

HPLC 法测定饲料添加剂淫羊藿提取物中黄酮醇苷含量

LC-443

摘要：本文建立了 HPLC 法测定饲料添加剂淫羊藿提取物中黄酮醇苷含量的方法，并对方法的线性、精密度及加标回收率进行了考察。结果显示，朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和宝藿苷 I 等 5 种化合物在线性范围内线性关系良好；重复性考察中目标物保留时间相对标准偏差不大于 0.15%，峰面积的相对标准偏差在 0.02%~0.995% 之间，重复性好；低中高三水平的加标实验中，目标物的加标回收率在 83.5%~97.0% 之间。

关键词：高效液相色谱仪 淫羊藿提取物 黄酮醇苷

技术特点：

- ❖ Shim-pack GIST C18 色谱柱分离良好，可减少样品杂峰对目标物干扰。
- ❖ 本方法灵敏度相较于标准提升 14 倍、重复性均优于标准要求。

淫羊藿提取物已列入我国《饲料添加剂目录》，其在促进畜禽生长、提高动物免疫力等方面具有良好的效果，深受畜禽养殖企业的青睐。我国是淫羊藿地理分布中心，拥有 40 余种淫羊藿品种，不同品种淫羊藿中主要成分黄酮醇苷的种类和含量等差异巨大。因淫羊藿品种、产地、采收季节和提取加工工艺等因素的不同，导致市场上淫羊藿提取物的质量参差不齐，鱼龙混杂。

目前，我国有多达几百家企业获得饲料添加剂

淫羊藿提取物的生产许可，但不同企业之间的生产工艺和质量控制标准千差万别。国家标准 GB/T 43810-2024《饲料添加剂淫羊藿提取物中黄酮醇苷的测定 高效液相色谱法》的制定和实施为规范淫羊藿提取物产品质量、监管和应用提供技术支撑，对促进我国饲用天然植物提取物饲料添加剂产业的健康可持续发展具有重大的现实意义。本文采用高效液相色谱法测定饲料添加剂淫羊藿提取物中黄酮醇苷含量，操作性和实用性强，可供相关检测参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本文使用岛津 Essentia LC-16 液相色谱仪，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20Alite	自动进样器：	SIL-16
柱温箱：	CTO-16L	输液泵：	LC-16×2
脱气机：	DGU-20A3R	检测器：	SPD-16

1.2 分析条件

色谱柱：	Shim-pack GIST C18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30017-08)		
流动相：	A - 水; B - 乙腈		
流速：	1.0 mL/min	柱温：	40°C
进样体积：	20 μL	检测波长：	270 nm
洗脱方式：	B 相初始浓度为 25%，时间程序见表 1。		

表 1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Pump B Conc
15	Pumps	Pump B Conc.	25
23	Pumps	Pump B Conc.	30
33	Pumps	Pump B Conc.	52
40	Pumps	Pump B Conc.	52
41	Pumps	Pump B Conc.	25
45	Pumps	Pump B Conc.	25
50	Controller	Stop	

1.3 样品前处理

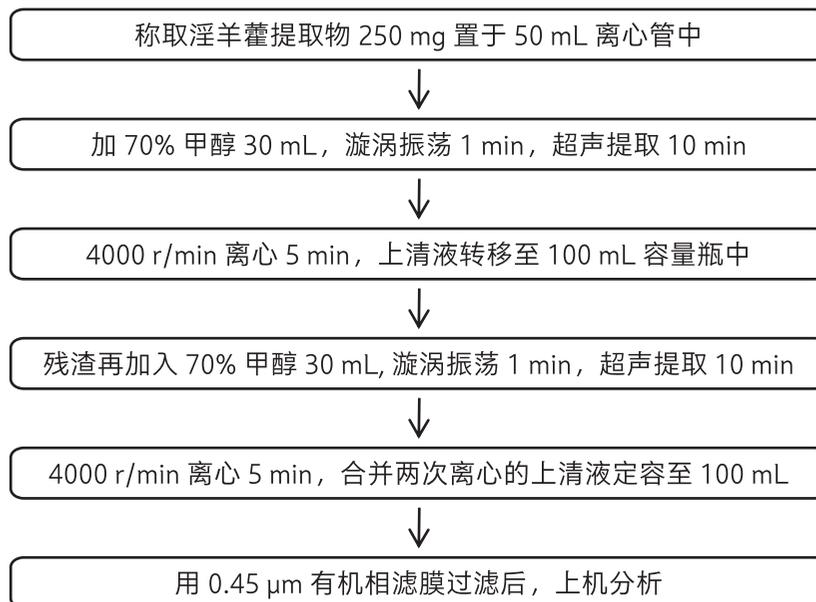


图 1 样品前处理流程图

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

各化合物的标准色谱图如图 2 所示。

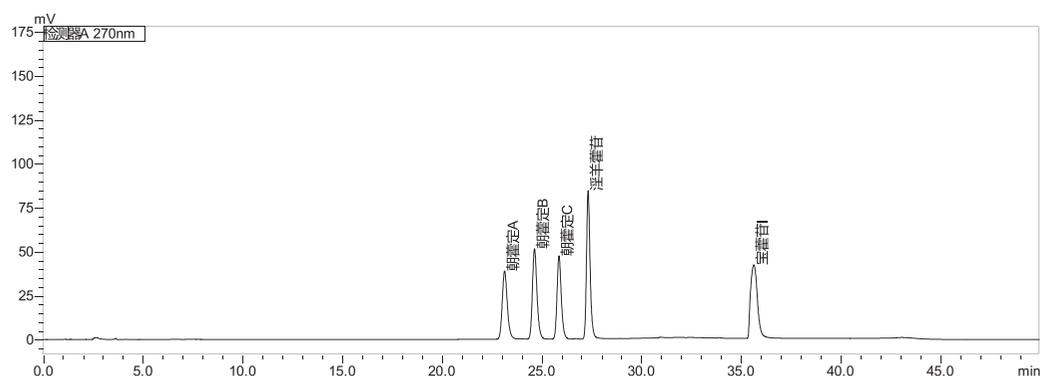


图 2 混合标准溶液色谱图 (20 mg/L)

2.2 线性

以70%甲醇为溶剂,分别配制成浓度为0.5、5.0、10、20、50、100、200 mg/L的系列混合标准工作溶液。按1.2分析条件进行测定,使用外标法定量。以峰面积为纵坐标,对应系列混合标准工作溶液浓度为横坐标,绘制校准曲线。校准曲线线性关系良好,相关系数 r 均大于0.999。以线性最低点0.5 mg/L标准溶液的色谱峰信噪比计算出仪器检测限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)。结果见表2。

表2 5种化合物线性、方法检出限及定量限结果

No.	化合物名称	线性范围 (mg/L)	相关系数 (r)	准确度 (%)	检测限 (g/kg)	定量限 (g/kg)
1	朝藿定 A	0.5~ 200	0.9996	89.3-107.6	0.005	0.014
2	朝藿定 B	0.5~ 200	0.9996	89.5-105.7	0.004	0.011
3	朝藿定 C	0.5~ 200	0.9996	89.4-105.8	0.004	0.012
4	淫羊藿苷	0.5~ 200	0.9996	88.9-106.6	0.002	0.007
5	宝藿苷I	0.5~ 200	0.9996	89.9-104.8	0.003	0.008

2.3 精密度

分别取0.5、20、200 mg/L的混合标准工作溶液连续测定6次,考察仪器的精密度。结果显示,5种化合物的保留时间相对标准偏差RSD%在0.025~0.150%;峰面积的相对标准偏差RSD%在0.020%~0.995%之间,仪器精密度良好。结果见表3。

表3 精密度检测结果 ($n=6$)

No.	化合物名称	RSD% (0.5 mg/L)		RSD% (20 mg/L)		RSD% (200 mg/L)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	朝藿定 A	0.074	0.993	0.038	0.038	0.147	0.189
2	朝藿定 B	0.057	0.473	0.035	0.021	0.122	0.065
3	朝藿定 C	0.049	0.819	0.033	0.020	0.106	0.077
4	淫羊藿苷	0.031	0.574	0.026	0.046	0.075	0.085
5	宝藿苷I	0.073	0.909	0.059	0.119	0.050	0.060

2.4 加标回收率

采用1.2项下分析方法测定市售淫羊藿提取物,样品色谱图见图3。在该样品中分别进行5种化合物的低、中、高浓度水平加标实验,每组加标平行三份;各化合物的回收率范围在83.5%~97.0%之间,结果见表4。

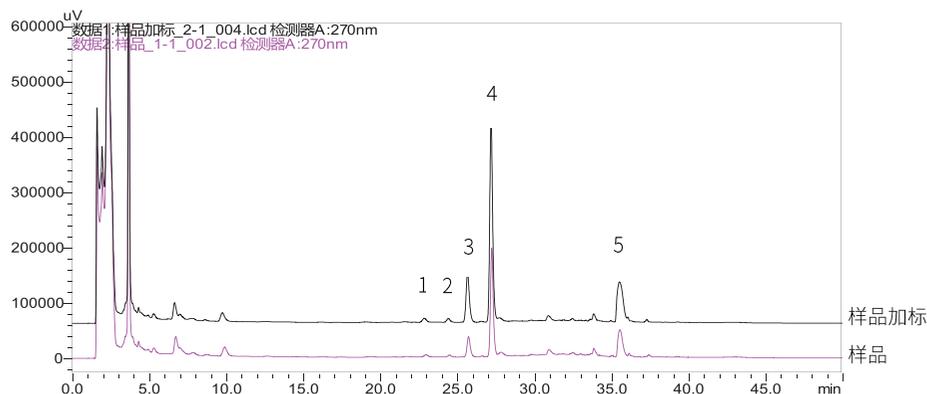


图3 样品与样品加标色谱图 (1.朝藿定 A; 2.朝藿定 B; 3.朝藿定 C; 4.淫羊藿苷; 5.宝藿苷I)

表 4 各化合物加标回收率结果

No.	化合物	样品量 (g/kg)	低浓度		中浓度		高浓度	
			加标量 (g/kg)	回收率 (%)	加标量 (g/kg)	回收率 (%)	加标量 (g/kg)	回收率 (%)
1	朝藿定 A	0.908	0.4	89.8	0.8	89.8	1.2	85.1
2	朝藿定 B	0.576	0.28	92.3	0.56	95.6	0.84	91.0
3	朝藿定 C	6.530	5.2	87.1	10.4	89.3	15.6	84.4
4	淫羊藿苷	19.560	9.6	92.9	19.2	97.0	28.8	91.7
5	宝藿苷I	8.721	4	85.9	8	88.1	12	83.5

■ 结论

本文参照国标 GB/T 43810-2024，使用岛津 Essentia LC-16 建立了测定饲料添加剂淫羊藿提取物中黄酮醇苷含量的分析方法。结果表明，各化合物在线性范围内线性良好。该方法灵敏度高、重复性好，可用于饲料添加剂淫羊藿提取物中黄酮醇苷含量的检测。

岛津应用云

