

中华人民共和国农业行业标准

《饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的  
测定 高效液相色谱法》

# 编制说明

（公开征求意见稿）

四川威尔检测技术股份有限公司

2022 年 8 月

# 目 录

一、工作简况 .....	1
1.1 任务来源 .....	1
1.2 制定背景 .....	1
1.3 工作过程 .....	3
二、标准编制原则、主要内容及其确定依据 .....	6
2.1 标准编制原则 .....	6
2.2 主要内容 .....	6
2.2.1 适用范围 .....	6
2.2.2 原理 .....	6
2.2.3 试剂或材料 .....	6
2.2.4 仪器设备 .....	7
2.2.5 样品 .....	7
2.2.6 试验步骤 .....	8
2.2.7 试验数据处理 .....	9
2.2.8 精密度 .....	10
2.3 主要技术内容确定的依据 .....	11
2.3.1 液相色谱条件的选择和优化 .....	11
2.3.2 样品前处理条件的选择和优化 .....	18
2.3.3 标准溶液稳定性考察 .....	20
2.3.4 方法学考察 .....	21
2.3.5 方法适用性考察 .....	24
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果 .....	27
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况 .....	27
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准 .....	28
六、与有关法律、法规的关系 .....	28
七、重大分歧意见的处理经过和依据 .....	28
八、涉及专利的有关说明 .....	29
九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议 .....	29
十、其他应当说明的事项 .....	29

中华人民共和国农业行业标准

《饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定 高  
效液相色谱法》

## 编制说明

### 一、工作简况

#### 1.1 任务来源

根据农业农村部农产品质量安全监管司《关于下达 2020 年农业国家标准和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2020〕128 号），由四川威尔检测技术股份有限公司承担《饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定 高效液相色谱法》农业行业标准制定工作，参与单位为江西省兽药饲料监察所、重庆民泰新农业科技发展集团有限公司、通威股份有限公司。本项目由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出，全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口，项目任务编号为 HYB-20278。

#### 1.2 制定背景

饲料防霉是饲料工业和养殖业生产中的重大问题。丙酸及其盐类是世界公认最经济实惠、安全有效的食用性防霉剂。丙酸盐包括丙酸钠、丙酸钾、丙酸钙和丙酸铵等。丙酸及丙酸盐类是酸性防霉剂，具有较广的抗菌谱，对霉菌、真菌、酵母菌等都有一定的抑制作用。其抑菌作用主要靠它的游离羧基（-COOH）破坏微生物细胞壁和细胞

膜或透膜直接作用于细胞内容物，使酶蛋白失活，从而抑制微生物的增殖及毒素的产生，减少饲料储存期间营养成分的损失，防止饲料发霉变质并延长贮存时间。丙酸及其盐类毒性低且安全，是动物正常代谢的中间产物。同时丙酸盐可增加钙、钠、钾元素，有利于机体钾、钠平衡和改善蛋壳质量，提高消化率，降低饲料成本。

丙酸及其盐类是目前最常见、用量最大的饲料防霉剂，2019年我国饲用防霉剂总产量约为6.0万吨，总产值约6.0亿，其中丙酸和丙酸盐型产品约占防霉剂总产量的70%。丙酸型防霉剂生产企业较多，产品类型繁多，丙酸和丙酸盐含量大多在20%~60%范围内，其中以50%~60%剂型为主，市场上的产品质量良莠不齐。

目前，与饲料添加剂防霉剂丙酸和丙酸盐相关的国家标准有GB/T 22145-2008、GB/T 17815-2018和GB/T 36863-2018，其中GB/T 22145-2008《饲料添加剂 丙酸》适用于含量在99.5%液体丙酸或以丙酸含量90%以上的粉剂产品，GB/T 17815-2018《饲料中丙酸、丙酸盐的测定》适用于丙酸含量在3000 mg/kg以下的饲料原料、配合饲料、浓缩饲料中丙酸、丙酸盐含量测定，GB/T 36863-2018《混合型饲料添加剂防霉剂通用要求》规定了防霉剂品种、辅料品种、质量要求、卫生要求等。目前，没有针对含量范围为5%~70%饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐测定的国家/行业标准方法。

当前，饲料生产企业验收饲料添加剂防霉剂丙酸产品时，因为无国家/行业标准检测方法，只能参考有关文献或生产企业产品标准测定防霉剂中的丙酸和丙酸盐含量，由于检测方法不统一，经常与生产

商、贸易商发生纠纷，亟需制定国家/行业标准检测方法，为防霉剂生产企业控制产品质量、饲料企业科学使用提供可靠检测标准方法，有利于饲料监管部门监管防霉剂的质量安全，保证饲料、畜禽产品和水产品的质量安全。

### 1.3 工作过程

#### 1.3.1 成立标准编制小组

2020年8月，四川威尔检测技术股份有限公司接到《饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定 高效液相色谱法》行业标准制定项目任务后，对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案，组建了标准编制小组，制定了工作计划，落实人员与分工，详见表1。

表1 标准主要起草人员及任务分工

人员	职称	承担任务
张凤枰	教授级高工	项目负责人，负责项目的全面工作
张艳红	工程师	检测方法研究、样品检测、标准文本和编制说明编写
唐 姣	助理工程师	检测方法研究、样品检测、方法验证
符金华	高级牧医师	检测方法研究、标准文本和编制说明编写和完善、方法验证
杨 梅	高级工程师	调研、征求意见
陶有伦	高级工程师	调研、样品收集
杨发树	高级工程师	标准文本和编制说明编写和完善、方法验证、征求意见
王绪海	工程师	调研、样品收集

#### 1.3.2 技术路线和项目方案的制定

2020 年 8 月~9 月，标准编制小组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定指导思想，制定了标准制定技术路线和试验方案，见图 1。

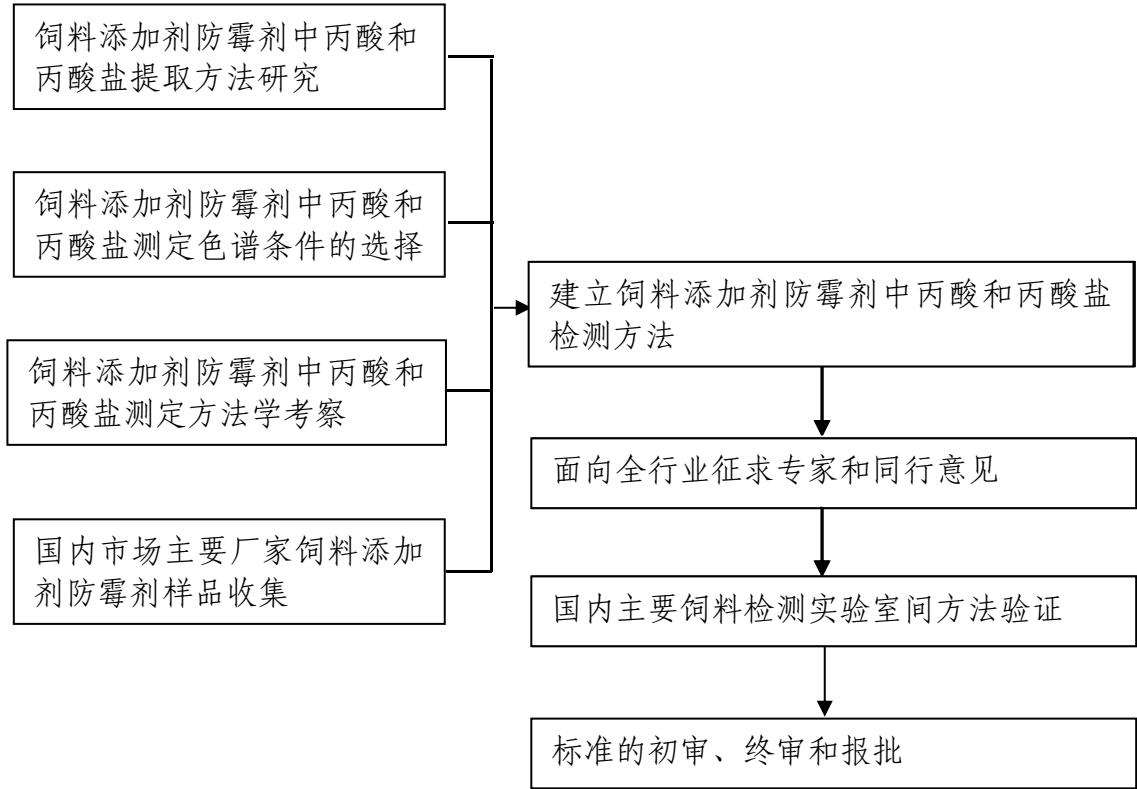


图 1 标准修订技术路线

1.3.3 开展方法学研究、实际样品检测

2020 年 10 月~2022 年 1 月，标准编制小组开展了色谱条件的选择和优化、提取条件的优化、方法学考察、国内市场主要厂家饲料添加剂防霉剂样品收集和实际样品测定。

1.3.4 编写标准文本和编制说明征求意见稿

2022 年 1 月，标准编制小组完成了标准文本、编制说明征求意见稿的编制工作。

1.3.5 征求意见和方法验证

2021 年 2 月上旬，标准编制小组将起草完成的农业行业标准《饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定 高效液相色谱法》标准文本和编制说明征求意见稿通过邮件发送至国家和省部级饲料质检机构、大中型饲料企业实验室、防霉剂生产企业、全国饲料工业标准化技术委员会委员等单位的专家征求意见。

### **1.3.6 预审和公开征求意见稿**

2022 年 4 月 19 日，全国饲料工业标准化技术委员会饲料检测方法标准化工作组组织专家对四川威尔检测技术股份有限公司等单位起草的农业行业标准《饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定 高效液相色谱法》（预审稿）进行了认真审查。专家组由李祥明、常碧影、郑金金、刘小敏、任玉琴、商军、李宏、宋荣、杨青、张进、许艳丽 11 位专家组成，广东酸动力生物科技有限公司品管总监李海芸、桂林市万康生物科技有限公司技术部部长唐执文列席会议。在听取起草专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下修改意见：

1. 鉴于丙酸的检测波长与甲醇的截止波长相近，进一步考察乙腈代替甲醇作为流动相的可能性。
2. 补充以蛭石等为载体防霉剂产品方法验证试验。
3. 进一步补充收集不同含量规格、剂型、载体的饲料添加剂防霉剂代表性样品，补充方法适用性考察试验。
4. 按照 GB/T 1.1 – 2020、GB/T 20001.4 – 2015 的要求规范标准文本及编制说明。

与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

2022 年 4 月~8 月，标准编制小组按照预审意见要求采集样品，完成流动相考察、防霉剂载体考察，以及不同含量规格、剂型、载体的饲料添加剂防霉剂代表性样品验证等相关试验，按照 GB/T 1.1 - 2020、GB/T 20001.4 - 2015 进一步规范标准文本、完善编制说明，形成公开征求意见稿。

## **二、标准编制原则、主要内容及其确定依据**

### **2.1 标准编制原则**

本标准的结构、技术要素和表达方法按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 20001.4—2015《标准编制规则第 4 部分：试验方法标准》的规定和要求进行编写。

### **2.2 主要内容**

#### **2.2.1 适用范围**

本标准制定的目的是满足饲料添加剂防霉剂生产企业和用户、监管部门和检验检测机构开展饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐含量的测定需要，适用范围为饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定。

#### **2.2.2 原理**

试样中的丙酸和丙酸盐用磷酸溶液提取，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

#### **2.2.3 试剂或材料**

(1) 水：GB/T 6682，一级。



(2) 乙腈：色谱纯。

(3) 0.1 % 磷酸溶液：移取1.0 mL磷酸，加水稀释、定容至1 000 mL，混匀，备用。

(4) 标准储备溶液（10 mg/mL）：准确称取0.500 0 g（精确至0.000 1 g）丙酸标准品（CAS号：79-09-4，纯度 $\geq 99.0\%$ ）于50 mL容量瓶中，加0.1 % 磷酸溶液（5.3）溶解，定容，摇匀。于2 °C ~ 8 °C保存，有效期为3个月。

(5) 标准系列溶液：准确移取0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL标准储备溶液（5.4），分别置于100 mL容量瓶，用0.1 % 磷酸溶液（5.3）稀释、定容，混匀，配制成浓度分别为0.01 mg/mL、0.02 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL标准系列溶液。临用现配。

(6) 微孔滤膜：0.45  $\mu\text{m}$ ，水系。

#### 2.2.4 仪器设备

(1) 高效液相色谱仪：配有紫外检测器（或二极管阵列检测器）。

(2) 分析天平：精度为0.000 1 g。

(3) 超声波清洗器。

#### 2.2.5 样品

目前，我国饲料添加剂防霉剂主流产品包括固体样品、液体样品，一般来说，饲料添加剂防霉剂固体样品细度较细，且丙酸极易挥发，一般是按照GB/T 14699.1采样后立即密封，混匀，样品不需要粉碎，进实验室后开袋后要立即称样，防止丙酸挥发。

因此，本部分表述为：取代表性的样品200 g，装入容器中，密封，应尽快分析。

## 2.2.6 试验步骤

### (1) 试样溶液制备

**固体试样：**平行做两份试验。称取 0.5 g（精确至 0.1 mg）试样，置于 100 mL 容量瓶中，立即加入 80 mL 0.1%磷酸溶液（5.3），加塞，摇匀，超声提取 10 min，取出，冷却至室温，用 0.1%磷酸溶液（5.3）定容，混匀。准确移取 10 mL 提取液于 100 mL 容量瓶中，用 0.1%磷酸溶液（5.3）稀释、定容，混匀，过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜，作为试样溶液，备用。

**液体试样：**平行做两份试验。称取 0.5 g（精确至 0.1 mg）试样，置于 100 mL 容量瓶中，立即用 0.1%磷酸溶液（5.3）稀释、定容，混匀。准确移取 10 mL 提取液于 100 mL 容量瓶中，用 0.1%磷酸溶液（5.3）稀释、定容，混匀，过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜，作为试样溶液，备用。

### (2) 测定

**高效液相色谱参考条件：**

a) 色谱柱：C18 柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5  $\mu\text{m}$ ，或性能相当者；

b) 流动相：乙腈（5.2）+0.1%磷酸溶液（5.3）=5+95（V+V）；

c) 流速：1.0 mL/min；

d) 检测波长：210 nm；

e) 进样量：20  $\mu\text{L}$ ；

f) 柱温: 30℃。

**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 (5.5) 和试样溶液 (8.1) 上机测定。丙酸标准溶液的液相色谱图见附录 A。

**定性:** 以保留时间定性, 试样溶液中丙酸色谱峰的保留时间应与浓度相当的标准系列溶液中丙酸色谱峰的保留时间一致, 其相对偏差在±2.5%之内。

**定量:** 以丙酸的浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 其相关系数应不低于 0.995。试样溶液中丙酸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 0.1% 磷酸溶液 (5.3) 稀释 (稀释倍数  $n$ ) 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%。

### 2.2.7 试验数据处理

目前, 我国饲料行业使用的丙酸型饲料添加剂防霉剂产品类型主要有丙酸、丙酸盐、丙酸+丙酸盐等三种, 以丙酸+丙酸盐型为主, 其功效成分均为丙酸, 根据本标准原理, 试样中的丙酸和丙酸盐用磷酸溶液提取, 高效液相色谱仪测定丙酸, 外标法定量, 因此, 试样中丙酸和丙酸盐的测定结果均以丙酸计。

试样中丙酸和丙酸盐 (以丙酸计) 的含量以质量分数  $w$  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:

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2 \times n}{m \times V_1 \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\rho$ ——由标准曲线计算得到的试样溶液中丙酸的质量浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

$V$ ——试样提取液总体积, 单位为毫升 (mL);

$V_1$ ——移取提取液体积, 单位为毫升 (mL);

$V_2$ ——试样溶液体积, 单位为毫升 (mL);

$n$ ——超出线性范围后的稀释倍数;

$m$ ——试样质量, 单位为克 (g)。

$$w = \frac{A \times C_s \times V \times V_2 \times n}{A_s \times m \times V_1 \times 1000} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$A$ ——试样溶液中丙酸色谱峰面积;

$A_s$ ——标准溶液中丙酸的色谱峰面积;

$C_s$ ——丙酸标准溶液的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

$V$ ——试样提取液总体积, 单位为毫升 (mL);

$V_1$ ——移取提取液体积, 单位为毫升 (mL);

$V_2$ ——试样溶液体积, 单位为毫升 (mL);

$n$ ——超出线性范围后的稀释倍数;

$m$ ——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。

## 2.2.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过

其算术平均值的 10 %。

## 2.3 主要技术内容确定的依据

### 2.3.1 液相色谱条件的选择和优化

#### 2.3.1.1 检测波长的选择

采用二极管矩阵检测器在 190 nm ~ 400 nm 波长扫描得到丙酸色谱峰的光谱图，如图 2。结果表明，丙酸在波长 210 nm 有较大吸收峰，因此，确定丙酸检测波长为 210 nm。

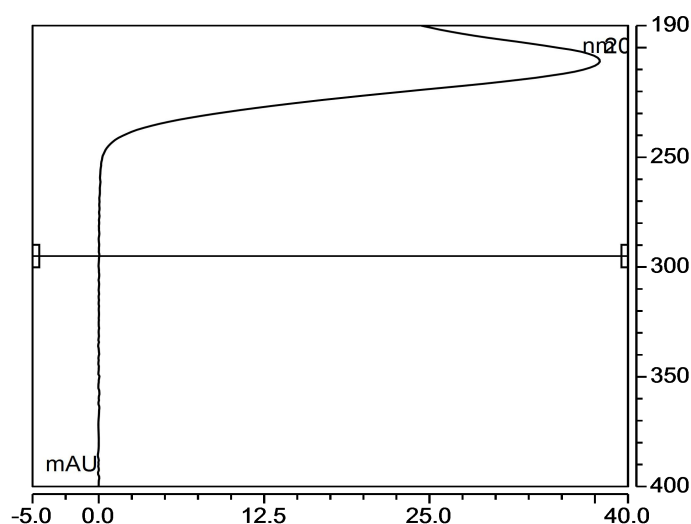


图2 丙酸标准溶液光谱图

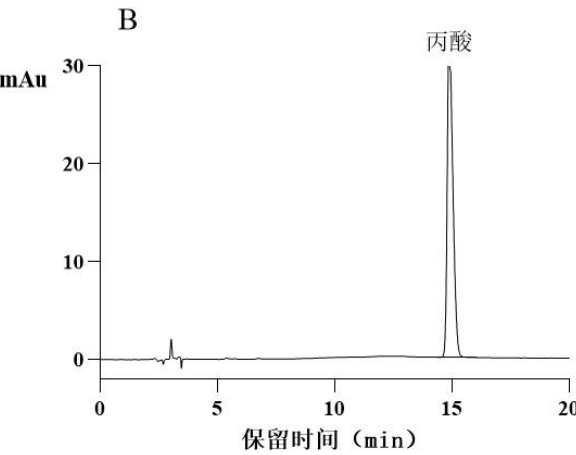
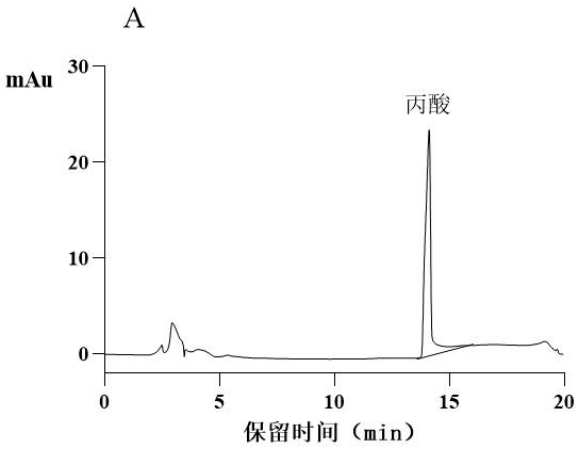
#### 2.3.1.2 流动相的考察

分别考察了三种流动相对丙酸峰形的影响，色谱条件详见表 2，色谱图见图 3。结果表明，0.1%磷酸溶液和 1.5 g/L 的磷酸氢二铵（pH 为 3.0 左右）作为水相时，基线平稳，丙酸的峰形对称，无拖尾，分离良好，可排除杂质的干扰，但磷酸氢二铵作为流动相使用时易结晶，堵塞色谱柱和仪器。丙酸是弱酸，通过液相色谱分离时，酸性流动相

能抑制有机酸的离解，明显改善峰形。因此，选择 **0.1%磷酸溶液** 作为流动相成分。

表 2 流动相考察试验条件

No.	流动相成分	流动相 体积比	流速 (mL/min)
流动相 1	甲醇：水	5：95	1.0
流动相 2	甲醇：0.1%磷酸溶液	5：95	1.0
流动相 3	甲醇+1.5g/L 的磷酸氢二铵 (PH 3.0)	5：95	1.0



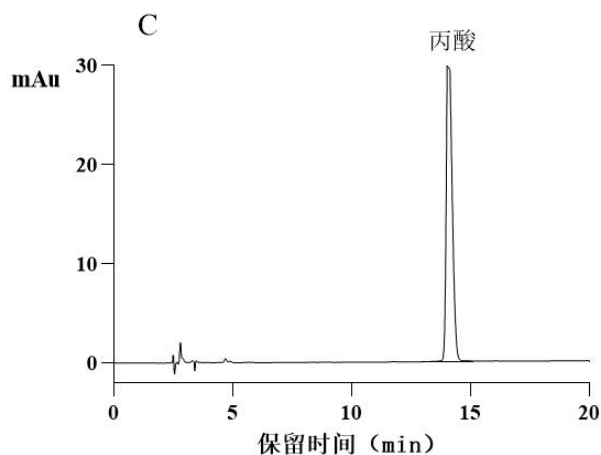


图3 三种流动相丙酸标准溶液色谱图

注：A：流动相 1；B：流动相 2；C：流动相 3

选择 0.1%磷酸溶液作为水系流动相，分别考察甲醇和乙腈作为有机系流动相对色谱图基线、丙酸峰形和峰面积的影响，色谱图峰面积比较见表 3，色谱图见图 4。结果表明，甲醇和乙腈作为有机系流动相时，均峰形对称，分离良好，峰面积无差异，但乙腈作为有机系流动相时基线噪音明显小于甲醇，且甲醇的紫外吸收截止波长为 205nm，于丙酸检测波长 210nm 接近，因此选择乙腈为流动相成分，本方法流动相为乙腈+0.1%磷酸溶液=5+95。

表 3 甲醇和乙腈流动相对比

流动相组成	峰面积 (μV)	平均值 (μV)	RSD/%
甲醇	512569	517560	0.99
	525037		
	513747		
	522839		
	514876		
	516293		
乙腈	515757	514982	0.57
	515521		
	509209		
	516772		
	515341		
	517294		

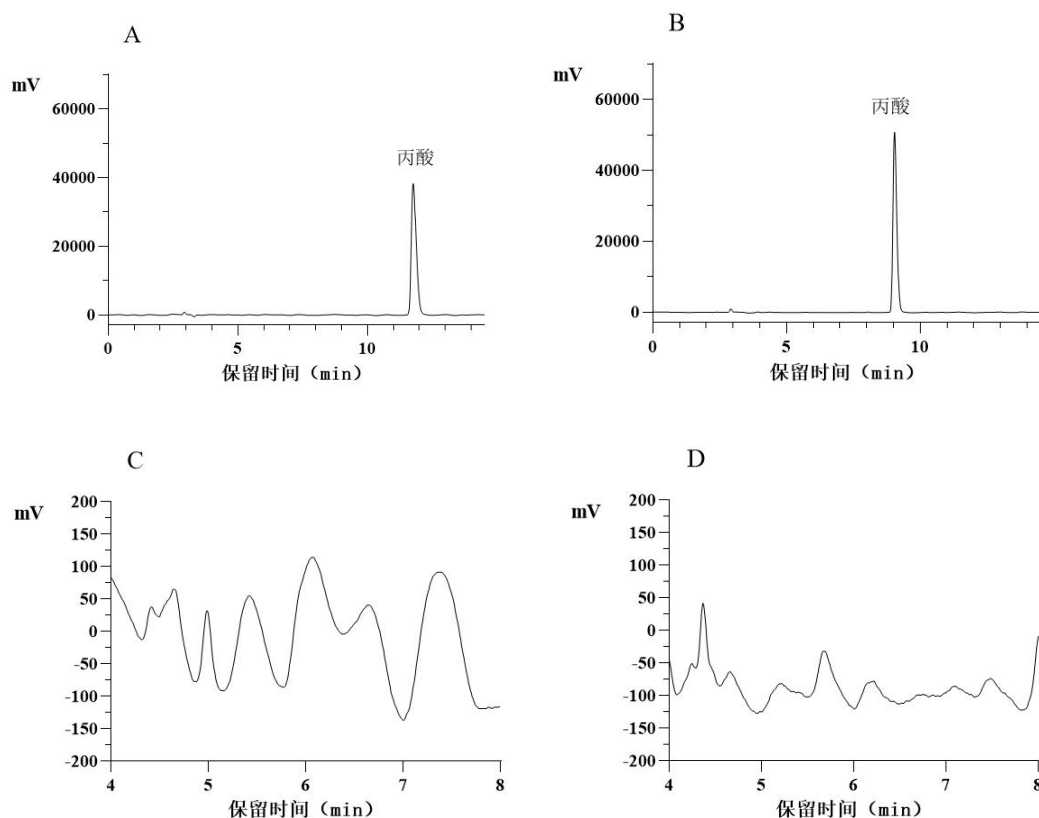


图4 甲醇和乙腈作为有机系丙酸标准溶液色谱图

注: A: 甲醇-有机系; B: 乙腈-有机系; C: 甲醇-有机系-基线; D: 乙腈-有机系-基线

### 2.3.1.3 色谱柱温度的考察

色谱柱温度对溶剂的溶解能力、色谱柱的性能、流动相的粘度都有一定的影响。分别考察色谱柱温度为 25 °C、30 °C、35 °C 和 40 °C 时丙酸的峰形和分离情况, 结果见图 5。考察结果表明, 随着色谱柱温度的升高, 丙酸的保留时间缩短, 由 11.322 min 缩短到 10.161 min。在以上条件中, 均峰形对称, 满足实验要求, 低温有利于延长色谱柱使用寿命, 我国部分地区夏季时不易控制到 25 °C。因此, 色谱柱温度确定为 30 °C。



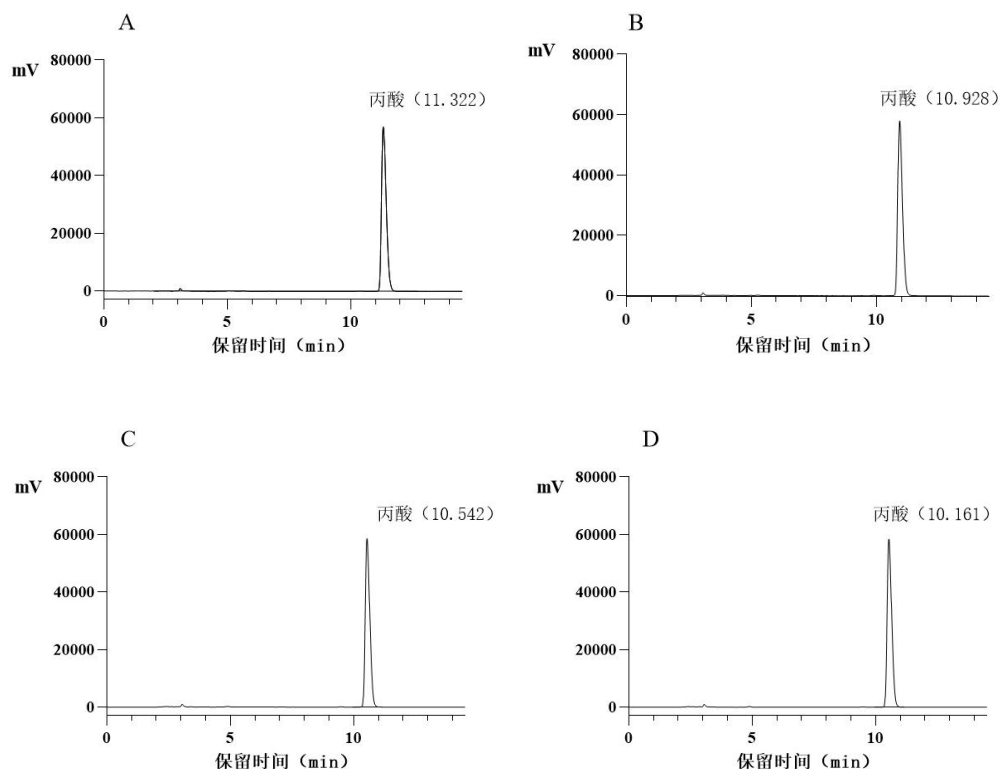


图5 不同柱温丙酸标准溶液色谱图

注: A: 25 °C; B: 30 °C; C: 35 °C; D: 40 °C

#### 2.3.1.4 不同厂家色谱柱的考察

根据相似相溶原理,选择  $C_{18}$  柱分离丙酸。在流动相为乙腈+0.1% 磷酸溶液=5: 95,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 210 nm,柱温为 30 °C 时,分别考察 Waters、Agilent、Thermo 和岛津的  $C_{18}$  柱对丙酸的保留情况,结果见图 6。结果表明,四个厂家  $C_{18}$  色谱柱得到的丙酸色谱峰均峰形对称,满足实验要求。因此,该方法选择  $C_{18}$  柱(柱长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5  $\mu\text{m}$ ) 或等效色谱柱。

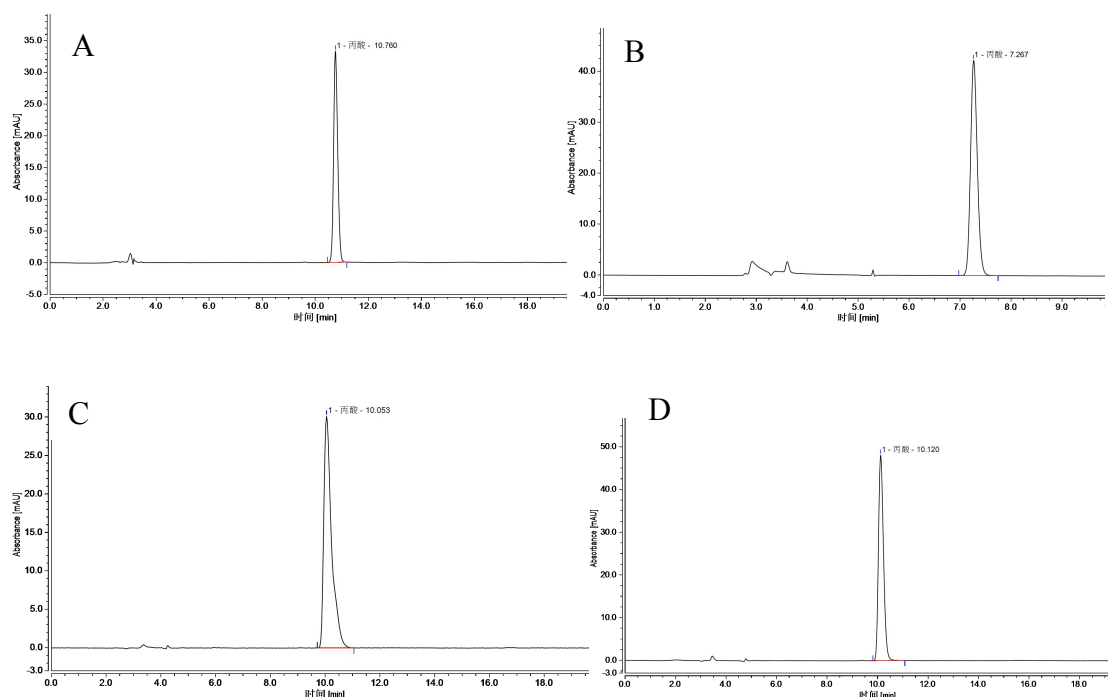


图6 不同厂家色谱柱丙酸标准溶液色谱图

注：A: Waters SymmetryShield™ RP18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)

B: Agilent ZORBAX SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)

C: Thermo Synchronis C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)

D: Shimadzu InertSustain C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)

### 2.3.1.5 色谱条件的选择性、专属性和稳定性考察

在上述色谱条件下，考察不同浓度丙酸标准工作溶液的保留时间、峰面积的精密度和稳定性，试验结果见表4。结果表明，0.02 mg/mL~1.0 mg/mL 等6种不同浓度丙酸标准工作溶液保留时间的RSD值均小于0.15%，峰面积的RSD值均小于1.00%。考察了固体防霉剂和液体防霉剂实际样品色谱分析的选择性，色谱图见图7~图8。结果表明，在试验色谱条件下，实际样品中的色谱图无其他杂质峰干扰。

以上试验结果表明，在所选择的B色谱条件下，丙酸的分离度、稳定性和专属性满足定性和定量测定要求，该方法选择性、专属性和稳定性高。

表 4 色谱柱选择性、稳定性和专属性考察试验结果

丙酸（mg/mL）	保留时间（min）						RSD（%）
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
0.02	10.133	10.130	10.143	10.137	10.137	10.130	0.050
0.05	10.123	10.127	10.117	10.117	10.123	10.127	0.044
0.1	10.113	10.117	10.110	10.110	10.103	10.097	0.071
0.2	10.077	10.073	10.073	10.080	10.070	10.073	0.035
0.5	10.073	10.090	10.097	10.100	10.100	10.117	0.14
1.0	10.110	10.113	10.117	10.137	10.137	10.147	0.15
丙酸（mg/mL）	峰面积（mAU*min）						RSD（%）
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
0.02	0.2215	0.2275	0.2257	0.2246	0.2271	0.2237	1.00
0.05	0.5677	0.5667	0.5646	0.5624	0.5612	0.5696	0.57
0.1	1.1224	1.1083	1.1166	1.1135	1.1144	1.1051	0.55
0.2	2.2451	2.2512	2.2451	2.2377	2.2414	2.2532	0.26
0.5	5.6128	5.6279	5.6127	5.5943	5.6034	5.6331	0.26
1.0	11.1999	11.2100	11.2132	11.2448	11.2518	11.2244	0.18

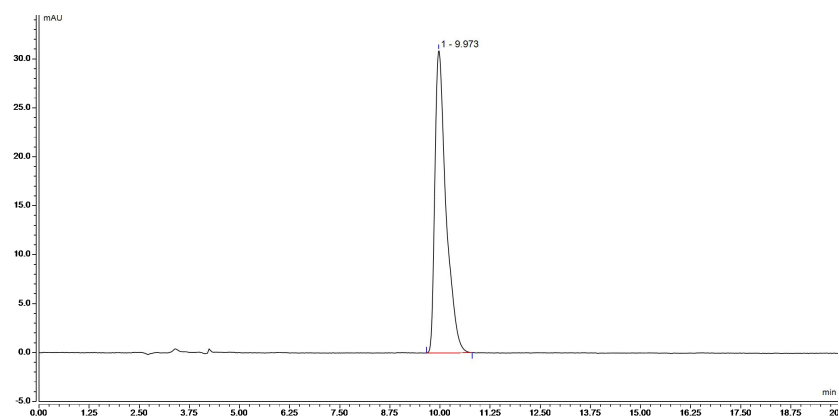


图7 固体防腐剂丙酸色谱图

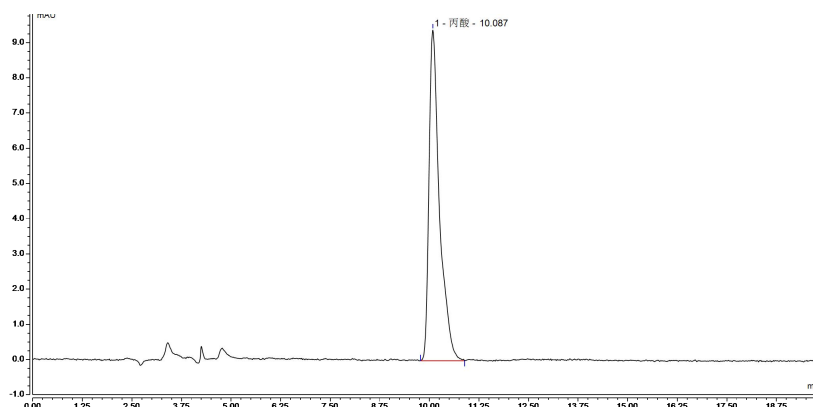


图8 液体防霉剂丙酸色谱图

## 2.3.2 样品前处理条件的选择和优化

### 2.3.2.1 提取溶剂的选择

经调研，目前我国主要饲料添加剂防霉剂固体产品绝大部分用二氧化硅做载体。丙酸和丙酸盐易溶于水，饲料添加剂防霉剂产品成分比较简单，固体产品大部分成分是丙酸和丙酸盐与二氧化硅载体的混合物。因此试验选取3个不同含量固体防霉剂和1个液体防霉剂，比较水、0.1%、0.2%、0.5%和1.0%磷酸溶液作为提取剂的提取效果，为了防止丙酸挥发，称样后立即添加提取溶液。固体防霉剂超声提取、稀释，液体防霉剂直接稀释，按照上述色谱条件进行液相色谱分析，结果见表5。结果表明，水、0.1%、0.2%、0.5%和1.0%磷酸溶液作为提取剂的提取效果基本一致，但是为了与流动相匹配，最终选用0.1%磷酸溶液作为提取溶剂。

表5 不同提取溶剂丙酸测定结果（n=3）

样品名称	含量（%）				
	水	0.1%磷酸溶液	0.2%磷酸溶液	0.5%磷酸溶液	1.0%磷酸溶液
液体防霉剂	58.4	58.7	59.1	58.6	58.7
固体防霉剂①	9.55	9.35	9.56	9.37	9.47
固体防霉剂②	40.2	40.9	40.4	40.0	40.3
固体防霉剂③	63.1	63.5	62.9	62.9	63.2

### 2.3.2.2 提取方式的选择

选取了 2 个不同含量固体防霉剂和 1 个液体防霉剂，分别称取 0.5 g 饲料添加剂防霉剂样品于 100 mL 容量瓶中，固体样品加入 80 mL 0.1 %磷酸溶液，选择提取方式为直接提取、超声 5 min、超声 10 min、超声 20 min 和超声 30 min 进行提取后，恢复至室温后用 0.1 %磷酸溶液定容至刻度，混匀后稀释 10 倍；液体样品直接用 0.1 %磷酸溶液稀释、定容、混匀，再稀释 10 倍，按照上述色谱条件进行液相色谱分析，其含量测定结果见表 6。结果表明，该实验中 5 种提取方式结果基本一致，超声 10 min、20 min 的提取效果稍优于其他提取条件，可使丙酸和丙酸盐充分溶出。因此，选择超声 10 min 作为饲料添加剂防霉剂中丙酸的提取方式。

表 6 不同提取方式的考察结果 (n=3)

样品	含量 (%)				
	直接提取	超声 5 min	超声 10 min	超声 20 min	超声 30 min
液体防霉剂 1#	58.7	59.3	58.9	59.0	58.7
固体防霉剂 13#	43.7	44.1	44.2	43.6	43.7
固体防霉剂 6#	58.9	59.6	60.2	60.2	59.1

### 2.3.2.3 试样溶液的稳定性考察

由于丙酸沸点较低，属于易挥发有机酸。考察提取后的试样溶液放置 0、8、16、24、32、48 小时的稳定性，考察结果见表 7。结果表明，试样溶液放置 0~48 小时峰面积变化不大，偏差为 0.24%，证明试样溶液在 48 小时内稳定。

表 7 试样溶液稳定性考察结果 (n=3)

时间 (h)	峰面积 (μV)	偏差/%
0	512991	0.24
8	516058	
16	513763	
24	513587	
32	513655	
48	512528	

### 2.3.3 标准溶液稳定性考察

配制 1.0 mg/mL 的丙酸标准储备溶液，每 10 天进行一次稳定性考察，连续考察 9 次，每次考察都采用临用现配的丙酸标准溶液的响应值来计算所考察的丙酸标准溶液含量，每次做 3 平行试验，9 次丙酸标准溶液稳定性结果见表 8。结果表明，丙酸标准储备溶液 90 天内较稳定，确定丙酸标准储备溶液有效期为 3 个月。

表 8 标准溶液稳定性考察结果

序号	检测浓度/ (mg/mL)				配置浓度/ (mg/mL)	偏差/%
	平行 1	平行 2	平行 3	平均值		
1	9.921	9.923	9.918	9.921	9.928	0.074
2	9.921	9.925	9.932	9.926	9.928	0.020
3	9.886	9.887	9.881	9.885	9.928	0.44
4	9.908	9.882	9.883	9.891	9.928	0.37
5	9.894	9.911	9.885	9.897	9.928	0.32
6	9.899	9.904	9.889	9.897	9.928	0.31
7	9.901	9.912	9.912	9.908	9.928	0.20
8	9.886	9.904	9.888	9.893	9.928	0.36
9	9.899	9.916	9.897	9.904	9.928	0.24

## 2.3.4 方法学考察

### 2.3.4.1 线性范围

准确移取丙酸标准储备溶液，用 0.1%磷酸溶液稀释，制得浓度为 0.02 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 系列标准溶液，由低浓度到高浓度供高效液相色谱仪测定。以标准溶液中被测组分的峰面积为纵坐标，以标准溶液中被测组分的浓度为横坐标绘制标准工作曲线，丙酸的回归方程及相关系数 ( $r^2$ ) 见表 9。结果表明，丙酸浓度在 0.02 mg/mL ~ 1.0 mg/mL 范围内，相关系数为 0.9999。

表9 丙酸酸线性范围、线性方程及相关系数 ( $R^2$ )

化合物	线性范围 (mg/mL)	线性方程	$R^2$
丙酸	0.02~1.0	$y = 646.3115x + 3.48792$	0.9999

### 2.3.4.2 方法检出限和定量限

在本试验条件下，将标准溶液连续稀释后添加到 0.5 g 二氧化硅载体中进行加标回收实验，以 3 倍信噪比 (S/N) 作为方法的检出限，以 10 倍信噪比 (S/N) 作为方法的定量限。结合称样质量、定容体积和稀释体积，丙酸的检出限为 0.1 %，定量限为 0.3 %。

### 2.3.4.3 方法精密度考察

按照上述确定的试样前处理和液相色谱条件，开展了固体防霉剂和液体防霉剂中丙酸测定的精密度试验，每个样品进行6平行测定，并重复3次，结果见表10。结果表明，按照上述方法和条件，液体防霉剂、低含量固体防霉剂、中含量固体防霉剂和高含量固体防霉剂样

品中丙酸测定结果批内、批间的相对标准偏差在0.36%~1.35%之间，均小于2%，测定结果重复性好。

表10 方法精密度试验结果

样品	批次	丙酸 / %						平均值 %	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
液体防霉剂 ①	I	63.78	64.38	64.79	64.43	64.43	65.00	64.5	0.65	0.72
	II	63.60	64.20	64.60	64.00	64.60	65.00	64.3	0.78	
	III	63.58	64.51	64.86	64.45	64.69	65.12	64.5	0.82	
固体防霉剂 ②	I	12.19	12.23	12.23	12.06	12.12	12.20	12.2	0.56	0.90
	II	12.20	12.20	12.00	12.00	12.00	12.40	12.1	1.35	
	III	12.20	12.12	12.09	12.13	12.14	12.34	12.2	0.74	
固体防霉剂 ③	I	40.61	40.81	40.76	40.30	40.20	40.56	40.5	0.60	0.63
	II	40.60	40.80	40.80	40.60	40.00	40.40	40.5	0.74	
	III	40.75	40.99	40.89	40.60	40.39	40.54	40.7	0.55	
固体防霉剂 ④	I	60.78	61.04	60.50	60.45	60.57	60.56	60.6	0.36	0.73
	II	60.60	61.40	60.20	60.40	60.40	60.60	60.6	0.69	
	III	60.89	61.26	60.79	60.72	59.33	60.80	60.6	1.10	

#### 2.3.4.4 回收率试验

按照上述确定的试样前处理和液相色谱条件，采用空白二氧化硅、蛭石、麦饭石和水作为载体，开展丙酸加标回收率试验，每个样品进行3梯度加标、6平行测定，并重复3次，计算加标回收率、批内和批间相对标准偏差，结果见表11。结果表明，按照上述方法和条件，固体防霉剂和液体防霉剂中丙酸的平均回收率在86.1%~102.0%，批内相对标准偏差在0.23%~3.18%之间，批间相对标准偏差在0.34%~2.46%之间，均小于5.0%。说明该方法对不同类型、不同含量样品、不同时间测定均有较好的精密度和准确度。



表11 液体防霉剂和固体防霉剂回收率试验结果

载体	加标量 (%)	测定 批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD(%)	批间 RSD(%)
二氧化硅	0.3	I	86.0	87.6	88.9	88.1	88.2	88.4	87.9	0.81	0.98
		II	89.7	90.0	92.0	88.5	90.9	89.7	90.1	0.97	
		III	87.5	88.3	89.9	87.8	87.6	90.3	88.6	1.15	
	10.0	I	100.0	100.3	100.4	98.7	99.3	100.1	99.8	0.67	1.07
		II	100.1	100.1	98.1	98.1	98.1	102.0	99.4	1.61	
		III	100.1	99.3	99.0	99.4	99.5	101.4	99.8	0.89	
	40.0	I	99.6	100.1	100.0	98.9	98.6	99.5	99.4	0.60	0.63
		II	99.6	100.1	100.1	99.6	98.1	99.1	99.4	0.74	
		III	99.9	100.5	100.3	99.6	99.1	99.4	99.8	0.55	
	60.0	I	99.4	99.8	98.9	98.9	99.0	99.0	99.2	0.36	0.73
		II	99.1	100.4	98.4	98.8	98.8	99.1	99.1	0.69	
		III	99.6	100.2	99.4	99.3	97.0	99.4	99.1	1.10	
蛭石	0.3	I	98.2	96.2	96.2	96.2	97.2	97.2	96.9	0.87	1.38
		II	97.2	98.2	95.1	94.6	99.3	97.2	96.9	1.84	
		III	94.6	96.2	95.7	96.7	98.8	96.2	96.3	1.43	
	10.0	I	99.1	99.7	103.0	98.7	99.1	100.5	100.0	1.61	1.34
		II	99.9	100.3	100.9	99.7	100.3	102.4	100.6	0.97	
		III	99.7	100.1	100.1	101.1	101.1	103.6	101.0	1.42	
	40.0	I	98.4	98.7	98.7	99.4	100.6	98.3	99.0	0.86	0.65
		II	98.0	98.4	98.4	98.4	98.6	98.0	98.3	0.25	
		III	97.9	98.1	98.9	98.7	98.1	98.0	98.3	0.43	
	60.0	I	98.9	96.5	99.1	98.6	97.8	98.4	98.2	0.98	0.64
		II	98.3	98.7	98.8	98.1	98.1	98.9	98.5	0.36	
		III	98.5	97.8	99.0	98.3	98.1	99.0	98.4	0.50	
麦饭石	0.3	I	95.3	100.5	96.9	94.1	92.6	92.6	95.3	3.18	2.46
		II	95.3	92.7	95.8	95.1	95.1	95.7	95.0	1.19	

载体	加标量 (%)	测定 批次	回收率 (%)						平均回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		III	90.5	92.0	97.9	96.2	94.1	95.7	94.4	2.92	
	10.0	I	99.9	99.7	96.4	98.4	95.8	94.1	97.4	2.39	2.45
		II	100.5	102.4	100.9	103.4	102.2	102.4	102.0	1.04	
		III	99.7	101.3	100.9	101.3	99.9	100.7	100.7	0.71	
	40.0	I	96.7	97.3	97.4	97.3	97.6	96.5	97.1	0.45	0.42
		II	97.4	97.6	97.4	97.2	97.5	96.6	97.3	0.37	
		III	96.8	98.2	97.3	97.0	97.4	97.4	97.3	0.49	
	60.0	I	98.5	98.4	98.4	98.0	97.9	97.3	98.1	0.47	0.34
		II	98.1	97.9	98.5	98.3	98.0	98.0	98.1	0.23	
		III	97.8	97.7	97.8	97.9	98.3	97.5	97.8	0.27	
水	0.3	I	85.9	88.1	90.2	86.9	86.0	87.1	87.4	1.36	0.54
		II	87.9	84.5	86.4	87.1	86.5	87.2	86.6	0.92	
		III	87.2	86.9	87.0	83.2	86.6	85.6	86.1	1.30	
	10.0	I	100.3	100.3	98.9	98.6	99.9	98.2	99.4	0.91	1.67
		II	98.1	96.2	96.2	96.2	96.2	96.2	96.5	0.83	
		III	99.4	100.4	98.8	99.8	99.8	99.8	99.7	0.52	
	40.0	I	97.9	99.7	98.8	98.4	98.9	99.3	98.8	0.66	0.74
		II	98.1	99.6	98.1	97.6	97.6	99.1	98.4	0.82	
		III	98.2	100.0	99.1	98.9	99.3	99.4	99.1	0.60	
	60.0	I	97.7	98.7	99.4	98.8	98.8	99.8	98.9	0.69	0.77
		II	97.5	98.4	99.1	98.1	99.1	99.8	98.7	0.83	
		III	97.4	99.0	99.5	98.8	99.2	100.0	99.0	0.87	

### 2.3.5 方法适用性考察

从市场上收集我国主要饲料防霉剂生产企业的产品(固体型和液体型)共35批次,按照上述确定的条件和方法测定丙酸的含量,结果见表12。结果表明,本方法的测定值与生产厂家的标示值基本一致,

所建立的标准方法适用于固体型和液体型饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定。

表12 饲料添加剂防霉剂实际样品测定结果

样品		丙酸 / %				
编号	载体	平行 1	平行 2	平行 3	平均值	标识含量
固体防霉剂 1 号	二氧化硅	58.4	59.2	59.6	59.1	58.0
固体防霉剂 2 号	二氧化硅	52.2	52.5	53.0	52.6	50.0
固体防霉剂 3 号	二氧化硅	51.4	51.7	51.3	51.5	50.0
固体防霉剂 4 号	二氧化硅	47.4	48.0	47.1	47.5	45.0
固体防霉剂 5 号	二氧化硅	62.7	62.5	62.3	62.5	60.0
固体防霉剂 6 号	二氧化硅	36.2	36.0	36.3	36.2	35.0
固体防霉剂 7 号	二氧化硅	13.3	13.3	12.9	13.2	12.0
固体防霉剂 8 号	二氧化硅	12.8	12.9	12.8	12.8	12.0
固体防霉剂 9 号	二氧化硅	12.8	12.7	12.8	12.7	12.0
固体防霉剂 10 号	二氧化硅	50.2	51.1	49.8	50.4	50.0
固体防霉剂 11 号	二氧化硅	62.9	62.3	62.1	62.4	60.0
固体防霉剂 12 号	二氧化硅	52.3	52.8	53.2	52.8	50.0
液体防霉剂 13 号	水	63.4	64.4	63.4	63.7	60.0
液体防霉剂 14 号	水	63.0	64.8	65.0	64.2	60.0

液体防霉剂 15 号	水	61.1	61.0	60.6	60.9	60.0
固体防霉剂 16 号	二氧化硅	50.1	50.1	50.2	50.1	50.0
固体防霉剂 17 号	二氧化硅	51.6	50.9	51.1	51.2	50.0
固体防霉剂 18 号	二氧化硅	41.5	41.6	41.4	41.5	40.0
固体防霉剂 19 号	二氧化硅	60.4	60.1	60.3	60.3	60.0
固体防霉剂 20 号	二氧化硅	61.2	61.5	61.4	61.4	60.0
固体防霉剂 21 号	二氧化硅	52.3	52.4	53.1	52.6	50.0
固体防霉剂 22 号	二氧化硅	52.7	52.7	52.8	52.8	50.0
固体防霉剂 23 号	二氧化硅	48.5	48.6	47.6	48.2	45.0
固体防霉剂 24 号	二氧化硅	49.8	50.5	50.5	50.3	50.0
固体防霉剂 25 号	二氧化硅	52.5	52.5	52.4	52.5	50.0
固体防霉剂 26 号	二氧化硅	50.5	50.1	50.4	50.4	50.0
固体防霉剂 27 号	二氧化硅	47.4	48.5	48.3	48.1	45.0
固体防霉剂 28 号	二氧化硅	58.8	57.7	58.3	58.3	55.0
固体防霉剂 29 号	二氧化硅	51.7	52.8	53.3	52.6	50.0
固体防霉剂 30 号	二氧化硅	63.0	63.1	63.1	63.1	60.0
固体防霉剂 31 号	二氧化硅	22.3	22.4	22.3	22.3	20.0
固体防霉剂 32 号	二氧化硅	55.6	55.7	54.9	55.4	55.0
固体防霉剂 33 号	二氧化硅、 元明粉	64.3	64.7	63.9	64.3	60.0
固体防霉剂 34 号	二氧化硅、 沸石粉	46.9	46.8	46.9	46.9	45.0
固体防霉剂 35 号	二氧化硅、 蛭石	40.2	40.3	40.1	40.2	40.0

### 三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

2022 年 2 月~3 月，标准编制小组委托国家饲料质量检验检测中心（武汉）、农业农村部饲料质量监督检验测试中心（成都）和四川省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所完成本标准的复核验证工作。三家检测机构对本标准的复核验证结论为：

经试验验证，四川威尔检测技术股份有限公司制定的农业行业标准《饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定 高效液相色谱法》适用于的固体型和液体型饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐含量的测定。丙酸在 0.02 mg/mL ~ 1.0 mg/mL 范围内呈良好线性关系，相关系数在 0.999 以上；加标回收试验结果表明，加标回收率范围、相对标准偏差与标准规定相符合；方法检出限、定量限与标准规定一致；方法灵敏度高、重复性好，适用于饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定。

制定、发布、实施本标准，有利于防霉剂生产企业控制产品质量、饲料企业科学使用提供可靠检测标准方法，有利于饲料监管部门监管防霉剂的质量安全，保证饲料、畜禽产品和水产品的质量安全，促进我国饲料工业的高质量发展。

### 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

目前，未见 ISO 等国际组织和其他国家有关饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐检测的标准方法。与国内同类标准技术内容对比情况见

表 13。结果表明，本标准检测项目适用范围与 GB/T 17815-2018 不同，检出限、定量限也不同。

表 13 与国内外同类标准技术内容的对比情况

标准编号和名称	适用范围	检测项目	检出限和定量限
GB/T 17815-2018 饲料中丙酸、丙酸盐的测定	适用于丙酸含量在 3000 mg/kg 以下的饲料原料、配合饲料浓缩饲料中丙酸、丙酸盐（以丙酸计）的测定	丙酸、丙酸盐（以丙酸计）	气相色谱法的检出限为 30 mg/kg，定量限为 100 mg/kg；高效液相色谱法的检出限为 30 mg/kg，定量限为 100mg/kg
NY/T ×××× - 202×饲料添加剂防霉剂中丙酸和丙酸盐的测定 高效液相色谱法	饲料添加剂防霉剂	丙酸和丙酸盐（以丙酸计）	丙酸和丙酸盐（以丙酸计）的检出限为 0.1 %，定量限为 0.3 %

## 五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

未采用国际标准或国外标准。

## 六、与有关法律、法规的关系

本标准与现行的有关饲料法律、法规、规章和政策以及有关基础标准和强制性标准方向统一一致，相互支持，互相配合、协调一致，形成统一的有机整体。

## 七、重大分歧意见的处理经过和依据

2021 年 2 月~4 月，标准编制小组发送给国家饲料质检中心、省部级饲料质检机构、大中型饲料企业实验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的质检机构、科研院所、高校、企业等单位的专家征求意见，发函单位 40 个，回函单位 25 个，未回函单位 15 个；提出意见单位 21 个，无意见单位 4 个。共提出意见 82 条；采纳 63 条，部分采纳或不采纳 19 条。无重大分歧意见。

## 八、涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但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。

## 九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

（1）首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本；

（2）发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会组织标准起草单位通过标准培训、会议宣贯、影音文件等方式，积极开展本标准的宣贯工作。

（3）建议本标准正式发布后，设定6个月的过渡期，过渡6个月后实施。

## 十、其他应当说明的事项

无。