

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××-202×

饲料中姜黄素的测定
高效液相色谱法

Determination of curcuminoid in feeds—High performance liquid chromatography

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：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）]。

本文件主要起草人：

饲料中姜黄素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了饲料中姜黄素（姜黄素、脱甲氧基姜黄素及双脱甲氧基姜黄素）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、添加剂预混合饲料及混合型饲料添加剂中姜黄素的测定。

本文件配合饲料、浓缩饲料、精料补充料中姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素的检出限均为1.0 mg/kg，定量限均为2.5 mg/kg，添加剂预混合饲料、混合型饲料添加剂中姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素的检出限均为3 mg/kg，定量限均为10 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

试样中的姜黄素用甲醇提取，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 磷酸二氢钾：优级纯。

5.5 磷酸二氢钾溶液（50 mmol/L）：称取磷酸二氢钾（5.4）6.804 g，用水溶解，并定容至 1000 mL，混匀。

5.6 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取姜黄素（Cur I，CAS 号 458-37-7，纯度≥95%）、去甲氧基姜黄素（Cur II，CAS 号 22608-11-3，纯度≥95%）、双去甲氧基姜黄素（Cur III，CAS 号 22608-11-3，

24939-16-0, 纯度≥95%)标准品各 50 mg (精确至 0.1 mg), 分别置于 50 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇(5.2)溶解并定容, 混匀。于 2 °C~8 °C 避光保存, 有效期 6 个月。

5.7 混合标准中间溶液(50 μg/mL): 准确移取标准储备溶液(5.6)各 2.5 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇(5.2)稀释并定容, 混匀。临用现配。

5.8 混合标准系列溶液: 准确移取适量混合标准中间溶液(5.7), 用甲醇(5.2)稀释并定容, 混匀, 配制成浓度为 0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.5 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、25.0 μg/mL 的混合标准系列溶液。临用现配。

5.9 微孔滤膜: 0.45 μm, 有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪: 配有二极管阵列检测器或紫外可见光检测器。

6.2 分析天平: 精度 0.01 g 和 0.0001 g。

6.3 超声清洗器。

7 样品

按 GB/T 20195 的规定制备试样, 不少于 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 试样溶液制备

平行做两份试验。称取配合饲料、浓缩饲料、精料补充料约 2 g (精确至 0.01 g), 添加剂预混合饲料、混合型饲料添加剂约 0.5 g (精确至 0.0001 g) 于 50 mL 具塞离心管中, 准确加入 50 mL 甲醇(5.2), 涡漩混匀, 超声提取 20 min, 中间旋摇 1 次, 静置, 取上清液过 0.45 μm 滤膜(5.9), 待测。

8.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

a) 色谱柱: C₁₈ 柱, 长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm, 或性能相当者;

b) 柱温: 40 °C;

c) 检测波长: 420 nm;

d) 流动相: 磷酸二氢钾溶液(5.5)+乙腈(5.3)=45+55;

e) 流速: 1.0 mL/min;

f) 进样量: 10 μL。

8.3 测定

8.3.1 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(5.8)和试样溶液(8.1)上机测定。姜黄素混合标准溶液的液相色谱图见附录A。

8.3.2 定性

在相同试验条件下,试样溶液中待测物的保留时间应与浓度相当的标准溶液中待测物的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

8.3.3 定量

在仪器最佳条件下,混合标准系列溶液与试样溶液交替进样,采用外标法定量。以标准溶液中的被测组分的峰面积为纵坐标,标准溶液中被测组分的浓度为横坐标绘制标准曲线,其相关系数应不低于0.99。试样溶液与标准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,需根据测定浓度用甲醇稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中Cur I、Cur II、Cur III的含量以质量分数 w_i 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按式(1)计算;单点校准按式(2)计算:

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

式中:

ρ_i ——由标准曲线查得的试样溶液中待测物的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样溶液体积,单位为毫升(mL);

n ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g);

1 000——换算系数。

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

式中:

A_i ——试样溶液中待测物的色谱峰面积;

ρ_{si} ——标准溶液中待测物的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样溶液体积,单位为毫升(mL);

n ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数;

A_{si} ——标准溶液中待测物的色谱峰面积;

m ——试样质量,单位为克(g);

1 000——换算系数。

试样中姜黄素含量 w 为Cur I、Cur II、Cur III的含量之和,按式(3)计算。

$$w = w_{\text{cur I}} + w_{\text{cur II}} + w_{\text{cur III}} \dots\dots\dots (3)$$

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。

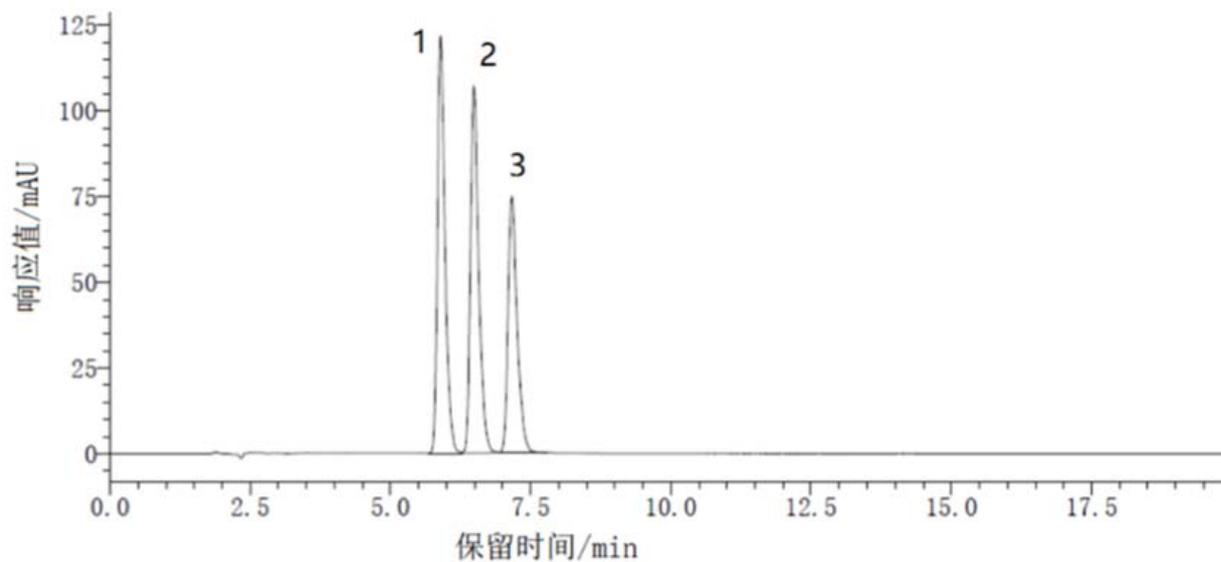
10 精密度

在重复性条件下,Cur I、Cur II、Cur III两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的10%。

附录 A
(资料性)

混合标准溶液中姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素的液相色谱图

混合标准溶液中姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素的液相色谱图见图 A.1



标引序号说明：

1——双去甲氧基姜黄素（Cur III）；

2——去甲氧基姜黄素（Cur II）；

3——姜黄素（Cur I）。

图 A.1 混合标准溶液（1.0 $\mu\text{g/mL}$ ）液相色谱图