



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—202×

饲料中新甲基橙皮苷二氢查尔酮的测定 高效液 相色谱法

Determination of neohesperidin dihydrochalcone in
feeds—High performance liquid chromatography

(定向征求意见稿)

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/T1.1—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)归口。

本文件起草单位：山东省畜产品质量安全中心、山东奔月生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：

饲料中新甲基橙皮苷二氢查尔酮的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了饲料中新甲基橙皮苷二氢查尔酮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、添加剂预混合饲料中新甲基橙皮苷二氢查尔酮的测定。

本文件的方法检出限为 0.5 mg/kg，定量限为 1.0 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

试样中的新甲基橙皮苷二氢查尔酮用甲醇提取，经固相萃取柱净化后，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 丙酮：色谱纯。

5.4 50%甲醇溶液：取甲醇 50 mL，加水稀释至 100 mL，混匀。

5.5 90%甲醇溶液：取甲醇 90 mL，加水稀释至 100 mL，混匀。

5.6 50%甲醇丙酮溶液：取甲醇 50 mL，加丙酮稀释至 100 mL，混匀。

5.7 新甲基橙皮苷二氢查尔酮标准储备溶液（1.0 mg/mL）：称取新甲基橙皮苷二氢查尔酮标准品（ $C_{28}H_{36}O_{15}$ ，CAS号：20702-77-6，纯度 $\geq 98.0\%$ ）10 mg（精确至0.01 mg）于10 mL容量瓶中，用甲（5.2）醇溶解并稀释至刻度，混匀， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期6个月。

5.8 标准中间溶液（20 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取标准储备溶液（5.7）1 mL于50 mL容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释定容，混匀， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期2周。

5.9 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液（5.8）于容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释定容，配制成质量浓度分别为 0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL 标准系列溶液，临用现配。

5.10 EMR 固相萃取小柱：600 mg/6 mL，或性能相当者。

5.11 PSA 固相萃取小柱：500 mg/10 mL，或性能相当者。

5.12 微孔滤膜：孔径 0.22 μm，有机系。

5.13 氮气：纯度≥99.9%。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外吸收检测器（或二极管矩阵检测器）。

6.2 分析天平：精度为 0.1 mg、0.01 mg。

6.3 氮吹仪。

6.4 离心机：转速不低于 10 000 r/min。

6.5 固相萃取装置。

6.6 涡旋混合器。

7 样品

按照 GB/T 20195 制备试样。取样品至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛，充分均匀，装入密闭容器中，备用。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g（精确至 0.1 mg）于 50 mL 离心管中，加入甲醇（5.2）20 mL，涡旋混匀，超声提取 20 min，不时振摇。取上清液 10 000 r/min 离心 10 min，备用。

8.2 净化

用 10 mL 50%甲醇溶液（5.4）活化 EMR 固相萃取柱，流速小于 1.0 mL/min，抽干。取备用液（8.1）5 mL 过 EMR 柱，流速小于 1.0 mL/min，收集流出液，再加入 3 mL 甲醇（5.2）过柱，抽干，收集所有流出液，混匀后于 40 °C 水浴氮气吹干。取 6 mL 50%甲醇丙酮溶液（5.6）超声溶解残渣，待净化。

用 10 mL 丙酮（5.3）活化 PSA 固相萃取柱，取待净化液全部过 PSA 柱，流速小于 1.0 mL/min，收集流出液，用 6 mL 50%甲醇丙酮溶液（5.6）冲洗氮吹管并过柱，抽干，收集全部洗脱液，混匀后于 40 °C 氮气吹干。准确加入 1 mL 90%甲醇溶液（5.5）溶解残渣，涡旋混匀，用 0.22 μm 微孔滤膜（5.12）过滤，待测。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，长 250 mm，内径 4.6 mm，粒度 5 μm，或相当者；
- b) 流动相：A 为甲醇，B 为水，梯度洗脱程序见表 1；

- c) 流速: 1.0 mL/min;
 d) 柱温: 40 °C ;
 e) 进样量: 10 μL。
 f) 紫外检测波长: 281 nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	A 相, %	B 相, %
0.0	40	60
0.5	40	60
12.0	60	40
12.5	95	5
15.5	95	5
16.0	40	60
23.0	40	60

8.3.2 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(5.9)和试样溶液(8.2)上机测定。新甲基橙皮苷二氢查尔酮标准溶液的液相色谱图见附录 A。

8.3.3 定性

以保留时间定性, 试样溶液中新甲基橙皮苷二氢查尔酮的保留时间应与质量浓度相当标准系列溶液中新甲基橙皮苷二氢查尔酮的保留时间一致, 其相对偏差在 ±2.5 %之内。

8.3.4 定量

以新甲基橙皮苷二氢查尔酮的质量浓度为横坐标, 以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。试样溶液中新甲基橙皮苷二氢查尔酮的质量浓度应在标准曲线的线性范围内, 若超出线性范围, 应将试样溶液稀释后, 重新测定。单点校准定量时, 试样溶液中新甲基橙皮苷二氢查尔酮的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30 %。

9 试验数据处理

试样中新甲基橙皮苷二氢查尔酮的含量以质量分数 w 计, 数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示。多点校准按公式 (1) 计算, 单点校准按公式 (2) 计算。

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times n}{m \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ —由标准曲线查得试样溶液中待测物质量浓度, 单位为微克每毫升 (μg/mL);

V_1 —提取液的总体积, 单位为毫升 (mL);

V_3 —试样溶液最终体积, 单位为毫升 (mL);

n —超出标准曲线范围后的稀释倍数；

V_2 —净化时所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m —试样质量，单位为克（g）；

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V_1 \times V_3 \times n}{A_s \times m \times V_2} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A —试样溶液中待测物的峰面积；

ρ_s —标准液中待测物质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V_1 —提取液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_3 —试样溶液最终体积，单位为毫升（mL）；

n —超出标准曲线范围后的稀释倍数；

A_s —标准溶液中待测物的峰面积；

V_2 —净化时所用试样提取溶液的体积；

m —试样质量，单位为克（g）；

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，2 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
(资料性)

新甲基橙皮苷二氢查尔酮标准溶液液相色谱图

新甲基橙皮苷二氢查尔酮标准溶液液相色谱图见图 A.1。

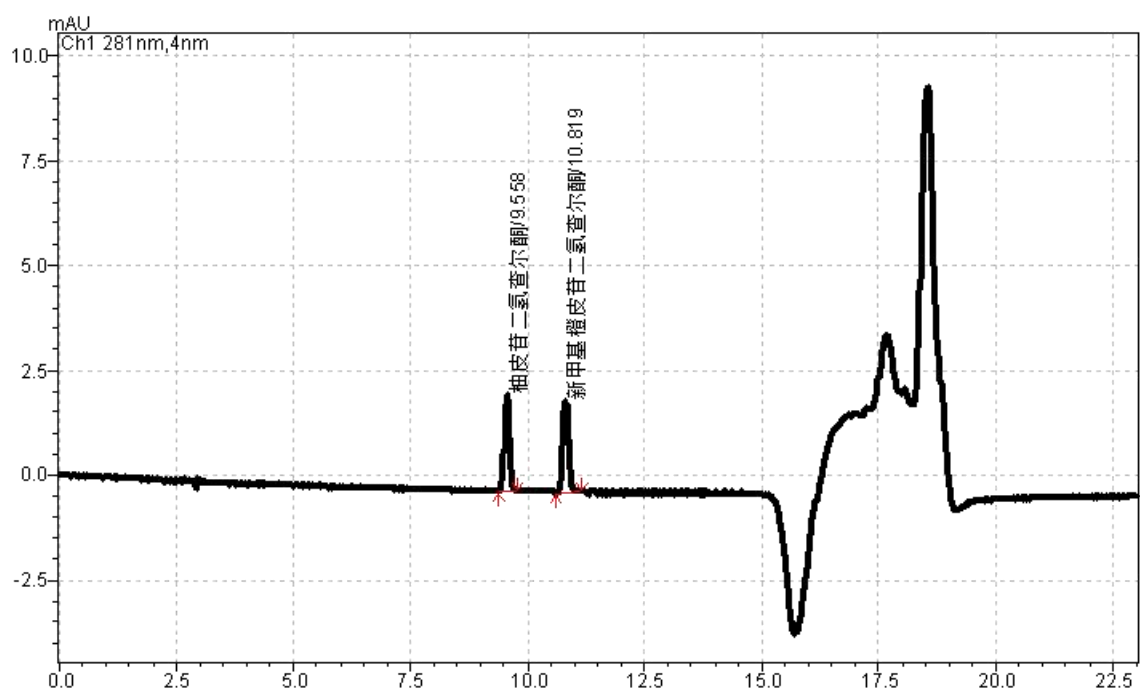


图 A.1 新甲基橙皮苷二氢查尔酮标准溶液液相色谱图 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)