

中华人民共和国国家标准

饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的
测定 高效液相色谱法

编制说明

(公开征求意见稿)

贵州省兽药饲料检测所

2023年12月

目 录

一、工作简况	1
1.1 任务来源	1
1.2 制定背景	1
1.3 工作过程	3
2.1 编制原则	4
2.2 方法试验条件研究	4
2.2.1 试验材料	4
2.2.2 顺、反式 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的校正因子	4
2.2.3 色谱条件的选择和优化	5
2.2.4 样品提取条件的选择和优化	12
2.2.5 净化方法的选择和优化	16
2.2.6 标准工作曲线	20
2.2.7 试验步骤	21
2.3 方法主要技术指标	24
2.3.1 线性范围	24
2.3.2 检出限和定量限	24
2.3.3 专一性试验	27
2.3.4 精密度试验	28
2.3.5 添加回收试验	28
2.3.6 方法耐用性	43
2.4 标准储备溶液有效期考察	44
2.5 方法适用性考察	44
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果	46
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况	46
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准	46
六、与有关法律、法规的关系	46
七、重大分歧意见的处理经过和依据	46
八、涉及专利的有关说明	46
九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议	46
十、其他应当说明的事项。	47
参考文献	48

一、工作简况

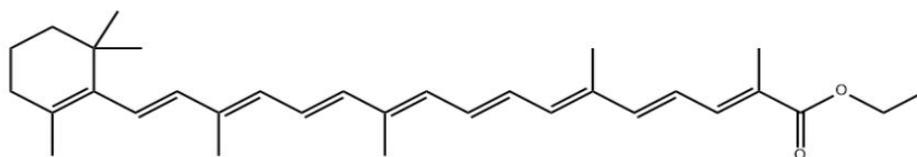
1.1 任务来源

根据国家标准化管理委员会《国家标准化管理委员会关于下达 2021 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》(国标委发[2019] 29 号), 本标准修订项目编号为 20213330 -T-469, 项目名称为《饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的测定 高效液相色谱法》, 项目主持单位为贵州省兽药饲料检测所。本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

1.2 制定背景

β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯又叫阿朴胡萝卜素酸乙酯、天然橙 7 号或阿朴酯等, 是类胡萝卜素中一种含氧的阿朴胡萝卜素类化合物, 在食品工业中主要用于食用油脂、人造奶油、果酱、果冻及饮品类产品的着色^[1]。在饲料工业中广泛应用于肉禽, 尤其是肉鸡的皮肤、脚胫、脂肪的着色以及禽类蛋黄的着色, 在目标组织中沉积率较高, 着色效果显著高于 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛及万寿菊提取物^[2-5]。部分文献表明, 家禽日粮中添加一定量的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯可提高家禽机体免疫力, 促进雏禽发育^[6-9]。

β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯广泛存在于自然界中, 主要是青草、紫花苜蓿、绿色蔬菜和柑橘类水果中阿朴胡萝卜素醛的代谢产物。尚未发现有价值的可以从天然原料中提取的方法, 故目前主要依靠全合成的方法进行商业化生产。 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯纯品通常为红紫色的结晶, 分子式为 $C_{32}H_{44}O_2$, 分子量 460.70^[10]。有全反式和顺式 2 种几何异构体(不同的制备方法, 其顺/反异构体的比例会不同, 自然界全反式比例为 70%-90%), 在正己烷中的最大吸收波长为 449 nm, 熔点 139°C, 易溶于氯仿, 微溶于植物油, 极难溶于乙醇, 不溶于水和



甘油, 对氧和光极不稳定。

图 1 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯结构式

经调研，贵州、云南、广东、广西、上海等省份对禽产品消费心理均以肉鸡膘黄、脚黑，鸡蛋心红、壳绿作为优质产品的判定指标，养殖场习惯使用着色剂提高产品竞争力。我国《饲料添加剂品种目录（2013）》（农业农村部公告第2045号）及《饲料添加剂安全使用规范》（农业农村部公告第2625号）规定 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯在禽饲料限量为80 mg/kg。

前期调研发现： β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯使用广泛、添加混乱、检测标准缺失、养殖者认知匮乏、不利监管等问题。一是禽饲料中使用广泛。2019年至今，贵州省兽药饲料检测所累计检测11个省禽饲料409批， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯检出率24.7%，配合饲料、浓缩饲料及添加剂预混合饲料折算为日粮含量主要在2.0~10.0 mg/kg。二是添加剂中未检出。累计检测添加剂及混合型添加剂24批，均未检出 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯。添加剂中添加会增加成本，在养殖者无需求，不会添加或添加廉价的着色剂。三是没有法定检测方法标准，国内尚无饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量检测推荐性国家标准或行业标准，各级管理部门无法开展执法检查；四是使用现状混乱无规律。养殖者对添加阶段、添加量、添加配比、添加时间、成色效果的使用没有标准。因此，建立一种快速、准确测定饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量的标准方法，填补技术空白，有利于行业主管部门开展饲料中着色剂规范使用监管工作，指导安全、科学、绿色养殖，确保饲料和禽产品的质量安全，引导社会健康消费，保障人民的身体健康，推动产业高质量发展。

国内关于斑螫黄的检测较多，主要有分光光度法、薄层色谱法（TLC）、高效液相色谱法（HPLC）、高效液相色谱法-质谱联用法（HPLC-MS/MS）等^[11-16]，发布有农业农村部行业标准《饲料中斑螫黄的测定 高效液相色谱法》（NY/T 2896-2022）^[17]。目前国内仅有针对10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂（粉剂）的国家推荐标准^[18]，尚无饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量检测的强制性或推荐性标准，且检验方法相对较少。栾庆祥等^[19-20]将均质混匀后的禽蛋用乙腈提取，使用超高效液相色谱法（UPLC）测定禽蛋中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量。杨梅等^[21]采用固相萃取技术处理样品，通过超高效液相色谱-串联质谱法（UPLC-MS/MS）对禽蛋中的斑螫黄和进行分离和检测。章厉劼等^[22]参照饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛检测方法，使用甲醇、正己烷和乙酸乙酯提取饲料中的斑螫黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯，经超高效液相色谱法（UPLC）测定含量。

综合参考斑蝥黄及 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯现行标准及文献中的检测方法，高效液相色谱法（HPLC）操作简便、检测准确、利于推广，能够满足检测机构在实际检测中的定性和定量要求。本研究拟制定《饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的测定 高效液相色谱法》，采用水分散试样，再用无水乙醇和二氯甲烷提取饲料中的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯，用固相萃取小柱对目标物进行净化和富集，最后采用反相 HPLC 法进行分析，用外标法定量试样中顺、反式 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的总量。

1.3 工作过程

1.3.1 成立标准起草小组

2021 年 8 月计划任务下达。由贵州省兽药饲料检测所作为牵头单位，成立标准起草小组，对标准起草工作进行分工，明确各自职责和任务。

1.3.2 调研和工作布置

2021 年 9 月，起草小组系统汇总分析了以前工作过程中广泛查阅和搜集的国内外相关标准和技术资料，通过主要生产厂家的解 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯产品信息。经认真分析研究，参考斑蝥黄等着色剂标准内容，结合近年贵州省饲料质量预警监测任务发现的问题，起草小组确定了标准的总体框架，拟定了标准的范围、技术要求等主要内容。

1.3.3 样品收集及试验

2021 年 8 月-2023 年 4 月，起草小组在资料汇总、调研的基础上，多渠道（包括但不限于生产、销售和使用环节）收集不同生产厂家生产的饲料样品，并组织开展了标准技术要求中规定项目的实验室试验研究工作，制定了饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量测定方法。对试验数据进行整理、分析，撰写标准文本和编制说明，2023 年 6 月形成了《饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的测定 高效液相色谱法》（定向征求意见稿）。

1.3.4 征求意见情况

2023 年 6 月将《饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的测定 高效液相色谱法》（定向征求意见稿）与编制说明（定向征求意见稿）邀请全国相关领域专家征求意见，共收到 20 名专家，99 条意见。起草小组根据相关意见对标准进行修改，形成公开征求意见稿。

1.3.5 方法验证情况

2023年8月至11月，由上海市兽药饲料检测所、河南省农畜水产品检验技术研究院、辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院完成方法验证工作。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

2.1 编制原则

本标准的编写制定过程以提高测试方法的选择性、准确度、精密度、检出限和分析效率为总原则，反映现代仪器分析科学技术的先进成果和先进经验。

本标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写及表述按照 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》、GB/T 5009.1 - 2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》和 GB/T 20001.4 - 2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求编写。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

2.2 方法试验条件研究

2.2.1 试验材料

β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯（纯度 $\geq 99.8\%$ ）购自瑞士 Carote Nature 公司。色谱级甲醇和乙腈购自德国 Merck 公司。Bond Elut Plexa 固相萃取柱（60 mg, 3 mL）购自美国 Agilent 公司。分析纯无水乙醇、二氯甲烷、三氯甲烷和光学纯环己烷购自国药集团化学试剂有限公司。

高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器（Ultimate 3000，美国 Thermo Scientific 公司；E2695，美国 Waters，公司）、紫外分光光度计（Gcnscys 180，美国 Thermo Scientific 公司）、超声波清洗器（KQ-250D，昆山市超声仪器有限公司）、超纯水仪（Millipore，德国 EMD Millipore 公司）、万分之一天平（AB104-S，瑞士 Mettler Toledo 公司）、十万分之一天平（XSR205DU，瑞士 Mettler Toledo 公司）、高速冷冻离心机（3K15，德国 Sigma 公司）、氮吹仪（FV64，广州德泰公司）。

2.2.2 顺、反式 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的校正因子

高效液相色谱仪在检测 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯时，需分别检测顺、反式 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的峰面积进行计算，参考欧洲饲料添加剂生产商协会

(FEFANA) 标准《FEFANA Task Force Analytical Carotenoids Determination of Stabilised Apoester in Premixes and Feedstuffs》(FEFANA-SJ-Apoester-002) 规定, β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯色谱峰面积为反式 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。

2.2.3 色谱条件的选择和优化

2.2.3.1 流动相的选择

试验选用 C₁₈ 色谱柱 (Waters Symmetry®C₁₈ 4.6×250 mm, 5 μ m), 参考《饲料中斑螫黄的测定 高效液相色谱法》(NY/T 2896-2022)、《饲料中角黄素的高效液相色谱法》等文献中流动相比比例对禽配合饲料阳性添加样品的检测情况, 结果见表 1, 色谱图见图 2-5。试验结果发现: 乙腈-水 (体积比为 95: 5)、乙腈-0.1%甲酸水 (体积比为 90: 10) 出峰时间均过晚, 影响检测效率。乙腈-甲醇 (体积比为 20:80) 与乙腈-甲醇 (体积比为 95: 5) 流动相出峰时间较理想, 分离度符合要求, 峰型较好, 但后者成本较高, 毒性相对较大, 因此选用乙腈-甲醇 (体积比为 20:80) 为本方法流动相。

表 1 不同流动相检测 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯情况结果

流动相比例	出峰时间 (min)	峰面积 (mAU*min)	峰高 (mAU)	分离度	不对称度	理论塔板数	来源
乙腈-水 (95: 5)	35.293	72.8717	99.54	2.07	1.08	14910	饲料中斑螫黄的测定 高效液相色谱法 (NY/T 2896 - 2022)
乙腈-0.1%甲酸水 (90-10)	60 min 内未出峰	/	/	/	/	/	超高效液相色谱法测定饲料中斑螫黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量方法的研究
乙腈-甲醇 (95: 5)	16.793	67.5943	218.74	1.75	1.08	18181	饲料中角黄素的高效液相色谱法
乙腈-甲醇 (20: 80)	13.337	83.5037	256.83	1.72	0.88	12094	优化后方法

图 2 禽配合饲料阳性添加色谱图 (80 mg/kg, 流动相为甲醇-乙腈, 比例为 80:20)

图 3 禽配合饲料阳性添加色谱图 (80mg/kg, 流动相为乙腈-水, 比例为 95:5)

图 4 禽配合饲料阳性添加色谱图 (80mg/kg, 流动相为乙腈-0.1%甲酸水, 比例为 90:10)

图 5 禽配合饲料阳性添加色谱图 (80mg/kg, 流动相为乙腈-甲醇, 比例为 95:5)

2.2.3.2 检测波长选择

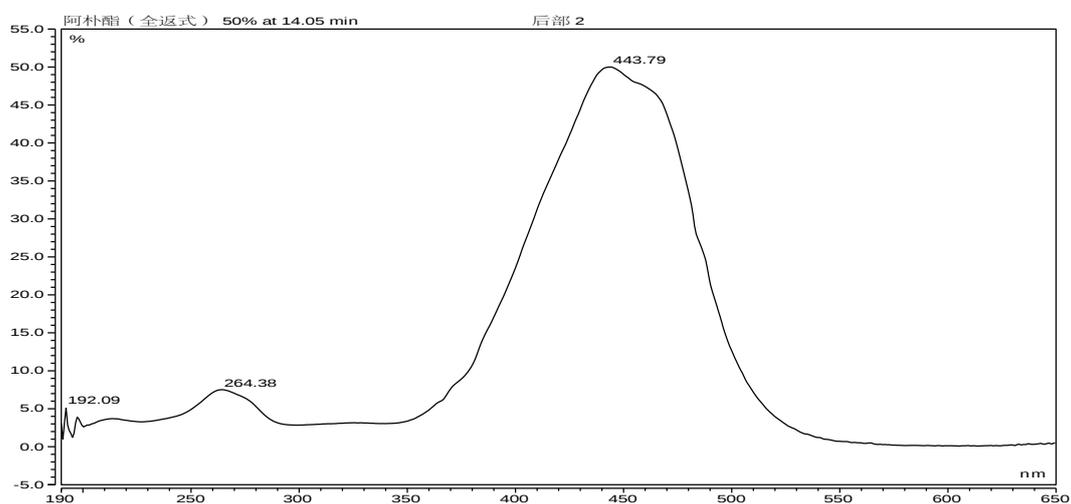


图 6 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品紫外吸收光谱图 (扫描范围 190-650 nm)

在上述流动相 (2.2.2.1) 条件下, 通过二极管阵列检测器检测 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品 (扫描范围 190-650 nm), 得出色谱峰紫外吸收光谱图见图 6, 因此选择紫外检测波长为 445 nm。

2.2.3.3 色谱柱选择

分别选用 Waters Symmetry®C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 粒径 5 μ m)、Agilent SB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 粒径 3.5 μ m)、Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 粒径 5 μ m) 和 Thermo scientific ODS-2 Hypersil™ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 粒径 5 μ m) 检测禽配合饲料阳性添加样品 (80 mg/kg), 检测结果见图 7-10。

图 7 禽配合饲料阳性添加色谱图 (Waters Symmetry®C18 色谱柱)

图 8 禽配合饲料阳性添加色谱图 (Agilent SB C18 色谱柱)

图 9 禽配合饲料阳性添加色谱图 (Agilent ZORBAX SB C18 色谱柱)

图 10 禽配合饲料阳性添加色谱图（Thermo scientific ODS-2 Hypersil™ 色谱柱）

检测结果表明，Waters Symmetry®C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm，粒径 5 μm）分离效果最佳，峰型较好，因此确认本方法使用色谱柱为 Waters Symmetry®C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm，粒径 5 μm）。

2.2.3.4 流动相流速选择

为检测流动相不同流速对检测的影响，试验分别设置 0.8、1.0、1.2 mL/min 的流速，通过检测禽配合饲料阳性添加样品（80mg/kg）色谱图进行比较。检测结果见图 11-13，综合出峰时间、分离效果，设定方法流动相流速为 1.0 mL/min。

图 11 禽配合饲料阳性添加色谱图（设定流速：1.0 mL/min）

图 12 禽配合饲料阳性添加色谱图（设定流速：0.8 mL/min）

图 13 禽配合饲料阳性添加色谱图（设定流速：1.2 mL/min）

2.2.3.5 色谱柱温度选择

图 14 禽配合饲料阳性添加色谱图（设定柱温：25℃）

为检测色谱柱柱温对检测的影响，试验分别设置 25℃、30℃、35℃的柱温，通过检测禽配合饲料阳性添加样品（80 mg/kg）色谱图进行比较。检测结果见图 14~图 16。

图 15 禽配合饲料阳性添加色谱图（设定柱温：30℃）

图 16 禽配合饲料阳性添加色谱图（设定柱温：35℃）

结果表明，柱温为 25℃时出峰时间较晚，色谱峰型不佳；柱温度为 35℃时，顺反 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯分离效果相对较差，因此确定本方法色谱柱柱温为 30℃。

2.2.3.6 色谱条件的确定

根据以上试验，最终选择液相色谱参数如下：

Waters Symmetry®C₁₈ 柱，250 mm×4.6 mm，粒径 5 μ m；

流动相为甲醇-乙腈（体积比为 80:20），

流速为 1 mL/min;

检测波长: 445 nm。

2.2.4 样品提取条件的选择和优化

2.2.4.1 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯阳性添加样品的配制

β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯在生产过程中, 往往会在表面包被木质素磺酸盐, 使用标准物质制备阳性添加样品检测回收率的方法不能完全模拟试验提取过程。因此, 试验以 10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂(粉剂)作为标准品添加入配合饲料中, 以检测不同提取方法的提取效果。10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂按照《饲料添加剂 10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯(粉剂)》(GB/T 21516-2008)检测出实际含量, 结果见表 2。

表 2 国标法检测 10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂的结果

样品名称	称样量(g)	吸光度	质量分数(%)	平均值(%)	RSD 值(%)
添加剂 1	0.1002	0.508	10.1		
添加剂 1	0.1016	0.509	10.0		
添加剂 1	0.0991	0.502	10.1	10.1	0.82
添加剂 1	0.1004	0.506	10.1		
添加剂 1	0.1018	0.506	9.94		

精密称取适量 10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂, 加入配合饲料中, 混合均匀, 制备 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯添加浓度为 80 mg/kg 的阳性添加样品。

2.2.4.2 提取方法选择

β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯与斑蝥黄理化性质相似, 试验选取标准或文献中提取方法, 分别提取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料阳性添加样品(80 mg/kg), 上液相色谱仪检测并计算含量。结果见表 3。

结果表明, 《饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法》(NY/T 2896-2022)与《超高效液相色谱法测定饲料中斑蝥黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量方法的研究》的提取方法效果相对较好, 但后者步骤较为繁琐。同时在养殖环节, β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯与斑蝥黄一般同时使用, 农业农村部公告第 2625 号规定 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯与斑蝥黄等常用着色剂在禽饲料中含量总计不能超过 80 mg/kg, 如需要同时检测这两种着色剂, 采用同一提取方法能够简便步骤, 提高效率。因此饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的提取方法主要参照《饲料中斑

螯黄的测定 高效液相色谱法》(NY/T 2896 - 2022), 后续优化试验在该方法的基础上进行。

表 3 不同提取方法提取β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的情况

方法来源	主要提取步骤	回收率 (%)	结果分析
饲料添加剂 10%β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯(粉剂) GB/T 21516-2008	准确称取阳性添加样品 5 g 于 250 mL 棕色容量瓶中, 加入 10mL 预热至 60℃的水, 水浴超声处理 20 min。冷却后, 加入 100 mL 无水乙醇和 100 mL 三氯甲烷, 摇匀后常温水浴超声处理 5 min, 用三氯甲烷定容。	88.0	提取试剂比例不适用于检测配合饲料, 且试剂用量过大
饲料中斑螯黄的测定 高效液相色谱法 NY/T 2896 - 2022	准确称取阳性添加样品 5 g 于 100 mL 棕色容量瓶中, 加入 15 mL 预热至 60℃的水, 并在 60℃水浴中超声处理 5 min。冷却后, 加入 50 mL 无水乙醇和 30 mL 二氯甲烷, 摇匀后常温水浴超声处理 20 min, 用二氯甲烷定容。	102.3	提取效果较好
土鸡蛋中添加剂斑螯黄的色谱质谱连用检测方法研究 (参考文献)	准确称取阳性添加样品 5 g 于 100 mL 棕色容量瓶中, 加入 50 mL 乙腈, 超声处理 30 min。冷却后用乙腈定容。	9.36	β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯由木质素磺酸盐进行包被, 纯乙腈无法提取。
超高效液相色谱法测定饲料中斑螯黄和β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量方法的研究 (参考文献)	准确称取阳性添加样品 2 g 于 50 mL 离心管中, 分别加入水 8 mL, 饱和氯化钠溶液 4 mL, 0.05% 乙酸溶液 4 mL, 摇匀, 加入提取剂(甲醇、乙酸乙酯、正己烷, 体积比为 1:1:1) 10 mL, 涡旋 2 min, 然后与 5000 r/min 离心 5 分钟, 用滴管吸取上层萃取液于另一个离心管, 再加入提取剂 10 mL 进行萃取, 重复 3 次, 合并萃取液后, 加入 2 mL 无水乙醇, 于 40℃下氮气吹干。用甲基叔丁基醚-乙腈(1+9)溶液 5.0 mL 溶解残余物。	105.5	操作相对繁琐
饲料中角黄素的高效液相色谱法测定 (参考文献)	准确称取阳性添加样品 5 g 于 100mL 具塞离心管中, 加入 30 mL 乙腈和 20 mL 乙腈饱和的正己烷溶液, 在加入 10g 无水硫酸钠, 涡旋, 离心。移入分液漏斗中, 收集乙腈层, 重复 1 次, 合并萃取液后 40℃氮吹至 2 mL, 甲醇定容至 10mL。	9.78	提取效果较差, 且操作相对繁琐

2.2.4.3 提取方法优化

(1) 提取试剂优化

《饲料中斑螯黄的测定 高效液相色谱法》(NY/T 2896 - 2022) 提取方法使用二氯甲烷作为主要提取试剂, 但更多文献表明: β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯易

溶于三氯甲烷。使用三氯甲烷与二氯甲烷进行对比，分别提取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料阳性添加样品（80 mg/kg），试验结果见表 4。结果表明，两种提取试剂检测结果接近，都能够有效提取饲料中的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯，但三氯甲烷毒性更大，为易制毒试剂，管控严格。因此确定采用二氯甲烷作为提取试剂。

表 4 二氯甲烷与三氯甲烷提取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的情况

提取试剂	回收率 (%)					平均回收率 (%)
二氯甲烷	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3
三氯甲烷	110.6	98.7	105.3	106.2	106.0	105.6

(2) 提取试剂比例优化

参照《饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法》（NY/T 2896-2022）中提取步骤：称取适量样品进 100 mL 容量瓶中，加入 15 mL 水，并在常温水浴中超声处理 5 min。冷却后，加入 50 mL 无水乙醇和 30 mL 二氯甲烷，摇匀后常温水浴超声处理 20 min，用二氯甲烷定容，提取试剂比例为水-乙醇-二氯甲烷（15:50:35）。试验调整不同提取试剂的比例，分别按步骤检测 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料阳性添加样品（80 mg/kg），对提取效果进行比较，试验结果见表 5。

表 5 不同比例提取试剂提取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的情况

提取试剂比例	回收率 (%)					平均回收率 (%)
水-乙醇-二氯甲烷 (15:50:35)	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3
乙醇-二氯甲烷 (50:50)	6.91	6.67	6.88	6.69	6.90	6.81
水-二氯甲烷 (15:85)	提取溶液分层，无法定容					/
二氯甲烷 (100)	7.18	7.04	7.16	7.02	7.14	7.11

结果表明， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯表面往往进行包被，二氯甲烷直接提取效果较差。先添加水打开包被，能够提高提取效果，二氯甲烷无法与水互溶，分层会导致无法定容，添加一定比例的无水乙醇能够有效促使两者相溶。因此确定各步骤提取试剂比例为水-乙醇-二氯甲烷（15:50:35）。

2.2.4.4 超声温度优化

参照《饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法》(NY/T 2896-2022)提取方法,分别添加不同温度的水并设置不同超声温度,对 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料阳性添加样品(80 mg/kg)进行提取试验,检测结果如表 7,结果表明添加不同温度的蒸馏水对提取结果无较大影响,因此设定超声提取温度为室温。

表 7 不同超声温度提取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的情况

提取温度(°C)	回收率(%)					平均回收率(%)
室温	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3
40	103.8	95.7	104.1	95.8	104.7	100.8
60	106.2	102.2	105.4	102.3	105.4	104.7

2.2.4.5 超声时间优化

超声提取法是利用超声波的空化作用、机械效应和热效应等加速有效物质的释放、扩散和溶解,显著提高提取效率的提取方法。试验分别设置超声 10 min、20 min、30 min 以及不超声来比较超声时间对提取效果的影响。试验结果见表 8。综合比较,超声 20 min 效果最佳,确定方法的超声时间为 20 min。

表 8 不同超声时间提取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的情况

超声时间(min)	回收率(%)					平均回收率(%)
0	87.1	82.1	82.2	86.2	92.6	86.0
5	94.5	95.2	96.3	95.6	97.8	95.9
10	98.6	92.7	93.7	98.2	105.5	97.7
20	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3
30	96.6	102.2	100.4	105.3	108.4	102.8

2.2.4.6 称样质量的选择

试验分别精密称取 2.5 g、5 g、10 g(精确至 0.1 mg)阳性配合饲料(80 mg/kg),通过回收率比较不同称样质量对检测结果的影响,检测结果见表 9,结果表明,称样量为 2.5 g、5 g 时,回收率与相对标准偏差均良好;称样量为 10 g 时,添加 15 mL 水不能完全润湿全部饲料,无法有效提取,使用 2 倍的提取试剂则会显著

提高成本。为保证样品检测结果的稳定性，因此本方法设置配合饲料、浓缩饲料、精料补充料称样量为 5 g，添加剂预混合饲料含量较高，设置称样量为 2.5 g。

表 9 不同称样质量提取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的情况

称样质量 (g)	回收率 (%)					平均回收率 (%)	RSD (%)
2.5	99.9	97.1	99.9	97.0	99.2	98.8	1.6
5	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3	2.4
10	20.7	22.2	33.0	21.9	23.3	24.2	20.6

2.2.4.7 样品粉碎细度的选择

试验选择未粉碎的阳性配合饲料，粉碎后分别过 0.425 mm 和 0.25 mm 试验筛，检测两种粉碎细度筛下物中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的含量，结果见表 10。结果表明，0.425 mm 和 0.25 mm 两种粉碎细度对饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的测定结果影响较小，为提高检测效率，因此确定样品参数为：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，避光密闭保存。

表 10 不同粉碎细度提取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的情况

粉碎细度 (mm)	回收率 (%)					平均回收率 (%)	RSD (%)
0.425	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3	2.4
0.250	90.9	104.0	97.8	104.2	103.0	100.0	5.7

2.2.5 见光见氧稳定性考察

部分文献表明， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯对光和氧不稳定，为检测提取条件下光照和氧对饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯是否存在影响，试验配制 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品，在室温、光照射且接触氧气的情况下放置，12h 内每隔 1h 上机检测一次峰面积，结果见表 11。

结果表明：24h 内，室温提取条件下，光照、氧对 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯无明显影响，不影响饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的提取结果，因此无需针对光和氧做特殊处理。

表 11 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯在光照和氧条件下稳定性的情况

标准品浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测时间 (h)	峰面积 (mAU*min)	RSD (%)
20	0	88.2902	
20	1	88.8592	
20	2	88.7077	
20	3	88.7675	
20	4	88.8276	
20	5	88.6559	
20	6	88.6830	0.23
20	7	88.6863	
20	8	88.8948	
20	9	88.8256	
20	10	88.8334	
20	11	89.1382	
20	12	89.0470	

2.2.6 净化方法的选择和优化

2.2.6.1 固相萃取柱类型选择

配合饲料、浓缩饲料、精料补充料基质相对复杂，杂质可能会干扰检测结果。使用固相萃取柱能有效去除干扰杂质，浓缩后上机，从而确保提高检测灵敏度。试样经过无水乙醇和二氯甲烷提取后，对提取液进行离心，取上清液 5 mL 经氮气吹干，乙腈复溶后加水稀释，过固相萃取柱， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯吸附在固相萃取柱上，经 50%乙腈水溶液淋洗去除杂质，再用乙腈洗脱 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯，氮吹浓缩后上机检测。为检测不同填料固相萃取柱对净化效果的影响，试验制备禽配合饲料阳性添加样品（添加浓度为 80 mg/kg），经提取后分别过亲水亲脂平衡固相萃取柱（Bond Elut Plexa, 60 mg/3 mL）、 C_{18} （Bond Elut - C_{18} , 200 mg/3 mL）、中性氧化铝（Cleanert Alumina N, 2 g/6 mL）3 种固相萃取柱，净化试样后上机检测，检测结果见表 12。

表 12 不同填料固相萃取柱对回收率的影响

净化柱种类	回收率 (%)					平均回收率 (%)	RSD (%)
亲水亲脂平衡固相萃取柱	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3	2.4
C ₁₈ 固相萃取柱	87.0	94.4	93.9	98.5	92.6	92.3	4.5
中性氧化铝固相萃取柱	46.4	61.6	43.6	56.6	47.0	51.1	15.1

结果表明，C₁₈ 固相萃取柱、中性氧化铝固相萃取柱回收率、稳定性相对较低。亲水亲脂平衡固相萃取柱回收率相对较高，稳定性良好，能够有效去除试样中干扰检测的物质，因此选择亲水亲脂平衡固相萃取柱进行样品净化。

2.2.6.2 固相萃取柱规格优化

为比较不同规格亲水亲脂平衡固相萃取柱对回收率的影响，选取 2 种固相萃取柱进行试验，结果见表 13。结果表明，不同规格的净化柱对回收率无较大影响，使用 60 mg/3 mL 净化柱与 200 mg/6 mL 净化柱回收率无较大区别，200 mg/6 mL 净化柱反而需要更多洗脱溶液，提高成本，降低检测效率。

表 13 不同规格固相萃取柱对回收率的影响

净化柱种类	回收率 (%)					平均回收率 (%)	RSD (%)
Bond Elut Plexa 60 mg/3 mL	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3	2.4
Bond Elut Plexa 200 mg/6 mL	103.0	104.8	106.2	104.1	110.0	105.6	2.6

2.2.6.3 洗脱体积优化

参考《饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法》(NY/T2896-2022) 中斑蝥黄净化方法，试验发现乙腈对β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯同样具有较好的洗脱效果，为检测不同洗脱体积对回收率的影响，使用不同体积的乙腈进行洗脱，试验结果见表 14。结果表明，洗脱体积为 5 mL 时回收率较好，且体积适量，容易吹干，检测效率较高，因此确定洗脱试剂为乙腈，洗脱体积为 5 mL。

表 14 不同洗脱体积对回收率的影响

洗脱体积	回收率 (%)					平均回收率 (%)
乙腈 (3 mL)	89.2	87.3	93.4	94.4	98.6	92.6

乙腈 (5 mL)	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3
乙腈 (10 mL)	102.0	101.3	101.4	105.4	101.6	102.3

2.2.6.4 氮吹水浴温度优化

氮吹是浓缩样品的主要手段，水浴温度作为重要参数，对氮吹时间及回收率有较大影响，试验分别设置 40 °C、50 °C、60 °C 作为氮吹温度进行检测，结果见表 15。结果表明，提取试剂中含有 15% 的水，设置为 40 °C 时较难吹干，氮吹时间过长；设置为 60 °C 时，回收率相对较低；50 °C 回收率最好，因此确定将氮吹温度设置为 50 °C。

表 15 不同氮吹温度对回收率的影响

氮吹温度 (°C)	回收率 (%)					平均回收率 (%)
40	难以吹干					/
50	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3
60	92.3	89.0	86.2	93.9	94.3	91.1

2.2.6.5 复溶液的选择

试样经固相萃取柱净化保留后，洗脱，氮气吹干，复溶液溶解后才能上机检测，不同复溶液可能会对回收率、出峰时间、峰型有较大影响。试验使用乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚-乙腈（体积比为 1:9，根据《超高效液相色谱法测定饲料中斑蝥黄和β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量方法的研究》）、乙腈-甲醇（体积比为 1:5，根据 2.2.2 色谱条件的确定）4 种复溶液进行对比，结果见表 16。

表 16 不同复溶液对回收率的影响

复溶液种类	回收率 (%)					平均回收率 (%)
乙腈	102.3	100.5	106.5	100.2	102.8	102.3
甲醇	103.7	104.5	103.3	101.8	103.3	103.3
乙腈-甲醇 (1:5)	102.9	101.0	103.8	105.0	100.5	102.6
甲基叔丁基醚-乙腈 (1:9)	104.2	104.1	101.2	103.7	103.5	103.3

结果表明，试样经 4 种复溶液复溶后，出峰时间均与标准品保持一致，峰型良好。乙腈-甲醇（体积比为 1:5）、甲基叔丁基醚-乙腈（体积比为 1:9）需额外配制溶液，增加操作步骤；乙腈复溶效果好，且与《饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法》（NY/T2896-2022）一致。综合考虑，选取乙腈作为复溶液。

2.2.6.6 净化柱过载考察

为确定所选择的色谱柱规格能够满足检测需要，不发生过载现象，试验制备 160 mg/kg 的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯阳性配合饲料，提取后过 60 mg/3 mL 净化柱净化，回收率测定结果见表 17，结果表明，所选的净化柱规格能够满足检测需要。

表 17 净化柱过载试验结果

阳性样品含量 (mg/kg)	回收率 (%)					平均回收率 (%)
160	104.2	104.5	103.4	104.3	104.6	104.2

2.2.6.7 添加剂预混合饲料试样前处理优化

添加剂预混合饲料通常按 1%~5% 添加入配合饲料中， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量高，不需要过固相萃取柱浓缩阳性物质，反而在过柱前需要额外稀释确保净化柱不过载，试验对比添加剂预混合饲料阳性添加样品（5 mg/kg）净化前后色谱图见图 17 和图 18， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯保留时间附近无干扰峰，信号响应良好。为提高检测效率，本方法添加剂预混合饲料经提取试剂提取完成后，用乙腈稀释到线性范围内进行检测即可直接上机检测。

图 17 添加剂预混合饲料阳性添加样品色谱图-直接上机（添加浓度 5 mg/kg）

图 18 添加剂预混合饲料阳性添加样品色谱图-净化后上机（添加浓度 5 mg/kg）

2.2.7 标准工作曲线

2.2.7.1 标准储备溶液配制

精密称取称取 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品 1 mg(精确至 0.01 mg)，用二氯甲烷溶解至 5 mL 棕色容量瓶中，定容至刻度，配制成浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准储备溶液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存，使用前超声 10 min。

2.2.7.2 标准系列溶液配制

将 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准储备溶液用乙腈稀释，配制成浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准系列溶液。

2.2.7.3 标准工作曲线的绘制

将 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯系列标准工作溶液依次注入液相色谱仪，以 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准工作溶液浓度为横坐标，以全反式 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯和顺式 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯峰面积之和为纵坐标，绘制标准工作曲线。

2.2.8 试验步骤

2.2.8.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

(1) 提取

平行做两份试验。称取试样5 g (精确至0.1 g)，置于100 mL棕色容量瓶中，加入15 mL水，混匀，常温超声5 min。加入50 mL无水乙醇和30 mL二氯甲烷，混匀，常温超声20 min。冷却至室温后，用二氯甲烷定容(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 (V_1) 到10 mL离心管中，于50 °C氮气吹干，用3 mL乙腈复溶，再加入3 mL水，涡旋混匀，备用。

(2) 净化

HLB 小柱先用 3 mL 乙腈和 3 mL 水活化，备用液过柱，先用 3 mL 乙腈洗涤离心管，再加入 3 mL 水洗涤，洗涤液过柱。用 5 mL 乙腈水溶液淋洗 HLB 小柱，抽干。用 5 mL 乙腈洗脱，收集洗脱液于 50 °C 氮气吹干，准确加入 1.0 mL (V_2) 乙腈复溶，过微孔滤膜，备用。

2.2.8.2 添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂

(1) 提取

平行做两份试验。称取试样2.5 g (精确至0.1 g)，置于100 mL棕色容量瓶中，加入15 mL水，常温超声5 min。加入50 mL无水乙醇和30 mL二氯甲烷，混匀，常温超声20 min。冷却至室温后，用二氯甲烷定容(V)，摇匀，备用。

(2) 稀释

取部分提取液至离心管中，于8 000 r/min离心5 min，准确吸取上清液5 mL (V_1)，用乙腈稀释到线性范围内进行测定。

2.2.8.3 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，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，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 μL。

2.2.8.4 测定

(1) 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和试样溶液上机测定。

(2) 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±2.5%之内。

(3) 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用乙腈稀释后重新测定。

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。

2.2.8.5 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)。按公式 (1) 计算:

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2 \times n}{m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

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

V ——提取液定容体积, 单位为毫升 (mL);

V_1 ——用于净化的提取液体积, 单位为毫升 (mL);

V_2 ——净化后定容体积, 单位为毫升 (mL);

n ——稀释倍数;

m ——试样质量, 单位为克 (g);

测定结果用2次平行测定的算术平均值表示, 保留3位有效数字。

2.3 方法主要技术指标验证

2.3.1 线性考察

配制成浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准系列溶液。按照上述 HPLC 分析条件上机，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，结果见表 18。结果表明， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯在 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~ 40.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好，相关系数 $r^2=1$ 。

表 18 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品曲线结果

标准品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	(反式) 峰面积 (mAU*min)	(顺式) 峰面积 (mAU*min)	顺反式总峰面积 (mAU*min)
0.05	0.2187	0	0.2187
0.1	0.4102	0	0.4102
0.5	2.0503	0	2.0503
1	4.0626	0	4.0626
5	20.6487	0	20.6487
20	82.3456	0	82.3456
40	162.3733	0	162.3733

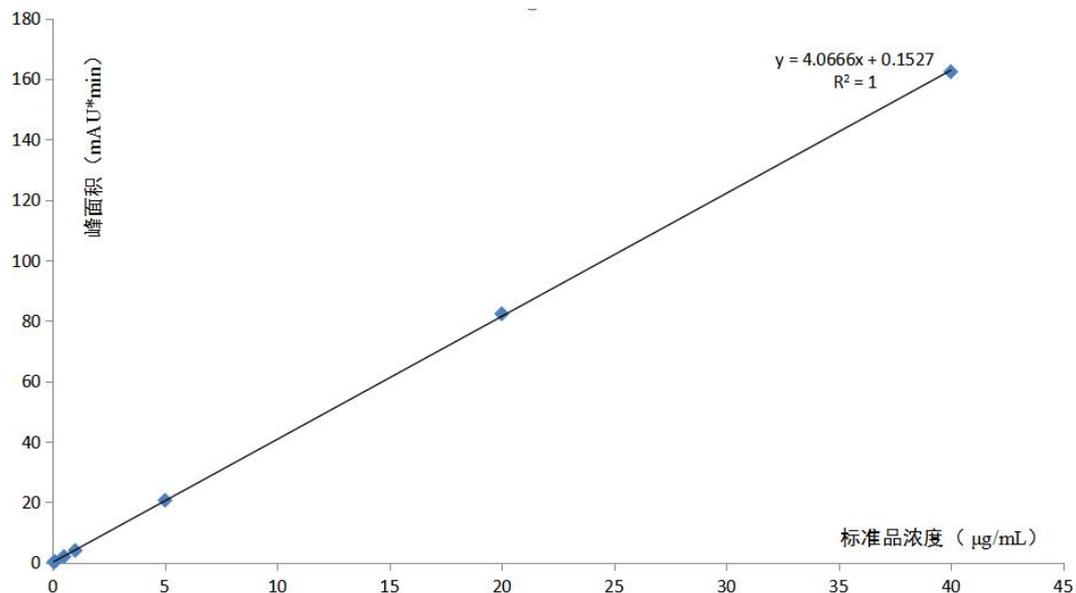


图 19 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准曲线

2.3.2 提取效率考察

经调研国内生产厂家，目前市面上 10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添

加剂包被材料均为木质素磺酸盐包被,为检测提取试剂对木质素磺酸盐包被的打开能力,试验称取 0.5g β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂(10%),加入提取试剂一水-乙醇-二氯甲烷(15:50:35)超声提取,稀释后上机检测,检测结果见表 6。

表 6 10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂检测情况

样品名称	β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量 (%)					平均回收率 (%)
10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂	10.6	10.5	10.2	10.3	10.4	10.4

结果表明:提取试剂一水-乙醇-二氯甲烷(15:50:35)可以打开 10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂的木质素磺酸盐包被,有效提取饲料中的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯。

2.3.3 检出限和定量限

向空白试样中添加不同浓度的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯,上机检测。根据检出限 S/N=3 原则,定量限 S/N=10 原则,确定方法的检出浓度为 0.0375 $\mu\text{g/mL}$,定量浓度为 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 。按照提取方法不同,确定配合饲料、浓缩饲料、精料补充料检出限为 0.15 mg/kg,定量限为 0.5 mg/kg;添加剂预混合饲料检出限为 1.5 mg/kg,定量限为 5 mg/kg。结果见图 20-25。

图 20 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品色谱图 (0.0375 $\mu\text{g/mL}$)

图 21 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品色谱图 (0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

图 22 配合饲料阳性添加色谱图 (检出限: 0.15 mg/kg)

图 23 添加剂预混合饲料阳性添加色谱图 (检出限: 1.5 mg/kg)

图 24 配合饲料阳性添加色谱图（定量限：0.5 mg/kg）

图 25 添加剂预混合饲料阳性添加色谱图（定量限：5mg/kg）

2.3.4 专一性试验

为了验证该方法能够不受其他物质影响，准确的测定出饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的含量。在空白样品中分别添加 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯、斑蝥黄、玉米黄质、叶黄素、 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛、 β -胡萝卜素、苏丹红（I、II、III、IV）等脂溶性色素制备混合阳性添加样品，通过高效液相色谱测定，观察干扰物质色谱峰与 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯色谱峰的分离情况，色谱图见图 26，试验表明： β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯保留时间没有其他杂峰，分离度为 1.84，与其他物质能够较好的分离开，表明该检测方法专一性良好。

图 26 混合阳性添加样品色谱图

2.3.5 精密度试验

连续进样 5 ug/ml 浓度的 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品 6 次，记录每次检测峰面积并计算 RSD 值，结果见表 18，表明方法精密度良好。

表 19 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准品精密度结果

序号	峰面积 (反式) (mAU*min)	平均峰面积 (反式) (mAU*min)	RSD (%)
1	28.4965		
2	28.4190		
3	28.4257		
4	29.4799	28.7	1.48
5	28.9531		
6	28.4965		

2.3.6 添加回收试验

2.3.6.1 空白样品筛选

选取市面上常用配合饲料、浓缩饲料、精料补充料及添加剂预混料，按照方法进行前处理并上机检测，查看 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯保留时间是否存在干扰峰，筛选空白样品。经过试验，共筛选空白样品 14 份，空白样品色谱图见图 27-40。

图 27 配合饲料（蛋鸡）空白样品色谱图

图 28 配合饲料（小鸡）空白样品色谱图

图 29 配合饲料（肉鸡）空白样品色谱图

图 30 配合饲料（蛋鸭）空白样品色谱图

图 31 配合饲料（肉鸭）空白样品色谱图

图 32 复合预混合饲料（蛋鸡）空白样品色谱图

图 33 复合预混合饲料（肉鸡）空白样品色谱图

图 34 配合饲料（猪）空白样品色谱图

图 35 精料补充料（牛、羊）空白样品色谱图

图 36 浓缩饲料（猪）空白样品色谱图

图 34 配合饲料（鱼）空白样品色谱图

图 38 浓缩饲料（蛋鸡）空白样品色谱图

图 39 浓缩饲料（肉鸡）空白样品色谱图

图 40 维生素预混合饲料空白样品色谱图

2.3.6.2 添加浓度的确定

按照农业农村部公告第 2625 号规定， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯仅限在家禽饲料中使用，且添加量不超过 80 mg/kg。为验证本方法在各个添加浓度的检测水平，确定 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯在配合饲料、浓缩饲料、精料补充料中的添加浓度为 0.5 mg/kg、5.0 mg/kg、40 mg/kg 和 80 mg/kg。添加剂预混合饲料按 1% 计算，确定添加浓度为 5 mg/kg、50 mg/kg、4000 mg/kg 和 8000 mg/kg，阳性添加使用 10% β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯饲料添加剂作为添加物。各样品定量限检测色谱图见图 41-54。

图 41 配合饲料（蛋鸡）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 42 配合饲料（小鸡）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 43 配合饲料（肉鸡）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 44 配合饲料（蛋鸭）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 45 配合饲料（肉鸭）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 46 复合预混合饲料（蛋鸡）阳性添加（添加浓度 5mg/kg）色谱图

图 47 复合预混合饲料（肉鸡）阳性添加（添加浓度 5mg/kg）色谱图

图 48 配合饲料（猪）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 49 精料补充料（牛、羊）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 50 浓缩饲料（猪）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 51 配合饲料（鱼）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 52 浓缩饲料（蛋鸡）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 53 浓缩饲料（肉鸡）阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

图 54 维生素预混合饲料阳性添加（添加浓度 0.5mg/kg）色谱图

2.3.6.3 添加回收率实验结果

添加回收试验每批次同一浓度做 5 次平行实验，进行 3 次重复。部分添加样品的上机浓度超过线性范围时，需要根据测定浓度，进行稀释后重新测定，直到上机液浓度在标准曲线的线性范围内，试验结果见表 20-33。在 0.5-8000 mg/kg 添加浓度范围内，批内平均回收率为 80.4%-109.8%，批内 RSD 在 0.1%-8.8% 之间，批间平均回收率为 82.2%-108.9%，批间 RSD 在 0.2%-9.8% 之间，RSD 均小于 10%。由此可见回收率较好，说明本方法能满足饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量测定需要。

表 20 配合饲料（蛋鸡）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	109.2	107.8	104.1	98.2	102.1	104.3	4.2	102.6	3.0
	105.7	94.2	111.3	100.2	110.8	104.4	7.0		
	102.2	93.5	98.1	97.9	103.7	99.1	4.0		
5	96.9	97.2	96.2	98.8	96.4	97.1	1.1	95.7	4.6
	100.3	97.6	100.3	97.1	100.6	99.2	1.7		
	89.6	90.9	90.4	91.6	91.2	90.8	0.8		
40	95.4	96.9	94.9	97.1	95.3	95.9	1.1	94.9	5.2
	100.3	97.6	100.3	97.1	100.6	99.2	1.7		
	89.2	89.0	90.2	89.5	89.5	89.5	0.5		
80	95.4	96.9	94.9	97.1	95.3	95.9	1.1	100.8	6.1
	99.9	97.2	99.5	96.6	99.8	98.6	1.6		
	106.4	109.0	109.2	106.9	107.2	107.7	1.2		

表 21 配合饲料（小鸡）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	94.4	104.1	87.0	99.9	93.7	95.8	6.8	99.3	2.3
	101.7	94.9	110.2	102.6	101.3	102.1	5.3		
	99.5	101.1	96.8	101.2	100.9	99.9	1.9		
5	97.1	98.6	96.7	99.4	96.9	97.7	1.2	96.3	4.0
	99.8	99.1	99.0	98.8	99.2	99.2	0.4		
	91.5	90.9	92.9	92.0	92.4	92.0	0.8		
40	98.7	106.2	98.8	105.3	100.0	101.8	3.6	99.3	9.0
	108.6	103.5	109.4	103.4	108.9	106.8	2.8		
	89.2	89.0	90.2	89.5	89.5	89.5	0.5		
80	96.4	98.9	96.5	98.3	95.8	97.2	1.3	102.4	5.7
	102.0	99.5	102.1	100.0	102.3	101.2	1.3		
	105.5	109.5	110.5	110.6	107.5	108.7	2.0		

表 22 配合饲料（肉鸡）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	100.3	103.9	109.0	100.4	110.0	104.7	4.4	102.9	3.3
	101.1	105.3	103.4	110.8	104.1	104.9	3.4		
	99.3	102.5	96.4	99.2	97.6	99.0	2.3		
5	94.1	88.3	95.2	88.2	95.3	92.2	4.0	92.0	0.9
	90.7	96.5	90.0	96.3	90.0	92.7	3.7		
	91.4	90.6	89.7	91.5	92.1	91.1	1.0		
40	90.3	90.3	90.6	89.8	90.6	90.3	0.4	92.3	2.1
	92.2	92.3	92.3	92.4	92.5	92.3	0.1		
	95.3	93.9	94.2	93.9	93.4	94.1	0.8		
80	88.6	88.9	87.5	89.4	88.0	88.5	0.8	94.3	9.1
	91.1	89.4	90.9	89.6	90.5	90.3	0.8		
	105.9	105.5	105.7	102.2	101.4	104.1	2.1		

表 23 配合饲料（蛋鸭）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	87.7	76.9	84.4	82.3	87.8	83.8	5.4	91.0	9.6
	79.7	97.0	84.2	94.5	87.4	88.6	8.1		
	101.0	100.5	99.6	102.3	100.3	100.7	1.0		
5	93.6	93.4	93.9	93.9	94.1	93.8	0.3	96.1	2.2
	94.7	95.6	94.5	95.6	95.2	95.1	0.5		
	101.8	90.6	100.6	97.9	106.5	99.5	5.9		
40	99.4	92.1	92.0	98.4	92.1	94.8	4.0	95.3	1.0
	99.2	92.3	98.8	92.4	99.3	96.4	3.9		
	92.5	94.8	96.8	93.0	95.8	94.6	1.9		
80	95.8	86.2	86.6	96.2	86.2	90.2	5.9	96.8	9.5
	96.5	87.3	96.4	87.1	96.9	92.8	5.5		
	107.3	105.3	107.7	109.3	107.2	107.4	1.3		

表 24 配合饲料（肉鸭）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	88.5	93.5	85.3	92.2	86.5	89.4	4.2	94.5	6.2
	97.9	90.1	93.5	91.1	93.3	92.3	2.3		
	102.3	102.2	99.2	97.1	103.4	100.8	2.6		
5	96.3	99.3	95.8	99.3	96.3	97.4	1.8	95.7	4.2
	100.1	96.5	99.8	96.9	99.9	98.6	1.8		
	91.5	89.1	92.6	92.9	90.0	91.2	1.8		
40	86.2	85.9	82.2	85.9	82.8	84.8	2.0	88.7	7.4
	85.9	83.0	86.1	83.6	86.1	84.9	1.8		
	97.5	93.6	97.4	95.0	98.0	96.3	2.0		
80	85.2	85.4	90.8	85.0	91.2	87.5	3.6	93.3	9.5
	86.7	90.9	85.7	85.1	95.7	88.8	5.0		
	102.0	105.3	102.1	102.7	105.4	103.5	1.7		

表 25 复合预混合饲料（蛋鸡）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
5	85.5	94.6	86.9	86.5	93.4	89.4	4.8	92.7	5.0
	92.0	102.5	97.9	100.2	97.0	97.9	4.0		
	97.4	85.6	86.0	93.7	90.9	90.7	5.6		
50	100.9	99.8	101.8	99.5	99.5	100.3	1.0	101.3	6.8
	109.7	106.5	110.3	106.7	110.1	108.7	1.7		
	94.4	95.2	95.4	94.8	95.2	95.0	0.4		
4000	93.7	92.3	97.1	93.6	95.7	94.7	1.8	98.4	7.4
	107.0	106.8	106.3	107.8	106.0	106.8	0.7		
	94.4	93.0	93.7	93.4	94.2	93.7	0.6		
8000	91.0	94.4	91.7	94.0	91.7	92.6	1.7	99.2	6.3
	107.1	102.2	105.1	103.6	105.8	104.9	1.5		
	99.7	100.5	100.3	99.6	99.9	100.0	0.4		

表 26 复合预混合饲料（肉鸡）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
5	86.9	100.9	89.3	92.1	82.8	90.4	7.5	94.4	8.1
	105.3	99.6	101.9	107.8	101.5	102.3	2.3		
	92.9	86.5	94.7	85.3	88.5	89.6	4.6		
50	99.0	102.7	99.0	102.1	99.1	100.4	1.8	100.3	4.9
	103.8	111.8	97.3	100.6	112.8	105.3	6.5		
	96.0	95.9	94.7	94.8	95.6	95.4	0.6		
4000	88.3	78.5	83.0	78.6	83.0	82.3	4.9	92.8	9.8
	92.2	97.0	92.9	97.2	92.2	94.7	2.3		
	101.6	100.5	101.0	102.4	102.0	101.5	0.7		
8000	88.5	89.7	81.4	89.4	81.4	86.1	5.0	97.1	9.6
	105.1	96.0	105.0	96.9	105.2	101.6	4.7		
	102.2	103.7	102.0	103.3	105.6	103.6	1.3		

表 27 配合饲料（猪）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	82.1	86.7	90.1	87.2	90.3	87.3	3.8	92.6	9.5
	111.3	99.1	100.1	99.1	104.1	102.7	5.1		
	88.2	92.1	84.1	85.6	89.2	87.9	3.6		
5	97.2	95.8	100.9	101.4	97.9	98.6	2.4	98.5	1.2
	99.2	100.1	99.2	99.4	100.4	99.7	0.5		
	97.7	96.0	97.9	97.0	97.7	97.3	0.8		
40	99.0	99.0	99.1	99.6	98.6	99.1	0.3	98.3	0.7
	98.1	99.3	97.3	96.8	97.4	97.8	1.0		
	98.7	97.0	100.1	98.4	96.7	98.2	1.4		
80	102.8	103.4	103.4	104.0	104.3	103.6	0.5	103.4	1.0
	102.2	101.1	104.0	102.5	101.5	102.3	1.1		
	104.7	103.8	102.4	105.3	105.3	104.3	1.2		

表 28 精料补充料（牛、羊）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	104.6	98.2	90.6	96.2	102.3	98.4	5.5	96.6	6.1
	101.7	103.6	100.8	102.2	98.9	101.4	1.7		
	92.0	87.5	86.5	92.2	90.8	90.0	2.3		
5	97.4	100.8	103.0	102.2	99.4	100.8	2.4	101.2	0.4
	100.0	99.7	102.5	104.6	101.1	101.6	2.0		
	100.4	102.2	99.7	102.5	101.2	101.4	1.4		
40	100.0	102.7	101.6	99.8	102.1	101.2	1.3	100.7	0.5
	99.4	98.7	100.3	100.8	101.8	100.2	1.2		
	99.2	99.4	102.5	101.4	100.8	100.6	1.4		
80	111.0	111.1	105.5	111.3	104.5	108.7	2.2	108.9	0.2
	110.7	110.7	107.5	107.3	108.0	108.8	1.6		
	110.5	110.3	108.6	105.9	110.0	109.1	1.8		

表 29 浓缩饲料（猪）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	95.8	104.8	103.4	92.3	99.7	99.2	5.2	99.0	4.2
	99.7	103.0	104.4	102.2	105.0	103.0	2.0		
	94.2	100.2	91.7	97.5	90.5	94.8	4.3		
5	100.1	103.6	100.5	100.6	102.0	101.3	1.4	100.7	1.3
	101.4	101.0	103.4	100.9	100.7	101.5	1.1		
	100.4	98.5	98.7	99.1	99.3	99.2	0.8		
40	99.8	99.6	100.3	102.5	100.2	100.5	1.2	99.5	0.9
	99.4	99.2	99.1	97.5	98.5	98.7	0.8		
	98.8	100.5	98.9	98.2	99.9	99.3	0.9		
80	107.1	102.2	103.0	103.7	107.0	104.8	2.0	106.9	2.0
	106.4	108.5	107.2	105.9	108.4	107.3	1.1		
	110.7	105.4	109.8	104.9	112.9	108.8	2.3		

表 30 配合饲料（鱼）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	99.4	98.3	100.4	92.1	93.7	96.8	3.8	96.4	6.5
	101.7	99.8	103.9	102.5	104.8	102.5	1.9		
	93.6	92.3	87.3	89.0	87.4	89.9	2.3		
5	101.6	100.2	100.5	99.8	103.3	101.1	1.4	99.6	1.9
	98.8	101.1	103.8	99.0	98.4	100.2	2.3		
	97.5	97.2	97.9	97.4	97.3	97.4	0.3		
40	100.6	99.8	96.9	102.5	100.2	100.0	2.0	99.6	0.7
	98.7	98.3	100.3	98.1	98.2	98.7	0.9		
	100.3	99.8	99.1	98.8	102.0	100.0	1.3		
80	110.7	110.4	109.8	108.9	108.9	109.8	0.7	108.8	1.0
	107.6	107.5	107.6	110.4	105.8	107.8	1.5		
	110.9	110.8	108.9	108.8	105.7	109.0	1.9		

表 31 浓缩饲料（蛋鸡）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	98.2	106.2	101.0	106.6	97.1	101.8	4.3	100.1	4.3
	80.4	99.8	97.5	100.8	97.7	95.3	8.8		
	105.9	93.6	109.5	100.2	107.4	103.3	6.2		
5	95.6	97.8	96.0	97.1	96.0	96.5	1.0	96.5	1.5
	97.7	88.6	94.1	96.8	97.8	95.0	4.1		
	99.8	96.9	98.6	97.1	98.0	98.1	1.2		
40	92.1	89.7	91.1	90.2	90.5	90.7	1.0	91.6	0.7
	91.0	94.9	91.1	92.2	91.2	92.1	1.8		
	91.5	92.3	91.6	92.4	91.6	91.9	0.5		
80	88.9	84.7	89.4	84.8	88.8	87.3	2.7	88.4	0.9
	86.1	90.3	87.3	90.7	90.5	89.0	2.4		
	86.4	90.9	86.8	91.9	87.9	88.8	2.8		

表 32 浓缩饲料（肉鸡）添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	92.3	109.0	97.2	104.9	96.4	100.0	6.8	99.2	2.0
	98.0	84.3	105.6	95.3	101.6	96.9	8.3		
	101.2	91.6	106.7	98.5	105.8	100.8	6.1		
5	95.1	95.4	95.1	93.3	95.9	95.0	1.0	94.3	0.8
	92.3	93.8	92.5	92.2	94.4	93.4	0.8		
	94.9	95.8	94.1	93.7	94.0	94.5	0.9		
40	79.7	77.3	82.8	87.0	82.8	81.9	4.5	82.2	1.9
	81.0	88.4	81.2	88.6	81.6	84.2	4.7		
	82.4	77.2	82.8	77.4	82.5	80.4	3.6		
80	87.9	90.4	87.8	90.6	88.3	89.0	1.6	89.7	0.7
	89.8	86.8	89.9	89.6	95.6	90.3	3.6		
	91.4	88.7	91.8	85.5	91.8	89.8	3.0		

表 33 维生素预混合饲料添加回收试验结果

添加浓度 (mg/kg)	回收率 (%)					批内平均回 收率 (%)	批内变异系 数 (n=5, %)	批间平均回 收率 (%)	批间变异系数 (n=3, %)
0.5	102.6	93.6	105.9	96.7	103.9	100.5	5.1	94.4	5.9
	80.6	92.3	87.8	99.8	88.3	89.8	7.8		
	99.4	95.0	86.7	96.2	86.5	92.8	6.3		
5	101.4	105.1	101.7	105.1	100.9	102.8	2.0	97.4	4.8
	95.7	91.6	95.4	92.2	95.9	94.2	2.2		
	97.3	94.1	96.6	93.7	93.7	95.1	1.8		
40	104.4	109.6	104.0	108.8	104.4	106.2	2.5	100.2	5.2
	97.5	97.4	96.8	97.8	97.9	97.5	0.4		
	95.9	97.6	96.4	97.5	97.2	96.9	0.8		
80	101.4	100.7	101.4	101.0	101.7	101.3	0.4	103.0	1.5
	102.9	105.5	103.0	106.3	102.8	104.1	1.6		
	102.7	105.8	102.6	105.3	102.2	103.7	1.6		

2.3.7 方法耐用性考察

表 34 方法耐用性试验结果

添加含量 (mg/kg)	仪器型号	检测结果 (mg/kg)	算术平均值 (mg/kg)	允许偏差 (mg/kg)	实际偏差 (mg/kg)
0.5	Ultimate 3000	0.466	0.485	≤0.048	0.019
	Waters E2695	0.504			
5	Ultimate 3000	4.71	4.845	≤0.484	0.135
	Waters E2695	4.98			
40	Ultimate 3000	40.3	39.05	≤3.90	1.25
	Waters E2695	37.8			
80	Ultimate 3000	82.4	84.55	≤8.46	2.15
	Waters E2695	86.7			

为检测不同仪器对本方法的耐用性，试验制备不同浓度的阳性添加样品，提

取、净化后，分别使用两台不同品牌的高效液相色谱仪进行检测，两台仪器检测结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算数平均值 10%，在允许偏差范围内。

2.4 标准储备溶液有效期考察

将 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准储备溶液定量移取分装后于 -18°C 保存，每周用环己烷稀释成 $2\ \mu\text{g/mL}$ ，以紫外可见分光光度计测定其浓度，同时将另一份定量分装的储备溶液用乙腈稀释成 $40\ \mu\text{g/mL}$ ，再用 HPLC 测定色谱峰纯度和峰面积，以考察储备溶液在 -18°C 保存条件下的稳定性。连续测定 1 个月，RSD 均小于 5%，HPLC 测定 $40\ \mu\text{g/mL}$ 全反式色谱纯度均大于 99%，峰面积 RSD 小于 1%，因此 1 个月内 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯标准储备溶液在 -18°C 可稳定保存。

表 35 标准储备溶液有效期实验结果

检测方式	检测时间							平均值	RSD (n=7,%)
	1d	3d	7d	14d	21d	28d	35d		
吸光度	0.497	0.496	0.496	0.496	0.496	0.497	0.496	0.496	0.1
峰面积(反式, mAU*min)	169.852	170.705	169.339	171.093	169.522	171.063	170.873	170.4	0.4
相对峰面积 (反式, %)	99.920	99.920	99.920	99.920	99.920	99.920	99.930	99.9	0.0
峰面积(顺式) (mAU*min)	0.129	0.130	0.136	0.138	0.136	0.129	0.139	0.134	3.3
相对峰面积 (顺式, %)	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.070	0.079	4.8

2.5 方法适用性考察

试验收集了贵州、湖南、安徽等省份共计 8 个产地 28 批样品，使用本方法对其 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量进行检测，检测结果见表 36。

表 36 市场饲料样品中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量检测结果

编号	样品名称	来源	结果 (mg/kg)
1	产蛋鸡高峰期配合饲料	湖南	未检出
2	小鸡配合饲料	贵州	未检出
3	肉用仔鸡中期配合饲料	安徽	6.79
4	肉中鸡配合饲料 II 型	贵州	2.96
5	快大肉大鸡配合饲料	贵州	4.24
6	肉大鸡配合饲料	云南	6.70

7	128 肥鸡配合饲料	广西	13.4
8	蛋鸭配合饲料	安徽	7.37
9	产蛋鸭配合饲料	安徽	未检出
10	肉大鸭配合饲料 I 型	贵阳	6.56
11	肥鸭配合饲料	安徽	未检出
12	蛋鹌鹑产蛋期配合饲料	贵州	未检出
13	蛋鸭自配料	河北	未检出
14	肉鸡自配料	贵州	未检出
15	蛋鸡产蛋期自配料	贵州	4.57
16	5%蛋鸡产蛋期复合预混合饲料	湖北	未检出
17	5%蛋鸡产蛋期复合预混合饲料	河南	86
18	蛋鸡产蛋后期复合预混料	河北	3.85
19	1%肉用仔鸡中期预混料	广西	未检出
20	生长育肥猪配合饲料	贵州	未检出
21	牛、羊精料补充饲料	贵州	未检出
22	乳猪浓缩饲料	贵州	未检出
23	鲟鱼配合饲料	广东	未检出
24	蛋鸡浓缩饲料	贵州	未检出
25	肉鸡浓缩饲料	贵州	未检出
26	维生素预混合饲料	重庆	未检出
27	龙虾配合饲料	湖北	未检出
28	黄颡鱼膨化配合饲料	四川	未检出

本方法经试验验证，配合饲料和浓缩饲料检出限能达到 0.15 mg/kg，同时在 0.5~8000 mg/kg 添加浓度时， β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯在 0.5-8000 mg/kg 添加浓度范围时，批内平均回收率为 80.4%-109.8%，批内 RSD 在 0.1%-8.8%之间，批间平均回收率为 82.2%-108.9%，批间 RSD 在 0.2%-9.8%之间，线性、耐用性等各项技术指标均能满足要求，方法重复性好，定量准确，样品前处理方法合理。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准在制定过程中，起草组收集了国内相关行业标准，并结合国内外相关文献资料和产品申请材料中的相关内容，对上述标准、文献进行分析和总结的基础上，通过实验室试验研究，完成了标准文本的起草。

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

本标准未采用国内外标准，不涉及采标内容。

六、与有关法律、法规的关系

本标准的编制依据为现行的饲料相关法律法规《饲料添加剂安全使用规范》（农业农村部公告 2017 年第 2625 号发布，农业农村部公告 2019 年第 231 号修订）及其配套文件，标准内容与上述法律和管理办法协调一致、相互衔接，指标也与这些文件中的规定相符。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利相关内容。

九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

建议本标准批准后尽快发布。本标准发布对于指导饲料行业相关监管单位对饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯的含量进行有效检测，帮助饲料生产企业控制

产品质量具有重要意义。

本标准为首次制定，无替代、废止现行有关标准。

十、其他应当说明的事项。

无。

参考文献

- [1] 宋宁宁. 食品中合成色素的安全性及其检测方法研究现状[J]. 食品与药品,2013(06):440-442.
- [2] 朱基美.β-阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯及其研究进展[J].广东饲料,2012,21(增刊 1):84-86.
- [3]王海威,王丽辉,栗剑,等.加丽素红、加丽素黄对黄羽肉鸡生长性能及胴体着色的影响[J]. 饲料博览,2014(01):1-3.
- [4] Castañeda M P,Hirschler E M,Sams A R.Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. Poultry science. 2005,84(1):PP143-7.
- [5] 文正常,王璇,金晓峰,等.蛋鸡饲料添加加丽素红和加丽素黄对鸡蛋色素沉积量和蛋黄色度的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2021(23):104-108.
- [6] Araujo Pereira,Bittencourt,Silva Cisneros,et al.The dietary supplementation of canthaxanthin in combination with 25OHD3 results in reproducti -ve,performance,andprogeny quality gains in broiler breeders.Poultry Science.2019,98(11):PP5801-5808.
- [7]张伟.角黄素和阿朴酯对三黄肉种鸡及后代肉鸡生产性能和健康影响 的研究[D].成都:四川农业大学,2011.
- [8] 李俊,程业飞,苏越,等.阿朴酯和斑蝥黄复合对蛋鸡抗氧化功能、蛋品质和蛋黄色素沉积的影响[J].湖北农业科学,2018,57(18):88-91.
- [9] 姬翔宇,杨继业,陈书明,等.阿朴酯和斑蝥黄对产蛋后期鸡生产性能、蛋品质、肝肾功能及抗氧化机能的影响[J].中国畜牧杂志,2020(05):122-126
- [10] 刘笑,吕国锋,黄国东.阿朴酯关键中间体 C5 磷盐的合成[J].广州化工,2016,44(13):90-92.
- [11] 张华,杨鑫,马莺,等.饲料中角黄素的高效液相色谱法测定[J].分析测试学报,2008,27(7):785-787.
- [12] 付淑梅,刘婷.反相高效液相色谱法测定饲料中的斑蝥黄含量[J].广东化工,2017,16(44):233-234.
- [13] 陈东洋,张昊,冯家力,等.固相萃取-高效液相色谱法测定禽蛋中斑蝥黄和叶黄素[J].中国食品卫生杂志,2020,32(1):45-48.
- [14] 隋艳梅,寿飞飞,胡晓庆.10%斑蝥黄 HPLC 测定方法[J].中国化工贸易,2013,11:313-313.
- [15] 陈庚超,叶李扬,黄智娟,等.土鸡蛋中添加剂斑蝥黄的色谱质谱联用检测方法研究[J].现代食品,2021(06):177-180

- [16] 宗万里,臧汝瑛,宋韶锦.液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱测定鸡蛋中斑蝥黄含量[J].黄河科技学院学报,2019,21(05):94-97
- [17] 饲料工业标准化技术委员会.饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法(NY/T 2896 - 2022)[S].北京,中国农业出版社,2022.
- [18] 饲料工业标准化技术委员会.饲料添加剂 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯(粉剂)(GB/T 21516—2008)[S].北京,农业出版社,2007.
- [19] 栾庆祥,金晓峰,黄鑫,等.超高效液相色谱法测定鸡蛋中 6 种色素残留量的方法研究[J].中国家禽,2021,43(3):59-63.
- [20] 栾庆祥,金晓峰,黄鑫,等.超高效液相色谱法测定禽蛋中斑蝥黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯残留量方法的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2020(11):136-138.
- [21] 杨梅,张姘婕,陈红.超高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中 2 种色素残留[J].中国食品卫生杂志,2017,29(2):176-180.
- [22] 章厉劼,钱莘莘,孙真峥,等.超高效液相色谱法测定饲料中斑蝥黄和 β -阿朴-8'-胡萝卜素酸乙酯含量方法的研究[J].中国饲料,2021(3):78-82