



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××× - 202×

饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的测定 高效液相色谱法

Determination of β -apo-8'-carotenoic acid ethyl ester in feeds—High
performance liquid chromatography

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

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。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：贵州省兽药饲料检测所。

本文件主要起草人：

饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯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、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的测定。

本文件配合饲料、浓缩饲料、精料补充料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的检出限为0.15 mg/kg、定量限为0.50 mg/kg，添加剂预混合饲料、混合型饲料添加剂中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的检出限为1.5 mg/kg、定量限为5.0 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

试样中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯经水分散、乙醇和二氯甲烷提取、固相萃取柱净化，用高效液相色谱仪检测，外标法定量。

5 试剂或材料

除另有规定外，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 二氯甲烷。

5.3 无水乙醇。

5.4 乙腈：色谱纯。

5.5 甲醇：色谱纯。

5.6 二丁基羟基甲苯(BHT)：分析纯。

5.7 乙腈水溶液：量取相同体积的乙腈（5.4）和水（5.1），混匀。

5.8 标准储备溶液（200 μg/mL）：称取1 mg β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品（CAS号：1109-11-1，纯度≥95%）（精确至0.01 mg），用二氯甲烷（5.2）溶解，转移至5 mL棕色容量瓶中定容，摇匀。-18 °C以下玻璃容器中避光储存（为避免反复解冻可进行适量分装），使用前超声10 min，有效期1个月。

5.9 标准系列溶液：准确移取适量标准储备溶液（5.8），用乙腈（5.4）稀释定容，混匀，配制成质量浓度分别为0.05 g/mL、0.1 g/mL、0.5 g/mL、1.0 g/mL、5.0 g/mL、20.0 g/mL、40.0 g/mL的标准系列溶液。临用现配。

5.10 亲水亲脂平衡固相萃取柱：60 mg/3 mL，或性能相当者。

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：感量为0.1 g和0.00001 g。

6.3 离心机：转速不低于8 000 r/min。

6.4 超声波清洗仪。

6.5 固相萃取装置。

6.6 氮吹仪。

7 样品

按GB/T 14699.1饲料采样标准采集并按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎过0.425 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，避光保存¹，备用。

8 试验步骤

8.1 试样溶液的制备

8.1.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

8.1.1.1 提取

平行做两份试验。称取试样5 g（精确至0.000 1 g），置于100 mL棕色容量瓶中，加入0.01 g的BHT（5.6）、15 mL水，混匀，室温超声5 min。加入50 mL无水乙醇（5.3）和30 mL二氯甲烷（5.2），混匀，室温超声20 min。冷却至室温后，用二氯甲烷（5.2）定容（V），摇匀，静置5 min。取20 mL上层提取液置于50 mL离心管中，于8 000 r/min离心5 min，准确吸取上清液5 mL（V₁）到10 mL离心管中，于50 °C水浴氮气吹干，用3 mL乙腈（5.4）复溶，再加入3 mL水，涡旋混匀，备用。

8.1.1.2 净化

净化柱（5.11）先用3 mL乙腈（5.4）和3 mL水活化，备用液（8.1.1.1）过柱，先用3 mL乙腈（5.4）洗涤离心管，再加入3 mL水洗涤，洗涤液过柱。用5 mL乙腈水溶液（5.7）

¹ 添加剂预混合饲料应按照说明书要求进行储存。

淋洗净化柱，抽干。用 5 mL 乙腈（5.4）洗脱，收集洗脱液于 50 °C 水浴氮气吹干，准确加入 1.0 mL (V_2) 乙腈（5.4）复溶，过微孔滤膜（5.12）后上机测定。

8.1.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

8.1.2.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2.5 g（精确至 0.0001 g），置于 100 mL 棕色容量瓶中，加入 15 mL 水，室温超声 5 min。加入 50 mL 无水乙醇（5.3）和 30 mL 二氯甲烷（5.2），混匀，室温超声 20 min。冷却至室温后，用二氯甲烷（5.2）定容（V），摇匀，静置，备用。

8.1.2.2 稀释

取 20 mL 提取液（8.1.2.1）至 50 mL 离心管中，于 8 000 r/min 离心 5 min，准确吸取上清液 5 mL (V_1)，用乙腈（5.4）稀释到线性范围内，过微孔滤膜（5.12）后上机测定。

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：Waters Symmetry® C18 柱²，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μ m，或性能相当者；

b) 柱温：30 °C；

c) 检测波长：445 nm；

d) 流动相：乙腈+甲醇= 20+80；

e) 流速：1.0 mL/min；

f) 进样量：20 μ L。

8.2.2 标准系列溶液和试样溶液的测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列工作溶液（5.9）和试样溶液（8.1.1.2或8.1.2.2）上机测定。 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准溶液色谱图参见附录A。

8.2.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯保留时间应与标准系列中浓度相当的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准溶液的保留时间一致，其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

8.2.4 定量

以 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准系列溶液浓度为横坐标，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。如超出线性范围，应准确移取适量试样溶液（8.1.1.2或8.1.2.2）用乙腈（5.4）稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的浓度与标准系列工作溶液的浓度相差不超过 30%。

注：色谱峰面积为反式 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯峰面积与 1.4 倍顺式 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯峰面积

² Waters Symmetry® C18 柱是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对该产品的认可。

之和，1.4 为顺式β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯对反式β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的校正因子。

9 试验数据处理

试样中β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的含量以质量分数 w 计，单位为毫克每千克 (mg/kg)。多点校准按公式 (1) 计算，单点校准按公式 (2) 计算：

$$w = \frac{\rho \leftarrow V \leftarrow V_2 \leftarrow 1000}{m \leftarrow V_1 \leftarrow 1000} \leftarrow f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——由标准工作曲线得到的试样溶液中β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的浓度，单位为微克每毫升 (g/mL)；

V ——提取液定容体积的数值，单位为毫升 (mL)；

V_1 ——用于净化的提取液体积的数值，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——净化后定容体积的数值，单位为毫升 (mL)；

m ——试样质量，单位为克 (g)；

f ——稀释倍数。

$$w = \frac{A_1 \leftarrow \rho_2 \leftarrow V \leftarrow V_2 \leftarrow 1000}{A_2 \leftarrow V_1 \leftarrow m \leftarrow 1000} \leftarrow f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A_1 ——试样溶液中β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯色谱峰面积；

ρ_2 ——标准溶液中β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯浓度的数值，单位为微克每毫升 (g/mL)；

V ——提取液定容体积的数值，单位为毫升 (mL)；

V_1 ——用于净化的提取液体积的数值，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——净化后定容体积的数值，单位为毫升 (mL)；

A_2 ——标准溶液中β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯色谱峰面积；

m ——试样质量，单位为克 (g)；

f ——稀释倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留3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的绝对差值不得超过该算术平均值的10%。

附录 A
(资料性)

β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准溶液色谱图

A.1 β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准溶液 (20.0 μg/mL) 色谱图见图 A.1

图 A.1 β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准溶液 (20.0 μg/mL) 色谱图

A.2 β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯阳性添加样品 (80 mg/kg) 色谱图见图 A.2

图 A.2 β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯阳性添加样品 (80 mg/kg) 色谱图

GB/T ×××××-202×

A.3 β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯阳性添加样品 (80 mg/kg) 色谱图见图 A.2

图 A.3 配合饲料阳性添加 (定量限: 0.5 mg/kg) 色谱图

A.4 β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯阳性添加样品 (80 mg/kg) 色谱图见图 A.2

图 A.4 添加剂预混合饲料阳性添加 (定量限: 5 mg/kg) 色谱图
