ICS 65.120
CCS B 46

NY

中 华 人 民 共 和 国 农 业 行 业 标 准

NY/T ××××—202×

混合型饲料添加剂甜味剂中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜的测定 高效液相色谱法

Determination of sodium saccharin, neohesperidin dihydrochalcone and neotame in sweeteners as mixed feed additive—High performance liquid chromatography

（公开征求意见稿）

202×-××-××发布　　202×-××-××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：四川威尔检测技术股份有限公司、成都大帝汉克生物科技有限公司、宜宾学院、重庆民泰新农业科技发展集团有限公司。

本文件主要起草人：

混合型饲料添加剂甜味剂中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜的测定　高效液相色谱法

1　范围

本文件描述了混合型饲料添加剂甜味剂中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于混合型饲料添加剂甜味剂中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜的测定。

本文件的检出限为0.01%，定量限为0.04%。

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

试样中的待测物用40%甲醇溶液提取，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　甲醇：色谱纯。

5.3　乙腈：色谱纯。

5.4　三乙胺：色谱纯。

5.5　磷酸：优级纯。

5.6　三乙胺溶液：移取 3 mL 三乙胺，加入 1 000 mL 水中，混匀，用磷酸调 pH 至 3.5。
5.7　40％甲醇溶液：量取 400 mL 甲醇（5.2）、600 mL 水，混匀，备用。
5.8　标准储备溶液（1.0 mg/mL）：准确称取 0.1 g 无水糖精钠标准品（$C_6H_4CONNaSO_2$，CAS 号：128-44-9，纯度不低于 99.0%）、新甲基橙皮苷二氢查尔酮标准品（$C_{28}H_{36}O_{15}$，CAS 号：20702-77-6，纯度不低于 98.0%）、纽甜标准品（$C_{20}H_{30}N_2O_5$，CAS 号：165450-17-9，纯度不低于 99.0%）（精确至 0.01 mg），分别置于 100 mL 容量瓶中，加 40％甲醇溶液（5.7）溶解、定容，混匀。－18℃以下保存，有效期 3 个月。或购买有证标准物质。
5.9　混合标准中间溶液（200 μg/mL）：准确移取糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜标准储备溶液（5.8）各10 mL，置于50 mL容量瓶中，用40％甲醇溶液（5.7）稀释、定容，混匀。临用现配。
5.10　混合标准系列溶液：准确移取适量混合标准中间溶液（5.9），用40％甲醇溶液（5.7）稀释、定容，混匀，配制成质量浓度分别为0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、50.0 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL混合标准系列溶液。临用现配。
5.11　微孔滤膜：0.45 μm，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 0.1 mg 和 0.01 mg。
6.3　超声波清洗器。
6.4　pH 计。
6.5　电热恒温干燥箱。

7　样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，充分混匀，密封，备用。

8　试验步骤

8.1　试样溶液制备

平行做两份试验。称取0.5 g~2.0 g（精确至0.1 mg）试样，置于100 mL容量瓶中，加入80 mL40％甲醇溶液（5.7），摇匀，超声提取20 min，期间振摇2~3次，取出，冷却至室温，用40％甲醇溶液（5.7）定容，混匀，过微孔滤膜（5.11），备用。

8.2　测定

8.2.1　高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下：
a）色谱柱：C_{18}柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，或性能相当者；
b）流动相：A相为乙腈，B相为三乙胺溶液（5.6），梯度洗脱程序见表1；
c）流速：1.0 mL/min；
d）检测波长：210 nm；
e）进样量：10 μL；

f）柱温：30 ℃。

表1 梯度洗脱程序

时间 / min	A相 / %	B相 / %
0	5	95
10	25	75
20	50	50
22	5	95
28	5	95

8.2.2 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列溶液（5.10）和试样溶液（8.1）上机测定。糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜标准溶液的液相色谱图见附录A。

8.2.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜色谱峰的保留时间应与质量浓度相当的标准系列溶液中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜色谱峰的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

8.2.4 定量

以糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜的质量浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.99。试样溶液中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜的质量浓度应在标准曲线的线性范围内，如超出线性范围，应将试样溶液（8.1）用40%甲醇溶液（5.7）稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中糖精钠（$C_6H_4CONNaSO_2$）、新甲基橙皮苷二氢查尔酮、纽甜的含量w以质量分数计，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：

$$w = \frac{\rho \times V \times f}{m \times 1000 \times 1000} \times 100 \quad (1)$$

式中：

ρ ——由标准曲线查得的试样溶液中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮、纽甜的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL ）；

V ——试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

f ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）

1000 ——换算系数。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times f}{A_s \times m \times 1000 \times 1000} \times 100 \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

A ——试样溶液中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮、纽甜的色谱峰面积；

A_S ——标准溶液中糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮、纽甜的色谱峰面积；

ρ_S ——糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮、纽甜标准溶液的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

f ——试样溶液的稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

鉴于饲料添加剂糖精钠含2个结晶水，试样中糖精钠（$C_6H_4CONNaSO_2 \cdot 2H_2O$）的含量$w_1$以质量分数计，数值以百分含量（%）表示。按公式（3）计算：

$$w_1 = w \times \frac{242.205}{205.166} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

w_1 ——糖精钠（$C_6H_4CONNaSO_2 \cdot 2H_2O$）的含量，单位为%；

w ——糖精钠（$C_6H_4CONNaSO_2$）的含量，单位为%；

242.205 ——饲料添加剂糖精钠（$C_6H_4CONNaSO_2 \cdot 2H_2O$）的分子量；

205.166 ——糖精钠（$C_6H_4CONNaSO_2$）分子量。

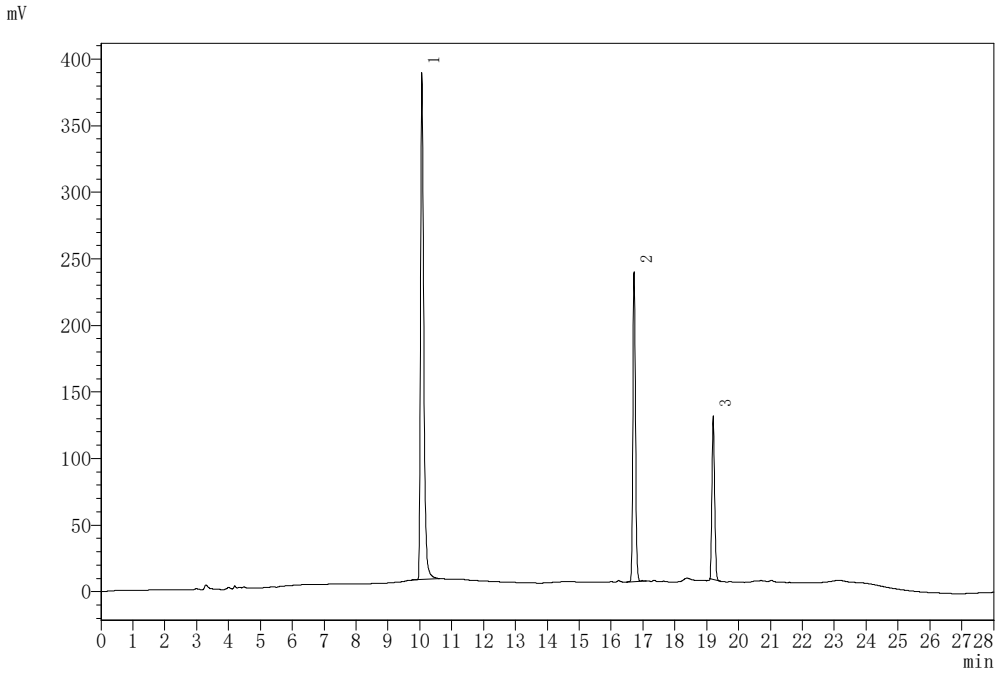
测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不得超过该算术平均值的10%。

附 录 A
（资料性）
糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜混合标准溶液液相色谱图

糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜混合标准溶液液相色谱图见图 A.1。



标引序号说明：

1——糖精钠；

2——新甲基橙皮苷二氢查尔酮；

3——纽甜。

图A.1　糖精钠、新甲基橙皮苷二氢查尔酮和纽甜混合标准溶液（50 μg/mL）液相色谱图