



中华人民共和国国家标准

GB/T 23187—2008

饲料中叶黄素的测定 高效液相色谱法

Determination of lutein in feeds—
High performance liquid chromatography

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

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、佛山市南海区维德生物技术有限公司。

本标准主要起草人:齐德生、于炎湖、陈红、陶正国、高俊勤、邝金媚、辜垂鹏、黄楷彬、孙玉国、张妮娅。

饲料中叶黄素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了高效液相色谱法测定饲料中叶黄素的方法。

本标准适用于单一饲料、添加剂预混合饲料、浓缩饲料及配合饲料中叶黄素的测定。方法的定量限为 0.5 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008, ISO 3696:1987, MOD)

GB/T 14699.1 饲料 采样(GB/T 14699.1—2005, ISO 6497:2002, IDT)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备(GB/T 20195—2006, ISO 6498:1998, IDT)

3 原理

试样中叶黄素经碱液皂化及有机溶剂提取后，取上清液过滤，注入高效液相色谱仪进行分离，用紫外检测器检测，外标法计算叶黄素的含量。

4 试剂和材料

除特殊说明外，所用试剂均为分析纯试剂，用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 正己烷。

4.2 丙酮。

4.3 无水乙醇。

4.4 甲苯。

4.5 甲醇。

4.6 异丙醇。

4.7 氢氧化钾。

4.8 无水硫酸钠。

4.9 提取剂：正己烷-丙酮-无水乙醇-甲苯(34+23+20+23)混合液。

4.10 氢氧化钾甲醇溶液(400 g/L)：40 g 氢氧化钾溶于甲醇中，冷却后用甲醇稀释至 100 mL。

4.11 硫酸钠溶液(100 g/L)：10 g 无水硫酸钠溶于 100 mL 水中。

4.12 叶黄素标准储备液：准确称取叶黄素标准品(含量大于 99.0%)2 mg(精确至 0.1 mg)，先加入少量流动相超声溶解，用流动相定容至 100 mL 棕色容量瓶，作标准储备液，4℃避光保存，保存期 3 天。

4.13 叶黄素标准工作液：取叶黄素标准储备液(4.12)用流动相逐级稀释成 0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL 系列标准工作液。

5 仪器

5.1 恒温水浴锅。

5.2 分析天平：感量 0.000 1 g。

5.3 高效液相色谱仪：配 UV-VIS 检测器。

5.4 旋转蒸发仪。

5.5 分液漏斗:250 mL。

5.6 分析实验室常用玻璃仪器。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 采集有代表性的样品,按 GB/T 20195 进行样品制备。粉碎过 0.45 mm 孔筛,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

警告——整个制备过程应避免光操作!

称取试料 1 g~5 g(m),精确到 0.000 1 g,置于 100 mL 棕色容量瓶中。加入 30 mL 提取剂(4.9),塞紧,旋转振摇 1 min。加入 2 mL 40%氢氧化钾甲醇液(4.10)于容量瓶中,旋转振摇 1 min,将容量瓶接上空气冷凝装置或塞紧瓶塞,置于 50℃~60℃水浴中加热 20 min。于暗处放置 1 h,加入 20 mL 正己烷(4.1),旋转振摇 1 min,加入 10%硫酸钠溶液(4.11)50 mL,转移到 250 mL 分液漏斗(5.5)中,猛烈振摇 1 min,于暗处放置 1 h,取出上层溶液;水相分别加入 20 mL 正己烷(4.1)提取两次,合并上层液,于旋转蒸发仪中 50℃~60℃水浴浓缩至干,根据样品中叶黄素含量高低,残余物加正己烷(4.1)10 mL~100 mL(V_1),充分溶解后经 0.45 μ m 滤膜过滤,滤液备用。取 20 μ L 滤液在高效液相色谱仪上测定叶黄素组分的峰面积,根据标准工作曲线(7.2.2)计算滤液中叶黄素的浓度(c_0)。

7.2 测定

7.2.1 色谱条件

色谱柱:硅胶柱(5.0 μ m,250 mm×4.6 mm)。

流动相:正己烷-乙酸乙酯-异丙醇(73+27+1.5)混合液。

流速:1.5 mL/min。

柱温:室温。

进样量:20 μ L。

检测器:紫外检测器,使用波长 446 nm。

7.2.2 标准工作曲线的绘制

各取 20 μ L 叶黄素标准工作液上机进行高效液相色谱分析。以浓度(c)为横坐标,以峰面积(A)为纵坐标,做标准工作曲线。

8 结果计算

饲料中叶黄素含量 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:

c_0 ——由标准工作曲线查得的试样滤液中叶黄素的浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);

V_1 ——加入正己烷的体积(7.1),单位为毫升(mL);

m ——称样量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定后的算术平均值表示,结果表示到 0.1 mg/kg。

9 精密度

对同一样品同时或快速连续地进行两次测定,所得结果的相对偏差:叶黄素含量小于或等于 50 mg/kg 时,不得大于 15%;含量大于 50 mg/kg 时,不得大于 10%。