

中华人民共和国农业行业标准

《天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸
的测定 高效液相色谱法》

编制说明

(公开征求意见稿)

起草单位：

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

北京爱绿生物科技有限公司

天津博菲德科技有限公司

湖南农业大学

河南福源青阳生物科技有限公司

目录

一、工作简况（包括任务来源、制定背景、起草过程等）	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 制定背景.....	1
1.3 起草过程.....	5
二、标准编制原则、主要内容及其确定依据	9
2.1 标准编制原则.....	9
2.2 主要内容及确定依据.....	9
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益	10
3.1 试验验证的分析、综述报告.....	10
3.1.1 标准名称.....	10
3.1.2 前言.....	10
3.1.3 主体内容.....	10
3.1.4 范围的界定.....	10
3.1.5 原理.....	11
3.1.6 试剂和材料.....	11
3.1.7 仪器和设备.....	12
3.2 标准的方法研究内容.....	12
3.2.1 样品的制备.....	12
3.2.2 样品中菊苣酸和咖啡酸的提取.....	12
3.2.3 菊苣酸和咖啡酸 HPLC 定量分析方法的建立.....	17
3.2.4 标准技术指标的论证.....	25
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况	37
五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因	37
六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系	37
七、重大分歧意见的处理经过和依据	37
八、涉及专利的有关说明	37
九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议	37
十、其他应当说明的事项	38
参考文献	39

一、工作简况（包括任务来源、制定背景、起草过程等）

1.1 任务来源

根据《农业农村部农产品质量安全监管局关于下达 2023 年农业国家标准和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2023〕51 号），项目名称为：《天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定 高效液相色谱法》，项目编号是 NCB-23077。项目承担单位为中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、北京爱绿生物科技有限公司、天津博菲德科技有限公司、湖南农业大学。项目主持人为张军民研究员。在本标准的编制过程中，河南福源青阳生物科技有限公司在样品采集、试验方法的验证等方面做了大量工作，将河南福源青阳生物科技有限公司加入项目承担单位。

1.2 制定背景

2002 年，世界卫生组织（WHO）提出“在食用动物中减少抗生素使用的全球原则”。自 2006 年至今，随着全世界范围内遏制动物源耐药性行动计划的开展，欧盟、日本、韩国、美国等国家也开始限制或全面禁止饲用抗生素作为促生长剂在饲料中使用。自 2020 年开始，我国开始实施严格的“养殖限抗”、“饲料禁抗”和“产品无抗”政策之后，天然植物饲料原料及其产品因其具有绿色、安全、有效等特点作为饲料原料已成为大众关注的焦点，并广泛应用于饲料工业。目前，天然植物饲料原料及其产品在我国已经形成平稳而快速上升发展的产业链，并逐渐成熟。天然植物及相关产品作为抗生素替代品之一用于畜禽养殖，已受到国内外广泛关注。

天然植物，尤其具有食药同源特性的天然植物在我国具有悠久的历史，天然植物作为饲料原料使用，产品类型通常包括天然植物原粉或者其提取物。2013 年 1 月，农业农村部发布《饲料原料目录》，115 种天然植物被收录其中，同年又明确天然植物粗提物也归为饲料原料，目前有 117 种天然植物被收录于《饲料原料目录》。《天然植物饲料原料通用要求》中华人民共和国国家标准 GB/T 19424-2018 首次对天然植物饲料原料的给出了具体的详细定义：规定以天然植物饲料原料，植物学纯度不低于 95%的单一天然植物干燥物、粉碎物或粗提物为原料，添加或不添加辅料制得的单一型产品；或以 2 种或 2 种以上天然植物干燥物、粉碎物或粗提物为原料，添加或不添加辅料，经复配加工而成的复配型产品，

或由天然植物粉碎物和粗提物复配而成的混合型产品。包括天然植物干燥物饲料原料（单一型和复配型）、天然植物粉碎物饲料原料（单一型和复配型）、天然植物粗提物饲料原料（单一型和复配型）、混合型天然植物饲料原料¹⁻²。

咖啡酸（Caffeic acid），别名为 3, 4-二羟基桂皮酸。化学名为 trans-3, 4-dihydroxycinnamic acid，分子式为 C₉H₈O₄，分子量为 180.16，CAS 号为 331-39-5。菊苣酸（Cichoric acid），分子式为 C₂₂H₁₈O₁₂，分子量为 474.37，CAS 号为 70831-56-0，由咖啡酸和酒石酸缩合而成，属咖啡酸衍生物。咖啡酸及其衍生物在植物体内均是通过莽草酸途径合成，由苯丙氨酸经过脱氨形成桂皮酸，再由桂皮酸衍生而来。苯环上的邻二酚羟基是咖啡酸及其衍生物的活性位点，苯环上取代基的吸电子能力越强，其生物活性越强，二者化学结构式见图 1。咖啡酸及其衍生物普遍存在于一些植物中，是植物中分布广泛的次级代谢产物。如咖啡酸是蒲公英药材中的主要活性物质之一，阿魏酸为伞形科多种药用植物的主要成分，绿原酸主要存在于忍冬科的药用植物中，苹果、山楂中也含有绿原酸等咖啡酸衍生物。

咖啡酸和菊苣酸具有提高免疫力、抗氧化、清除自由基、维持乳房健康的功效，提高动物的生长性能和改善肉品质等作用³⁻⁵。菊苣酸还可调节血糖代谢、延缓衰老的作用，具有成分单一、安全、高效、毒性小的优点，已被欧美国家作为免疫增强剂而广泛使用。乔天磊通过在断奶仔猪饲料中添加咖啡酸，发现咖啡酸能改善肠道形态和肠道菌群结构，提高抗氧化能力和免疫功能，增强肠道屏障功能，进而提高断奶仔猪的生长性能⁶。Ma 等通过体外试验和斑马鱼模型研究菊苣酸的抗氧化作用，发现 6、12 及 24 mg/L 的菊苣酸能刺激超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-px) 的产生，并且也通过 Keap1-Nrf2 和 HO-1 信号通路发挥抗氧化作用⁷。刁志君分别从细胞和动物水平研究了菊苣酸抑制机体氧化的能力与机制，研究表明 100 mg/kg 菊苣酸能显著提高小鼠大脑皮质和肝脏中 Nrf2 通路相关蛋白的表达，0.5 mg/m L 的菊苣酸能够维持细胞内氧化还原平衡，以及 50 μmol/L 菊苣酸和 100 μmol/L H₂O₂ 共同作用能够上调 Nrf2/Keap1 信号通路下游相关抗氧化防御酶的表达⁸。

通过查阅《中华人民共和国药典》和《中华人民共和国兽药典》以及调研相

关文献资料可知，菊苣酸和咖啡酸是蒲公英（7.6.68）、菊花（7.6.54）、菊苣（4.5）等菊科为主的天然植物饲料原料中的主要活性成分，也通常被用于真伪鉴别和质量控制的主要成分⁹⁻¹⁰。杜仲（7.6.23）、杜仲叶（7.6.24）、川穹（7.6.14）、金银花（7.6.51）、升麻（7.6.84）等天然植物中也含有咖啡酸或菊苣酸²。菊科类天然植物饲料原料多为菊科多年生草本植物²，耐寒抗热、适应性、抗逆性强，资源分布非常广泛，在我国各省均有分布，作为天然植物饲料原料在饲料工业、畜禽养殖中广泛应用，具有天然、安全等特点，在提高畜禽生产性能、增强抗氧化应激能力、改善机体免疫功能以及调节生理代谢等方面发挥着重要的作用。邓海涛¹¹在肉鸡日粮中添加 1% 的蒲公英，发现显著提高了肉鸡的采食量、平均日增重及饲料转化率，降低发病率，对调节免疫系统及免疫器官发育具有促进作用，有效提高机体免疫力，姚东云¹²研究发现，在蛋鸡饲料中长期添加蒲公英粗提物，可以提高蛋鸡的产蛋率、平均蛋重和饲料转化率，降低次蛋率和破损率，还可有效缓解蛋鸡的氧化应激。曹林等¹³研究发现，将甘草和蒲公英添加在三元杂交猪饲料中，可改善饲料的适口性、提高营养物质消化率，提高日增重，降低料重比。侯宏伟等¹⁴用一定比例的黄芪、麦芽、党参、蒲公英等配制成复方中草药并添加至断奶仔猪日粮中，结果发现仔猪料重比和腹泻率降低，生长性能提高，促进断奶仔猪机体健康生长，且添加量为 0.5% 时效果最好。隋明静¹⁵在断奶仔猪的日粮中添加由金银花、杜仲、黄芪等复方中草药饲料添加剂，研究表明，复方中草药中的活性物质对免疫器官分泌更多的免疫细胞具有协同作用，可提高胸腺指数和脾脏指数，从而增强断奶仔猪的免疫力。然而，由于天然植物饲料原料明显的种属、地域、生长环境等差别，蒲公英等天然植物饲料原料中的有效成分及含量具有显著的差异，且提取工艺不同、产品多以复配型或混合型为主，导致市场上蒲公英等天然植物饲料原料的质量参差不齐。

目前，国内外还没有蒲公英、菊花等天然植物饲料原料的相关质量标准及方法标准，相关企业对蒲公英相关成分含量较大，其中咖啡酸含量主要利用薄层色谱法或高效液相色谱法检测，含量范围差别较大，具体如表 1 所示¹⁶⁻¹⁸。同时，菊苣酸化学性质不稳定，对紫外线敏感，存放于低温（4℃）的乙醇溶液中能延缓其降解，并能适当延长其贮藏时间；且在提取过程中，因干燥方法和温度等工艺的不同对菊苣酸有较大的影响，因而从植物中提取和保存菊苣酸具有很大的挑

战性。标准的缺乏，质量控制成分不稳定性，生产工艺的差别等，不利于饲料原料及其产品的监管，也不利于饲料原料质量安全监管和养殖业健康发展。因此，建立天然植物饲料原料中咖啡酸和菊苣酸的含量测定的方法非常必要。有利于满足企业和监管部门进行产品质量控制的迫切需要，也是促进畜牧业绿色、高效、健康发展的必经之路。

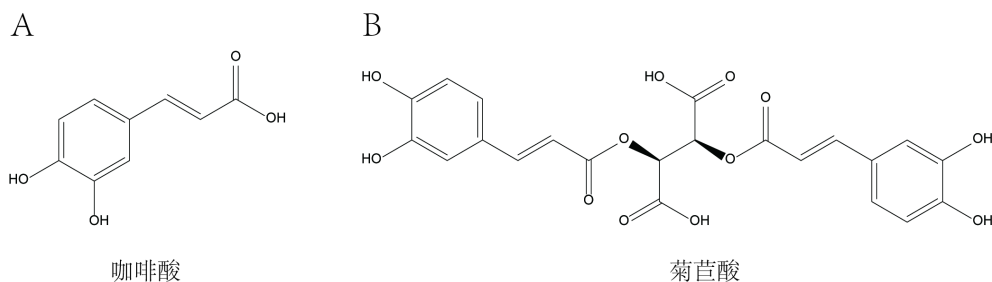


图 1. 咖啡酸和菊苣酸的化学结构

表 1 国内外食品和饲料中菊苣酸和咖啡酸相关的标准汇总

序号	标准编号	标准名称	检测对象 (咖啡酸/菊苣酸)	检测方法
1	GH/T 1312-2020	蜂胶中绿原酸、咖啡酸、p-香豆酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和阿替匹林 C 的测定 高效液相色谱法	咖啡酸	HPLC
2	GH/T 1280-2019	蜂胶中咖啡酸、p-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素含量的测定 反相高效液相色谱法	咖啡酸	HPLC
3	Q/320982 ZHX 0123-2019	复合菊苣酸溶液	菊苣酸	滴定法
4	Q/320982 TMQ 0140-2019	复合菊苣酸溶液	菊苣酸	滴定法
5	Q/VBL 0004S-2018	3,4-二羟基肉桂酸（咖啡酸）	咖啡酸	HPLC
6	Q/SXTYDX 008-2020	《饲料原料 蒲公英》	咖啡酸 $\geq 0.02\%$	HPLC
7	Q/206158532C·89-2022	《饲料原料 蒲公英》	咖啡酸 $\geq 0.02\%$	HPLC
8	Q/370725BGM 109-2021	《天然植物饲料原料 蒲公英粗提物》	咖啡酸 $\geq 0.02\%$	HPLC
9	Q/SHBH 021-2022	《饲料原料 蒲公英》	/	/
10	Q/SXBSY 049-2022	《饲料原料 蒲公英》	咖啡酸 I 型 $\geq 0.30\%$ ；II 型 $\geq 0.80\%$ ；III 型 $\geq 1.00\%$ ；IV 型 $\geq 1.50\%$ ；V 型 $\geq 2.00\%$ ；VI 型 $\geq 3.00\%$	HPLC
11	Q/91510723MA6AEN4M1L.	《饲料原料 蒲公英》	蒲公英多糖	分光光

	28-2022			度法
12	Q/HNJD 040-2021	《饲料原料 蒲公英》	鉴别出咖啡酸	薄层色谱法
13	Q/579609236Q·23-2023	《饲料原料 蒲公英粗提物》	咖啡酸 \geq 0.01%	HPLC
14	Q/411627000000 ZSB 079-2022	《天然植物饲料原料 蒲公英粗提物》	咖啡酸 \geq 0.004%	HPLC
15	Q/371725YJH002-2023	《天然植物饲料原料 蒲公英（复配型）》	/	/
16	Q/371725YXC005-2022	《天然植物饲料原料 蒲公英（复配型）》	/	/
17	中华人民共和国药典（2020版）	蒲公英	菊苣酸	HPLC
18	YBZ-PFKL-2021101	蒲公英（碱地蒲公英）配方颗粒	菊苣酸、咖啡酸	HPLC

1.3 起草过程

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、北京爱绿生物科技有限公司、天津博菲德科技有限公司、湖南农业大学、河南福源青阳生物科技有限公司接到标准制定任务后，系统收集国内外天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量测定的相关方法以及蒲公英等天然植物饲料原料的产品标准等相关资料。制定实施方案，明确主要成分、提取方法、净化等前处理步骤，并建立优化天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的高效液相色谱法。进行系统的方法学验证，并进行实验室间验证。

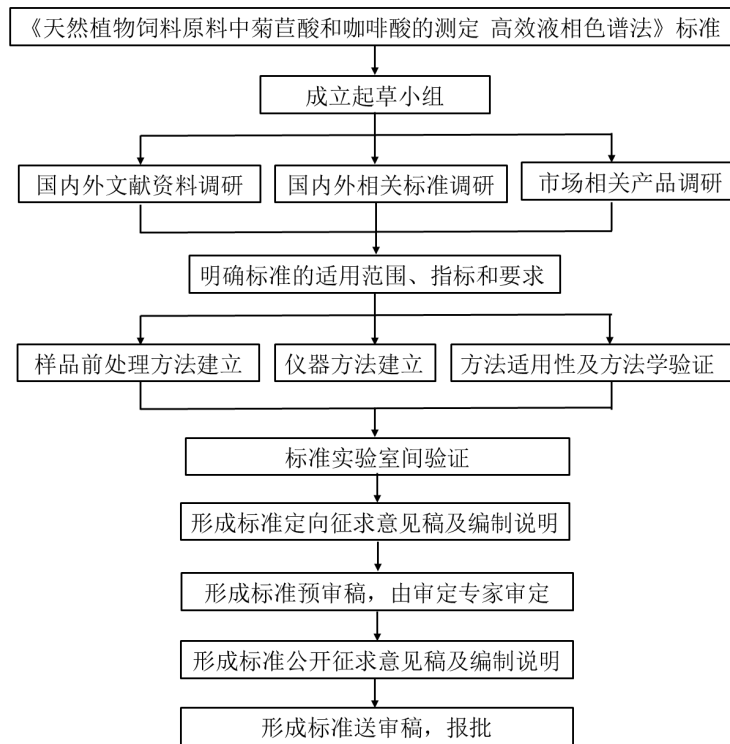


图 2 标准编制的技术路线

主要起草过程：

- 1、2023 年 1 月，成立标准编制小组。组织标准编制单位中从事标准制修订、仪器分析等具有丰富技术经验的专业研究人员组成标准编制小组。
- 2、2023 年 2 月，召开项目启动会议，确定了该标准制定的技术路线、技术内容、分工以及时限要求等。
- 3、2023 年 2 月-3 月，查阅文献以及相关标准等资料，收集样品。
- 4、2023 年 3 月-7 月，建立优化蒲公英粗提物中咖啡酸和菊苣酸的高效液相色谱法，进行系统的方法学验证。
- 5、2023 年 7 月-8 月，进行实验室间验证，验证方法的可靠性和重复性。
- 6、2023 年 8 月-9 月，形成定向征求意见稿并以函审的方式发往国内多家单位征求对标准的意见。

2023 年 8 月 17 日-2023 年 9 月 3 日，标准编制小组根据讨论的专家和单位，分别向相关的行业主管部门、科研机构、检测部门和企业等 21 家单位发出了定向标准征求意见稿，向相关专家和单位征求标准修改意见。共收集到来自 20 份反馈意见 155 条，归纳汇总为 116 条，部分采纳或不采纳 20 条。标准编制小组意见经过反复研究、讨论后，修改形成了《天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸

的测定 高效液相色谱法》预审稿及编制说明，其中部分采纳或不采纳意见的依据说明如表 2 所示：

表 2 部分采纳或不采纳意见的依据说明

序号	章条编号	意见内容	处理意见及理由
1	封面	建议将英文标题中“—”替换为“by”	不采纳，GB/T 1.1-2020 规定文件名称的英文译名各元素之间为一字线形式的连接号（—）。
2		“本文件天然植物饲料原料（单一型和复配型）中菊苣酸和咖啡酸的定量限为 0.1 g/kg，检出限为 0.03 g/kg；天然植物粗提物饲料原料（单一型和复配型）中菊苣酸和咖啡酸的定量限为 0.2 g/kg，检出限为 0.06 g/kg；混合型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的定量限为 0.2 g/kg，检出限为 0.06 g/kg。”建议修改为“本文件菊苣酸的方法检出限为**，定量限为**；本文件咖啡酸的方法检出限为**，定量限为**。”	不采纳，GB/T 19424-2018 中对天然植物饲料原料进行了分类，且在试验过程中不同类型的天然植物饲料原料的检出限和定量限有差别。
3	1	“本文件天然植物饲料原料（单一型和复配型）中菊苣酸和咖啡酸的定量限为 0.1 g/kg”建议修改为“本文件天然植物干燥物和粉碎物饲料原料（单一型和复配型）中菊苣酸和咖啡酸的定量限为 0.1 g/kg。”	部分采纳，已经修改为“本文件植物学纯度不低于 95%的单一或以 2 种或 2 种以上天然植物干燥物、粉碎物为原料，添加或不添加辅料制得的单一型和复配型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.03 g/kg、定量限为 0.1 g/kg；以植物学纯度不低于 95%的单一或以 2 种或 2 种以上天然植物粗提物为原料，添加或不添加辅料制得的单一型和复配型天然植物粗提物饲料原料和由天然植物粉碎物和粗提物复配而成的混合型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.06 g/kg、定量限为 0.2 g/kg。”
4		“本文件天然植物饲料原料（单一型和复配型）中菊苣酸和咖啡酸的定量限为 0.1 g/kg，检出限为 0.03 g/kg；天然植物粗提物饲料原料（单一型和复配型）中菊苣酸和咖啡酸的定量限为 0.2 g/kg，检出限为 0.06 g/kg；混合型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的定量限为 0.2 g/kg，检出限为 0.06 g/kg。”建议修改为“本文件单一型和复配型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.03 g/kg、定量限为 0.1 g/kg；单一	同上。

		型和复配型天然植物饲料提取物中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.06 g/kg、定量限为 0.2 g/kg；混合型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.06 g/kg、定量限为 0.2 g/kg。”	
5	4	“试样中的菊苣酸和咖啡酸用乙醇溶液提取，高效液相色谱检测，色谱峰的保留时间定性，外标法定量。”建议修改为“试样中的菊苣酸和咖啡酸用乙醇溶液提取后，采用配有紫外检测器或者二极管阵列检测器的高效液相色谱仪在波长 327 nm 处检测，根据色谱峰的保留时间定性，外标法定量。”	不采纳，已修改为“试样中的菊苣酸和咖啡酸用乙醇溶液提取，高效液相色谱测定，外标法定量。”
6	5.1	建议删除“水：GB/T 6682，一级。”	不采纳，GB/T 20001 中“试剂或材料”举例中对水进行了规定。
7	5.4	“甲酸：色谱纯。”建议修改为“甲酸：分析纯。”	不采纳，甲酸用于配制流动相，用色谱纯。
8	5.7	建议“标准储备溶液”修改为“标准储备液”。	不采纳，不符合 GB/T 20001 的规定。
9	5.9	建议混合标准系列溶液设置 6 个点的浓度	不采纳，GB/T 27417 中建议采用校准曲线法定量，并至少有 6 个校准点（包括空白），浓度范围尽可能覆盖一个或多个数量级。由于样品中含量差异较大，因此选取线性范围为 0~100 µg/mL。
10		是否是植物粗提取物或含有粗提取物的复合或混合型原料的称量为 0.5 g?	不采纳，已修改为“准确称取天然植物饲料原料试样 0.5~1.0 g”。
11	8.1	“（天然植物饲料原料（单一型和复配型）1.0 g；天然植物粗提取物饲料原料（单一型和复配型）0.5 g；混合型天然植物饲料原料 0.5 g）”建议更改为“[天然植物饲料原料（单一型和复配型）1.0 g；天然植物粗提取物饲料原料（单一型和复配型）0.5 g；混合型天然植物饲料原料 0.5 g]”。	同上。
12		“准确移取 10 mL 提取液于 20 mL 离心管中”建议修改为“移取 10 mL 提取液于 20 mL 离心管中”。	部分采纳，已修改为“移取适量提取液于离心管中”。
13		建议图表中“甲醇（%）”、“0.3%甲酸（%）”修改为“A 相（%）”、“B（%）”表 1 中用 A 和 B 代替。	部分采纳，已修改为“A 相/%”、“B 相/%”。
14	8.3.3	“如超出线性范围，用 60%乙醇溶液（5.5）稀释后重新测定。”修改为“如超出线性范围，稀释样品，使样品含量在线性范围内后重新测定。”	不采纳，原表述更清楚简洁。
15	10	建议增加再现性要求。	不采纳，参考 GB/T 20001.4 要求，

			给出了精度度来表示再现性精密度。
16	附录 A	建议在色谱图上表示待测物名称,然后删掉说明。	不采纳,不符合 GB/T 1.1-2020 标准化工作导则中对图中的注和图脚注规定。
17	编制说明 3.1	建议删除编制说明中“3.1”相关内容。	不采纳,3.1 部分使编制说明的内容更完整。
18	编制说明	建议列出空白蒲公英样品中菊苣酸和咖啡酸的含量。	不采纳,无不含有咖啡酸和菊苣酸的蒲公英样品。
19	3.2.2	补充不同提取剂、提取条件测定的两种物质的液相色谱测定数据,最好用折线图表示;在此基础上再进行添加回收率测定,确定最佳提取条件。	部分采纳,样品中浓度测定浓度和回收率用复合图表示。
20	编制说明 3.2.3.5	建议简化洗脱条件的选择。	不采纳,因不同基质的天然植物饲料原料中绿原酸、阿魏酸、槲皮素等干扰物质的影响较大,文本中洗脱条件可避免这些物质的干扰。

7、2023 年 9 月-10 月,起草工作组对提出的意见经过反复研究、讨论和处理后,修改形成了预审稿及编制说明,并申请预审。

8、2024 年 1 月 22 日,全国饲料工业标准化技术委员会微生物及酶制剂标准化工作组组织专家对中国农业科学院北京畜牧兽医研究所等单位起草的国家标准《天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定 高效液相色谱法》(预审稿)进行了认真审查。专家组由常碧影、顾进华、董虹、乔宇、魏秀莲、程林丽、张凤桦和宋荣 8 位专家组成。列席企业代表有晨光生物科技集团股份有限公司高伟、河南金百合生物科技股份有限公司朱梦杰、四川恒瑞通达生物科技有限公司董素军。在听取起草专家汇报的基础上,专家组审查了标准文本及编制说明,进行了指导提出了意见,归纳汇总为 19 条,部分采纳或不采纳 0 条。标准编制小组意见经过反复研究、讨论后,修改形成了《天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定 高效液相色谱法》标准公开征求意见稿,申请公开征求意见。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

2.1 标准编制原则

本标准是根据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分:标准的结构与编写规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第 4 部分:试验方法标准》的规定

进行的编制¹⁶⁻¹⁷。并且按照 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》对方法学进行了考察，确保方法的科学性、可行性和可靠性。标准制定符合我国国情，满足饲料原料的检测要求，且普适性强，操作简单，易于推广¹⁸。

2.2 主要内容及确定依据

在编制过程中，标准编制小组查阅了国内外相关文献、标准等资料，并对天然植物饲料原料的市场规模进行了调研，参考各行部门制定的同类的标准方法以及饲料生产企业相关的产品质控方法，遵循“先进性、实用性、统一性和规范性”的原则，坚持标准的可操作性，完成了天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检测工作，形成了标准草案和编制说明。目前，国内外还没有关于天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量测定的相关方法标准，咖啡酸和菊苣酸含量测定相关标准以及蒲公英等天然饲料原料的产品标准如表 1 所示。本标准在参考《蜂胶中绿原酸、咖啡酸、p-香豆酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和阿替匹林 C 的测定 高效液相色谱法》(GH/T 1312-2020)中咖啡酸含量的测定方法、《3,4-二羟基肉桂酸(咖啡酸)》(Q/VBL 0004S-2018)和 2020 年版《中华人民共和国药典》蒲公英药材及饮片中菊苣酸的测定方法及相关文献的基础上，确定其提取过程和检测条件^{9,10 16-17,24-25}。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

3.1 试验验证的分析、综述报告

3.1.1 标准名称

本标准主要解决天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸测定的技术问题，所以将本标准的名称定为：《天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定 高效液相色谱法》。因此将本标准的全称翻译为“Determination of chicorionic acid and caffeic acid in natural plant feedstuff—High performance liquid chromatography”。

3.1.2 前言

明确了本标准的起草依据、归口单位及主要起草单位、起草人。

3.1.3 主体内容

标准的主体内容包括：范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、试剂和

材料、仪器设备、样品、试验步骤、试验数据处理、精密度和附录。

3.1.4 范围的界定

本文件描述了天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡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中菊苣酸和咖啡酸的测定。

本文件天然植物干燥物、粉碎物单一型和复配型饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.03 g/kg，定量限为 0.1 g/kg，含粗提物的天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的检出限为 0.06 g/kg，定量限为 0.2 g/kg。

3.1.5 原理

试样中的菊苣酸和咖啡酸用乙醇溶液提取，高效液相色谱检测，外标法定量。

3.1.6 试剂和材料

3.1.6.1 水：GB/T 6682，一级。

3.1.6.2 甲醇：色谱纯。

3.1.6.3 乙醇：分析纯。

3.1.6.4 甲酸：色谱纯。

3.1.6.5 乙酸：色谱纯。

3.1.6.6 磷酸：色谱纯。

3.1.6.7 60%乙醇溶液：移取 600 mL 乙醇于 1 000 mL 容量瓶中，加水(3.1.6.1)定容，混匀。

3.1.6.8 标准储备溶液（10 mg/mL）：准确称取菊苣酸标准品（CAS 号：70831-56-0，纯度≥98%）、咖啡酸标准品（CAS 号：331-39-5，纯度≥98%）各 100 mg（精确至 0.1 mg），分别置于 10 mL 棕色容量瓶中，用乙醇（3.1.6.3）溶解并定容，混匀。-18 °C 以下避光保存，有效期 6 个月。

3.1.6.9 混合标准储备溶液：分别准确移取适量的菊苣酸和咖啡酸标准储备溶液（3.1.6.8）各 1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用 60%乙醇溶液（3.1.6.7）定容，混匀。-18 °C 以下避光保存，有效期 6 个月。

3.1.6.10 混合标准系列溶液：准确移取适量混合标准储备溶液于 10 mL 棕色容量瓶中，用 60%乙醇溶液（3.1.6.7）定容至刻度线，配成系列标准溶液，浓度分别为：0.5 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 和 200 μg/mL。临用现配。

3.1.6.11 微孔滤膜：0.45 μm，有机系。

3.1.7 仪器和设备

高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器；天平：感量为 1.0 g；分析天平：感量 1 mg 和 0.1 mg；超声波清洗机；离心机：转速不低于 4 000 r/min；涡旋混合器。

3.2 标准的方法研究内容

3.2.1 样品的制备

按 GB/T 20195 制备试样，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 的孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，避光保存，备用。

3.2.2 样品中菊苣酸和咖啡酸的提取

3.2.2.1 提取溶液的选择

提取试剂是影响目标化合物提取效率的一个重要因素。参考《中国药典》蒲公英药材及饮片中菊苣酸成分的提取方法以及国家标准 GB/H 1312-2020《蜂胶中绿原酸、咖啡酸、p-香豆酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和阿替匹林 C 的测定 高效液相色谱法》的方法，为了获得最佳的提取试剂，比较了不同浓度的甲醇溶液（10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%和 80%）、乙醇溶液（10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%和 80%）以及纯水对天然植物饲料原料蒲公英粉中菊苣酸和咖啡酸的提取效果，不同浓度的甲醇溶液（20%、40%、60%、80%和 100%）、乙醇溶液（20%、40%、60%、80%和 100%）以及纯水对天然植物饲料原料蒲公英粗提物中菊苣酸和咖啡酸的提取效果。

提取方法为：平行做两份试验，称取天然植物饲料原料蒲公英粉试样 1.0 g，精确至 1 mg，分别置于 100 mL 离心管中，准确加入不同浓度的提取溶液 40 mL。涡旋混匀 5 min，置于水浴超声提取 60 min，于 4 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移至干净的 50 mL 容量瓶中，同浓度的提取溶液定容至 50 mL 刻度线，取适量提取液，4 000 r/min 离心 10 min，吸取适量上清待测液过 0.45 μm 微孔滤膜，待测。

平行做两份试验，称取天然植物饲料原料蒲公英粗提物试样 0.5 g，精确至 1 mg，分别置于 100 mL 离心管中，准确加入不同浓度的提取溶液 40 mL。涡旋混匀 5 min 后，重复上述提取步骤，得到待测液。

分别计算天然植物饲料原料蒲公英粉和蒲公英粗提物中菊苣酸和咖啡酸的含量，结果显示，乙醇溶液提取效果均较好，当提取溶剂为 60%乙醇溶液时，菊苣酸和咖啡酸的提取效果整体较好，计算获得的菊苣酸和咖啡酸的含量最高。综合考虑，选择 60%乙醇作为提取溶液。

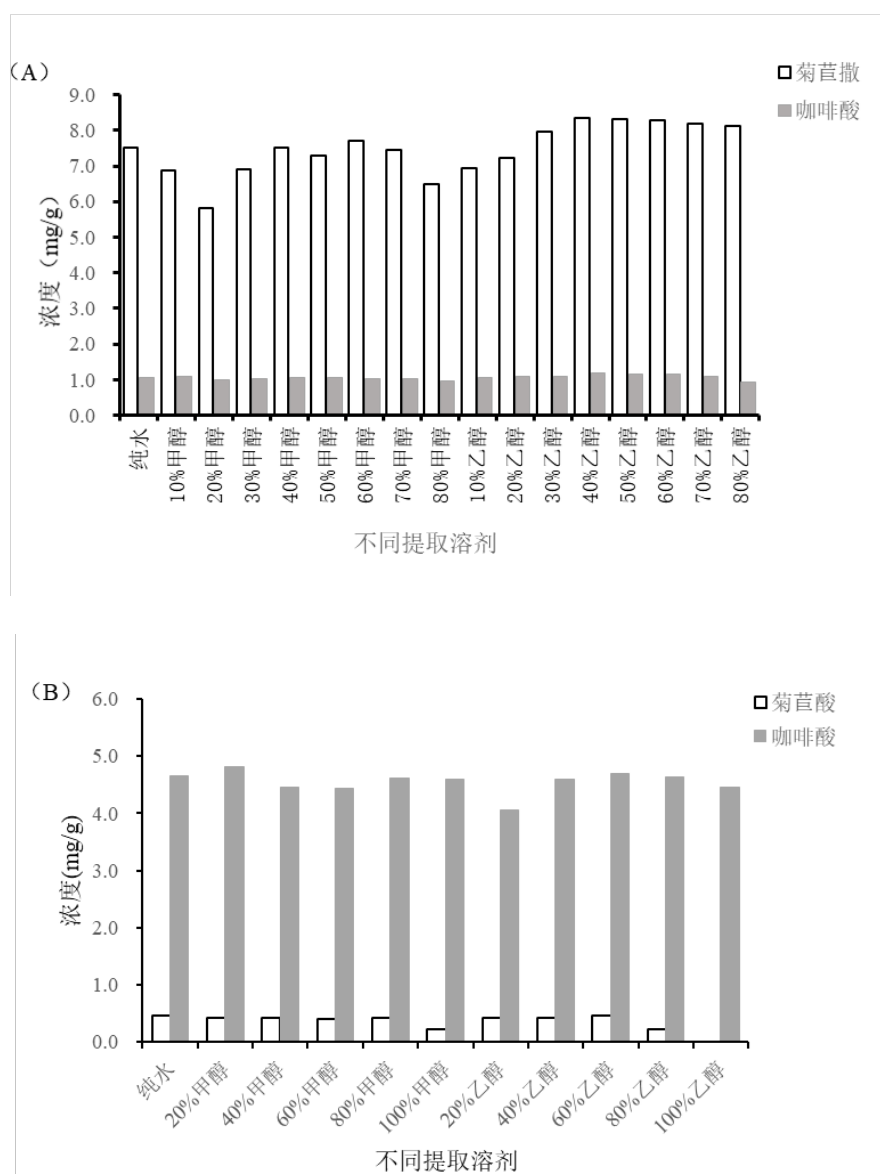


图 3 不同提取溶剂下菊苣酸和咖啡酸的含量
(A 蒲公英粉, B 蒲公英粗提物)

3.2.2.2 超声时间的选择

平行做两份试验，称取天然植物饲料原料蒲公英粉试样 1.0 g，精确至 1 mg，分别置于 100 mL 离心管中，准确加入提取溶液 40 mL。涡旋混匀 5 min，置于水

浴超声提取，于 4 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移至干净的 50 mL 容量瓶中，同浓度的提取溶液定容至 50 mL 刻度线，移取适量提取液，4 000 r/min 离心 5 min，吸取适量上清待测液过 0.45 μ m 微孔滤膜，待测。其中，超声提取时间分别采用 30 min、60 min、90 min、120 min。

平行做两份试验，称取饲料天然植物原料蒲公英粗提物试样 0.5 g，精确至 1 mg，分别置于 100 mL 离心管中，准确加入提取溶液 40 mL。涡旋混匀 5 min 后，重复上述提取步骤，得到待测液。其中，超声提取时间分别采用 30 min、60 min、90 min、120 min。

分别在不同超声时间下，分别计算天然植物饲料原料蒲公英粉和蒲公英粗提物中菊苣酸和咖啡酸的含量，结果如图 3 所示。可以看出，超声时间对于菊苣酸和咖啡酸的含量影响不大，超声时间为 60 min 时，菊苣酸和咖啡酸提取含量均最佳。

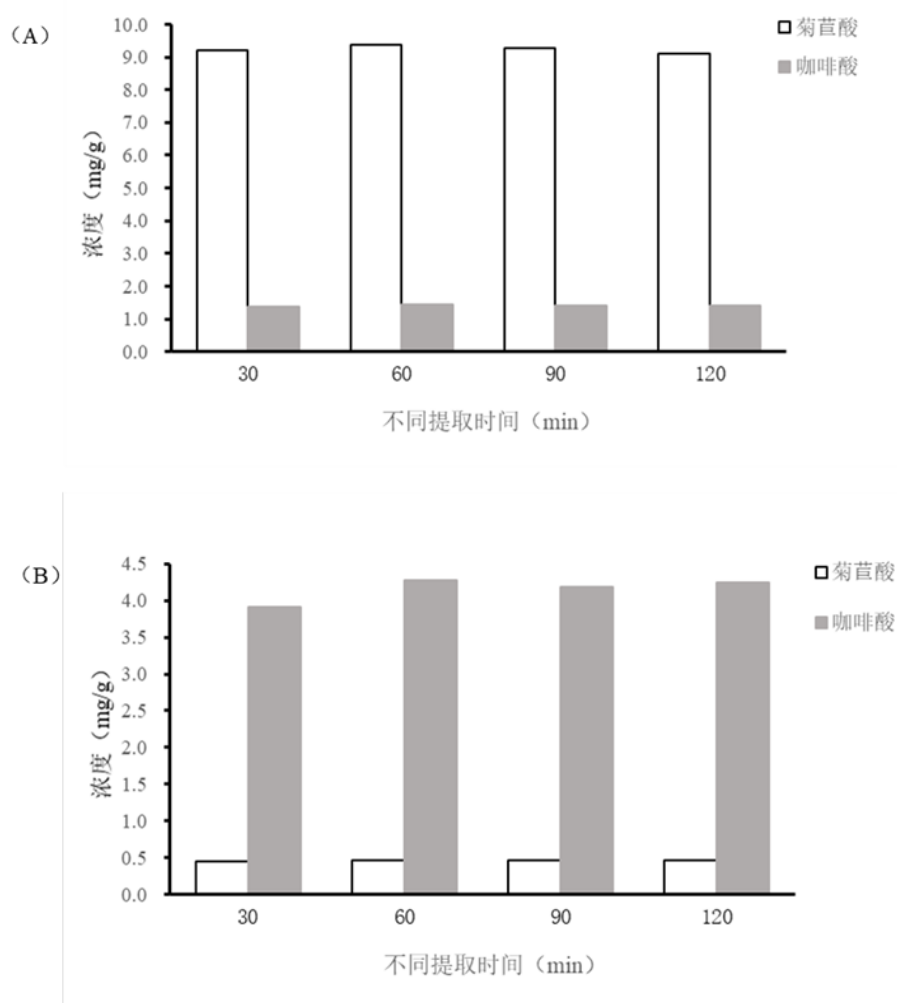


图 4 不同提取时间下菊苣酸和咖啡酸的含量

(A 蒲公英粉, B 蒲公英粗提物)

3.2.2.4 不同天然植物饲料原料的提取方法适用性评价

参考国家标准 GB/T 19424-2018《天然植物饲料原料通用原则》，选取单一型天然植物饲料原料菊花粉、杜仲粉；单一型天然植物粗提物饲料原料菊花粗提物、党参粗提物；复配型天然植物饲料原料（蒲公英粉、黄芪粉、当归粉）；复配型天然植物粗提物饲料原料（蒲公英粗提物、黄芪粗提物、益母草粗提物）；混合型天然植物饲料原料（蒲公英粉、杜仲粉、当归粗提物），分别以建立的提取方法进行试验，对其中的菊苣酸和咖啡酸含量进行定量检测。

平行做两份试验，称取天然植物饲料原料试样 1.0 g，精确至 1 mg，分别置于 100 mL 离心管中，准确加入提取溶液 40 mL，其中饲料原料蒲公英粉中加入菊苣酸和咖啡酸 4.0 g/kg 和 1.0 g/kg，菊花粉中加入菊苣酸和咖啡酸 4.0 g/kg 和 0.5 g/kg，杜仲粉及复配型饲料原料样品中加入菊苣酸和咖啡酸分别为 0.5 g/kg。涡旋混匀 5 min，如上述步骤提取，吸取适量上清待测液过 0.45 μm 微孔滤膜，待测。

平行做两份试验，称取天然植物粗提物饲料原料试样 0.5 g，精确至 1 mg，分别置于 100 mL 离心管中，准确加入提取溶液 40 mL，其中蒲公英粗提物中加入菊苣酸和咖啡酸 4.0 g/kg 和 1.0 g/kg，菊花粗提物中加入菊苣酸和咖啡酸 2.5 g/kg 和 5.0 g/kg，党参粗提物中菊苣酸和咖啡酸 0.5 g/kg，杜仲粗提物、金银花粗提物和复配型植物粗提物饲料原料样品中加入菊苣酸和咖啡酸分别为 0.5 g/kg、1.0 g/kg。涡旋混匀 5 min 后，重复上述提取步骤，得到待测液。

其中，蒲公英粉中菊苣酸的含量为 9.4 g/kg，咖啡酸的含量为 1.4 g/kg；菊花粉中菊苣酸的含量为 7.9 g/kg，咖啡酸的含量为 0.4 g/kg；杜仲粉中咖啡酸的含量为 0.1 g/kg，未检测到菊苣酸；菊苣粉中菊苣酸有检出但低于定量限，未检测到咖啡酸；蒲公英粗提物中菊苣酸的含量为 6.8 g/kg，咖啡酸的含量为 0.6 g/kg；菊花粗提物中菊苣酸的含量为 1.7 g/kg，咖啡酸的含量为 0.1 g/kg，杜仲粗提物和金银花粗提物中未检测到菊苣酸，咖啡酸含量分别为 0.6 g/kg 和 2.9 g/kg，党参粗提物中未检测到咖啡酸和菊苣酸。几种天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的回收率在 85.3%-120.6%之间。试验发现，对于上述几种基质，该前处理方法均有较好的结果。该法可以实现对上述天然植物饲料原料样品的检测。

表 3 不同基质对天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量的影响

样品类型	样品名称	化合物名称	样品含量 (g/kg)	加标量 (g/kg)	回收率 (%)	
天然植物饲料原料	蒲公英粉	菊苣酸	9.4	4.0	108.1	
		咖啡酸	1.4	1.0	114.6	
	菊花粉	菊苣酸	7.9	4.0	97.6	
		咖啡酸	0.4	0.5	120.6	
	杜仲粉	菊苣酸	<LOD	0.5	85.7	
		咖啡酸	0.1	0.5	98.0	
	菊苣粉	菊苣酸	<LOD	0.5	87.7	
		咖啡酸	<LOD	0.5	96.3	
	党参粉	菊苣酸	<LOD	0.25	95.6	
		咖啡酸	<LOD	0.25	98.8	
	复配型（蒲公英粉、黄芩粉、当归粉）	菊苣酸	0.2	0.5	93.4	
		咖啡酸	0.2	0.5	90.3	
	天然植物粗提物饲料原料	蒲公英粗提物	菊苣酸	6.8	4.0	89.4
			咖啡酸	0.6	1.0	86.9
菊花粗提物		菊苣酸	1.7	2.5	99.0	
		咖啡酸	0.1	5.0	107.4	
杜仲粗提物		菊苣酸	<LOD	0.5	78.4	
		咖啡酸	0.6	1.0	112.3	
金银花粗提物		菊苣酸	<LOD	0.5	90.5	
		咖啡酸	2.9	1.0	97.3	
党参粗提物		菊苣酸	<LOD	0.5	91.5	
		咖啡酸	<LOD	0.5	100.6	
复配型（蒲公英粗提物、益母草粗提物）		菊苣酸	0.8	0.5	82.1	
		咖啡酸	1.1	1.0	88.5	
天然植物饲料原料		混合型（蒲公英粉、杜仲粉、当归粗提物）	菊苣酸	0.4	0.5	89.5
			咖啡酸	0.5	0.5	86.9

3.2.2.5 样品中菊苣酸和咖啡酸的最佳提取条件

最佳提取条件为：平行做两份试验，准确称取天然植物饲料原料试样 0.5 g~1.0 g，精确至 1 mg，分别置于 100 mL 离心管中准确加入提取溶剂 40 mL，涡旋混匀 5 min 后，置于水浴超声提取 60 min，于 4 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移至干净的 50 mL 容量瓶中，同浓度的提取溶液定容至 50 mL 刻度线，移取适量提取液，4 000 r/min 离心 10 min，吸取适量上清待测液过 0.45 μm 微孔滤

膜，待测。

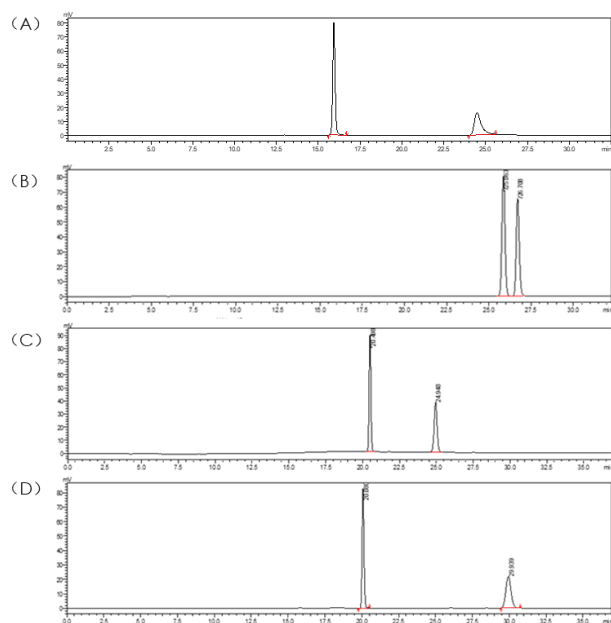
3.2.3 菊苣酸和咖啡酸 HPLC 定量分析方法的建立

3.2.3.1 色谱柱的选择

常用的反相填料有： C_{18} (ODS)、 C_8 (MOS)、 C_4 (Butyl)、 C_6H_5 (Phenyl)等，分离柱由于键合方式、粒径、长度的不同，内径的差异等多方面因素，呈现出不同的选择性。不同品牌的同种固定相色谱柱的分离选择性也存在明显差异。参考《蜂胶中绿原酸、咖啡酸、p-香豆酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和阿替匹林 C 的测定 高效液相色谱法》(GH/T 1312-2020)中咖啡酸含量的测定方法中 2020 年版《中华人民共和国药典》中蒲公英中菊苣酸的测定中采用了酸性条件下，采用 C_{18} 色谱柱进行分离，本试验选择了 4 种反相色谱柱对菊苣酸和咖啡酸标准品进行分离分析。反相色谱的填料一般以硅胶为基质，表面键合极性相对较弱的官能团的键合相。试验中流动相、流速以及柱温等条件参考相关文献，在较优色谱条件的基础上得到的结果见表 4。

表 4 菊苣酸和咖啡酸在不同色谱柱上的分离度

序号	色谱类型	色谱柱型号	分离度 R	理论塔板数	保留时间/min	
					菊苣酸	咖啡酸
1	反相色谱	Waters C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 色谱柱	R=13.5	$N_{\text{菊苣酸}}=18550$; $N_{\text{咖啡酸}}=2650$	24.5	15.9
2	反相色谱	Shimadzu Shim-pack GIST C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 色谱柱	R=2.5	$N_{\text{菊苣酸}}=98163$; $N_{\text{咖啡酸}}=92645$	26.7	25.9
3	反相色谱	Agilent ZORBAX SB-Phenyl (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 色谱柱	R=22.2	$N_{\text{菊苣酸}}=34169$; $N_{\text{咖啡酸}}=109852$	22.1	18.5
4	反相色谱	Agilent 5 HC- C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 色谱柱	R=13.5	$N_{\text{咖啡酸}}=108403$; $N_{\text{菊苣酸}}=77515$	25.0	20.5



(A) Waters C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; (B) Shimadzu Shim-pack GIST C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; (C) Agilent ZORBAX SB-Phenyl (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; (D) Agilent 5 HC-C₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) 色谱柱

图 5 不同色谱柱对菊苣酸和咖啡酸的分离

通过表 4 中对相邻色谱峰间的分离度、保留时间等参数进行比较, 总体上, C₁₈ 色谱柱分离效果优于 Phenyl 色谱柱; 相同规格的色谱柱, 不同品牌, 同一品牌不同键合方式的 C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱对菊苣酸和咖啡酸都有较好的分离效果。结合样品的复杂性和其他物质的干扰等因素, 选择了 Agilent 5 HC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱作为固定相, 进一步研究流动相对分离效果的影响。

3.2.3.2 检测波长的选择

为了解菊苣酸和咖啡酸标样测定的最佳吸收波长, 采用 HPLC 法以二极管阵列检测器对样品进行全波长扫描 (200 nm~400 nm), 采集到的吸收波长见图 6。菊苣酸和咖啡酸的图谱相似, 综合两种物质, 在 327 nm 处吸收最好。因此选择 327 nm 作为检测波长, 而且这与《中华人民共和国药典 (一部)》(2020 版) 中蒲公英中菊苣酸的检测波长一致。因此, 选择 327 nm 作为菊苣酸和咖啡酸的检测波长。

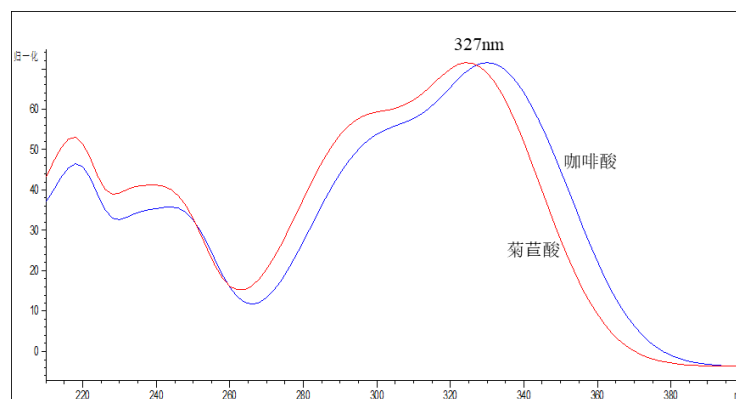


图 6 菊苣酸和咖啡酸 HPLC 吸收光谱图

3.2.3.3 流动相的确定

参考其他标准和文献，选择了甲醇/磷酸溶液，甲醇/甲酸溶液，甲醇/乙酸溶液等3种溶剂系统作为流动相对菊苣酸和咖啡酸混合标准溶液进行分析。实验发现：菊苣酸和咖啡酸在甲醇/甲酸溶液中有较好的保留，峰型较好，分离效果较佳，可实现完全分离。

在此基础上，进一步优化甲酸溶液浓度，结果发现，加大甲酸溶液中甲酸的比例可以使菊苣酸和咖啡酸的色谱峰更明显，分离度更好，但检测时间延长，同时甲酸的浓度会影响菊苣酸和咖啡酸的峰型，当甲酸浓度为0.3% 时峰型最好。具体分离度和保留时间见表5。

表 5 流动相对菊苣酸和咖啡酸分离的影响

色谱柱型号	流动相种类	分离度	理论塔板数	保留时间/min	
				菊苣酸	咖啡酸
Agilent 5 HC-C ₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) 色谱柱	A 相: 甲醇	35.5	N _{菊苣酸} =62834;	27.2	20.6
	B 相: 0.3%磷酸		N _{咖啡酸} =126313		
	A 相: 甲醇	14.7	N _{菊苣酸} =70893;	24.9	20.5
	B 相: 0.3%甲酸		N _{咖啡酸} =126601		
	A 相: 甲醇	15.8	N _{菊苣酸} =44587;	30.5	20.2
	B 相: 0.3%乙酸		N _{咖啡酸} =128645		
	0.1%	15.7	N _{菊苣酸} =68588;	25.3	20.5
	甲		N _{咖啡酸} =127549		
酸	0.2%	14.7	N _{菊苣酸} =70893;	24.9	20.5
浓			N _{咖啡酸} =126601		
度	0.3%	14.7	N _{菊苣酸} =70893;	24.9	20.5
			N _{咖啡酸} =126656		

0.4%	16.7	N 菊苣酸=72332; N 咖啡酸=131656	25.0	20.1
0.5%	16.5	N 菊苣酸=71416; N 咖啡酸=131251	25.1	20.1

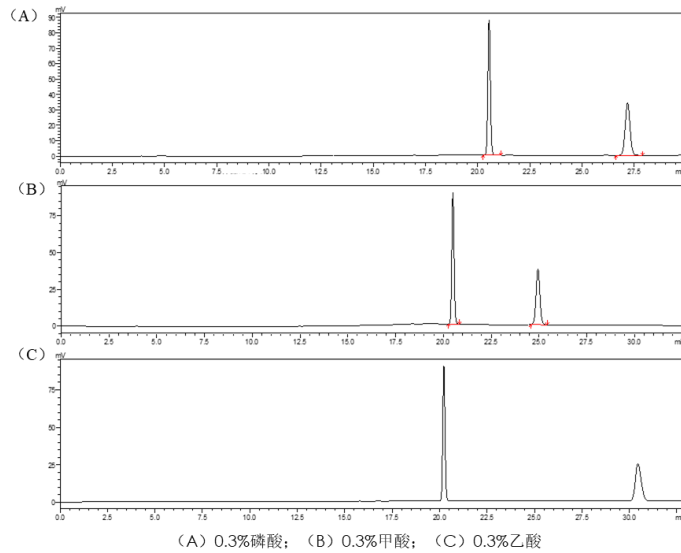


图 7 不同流动相类型对菊苣酸和咖啡酸的分离

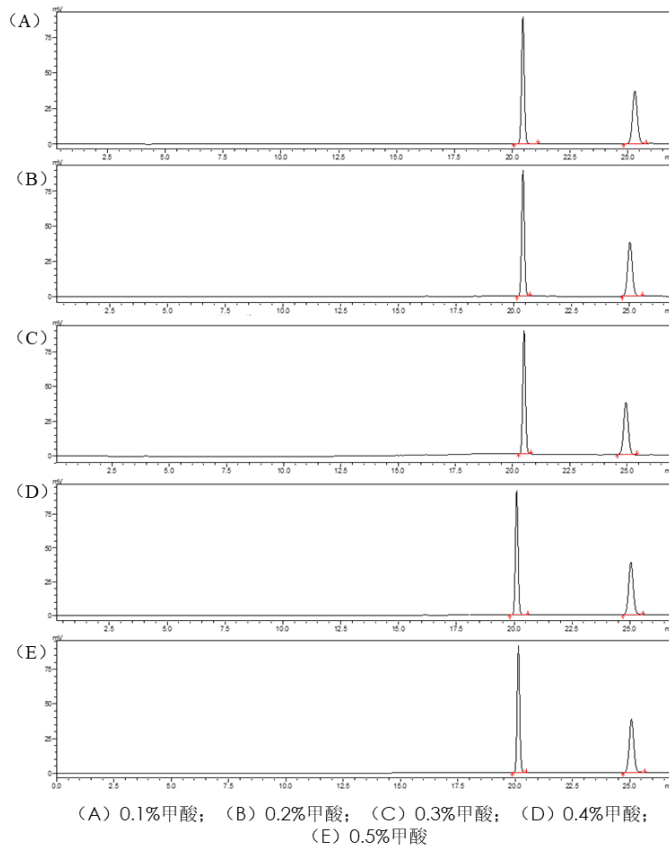


图 8 不同甲酸比例对菊苣酸和咖啡酸的分离

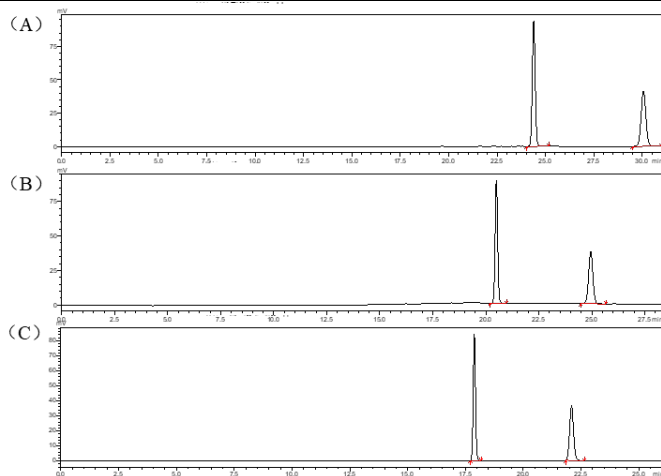
综合考量检测时间与分离效果，实验最终选定甲醇/0.3%甲酸溶剂系统作为方法的流动相。

3.2.3.4 流速的选择

由于溶剂流速对色谱峰的保留时间和峰型有较大影响。对流速进行优化，研究 0.6、0.8、1.0 mL/min 的条件下菊苣酸和咖啡酸的色谱结果，结果见表 6。当流速增大时，色谱峰保留时间前移，分离度降低，分析时间缩短，但色谱峰峰型将变差。当流速降低时，色谱峰保留时间后移，分离度增大，分析时间延长，但此时色谱峰峰型较好。

表 6 流动相流速对菊苣酸和咖啡酸分离的影响

色谱柱型号	流速/mL·min ⁻¹	分离度	保留时间/min	
			菊苣酸	咖啡酸
Agilent 5HC-C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱	0.6	15.3	30.1	24.4
	0.8	15.7	24.9	20.5
	1.0	16.1	22.1	17.9



(A) 流速0.6 mL/min; (B) 流速0.8 mL/min; (C) 流速1.0 mL/min°C;

图 9 不同流速对菊苣酸和咖啡酸的分离

综合分离度、保留时间和色谱峰峰型等因素，实验最终选择流速为 0.8 mL/min。

3.2.3.5 色谱柱温度的确定

对于高效液相色谱而言，温度是非常重要的因素。合适的色谱柱温度，不仅可以加快分析速度，而且还具有提高分离效率、改善峰型、调节选择性等优点。因此，实验优化了色谱柱柱温，研究了色谱柱温度对分离效果的影响，结果见表 7。

表 7 色谱柱柱温对菊苣酸和咖啡酸分离的影响

色谱柱型号	色谱柱温度	分离度	保留时间/min	
			菊苣酸	咖啡酸
Agilent 5HC-C ₁₈ (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) 色谱 柱	25	17.0	29.1	22.3
	30	16.4	27.2	21.4
	35	14.7	24.9	20.5
	40	15.2	23.2	19.3

表 7 可以看出,随着色谱柱温度的升高,分离度先降低后增加,菊苣酸出峰时间提前。再继续提高柱温,分离度升高趋缓。由于色谱柱温度会影响色谱柱寿命,因此实验最终确定色谱柱温度为 35°C。

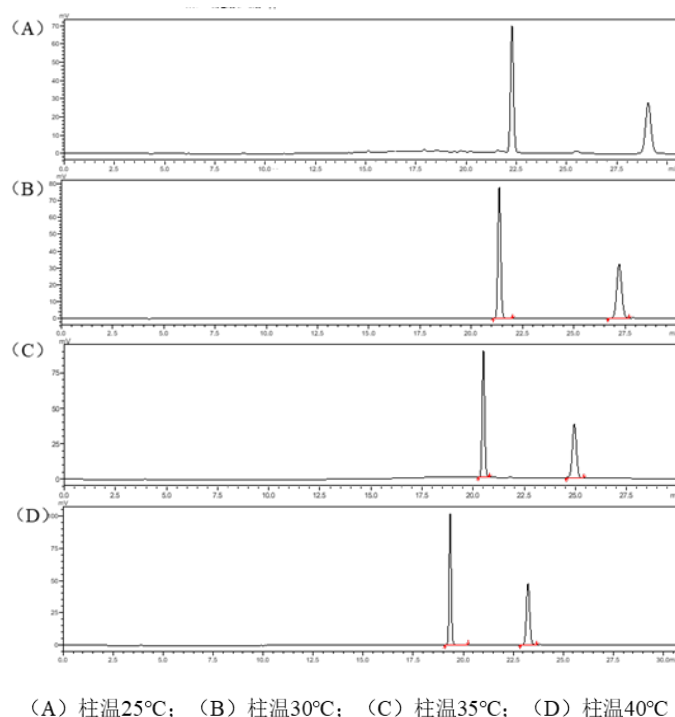


图 10 不同色谱柱温度对菊苣酸和咖啡酸的分离

3.2.3.6 不同洗脱条件的选择

不同的洗脱条件对目标化合物的分离、排除基质中其他物质的干扰起非常重要的作用。本试验研究了不同洗脱条件对分离效果的影响,等度洗脱条件为流动相 A (甲醇)/流动相 B (0.3%甲酸) = 35/65 (v/v) 时,菊苣酸和咖啡酸的保留时间分别为 12.6 min 和 17.1 min,菊苣酸的峰型不好。梯度洗脱条件下,菊苣酸和咖啡酸的保留时间分别为 16.6 min 和 21.3 min,分离效果较好,分离度为 14.7。综合菊苣酸和咖啡酸的分离情况和不同基质中其他物质的干扰情况,采用梯度洗脱条件,梯度洗脱程序表如表 8 所示。

表 8 梯度洗脱程序表

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	5	95
2	20	80
4	30	70
12	35	65
23	35	65
24	5	95
26	5	95

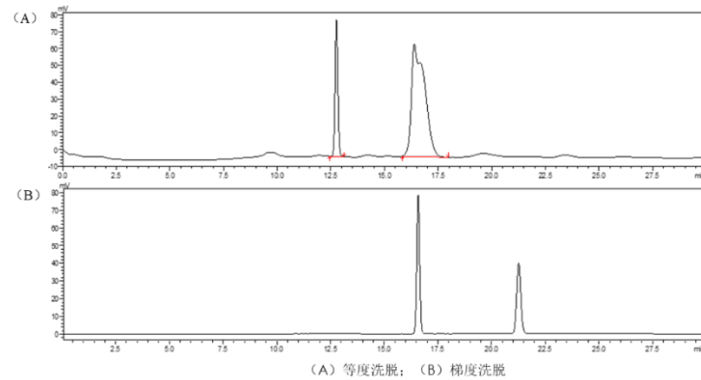
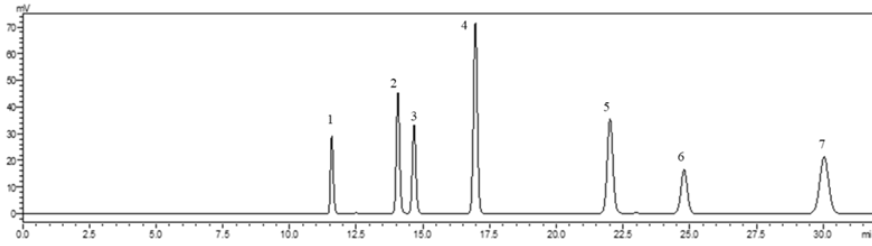


图 11 不同洗脱条件对菊苣酸和咖啡酸的分离

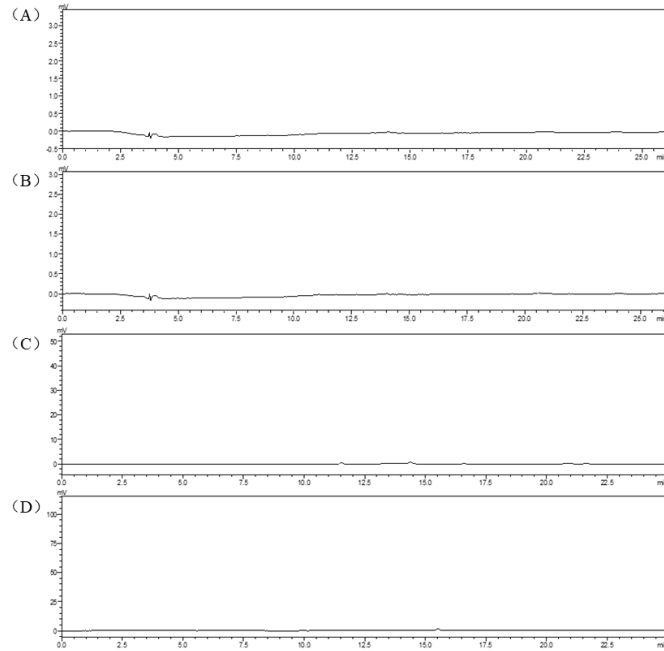
3.2.3.7 干扰试验

天然植物中，广泛存在绿原酸及其衍生物、芦丁、槲皮素等黄酮类物质。绿原酸及其衍生物由咖啡酸、奎尼酸缩合而成的羟基肉桂酸类化合物，广泛存在于杜仲、金银花等植物中。为排除绿原酸及其衍生物、芦丁、槲皮素等对咖啡酸和菊苣酸测定的影响，选择新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 a、异绿原酸 b、异绿原酸 c、阿魏酸、槲皮素、芦丁等 9 种标准品，在上述优化后的色谱条件下，与咖啡酸和菊苣酸进行同时检测。在梯度洗脱模式下，保留时间在 20 min 和 24 min 左右，没有干扰峰，表明检测方法专一性良好。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、菊苣酸、阿魏酸、异绿原酸 a 的出峰顺序如图 12 所示。异绿原酸 b、异绿原酸 c、槲皮素、芦丁在此条件下不能被检测，如图 13 所示。



1.新绿原酸；2.绿原酸；3. 隐绿原酸；4.咖啡酸；5.菊苣酸；6.阿魏酸；7.异绿原酸 a

图 12 4 种绿原酸同分异构体、阿魏酸与菊苣酸和咖啡酸的分离

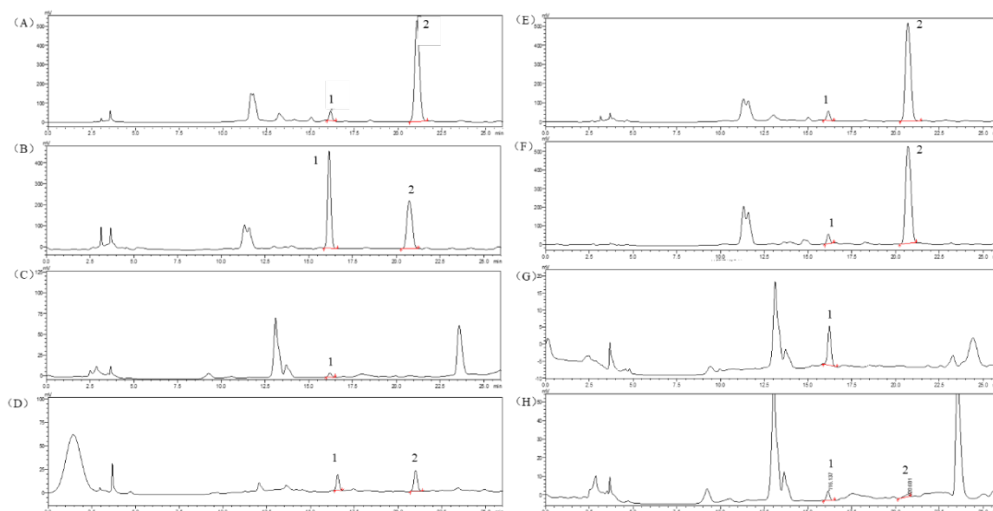


(A) 异绿原酸b；(B) 异绿原酸c；(C) 芦丁；(D) 槲皮素

图 13 异绿原酸 b、异绿原酸 c、芦丁、槲皮素的色谱图

综上所述，方法最终选定色谱条件为：使用 C₁₈ 柱，长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5.0 μm（或其他效果等同的色谱柱）；波长 327 nm，流动相 A：流动相 B：甲醇/0.3%甲酸为流动相，流速为 0.8 mL/min；色谱柱温度设定为 35 °C；进样量 10 μL；梯度洗脱条件如表 8 所示。

在该优化色谱条件下，对不同基质的天然植物饲料原料进行分析，代表性试样的典型色谱图如图 14 所示，目标化合物相邻两个峰的分度度 R 均大于 1.5，而且目标化合物与杂质分离效果较好，分离度高。



(A) 蒲公英; (B) 菊花; (C) 杜仲; (D) 复配型天然植物饲料原料; (E) 蒲公英粗提物;
(F) 菊花粗提物; (G) 杜仲粗提物; (H) 复配型天然植物粗提物饲料原料

图 14 典型样品色谱图 (1.咖啡酸; 2.菊苣酸)

3.2.4 标准技术指标的论证

3.2.4.1 线性实验

配置菊苣酸和咖啡酸浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ ，以上述条件进行检测，以色谱峰面积和标准溶液浓度作标准曲线，线性实验结果见表 9。

表 9 菊苣酸和咖啡酸对照溶液线性实验结果表

化合物名称	标准曲线范围 $\mu\text{g/mL}$	相关系数 R
菊苣酸	0.5~100	0.999
咖啡酸	0.5~100	0.999

从表 9 中可以看出：菊苣酸和咖啡酸标准溶液在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内线性关系良好。如果样品中菊苣酸和咖啡酸浓度不在此线性范围之内，可以通过稀释对样品进行处理，再进行检测。

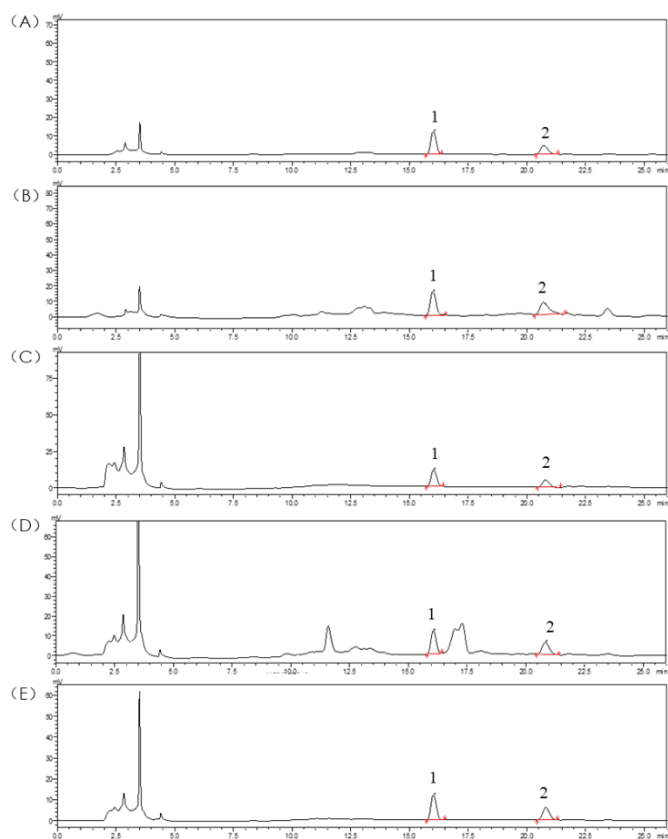
3.2.4.2 检出限的测定

以菊苣酸和咖啡酸信噪比不低于 3 来确定各自检出限(LOD)。在该实验中，取 20 份空白基质样品，按照上述提取方法进行样品处理和测定。根据空白样品的基线噪音，取其平均值，以信噪比 $S/N=3$ 为定量限；将咖啡酸对照品溶液逐步稀释，进行液相色谱分析，计算信噪比。菊苣酸和咖啡酸浓度为 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 时，均满足 $S/N \geq 3$ 。按照样品前处理稀释倍数计算，天然植物饲料原料实际样品中菊苣酸和咖啡酸的检出限 ($3 S/N$) 为 0.03 g/kg；天然植物粗提物饲料原料样品和

混合型天然植物饲料原料样品中菊苣酸和咖啡酸的检出限(3 S/N)为 0.06 g/kg。

3.2.4.3 定量限的测定

以菊苣酸和咖啡酸信噪比不低于 10 来确定各自定量限 (LOQ)。在本试验中,筛选了党参、知母、黄芪、姜黄、当归、葛根、玉米、党参粗提物、知母粗提物、黄芪粗提物、姜黄粗提物、当归粗提物等单一型天然植物饲料原料,党参、知母及其粗提物在上述色谱条件下,菊苣酸和咖啡酸处未检测到峰,且杂质峰较少。得到单一型天然植物饲料原料党参粉;复配型天然植物饲料原料党参粉、知母粉;单一型天然植物粗提物饲料原料党参粗提物;复配型天然植物粗提物饲料原料样品知母粗提物、党参粗提物;混合型饲料原料样品党参粉、党参粗提物作为空白样品。取 20 份空白基质样品,按照上述提取方法进行样品处理和测定。根据空白样品的基线噪音,取其平均值,以信噪比 S/N=10 为定量限,菊苣酸和咖啡酸浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 时,均满足 $S/N \geq 10$ 。按照样品前处理稀释倍数计算,天然植物饲料原料实际样品中菊苣酸和咖啡酸的定量限 (10 S/N) 为 0.1 g/kg;天然植物粗提物饲料原料样品和混合型天然植物饲料原料样品中菊苣酸和咖啡酸的定量限 (10 S/N) 为 0.2 g/kg。其定量限的添加回收情况如表 13-17。



(A) 单一型天然植物饲料原料; (B) 复配型天然植物饲料原料; (C) 单一型天然植物粗提物饲料原料; (D) 复配型天然植物粗提物饲料原料; (E) 混合型天然植物饲料原料

图 16 菊苣酸和咖啡酸定量限 HPLC 色谱图

(1.咖啡酸; 2.菊苣酸)

3.2.4.4 稳定性

取天然植物饲料原料蒲公英粉和蒲公英粗提物供试品, 制备获得供试品溶液, 在 0、4、8、12、16、20、24 h, 各进样一次, 按照上述色谱条件测定, 分别记录菊苣酸和咖啡酸的峰面积, 测定结果见表 10, 天然植物饲料原料蒲公英粉中菊苣酸的浓度在 8.5 g/kg~8.6 g/kg 之间, 咖啡酸的浓度在 0.3 g/kg 之间, RSD 为 0.6%~2.7%; 天然植物粗提物饲料原料蒲公英粗提物中菊苣酸的浓度在 5.3 g/kg~5.4 g/kg 之间, 咖啡酸的浓度在 5.4 g/kg~5.5 g/kg 之间, RSD 为 0.6%~2.2%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

表 10 菊苣酸和咖啡酸稳定性实验结果

样品类型	化合物名称	浓度 (g/kg)							平均值 (g/kg)	RSD (%)
		0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h		
蒲公英粉	菊苣酸	8.6	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.6	8.5	0.6
	咖啡酸	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	2.7
蒲公英粗提物	菊苣酸	5.3	5.3	5.3	5.3	5.5	5.5	5.4	5.4	2.2
	咖啡酸	5.4	5.4	5.5	5.4	5.5	5.4	5.4	5.4	0.6

3.2.4.5 重复性

取配制好的菊苣酸和咖啡酸对照品溶液, 分别用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析, 连续进样 6 次, 菊苣酸和咖啡酸对照品 HPLC 分析结果相对标准偏差 RSD 为 0.1%~0.6%, 表明仪器精密度良好, 该方法重复性符合要求。结果见表 11。

表 11 菊苣酸和咖啡酸重复性实验结果

化合物名称	浓度 (μg/mL)						平均值 (μg/mL)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
菊苣酸	49.4	49.3	49.4	49.4	49.2	49.5	49.4	0.2
咖啡酸	49.2	49.1	49.2	49.2	49.2	49.4	49.2	0.2

3.2.4.6 方法的准确性与精密度

选取单一型天然植物饲料原料 (党参粉) 和复配型天然植物饲料原料 (知母

粉、党参粉) 分别作为试样 1 和试样 2; 取单一型天然植物粗提物饲料原料(党参粗提物) 和复配型天然植物粗提物饲料原料样品(知母粗提物、党参粗提物) 作为试样 3 和试样 4, 取混合型饲料原料样品 5(党参粉、党参粗提物), 按照最优色谱条件对样品进行 HPLC 分析, 根据标准曲线计算出菊苣酸和咖啡酸的含量在 0-0.05 g/kg 之间。另精密称取 5 个试样样品各 18 份, 对天然植物饲料原料试样(单一型和复配型) 按照 0.1 g/kg, 0.25 g/kg, 0.5 g/kg, 1.0 g/kg 和 2.5 g/kg, 进行添加回收实验, 每个重复 6 次; 对天然植物粗提物饲料原料试样(单一型和复配型) 和混合型天然植物饲料原料按照 0.2 g/kg, 0.5 g/kg, 1.0 g/kg 和 2.0 g/kg 和 5.0 g/kg 进行添加回收实验, 每个重复 6 次, 结果见表 13-17。由表 13-17 可知, 菊苣酸的回收率为 86.0%~106.9%, 批内 RSD 在 0.03%~6.1%之间, 批间 RSD 在 0.2%~5.8%之间; 咖啡酸的回收率为 91.6%~111.9%, 批内 RSD 在 0.3%~5.2%之间, 批间 RSD 在 0.1%~4.6%之间, 批内 RSD 和批间 RSD 均≤5.2%。可见菊苣酸和咖啡酸回收率与精密度良好, 批内 RSD 和批间 RSD 均≤6.1%。

另筛选菊苣酸和咖啡酸含量低的天然植物饲料样品, 配制混合型饲料原料样品 6(栀子、八角、百里香、黄芪、当归、杨树花、栀子粗提物、八角粗提物、百里香粗提物、黄芪粗提物、当归粗提物、杨树花粗提物), 按照最优色谱条件对样品进行 HPLC 分析, 根据标准曲线计算出菊苣酸和咖啡酸的含量在 0-0.09 g/kg 之间。另精密称取试样 6 样品 24 份, 按照 0.2 g/kg, 0.5 g/kg, 1.0 g/kg 和 5.0 g/kg 进行添加回收实验, 每个重复 6 次, 结果见表 18。由表 18 可知, 菊苣酸的回收率为 80.3%~115.7%, 批内 RSD 在 1.6%~5.1%之间, 批间 RSD 在 0.9%~2.6%之间; 咖啡酸的回收率为 81.8%~117.2%, 批内 RSD 在 1.0%~3.9%之间, 批间 RSD 在 1.8%~4.6%之间, 批内 RSD 和批间 RSD 均≤5.1%。可见菊苣酸和咖啡酸回收率与精密度良好, 批内 RSD 和批间 RSD 均≤5.1%

综上所述, 此方法加标回收率与精密度良好, 说明方法准确度高, 而且常见的其他饲用植物原料和提取物不会影响方法准确性, 基本满足 GB/T 27417-2017 和 GB/T- 27404-2008 的要求。

表 13 单一型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量的加标回收及精密度结果

试样	化合物	样品含量 (g/kg)	加标水平 (g/kg)	回收率 (%)	批内平均回收率 (%)	批内 RSD (n=6, %)	批间平均回收率 (%)	批间 RSD (n=3, %)
----	-----	-------------	-------------	---------	-------------	-----------------	-------------	-----------------

单一型天然植物饲料原料试样 1	菊 苣 酸	<LOD	0.1	93.9, 95.9, 93.7, 95.6, 97.5, 95.4	95.3	1.5		
				89.5, 91.0, 89.5, 92.1, 94.5, 90.6	91.2	2.1	93.5	2.2
				90.4, 94.5, 92.0, 94.7, 97.1, 94.4	93.8	2.5		
			0.25	95.6, 89.0, 92.0, 90.6, 94.8, 97.2	93.2	3.4		
				88.9, 90.6, 88.0, 88.5, 87.8, 88.8	88.8	1.1	92.0	3.1
				92.0, 93.9, 92.8, 96.5, 95.3, 93.4	94.0	1.7		
		0.5	93.2, 93.1, 92.9, 90.5, 93.4, 91.4	92.4	1.3			
			88.7, 89.8, 88.5, 93.7, 88.2, 89.0	89.6	3.9	91.1	1.8	
			88.8, 90.3, 91.6, 93.1, 93.5, 90.9	91.4	2.5			
		1.0	95.3, 95.6, 96.1, 97.6, 96.2, 87.8	94.7	3.7			
			92.2, 89.0, 86.5, 91.1, 88.5, 86.9	89.0	3.8	91.5	3.2	
			94.5, 92.1, 92.4, 90.1, 89.0, 87.2	90.9	2.9			
		2.5	97.7, 98.9, 101.2, 97.6, 98.3, 101.4	99.2	1.7			
			90.1, 92.8, 90.3, 90.6, 87.8, 86.4	89.7	3.5	94.7	3.7	
			98.2, 96.8, 92.3, 95.6, 89.9, 98.6	95.2	3.6			
	咖啡 酸	<LOD	0.1	97.9, 99.9, 97.2, 98.4, 100.5, 97.9	98.6	1.3		
				96.8, 99.0, 96.2, 98.1, 100.2, 96.8	97.8	1.6	98.0	0.6
				95.6, 99.4, 94.7, 97.4, 100.4, 96.8	97.4	2.2		
0.25			110.6, 106.8, 106.8, 106.6, 106.8, 111.0	108.7	1.7			
			98.8, 100.7, 99.1, 99.2, 98.5, 100.0	100.0	0.8	105.8	2.1	
			111.9, 106.1, 107.7, 107.5, 108.4, 111.1	108.8	2.1			
0.5			103.7, 103.0, 103.3, 102.7, 104.7, 102.8	103.4	0.7			
			99.0, 100.2, 99.3, 97.4, 98.0, 99.0	98.8	1.0	101.0	2.3	
			101.4, 100.9, 98.9, 102.1, 99.7, 101.5	100.8	1.1			
1.0			104.9, 104.9, 105.0, 105.5, 105.5, 104.5	105.0	0.3			
			102.3, 99.4, 104.7, 104.8, 105.8, 104.4	103.6	2.3	104.1	0.7	
			103.4, 102.1, 104.4, 105.1, 106.5, 101.6	103.9	1.8			
2.5	108.9, 109.6, 110.4, 108.9, 108.6, 109.6	109.3	0.7					
	108.0, 107.0, 107.6, 102.5, 108.1, 105.6	106.5	2.2	106.4	2.8			
	101.3, 103.5, 102.5, 105.2, 101.4, 106.5	103.4	2.1					

表 14 复配型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量的加标回收及精密度结果

试样	化合物	样品含量 (g/kg)	加标水平 (g/kg)	回收率 (%)	批内平均回收率 (%)	批内 RSD (n=6, %)	批间平均回收率 (%)	批间 RSD (n=3, %)
复配型天然植物饲料原料试样 2	菊 苣 酸	<LOD	0.1	96.9, 89.5, 88.8, 103.5, 94.1, 89.6	93.7	6.1		
				91.0, 91.7, 85.8, 85.7, 86.0, 94.6	89.1	4.3	93.3	4.3
				97.0, 99.8, 96.5, 100.2, 91.4, 98.0	97.2	3.3		
			0.25	97.4, 97.2, 97.2, 98.6, 96.8, 96.8	97.4	0.03		
				99.9, 100.2, 102.0, 97.8, 102.7, 98.4	100.2	2.0	98.3	2.3
				96.8, 97.2, 94.9, 96.6, 95.8, 102.0	97.2	2.5		
			0.5	96.7, 96.0, 97.5, 99.1, 96.0, 95.1	96.7	1.5		
				95.1, 100.9, 94.8, 94.1, 92.6, 91.9	94.9	3.5	96.3	1.3
				95.2, 97.3, 101.5, 98.3, 95.7, 96.3	97.4	2.4		
			1.0	99.0, 100.6, 99.2, 96.8, 99.2, 100.7	99.2	1.4		
				97.1, 97.8, 97.2, 96.0, 100.1, 94.9	97.2	1.9	98.4	1.1
				99.6, 98.5, 98.7, 99.3, 100.3, 95.7	98.7	1.6		
2.5	95.8, 95.4, 95.7, 94.8, 95.1, 88.3	94.2	3.3	93.3	1.7			

咖啡酸	<LOD		94.8, 95.9, 95.4, 96.3, 92.1, 90.4	94.2	2.7		
			89.6, 90.3, 91.4, 92.6, 89.9, 95.0	91.5	2.5		
		0.1	108.2, 109.7, 101.2, 102.4, 102.8, 101.4	104.3	3.5	100.5	4.6
			99.2, 100.5, 91.6, 93.6, 94.8, 92.6	95.4	3.5		
			101.4, 105.8, 99.4, 100.4, 103.4, 101.0	101.9	2.3		
		0.25	104.2, 105.2, 105.0, 105.2, 104.4, 104.8	104.8	0.4	104.0	0.9
			101.4, 104.6, 104.7, 100.6, 103.4, 102.8	102.9	1.6		
			104.9, 102.2, 104.2, 102.1, 104.0, 107.4	104.1	1.9		
		0.5	103.6, 102.5, 105.3, 106.4, 104.2, 103.1	104.4	2.3	100.1	4.0
			96.3, 96.7, 96.0, 97.7, 97.4, 95.5	96.6	0.9		
			98.6, 95.7, 101.6, 99.7, 98.5, 102.3	99.4	2.4		
		1.0	103.8, 103.2, 102.8, 103.1, 103.0, 105.9	103.6	1.1	103.7	0.5
	105.4, 104.4, 105.1, 103.3, 107.7, 100.4	104.4	2.2				
	103.2, 102.5, 104.2, 101.9, 102.0, 105.8	103.3	1.4				
2.5	103.1, 10.7, 102.9, 101.1, 95.7, 103.6	101.7	3.0	102.4	0.8		
	101.6, 102.4, 102.9, 105.5, 99.5, 101.4	102.2	1.9				
	103.2, 105.9, 99.6, 103.4, 102.9, 104.2	103.2	1.9				

表 15 单一型天然植物粗提物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量的加标回收及精密度结果

试样	化合物	样品含量 (g/kg)	加标水平 (g/kg)	回收率 (%)		批内平均回收率 (%)	批内 RSD (n=6, %)	批间平均回收率 (%)	批间 RSD (n=3, %)
				回收率 (%)	回收率 (%)				
单一型天然植物粗提物饲料原料试样 3	菊苣酸	<LOD	0.2	90.3, 97.0, 99.7, 97.6, 96.5, 97.4	96.4	3.3	94.0	3.0	
				90.8, 97.7, 98.3, 97.1, 95.6, 93.0	95.6	3.0			
				84.6, 88.5, 90.4, 92.4, 91.2, 93.3	90.1	3.5			
			0.5	87.4, 86.4, 89.0, 87.0, 87.0, 88.2	87.5	1.1	88.7	3.2	
				87.4, 92.8, 89.9, 86.4, 84.2, 81.8	87.1	4.5			
				91.5, 89.5, 85.7, 94.1, 94.9, 94.2	91.7	3.9			
	咖啡酸	<LOD	1.0	91.2, 89.6, 87.3, 89.1, 88.3, 86.2	88.7	1.2	90.2	3.1	
				92.8, 87.4, 86.3, 84.3, 84.9, 88.6	87.4	3.6			
				90.3, 89.5, 87.3, 91.2, 90.4, 88.7	89.6	1.6			
			2.0	89.2, 91.2, 91.3, 91.8, 92.5, 94.5	93.4	5.9	97.3	1.6	
				88.2, 90.4, 87.2, 85.4, 90.1, 87.4	88.1	2.1			
				87.2, 88.5, 90.5, 89.6, 92.3, 87.2	89.2	2.2			
咖啡酸	<LOD	5.0	98.4, 96.5, 98.3, 98.0, 98.1, 99.8	98.2	1.0	99.0	0.7		
			100.1, 96.4, 98.3, 97.9, 97.9, 98.4	98.1	1.2				
			97.6, 93.4, 96.4, 95.7, 94.6, 95.5	95.5	1.5				
		0.2	93.5, 101.0, 103.4, 101.6, 99.9, 101.9	100.2	3.5	100.3	0.9		
			92.4, 100.4, 101.8, 100.4, 100.4, 100.6	99.3	3.4				
			95.3, 100.5, 104.4, 102.0, 102.3, 102.7	101.2	3.1				
0.5	100.6, 102.0, 103.0, 101.8, 101.2, 103.0	101.9	0.6	102.2	0.4				
	102.6, 103.8, 102.3, 102.7, 103.0, 101.5	102.7	0.7						
	97.5, 98.2, 96.0, 107.4, 107.5, 105.5	102.0	5.2						
1.0	101.8, 100.6, 100.5, 102.2, 101.1, 100.2,	101.1	0.8	102.5	1.9				
	108.0, 105.8, 104.5, 105.5, 103.7, 101.5	104.8	2.1						
	101.2, 99.5, 102.6, 103.2, 101.5, 102.3	101.7	1.3						
2.0	99.5, 101.1, 101.2, 100.8, 100.7, 101.6	100.6	0.7	99.8	0.8				
	98.6, 102.6, 100.5, 99.2, 97.3, 99.9	99.7	1.8						
	102.5, 99.1, 97.5, 98.4, 99.1, 97.5	99.0	1.9						
5.0	100.6, 99.2, 99.4, 99.5, 99.4, 100.0	99.7	0.5	99.0	0.7				

98.4, 98.8, 100.3, 98.5, 98.7, 99.2	99.0	0.7
100.1, 97.6, 98.2, 98.1, 98.2, 97.9	98.3	0.9

表 16 复配型天然植物粗提物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量的加标回收及精密度结果

试样	化合物	样品含量 (g/kg)	加标水平 (g/kg)	回收率 (%)	批内平均回收率 (%)	批内 RSD (n=6, %)	批间平均回收率 (%)	批间 RSD (n=3, %)
复配型天然植物粗提物饲料原料试样 4	菊苣酸	<LOD	0.2	105.5, 106.0, 101.6, 100.9, 99.6, 101.8	102.6	2.5	102.0	1.1
				106.6, 103.6, 103.2, 99.5, 101.5, 101.3	102.6	2.4		
				103.5, 100.1, 101.1, 97.7, 99.9, 102.3	100.7	2.0		
		0.5	78.4, 78.0, 78.4, 83.9, 76.8, 90.8	81.1	5.4	84.9	5.8	
			85.9, 87.6, 91.0, 93.0, 90.3, 92.7	90.1	2.8			
			799, 87.8, 80.8, 84.4, 87.1, 81.7	83.6	3.4			
		1.0	90.1, 88.7, 87.9, 88.9, 88.4, 87.3	88.6	1.1	90.7	4.3	
			89.5, 99.4, 99.1, 94.2, 89.4, 99.6	95.2	5.1			
			90.0, 88.3, 88.0, 88.3, 879, 87.7	88.4	0.9			
			90.2, 91.2, 91.6, 90.4, 92.2, 91.7	91.2	0.9			
	2.0	96.1, 90.2, 93.2, 91.3, 97.9, 92.3	93.5	3.1	92.0	1.4		
		90.4, 91.2, 91.3, 90.4, 92.2, 91.6	91.2	0.8				
		99.6, 98.1, 98.7, 99.2, 100.3, 99.0	99.2	0.8				
	5.0	99.3, 98.7, 98.9, 96.2, 100.4, 95.7	98.2	1.9	98.1	1.2		
		96.7, 96.0, 96.2, 96.5, 97.7, 98.3	96.9	0.9				
		103.5, 103.3, 99.6, 98.8, 98.4, 99.8	100.6	2.2				
	咖啡酸	0.2	<LOD	100.1, 101.0, 96.4, 97.1, 95.9, 96.7	97.9	2.2	101.4	3.9
				108.2, 108.3, 104.3, 105.0, 102.0, 105.6	105.7	2.0		
				101.8, 103.8, 102.2, 101.6, 103.0, 104.2	102.8	1.0		
		0.5	100.0, 100.7, 100.3, 108.6, 106.4, 107.0	103.8	3.8	103.9	1.1	
105.9, 109.1, 107.7, 101.9, 104.2, 102.0			105.1	2.8				
102.2, 100.6, 100.1, 99.8, 99.6, 99.1			100.2	1.1				
1.0		97.2, 105.6, 106.1, 101.9, 96.0, 102.9	101.6	3.8	100.8	0.9		
		101.9, 100.7, 100.1, 100.5, 100.6, 98.8	100.4	1.0				
		100.0, 101.3, 101.4, 100.4, 101.0, 100.8	100.8	0.5				
2.0		101.8, 97.5, 100.4, 100.0, 105.1, 101.9	101.1	2.5	100.9	0.2		
	99.9, 101.3, 1001.3, 100.2, 101.0, 100.5	100.7	0.6					
	98.0, 98.2, 98.5, 97.7, 98.6, 97.2	98.0	0.6					
5.0	97.2, 97.3, 97.4, 97.2, 97.9, 94.1	96.9	1.4	97.4	0.6			
	972, 97.3, 97.3, 96.9, 97.9, 97.2	97.3	0.3					

表 17 混合型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量的加标回收及精密度结果

试样	化合物	样品含量 (g/kg)	加标水平 (g/kg)	回收率 (%)	批内平均回收率 (%)	批内 RSD (n=6, %)	批间平均回收率 (%)	批间 RSD (n=3, %)
混合型天然植物	菊苣酸	<LOD	0.2	101.4, 106.6, 101.1, 102.8, 104.2, 103.1	103.2	2.0	103.7	1.9
				104.0, 111.4, 102.9, 105.8, 108.7, 103.0	105.0	3.3		
				101.0, 107.5, 101.1, 100.2, 103.3, 98.9	102.0	3.0		

物料原料试样5	咖啡酸	<LOD	0.5	104.0, 102.0, 103.4, 96.0, 98.2, 100.4	100.7	3.1		
				101.0, 101.8, 98.3, 98.5, 98.3, 100.1	99.7	1.5	99.9	0.7
				100.7, 98.5, 98.8, 98.4, 99.4, 100.7	99.4	1.1		
			1.0	95.0, 96.5, 95.8, 95.2, 94.9, 91.3	94.8	1.9		
				97.1, 96.9, 95.2, 96.9, 92.5, 93.3	95.3	2.1	95.6	1.0
				97.1, 97.4, 95.2, 96.7, 99.1, 94.4, 96.6	96.6	1.7		
			2.0	94.4, 99.5, 98.6, 99.3, 100.4, 99.9	98.7	2.2		
				96.4, 96.6, 101.5, 98.5, 100.5, 99.8	98.9	2.1	98.9	0.2
				96.5, 97.5, 100.8, 98.5, 100.5, 100.5	99.1	1.8		
			5.0	106.4, 104.7, 104.6, 104.1, 104.2, 101.2	104.2	1.6		
				104.0, 104.4, 104.2, 104.7, 106.9, 99.6	104.0	2.3	103.4	1.2
				103.2, 102.4, 101.9, 100.8, 101.9, 101.2	101.9	0.8		
			0.2	103.6, 106.9, 105.5, 103.8, 103.5, 104.2	104.6	1.3		
				101.5, 105.4, 104.5, 102.0, 101.0, 102.3	102.8	1.7	103.1	1.4
				100.2, 104.9, 103.1, 100.6, 100.8, 101.4	101.8	1.8		
0.5	104.8, 102.8, 102.6, 102.0, 103.2, 105.2	103.7	1.2					
	104.7, 104.6, 104.7, 105.2, 101.9, 104.8	104.3	1.1	104.1	0.3			
	104.7, 104.3, 104.7, 105.2, 102.1, 104.7	104.3	1.1					
1.0	102.8, 102.8, 103.4, 102.3, 102.6, 97.9	101.9	2.0					
	102.2, 102.3, 102.8, 102.2, 102.3, 99.8	101.9	1.0	101.9	0.1			
	102.0, 102.3, 101.6, 102.2, 102.2, 100.7	101.8	0.6					
2.0	101.3, 105.6, 103.5, 104.3, 104.4, 104.0	103.8	1.4					
	100.9, 105.6, 100.1, 101.2, 103.9, 102.6	102.4	2.0	102.2	1.7			
	100.9, 100.3, 99.7, 101.0, 100.9, 99.2	100.3	0.8					
5.0	106.0, 106.3, 105.8, 106.0, 104.1, 101.3	104.9	1.9					
	95.1, 105.4, 105.0, 105.0, 103.3, 103.0	102.8	3.8	103.7	1.1			
	104.0, 104.6, 104.0, 104.2, 102.4, 99.3	103.2	2.1					

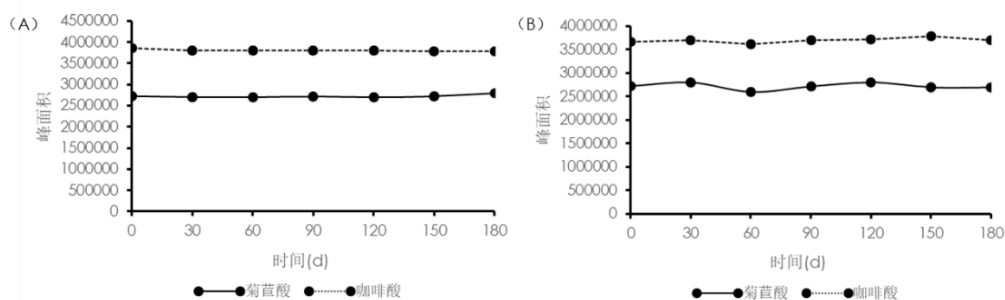
表 18 混合型天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸含量的加标回收及精密度结果

试样	化合物	样品含量 (g/kg)	加标水平 (g/kg)	回收率 (%)		批内平均回收率 (%)	批内 RSD (n=6, %)	批间平均回收率 (%)	批间 RSD (n=3, %)	
				回收率 (%)	回收率 (%)					
混合型天然植物饲料原料试样6	菊苣酸	<LOD	0.2	111.1, 102.3, 107.1, 103.0, 107.6, 106.7	106.3	3.0				
				109.0, 102.8, 113.2, 108.6, 108.6, 105.8	108.0	3.3	107.3	0.9		
				105.3, 104.5, 109.9, 105.0, 108.8, 112.8	107.7	3.1				
			0.5	89.7, 82.5, 82.5, 80.8, 86.9, 81.0	83.9	5.1				
				84.4, 82.0, 83.9, 86.0, 81.1, 84.8	83.7	2.2	84.2	0.9		
				83.0, 87.9, 82.2, 89.0, 87.7, 80.3	85.0	4.3				
			1.0	107.5, 113.8, 105.4, 107.1, 108.2, 112.7	109.1	3.1				
				107.8, 108.9, 111.3, 109.6, 111.3, 115.3	110.7	2.4	111.5	2.6		
				112.3, 109.6, 114.5, 113.5, 113.2, 115.7	114.8	1.8				
			5.0	87.6, 86.9, 84.3, 85.0, 86.1, 88.6	86.4	1.6				
				88.2, 85.9, 89.2, 85.2, 84.3, 87.5	86.7	2.3	87.8	2.4		
				90.9, 87.3, 90.2, 89.4, 90.6, 93.1	90.2	2.1				
			咖啡	<LOD	0.2	85.2, 91.8, 87.8, 92.5, 89.2, 91.8	89.7	3.2		
						89.6, 96.3, 91.5, 99.5, 91.7, 95.1	93.9	3.9	93.2	3.2
						91.3, 98.3, 93.7, 101.5, 94.0, 97.6	96.1	3.9		

酸	0.5	86.6, 85.3, 87.7, 84.2, 84.3, 86.5	85.8	1.6	87.7	2.0
		89.5, 89.0, 91.7, 87.7, 87.4, 89.6	89.2	1.7		
		89.9, 89.3, 81.8, 88.3, 88.2, 90.7	88.0	4.0		
	1.0	117.2, 118.4, 117.3, 114.9, 116.8, 118.3	117.2	1.1	111.7	4.6
		108.8, 101.3, 107.9, 107.6, 108.0, 108.6	107.0	2.6		
		111.5, 113.3, 109.9, 110.3, 111.1, 109.5	110.9	1.2		
	5.0	94.5, 96.4, 86.5, 96.3, 94.7, 96.4	95.8	1.0	97.7	1.8
		96.7, 98.4, 98.3, 98.9, 97.0, 99.7	98.2	1.2		
		98.4, 100.7, 99.9, 99.0, 98.3, 99.0	99.2	1.0		

3.2.4.8 标准储备溶液和混合标准储备溶液有效期的考察

取保存在冰箱-20℃保存的标准储备溶液和混合标准储备溶液，按照实验方法，分别在 0、30、60、90、120、150 和 180 天取出混合标准储备液，稀释至 50 μg/mL 按照优化后的 HPLC 色谱条件，测定峰面积，结果如图 17 所示：观察菊苣酸和咖啡酸峰面积在 0-180 天内基本无变化，这说明标准储备溶液和混合标准储备溶液在该条件下储存，180 天内，即 6 个月内稳定，无明显降解和变化。而且参考 GH/T 1312-2020 《蜂胶中绿原酸、咖啡酸、p-香豆酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸和阿替匹林 C 的测定 高效液相色谱法》，咖啡酸对照品储备液（2.0 mg/mL）在-18℃冰箱中，有效期 180 天，因此，将该混合标准储备液的储存期设为 6 个月。



(A) 标准储备溶液； (B) 混合标准储备溶液

图 17 标准储备溶液和混合标准储备溶液稳定性考察

3.2.4.9 方法验证结果

四川威尔检测技术股份有限公司、山东省畜产品质量安全中心和辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院 3 家实验室参加了该农业行业标准的验证，标准编制单位向验证单位提供方法草案、验证方案和标准品。验证单位按照方法草案准备试验用品，在规定时间内完成了对标准方法的定量限、线性范围、回收率和精

密度等技术指标的验证试验并返回试验结果。3家实验室的验证结果表明,中国农业科学院北京畜牧兽医研究所等单位编制的《天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定 高效液相色谱法》适用于天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的测定。标准曲线相关系数可达0.99,方法检出限、定量限可达到标准制修订单位规定的水平。辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院分别添加3个浓度水平的菊苣酸和咖啡酸(3个浓度水平分别是定量限、2倍定量限、5倍定量限),菊苣酸回收率在98.92%~106.16%之间,RSD≤3.47%,咖啡酸的回收率在97.42%~103.50%之间,RSD≤4.77%;四川威尔检测技术股份有限公司分别添加3个浓度水平的菊苣酸和咖啡酸(3个浓度水平分别是定量限、2倍定量限、5倍定量限),菊苣酸回收率在87.6%~101.3%之间,RSD≤6.49%,咖啡酸的回收率在88.9%~106.2%之间,RSD≤5.76%;山东省畜产品质量安全中心分别添加3个浓度水平的菊苣酸和咖啡酸(3个浓度水平分别是定量限、5倍定量限、10倍定量限),菊苣酸回收率在92.42%~102.3%之间,RSD≤4.00%,咖啡酸的回收率在98.2%~102.23%之间,RSD≤3.18%。综上,方法的定量限、线性范围、回收率和精密度等技术指标均符合GB/T 27417-2017和GB/T-27404-2008的要求,说明该方法可行。

3.2.4.10 实际样品的测定

使用本方法对从市场采集的以及实验室制备的不同来源的天然植物饲料原料57个样品进行了考察,结果见表18所示,菊苣酸和咖啡酸的含量差异很大。经调研发现,由于物种、采收季节、生长环境、加工工艺以及是否添加辅料等因素的影响造成了该差异,而且由于缺乏相关标准,监管缺乏依据也造成了市场上的产品质量参差不齐,差异较大。

表 18 57 个实测样品的检测值

样品编号	名称	菊苣酸	咖啡酸
		(g/kg)	(g/kg)
1	蒲公英 1	7.7	0.1
2	蒲公英 2	5.9	0.1
3	蒲公英 3	4.5	0.1
4	蒲公英 4	6.8	0.4

5	蒲公英 5	9.4	1.4
6	菊花 1	0.6	0.1
7	菊花 2	1.2	0.1
8	菊花 3	0.6	0.1
9	菊花 4	7.9	0.4
10	杜仲	<LOQ	0.1
11	当归	<LOQ	<LOQ
12	党参	<LOQ	<LOQ
13	金银花 1	<LOQ	0.3
14	金银花 2	<LOQ	0.2
15	桑叶	<LOQ	<LOQ
16	野菊花	0.22	<LOQ
17	油莎豆 1	<LOQ	<LOQ
18	油莎豆 2	<LOQ	<LOQ
19	栀子 1	<LOQ	<LOQ
20	栀子 2	<LOQ	<LOQ
21	八角 1	<LOQ	<LOQ
22	八角 2	<LOQ	<LOQ
23	白扁豆	<LOQ	<LOQ
24	百里香	<LOQ	0.1
25	蒲公英粗提物 1	0.5	3.2
26	蒲公英粗提物 2	1.4	0.1
27	蒲公英粗提物 3	6.8	0.6
28	蒲公英粗提物 4	2.0	0.4
29	蒲公英粗提物 5	2.5	0.2
30	蒲公英粗提物 6	1.4	0.2
31	蒲公英粗提物 7	2.0	0.07
32	蒲公英粗提物 8	1.1	0.2
33	菊花粗提物 1	43.6	0.3

34	菊花粗提物 2	1.6	0.1
35	菊花粗提物 3	1.1	<LOQ
36	菊花粗提物 4	5.9	<LOQ
37	杜仲粗提物 1	<LOQ	0.2
38	杜仲粗提物 2	<LOQ	0.1
39	金银花粗提物 1	<LOQ	2.9
40	金银花粗提物 2	<LOQ	1.0
41	党参粗提物 1	<LOQ	<LOQ
42	党参粗提物 2	<LOQ	<LOQ
43	百里香粗提物 1	<LOQ	<LOQ
44	百里香粗提物 2	<LOQ	<LOQ
45	淫羊藿粗提取	<LOQ	<LOQ
46	桑叶粗提物	<LOQ	<LOQ
47	野菊花粗提物 1	0.1	<LOQ
48	野菊花粗提物 2	<LOQ	<LOQ
49	栀子粗提物 1	<LOQ	<LOQ
50	栀子粗提物 2	<LOQ	<LOQ
51	复配型饲料原料 1 (蒲公英、菊花)	0.2	0.2
52	复配型饲料原料 2 (蒲公英、山楂)	0.2	0.1
53	复配型饲料原料 3 (蒲公英、金银花)	0.1	0.1
54	复配型天然植物粗提物饲料原料 1 (蒲公英粗提物、黄芪粗提物、益母草粗提物)	0.4	0.5
55	复配型天然植物粗提物饲料原料 2 (蒲公英粗提物、党参粗提物)	0.3	0.6
56	复配型天然植物粗提物饲料原料 3 (蒲公英粗提物、益母草粗提物)	0.8	1.1
57	混合型天然植物饲料原料 1 (蒲公英、杜仲、益母草粗提物)	0.4	0.5

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

无。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

目前天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸的含量测定方法无国际标准和国外先进标准可参照。本标准在制定过程中对以蒲公英为主的单一型和复配型天然植物饲料原料的质量、检测和市场进行了充分的调查研究，并广泛征求和采纳了国内相关领域专家的意见和建议，所制定的标准适合我国国情，具有先进性、科学性、实用性和可操作性。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

标准所确定的各项技术指标和内容符合我国现行的有关方针、政策，并相关法律、法规、标准吻合。

本标准颁布实施后，填补我国天然植物饲料行业，天然植物饲料原料中菊苣酸和咖啡酸测定方法的空白，更有利于行业应用和相关产品质量标准的制定；与现行的法律、法规及相关标准没有矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但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。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

(1) 首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本；

(2) 为了贯彻好本标准，使其有效发挥作用，建议在标准发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，并在相关企业和检测机构进行宣传 and 贯彻，组织有关部门和人员进行学习和培训。

十、其他应当说明的事项

无。

参考文献

1. 《天然植物饲料原料通用要求》中华人民共和国国家标准 GB/T 19424-2018.
2. 中华人民共和国农业农村部公告第 1773 号-关于发布《饲料原料目录》的公告。
3. 王红, 冯帅, 史磊, 田新, 李峰, 李鹏. 菊苣酸的研究进展[J]. 药学研究, 2021,40 (9): 614-619.
4. 张雯, 孙雅丽, 王琳, 秦翠平, 马建章. 咖啡酸及其衍生物药理作用研究进展 [J]. 动物医学进展, 2021, 42(8): 103-106.
5. Lee J., Scagel C.F. Chicoric acid: chemistry, distribution, and production [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2013 (1): 40.
6. 乔天磊. 饲料中添加咖啡酸对断奶仔猪生长性能和肠道屏障功能的影响[D]. 四川农业大学, 2023
7. MA J, LI M, KALAVAGUNTA P K, et al. Protective effects of cichoric acid on H₂O₂ - induced oxidative injury in hepatocytes and larval zebrafish models [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018(104) : 679—685.
8. 刁志君. 菊苣酸对体内抗氧化防御酶的调节作用及机制研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017. (10) : 1279—1285.
9. 国家药典委员会, 中华人民共和国药典, 一部[M]. 北京, 中国医药科技出版社, 2015。
10. 国家药典委员会, 中华人民共和国药典, 一部[M]. 北京, 中国医药科技出版社, 2020。
11. 邓海涛. 日粮中添加蒲公英对肉鸡生长性能和抗病力的影响[J]. 国外畜牧学 (猪与禽), 2021, 41(4): 102-103.
12. 姚东云. 蒲公英粗提物对蛋鸡生产性能及生化指标的影响[J]. 饲料研究, 2020, 43(3): 38-40.
13. 曹林, 肖传明, 冯秀燕, 等 . 天然植物提取物对断奶仔猪生长性能、血清生化指标、抗氧化能力及免疫功能的影响[J]. 饲料研究, 2022, 45(9): 40-44.
14. 侯宏伟, 欧阳五庆, 杨晓华. 超微粉碎中草药饲料添加剂对断奶仔猪生长性能

- 和腹泻率的影响[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(11): 42-44.
15. 隋明静.植物提取复方制剂对断奶仔猪生长性能、免疫机能及肠道菌群的影响[D]. 保定:河北农业大学, 2019.
 16. 《蜂胶中绿原酸、咖啡酸、p-香豆酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸、4, 5-二咖啡酰奎宁酸和阿替匹林 C 的测定 高效液相色谱法》中华人民共和国行业标准 GH/T 1312-2020。
 17. 《蜂胶中咖啡酸、p-香豆酸、阿魏酸、短叶松素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、白杨素和高良姜素含量的测定反相高效液相色谱法》中华人民共和国行业标准 GH/T 1280-2019。
 18. 国家标准 - 全国标准信息公共服务平台, <https://www.qybz.org.cn/>
 19. 《标准化工作导则 第 1 部分: 标准化文件的结构和起草规则》中华人民共和国国家标准 GB/T 1.1-2020。
 20. 《标准编写规则第 4 部分: 试验方法标准》中华人民共和国国家标准 GB/T 20001.4-2015。
 21. 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》中华人民共和国国家标准 GB/T 27417-2017。
 22. 《分析实验室用水规格和实验方法》中华人民共和国国家标准 GB/T 6682。
 23. 《动物饲料 试样的制备》中华人民共和国国家标准 GB/T 20195
 24. 李超, 董自波, 蒋金来, 赵文艳. HPLC 法测定蒲公英中菊苣酸、咖啡酸与氯元素[J]. 中草药, 2015 (46) 3577-3580。
 25. Carazzone C., Mascherpa D., Gazzani G, et al. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2/3): 1062-1071.