

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—20XX

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 (HPLC)

(公开征求意见稿)

20XX-XX-XX发布

20XX-XX-XX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这些专利的责任。

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：浙江省兽药饲料监察所。

本文件主要起草人：。

饲料中吡啶甲酸铬的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定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

饲料中的吡啶甲酸铬用乙腈提取，浓缩后经混合型阴离子交换柱净化，用高效液相色谱仪-紫外检测器或二极管阵列检测器测定，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 乙腈溶液（10%）：量取 10 mL 乙腈，加水至 100 mL。

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 50 mL，混匀，静止，取上层溶液。

5.6 磷酸盐缓冲液（pH7.0）：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。

- 5.7 标准储备溶液 (250 µg/mL)：称取吡啶甲酸铬对照品 (CAS 号：14639-25-9，含量 ≥ 98.0%) 约 25 mg (精确至 0.01 mg)，置 100 mL 容量瓶中，加乙腈 (5.2) 超声溶解，用乙腈定容，混匀。2℃-8℃ 保存，有效期为 6 个月。
- 5.8 标准中间溶液 (25 µg/mL)：准确量取标准储备液 (5.7) 10 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水定容，摇匀。(临用新配)。
- 5.9 标准系列溶液：准确量取标准中间溶液 (5.8) 适量，用水定容配成系列标准溶液，浓度分别为：0.05 µg/mL、0.1 µg/mL、0.5 µg/mL、1.0 µg/mL、2.0 µg/mL、5.0 µg/mL。(临用新配)
- 5.10 固相萃取柱：混合型阴离子交换柱(MAX)，500 mg/6 mL。
- 5.11 微孔滤膜：0.45 µm，水系。

6 仪器设备

- 6.1 高效液相色谱仪：带紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 6.2 分析天平：感量 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 旋涡混合器。

7 样品

按GB/T 20195制备样品，粉碎使其全部通过0.425 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

平行试验 2 份。称取配合饲料约 5 g，浓缩饲料、精料补充料约 3-5 g (精确至 1 mg)，添加剂预混饲料约 1 g (精确至 0.1 mg)，置锥形瓶或 50 mL 离心管中，加乙腈 (5.2) 25.00 mL，振荡、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，置离心管中。残渣用乙腈 (5.2) 25.00 mL 重复提取 1 次，合并 2 次提取液，混匀。

8.2 浓缩、净化

8.2.1 添加剂预混合饲料

精密移取提取液 (8.1) 5 mL-50 mL，于 50℃ 下用氮气吹至近干，加 5.00 mL 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 µm 微孔滤膜 (5.11) 过滤，为试样溶液。

8.2.2 配合饲料、浓缩饲料、精料补充料

精密移取提取液（8.1）5 mL-50 mL，于 50℃ 下用氮气吹至近干，加 5.00 mL 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，涡旋 10 s，8 000 r/min 离心 3 min，取下层清液 1.00 mL，加 3.00 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，用乙腈（5.2）8 mL 洗脱，收集洗脱液，于 50℃ 下用氮气吹至近干，加 2.00 mL 乙腈溶液（5.4）超声或涡旋使溶解，用 0.45 μm 微孔滤膜（5.11）过滤，为试样溶液。

8.3 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈柱，长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，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 μL；

流动相：A：乙腈（5.2）；B：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
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保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中吡啶甲酸铬的保留时间一致，其相对偏差应在±2.5%之内。

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。多点校准按式（1）计算；单点校准按式（2）计算：

$$w = \frac{\rho \times n \times V_l \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——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（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

n ——净化前试样的总稀释倍数；

V_l ——净化后加入乙腈溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

$$w = \frac{A \times C_s \times n \times V_l \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

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的峰面积；

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

n ——净化前试样的总稀释倍数；

V_l ——净化后加入乙腈溶液的体积，单位为毫升（mL）。

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，结果保留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10%。

附录 A
(资料性附录)
吡啶甲酸铬标准溶液液相色谱图

A.1 吡啶甲酸铬标准溶液液相色谱图见图 A.1。

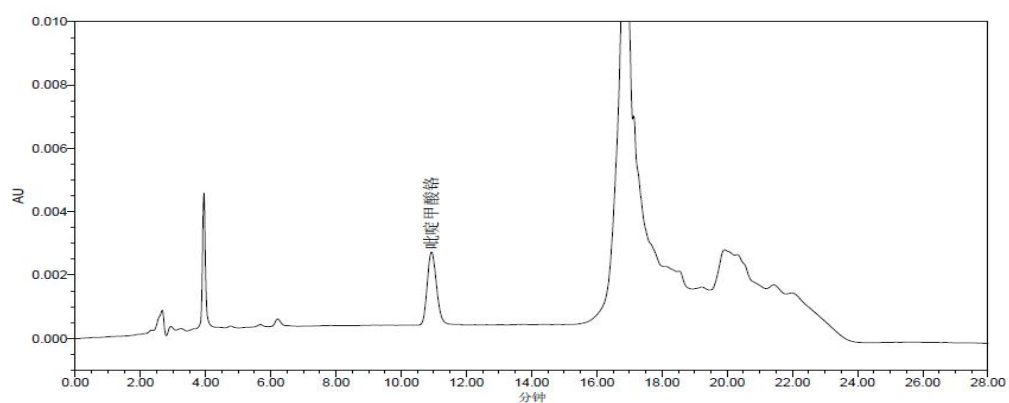


图 A.1 吡啶甲酸铬标准溶液液相色谱图 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

农业行业标准《饲料中吡啶甲酸铬的测定 高效液相色谱法》

编制说明（公开征求意见稿）

1 标准制定背景及任务来源

1.1 标准制定背景

在畜禽养殖中，吡啶甲酸铬作为有机三价铬源的营养添加剂已经得到广泛的应用，适量添加对动物的生长发育繁殖起到积极作用，农业部公告第 2625 号“饲料添加剂安全使用规范”中，有机铬（吡啶甲酸铬、烟酸铬）在配合饲料或全混合日粮中的添加推荐量（以 Cr 计）为 0~0.2 mg/kg，最高限量为 0.2 mg/kg（相当于吡啶甲酸铬 1.6 mg/kg）；曾有权^[1]报道，在饲料中添加 0.2-2mg/kg 的三价铬是适合的。经调研，当前饲料企业在预混合料中的添加量（吡啶甲酸铬）约为 40mg/kg，浓缩料约为 15mg/kg。三价有机铬过量添加，对畜禽产生一定的毒性，研究表明，体外细胞培养添加大于 0.6 mmol 吡啶甲酸铬，对细胞和 DNA 产生毒性作用。GB 13078-2017 饲料卫生标准中，饲料产品中铬的最高限量为 5~20mg/kg。饲料添加剂 吡啶甲酸铬（NY/T 916-2004）已于 2004 年颁布实施，但至今无饲料中吡啶甲酸铬测定方法。因此制定饲料中吡啶甲酸铬测定方法对饲料产品及畜产品质量安全监测提供技术保障。

1.2 任务来源

本标准的制定任务来源于农财发（2015）29 号《农业部关于下达 2015 年农业行业标准制定和修订等项目资金的通知》，项目编号：2015-25。由浙江省兽药饲料监察所承担，目前已经完成标准制订过程中的试验及验证工作，现对本标准中各项技术指标的制定作如下说明。

2. 主要工作过程

2.1 成立标准起草小组

2015 年 11 月计划任务下达后，为确保项目的顺利实施，成立标准起草小组，同时对标准起草工作进行分工，明确各自任务和职责，制定工作计划，落实人员与任务分工，详见表 1。

表 1 标准主要起草人员和任务分工

人 员	职 称	任 务 分 工
任玉琴	正高级兽医师	项目主持人，负责方案制定
吴望君	畜牧师	检测方法研究、样品检测
罗成江	兽医师	方法文献查新，前处理方法研究
侯 轩	兽医师	前处理方法研究

王彬	兽医师	样品采集、数据收集分析
黄娟	高级畜牧师	标准文本和编制说明完善
裘丞军	畜牧师	样品采集、数据收集分析
陈晓林	助理兽医师	标准征求意见及验证工作

2.2、标准编制过程

标准起草小组人员根据分工，开展调研，查阅，收集国内外相关资料、检测标准，了解产品应用情况，畜禽中添加水平，项目组对标准的各项指标进行了充分的讨论。拟订标准方法主要参数指标。

2016年1—3月，向饲料生产企业、市场收集产品，对收集的产品进行基础性检测。

2016年4月至2018年12月，组织相关技术人员对试验方法进行了充分的试验和讨论，编写了标准草案稿和编制说明。

2019年2月，向国内相关专家发出标准征求意见稿和起草说明，发送“征求意见稿”的单位（专家）数36份，收到“征求意见稿”后，回函的单位（专家）数18份，收到“征求意见稿后”回函并有建议或意见的单位（专家）数18份，没有回函的单位（专家）18份。提出建议的检验机构占66.7%，科研院校占22.2%，使用单位占11.1%。

2019年4月至2019年5月，对专家意见进行汇总，提出建议73条，采纳57条，不采纳16条。根据专家意见对标准草案稿进行进一步修订。

2021年4月15日，委托全国饲料工业标准化技术委员饲料检测方法标准化工作组组织了标准预审会议。

2021年5月—7月，根据预审专家意见，收集市场样品，补充相关数据。

3 标准编写原则

依据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》的规定起草和GB/T 20001.4—2015《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》的原则，结合资料查询、市场调研及实验数据对标准的范围、试验步骤等进行制订编写。

4 主要技术内容确定依据与过程

4.1 试剂和材料

4.2.1 试验用样品来源

猪配合饲料、鸡配合饲料、鱼配合饲料、猪复合预混合饲料来源于市场抽取和企业提供。

4.2.2 试验用标准物质

吡啶甲酸铬；来源：SIGMA；批号：010M1519 纯度：100%。

吡啶甲酸铬；来源：TCL；批号：Q85QG-JH，纯度：96%。

4.2.3 试验用试剂

乙腈：批号 030M0021，来源：上海凌峰化学试剂有限公司；乙腈（色谱纯）批号：332641000，来源：；三水合磷酸氢二钾批号：无水磷酸二氢钾 批号：20180808，来源：上海凌峰化学试剂有限公司。

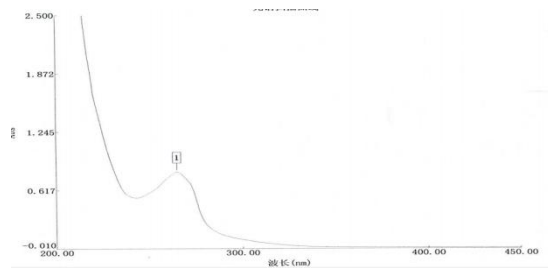
4.2 仪器和设备

Waters2695 高效液相色谱仪，Agilent1260 高效液相色谱仪；Shimadzu UV-2550 紫外分光光度计；Sigma 3-K18 冷冻离心机；Organomation 氮吹仪；METTLER 电子天平；KQ-500E 超声波清洗器。

4.3 高效液相色谱法条件的建立

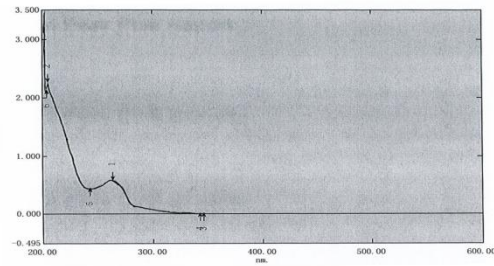
4.3.1 检测波长的筛选

取吡啶甲酸铬适量，用甲醇和 10%乙腈溶液配制吡啶甲酸铬为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液，用紫外-可见分光光度计在 200nm-400nm 处扫描，结果显示吡啶甲酸铬甲醇溶液和吡啶甲酸铬乙腈溶液在 264nm 处均有最大吸收。因此拟定检测波长为 264nm。与饲料添加剂 吡啶甲酸铬（NY/T 916-2004）标准的检测波长一致。见图 1-2。



● 序号	峰/谷	波长 (nm)	Abs	注释
1	峰	265.00	0.815	

图1 10%乙腈溶液紫外吸收光谱图



No.	P/V	Wavelength	Abs.	描述
1	⊕	264.20	0.596	
2	⊕	205.00	2.271	
3	⊕	345.50	.015	
4	⊕	342.70	.017	
5	⊕	243.60	443	
6	⊕	203.70	2.124	

图2 甲醇紫外吸收光谱图

4.3.2 流动相的筛选

通过文献资料查阅，在流动相选择上，比较了0.1M 磷酸二氢钠溶液（pH=8.5）/乙腈、甲醇/水、磷酸盐缓冲液（pH=7.0）/乙腈等体系的色谱保留性能，结果显示磷酸盐缓冲液/乙腈流动相中，试样中的吡啶甲酸铬分离效果最佳，专属性强，确定的流动相为：磷酸盐缓冲液[三水磷酸氢二钾5.699g，磷酸二氢钾3.4g，水至1L(pH=7.0)]：乙腈=93：7（v/v），流速为0.8 mL/min，鉴于饲料在该系统中杂质多、响应时间较长，采用梯度洗脱，有效缩短检测时间，提高分离效果，液相色谱图见图14-15。色谱条件：Agilent ZDRBAX SB C₁₈（4.6 mm×250 mm，5 μm ）柱，

柱温：30 ℃；进样量：20-50 μL ；流速：0.8 mL/min；检测波长：264 nm。流动相及梯度洗脱条件见表2。该流动相在猪配合饲料、禽配合饲料、水产配合饲料、浓缩料和预混料中的基质特异性干扰少，液相色谱图见图3-15。

表2 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A [乙腈] /%	流动相 B [磷酸盐缓冲液(pH=7.0)/乙腈] /%
0	7	93
15	7	93
16	30	70
21	30	70
22	7	93
30	7	93

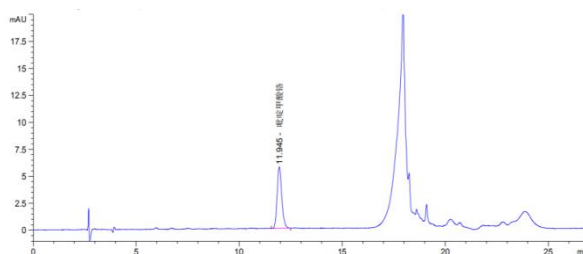


图3 吡啶甲酸铬标准图谱 (2.0 $\mu\text{g/mL}$)

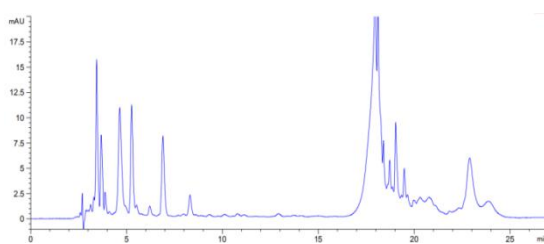


图4 鸡配合饲料 (空白样品)

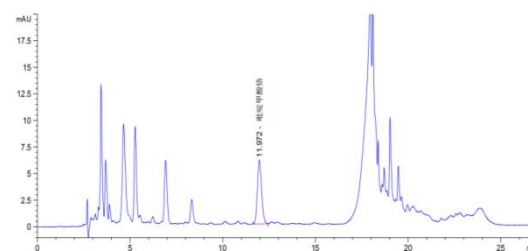


图5 鸡配合饲料加标样 (添加浓度 5 mg/kg)

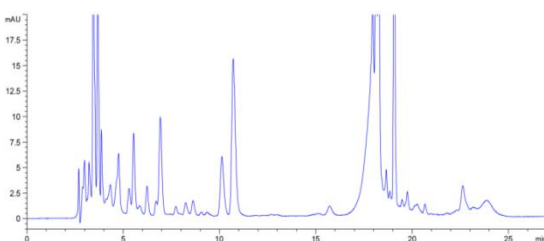


图6 猪配合饲料 (空白样品)

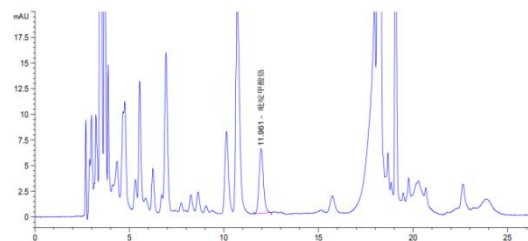


图7 猪配合饲料加标样 (添加浓度 5 mg/kg)

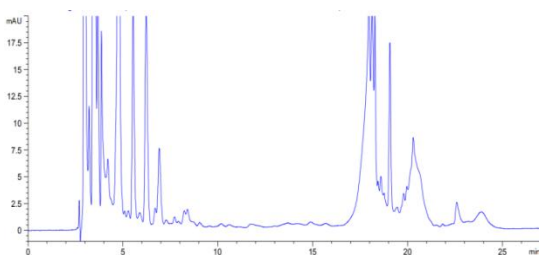


图8 水产配合饲料 (空白样品)

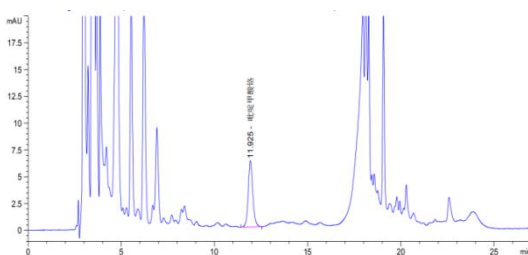


图9 水产配合饲料加标样 (添加浓度 5 mg/kg)

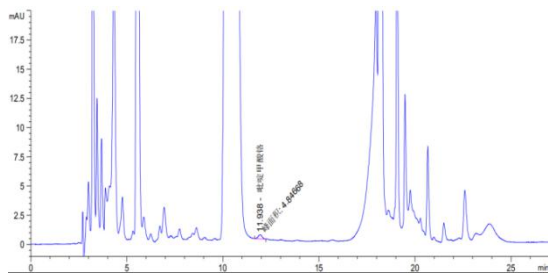


图 10 浓缩料（空白样品）

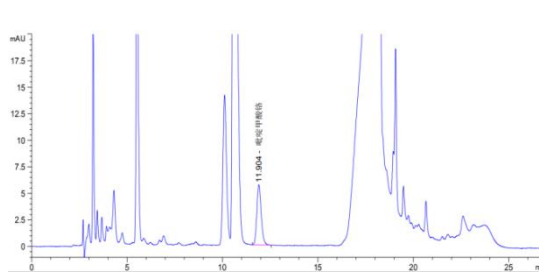


图 11 浓缩料（添加浓度 16 mg/kg）

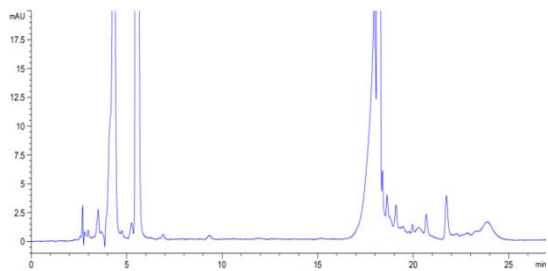


图 12 猪预混料（空白样品）

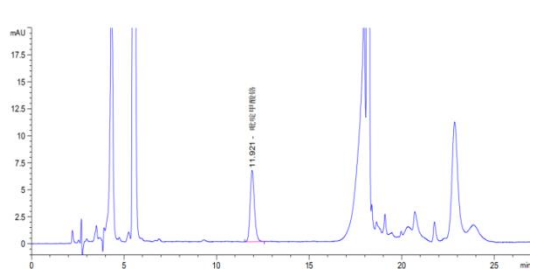


图 13 猪预混料（添加浓度 40 mg/kg）

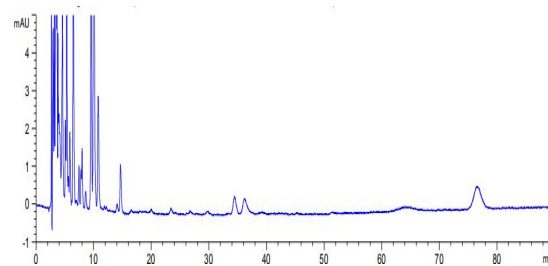


图 14 猪配合料等度（93+7）洗脱（90min）

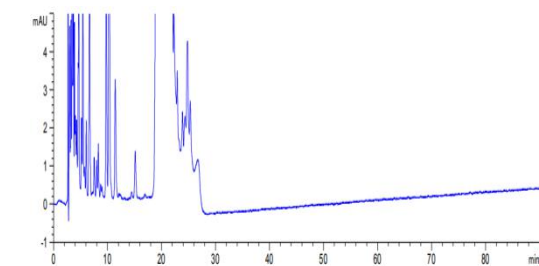


图 15 猪配合料梯度洗脱（90min）

4.4 试样提取、净化方法的建立

4.4.1 吡啶甲酸铬溶解性考察

参照《中国兽药典》2015 版中溶解度的试验方法，对吡啶甲酸铬在甲醇、乙腈等溶剂中的溶解性进行了考察。吡啶甲酸铬在各溶剂中的溶解性见表 3。

表 3 吡啶甲酸铬溶解性试验结果

溶剂	吡啶甲酸铬质量(g)	加溶剂量(mL)	常温超声 10min	常温超声 20min	常温超声 30min
甲醇	0.1055	90	部分溶解	溶解	溶解
50%甲醇溶液	0.1070	90	不溶解	部分溶解	溶解
乙腈	0.1009	100	部分溶解	部分溶解	溶解
乙腈	0.0247	100	部分溶解	溶解	/
10%乙腈	0.1019	100	部分溶解	部分溶解	部分溶解
10%乙腈	0.0251	100	部分溶解	部分溶解	溶解
水	0.0263	100	部分溶解	部分溶解	部分溶解
四氢呋喃	0.0249	100	不溶	不溶	不溶

三氯甲烷	0.0248	100	不溶	不溶	不溶
------	--------	-----	----	----	----

4.4.2 不同提取方法考察

根据溶解性试验结果，选择甲醇、乙腈、三氯甲烷等提取溶剂进行反复优化，最终提取方法为：称取配合饲料5 g、浓缩料3-5 g、预混料1 g（精确至0.1 mg），置于50 mL离心管中，加乙腈25.00 mL，振荡、超声或涡旋20 min，8000 r/min离心10 min，取上清液，置离心管中，残渣用乙腈重复提取1次。合并提取液，混匀，精密移取上清液适量，40-50℃氮吹干，加5 mL10%乙腈溶液，超声或涡旋使溶解，4℃8000 r/min离心5 min，取上清液过0.45 μm有机相滤膜，上机测定，结果见表4。

表 4 不同提取方法回收率考察结果

试样类别	试样重, g	添加量, mg/kg	超声, %	振荡, %	涡旋, %
猪浓缩料	5.0	1.0	/	/	101
	5.0	4.99	93.7	83.3	/
	3.0	16.64	98.8	90.5	77.6
猪配合料	5.0	1.60	129	89.4	89.7
	5.0	4.99	89.8	98.1	94.4
鸡配合料	5.0	1.0	/	/	80.2
	5.0	1.59	82.5	82.6	91.3
	5.0	4.99	84.8	85.4	/
水产预混料	1.0	5.0	/	/	86.3
	1.0	39.81	102.1	98.0	/
	1.0	50	/	/	90.9
	1.0	124.15	94.9	97.0	/

上述提取结果显示，振荡、超声和涡旋分别对试样提取，回收率在83.3%—101%间，3种提取方法回收率满足80%—110%要求，因此在前处理方法中选择振荡、超声或涡旋进行提取，根据设备选择不同的提取方式。

4.4.3 不同提取时间考察

取配合饲料和预混合饲料，添加不同浓度的吡啶甲酸铬，涡旋提取2次，时间10 min、20 min、30 min，分别测定考察，由表5-7可见，1-50 mg/kg添加，涡旋10 min时，预混料回收率小于60%，涡旋20 min与30 min时，回收率在85.4%-94.4%，RSD在2.9-4.3%，回收率、精密度符合要求，因此提取方法中，提取时间为20 min。

表 5 涡旋10 min吡啶甲酸铬加标回收率(%)

饲料类型	添加浓度 (mg/kg)	1	2	3	平均回收率	RSD, %
猪配合饲料	1.6	89.1	82.2	92.1	87.8	5.8

	5	83.1	84.3	78.2	81.9	3.9
预混料	5	52.0	61.5	47.7	53.7	13.1
	50	65.1	53.5	60.0	59.5	9.8

表 6 涡旋20 min吡啶甲酸铬加标回收率

饲料类型	添加浓度 (mg/kg)	1	2	3	平均回收 率, %	RSD, %
猪配合饲料	1.6	87.6	82.2	91.3	89.7	2.1
	5	94.8	98.2	90.1	94.4	4.3
预混料	5	88.0	88.2	82.6	86.3	3.7
	50	91.1	92.2	89.4	90.9	1.6

表 7 涡旋30 min吡啶甲酸铬加标回收率

饲料类型	添加浓度 (mg/kg)	1	2	3	平均回收 率, %	RSD, %
猪配合饲料	1.6	86.3	85.7	84.3	85.4	1.2
	5	89.6	84.6	89.4	87.9	3.2
预混料	5	94.5	88.4	93.0	92.0	3.5
	50	87.2	85.8	86.1	86.3	0.9

4.4.4 不同提取次数考察

称取试样，3.2项下的方法，用乙腈分次提取，结果显示，吡啶甲酸铬在1-200mg/kg添加时，提取2次回收率符合要求，因此确定提取2次。见表8-10。

表 8 提取1次（50 mL乙腈涡旋30 min）吡啶甲酸铬加标回收率

样品名称	样重, g	添加量, mg/kg	残留量, mg/kg	回收率, %
水产配合料	4.9628	1.51	0.98	64.9
猪配合料	5.0378	1.49	1.18	79.2
鸡配合料	5.0220	1.50	0.90	59.9
猪浓缩料	3.0037	4.17	4.58	110
预混料	1.0276	12.18	5.76	47.3

表 9 提取2次（涡旋20 min）吡啶甲酸铬加标回收率

样品名称	样重, g	添加量, mg/kg	残留量, mg/kg	回收率 %
水产配合料	5.0073	0.97	0.98	101
猪配合料	5.0026	1.61	1.45	90.1
鸡配合料	5.0089	1.61	1.47	91.3
猪浓缩料	4.9968	0.97	0.98	101
预混料	1.0143	9.95	9.15	82.9
猪浓缩料	3.0018	40.47	35.96	88.9
猪复合预混料	1.0205	239.13	229.01	95.8

表 10 提取3次（涡旋20 min）吡啶甲酸铬加标回收率

试样号	称重, g	添加量, mg/kg	测定值, mg/kg	回收率, %	RSD, %
猪预混料	1.0328	97.71	96.11	98.4	0.8
	1.0028	100.63	97.75	97.1	
	1.0084	100.07	98.66	98.6	
	1.0212	98.82	95.95	97.1	
	1.033	97.69	94.64	96.9	
	1.0026	50.43	45.97	91.2	2.9
	1.0116	49.98	44.85	89.7	
	1.0207	49.53	43.43	87.7	
	1.0015	50.48	47.25	93.6	
	1.0086	50.13	43.84	87.4	
	1.0134	59.87	48.62	81.2	3.1
	1.0096	60.10	51.63	85.9	
	1.0100	60.07	47.93	79.8	
	1.015	59.78	47.66	79.7	
	1.0123	59.93	48.75	81.3	
	1.0109	80.02	62.32	77.9	1.3
	1.0154	79.67	63.19	79.3	
	1.0109	80.02	62.36	77.9	
	1.0089	80.18	61.78	77.0	
	1.0125	79.90	61.33	76.8	
1.0172	238.87	222.13	93.0	2.3	
1.0151	239.36	209.19	87.4		
1.0066	241.38	220.24	91.2		
1.0038	242.06	219.26	90.6		
1.0199	238.24	218.19	91.6		
猪浓缩料	2.9933	40.59	34.54	85.1	2.3
	3.0061	40.41	32.81	81.2	
	3.009	40.37	33.50	83.0	
	3.0001	40.49	32.64	80.6	
	3.0077	40.39	33.90	83.9	

4.4.5 浓缩—氮吹水浴温度的考察

精密吸取吡啶甲酸铬标准溶液（24.072 $\mu\text{g/mL}$ ）5.00 mL，于100 mL容量瓶中，分别置于40 $^{\circ}\text{C}$ ，50 $^{\circ}\text{C}$ ，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热3h，冷却至室温，用水定容（1.204 $\mu\text{g/mL}$ ）。结果显示40 $^{\circ}\text{C}$ ，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热3h后未降解，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热3h，主峰面积下降25.2%，因此氮吹水浴温度确定为50 $^{\circ}\text{C}$ 。见表11。

表 11 吡啶甲酸铬标准溶液在不同水浴温度中稳定性考察

温度	常温（20 $^{\circ}\text{C}$ ）	40 $^{\circ}\text{C}$	50 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$
峰面积 mAU*S	64.392	65.108	65.367	48.203

4.5 复合预混料拟定的提取、净化方法

称取猪猪复合预混料 1 g, 置于 50 mL 离心管中, 加乙腈 25.00 mL, 涡旋 20 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 置离心管中, 残渣用乙腈 25.00 mL 重复提取 1 次。合并 2 次提取液, 混匀, 精密移取上清液适量, 50℃氮吹干, 加 5.00 mL 10% 乙腈溶液, 超声、涡旋使溶解, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 有机相滤膜, 上机测定。

4.6 配合饲料、浓缩料和精料补充料样品提取、净化方法的建立

鉴于配合饲料、浓缩料和精料补充料中基质干扰较多, 根据标准征求意见专家的建议, 样品提取后增加净化流程。

4.6.1 不同固相萃取柱的考察

称取猪配合料, 水产配合料和浓缩料 5 g, 添加浓度为 0.5mg/kg, 加乙腈 25 mL, 提取 2 次, 合并提取液, 混匀。精密移取上清液适量, 50℃氮吹近干, 加 5.00 mL 10% 乙腈溶液, 超声、涡旋使溶解, 用 10% 乙腈溶液饱和的正己烷 3mL 萃取振摇 10s, 8000 r/min 离心 5 min。取下清液 1.0 mL, 加 3.0 mL 水, 混合, 此为备用液。

备用液过活化后的固相萃取柱 (C₁₈ 净化小柱 500 mg / 6 mL、HLB 净化小柱 60 mg / 3 mL、MAX 净化小柱 500 mg / 6 mL 和 MCX 净化小柱 150 mg / 6 mL), 用 5% 甲醇 6mL、10% 甲醇 6mL 淋洗, 5mL 甲醇洗脱, 50℃氮吹干, 2.0 mL 10% 乙腈复溶, 上机。

试验结果显示: MAX 500 mg / 6mL 固相萃取柱在各类配合饲料中的回收率为 65.4~81.1% 间; 其他类型固相萃取柱的回收率在 6.8~41.8% 之间。因此选用规格为 500 mg / 6 mL 的 MAX 作为净化小柱。

4.6.2 固相萃取淋洗液的考察(WATERS MAX 500 mg / 6 mL)

用甲醇、水各 5mL 分别活化柱子, 淋洗液及洗脱法选用以下方法:

① 用 5% 甲醇 3 mL、10% 甲醇 3 mL 淋洗, 6 mL 甲醇洗脱, 50℃氮吹干, 2.0 mL 10% 乙腈复溶。流出液上机进样, 测得每一步淋洗过程都含有吡啶甲酸铬, 回收率 80.7%。

② 水 3 mL, 5% 甲醇 3 mL 淋洗, 6 mL 甲醇洗脱, 50℃氮吹干, 2.0 mL 10% 乙腈复溶。水、5% 甲醇淋洗流出液上机, 测得淋洗流出液均含有吡啶甲酸铬, 回收率 93.2%。

③ 乙酸乙酯 5 mL 淋洗, 6 mL 甲醇洗脱, 50℃氮吹干, 2.0 mL 10% 乙腈复溶。乙酸乙酯淋洗流出液 (氮吹干 10% 乙腈复溶) 上机, 未检测出吡啶甲酸铬, 回收率 94.0%。

④ 乙酸乙酯 5 mL 淋洗, 用 8 mL 乙腈洗脱, 50℃氮吹干, 2.0 mL 10% 乙腈复溶。乙酸乙酯淋洗流出液 (氮吹干用 10% 乙腈复溶) 上机, 结果回收率 98.0%。从图谱可知, 洗脱液中杂质相对较上述干净。

⑤ 2% 氨水溶液 5 mL 淋洗, 2% 甲酸甲醇 5 mL 洗脱, 50℃氮吹干, 2.0 mL 10% 乙腈复溶。

2%氨水溶液流出液未检测出吡啶甲酸铬，回收率 92.2%，但目标峰边上有杂峰干扰。

⑥ 备用液直接上活化柱，8 mL 乙腈洗脱，50℃氮吹干，2.0 mL 10%乙腈复溶。回收率 98.3%。

根据上述筛选结果，拟定④和⑥作为淋洗洗脱方法。

4.6.3 净化柱适用性考察

按方法④和⑥对 waters MAX 500 mg/6mL 以及 welch MAX 500 mg /6mL 两种净化柱进行考察，结果显示，淋洗洗脱法④在 welch MAX 500 mg/6mL 中的乙酸乙酯淋洗流出液检测出吡啶甲酸铬，回收率 75%。方法⑥在 waters MAX 500 mg/ 6mL 以及 welch MAX 500 mg/6mL 中的回收率为 98.6%、97.0%，淋洗流出液中未检测出吡啶甲酸铬，见图 16-18。因此淋洗洗脱方法确定为⑥。

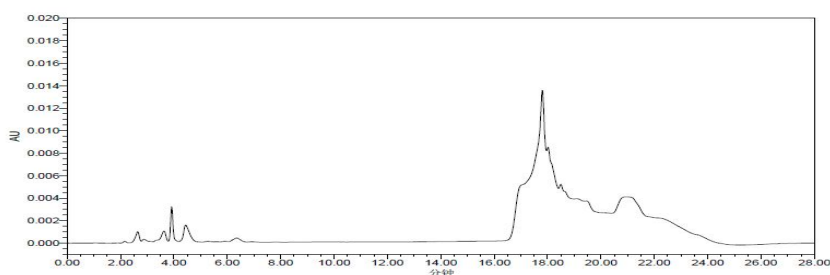


图 16 试样提取液过净化柱流出液上机色谱图[精料补充料（添加量为 16mg/kg）]

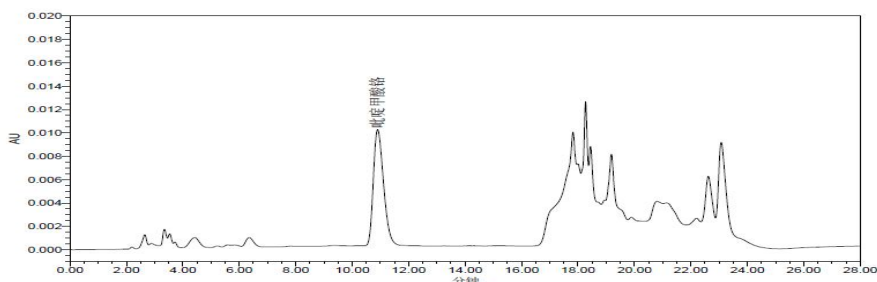


图 17 8mL 乙腈洗脱液（第 1 次）上机色谱图[精料补充料（添加量为 16mg/kg）]

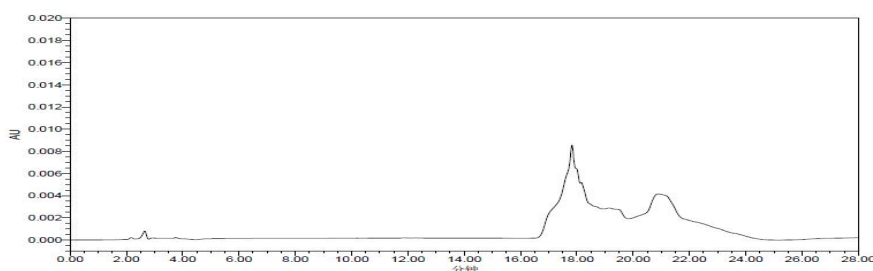


图 18 8mL 乙腈洗脱液（第 2 次）上机色谱图[精料补充料（添加量为 16mg/kg）]

4.6.4 配合料、浓缩料、精料补充料拟定的试样提取、净化方法

提取：称取配合料、浓缩料、精料补充料 3-5 g，加乙腈 25 mL，涡旋提取 20 min，8000 r/min 离心 5 min，取上清液。残渣重复提取一次，合并提取液，混匀。精密移取上清液适量，50℃氮

吹近干，加5.00 mL 10%乙腈溶液，超声、涡旋使溶解，用10%乙腈溶液饱和的正己烷3mL萃取振摇10s，8000 r/min离心5 min。取下清液1.0 mL，加3.0 mL水，混合，为备用液。

净化：选用 MAX 净化小柱，用甲醇、水依次活化，取备用液过柱，用 8 mL 乙腈洗脱，挤干，收集洗脱液，于 50℃水浴氮吹近干，加 2.00 mL 10%乙腈溶液，超声、涡旋使溶解。经滤膜过滤后，上机。

4.7 方法检出限和定量限考察

4.7.1 仪器灵敏度

按拟定色谱条件，在Waters2695和Agilent 1260高效液相色谱仪（紫外检测器）进行了标准溶液灵敏度考察，结果显示吡啶甲酸铬标准溶液为0.05 $\mu\text{g/mL}$ 时（相当于0.1mg/kg），信噪比为26-54；吡啶甲酸铬标准溶液为0.025 $\mu\text{g/mL}$ 时（相当于0.05mg/kg），信噪比为13-33；吡啶甲酸铬标准溶液为0.01 $\mu\text{g/mL}$ 时（相当于0.02mg/kg），信噪比为5-9；见图19-24。

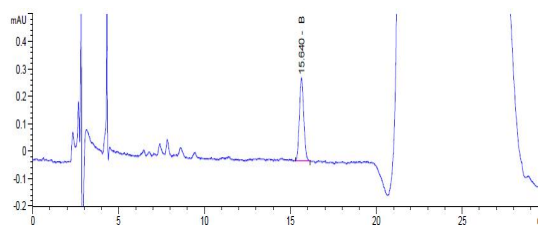


图 19 Agilret 1260 (0.05 $\mu\text{g/mL}$) S/N=26.1

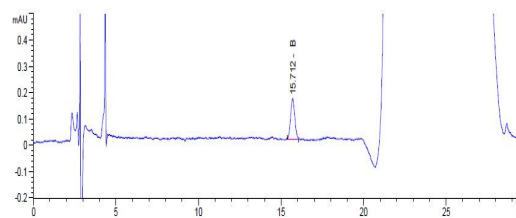


图 20 Agilret 1260 (0.025 $\mu\text{g/mL}$) S/N=13.6

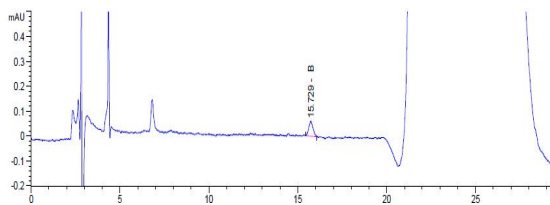


图 21 Agilret 1260 (0.01 $\mu\text{g/mL}$, S/N=5.1)

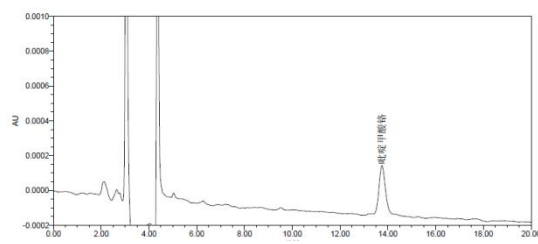


图 22 Waters 2695 (0.05 $\mu\text{g/mL}$, S/N=53.7)

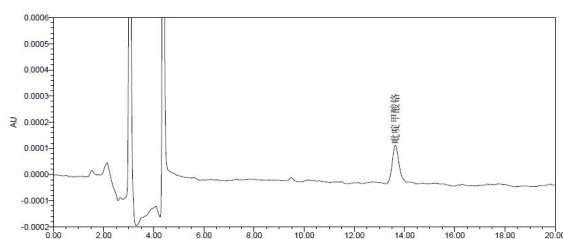


图 23 Waters 2695 (0.025 $\mu\text{g/mL}$, S/N=33.7)

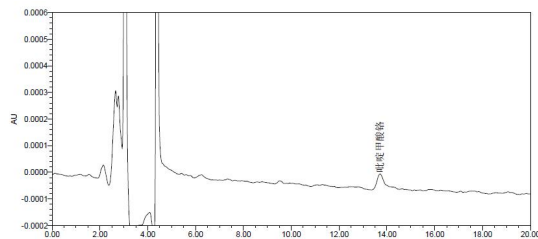


图 24 Waters 2695 (0.010 $\mu\text{g/mL}$, S/N=9.4)

4.7.2 方法检出限考察

按拟定色谱条件，采用灵敏度较低的 Agilent 1260 仪器进行检出限考察。在配合饲料、浓缩料、精料补充料和预混料中进行不同浓度加标试验，结果在配合饲料、浓缩料和精料补充料中添加浓度为 0.05 mg/kg 时，信噪比 (S/N) 为 3.1-6.3，平均 4.5；在复合预混料中添加浓度为 0.1 mg/kg 时，信噪比 (S/N) 为 3.9-4.3，平均 4.1。因此拟定配合饲料、浓缩料和精料补充料的检出限为 0.05 mg/kg，添加剂预混料的检出限为 0.1 mg/kg。结果见表 12 和图 25-28。

表 12 Agilent 1260 高效液相色谱仪检出限考察测定结果

试样名称	样重, g	添加量, mg/kg	S/N			平均 S/N
			1	2	3	
猪复合预混料	1.00	0.1	3.9	4.3	4.0	4.1
	1.00	0.2	5.8	4.8	6.9	5.8
猪配合料	5.00	0.05	4.2	3.9	3.6	3.9
猪浓缩料	5.00	0.05	6.3	4.7	5.0	5.3
精料补充料	5.00	0.05	3.1	4.5	4.6	4.2

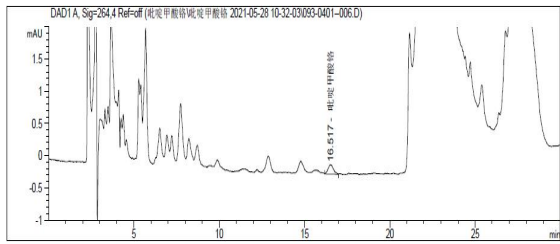


图 25 猪复合预混料 (添加量 0.1 mg/kg, S/N=4.3)

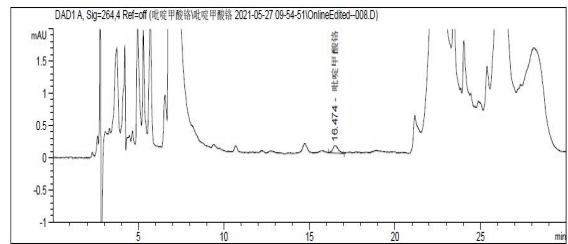


图 26 精料补充料 (添加量 0.05 mg/kg, S/N=4.5)

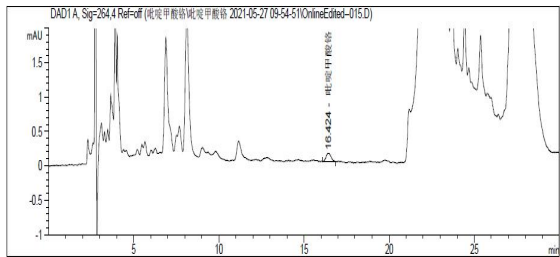


图 27 猪配合料 (添加量 0.05 mg/kg, S/N=3.9)

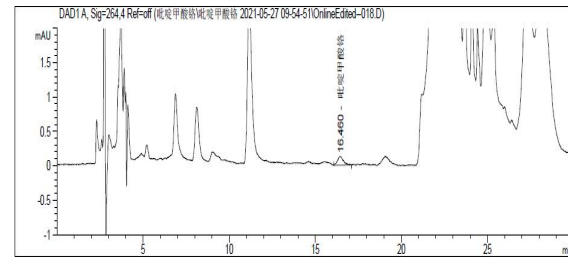


图 28 猪浓缩料 (0.05 mg/kg, S/N=4.7)

4.7.3 方法定量限考察

按拟定色谱条件, 在配合饲料、浓缩料、精料补充料和预混料中进行不同浓度加标回收率试验, 结果在配合饲料、浓缩料和精料补充料中添加浓度为0.1 mg/kg 时, Agilent仪器信噪比 (S/N) 为4-18, 平均12.4; Waters仪器信噪比 (S/N) 为5-26, 平均12.3。复合预混料中添加吡啶甲酸铬为0.5 mg/kg时, Agilent仪器信噪比 (S/N) 为7-11, 平均9.1; Waters仪器信噪比 (S/N) 为12-14, 平均12, 结果见表13-15和图29-33。因此标准方法中拟定配合饲料、浓缩料和精料补充料的定量限为0.1 mg/kg, 预混料为0.5 mg/kg, 拟定的定量限与饲料企业的添加量、农业部公告第2625号中规定的配合料添加推荐量 (以吡啶甲酸铬计) 为0~1.6 mg/kg仍有一定的空间。

表13 Agilent 1260高效液相色谱仪定量限考察结果

试样名称	试样号	样重, g	添加量, mg/kg	测定值, mg/kg	回收率, %	S/N
猪配合料	KB	5.00	/	/	/	/
	1	5.00	0.10	0.090	90.0	4.0
	2	5.00	0.10	0.087	87.0	5.5
	3	5.00	0.10	0.094	94.0	7.3

水产配合饲料	KB	5.00	/	/		
	1	5.00	0.10	0.099	99.0	16.4
	2	5.00	0.10	0.100	100	17.7
	3	5.00	0.10	0.098	98.0	15.7
猪浓缩料	KB	5.00	/	/	/	/
	1	5.00	0.10	0.063	63.0	9.7
	2	5.00	0.10	0.076	76.0	16.1
	3	5.00	0.10	0.079	79.0	17.1
精料补充料	KB	5.00	/			
	1	5.00	0.10	0.099	99.0	16.2
	2	5.00	0.10	0.096	96.0	17.1
	3	5.00	0.10	0.099	99.0	15.8
猪复合预混料	KB	1.00	/	/	/	
	1	1.00	0.5	0.370	74.0	9.2
	2	1.00	0.5	0.355	71.0	7.3
	3	1.00	0.5	0.379	75.8	10.9

表14 Waters 2695高效液相色谱仪测定结果表

试样名称	试样号	样重,g	添加量,mg/kg	测定值,mg/kg	回收率,%	S/N
猪配合料	KB	5.00	/	/	/	/
	1	5.00	0.10	0.091	91.0	11.0
	2	5.00	0.10	0.085	85.0	16.3
	3	5.00	0.10	0.093	93.0	26.4
水产配合饲料	KB	5.00	/	/	/	/
	1	5.00	0.10	0.097	97.0	14.5
	2	5.00	0.10	0.099	99.0	13.3
	3	5.00	0.10	0.094	94.0	12.9
猪浓缩料	KB	5.00	/	/	/	/
	1	5.00	0.10	0.064	64.0	4.8
	2	5.00	0.10	0.064	64.0	5.8
	3	5.00	0.10	0.069	69.0	7.2
精料补充料	KB	5.00	/	/	/	/
	1	5.00	0.10	0.099	99.0	6.8
	2	5.00	0.10	0.095	95.0	13.5
	3	5.00	0.10	0.102	102	14.8
猪复合预混料	KB	1.00	/	/	/	
	1	1.00	0.5	0.379	75.8	11.7
	2	1.00	0.5	0.405	81.0	11.4

	3	1.00	0.5	0.392	78.4	12.8
--	---	------	-----	-------	------	------

15 不同饲料中吡啶甲酸铬定量限回收率试验结果 (批间, n=3)

饲料类型	添加浓度 (mg/kg)	平均回收率/批内 RSD%			批间 RSD%
		第一次	第二次	第三次	
猪配合料	0.1	90.1/3.9	89.4/4.9	86.5/10.4	2.2
水产配合料	0.1	98.5/0.9	96.5/2.4	74.6/4.2	14.8
猪浓缩料	0.1	72.7/11.4	65.6/3.8	84.6/4.1	12.9
精料补充料	0.1	97.5/1.7	98.1/3.6	100.1/2.1	1.4
复合预混料	0.5	73.3/3.3	78.2/3.3	79.9/2.7	4.4

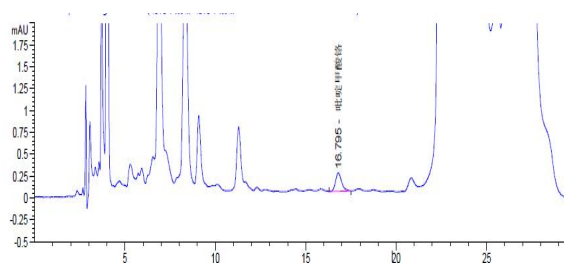


图 29 猪配合饲料 (添加量 0.1mg/kg S/N=7.3)

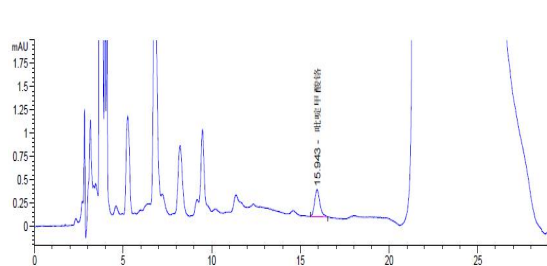


图 30 水产配合饲料 (添加量 0.1mg/kg S/N=16.4)

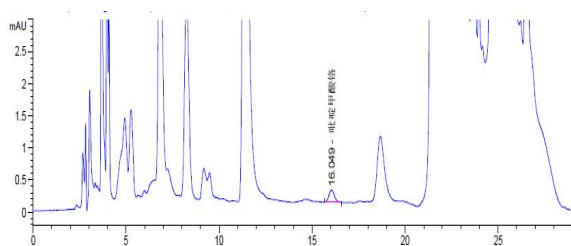


图 31 浓缩料 (添加量 0.1mg/kg S/N=16.1)

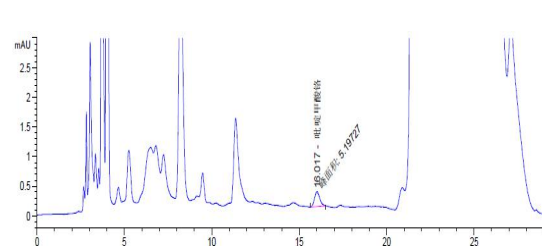


图 32 精料补充料 (添加量 0.1mg/kg S/N=16.2)

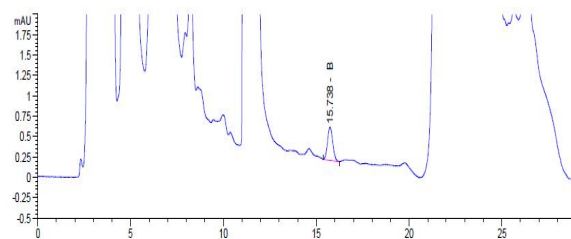


图 33 复合预混料 (添加量 0.1mg/kg S/N=9.2)

4.8 标准曲线考察

标准贮备液配制: 精密称取吡啶甲酸铬 (TCL) 标准品约 25 mg, 用乙腈溶解并定容至 100 mL (250 $\mu\text{g/mL}$)。

标准中间液配制: 精密吸取标准贮备液 10.00 mL, 用水稀释定容至 100 mL。

标准系列配制: 准确量取标准储备溶液和标准中间溶液适量, 用水稀释定容配成系列标准溶液, 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 $\mu\text{g/mL}$,

以峰面积为纵坐标 (Y)，浓度为横坐标 (X)，得出回归方程 $Y=109.34X-0.7015$ ，相关系数 $R^2=1$ ，显示吡啶甲酸铬在 0.05-5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系。见图 34-35。

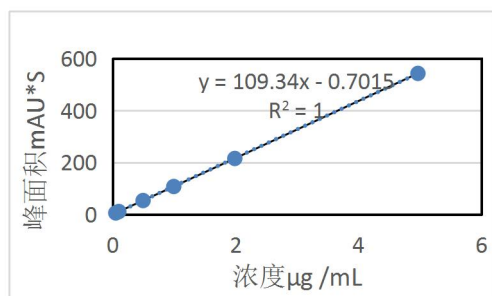


图 34 标准曲线图

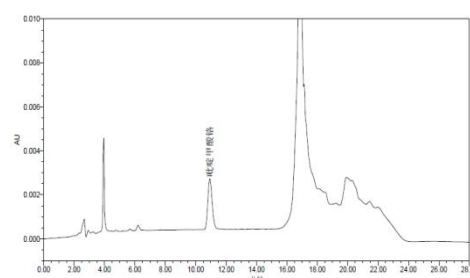


图 35 吡啶甲酸铬标准溶液 0.5 $\mu\text{g/mL}$

4.9 方法准确度和精密度考察

4.9.1 配合饲料、浓缩料和精料补充料方法准确度和精密度考察

配合饲料、浓缩料和精料补充料前处理方法：称取各类饲料约 3-5 g，置 50 mL 离心管中，加乙腈 25.00 mL，超声 20 min，8000 r/min 离心 10 min，取上清液，置离心管中。残渣用乙腈 25.00 mL 重复提取 1 次，合并 2 次提取液，混匀。精密移取提取液适量，于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹至近干，加 10%乙腈溶液 5.00 mL，超声、涡旋使溶解，加用 10%乙腈溶液饱和的正己烷 3 mL，涡旋 10 s，8000 r/min 离心 3min，取下层清液 1.00 mL，加 3.00 mL 水，混匀为备用液。依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水预淋洗 MAX 固相萃取柱 (5mg/6mL)，取上述备用液全部过柱，用乙腈 8 mL 洗脱，收集洗脱液，于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹至近干，加 2.00 mL 10%乙腈溶液，涡旋使溶解，用 0.45 μm 滤膜过滤。

色谱条件： C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 柱，柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量：50 μL ；流速：0.8 mL/min；检测波长：264 nm。流动相及梯度洗脱条件下表 16。

称取试样，按上述方法添加 3 个浓度吡啶甲酸铬，批内、批间考察，结果显示，配合饲料、浓缩饲料和精料补充料在 0.2~16 mg/kg 添加，批内批间平均回收率为 70.0~105%，批内批间 RSD 为 0.8%—10.8%，准确度和精密度均符合要求。见表 17，典型图谱见图 36-图 41。

表 16 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A [乙腈] /%	流动相 B [磷酸盐缓冲液(pH=7.0)/乙腈] /%
0	7	93
15	7	93
16	30	70
21	30	70
22	7	93
30	7	93

表 17 不同饲料中吡啶甲酸铬 3 个浓度添加回收率试验结果 (批内)

饲料	添加浓度	1	2	3	4	5	平均回收	RSD, %

类型	(mg/kg)						率, %	
猪配合饲料	0.2	104.3	109.0	101.6	107.0	103.7	105	2.8
	0.5	89.6	85.4	89.2	89.5	90.0	88.7	2.1
	1.6	93.3	91.8	92.8	92.2	91.6	92.3	0.8
水产配合饲料	0.2	99.3	99.5	98.0	97.9	97.0	98.3	1.1
	0.5	100.7	100.3	97.5	99.6	99.4	99.5	1.2
	1.6	93.3	91.8	92.8	92.2	91.6	92.3	0.8
猪浓缩饲料	0.2	74.3	71.4	78.8	74.5	74.0	74.6	3.6
	5	75.0	71.2	77.3	74.5	75.9	74.8	3.0
	16	91.8	87.9	93.8	90.6	92.8	91.4	2.5
精料补充料	0.2	91.7	88.9	92.0	88.7	90.6	90.4	1.7
	5	92.5	90.6	89.4	91.5	90.7	90.9	1.3
	16	97.0	90.0	92.0	93.5	92.2	92.9	2.8

表 18 不同饲料中吡啶甲酸铬 3 个浓度添加回收率试验结果 (批间)

饲料	添加浓度, mg/kg	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	平均回收率, %	批间 RSD, %
猪配合饲料	0.2	81.9	95.1	92.3	82.7	78.4	86.1	8.4
	0.5	80.3	87.9	90.0	80.7	80.3	83.8	5.6
	1.6	94.0	91.6	92.4	87.6	83.7	89.9	4.6
水产配合饲料	0.2	81.7	95.4	94.5	88.7	88.2	89.7	6.2
	0.5	87.3	91.0	97.0	91.9	91.1	91.7	3.8
	1.6	88.7	97.6	94.3	86.5	91.6	91.7	4.8
猪浓缩饲料	0.2	77.5	71.4	73.6	65.4	62.0	70.0	8.9
	5	90.5	75.9	91.1	73.2	75.6	81.3	10.8
	16	92.6	87.9	88.7	82.0	83.7	87.0	4.8
精料补充料	0.2	84.0	83.0	89.9	89.4	81.3	85.5	4.6
	5	97.9	90.7	94.7	85.4	87.9	91.3	5.5
	16	96.5	92.2	94.4	92.5	94.9	94.1	1.9

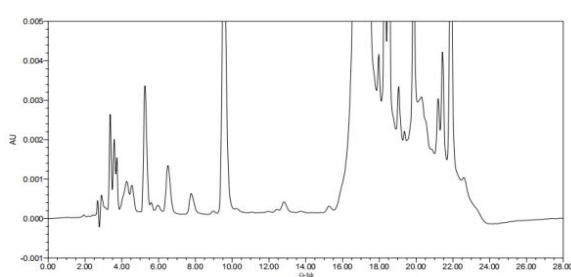


图 36 浓缩料 (空白)

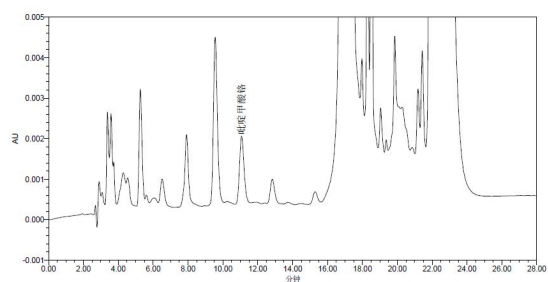


图 37 浓缩料 (添加量为 5 mg/kg)

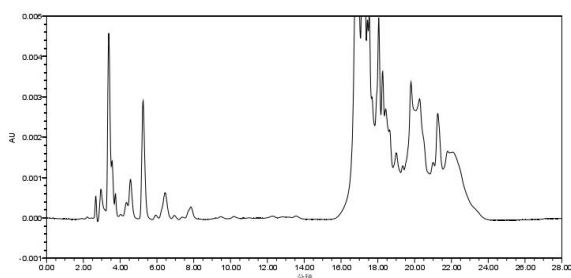


图 38 配合料 (空白)

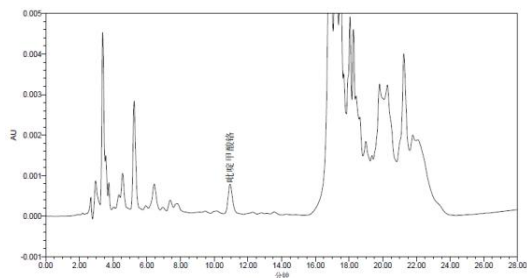


图 39 配合料 (添加量为 0.5 mg/kg)

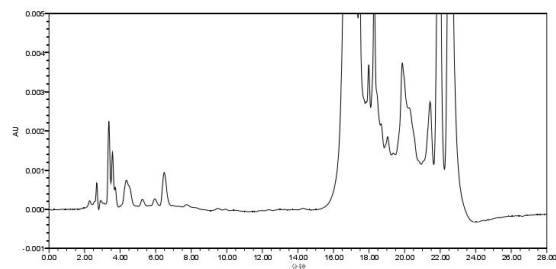


图 40 精料补充料 (空白)

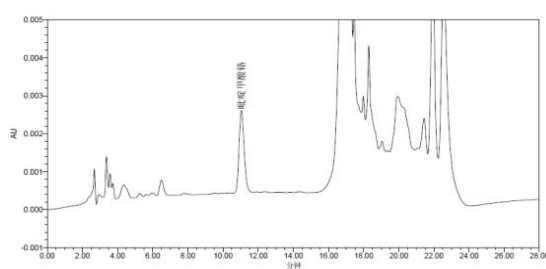


图 41 精料补充料 (添加量为 5 mg/kg)

4.9.2 复合预混料方法准确度和精密度考察

称取猪复合预混料1 g，置于50 mL离心管中，加乙腈25.00 mL，涡旋20 min，8000 r/min离心10 min，取上清液，置离心管中，残渣用乙腈25.00 mL重复提取1次。合并2次提取液，混匀，精密移取上清液适量，50℃氮吹干，加5.00 mL10 %乙腈溶液，超声、涡旋使溶解，4℃8000 r/min离心5 min，取上清液过0.45 μm有机相滤膜，上机测定。结果显示，复合预混料中1-200 mg/kg添加的平均回收率为73.9%-105%，批内、批间RSD为0.74%-5.8%，准确度和精密度符合要求，见表19-20和图42-43。

表 19 复合预混料中吡啶甲酸铬加标回收率测定结果 (批内)

添加浓度 (mg/kg)	1	2	3	4	5	平均回收率, %	RSD, %
1.0	104	103	105	106	104	105	1.2
2.0	107	94.1	97.6	99.1	/	96.9	5.8
10	79.5	81.6	82.9	78.0	78.3	80.1	2.7
40	85.8	84.7	81.7	82.7	82.7	83.5	2.0
50	91.1	92.2	89.4	88.7	93.1	90.9	2.0
60	83.0	82.7	79.4	85.0	79.4	81.9	3.0
80	77.6	78.1	77.9	73.9	78.6	77.2	2.4
100	74.82	74.55	71.95	74.11	/	73.9	1.8
240	95.8	96.0	94.8	94.0	94.9	95.1	0.74

表 20 复合预混料中吡啶甲酸铬加标回收率 (%) 测定结果 (批间)

添加浓度, mg/kg	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	平均回收率	RSD, %
1.0	85.0	87.2	84.6	83.2	83.2	84.6	2.0
5	77.6	85.5	89.5	84.1	81.5	83.6	5.3
40	80.8	83.7	82.6	83.2	82.8	82.6	1.3

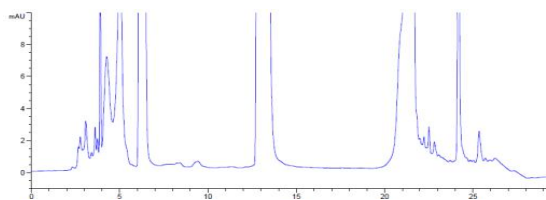


图 42 预混料（空白）

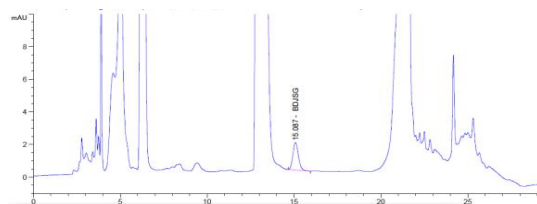


图 43 预混料（添加浓度 5mg/kg）

4.10 测试溶液放置稳定性考察

取吡啶甲酸铬标准溶液（2.440 $\mu\text{g/mL}$ ）和试样溶液，按拟定色谱条件，上机重复进样测定，结果见表21-22。

表 21 吡啶甲酸铬标准上机液重复进样24针的分面积

时间	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h
峰面积mAU*S	95.520	95.064	95.675	96.101	94.894	96.139	95.037	95.318
时间	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h
峰面积mAU*S	94.988	95.759	94.720	95.820	95.013	95.431	95.160	94.320
时间	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h
峰面积mAU*S	95.252	95.608	95.406	96.300	95.893	95.848	95.231	95.003
RSD	0.5%							

表 22 水产饲料上机溶液（添加浓度为4 mg/kg）放置稳定性试验结果

时间	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h
峰面积mAU*S	81.389	80.916	80.396	79.746	79.872	79.598	79.736	79.234
时间	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h
峰面积mAU*S	79.664	78.707	79.083	78.715	78.254	78.101	78.437	78.818
时间	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h	23 h
峰面积mAU*S	78.285	77.667	78.560	78.403	77.391	78.145	78.512	78.495
RSD	1.2%							

上述结果显示，24 h内吡啶甲酸铬标准上机液RSD为0.5%，试样溶液在24 h内上机液峰面积的RSD为1.2%，表明吡啶甲酸铬标准溶液和供试品溶液在24 h内稳定性良好

4.11 吡啶甲酸铬标准储备液存放有效期考察（置 4℃保存）

取吡啶甲酸铬标准储备液，在4℃冰箱存放不同时间，分别测定，结果显示见表23，放置7月内，RSD为0.71%。吡啶甲酸铬标准储备液4℃存放暂定6个月。

表 23 吡啶甲酸铬标准储备液存放有效期考察结果

考察时间	0月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月
标准储备液浓度 $\mu\text{g/mL}$	244.0	244.0	246.2	241.7	242.9	242.6	242.8	240.0
RSD, %	0.52							
	0.75							

	0.69		
	0.64		
	0.60		
	0.71		

4.12 方法耐用性考察

不同色谱柱和小幅变化流动相比例，考察基质干扰情况，结果显示配合饲料、浓缩料和预混料中基质基本未干扰主成分。见图 44-51。

① Agilent ZDRBAX SB C₁₈柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)

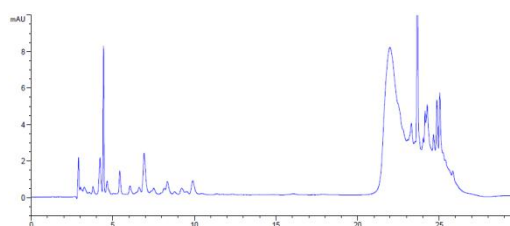


图 44 水产配合饲料 (空白)

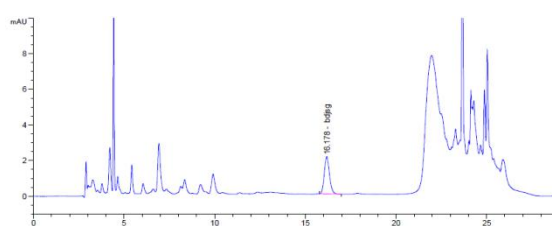


图 45 水产配合饲料 (添加量 1.6mg/kg)

② Agilent Eclipse XDB C₁₈柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)

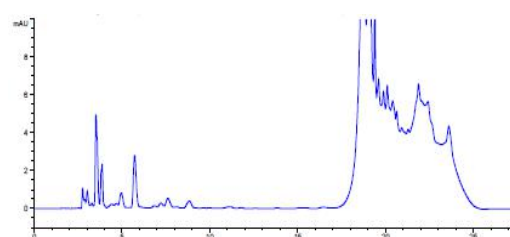


图46 水产配合饲料 (空白)

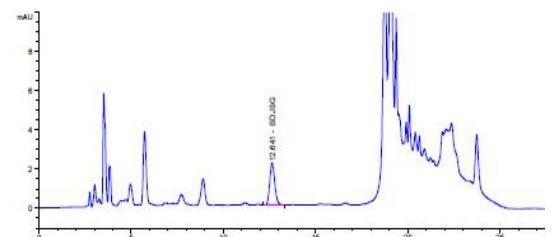


图47 水产配合饲料 (添加量1.6mg/kg)

③ Waters symmetry C₁₈柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)

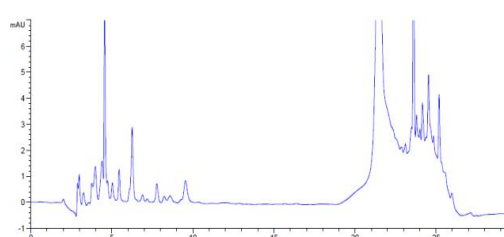


图 48 水产配合饲料 (空白)

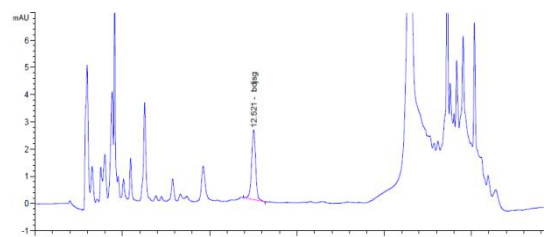


图 49 水产配合饲料 (添加量 1.6mg/kg)

④ Waters Bridge C₁₈柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)

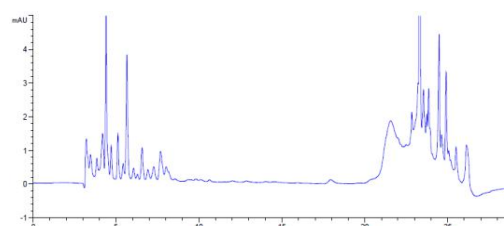


图 50 水产配合饲料 (空白)

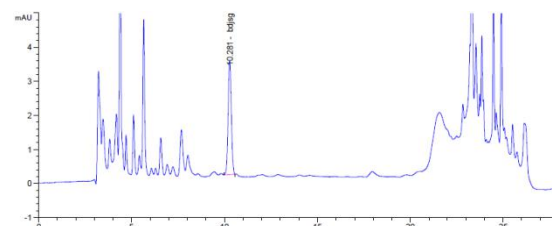


图 51 水产配合饲料 (添加量 1.6mg/kg)

4.13 市场上样品考察结果

抽取市场上典型样品，按拟定的色谱条件测定，结果见表24。

表24 吡啶甲酸铬含量测定结果 (mg/kg)

样品编号	饲料名称	标示含量	测定结果
FJ19011	猪配合饲料	无	1.6
FJ192010	猪配合饲料	无	1.2
FJ19008	猪配合饲料	无	未检出
FJ192013	猪配合饲料	无	未检出
FJ192003	淡水鱼配合饲料	无	未检出
FJ19031	淡水鱼配合饲料	无	未检出
FJ19081	猪浓缩料	无	2.7
FJ18020	猪浓缩料	无	未检出
厂家 1	猪浓缩料	无	未检出
FJ192160	猪浓缩料	无	未检出
FJ191125	肉牛精料补充料	无	未检出
FJ191127	奶牛精料补充料	无	未检出
厂家 2	精料补充料	无	未检出
厂家 3	猪复合预混料	无	33.64
FJ19201	猪复合预混料	无	未检出
FJ19198	猪复合预混料	无	37.11
FJ19195	猪复合预混料	无	40.24
FJ21004	猪用复合预混合饲料	无	67.7
FJ21156	10%生长育肥猪前期浓缩饲料	无	20.6
FJ21025	大猪自配料	无	1.02
厂家 4	育肥猪用复合预混合饲料	2000	1879
厂家 5	肉牛羊用复合预混合饲料	200	184
厂家 6	怀孕母猪复合预混合饲料	40	37.9
厂家 7	哺乳母猪复合预混合饲料	40	37.3
厂家 8	混合型饲料添加剂 吡啶甲酸铬	≥16000	16553
厂家 9	猪用配合料	1.65	1.67

4.14 国内外相关标准查询比较情况

表24 国内外吡啶甲酸铬测定标准对比表

检测内容	保健食品 吡啶甲酸铬 GB 5009.195-2003	饲料添加剂吡啶甲酸 铬 NY/T 916-2004	本方法
检出限	0.05μg	/	配合饲料、浓缩饲料、精料补充料检出限为0.05 mg/kg，定量限为0.1 mg/kg；添加剂预混合饲料检出限为0.1 mg/kg，定量限为0.5 mg/kg

标准曲线线性范围	2.0 -100 µg/mL	0.025-2.0 µg/mL	0.05 -5 µg/mL
提取方法	50%甲醇超声5min, 3000r/min离心3min	甲醇20 mL超声30min, 取10 mL上清液水浴蒸干, 用甲醇10 mL超声5min, 定容。	添加剂预混合饲料: 乙腈50 mL分2次提取, 涡旋20 min, 8000 r/min离心10 min, 合并提取液, 50℃氮吹干, 10%乙腈溶液复溶。 配合饲料等: 提取后再用阴离子交换柱净化、浓缩, 10%乙腈溶液复溶。
色谱条件	检测波长: 254nm 流动相: 0.125mol/L磷酸盐缓冲液+乙腈=425+75 色谱柱: µ-BONDAPAK™C ₁₈	检测波长: 264nm 流动相: 甲醇+水=30+70 色谱柱: C ₁₈	检测波长: 264nm 流动相: 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) +乙腈=97+3 色谱柱: C ₁₈ 梯度洗脱。

5、与现行法律法规和强制性标准的关系

本标准作为方法标准, 作为农业投入品, 本标准作为推荐性标准发布, 以提高我国饲料中吡啶甲酸铬的监测水平。

6 重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧。

7 作为推荐性标准的意见

本标准作为分析方法标准, 并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一。按照标准化法的规定, 建议按推荐性标准发布实施。

8、贯彻标准的要求和措施建议

要求各生产企业、使用单位对标准贯彻实施, 各级饲料监督部门、质检机构在实施各类检查、检验中应积极利用和创造各种渠道宣贯本标准, 对质检、生产、使用等相关单位人员进行标准宣贯培训班。

9、废止现行有关标准的建议

无。

10 其他应予说明的事项

无。

浙江省兽药饲料监察所 2021年7月