

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 5715—2022

发酵液中衣康酸的测定 高效液相色谱法

Determination of itaconic acid in fermentation liquor—High performance liquid
chromatography method

2022-04-08 发布

2022-10-01 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布



THE UNIVERSITY OF CHINA PRESS

1911

THE UNIVERSITY OF CHINA PRESS

THE UNIVERSITY OF CHINA PRESS

THE UNIVERSITY OF CHINA PRESS

THE UNIVERSITY OF CHINA PRESS

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。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国食品工业标准化技术委员会（SAC/TC 64）归口。

本文件起草单位：安徽省食品药品检验研究院、青岛琅琊台集团股份有限公司、中国生物发酵产业协会、山东省食品发酵工业研究院、山东寿光巨能金玉米开发有限公司、武汉远大弘元股份有限公司、天津科技大学。

本文件主要起草人：李建军、何俊、李悦明、冯志合、田延军、李静、徐建春、吴泽华、李霞、王晋、张居舟、张文文、程坚、张成林。

本文件为首次发布。

发酵液中衣康酸的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了发酵液中衣康酸的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于衣康酸发酵液中衣康酸的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

第一法 高效液相色谱 紫外检测器法

4 方法提要

试样中的衣康酸经甲醇溶液提取或直接稀释，经强阴离子固相萃取柱净化，利用反相液相色谱柱分离，用紫外检测器检测，外标法定量。

5 试剂和材料

水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇：色谱纯。

5.1.2 磷酸：优级纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 甲醇溶液（1+1，体积比）：量取 250 mL 甲醇（5.1.1）至 500 mL 容量瓶，用水定容，混匀。

5.2.2 2%磷酸甲醇溶液：量取 2 mL 磷酸（5.1.2）至 100 mL 容量瓶，用甲醇（5.1.1）定容，混匀。

5.2.3 0.1%磷酸溶液：准确吸取 1 mL 磷酸（5.1.2），转移入 1 000 mL 容量瓶，用水定容，混匀。

5.2.4 0.1%磷酸甲醇溶液（87+13，体积比）：量取0.1%磷酸溶液（5.2.3）870 mL至1 000 mL容量瓶，用甲醇（5.1.1）定容，混匀。

5.3 标准品

衣康酸标准品（CAS：97-65-4， $C_5H_6O_4$ ）：纯度不小于99%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

提示：在衣康酸配制时注意安全防护。

5.4.1 衣康酸标准储备液（2.0 mg/mL）：精密称取20 mg（精确至0.1 mg）的衣康酸标准品（5.3），用甲醇（5.1.1）溶解并定容至10 mL，此溶液衣康酸含量为2.0 mg/mL，于4 °C下保存，有效期6个月。

5.4.2 衣康酸标准工作液：分别量取适量衣康酸标准储备液（5.4.1），用0.1%磷酸甲醇溶液（5.2.4）配制成5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L的标准工作液，于4 °C保存，现配现用。

5.5 材料

5.5.1 强阴离子固相萃取小柱（SAX）：1 000 mg/6mL，或相当者，使用前依次用4 mL甲醇（5.1.1）、4 mL水、4 mL甲醇溶液（5.2.1）活化。

5.5.2 0.45 μ m 滤膜，有机系。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器。

6.2 电子天平：感量0.1 mg和0.01 g。

6.3 涡旋振荡器。

6.4 氮吹仪。

6.5 固相萃取装置。

6.6 离心机：转速不低于6 000 r/min。

6.7 其他实验室常用仪器。

7 分析步骤

7.1 试液制备

量取500 mL发酵液搅匀，取适量体积经6 000 r/min离心5 min，称取上清液1.0 g（精确至0.01 g）于100 mL容量瓶（可根据实际样品中衣康酸的含量，增加或减少称样量），用甲醇溶液（5.2.1）溶解并定容。

7.2 净化

移取1.00 mL上述溶解液（7.1）转移至预先活化的SAX固相萃取柱（5.5.1），控制流速约0.5 mL/min，弃去流出液，用1 mL甲醇水溶液（5.2.1）淋洗，再用2%磷酸甲醇溶液（5.2.2）4 mL洗脱，收集洗脱液于氮吹管中，50 °C下氮气缓缓吹至近干，用0.1%磷酸甲醇溶液（5.2.4）定容至1.0 mL，涡旋30 s溶

解残留物，0.45 μm 滤膜（5.5.2）过滤，供高效液相色谱仪分析。

如果样品基质对衣康酸的准确性和定量没有干扰，可省略 7.2，将定容液经 0.45 μm 滤膜（5.5.2）过滤后直接进行液相色谱分析。

7.3 标准曲线的制作

将配制的标准工作液，按浓度由低到高的顺序经液相色谱仪测定，以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标作图，绘制标准曲线。

7.4 仪器参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈（250×4.6 mm，5 μm）或具有同等性能的色谱柱；
- b) 流动相：0.1%磷酸甲醇溶液（5.2.4）；
- c) 流速：0.8 mL/min；
- d) 柱温：45 °C；
- e) 检测波长：210 nm；
- f) 进样量：5 μL。

7.5 测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，测得相应的峰面积，由标准曲线得到试样溶液中衣康酸的浓度。在上述色谱条件下，标准溶液和试样溶液的高效液相色谱图见附录 A 图 A.1。

7.6 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 分析结果的表述

试样中衣康酸的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \times f \quad \text{..... (1)}$$

式中：

- X* —— 试样中衣康酸的含量，单位为克每千克（g/kg）；
- c* —— 由标准曲线求得试样溶液中衣康酸的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
- c*₀ —— 由标准曲线求得空白试验中衣康酸的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
- V* —— 试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；
- m* —— 试样质量，单位为克（g）；
- f* —— 稀释倍数（若不改变称样量，则为100）；
- 1 000 —— 换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

9 灵敏度

若取 1.0 g 样品测定，衣康酸的检出限为 0.50 g/kg。

10 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应超过算术平均值的 10%。

第二法 高效液相色谱 示差折光检测器法

11 方法提要

试样中的衣康酸经甲醇溶液提取或直接稀释，经强阴离子固相萃取柱净化，利用反相液相色谱柱分离，用示差折光检测器检测，外标法定量。

12 试剂和材料

12.1 试剂

同 5.1。

12.2 试剂配制

同 5.2。

12.3 标准品

同 5.3。

12.4 标准溶液配制

12.4.1 衣康酸标准储备液

同 5.4.1。

12.4.2 衣康酸标准工作液

分别量取适量衣康酸标准储备液（12.4.1），用 0.1% 磷酸甲醇溶液（5.2.4）配制成 0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL 标准工作液，于 4 °C 保存，现配现用。

12.5 材料

12.5.1 强阴离子固相萃取小柱（SAX）：同 5.5。

12.5.2 0.45 μm 滤膜，有机系。

13 仪器和设备

高效液相色谱仪：配示差折光检测器。

其他同 6。

14 分析步骤

14.1 试液制备

同 7.1。

14.2 净化

14.2.1 同 7.2。

14.2.2 如果样品基质对衣康酸的准确定性和定量没有干扰，可省略 14.2，将定容液经 0.45 μm 滤膜（5.5.2）过滤后直接进行液相色谱分析。

14.3 标准曲线的制作

同 7.3。

14.4 仪器参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈（250×4.6 mm，5 μm）或具有同等性能的色谱柱；
- b) 流动相：0.1%磷酸甲醇溶液（5.2.4）；
- c) 流速：0.8 mL/min；
- d) 柱温：45 °C；
- e) 进样量：10 μL；
- f) 示差折光检测器检测池温度：45 °C。

14.5 测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，测得相应的峰面积，由标准曲线得到试样溶液中衣康酸的浓度。在上述色谱条件下，标准溶液和试样溶液的高效液相色谱图见附录 A 图 A.2。

14.6 空白试验

同 7.6。

15 分析结果的表述

试样中衣康酸的含量按公式（2）计算：

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- X* —— 试样中衣康酸的含量，单位为克每千克（g/kg）；
c —— 由标准曲线求得试样溶液中衣康酸的浓度，单位为毫克每升（mg/mL）；
*c*₀ —— 由标准曲线求得空白试验中衣康酸的浓度，单位为毫克每升（mg/mL）；
V —— 试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；
m —— 试样质量，单位为克（g）；
f —— 稀释倍数（若不改变称样量，则为100）；
 1 000 —— 换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

16 灵敏度

若取 1.0 g 样品测定，衣康酸的检出限为 5.0 g/kg。

17 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应超过算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性)
衣康酸的色谱图

衣康酸标准溶液色谱图见图 A.1 和图 A.2。

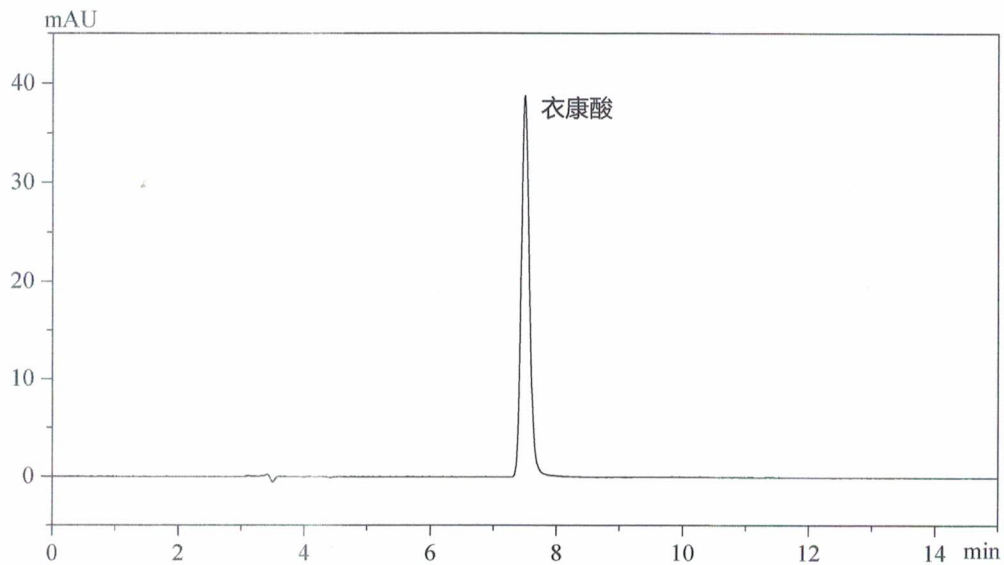


图 A.1 衣康酸标准溶液色谱图 (紫外检测器)

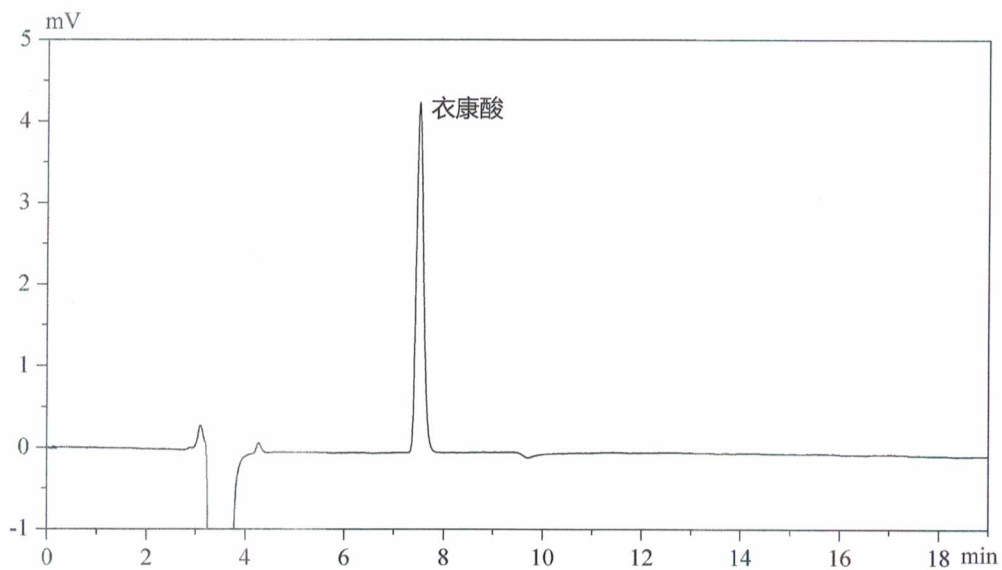


图 A.2 衣康酸标准溶液色谱图 (示差折光检测器)

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

中 华 人 民 共 和 国
轻 工 行 业 标 准
发 酵 液 中 衣 康 酸 的 测 定
高 效 液 相 色 谱 法
QB/T 5715—2022

*

中国轻工业出版社出版发行
地址：北京东长安街6号
邮政编码：100740
发行电话：(010) 85119832/38
网址：<http://www.chlip.com.cn>
Email：club@chlip.com.cn

轻工业标准化编辑出版委员会编辑
地址：北京西城区月坛北小街6号院
邮政编码：100037
电话：(010)68049923

*

版权所有 侵权必究
书号：155019·5872
印数：1—200册 定价：30.00元