

# 团 体 标 准

T/CFIAS 6002—2022

---

## 天然植物饲料原料及其提取物中绿原酸、 新绿原酸和隐绿原酸的测定 高效液相色谱法

**Determination of chlorogenic acid, neochlorogenic acid and  
cryptochlorogenic acid of natural plants and their extracts as feed  
material — High performance liquid chromatography**

2022-04-13 发布

2022-05-13 实施

---

中国饲料工业协会 发布



## 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。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件主要起草单位：河南全印检测技术有限公司、河南牧业经济学院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心（北京）]、广西壮族自治区畜牧站、西南民族大学、四川省饲料工作总站、中国农业科学院饲料研究所、天津中医药大学、河南科技大学、四川省三星堆乾鲲生物科技有限公司、安徽聚睿达管理咨询有限公司、河南省九一中医药创新研究有限公司、桂林莱茵生物科技股份有限公司、颍河（焦作）中药生物工程有限公司、四川恒瑞通达生物科技有限公司、洛阳蓝斯利科技有限公司、河南华牧生物科技有限公司、河南中大恒源生物科技股份有限公司、驻马店华中正大有限公司、河南金杜仲农业科技有限公司、河南省农业科学院畜牧兽医研究所、桂林华艺健康科技有限公司、郑州福源动物药业有限公司、石家庄市畜产品和兽药饲料质量检测中心、安阳市食品安全监督中心、安徽省兽药饲料监察所、禹州市合同泰药业有限公司、四川众检四方检验检测技术有限公司、河南金尔康生物科技有限公司、河南普尼尔生物科技有限公司、河南农业大学、河南省晨源生物科技有限公司。

本文件主要起草人：付立亭、樊克锋、宋荣、伍念荣、卢丽枝、常选妞、柏雪、赵立军、李俊、陈智阳、杜红鸽、白东英、赵小阳、段海涛、陈青、杨善发、陆静、梁海瑞、欧道英、胡依凡、卜发玉、袁江华、王新炎、文雁君、李书至、郑红初、李海利、李金荣、陶亚飞、白军、陈桂军、许舒娅、王旭斌、李雪梅、杨巧玲、李永芳、易永基、袁宝青、王中荣、李云、宋瑞、张梦雪、何跃、刘作涛、刘奎山、吴蕾、张磊、杜雪莉、严义梅、马彦博、江红格、温长印、张清海、陈文、许斌、孙晓红。



# 天然植物饲料原料及其提取物中绿原酸、新绿原酸 和隐绿原酸的测定 高效液相色谱法

## 1 范围

本文件规定了天然植物饲料原料及其提取物中绿原酸、新绿原酸和隐绿原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及其提取物中绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的测定。

本文件的定量限为 30 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

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%的天然植物为原料制得的单一型、复配型或混合型干燥物、粉碎物或粗取物产品。

### 3.2

**天然植物饲料原料提取物** extract of natural plant as feed material

天然植物采用提取、纯化、浓缩、干燥等工艺，获得的液态、膏状和固态产品。

## 4 原理

试样中的绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸用甲醇溶液提取，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，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 磷酸：优级纯。

5.4 提取液：量取 50 mL 甲醇，加入 50 mL 水，混匀。

5.5 磷酸溶液：量取 1 mL 磷酸（5.3），用水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.6 单一标准储备溶液（800 μg/mL）：分别准确称取绿原酸（CAS：327-97-9，纯度≥97%）、新绿原酸（CAS：906-33-2，纯度≥95%）和隐绿原酸（CAS：905-99-7，纯度≥99%）标准品约 0.02 g（精

确至 0.01 mg)，分别置于 25 mL 棕色容量瓶中，加入适量提取液（5.4），超声溶解，冷却至室温，再用提取液（5.4）定容，混匀，分别制得绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸单一标准储备溶液。2℃~8℃ 保存，有效期为 1 个月。

5.7 混合标准工作溶液：分别准确移取适量绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸单一标准储备溶液（5.6），用提取液（5.4）稀释、定容，配制成浓度分别为 1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、8 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL 和 80 μg/mL 混合标准工作溶液。临用现配。

5.8 微孔滤膜：0.45 μm，有机系。

## 6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平：感量 0.01 mg 和 0.1 mg。

6.3 超声波清洗器。

6.4 离心机：转速不低于 5 000 r/min。

## 7 样品

按 GB/T 20195 规定制备试样。固态样品至少 200 g，粉碎过 0.42 mm 分析筛，充分混匀，密闭保存，备用。液态或膏状样品，充分混匀，密闭保存，备用。

## 8 试验步骤

### 8.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样 2 g~5 g（精确至 0.1 mg），置于 250 mL 具塞锥形瓶中，准确加入 50 mL 提取液（5.4），盖好瓶塞。植物原料试样超声提取 40 min，植物提取物试样超声提取 30 min，期间手动振荡锥形瓶 2 次~3 次。取适量液体 5 000 r/min 离心 5 min，上清液过 0.45 μm 滤膜，备用。24 h 内测定。

### 8.2 测定

#### 8.2.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C<sub>18</sub> 柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者。

柱温：35℃。

检测波长：327 nm。

流速：1.0 mL/min。

进样量：10 μL。

流动相：A，乙腈（5.2）；B，磷酸溶液（5.5），梯度洗脱，洗脱程序见表 1。

表 1 洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
16	10	90
20	20	80
25	10	90
35	10	90

#### 8.2.2 混合标准工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准工作溶液（5.7）和试样溶液（8.1）上机测定。绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸混合标准溶液的液相色谱图参见附录A。

### 8.2.3 定性

在相同试验条件下，以保留时间定性。试样溶液与标准工作溶液中待测物的保留时间相对偏差在±5%以内。

### 8.2.4 定量

以标准工作溶液的系列浓度为横坐标，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0.99。试样溶液与标准工作溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应将试样溶液用提取液（5.4）稀释至线性范围内，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工作溶液浓度相差不超过30%。

## 9 试验数据处理

试样中绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的含量以质量分数 $w_i$ 计，单位为毫克每千克（mg/kg），多点校准按公式（1）计算：

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

式中：

$\rho_i$ ——标准曲线中查得的试样溶液中绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）；

$V$ ——试样提取液体积，单位为毫升（mL）；

$n$ ——稀释倍数。

单点校准按公式（2）计算：

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

式中：

$A_i$ ——试样溶液中绿原酸、新绿原酸或隐绿原酸的色谱峰面积；

$A_{\text{ist}}$ ——标准工作液中绿原酸、新绿原酸或隐绿原酸的色谱峰面积；

$\rho_{\text{ist}}$ ——标准工作液中绿原酸、新绿原酸或隐绿原酸的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）；

$V$ ——试样提取液体积，单位为毫升（mL）；

$n$ ——稀释倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

## 10 精密度

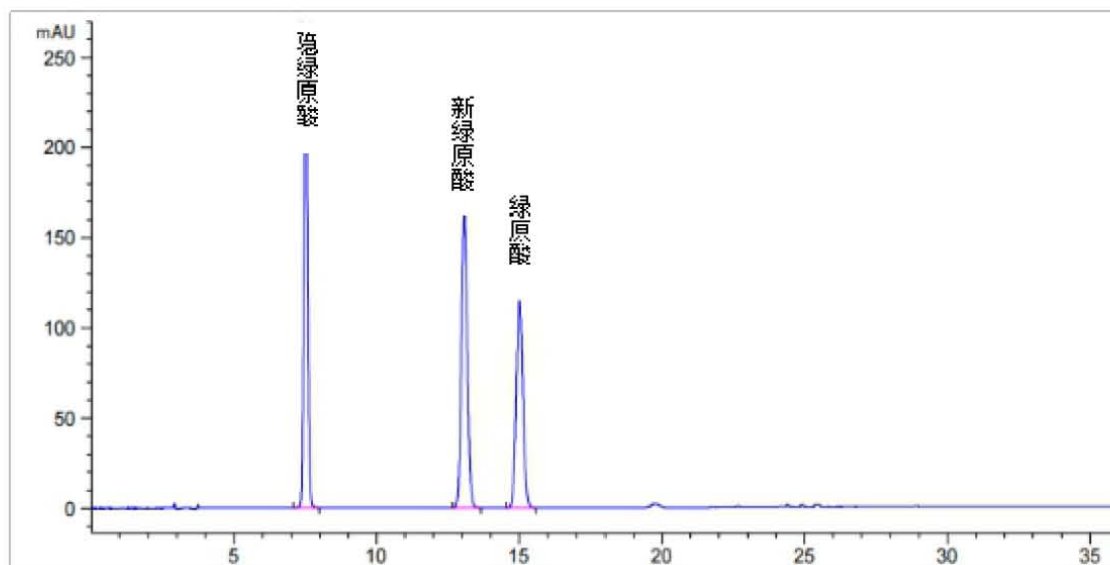
在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

附录 A

(资料性)

绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸混合标准溶液的液相色谱图

A.1 绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸混合标准溶液的液相色谱图见图 A.1。



图A.1 绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸混合标准溶液（80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的液相色谱图



