

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2897—2016

饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛的测定 高效液相色谱法

Determination of β -apo-8'-carotenal in feeds—
High performance liquid chromatography

2016-05-23 发布

2016-10-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:华中农业大学、广州汇标检测技术中心、广州立达尔生物科技有限公司、帝斯曼(中国)有限公司。

本标准主要起草人:张妮娅、齐德生、陈雷、高思。

饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于添加剂预混合饲料、浓缩饲料及配合饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛的测定。本标准的方法检出限为 0.6 mg/kg, 定量限为 2.0 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 14699.1 饲料采样方法

GB/T 20195 动物饲料 样品的制备

3 原理

试样中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛经甲醇、正己烷和乙酸乙酯提取后, 在氮气保护下浓缩, 用流动相重溶, 注入高效液相色谱仪中进行分离, 紫外检测器检测, 外标法测定样品中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛含量。

4 试剂和材料

除特别说明外, 所有试剂均为分析纯试剂, 试验用水符合 GB/T 6682 中三级用水规定, 色谱用水符合 GB/T 6682 中一级用水规定。

4.1 甲醇。

4.2 饱和氯化钠溶液: 将氯化钠逐步加入 100 mL 水中, 搅拌, 直至氯化钠不再溶解, 上清液即为饱和氯化钠溶液。

4.3 正己烷。

4.4 乙酸乙酯。

4.5 冰乙酸。

4.6 无水乙醇。

4.7 甲基叔丁基醚。

4.8 乙酸溶液(0.05%): 取 0.5 mL 冰乙酸于 1 L 容量瓶中, 用水定容。

4.9 提取剂: 将甲醇、乙酸乙酯、正己烷按照体积比为 1:1:1 混合均匀。

4.10 甲基叔丁基醚-甲醇(1+1)溶液: 将甲基叔丁基醚和甲醇按照体积比为 1:1 混合均匀。

4.11 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准品(含量大于 96%)。

4.12 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准储备液: 称取 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准品 0.05 g(精确至 0.000 1 g), 用甲基叔丁基醚-甲醇溶液(4.10)溶解, 转入 100 mL 棕色容量瓶中, 定容至刻度, 配制成浓度为 500 mg/L 的 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准储备液。4℃下避光保存, 有效期为 6 个月。

4.13 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准工作液: 取 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准储备液(4.12), 用甲基叔丁基醚-甲醇溶液(4.10)逐级稀释成浓度为 0.5 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、4.0 μ g/mL、8.0 μ g/mL 的系列标准工作液。

5 仪器

- 5.1 分析天平:感量 0.000 1 g。
5.2 高效液相色谱仪:配有紫外检测器。
5.3 氮吹仪。
5.4 0.45 μm 微孔滤膜。

6 试样的采集与制备

按 GB/T 14699.1 采集有代表性的样品,用四分法缩减取样。按 GB/T 20195 制备样品,粉碎过 0.45 mm 孔径的试验筛,混合均匀,装入密闭容器中,低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 试样溶液的制备

称取试样 0.5 g~2.0 g(m),精确到 0.000 1 g,于事先加入 10 mL 水的锥形瓶中,再分别加入饱和氯化钠溶液(4.2)2.0 mL、0.05%乙酸溶液(4.8)10.0 mL,摇匀,用提取剂(4.9)萃取 3 次,每次 15 mL,将上层萃取液合并后,加入 2.0 mL 无水乙醇(4.6),于 30℃ 下氮气吹干。用甲基叔丁基醚-甲醇溶液(4.10)4.0 mL(V_1)溶解残余物,通过 0.45 μm 微孔滤膜过滤,制成试样溶液。以上操作均在避光通风柜内进行。试样溶液避光冷藏,24 h 内完成上机测定。

7.2 测定

7.2.1 色谱参考条件

色谱柱:C30 柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒度 5.0 μm ;

流动相:A 相为甲醇、水、三乙胺混合溶液(90+10+0.1),B 相为甲基叔丁基醚-甲醇-水-三乙胺混合溶液(90+6+4+0.1);

梯度洗脱程序:按表 1 执行;

进样量:20 μL ;

流速:1 mL/min;

检测波长:462 nm;

柱温:35℃。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间, min	A, %	B, %
0	93.5	6.5
34	93.5	6.5
34.1	0	100
50	0	100
50.1	93.5	6.5

7.2.2 标准工作曲线的绘制

分别取 20 μL 不同浓度的 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准工作液(4.13)上机测定。以浓度(c)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准工作曲线,得出回归方程。

β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准溶液的色谱图参见附录 A。

7.2.3 样品测定

取 20 μL 试样溶液(7.1)在高效液相色谱仪上测定峰面积,根据回归方程(7.2.2)计算试样溶液中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛的浓度(C_0)。

8 结果计算

饲料中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛的含量 X , 以质量分数[毫克每千克(mg/kg)]表示, 按式(1)计算。

$$X = \frac{C_0 \times V_1}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

m ——试样质量, 单位为克(g);

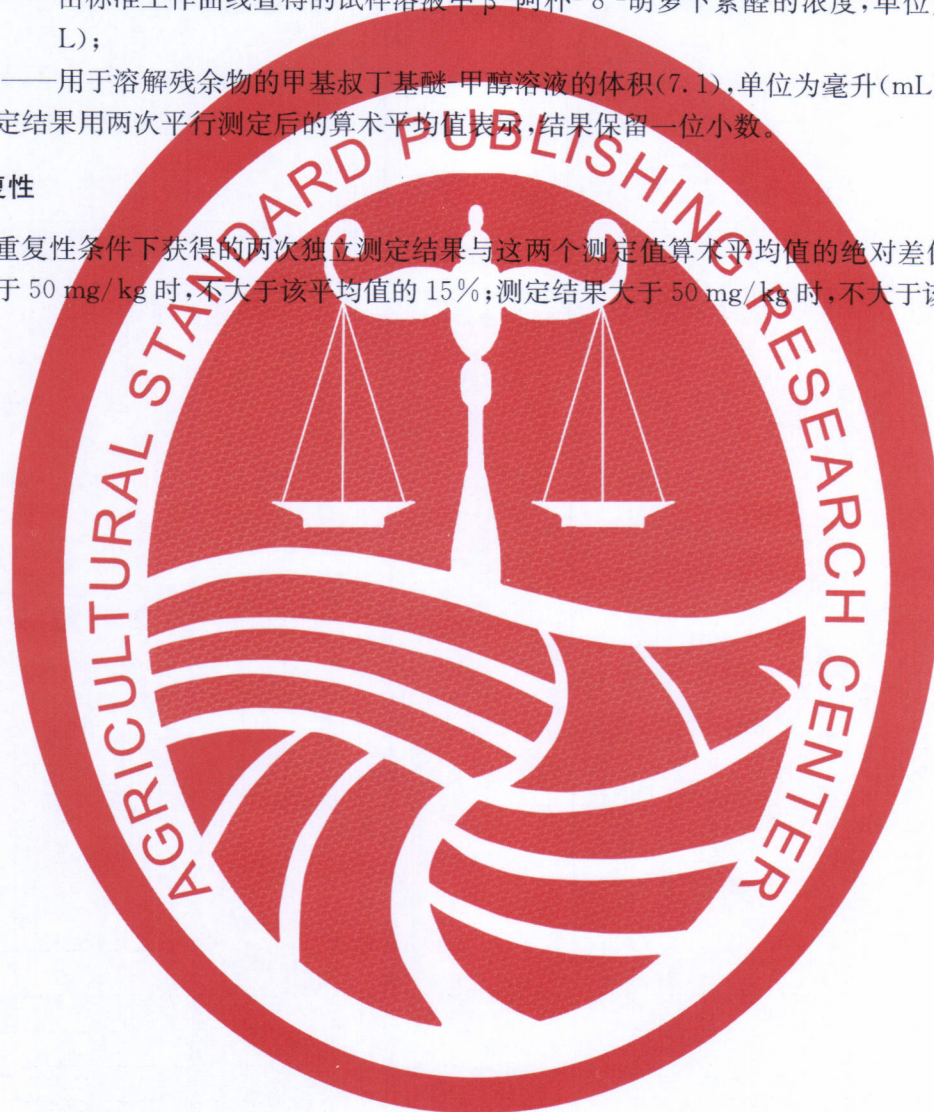
C_0 ——由标准工作曲线查得的试样溶液中 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛的浓度, 单位为毫克每升(mg/L);

V_1 ——用于溶解残余物的甲基叔丁基醚-甲醇溶液的体积(7.1), 单位为毫升(mL)。

测定结果用两次平行测定后的算术平均值表示, 结果保留一位小数。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果与这两个测定值算术平均值的绝对差值, 在测定结果小于或等于 50 mg/kg 时, 不大于该平均值的 15%; 测定结果大于 50 mg/kg 时, 不大于该平均值的 10%。



附 录 A

(资料性附录)

β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准溶液高效液相色谱图

β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准溶液($7.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$)的高效液相色谱图,见图 A. 1。

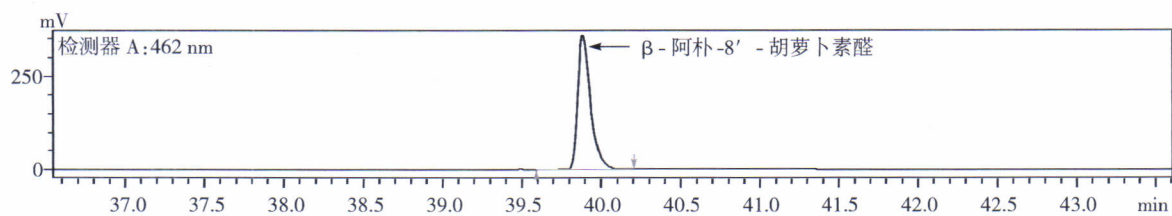


图 A. 1 β -阿朴-8'-胡萝卜素醛标准溶液($7.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$)高效液相色谱图