

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—XXXX

天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定 高效液相色谱法

Determination of chicorionic acid and caffeic acid in natural plant feedstuff —High performance liquid chromatography

(公开征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、北京爱绿生物科技有限公司、天津博菲德科技有限公司、湖南农业大学、河南福源青阳生物科技有限公司。

本文件主要起草人：张军民、郭晓青、赵青余、张会艳、汤超华、司玮、姚浪群、邓雪娟、曾建国、李红娇、邱瑾丽。

天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定。

本文件天然植物干燥物、粉碎物单一型和复配型饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.03 g/kg，定量限为 0.1 g/kg；含粗提物的天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.06 g/kg，定量限为 0.2 g/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实验方法

GB/T 19424 天然植物饲料原料通用要求

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

天然植物饲料原料 **natural plant as feed material**

以植物学纯度不低于95%的单一天然植物干燥物、粉碎物或粗提物为原料，添加或不添加辅料制得的单一型产品；或以2种或2种以上天然植物干燥物、粉碎物或粗提物为原料，添加或不添加辅料，经复配加工而成的复配型产品；或由天然植物粉碎物和粗提物复配而成的混合型产品。

注：包括天然植物干燥物饲料原料（单一型和复配型）、天然植物粉碎物饲料原料（单一型和复配型）、天然植物粗提物饲料原料（单一型和复配型）、混合型天然植物饲料原料。

4 原理

试样中的菊苣酸和咖啡酸用乙醇溶液提取，高效液相色谱测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，所用试剂均为分析纯。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 甲酸：色谱纯。

5.4 60%乙醇溶液：量取 600 mL 乙醇（5.3）于 1 000 mL 容量瓶中，加水（5.1）定容，混匀。

5.5 0.3%甲酸溶液：量取 3 mL 甲酸（5.3）于 1 000 mL 容量瓶中，加水（5.1）定容，混匀。

5.6 标准储备溶液（10 mg/mL）：准确称取菊苣酸标准品（CAS 号：70831-56-0，纯度≥98%）、咖啡酸标准品（CAS 号：331-39-5，纯度≥98%）各 100 mg（精确至 0.1 mg），分别置于 10 mL 棕色容量瓶

中，用乙醇溶解并定容，混匀。-18℃以下避光保存，有效期6个月。

5.7 混合标准中间溶液（1 mg/mL）：分别准确移取菊苣酸和咖啡酸标准储备溶液（5.6）各1 mL于10 mL棕色容量瓶中，用60%乙醇溶液（5.4）定容，混匀。-18℃以下避光保存，有效期6个月。

5.8 混合标准系列溶液：准确移取适量混合标准中间溶液（5.7），用60%乙醇溶液（5.4）配制成浓度均为0.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL和100 μg/mL混合标准系列溶液。临用现配。

5.9 微孔滤膜：0.45 μm，有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平：感量为1 mg和0.1 mg。

6.3 超声波清洗机。

6.4 冷冻离心机：转速不低于4 000 r/min。

6.5 涡旋混合器。

7 样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中，避光保存，备用。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。准确称取试样0.5 g~1.0 g（精确至1 mg），置于100 mL离心管中，准确加入40 mL 60%乙醇溶液（5.4），涡旋混匀5 min，超声提取1 h（温度控制在35℃以下）。冷却至室温，4 000 r/min离心10 min。将上清液转移至50 mL容量瓶中，加入60%乙醇溶液（5.4）定容到50 mL，混匀。移取适量提取液，4 000 r/min离心5 min，取上清液，用微孔滤膜（5.9）过滤，备用。

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：C₁₈柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：A相为0.3%甲酸溶液（5.5），B相为甲醇（5.1），梯度洗脱程序见表1；
- c) 流速：0.8 mL/min；
- d) 柱温：35℃；
- e) 进样量：10 μL；
- f) 检测波长：327 nm。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	B相/%	A相/%
0	5	95
2	20	80
4	30	70
12	35	65

23	35	65
24	5	95
26	5	95

8.2.2 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列溶液（5.8）和试样溶液（8.1）上机测定。菊苣酸和咖啡酸混合标准溶液的高效液相色谱图见附录 A。

8.2.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中菊苣酸和咖啡酸的保留时间应与浓度相当的混合标准溶液中菊苣酸和咖啡酸保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

8.2.4 定量

以菊苣酸和咖啡酸的浓度为横坐标，对应的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。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内，如超出线性范围，用 60%乙醇溶液（5.4）稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液的浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中菊苣酸和咖啡酸的含量以质量分数 w_i 计，数值以克每千克（g/kg）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V}{m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中待测组分 i 的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
- V ——试样溶液定容体积，单位为毫升（mL）；
- m ——试样质量，单位为克（g）；
- 1 000 ——换算系数；
- n ——超出标准曲线范围后的稀释倍数。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V}{A_{si} \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- A_i ——试样溶液中待测组分 i 的色谱峰面积；
- ρ_{si} ——标准溶液中待测组分 i 的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
- V ——试样溶液定容体积，单位为毫升（mL）；
- A_{si} ——标准溶液中待测组分 i 的色谱峰面积；
- m ——试样质量，单位为克（g）；
- 1 000 ——换算系数；
- n ——超出标准曲线范围后的稀释倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

10 精密度

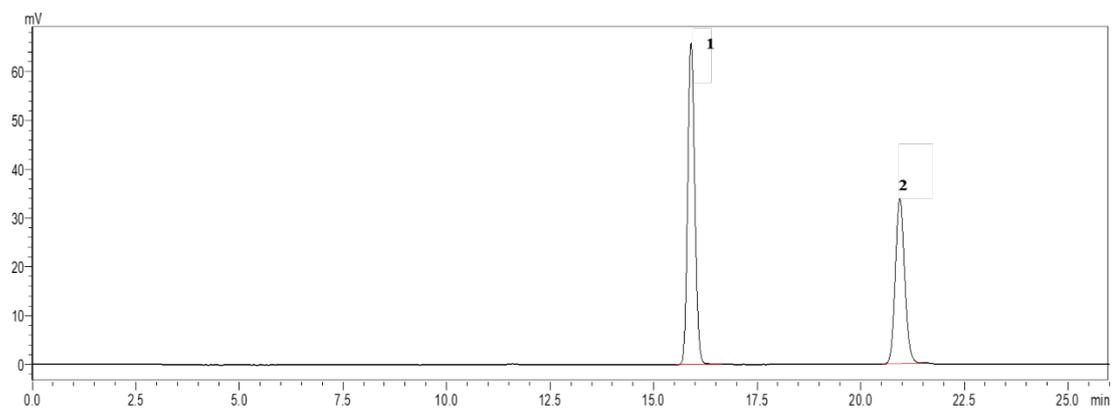
在重复性条件下获得的两次独立测定结果与算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的5%。

附录 A

(资料性)

菊苣酸和咖啡酸混合标准溶液液相色谱图

A.1 菊苣酸和咖啡酸混合标准溶液的液相色谱图。



说明：

1——咖啡酸；

2——菊苣酸。

图 A.1 菊苣酸和咖啡酸混合标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液相色谱图