ICS 65.120
CCS B 46

中华人民共和国国家标准

GB/T 23187－202×
代替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

（公开征求意见稿）

202×-××-××发布　　202×-××-××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。

本文件代替 GB/T 23187－2008《饲料中叶黄素的测定　高效液相色谱法》，与 GB/T 23187－2008 相比，除结构调整外，主要技术变化如下：

a）更改了适用范围，增加了检出限（见第 1 章，2008 年版的第 1 章）；

b）更改了部分试剂和材料的描述（见第 5 章，2008 年版的第 4 章）；

c）增加了反相液相色谱法（见第 5 章）；

d）增加了定性和定量描述（见 4.5.2.3、4.5.2.4、5.5.2.3、5.5.2.4）；

e）增加了附录 A 叶黄素标准溶液液相色谱图。

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：广州汇标检测技术中心、华中农业大学、广州立达尔生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：

本文件所代替文件历次版本发布情况为：

——2008 年首次发布为 GB/T 23187－2008；

——本次为第一次修订。

饲料中叶黄素的测定　高效液相色谱法

1　范围

本文件描述了饲料中叶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、混合型饲料添加剂和饲料原料中叶黄素的测定。

本文件的检出限为 0.2 mg/kg，定量限为 0.5 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　正相法

4.1 原理

试样中叶黄素经碱液皂化、有机溶剂提取，高效液相色谱测定，外标法定量。

4.2　试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1　水：GB/T 6682，一级。

4.2.2　正己烷。

4.2.3　正己烷：色谱纯。

4.2.4　乙酸乙酯：色谱纯。

4.2.5　异丙醇：色谱纯。

4.2.6　提取溶液：正己烷 + 丙酮 + 无水乙醇 + 甲苯 =34+23+20+23（体积比），混匀。

4.2.7　氢氧化钾甲醇溶液（400 g/L）：称取 40 g 氢氧化钾，溶于 80 mL 甲醇中，冷却后用甲醇定容至 100 mL，混匀。

4.2.8　硫酸钠溶液（100 g/L）：称取 10 g 无水硫酸钠，溶于 100 mL 水中，混匀。

4.2.9　流动相：正己烷（4.2.3）+乙酸乙酯（4.2.4）+异丙醇（4.2.5）=73+27+1.5（体积比）。

4.2.10　标准储备溶液：准确称取叶黄素（CAS 号：127-40-2，纯度≥98 %）标准品 2 mg（精确至 0.01 mg）于 100 mL 棕色容量瓶中，先加入少量流动相（4.2.9）超声溶解，再用流动相定容，混匀。

-20 ℃ 以下避光保存，有效期 1 个月。

4.2.11　标准系列溶液：准确移取适量标准储备溶液（4.2.10）于棕色容量瓶中，用流动相（4.2.9）稀释、定容，混匀，配制成质量浓度分别为 0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL 标准系列溶液。临用现配。

4.2.12　微孔滤膜：0.45 μm，有机系。

4.3　仪器设备

4.3.1　高效液相色谱仪：配备紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.3.2　分析天平：精度 0.1 mg、0.001 mg。

4.3.3　恒温水浴锅。

4.3.4　旋转蒸发仪。

4.3.5　分液漏斗：250 mL。

4.4　样品

按GB/T 20195制备，至少200 g，固体样品使其全部通过1 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中。液态和膏状样品，分布均匀的直接装入密闭容器；分布不均匀的匀浆后装入密闭容器。2 ℃～8 ℃ 避光保存。

4.5　试验步骤

警告—试验过程应避光操作！

4.5.1　试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样 1 g～5 g（精确至 0.1 mg），置于 100 mL 棕色具塞锥形瓶中。加入 30 mL 提取溶液（4.2.6），塞紧，旋转振摇 1 min，加入 2 mL 40 % 氢氧化钾甲醇溶液（4.2.7），旋转振摇 1 min，将锥形瓶接上冷凝装置或塞紧瓶塞，置于 50 ℃～60 ℃ 水浴中 20 min，于暗处放置 1 h，加入 20 mL 正己烷（4.2.2），旋转振摇 1 min，加入 10 % 硫酸钠溶液（4.2.8）50 mL，转移至 250 mL 分液漏斗（4.3.5）中，剧烈振摇 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（4.2.2）提取两次，合并上层溶液，于 50 ℃～60 ℃ 旋转蒸发仪中浓缩至干，根据样品中叶黄素含量高低，残余物加正己烷（4.2.2）10 mL～100 mL（V），充分溶解后，过微孔滤膜（4.2.12），滤液待测。

4.5.2　测定

4.5.2.1　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：正相硅胶柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者。

b）流动相：正己烷（4.2.3）+ 乙酸乙酯（4.2..4）+ 异丙醇（4.2.5）=73+27+1.5（体积比）。

c）流速：1.5 mL/min。

d）进样体积：20 μL。

e）柱温：室温。

f）检测波长：446 nm。

4.5.2.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（4.2.11）和试样溶液（4.5.1）上机测定。叶黄素标准溶液的液相色谱图见附录 A。

4.5.2.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中叶黄素保留时间应与标准系列溶液（质量浓度相当）叶黄素的保留时间一致，其相对偏差在 ± 2.5% 以内。

4.5.2.4 定量

以标准系列溶液中的浓度为横坐标，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。试样溶液与标准溶液中叶黄素的响应值均应在仪器检测的线性范围内，试样溶液如超出线性范围，应将试样溶液（4.5.1）用正己烷（4.2.2）稀释至线性范围内，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中叶黄素的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中 叶黄素的含量，以质量分数 ω 表示，单位为毫克每千克（mg/kg），多点校正按公式（1）计算，单点校正按公式（2）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \quad \cdots\cdots\cdots\

5 反相法

5.1 原理

试样中叶黄素经碱液皂化、有机溶剂提取，高效液相色谱测定，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 乙醇：色谱纯。

5.2.3 乙腈：色谱纯。

5.2.4 甲醇：色谱纯。

5.2.5 异丙醇：色谱纯。

5.2.6 甲基叔丁基醚：色谱纯。

5.2.7 正己烷。

5.2.8 提取溶液：正己烷 + 丙酮 + 无水乙醇 + 甲苯 =34+23+20+23（体积比），混匀。

5.2.9 氢氧化钾甲醇溶液（400 g/L）：称取 40 g 氢氧化钾，溶于 80 mL 甲醇中，冷却后用甲醇定容至 100 mL，混匀。

5.2.10 硫酸钠溶液（100 g/L）：称取 10 g 无水硫酸钠，溶于 100 mL 水中，混匀。

5.2.11 流动相 A：乙腈（5.2.3）+甲醇（5.2.4）=70+30（体积比）。

5.2.12 标准储备溶液：准确称取叶黄素（CAS 号：127-40-2，纯度≥98 %）标准品 2 mg（精确至 0.001 mg）于 100 mL 棕色容量瓶中，用乙醇（5.2.2）超声溶解、定容，混匀。-20 ℃ 以下避光保存，有效期 1 个月。

5.2.13 标准系列溶液：准确移取适量标准储备溶液（5.2.11）于棕色容量瓶中，用乙醇（5.2.2）稀释、定容，混匀，配制成质量浓度分别为 0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL 标准系列溶液。临用现配。

5.2.14 微孔滤膜：0.45 μm，有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪：配备紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.3.2 分析天平：精度 0.1 mg、0.001 mg。

5.3.3 恒温水浴锅。

5.3.4 旋转蒸发仪。

5.3.5 分液漏斗：250 mL。

5.4 样品

按GB/T 20195制备，至少200 g，固体样品使其全部通过1 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中。液态和膏状样品，分布均匀的直接装入密闭容器；分布不均匀的匀浆后装入密闭容器。2 ℃～8 ℃ 避光保存。

5.5 试验步骤

警告—试验过程应避光操作！

5.5.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样 1 g～5 g（精确至 0.1 mg），置于 100 mL 棕色具塞锥形瓶中。加入 30 mL 提取溶液（5.2.8），塞紧，旋转振摇 1 min，加入 2 mL 40 % 氢氧化钾甲醇溶液（5.2.9），旋转振摇 1 min，将锥形瓶接上冷凝装置或塞紧瓶塞，置于 50 ℃～60 ℃ 水浴中 20 min，于暗处放置 1 h，加入 20 mL 正己烷（5.2.7），旋转振摇 1 min，加入 10 % 硫酸钠溶液（5.2.10）50 mL，转移至 250 mL 分液漏斗（5.3.5）中，剧烈振摇 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（5.2.7）提取两次，合并上层溶液，于 50 ℃～60 ℃ 旋转蒸发仪中浓缩至干，根据样品中叶黄素含量高低，残余物加乙醇（5.2.2）10 mL～100 mL（V），充分溶解后，过微孔滤膜（5.2.14），滤液待测。

5.5.2 测定

5.5.2.1 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_{30}，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者。

b）流动相：A 为乙腈+甲醇(70+30, 体积比), B为甲基叔丁基醚，洗脱程序见表1。

c）流速：1.0 mL/min。

d）进样体积：20 μL。

e）柱温：30 ℃。

f）检测波长：446 nm。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0	100	0
12.0	80	20
17.0	0	100
17.1	100	0
20.0	100	0
22.0	0	100
22.1	100	0
25.0	100	0

5.5.2.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（5.2.13）和试样溶液（5.5.1）上机测定。叶黄素标准溶液的液相色谱图见附录 A。

5.5.2.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中叶黄素保留时间应与标准系列溶液（质量浓度相当）叶黄素的保留时间一致，其相对偏差在 ± 2.5% 以内。

5.5.2.4 定量

以标准系列溶液中的浓度为横坐标，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。试样溶液与标准溶液中叶黄素的响应值均应在仪器检测的线性范围内，试样溶液如超出线性范围，应将试样溶液（5.5.1）用乙醇（5.2.2）稀释至线性范围内，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中叶黄素的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中 叶黄素的含量，以质量分数 ω 表示，单位为毫克每千克（mg/kg），多点校正按公式（3）计算，单点校正按公式（4）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \quad \text{……（3）}$$

式中：

ρ——从标准曲线查得的试样溶液中叶黄素质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

f——超出标准曲线范围后的稀释倍数；

1000——换算系数；

m——试样质量，单位为克（g）。

$$\omega = \frac{A \times \rho_S \times V \times 1000}{A_S \times m \times 1000} \times f \quad \text{……（4）}$$

式中：

A——试样溶液中叶黄素峰面积；

ρ_s——标准溶液中叶黄素质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

1000——换算系数；

f——稀释倍数；

A_s——标准溶液叶黄素峰面积；

m——试样质量，单位为克（g）。

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。

5.7 精密度

在重复性条件下，叶黄素含量 >50 mg/kg 时，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于 10 %；叶黄素含量 ≤50 mg/kg 时，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于 15 %。

附 录 A
（资料性）
叶黄素标准溶液液相色谱图

叶黄素标准溶液的正相液相色谱图见图 A.1。

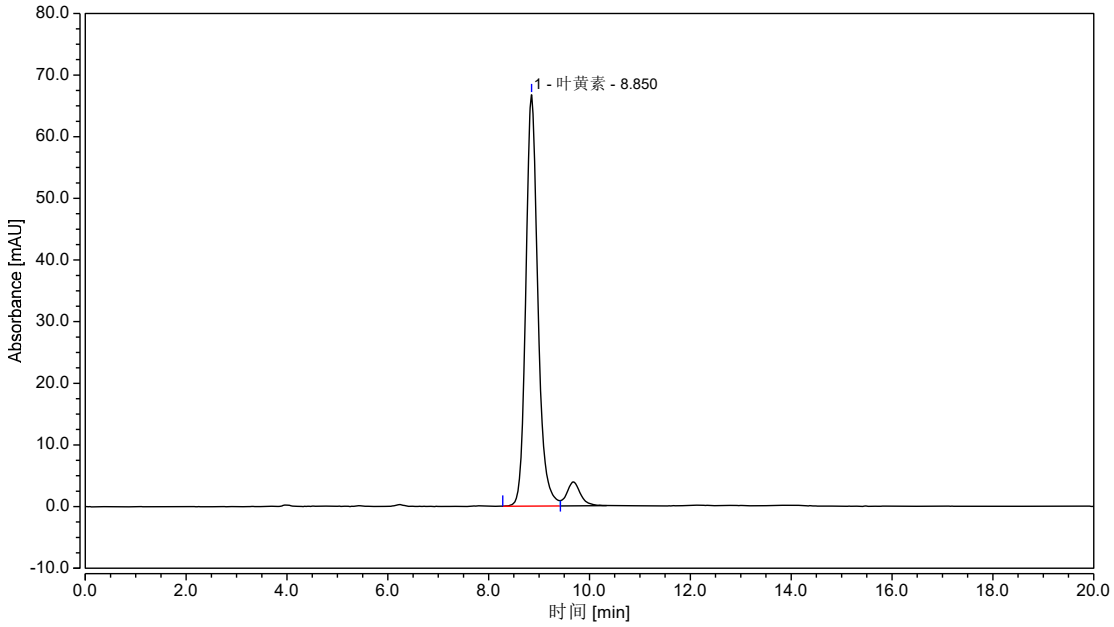

图 A.1　叶黄素标准溶液（10 μg/mL）的正相液相色谱图

叶黄素标准溶液的反相液相色谱图见图 A.2

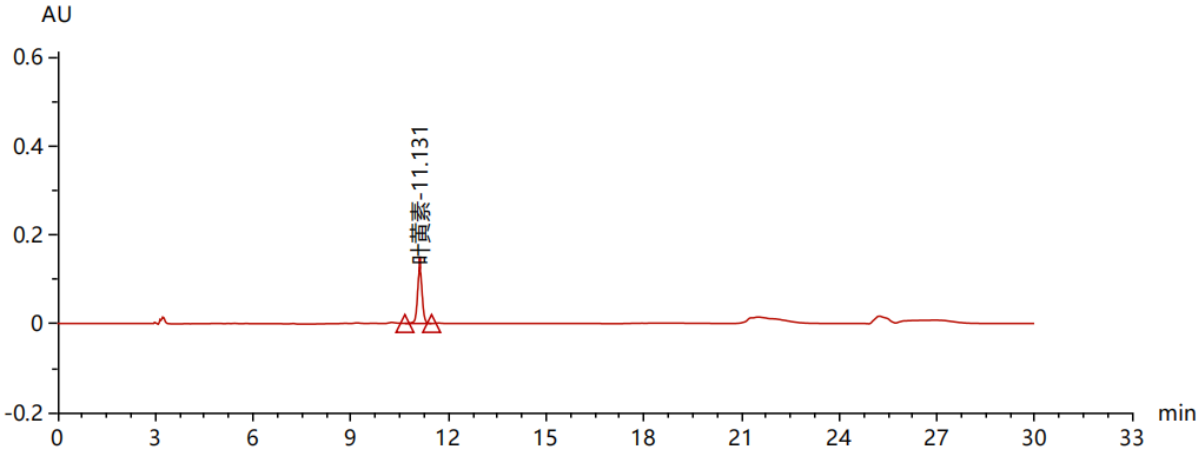

图 A.2　叶黄素标准溶液（10 μg/mL）的反相液相色谱图