ICS 65.120
CCS B 46

中华人民共和国国家标准

GB/T 44965—2024

饲料中 β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的测定 高效液相色谱法

Determination of β-apo-8′-carotenoic acid ethyl ester in feeds—High performance liquid chromatography

2024-11-28 发布　　2025-06-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

目　　次

前言 …… Ⅲ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　原理 …… 1
5　试剂或材料 …… 1
6　仪器设备 …… 2
7　样品 …… 2
8　试验步骤 …… 2
8.1　试样溶液的制备 …… 2
8.2　测定 …… 3
9　试验数据处理 …… 3
10　精密度 …… 4
附录 A（资料性）　β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯高效液相色谱图 …… 5

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。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：贵州省兽药饲料检测所、肇庆巨元生化有限公司、广州智特奇生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：赵贵、章厉勐、孙播东、王庆红、苏美丞、孙真峥、栾庆祥、黄鑫、朱基美、邓庆生、廖欢、王璇、金晓峰、谢丽丽、陈冰、肖峰、郭萍、周艺林、杨强。

饲料中 β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的测定　高效液相色谱法

1　范围

本文件描述了饲料中β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯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、精料补充料和添加剂预混合饲料中β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的测定。

本文件配合饲料、浓缩饲料、精料补充料中β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的检出限为0.15 mg/kg、定量限为0.50 mg/kg；添加剂预混合饲料中β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的检出限为1.5 mg/kg、定量限为5.0 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β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯经水分散，用乙醇和二氯甲烷提取，固相萃取柱净化（添加剂预混合饲料除外），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　二氯甲烷。

5.3　无水乙醇。

5.4　乙腈：色谱纯。

5.5　甲醇：色谱纯。

5.6　2,6-二叔丁基对甲酚（BHT）。

5.7　50%乙腈溶液：取100 mL乙腈（5.4），用水稀释至200 mL，混匀。

5.8　标准储备溶液（200 μg/mL）：减量法称取β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯标准品（CAS号：1109-11-1，纯度≥98.5%）适量（精确至0.01 mg），置于棕色容量瓶中，用二氯甲烷（5.2）溶解定

容，摇匀。－20 ℃以下玻璃容器中避光储存，有效期1个月。使用前，放至室温，超声10 min，冷却至室温，备用。

注：为避免反复解冻，适量分装。

5.9 标准系列溶液：准确移取适量标准储备溶液（5.8），用乙腈（5.4）稀释定容，混匀，配制成质量浓度分别为0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL的标准系列溶液。临用现配。

5.10 亲水亲脂平衡固相萃取柱：60 mg/3 mL，或性能相当者。

5.11 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：精度分别为1 mg和0.01 mg。

6.3 离心机：转速不低于8 000 r/min。

6.4 超声波清洗仪。

6.5 固相萃取装置。

6.6 氮吹仪。

7 样品

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，避光密封保存，备用。

8 试验步骤

8.1 试样溶液的制备

8.1.1 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料

8.1.1.1 提取

平行做2份试验。称取试样5 g（精确至1 mg），置于100 mL棕色容量瓶中，加入0.1 gBHT（5.6）、15 mL水，混匀，室温超声5 min。加入50 mL无水乙醇（5.3）和30 mL二氯甲烷（5.2），混匀，室温超声20 min。冷却至室温后，用二氯甲烷（5.2）定容，摇匀，静置5 min。取20 mL提取液，置于50 mL离心管中，8 000 r/min离心5 min。准确吸取上清液5 mL，置于10 mL离心管中，50 ℃氮气吹干，用3 mL乙腈（5.4）复溶，再加入3 mL水，涡旋混匀，备用。

8.1.1.2 净化

亲水亲脂平衡固相萃取柱（5.10）先用3 mL乙腈（5.4）和3 mL水活化，备用液（8.1.1.1）过柱，向离心管中加入3 mL乙腈（5.4）涡旋，再加入3 mL水，混匀过柱。用50%乙腈溶液（5.7）5 mL淋洗亲水亲脂平衡固相萃取柱（5.10），抽干。用5 mL乙腈（5.4）洗脱，收集洗脱液，50 ℃氮气吹干，准确加入1 mL乙腈（5.4）复溶，涡旋混匀，过微孔滤膜（5.11）后上机测定。

8.1.2 添加剂预混合饲料

平行做2份试验。称取试样2.5 g（精确至1 mg），置于100 mL棕色容量瓶中，加入0.1 gBHT

（5.6）、15 mL 水，混匀，室温超声 5 min。加入 50 mL 无水乙醇（5.3）和 30 mL 二氯甲烷（5.2），混匀，室温超声 20 min。冷却至室温后，用二氯甲烷（5.2）定容，摇匀。取适量提取液，8 000 r/min 离心 5 min，上清液过微孔滤膜（5.11）后上机测定。

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：C_{18}柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，载碳量≥19%，或性能相当者；

b） 柱温：30 ℃；

c） 检测波长：445 nm；

d） 流动相：V（乙腈）＋V（甲醇）＝20＋80；

e） 流速：1.0 mL/min；

f） 进样量：20 μL。

8.2.2 标准系列溶液和试样溶液的测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（5.9）和试样溶液（8.1.1.2 或 8.1.2）上机测定。β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯高效液相色谱图见附录 A。

8.2.3 定性

在相同试验条件下，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溶液（5.9）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。

8.2.4 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，准确移取适量试样溶液（8.1.1.2 或 8.1.2），用乙腈（5.4）稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的浓度与标准系列工作溶液的浓度相差不超过 30%。

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。

9 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 表示，单位为毫克每千克（mg/kg），多点校准按公式（1）计算，单点校准按公式（2）计算。

$$w=\frac{\rho\times V\times V_2\times 1\,000}{m\times V_1\times 1\,000}\times f \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

式中：

ρ —— 从标准曲线查得的试样溶液中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 —— 试样提取液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 —— 上机前最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m —— 试样的质量，单位为克（g）；

V_1 —— 移取上清液的体积，单位为毫升（mL）；

1 000 —— 换算系数；

f —— 超出线性范围后试样溶液的稀释倍数。

$$w = \frac{A_1 \times \rho_2 \times V \times V_2 \times 1\,000}{A_2 \times V_1 \times m \times 1\,000} \times f \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

式中：

A_1 —— 试样溶液中β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的色谱峰面积；

ρ_2 —— 标准工作液中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 —— 试样提取液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 —— 上机前最终定容体积，单位为毫升（mL）；

A_2 —— 标准工作液中β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的色谱峰面积；

V_1 —— 移取上清液的体积，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量，单位为克（g）；

1 000 —— 换算系数；

f —— 超出线性范围后试样溶液的稀释倍数。

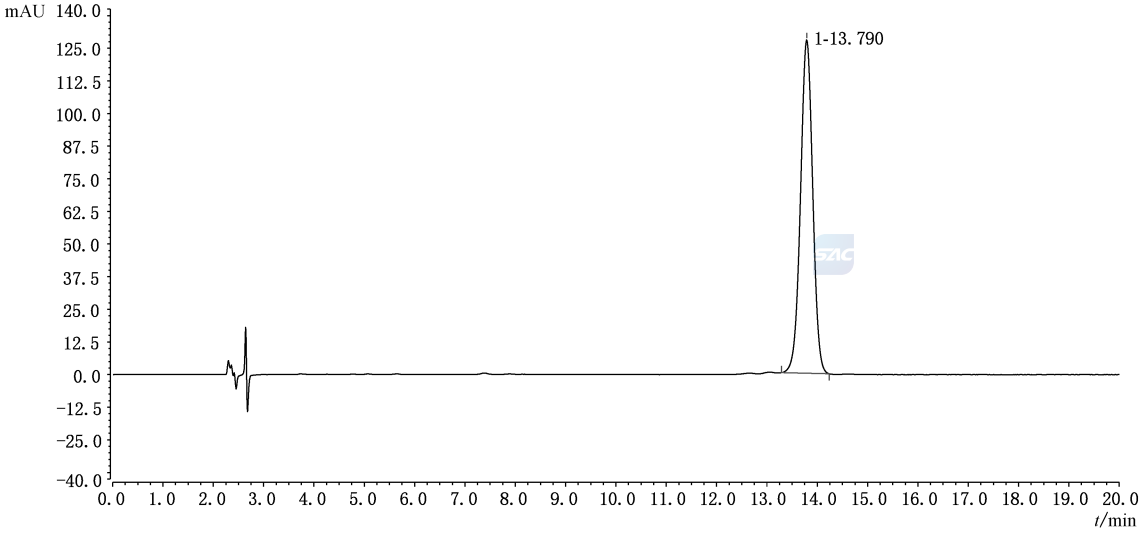
测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于算术平均值的10%。

附 录 A
（资料性）
β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯高效液相色谱图

A.1 β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯高效液相色谱图见图 A.1。

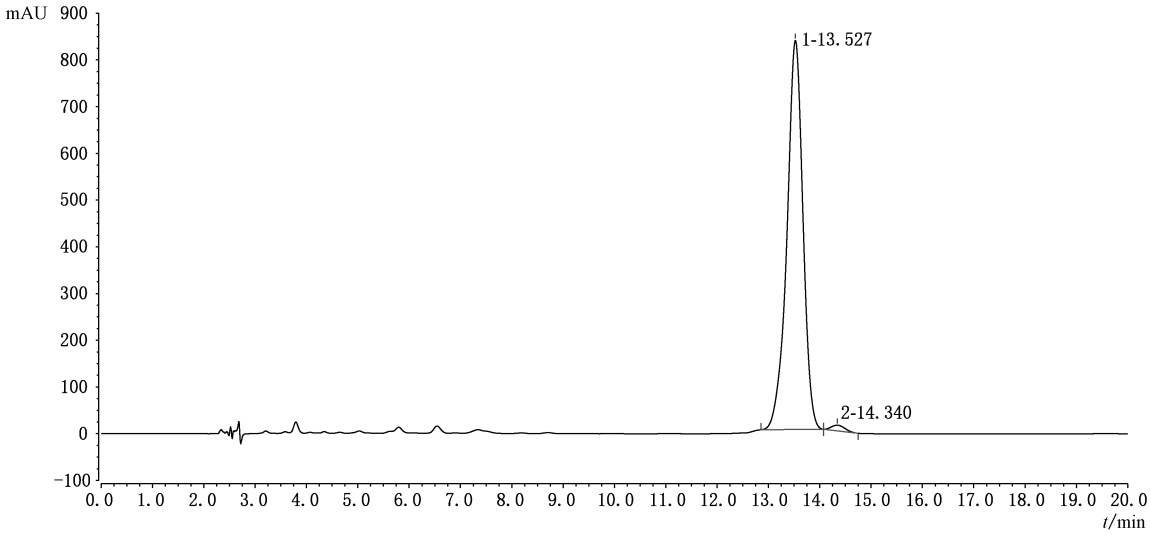


标引序号说明：

1——β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯（反式）。

图 A.1 β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯标准溶液（10 μg/mL）高效液相色谱图

A.2 含有β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的蛋鸡配合饲料高效液相色谱图见图 A.2。



标引序号说明：

1——β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯（反式）；

2——β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯（顺式）。

图 A.2 含有 β-阿朴-8′-胡萝卜素酸乙酯的蛋鸡配合饲料高效液相色谱图