

ICS 65.120

CCS B 46

团体标准

T/SDFA 030—2023

混合型饲料添加剂中紫苏籽 提取物的测定

2023-05-18 发布

2023-06-01 实施

山东省饲料行业协会 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。

本文件由山东省饲料行业协会提出并归口。

本文件起草单位：山东省畜产品质量安全中心、山东新希望六和集团有限公司、淄博维希尔生物技术有限公司、中国农科院北京畜牧兽医研究所、山东农业大学。

本文件主要起草人：孙延军、李勇、朱良智、张军民、杨青、饶正华、杨维仁、许天罡、孙春华、张桂国。

混合型饲料添加剂中紫苏籽提取物的测定

1 范围

本文件规定了混合型饲料添加剂紫苏籽提取物中黄酮、 α -亚麻酸和亚油酸的测定方法。

本文件适用于混合型饲料添加剂紫苏籽提取物中含量不低于0.5%的黄酮、含量不低于0.5%的 α -亚麻酸和亚油酸的测定。

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 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

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 黄酮的测定

4.1 原理

试样用乙醇溶液溶解后，硝酸铝络合体系显色，以芦丁为标准品，试样溶液和标准品溶液分别在510 nm处测定其吸光度，计算得出含量。

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 6682，三级。

4.2.2 乙醇溶液（60%）：量取 60 mL 无水乙醇，加水至 100 mL，混匀。

4.2.3 亚硝酸钠溶液（5%）：准确称取 5 g 亚硝酸钠，加水至 100 mL，混匀。

4.2.4 硝酸铝溶液（10%）：准确称取 10 g 硝酸铝，加水至 100 mL，混匀。

4.2.5 氢氧化钠溶液(4.3%):准确称取 5 g 氢氧化钠，加水至 100 mL，混匀。

4.2.6 芦丁标准储备各溶液:准确称取芦丁对照品（CAS:153-18-4，纯度 \geq 98%）15.2 mg，置于 50 mL 容量瓶中，用乙醇溶液（4.2.2）溶解，定容，混匀。现配现用。

4.3 仪器设备

4.3.1 紫外可见分光光度计：附 1 cm 比色皿。

4.3.2 分析天平：精度 0.1 mg。

4.3.3 超声清洗器。

4.4 样品

按 GB/T 20195 制备试样，粉碎过 0.425 mm 分析筛，至少 200 g，充分混匀。密封保存。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样适量（约相当于芦丁 30 mg，精确至 0.1 mg），置于 50 mL 锥形瓶中，加 60% 乙醇溶解，转移至 50 mL 容量瓶中，定容，摇匀。吸取 2.00 mL 溶液于 25 mL 容量瓶中，用乙醇溶液（4.2.2）补充至 12.5 mL，加入 0.7 mL 亚硝酸钠（4.2.3）溶液，摇匀，放置 5 min 后，加入 0.7 mL 硝酸铝（4.2.4）溶液，6 min 后再加入 5 mL 氢氧化钠（4.2.5）溶液，混匀，用乙醇溶液（4.2.2）定容，室温放置 10 min。

4.5.2 工作标准曲线的制备

分别准确移取芦丁标准储备溶液 1 mL，2 mL，4 mL，6 mL，8 mL 于 5 个 25 mL 容量瓶中，用乙醇溶液（4.2.2）补充至 12.5 mL，加入 0.7 mL 亚硝酸钠（4.2.3）溶液，摇匀，放置 5 min 后，加入 0.7 mL 硝酸铝（4.2.4）溶液，6 min 后再加入 5 mL 氢氧化钠（4.2.5）溶液，混匀，用乙醇溶液（4.2.2）定容，室温放置 10 min。

4.5.3 试剂空白溶液的制备

除不加试料外，均按上述试验步骤进行。

4.5.4 测定

用 1 cm 的比色皿，以试剂空白溶液为参照，立即测定工作标准曲线试样溶液和试样溶液在波长 510 nm 的吸光度。以芦丁浓度为横坐标，以吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。

4.6 试验数据处理

试样中黄酮含量 w_1 以质量分数（%）表示，按公式（1）计算：

$$\omega_1 = \frac{\rho_1 \times n}{m_1 \times 1000} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ρ_1 ——从标准曲线上查得的试样溶液中黄酮类化合物的量，单位为毫克（mg）；

n ——稀释倍数；

m_1 ——试样的质量，单位为克（g）；

1 000——换算系数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果表示至小数点后 2 位。

4.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

5 α -亚麻酸和亚油酸的测定

5.1 原理

试样中的 α -亚麻酸和亚油酸经提取，高效液相色谱分离紫外检测，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 甲醇。

5.2.3 乙腈：色谱纯。

5.2.4 磷酸乙腈溶液（0.1%）：取磷酸 1 mL 加乙腈至 1000 mL。

5.2.5 磷酸溶液（0.1%）：取磷酸 1 mL 加水至 1000 mL。

5.2.6 α -亚麻酸、亚油酸混合标准工作溶液：准确称取 α -亚麻酸标准品（CAS：463-40-1，纯度 $\geq 95\%$ ）、亚油酸标准品（CAS：60-33-3，纯度 $\geq 95\%$ ）适量（精确至 0.1 mg），于 100 mL 容量瓶中，用磷酸乙腈溶液（5.2.4）溶解，定容，混匀。溶液浓度为 α -亚麻酸 500 $\mu\text{g/mL}$ 、亚油酸 100 $\mu\text{g/mL}$ 。2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 贮存，有效期一个月。

5.2.7 滤膜：0.45 μm ，有机相。

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。

5.3.3 超声波清洗器。

5.4 样品

按 GB/T 20195 制备试样，至少 200 g。粉碎过 0.425 mm 分析筛，充分混匀，密闭保存。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样适量（约相当于 α -亚麻酸 5 mg 或亚油酸 1 mg，精确至 0.1 mg），置于 10 mL 具塞试管中，加入甲醇 8 mL，密封，25 $^{\circ}\text{C}$ 超声 30 min，冷却至室温，转移至 10 mL 容量瓶中，定容，摇匀。上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，滤液备用。

5.5.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱： C_{18} ，长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm ；或性能相当者；；

b) 流动相：0.1%磷酸溶液+乙腈=20+80；

c) 流量：1 mL/min；

d) 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；

e) 检测器：紫外检测器；

f) 检测波长：203 nm。

5.5.3 测定

5.5.3.1 混合标准工作溶液和试样溶液测定

在仪器最佳工作条件下，分别上机测定 α -亚麻酸、亚油酸混合标准工作溶液（5.2.6）和试样溶液（5.5.1）， α -亚麻酸、亚油酸标准工作溶液的液相色谱图见附录A。

5.5.3.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中 α -亚麻酸、亚油酸保留时间应与标准工作溶液中 α -亚麻酸、亚油酸的保留时间一致，其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

5.5.3.3 定量

试样溶液中 α -亚麻酸、亚油酸的浓度与标准工作溶液浓度相差不超过30%。如超出浓度范围，应将试样溶液稀释后，重新测定。如浓度低于工作溶液浓度范围，则增加称样量，重新测定。

5.6 试验数据处理

试样中 α -亚麻酸或亚油酸含量 ω_2 以质量分数（%）表示，按公式（1）计算：

$$\omega_2 = \frac{A_i \times \rho_2 \times V}{m_2 \times 1\,000 \times A_{Si}} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

式中：

A_i ——样品色谱图中 α -亚麻酸或亚油酸色谱峰面积；

ρ_2 ——标准溶液中 α -亚麻酸或亚油酸浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V ——试样稀释体积，单位为毫升（mL）；

m_2 ——试样质量，单位为克（g）；

1 000——换算系数；

A_{Si} ——标准溶液中 α -亚麻酸或亚油酸的峰面积。

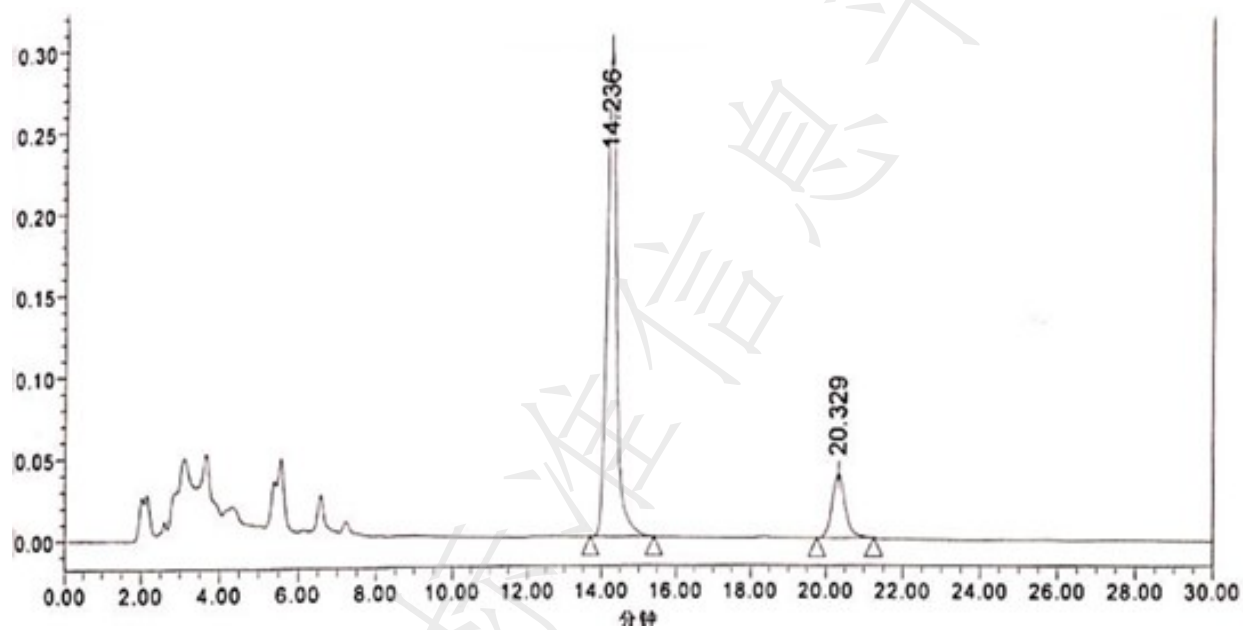
测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果表示至小数点后2位。

5.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

附录 A
(资料性)
 α -亚麻酸、亚油酸标准品液相色谱图

α -亚麻酸、亚油酸标准品液相色谱图见图 A.1



图A.1 α -亚麻酸、亚油酸标准品 (α -亚麻酸500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、亚油酸100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 液相色谱图