ICS

备案号：

DB34

安　徽　省　地　方　标　准

DB 34/T xxx-2019

饲料中黄芩苷的测定
高效液相色谱法

Determination of Chlorogenic acid in feed
High performance liquid chromatography method

（征求意见稿）

2019-XX-XX 发布　　2019-XX-XX 实施

安徽省质量技术监督局 发布

前　　言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。
本标准由安徽省兽药饲料监察所提出。
本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。
本标准起草单位：安徽省兽药饲料监察所等。
本标准起草人：刘发全等。

饲料中黄芩苷含量测定
高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中黄芩苷含量测定的高效液相色谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中黄芩苷含量测定。

本标准定量限为 1.0 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单）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 14699.1 饲料采样

3 原理

试样中的黄芩苷经 50%甲醇溶液超声提取，过滤后经色谱柱分离，用高效液相紫外检测器检测，以保留时间进行定性，外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 除特殊说明外，本方法所用试剂均为分析纯，用水符合 GB/T 6682 中一级用水的规定。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 50%甲醇水溶液：量取 500mL 甲醇（4.2）和水 500mL，混匀，作为提取溶液

4.5 磷酸。

4.6 流动相 A：乙腈

4.7 磷酸水溶液（0.025mol/L）：取磷酸 1.8 mL，加水至 1000 mL。

4.8 流动相 B：磷酸溶液（0.025mol/L）。

4.9 黄芩苷标准品：纯度≥98.0%。

4.10 黄芩苷标准溶液的制备

4.10.1 黄芩苷标准溶液贮备液：精确称取 20mg 黄芩苷标准品(精确至 0.01mg)于 200 mL 容量瓶中，用流动相（4.5）溶解，冷却，此溶液浓度为 100 μg/mL。置于 4℃冰箱中保存，有效期 60 天。

4.10.2 黄芩苷标准工作溶液：分别吸取贮备液（4.7.1）1 mL、2 mL、5 mL、10 mL、20 mL 于 100 mL 容量瓶中，用流动相溶液（4.5）定容，标准工作溶液系列浓度分别为 1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪(配紫外检测器)。

5.2 分析天平：感量 0.1 mg、0.01 mg。

5.3 离心机：≥3000 r/min。

5.4 超声波仪。

5.5 分析筛：孔径 0.42 mm。

5.6 粉碎机。

5.7　微孔滤膜：孔径 0.45 μm 尼龙滤膜。

6　试样的制备

按 GB/T 14699.1 规定采样，选取饲料样品 500 g 以上，四分法缩减至 100 g，磨碎，全部通过分析筛(5.5)，充分混匀，装入磨口瓶中备用。

7　分析步骤

7.1　提取

7.1.1 称取试样适量（配合饲料 5.0 g、浓缩饲料 3.0 g、预混合饲料 1.0 g），精确至 0.001g，置于 50 mL 容量瓶中，用甲醇溶液（4.4）准确定容，置于超声波仪（5.4）超声提取 30 min。

7.1.2 将试样提取液（7.1.1）转移至离心管，3000 r/min，离心 10 min，取离心上清液用 0.45 μm 尼龙滤膜过滤，滤液作为试样溶液上机测定。

7.2　测定

7.2.1　高效液相色谱条件

色谱柱：C_{18}型柱，长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或相当性能 C_{18}柱；

检测波长：327 nm；

流动相：A：乙腈，B：磷酸溶液（0.025mol/L）淋洗梯度见表 1；

流速：1.0 mL/min；

柱温：25℃；

进样体积：20 μL。

7.2.2　上机测定

黄芩苷标准工作溶液和试液（上机液）分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积进行计算。

表1高效液相色谱淋洗梯度

时间（分钟）	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~12	16	84
12~16	16→32	84→68
16~23	32	68
23~27	32→16	68→84
27~30	16	84

7.3　结果的计算与表述

7.3.1　计算公式

结果按式(1)计算：

$$X=\frac{C\times V}{m}\times f \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X---试样中黄芩苷含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C---试液色谱峰对应的黄芩苷浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m---试样质量，单位为克（g）；

V---定容体积，单位为毫升（mL）

f---稀释倍数。

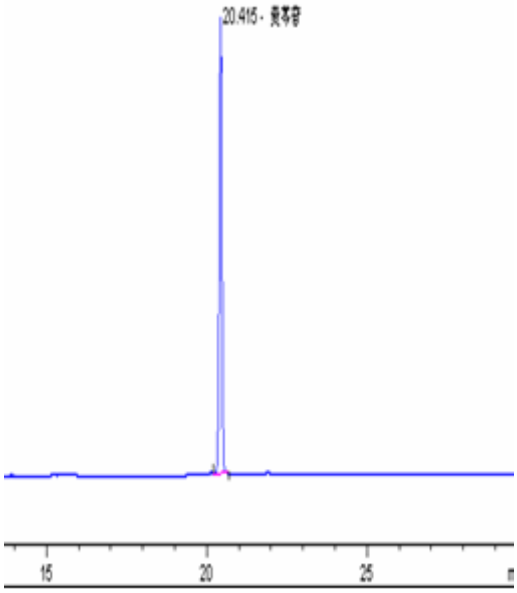
7.3.2 结果表示

平行测定结果用算术平均值表示，计算结果保留 3 位有效数字。

8 精密度

同一分析者对同一试样同时两次平行测定结果的相对偏差不大于 10%。

附　录　A
（资料性附录）
黄芩苷标准图谱



图A.1黄芩苷标准溶液色谱图