

基于离子排斥色谱的饲料酸化剂中多种有机酸同步检测

贾 铮, 肖志明, 李 兰, 樊 霞^{*}

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

摘 要: 为了规范饲用酸化剂的使用和管理, 建立一种快速、准确的多种有机酸同步检测方法应运而生。该文以实现饲料酸化剂中多种有机酸的同步检测为目标, 基于离子排斥色谱技术, 对饲料酸化剂中多种有机酸(柠檬酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、甲酸、乙酸、富马酸、丙酸和丁酸)的检测条件进行了优化研究。研究采用 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm Φ, 9 μm) 离子排斥色谱柱及二极管阵列检测器, 以硫酸溶液作为流动相, 比较了不同流动相浓度、不同柱温、不同流动相流速、不同检测波长等色谱条件对同步检测饲料酸化剂中 9 种有机酸的影响; 以上述优选的条件建立分析方法, 考察此方法的线性范围和检出限、回收率和精密度, 并用实际样品进行了验证。研究结果表明: 以 0.025 mol/L 硫酸溶液为流动相, 流速 0.70 mL/min, 柱温 30 ℃, DAD 检测波长为 210 nm, 以保留时间结合待测物质的紫外特征吸收光谱进行定性分析, 外标法进行定量分析。9 种有机酸组分的质量浓度与其峰面积在一定范围内呈良好线性关系, 决定系数>0.999, 9 种有机酸组分在 20 min 内可以得到良好分离; 方法检出限为 0.01~2.4 mg/L, 加标回收率为 90.7%~101.1%, 相对标准偏差为 0.91%~3.33%。基于上述条件建立的检测方法能够满足饲料酸化剂中多种有机酸成分的同步定量分析。

关键词: 色谱; 检测器; 有机酸; 二极管阵列; 饲料酸化剂; 同步检测

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.12.043

中图分类号: S816.7; O657.7⁺5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-12-0303-06

贾 铮, 肖志明, 李 兰, 樊 霞. 基于离子排斥色谱的饲料酸化剂中多种有机酸同步检测[J]. 农业工程学报, 2016, 32(12): 303-308. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.12.043 http://www.tcsae.org

Jia Zheng, Xiao Zhiming, Li Lan, Fan Xia. Simultaneous determination of multi-organic acids in feed acidifier by ion exclusion chromatography[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(12): 303-308. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.12.043 http://www.tcsae.org

0 引 言

在动物饲料中添加酸化剂可有效降低饲料 pH 值和酸结合力, 促进胃内酶原活化和降低胃肠道 pH 值, 促进肠道微生态平衡, 从而具有促进营养物质的消化、吸收, 提高免疫机能等作用^[1]。在饲用抗生素的使用不断暴露出诸多问题的当下, 饲料酸化剂因其无污染、无残留、抗菌活性高等特性, 与益生菌、酶制剂、香味剂等共同组成新型的绿色饲料添加剂, 作为能够有效代替抗生素的一类产品, 已得到饲料行业以及畜禽水产养殖业的普遍认可, 应用也日益广泛。2013 年, 农业部以公告形式颁布的《饲料添加剂品种目录(2013)》中, 已对该类饲料添加剂的类别和适用范围进行了明确的规定, 同时, 相关部门也已制定了相应的产品标准^[2]和检测方法标准^[3]。目前国内外市场上的饲用酸化剂产品很多, 根据不同的分类方法可以分为有机酸和无机酸、单一酸和复合酸。酸化剂产品质量的优劣, 与其活性成分及含量有着非常

密切的关系。复合型饲料酸化剂多以几种有机酸和无机酸及其盐类按照一定比例配制而成, 由于允许使用的酸化剂多达 30 余种, 性能各异, 其中的有机酸含量往往直接影响到酸化剂产品的质量和功效。为了规范饲用酸化剂的使用和管理, 建立一种快速、准确的多种有机酸同步检测方法应运而生。

文献报道的有机酸含量测定方法主要有气相色谱法^[4-5]、液相色谱法^[6-9]、毛细管电泳法^[10]以及离子色谱法^[11-13]。气相色谱法用于测定高沸点有机酸时一般需要衍生, 操作繁琐; 毛细管电泳法与其他分析方法相比, 在重现性方面有待改善; 反相液相色谱在有机酸测定的应用报道较多, 该法多以酸性缓冲盐溶液为流动相实现多组分有机酸的同步测定, 对流动相配制要求较高。而离子排斥色谱法作为离子色谱法中的一种, 集合了 Donnan 排斥、空间排斥以及吸附作用等多种分离机理, 具有样品前处理简单、分离分析干扰少、准确度高、重现性好等特点, 成为分析低分子量有机酸的一种有效方法。姜岷等^[14]利用 Aminex HPX-87H 离子色谱柱配以折光示差检测器对发酵液中有有机酸和混合单糖进行了测定; 马建刚^[15]等利用该色谱柱对大肠杆菌发酵液中的 9 种有机酸代谢产物进行了测定, 通过优化色谱条件改进了富马酸的分离。目前, 采用离子排斥色谱法同时测定饲料酸化剂中多种有机酸的报道较少。本研究利用离子排斥色谱法对饲料酸化剂中的 9 种有机酸进行分析, 通过优化试验条件分离各有机酸, 以期为实现饲料酸化剂中多种有机酸含量的同步快速测定以及此类

收稿日期: 2016-01-02 修订日期: 2016-04-24

基金项目: 中国农业科学院“饲料质量安全检测与评价”创新团队项目资助。

作者简介: 贾 铮, 男, 北京市人, 助理研究员, 主要从事饲料质量安全检测技术研究。北京 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), 100081。Email: jiazheng@caas.cn

*通信作者: 樊 霞, 女, 江苏泰兴人, 副研究员, 主要从事饲料质量安全检测技术研究。北京 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), 100081。Email: fanxia@caas.cn

产品的品质控制和质量监管提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UFLC-20A 液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司), 配有 2 个单独的超高压输液泵 (LC-20ADXR), 自动进样器 (SIL-20AXR), 柱温箱 (CTO-20A), 二极管阵列检测器 (SPD-M20A); SK3300LHC 超声器 (上海科导超声仪器有限公司); BP310/310g 型分析天平 (德国赛多利斯公司); 有机酸标准品: 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、乳酸、柠檬酸、富马酸、苹果酸和酒石酸 (德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 乙腈 (色谱纯, 德国 Fisher 公司); 其余试剂均为国产分析纯; 试验用水为经 Mili-Q 纯化的超纯水 ($>18.2 \text{ M}\Omega$)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱 ($300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm } \Phi$, $9 \mu\text{m}$); 流动相: 0.025 mol/L 硫酸溶液, 流速: 0.70 mL/min ; 柱温: 30°C ; 检测器: 二极管阵列检测器; 进样量: $20 \mu\text{L}$; 检测波长 $\lambda=210 \text{ nm}$; 外标法定量。

1.3 标准溶液的配制

准确称取 9 种有机酸各 50.0 mg , 加入流动相溶解并定容至 50 mL 容量瓶中, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液, 标准贮备液置于 4°C 冰箱中保存。分别取上述标准贮备液用流动相稀释至一定质量浓度 (甲酸、乙酸各 $200 \mu\text{g/mL}$, 苹果酸、柠檬酸、丙酸、丁酸各 $100 \mu\text{g/mL}$, 酒石酸、乳酸各 $50 \mu\text{g/mL}$, 富马酸 $5 \mu\text{g/mL}$)。

1.4 样品的制备

称取适量饲料酸化剂样品于 100 mL 容量瓶中, 加入 70 mL 去离子水, 超声提取 20 min , 用水定容至刻度, 样品溶液上机检测前用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

1.5 数据统计分析

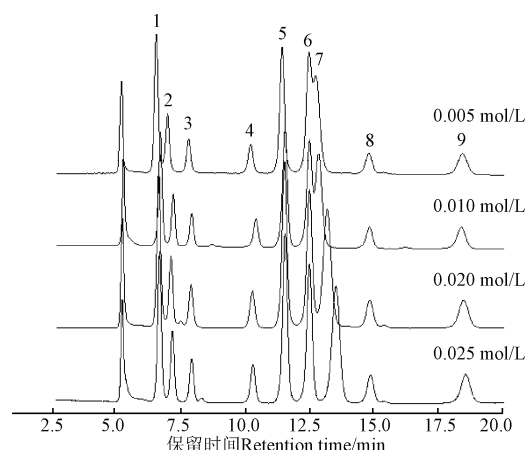
试验数据采用 Excel 软件进行统计分析, Origin 9.0 软件进行图形处理。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 流动相的选择

Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱可以采用低浓度硫酸、磷酸溶液作为流动相^[16]。Hans A. Eyéghé-Bickong^[17]等在流动相中加入一定比例乙腈, 以提高苹果酸和果糖之间的分离效果, 但造成背景噪声过高, 基线不稳等现象, 本试验尝试在流动相中加入了体积分数为 5% 的乙腈以减少分析时间, 但各组分分离情况均不够理想。结合采用磷酸溶液作为流动相可能会产生不溶性沉淀而损伤色谱柱^[18]的情况, 考虑到饲用酸化剂中金属离子的存在, 本研究选用了硫酸溶液作为流动相, 分别考察了 0.005 、 0.01 、 0.02 、 0.025 mol/L 等 4 个不同浓度的硫酸溶液作为流动相对 9 种有机酸组分分离情况的影响, 如图 1 所示, 混合标准溶液中各有机酸质量浓度分别为: 甲酸、乙酸各 $200 \mu\text{g/mL}$, 苹果酸、柠檬酸、丙酸、丁酸各 $100 \mu\text{g/mL}$, 酒石酸、乳酸各 $50 \mu\text{g/mL}$, 富马酸 $5 \mu\text{g/mL}$ 。



1.柠檬酸 2.酒石酸 3.苹果酸 4.乳酸 5.甲酸 6.乙酸 7.富马酸 8.丙酸 9.丁酸
1.Citric acid 2.Tartaric acid 3.Malic acid 4.Lactic acid 5.Formic acid 6.Acetic acid 7.Fumaric acid 8.Propanoic acid 9.Butyric acid

注: 流动相为硫酸溶液, 流速 0.70 mL/min , 色谱柱柱温 30°C 。

Note: mobile phase is H_2SO_4 solution; flow rate is 0.70 mL/min ; column temperature is 30°C .

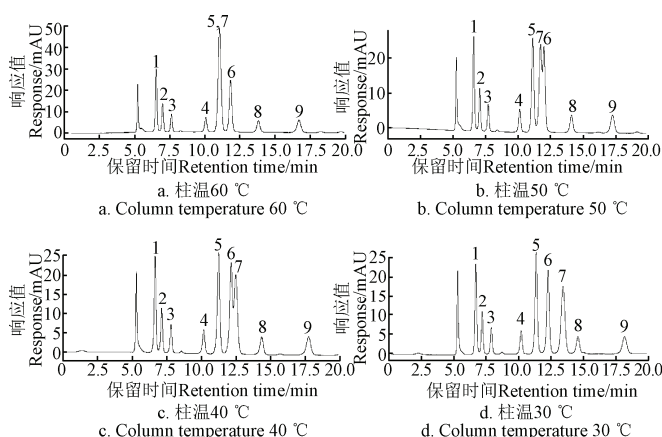
图 1 9 种有机酸混合标准样品在不同流动相浓度下的色谱图

Fig.1 Chromatograms of mixture of 9 organic acid standards under different mobile phase concentrations

从图 1 中可以看出: 当硫酸溶液浓度为 0.005 mol/L 时, 柠檬酸和酒石酸、富马酸和乙酸的分离效果较差, 随着硫酸浓度的提高, 有机酸的离解被抑制, 不受 Donnan 排斥的影响而与固定相作用^[19], 使对应组分的分离情况得到改善, 浓度为 0.025 mol/L 时, 各组分均得到良好的分离。

2.1.2 柱温的影响

色谱柱温对各有机酸组分的分离效果影响很大。之前报道的文献多以低浓度酸溶液作为流动相, 在较高柱温条件下进行, 本试验分别考察了柱温为 30 、 40 、 50 、 60°C 时 9 种有机酸组分的分离情况, 结果如图 2 所示。



注: 流动相为 0.025 mol/L 硫酸溶液, 流速 0.70 mL/min 。具体峰号标示参见图 1。

Note: mobile phase is 0.025 mol/L H_2SO_4 ; flow rate is 0.70 mL/min . The peak number is the same as in Fig. 1.

图 2 9 种有机酸混合标准样品在不同柱温下的色谱图

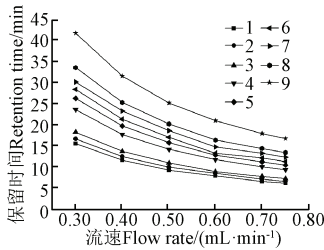
Fig.2 Chromatograms of mixture of 9 organic acid standards under different column temperatures

从图 2 中可以看出, 柱温变化对各有机酸组分的保留时间均有影响, 其中富马酸的保留时间受温度影响最

为明显，柱温 60 ℃时，富马酸与甲酸两组分峰重叠，无法分离；随着柱温的降低，富马酸的保留时间延长，当柱温为 50 ℃时，富马酸在甲酸和乙酸之间出峰，但由于甲酸和乙酸的保留时间接近，富马酸位于两者之间，分离效果无法得到进一步改善；当柱温降低至 40 ℃时，富马酸的保留时间进一步延长，出峰位置从乙酸之前转为乙酸之后；30 ℃时，富马酸与乙酸能够达到基线分离，此时，各有机酸组分均得到较好分离，因此，色谱柱温选择为 30 ℃。

2.1.3 流速的选择

选择不同流速的流动相（0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.75 mL/min）分离混合标准溶液。如图 3 所示，随着流速的提高，样品分析时间缩短，当流速为 0.70 和 0.75 mL/min 时，各有机酸组分均可在 20 min 内全部实现分离检测，但考虑到流速过大会造成色谱柱压力接近其耐压上限而影响使用寿命，故选择 0.70 mL/min 作为流动相流速。



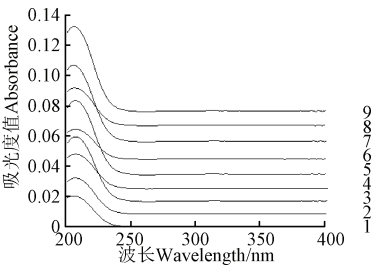
注：流动相为 0.025 mol/L 硫酸溶液，柱温 30℃。图中数字表示的具体峰号见图 1。
Note: mobile phase is 0.025 mol/L H₂SO₄; column temperature is 30℃. The peak number is the same as in Fig.1.

图 3 流速对保留时间的影响
Fig.3 Effect of flow rate on retention time

2.1.4 检测波长的选择

由二极管矩阵检测器在 200~400 nm 波长扫描得到各色谱峰的光谱图见图 4，吸收波长数据见表 1。由于各

有机酸在波长 210 nm 附近均有较大吸收，因此本研究选择检测波长为 210 nm。



注：图中数字表示的具体峰号见图 1。
Note: The peak number is the same as in Fig.1.

图 4 9 种有机酸混合标准样品的光谱图
Fig.4 UV spectrums of mixture of 9 organic acid standards

2.2 方法学考察

2.2.1 方法的线性范围和检出限

配制含有 9 种有机酸组分的系列混合标准溶液，在优化的试验色谱条件下依次进样，重复 3 次，以峰面积为纵坐标（y），质量浓度为横坐标（x）建立标准曲线，在各自线性范围内，其决定系数（R²）均大于 0.9990。以 3 倍信噪比（S/N）作为方法的检出限，9 种有机酸的检测波长、线性方程、决定系数、线性范围以及检出限等结果见表 1。

2.2.2 回收率和精密度

以含部分品种酸成分的复合型饲用酸化剂产品为代表样品（样品溶液中丙酸质量浓度<10 mg/L），分别添加 2 个不同浓度（具体浓度见表 2）的 9 种有机酸标准溶液，每个添加水平重复测定 6 次，计算平均加标回收率（R）和精密度（RSD），结果见表 2。从表 2 中可以看出，各有机酸组分的回收率介于 90.7%~101.1% 之间，相对标准偏差为 0.91%~3.33%，优化后的方法重复性好、准确度高。

表 1 9 种有机酸的吸收波长、线性回归方程、线性决定系数、线性范围、检出限
Table 1 Linear regression equation, determination coefficients, Linear range, detection of limits of 9 organic acid

有机酸 Organic acid	吸收波长 λ/nm	线性方程 Linear regression equation	决定系数 Determination coefficient R ²	线性范围 Linear range/ (mg·L ⁻¹)	检出限 Detection limit/ (mg·L ⁻¹)
柠檬酸 Citric acid	210	y=11623x-2468.4	0.9999	5.0~400	1.3
酒石酸 Tartaric acid	210	y=5530.6x-1562.7	0.9999	2.5~200	0.6
苹果酸 Malic acid	210	y=3691x-1866.5	0.9998	5.0~400	1.5
乳酸 Lactic acid	210	y=3756.6x-2152.6	0.9999	10~800	1.0
甲酸 Formic acid	210	y=16206x-4902.2	0.9999	10~600	1.2
乙酸 Acetic acid	203	y=15271x-7178.5	0.9999	20~1000	1.6
富马酸 Fumaric acid	210	y=18863x-7843.1	0.9998	0.1~50	0.01
丙酸 Propanoic acid	205	y=4271.8x-4302.9	0.9990	5.0~400	2.4
丁酸 butyric acid	206	y=5126.4x-3943	0.9993	5.0~400	2.4

注：y 为峰面积，x 为各有机酸组分的质量浓度，μg·mL⁻¹
Note: y is peak area; x is mass concentrations of 9 organic acids, μg·mL⁻¹.

表 2 9 种有机酸的加标回收率和精密度

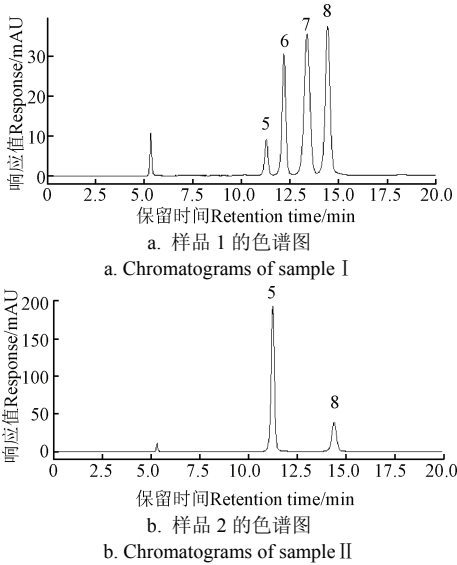
Table 2 Recoveries of 9 organic acids and precision of the method

有机酸 Organic acid	已知量 Present/(mg·L ⁻¹)	添加量 Added/(mg·L ⁻¹)	测定值 Found/(mg·L ⁻¹)	回收率 Recovery/%	精密度 RSD/%
柠檬酸 Citric acid	26.3	30	51.8	92.0	1.70
		150	176.3	100.0	2.21
酒石酸 Tartaric acid	-	10	10	100.0	1.07
		50	50	100.0	2.77
苹果酸 Malic acid	-	20	18.9	94.5	1.59
		100	96.2	96.2	3.33
乳酸 Lactic acid	10.9	10	19.0	90.9	1.19
		50	61.0	100.2	0.98
甲酸 Formic acid	26.2	20	41.8	90.5	0.91
		100	127.6	101.1	1.48
乙酸 Acetic acid	28.9	20	46.0	94.1	2.78
		100	126.2	97.9	3.02
富马酸 Fumaric acid	0.56	0.5	0.98	92.5	2.20
		2.5	2.92	95.4	1.82
丙酸 Propanoic acid	-	20	19.0	95.0	2.05
		100	94.3	94.3	1.70
丁酸 Butyric acid	-	30	27.2	90.7	2.47
		150	138.1	92.1	2.76

注：“-”代表未检出。
Note: “-”, not detected.

2.2.3 实际样品分析

应用本研究中优化的方法对 2 个不同类型的饲料酸化剂样品中 9 种有机酸组分进行测定，其色谱图见图 5，检测结果见表 3。



注：具体峰号标示参见图 1。
Note: The peak number is the same as in Fig.1.

图 5 实际样品的典型谱图
Fig. 5 Chromatograms of real sample

表 3 实际样品中 9 种有机酸含量

Table 3 Content of 9 organic acids in feed acidifier

有机酸 Organic acid	样品 1 Sample I /%	样品 2 Sample II /%
柠檬酸 Citric acid	-	-
酒石酸 Tartaric acid	-	-
苹果酸 Malic acid	-	-
乳酸 Lactic acid	-	-
甲酸 Formic acid	6.3(6.0)	45.5(45.0)
乙酸 Acetic acid	27.6(28.0)	-
富马酸 Fumaric acid	0.4(0.4)	-
丙酸 Propanoic acid	37.3(37.0)	14.7(15.0)
丁酸 Butyric acid	-	-

注：括号内数值代表标示量；“-”代表未检出。
Note: “()”, marked value; “-”, not detected.

从图 5 中可以看出，不同组分在本试验条件下可以得到有效分离，分析时间均能控制在 20 min 之内；从表 3 的数据可以看到本方法测定的结果与生产厂家的标示量基本一致，说明此方法准确性良好。

3 结 论

1) 采用 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm Φ, 9 μm) 离子排斥色谱柱结合二极管阵列检测器对饲料酸化剂中的 9 种有机酸组分进行了有效分离。通过单因素优化试验得到的最佳色谱条件：流动相为 0.025 mol/L 硫酸溶液，柱温条件 30 ℃，流速 0.7 mL/min，检测波长 210 nm，外标法定量分析。

2) 方法学考察结果显示，9 种有机酸组分在上述色谱条件下，其质量浓度与对应峰面积在一定范围内呈良好线性关系，决定系数>0.999，9 种有机酸组分在 20 min 内可以得到良好分离；方法检出限为 0.01~2.4 mg/L，加标回收率为 90.7%~101.1%，相对标准偏差为 0.91%~3.33%。建立的方法具有前处理简便、分离效果好、定性及定量准确、分析时间短等优点，为规范饲料酸化剂的生产使用，加强此类产品的质控与监管提供了技术支撑。

[参 考 文 献]

[1] 张秀芬, 杨琳. 饲用酸化剂在饲料应用的研究进展[J]. 广东饲料, 2014, 23(1): 31—33.
Zhang Xiufen, Yang Lin. Progress on application research of feed acidifier[J]. Guangdong Feed, 2014, 23(1): 31—33. (in Chinese with English abstract)
[2] GB/T 22142-2008. 饲料添加剂有机酸通用要求[S].
[3] GB/T 23877-2009. 饲料酸化剂中柠檬酸、富马酸和乳酸的测定 高效液相色谱法[S].
[4] 任清. 衍生化-毛细管气相色谱法同时测定饲料添加剂中富马酸、乳酸和柠檬酸[J]. 分析化学, 2002, 30(3): 304—306.
Ren Qing. Determination of fumaric acid, lactic acid and citric acid in feed additives by derivatization capillary gas

- chromatography[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30(3): 304—306. (in Chinese with English abstract)
- [5] 张霞, 刘志华, 杨光宇, 等. 固相萃取富集/气相色谱法测定烟草中的 9 种有机酸[J]. 分析测试学报, 2014, 33(5): 545—550.
- Zhang Xia, Liu Zhihua, Yang Guangyu, et al. Determination of Organic Acids in Tobacco by Solid Phase Extraction and Gas Chromatography[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(5): 545—550. (in Chinese with English abstract)
- [6] Carla Isabel Rodrigues, Liliana Martaa, Rodrigo Maiaa, et al. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20(5): 440—448.
- [7] 黄桂颖, 白卫东, 杨幼慧, 等. 反相高效液相色谱法测定荔枝肉中 10 种有机酸[J]. 现代食品科技, 2009, 25(5): 568—570.
- Huang Guiying, Bai Weidong, Yang Youhui, et al. Determination of ten organic acids in lychees by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(5): 568—570. (in Chinese with English abstract)
- [8] 索德成, 李兰, 樊霞. 饲用酸化剂中甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、柠檬酸的同步测定[J]. 饲料工业, 2012, 33(21): 60—62.
- Suo Decheng, Li Lan, Fan Xia. Determination of formic acid, acetic acid, propionic acid, lactic acid, citric acid in feed acidifier[J]. Feed Industry, 2012, 33(21): 60—62. (in Chinese with English abstract)
- [9] Rodrigo Scherer, Ana Cecília Poloni Rybka, Cristiano Augusto Ballus, et al. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices[J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 150—154.
- [10] 唐美华, 屠春燕, 薛亚芳, 等. 毛细管电泳法测定葡萄酒中的有机酸含量[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 209—211.
- Tang Meihua, Tu Chunyan, Xue Yafang, et al. Determination of organic acids in grape wine using capillary zone electrophoresis[J]. Food Science, 2009, 30(8): 209—211. (in Chinese with English abstract)
- [11] 刘瑞, 聂黎行, 孙焕, 等. 离子排斥色谱法测定生脉注射液中的有机酸[J]. 分析化学, 2012, 40(3): 489—490.
- Liu Rui, Nie Lixing, Sun Huan, et al. Determination of organic acids in sheng-mai injection by ion exclusion chromatography[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(3): 489—490. (in Chinese with English abstract)
- [12] 孙艺梦, 于泓, 李朦, 等. 离子排斥色谱中色谱柱温度对有机酸保留的影响[J]. 分析测试学报, 2013, 32(4): 508—513.
- Sun Yimeng, Yu Hong, Li Meng, et al. Effect of column temperature on the retention of organic acids in ion-exclusion chromatography[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(4): 508—513. (in Chinese with English abstract)
- [13] 胡静, 赵瑞峰, 施文庄, 等. 烟草中 9 种有机酸的梯度离子色谱法测定研究[J]. 分析测试学报, 2011, 30(10): 1171—1174.
- Hu Jing, Zao Ruifeng, Shi Wenzhuang, et al. Determination of nine organic acids in tobacco by gradient ion chromatography[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2011, 30(10): 1171—1174. (in Chinese with English abstract)
- [14] 姜岷, 雷丹, 陈可泉, 等. 纤维素水解液厌氧发酵产丁二酸发酵液中有有机酸和混合单糖的测定[J]. 分析化学, 2009, 37(4): 605—608.
- Jiang Min, Lei Dan, Chen Kequan, et al. Determination of organic acids and monomeric sugars in fermentation broth of succinic acid production with lignocellulose hydrolysate[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(4): 605—608. (in Chinese with English abstract)
- [15] 马建刚, 刘娇, 曾祥峰, 等. 大肠杆菌 9 种有机酸代谢产物的高效液相检测条件优化[J]. 现代食品科技, 2011, 27(5): 591—594, 519.
- Ma Jiangang, Liu Jiao, Zeng Xiangfeng, et al. Optimization of HPLC determination Conditions for 9 Organic Acids Produced by E. Coli[J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(5): 591—594, 519. (in Chinese with English abstract)
- [16] Fabio Chinnici, Umberto Spinabelli, Claudio Riponi, et al. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18: 121—130.
- [17] Hans A Eyéghé-Bickong, Erik O Alexandersson, Liezel M Gouws, et al. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries[J]. Journal of Chromatography B, 2012(885/886): 43—49.
- [18] 刘宇鹏, 郑璞, 孙志浩. 采用离子排斥色谱法分析发酵液中的琥珀酸等代谢产物[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(12): 119—123.
- Liu Yupeng, Zheng Pu, Sun Zhihao. Determination of Succinic Acid and other Metabolites from Fermentation Broth by Ion-exclusion Liquid Chromatography[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(12): 119—123. (in Chinese with English abstract)
- [19] 原小寓, 吴伟, 于泓. 离子排斥色谱法分析有机酸的新进展[J]. 生命科学仪器, 2005, 3(3): 29—33.
- Yuan Xiaoyu, Wu Wei, Yu Hong. New advances of organic acid analysis by Ion-exclusion Chromatography[J]. Life Science Instruments, 2005, 3(3): 29—33. (in Chinese with English abstract)

Simultaneous determination of multi-organic acids in feed acidifier by ion exclusion chromatography

Jia Zheng, Xiao Zhiming, Li Lan, Fan Xia^{*}

(Institute of Quality Standards & Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The addition of different kinds of acidifiers into animal feed would be effective in decreasing pH value and acid-binding capacity, and thus it brings the advantages such as facilitating the digestion and absorption, and enhancing the immune function. In connection with the demands for food safety and environment-friendly production, acidifiers have received considerable attention as feed additives. Regulating the usage and management of feed acidifiers requires the establishment of a synchronous detection method for different kinds of organic acids with high speed and high accuracy. The research object of this study was to establish the synchronous detection method, and to optimize the detecting condition of 9 kinds of organic acids (citric acid, tartaric acid, malic acid, lactic acid, formic acid, acetic acid, fumaric acid, propionic acid and butyric acid) based on the ion exclusion chromatography coupled with diode array detector (DAD). All the organic acids in this study were extracted by deionized water for further detection. A Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm, 9 μm) ion exclusion chromatography column with DAD was applied and sulfuric acid solution was taken as the flowing phase, and the different effects of chromatographic conditions such as mobile phase, flow rate, column temperature and detecting wave length on the 9 organic acids in feed acidifiers during synchronous detection were compared and analyzed. Then, the analytical methods established for all the above mentioned parameters were investigated for their linearity range, the limit of detection, the recovery rate and precision, followed by the verification using actual samples. The results showed that the best optimized parameter conditions for synchronously detecting the 9 organic acids were 0.025 mol/L sulfuric acid solution as flowing phase, flowing speed of 0.70 mL/min, column temperature of 30 °C, and 210 nm detecting wave length for DAD. The qualitative analysis of organic acids was executed based on their retention time and ultraviolet absorption spectra, while the quantitative analysis was executed based on the external standard method. According to the results of this study, it could be found that the mass concentration and the peak area had behaved nice linear correlations in specific range for the 9 organic acids, respectively, with the determination coefficients higher than 0.999. All the 9 organic acids could be successfully separated within 20 min. The limit of detection of the synchronous detection method was from 0.01 to 2.4 mg/L and the recovery rate was from 90.7% to 101.1%, while the relative standard deviation was from 0.91% to 3.33%. Bases on these results, the synchronous detection method focused in this study shows to be one of the successful ways for organic acid detecting in different animal feed acidifiers. This study can provide the technical support in further investigation of the acidifiers' application in the animal feed manufacturing factory as well as in the real market for quality assurance.

Keywords: chromatography; detectors; organic acids; diode array detector; feed acidifier; simultaneous determination