

中华人民共和国国家标准

GB/T 43810—2024

饲料添加剂淫羊藿提取物中 黄酮醇苷的测定 高效液相色谱法

Determination of flavonol glycosides in epimedium extract as feed additive—
High performance liquid chromatography

2024-03-15 发布

2024-10-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、中国医学科学院药用植物研究所、天津博菲德科技有限公司、湖南农业大学、北京爱绿生物科技有限公司、中国农业科学院饲料研究所。

本文件主要起草人：张军民、张会艳、赵青余、汤超华、秦玉昌、郭宝林、邓雪娟、曾建国、姚浪群、张晶晶、刘秀斌、郭晓青、谷旭。

饲料添加剂淫羊藿提取物中 黄酮醇苷的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了饲料添加剂淫羊藿提取物中黄酮醇苷的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于饲料添加剂淫羊藿提取物中 5 种黄酮醇苷(淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和宝藿苷 I)的测定。

本文件中淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和宝藿苷 I 定量限均为 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

试样中的黄酮醇苷用甲醇溶液提取,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,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 乙腈:色谱纯。

5.4 70%甲醇溶液:量取 700 mL 甲醇(5.2)于 1 000 mL 容量瓶中,加水定容,混匀。

5.5 标准储备溶液(2 mg/mL):准确称取淫羊藿苷(CAS:489-32-7,纯度 $\geq 96\%$)、朝藿定 A(CAS:110623-72-8,纯度 $\geq 95\%$)、朝藿定 B(CAS:110623-73-9,纯度 $\geq 95\%$)、朝藿定 C(CAS:110642-44-9,纯度 $\geq 95\%$)、宝藿苷 I(CAS:113558-15-9,纯度 $\geq 95\%$)各 20 mg(精确至 0.01 mg),分别置于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(5.2)溶解并定容,混匀。-18℃以下保存,有效期 3 个月。

5.6 混合标准中间溶液(200 mg/L):分别准确移取标准储备溶液(5.5)各 1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用 70%甲醇溶液(5.4)定容,混匀。于 2℃~10℃保存,有效期 3 个月。

5.7 混合标准系列溶液:准确移取适量混合标准中间溶液(5.6),用 70%甲醇溶液(5.4)配制成质量浓

度分别为 0.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L 混合标准系列溶液。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：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平：精度 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 超声波清洗器。

6.4 离心机：转速不低于 4 000 r/min。

6.5 涡旋混匀器。

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 孔径的分析筛，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 2 份试验。称取 0.25 g 试样（精确至 0.1 mg），置于 50 mL 离心管中，加入 30 mL 70% 甲醇溶液（5.4），涡旋混匀 1 min，超声提取 10 min。于 4000 r/min 离心 5 min，将上清液转移至 100 mL 容量瓶中，残渣再用 30 mL 70% 甲醇溶液（5.4）提取，重复上述操作，合并上清液，用 70% 甲醇溶液（5.4）定容，混匀。移取适量提取液，4 000 r/min 离心 5 min，用微孔滤膜（5.8）过滤，备用。宜 20 h 内上机测定。

8.2 色谱参考条件

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 ，或性能相当者；
- b) 流动相：A 相为水（5.1），B 相为乙腈（5.3），梯度洗脱程序见表 1；
- c) 流速：1 mL/min；
- d) 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；
- e) 进样量：20 μL ；
- f) 检测波长：270 nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	75	25
15	75	25
23	70	30
33	48	52

表 1 梯度洗脱程序（续）

时间/min	A 相/%	B 相/%
40	48	52
41	75	25
45	75	25

8.3 测定

8.3.1 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(5.7)和试样溶液(8.1)上机测定。淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和宝藿苷 I 混合标准溶液的高效液相色谱图见附录 A。

8.3.2 定性

在相同试验条件下,试样溶液中淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和宝藿苷 I 的保留时间应与混合标准系列溶液(质量浓度相当)所对应组分的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

8.3.3 定量

分别以淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和宝藿苷 I 的质量浓度为横坐标、对应的色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其线性相关系数应不低于 0.99。试样溶液中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内,如超出范围,用 70%甲醇溶液(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

试样中淫羊藿苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和宝藿苷 I 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:

$$w_i = \frac{\rho_i \times V}{m \times 1\,000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

- 式中:
- w_i

——

试样中待测组分 i 的含量,单位为克每千克(g/kg);
- ρ_i

——

从标准曲线查得的试样溶液中待测组分 i 的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V

——

试样定容的体积,单位为毫升(mL);
- m

——

试样的质量,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。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V}{A_{si} \times m \times 1\,000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

- 式中:
- w_i

——

试样中待测组分 i 的含量,单位为克每千克(g/kg);
- 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,单位为毫克每升(mg/L);

- V ——试样定容的体积,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 ——试样的质量,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。

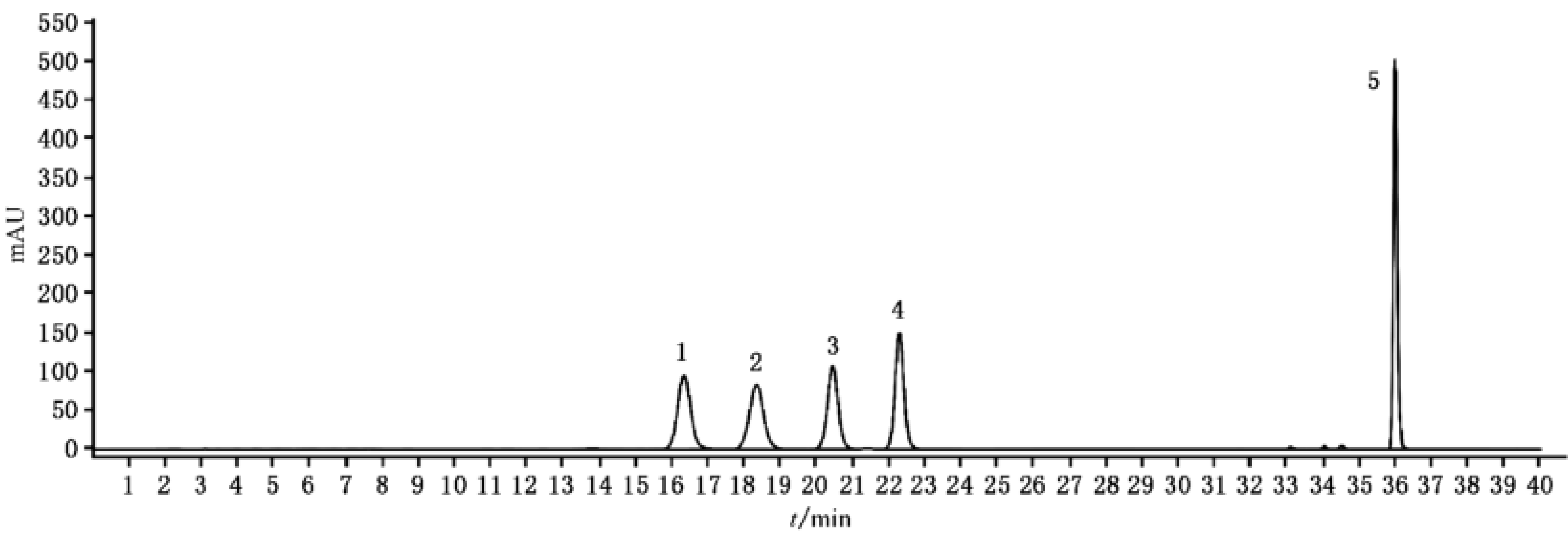
10 精密度

在重复性条件下,含量 $<1\text{ g/kg}$ 时,2 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 7%;含量 $\geq 1\text{ g/kg}$ 时,2 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)

5 种黄酮醇苷混合标准溶液液相色谱图

5 种黄酮醇苷混合标准溶液的液相色谱图见图 A.1。



标引序号说明：

- 1——朝藿定 A；
- 2——朝藿定 B；
- 3——朝藿定 C；
- 4——淫羊藿苷；
- 5——宝霍苷 I。

图 A.1 5 种黄酮醇苷混合标准溶液(50 mg/L)的液相色谱图

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

饲料添加剂淫羊藿提取物中
黄酮醇苷的测定 高效液相色谱法

GB/T 43810—2024

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址:www.spc.net.cn

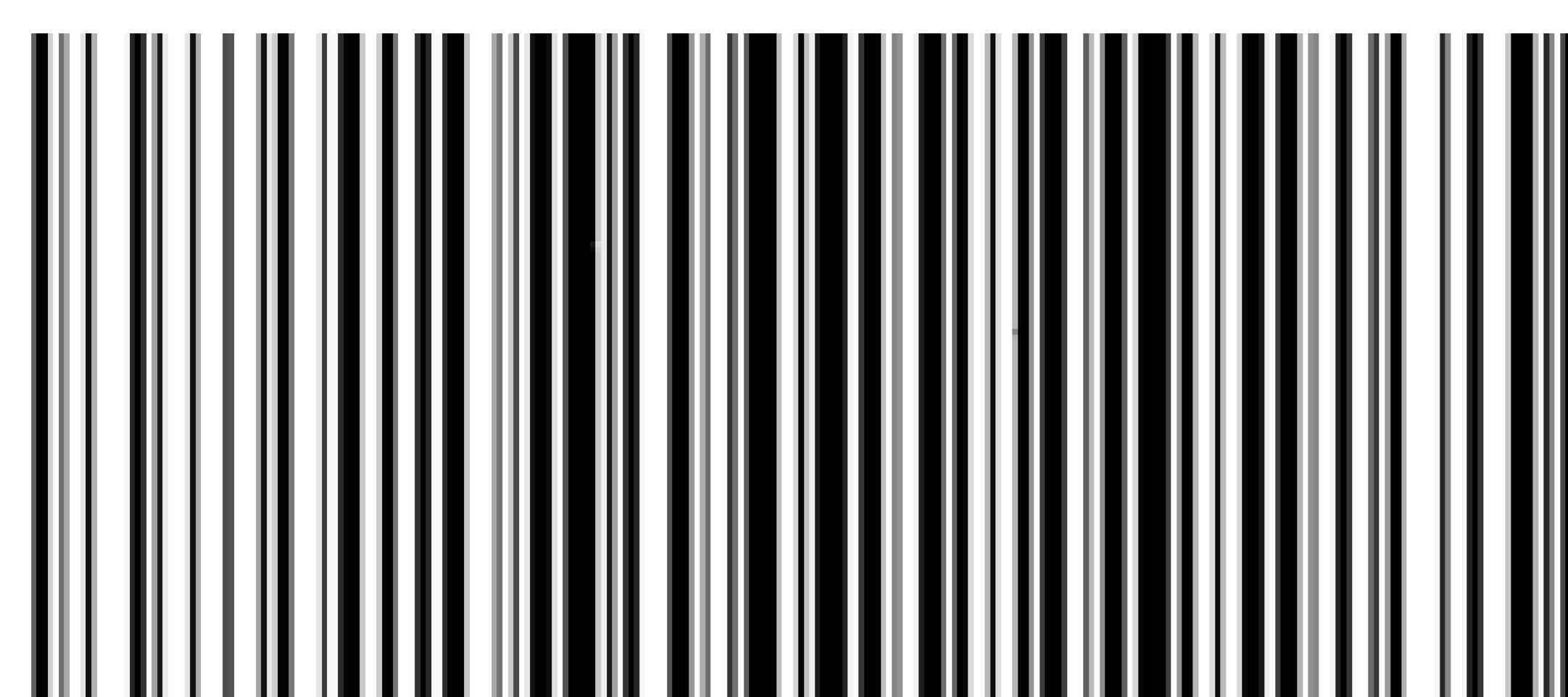
服务热线:400-168-0010

2024年3月第一版

*

书号:155066·1-75426

版权专有 侵权必究



GB/T 43810-2024