

饲料中 β -胡萝卜素的测定 高效液相色谱法

Determination of β -carotene in feeds—
High performance liquid chromatography

(报批稿)

前 言

本标准按照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。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由浙江省农业农村厅提出。

本标准由浙江省畜牧兽医和饲料标准化技术委员会（ZJQS/TC33）归口。

本标准起草单位：浙江省动物疫病预防控制中心（浙江省兽药饲料监察所）。

本标准主要起草人：施杏芬、吕伟军、阮鑫、张志健、裘丞军、吴望君、商小金。

饲料中 β -胡萝卜素的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中 β -胡萝卜素的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料中 β -胡萝卜素的测定。

本标准配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的定量限为 1 mg/kg, 添加剂预混合饲料定量限为 2 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 6682-2008 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 -胡萝卜素经碱溶液超声皂化, 生成全反式 β -胡萝卜素, 经石油醚萃取, 减压浓缩后, 用高效液相色谱法测定, 外标法定量。

5 试剂或材料

5.1 除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。

5.2 水: GB/T 6682-2008, 一级。

5.3 甲醇: 色谱纯。

5.4 异丙醇: 色谱纯。

5.5 二氯甲烷: 色谱纯。

5.6 石油醚(沸程 $30^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$)。

5.7 正己烷

5.8 无水硫酸钠。

5.9 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)。

5.10 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)。

5.11 L-抗坏血酸乙醇溶液: 称取L-抗坏血酸0.5 g, 加4 mL水加热溶解, 用无水乙醇稀释至100 mL混匀(现配现用)。

5.12 50%氢氧化钾溶液: 称取氢氧化钾50 g, 加水100 mL溶解, 混匀。

5.13 饱和氯化钠溶液: 先将烧杯中的水煮沸, 向沸水中边搅拌边加入氯化钠, 直到有固体颗粒析出, 将此溶液冷却至室温。

5.14 标准储备溶液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 称取全反式 β -胡萝卜素标准品(CAS: 7235-40-7, 纯度不低于95%) 50 mg(精确至0.01 mg)至100 mL棕色容量瓶中, 加入10 mL二氯甲烷(5.4)溶解, 用二氯甲烷(5.4)稀释并定容至刻度, 混匀, 每次临用前按附录A标定。 -20°C 保存, 有效期2个月。

5.15 标准中间溶液（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：精确移取 β -胡萝卜素标准储备溶液（5.13）10.0 mL于50 mL棕色容量瓶中，加入二氯甲烷（5.4）稀释并定容。于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期为1周。

5.16 标准系列溶液：精确移取适量 β -胡萝卜素标准中间溶液（5.14）于100 mL棕色容量瓶中，用流动相稀释定容配成系列标准溶液，浓度分别为0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。临用现配。

5.17 微孔滤膜：0.45 μm ，有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器/二极管阵列检测器。

6.2 分析天平：感量分别为0.001 g和0.01mg。

6.2 超声波清洗器。

6.3 旋转蒸发仪。

6.4 旋涡仪。

6.5 分光光度计。

7 样品

按GB/T 20195制备试样，至少200 g，粉碎使其全部通过0.42 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶中，避光保存，备用。

8 试验步骤

警示——应避免光操作！

8.1 皂化

平行做两份试验。称取试样配合饲料、精料补充料、浓缩饲料2 g~5 g或添加剂预混合饲料0.2 g~1 g，精确至0.001 g，置于250 mL具塞棕色三角瓶，加入 EDTA（5.8）1 g，边摇边加入L-抗坏血酸乙醇溶液（5.10）50 mL使试样完全分散、浸湿，加入10 mL 50%氢氧化钾溶液（5.11），混匀，50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热超声皂化20 min，不时振荡防止试样粘附在瓶底和瓶壁上，皂化结束后取出迅速冷却至室温。

8.2 提取

将皂化液转移至盛有80 mL石油醚（5.5）的500 mL分液漏斗中，用30 mL~50 mL水分2次~3次冲洗棕色三角瓶并入分液漏斗，旋紧瓶塞，轻轻振荡，放气，静置分层。转移水相至另一分液漏斗中，加入60 mL石油醚（5.5）重复提取两次，弃去水相，合并三次石油醚相。用100 mL饱和氯化钠溶液（5.12）洗涤石油醚提取液一次，轻轻旋摇防止乳化，弃去水相；再用水洗涤石油醚提取液至中性。石油醚提取液过无水硫酸钠（5.7）过滤脱水，转移至放有几粒BHT（5.9）的250 mL棕色容量瓶中，用石油醚（5.5）定容，摇匀。

8.3 浓缩

从石油醚提取液（8.2）中（V）分取一定体积（ V_1 ）于旋转蒸发器烧瓶中，置于40 $^{\circ}\text{C}$ ±2 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至近干，残渣用流动相5.00mL（ V_2 ）复溶解，使每毫升含 β -胡萝卜素10 μg 以下，旋涡混匀，用0.45 μm 滤膜（5.16）过滤备用。

8.4 测定

8.4.1 色谱条件

8.4.1.1 色谱柱：SB-C₁₈柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5.0 μm ，或性能相当者。

8.4.1.2 流动相：甲醇+异丙醇+二氯甲烷=80+17+3。

8.4.1.3 流速：1.5 mL/min。

8.4.1.4 柱温：30℃。

8.4.1.5 进样量：20 μL。

8.4.1.6 检测波长：450 nm。

8.4.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（5.15）和试样溶液（8.3）上机测定。β-胡萝卜素标准溶液的液相色谱图见附录B。

8.4.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中β-胡萝卜素保留时间应与标准系列溶液中β-胡萝卜素的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

8.4.4 定量

以β-胡萝卜素标准系列溶液中的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.999。试样溶液与标准溶液中β-胡萝卜素的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应将试样提取液用流动相稀释（稀释倍数n）至线性范围内，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中β-胡萝卜素的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

9.1 计算

试样中β-胡萝卜素的含量以质量分数计。多点校准按公式（1）计算，单点校准按公式（2）计算：

$$W = \frac{C \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中：

W——试样中β-胡萝卜素的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C——从标准曲线查得的试样溶液中β-胡萝卜素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

V₁——旋转蒸发时所用试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

V₂——旋转蒸发后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）；

n——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

$$W = \frac{A \times C_s \times V \times V_2 \times 1000}{A_s \times V_1 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

W——试样中β-胡萝卜素的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A——试样溶液中β-胡萝卜素的峰面积；

A_s——标准溶液中β-胡萝卜素的峰面积；

C_s——标准溶液中β-胡萝卜素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

V₁——旋转蒸发时所用试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

DB33/T XXXX—XXXX

V_2 —— 旋转蒸发后复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量，单位为克（g）；

n —— 超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

9.2 结果的表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

附录 A

(规范性)

标准储备溶液浓度标定方法

取 β -胡萝卜素标准储备溶液(浓度约为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)10 μL ,注入含3.0 mL正己烷(5.6)的比色皿中,混匀。比色皿厚度为1 cm,以正己烷(5.6)为空白,用分光光度计进行测定,入射光波长为450 nm,测定其吸光度值,平行测定3次,取均值。

溶液浓度按式(A.1)计算:

$$X = \frac{A}{E} \times \frac{3.01}{0.01} \dots\dots\dots \text{(A.1)}$$

式中:

X —— β -胡萝卜素标准储备溶液的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A —— β -胡萝卜素标准储备溶液的紫外吸光值;

E —— β -胡萝卜素在正己烷中的比吸光系数为0.2620;

$\frac{3.01}{0.01}$ ——测定过程中稀释倍数的换算系数。

附录 B

(资料性)

β-胡萝卜素标准溶液的高效液相色谱图

β-胡萝卜素标准溶液的高效液相色谱图见图 B.1。

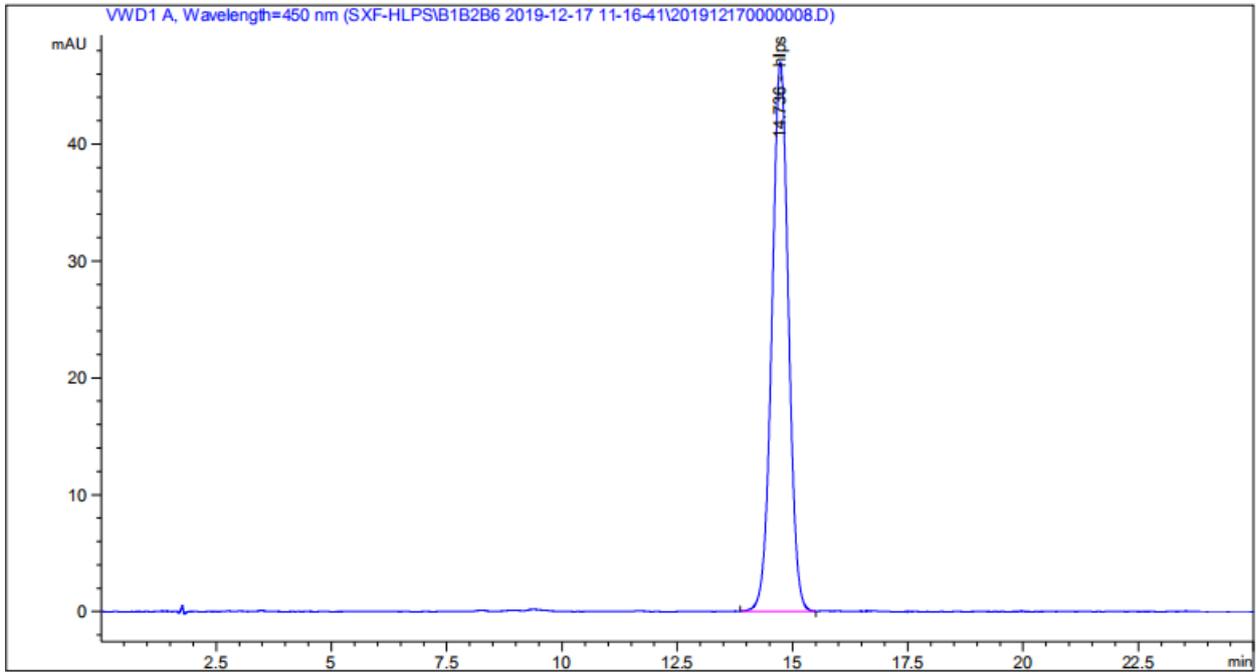


图 B.1 β-胡萝卜素标准溶液 (6.657 μg/mL) 的高效液相色谱图