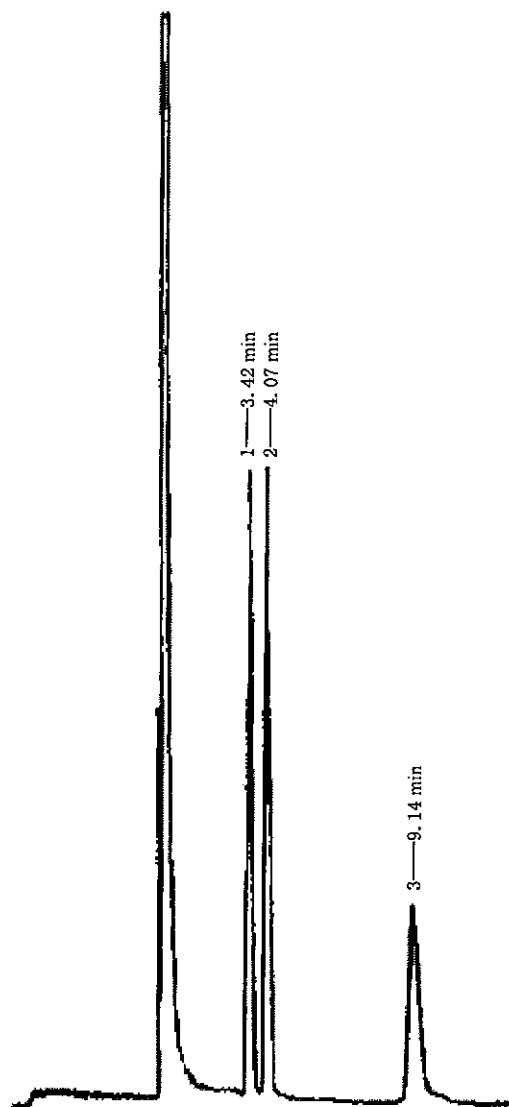
C.1 丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯和乙氧喹标准品的毛细管柱气相色谱图见图 C.1。



- 1——丁基羟基茴香醚；
2——二丁基羟基甲苯；
3——乙氧喹。

图 C.1 丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯和乙氧喹标准品的毛细管柱气相色谱图

C.2 丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、乙氧喹标准品的填充柱气相色谱图见图 C.2。



- 1——丁基羟基茴香醚；
- 2——二丁基羟基甲苯；
- 3——乙氧喹。

图 C.2 丁基羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯和乙氧喹标准品的填充柱气相色谱图