

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×

饲料中香芹酚和百里香酚的测定

Determination of carvacrol and thymol in feeds

(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。

本文件由中华人民共和国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：

本文件主要起草人：

饲料中香芹酚和百里香酚的测定

1 范围

本文件规定了饲料中香芹酚和百里香酚含量的气相色谱和高效液相色谱测定方法。

本文件适用于饲料添加剂、添加剂预混合饲料、浓缩饲料、配合饲料、精料补充料中香芹酚和百里香酚的测定。

本文件第一法规定了饲料添加剂、添加剂预混合饲料、浓缩饲料、配合饲料、精料补充料中香芹酚和百里香酚的气相色谱-氢火焰离子化检测器（GC-FID）测定方法，香芹酚和百里香酚的检出限为2.0 mg/kg，定量限为5.0 mg/kg。

本文件第二法规定了饲料添加剂、添加剂预混合饲料、浓缩饲料、配合饲料和精料补充料中香芹酚和百里香酚的高效液相色谱测定方法，其中使用紫外检测器香芹酚和百里香酚的检出限为2.0 mg/kg，定量限为5.0 mg/kg；使用荧光检测器的检出限为0.02 mg/kg，定量限为0.05 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 第一法 气相色谱法（仲裁法）

4.1 原理

试样中香芹酚和百里香酚经乙醇提取，经N-丙基乙二胺（PSA）、中性氧化铝和活性炭的混合固相吸附剂净化，使用带氢火焰离子化检测器（FID）的气相色谱仪分离、测定，用外标法进行定量分析。

4.2 试剂或材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 无水乙醇。

4.2.3 固相吸附剂：N-丙基乙二胺PSA（40 μm）、活性炭（120 目~400 目）与中性氧化铝（100 目~200 目）按1：1：0.5比例混合均匀。

4.2.4 香芹酚标准储备溶液（5.0 mg/mL）：称取香芹酚（CAS：499-75-2，纯度≥98.0%）标准品 500 mg（精确至 0.0001 g）于 100 mL 容量瓶中，用无水乙醇（4.2.2）溶解并定容至刻度。于 2℃~8℃ 保存，有效期为 3 个月。

4.2.5 百里香酚标准储备溶液（5.0 mg/mL）：称取百里香酚（CAS：89-83-8，纯度≥99%）标准品 500 mg（精确至 0.0001 g）于 100 mL 容量瓶中，用无水乙醇（4.2.2）溶解并定容至刻度。于 2℃~8℃ 保存，有效期为 3 个月。

4.2.6 标准中间溶液 I（500 μg/mL）：准确移取香芹酚标准储备溶液（4.2.4）10 mL 和百里香酚标准储备溶液（4.2.5）10 mL 于 100 mL 容量瓶中，用无水乙醇（4.2.2）定容。于 2℃~8℃ 保存，有效期为 1 个月。

4.2.7 标准系列工作溶液 I：准确移取适量标准中间溶液 I（4.2.6）于 50 mL 容量瓶中，用无水乙醇（4.2.2）稀释定容，配制成浓度分别为 0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、50.0 μg/mL、100 μg/mL 的标准系列工作溶液。临用现配。

4.2.8 滤膜：0.45 μm，有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 气相色谱仪：配备氢火焰离子（FID）检测器。

4.3.2 分析天平：感量 0.0001 g。

4.3.3 超声波清洗机。

4.3.4 离心机：转速不低于 10000 r/min。

4.3.5 涡旋振荡器。

4.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶中，避光保存，备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做两份试样。称取 5 g 试样（饲料添加剂试样 1 g），精确至 0.0001 g，置于 50 mL 聚丙烯离心管中。加入约 2.5 mL 水将试样浸湿，再加入 20 mL 无水乙醇（4.2.2），振荡混匀后于超声波清洗机（4.3.3）中超声提取 20 min，将试样取出，冷却至室温。10000 r/min 离心 5 min，收集上清液置于 50 mL 容量瓶中。残渣用 20 mL 无水乙醇（4.2.2）重复提取一次，合并 2 次提取液，用无水乙醇（4.2.2）定容至刻度，充分混匀。

4.5.2 净化

称取约 250 mg 固相吸附剂（4.2.3）置于 10 mL 离心管中，加入 2 mL 试样提取溶液（4.5.1），涡旋混匀 5 min，静置沉淀，上层清液用 0.45 μm 有机滤膜（4.2.8）过滤后上机检测。

4.5.3 气相色谱参考条件

毛细管色谱柱：HP-INNOWax（聚乙二醇）柱，长 30 m，内径 0.32 mm，膜厚 0.25 μm，或性能相当者。

检测器及温度：FID检测器，温度：260 ℃。

进样口温度：240 ℃。

柱温：初始温度 100 ℃，保持 2 min，以 10 ℃/min 的速率升温至 240 ℃，保持 5 min。

进样量：1.0 μL。

不分流。

载气：氮气（N₂）。

载气流速：1.5 mL/min。

尾吹气流速：25 mL/min。

氢气流速：40 mL/min。

空气流速：400 mL/min。

4.5.4 测定

4.5.4.1 标准系列工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列工作溶液（4.2.7）和试样溶液（4.5.2）上机测定。香芹酚和百里香酚标准溶液的气相色谱图参见附录A.1。

4.5.4.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中香芹酚和百里香酚保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中香芹酚和百里香酚的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.4.3 定量

以香芹酚或百里香酚的浓度为横坐标，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。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用无水乙醇（4.2.2）溶液稀释后，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%。

4.6 试验数据处理

试样中香芹酚或百里香酚的含量以质量分数 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 ——从标准曲线查得的试样溶液香芹酚或百里香酚的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

n ——稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）。

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

式中：

A_i ——试样溶液中香芹酚或百里香酚色谱峰面积；

A_{si} ——标准溶液中香芹酚或百里香酚的峰面积；

ρ_{si} ——标准溶液中香芹酚或百里香酚的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（ mL ）；

n ——稀释倍数；

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。

4.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定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 第二法 液相色谱法

5.1 原理

试样中的香芹酚和百里香酚用乙醇提取，经N-丙基乙二胺（PSA）、中性氧化铝和活性炭的混合固相吸附剂净化，以带紫外检测器（UV）或荧光检测器（FLD）的液相色谱仪进行分离、测定，用外标法进行定量分析。

5.2 试剂或材料

5.2.1 其他试剂与材料同4.2.1~4.2.6。

5.2.2 混合标准中间溶液Ⅱ（ $5.0 \mu\text{g/mL}$ ）：准确移取标准中间溶液Ⅰ（4.2.6）1 mL于100 mL容量瓶中，用无水乙醇（4.2.2）定容。临用现配。

5.2.3 标准系列工作溶液Ⅱ：准确移取适量混合标准中间溶液Ⅱ（5.2.2）于100 mL容量瓶中，用无水乙醇（4.2.2）稀释定容，配制成浓度分别为 5.0 ng/mL 、 10.0 ng/mL 、 20.0 ng/mL 、 50.0 ng/mL 、 100 ng/mL 、 250 ng/mL 的标准系列工作溶液。临用现配。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱仪：配备紫外检测器（UV）或荧光检测器（FLD）。

5.3.2 其他仪器设备同4.3.2~4.3.5。

5.4 样品

同4.4。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

提取步骤同4.5.1。

5.5.2 净化

净化步骤同4.5.2。

5.5.3 液相色谱参考条件

色谱柱：Eclipse Plus C18柱，长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，或性能相当者。

柱温：30 ℃。

检测器：紫外检测器：275 nm（荧光检测器，激发波长：274 nm，发射波长：304 nm）。

流动相：乙腈+水（65+35，V/V）。

流速：1.0 mL/min。

进样量：10 μL。

5.5.4 测定

5.5.4.1 标准系列工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列工作溶液（5.2.3）和试样溶液（5.5.2）上机测定。香芹酚和百里香酚标准溶液的液相-紫外色谱图参见附录A.2，液相-荧光色谱图参见附录A.3。

5.5.4.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中香芹酚和百里香酚保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中香芹酚和百里香酚的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

5.5.4.3 定量

以香芹酚或百里香酚的浓度为横坐标，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。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用无水乙醇（4.2.1）溶液稀释后，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%。

5.6 试验数据处理

试样中香芹酚或百里香酚的含量以质量分数 w_i 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按式（3）计算；单点校准按式（4）计算：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times n \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液香芹酚或百里香酚的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

n ——稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V \times n \times 1000}{A_{si} \times m \times 1000} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

A_i ——试样溶液中香芹酚或百里香酚色谱峰面积；

A_{si} ——标准溶液中香芹酚或百里香酚的峰面积；

ρ_{si} ——标准溶液中香芹酚或百里香酚的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

n ——稀释倍数；

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

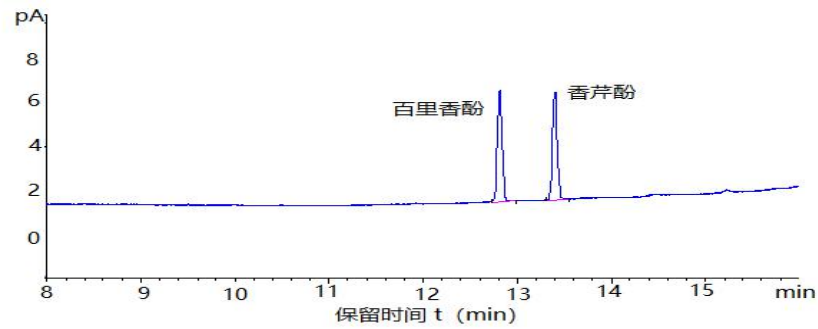
在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

附录 A

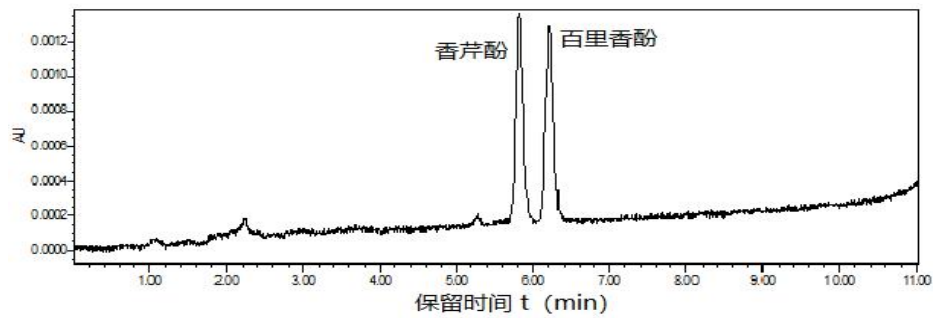
(资料性)

香芹酚和百里香酚标准溶液色谱图

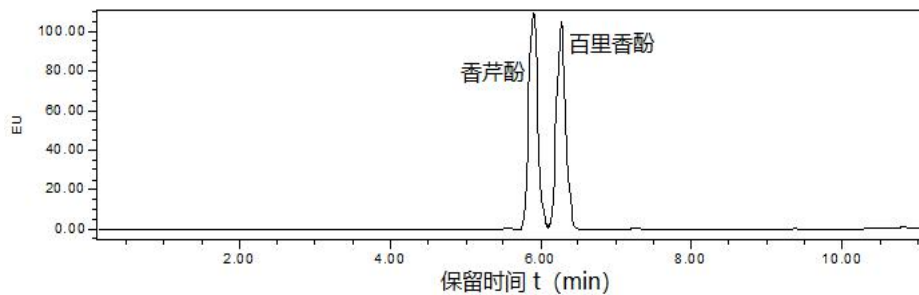
香芹酚和百里香酚标准溶液的气相色谱图见图 A.1，液相色谱-紫外检测器色谱图见图 A.2，液相色谱-荧光检测器色谱图见图 A.3。



图A.1 香芹酚和百里香酚标准溶液（1.0 μg/mL）气相色谱图



图A.2 香芹酚和百里香酚标准溶液（1.0 μg/mL）液相色谱-紫外检测器色谱图



图A.3 香芹酚和百里香酚标准溶液（1.0 μg/mL）液相色谱-荧光检测器色谱图

中华人民共和国农业行业标准

饲料中香芹酚和百里香酚的测定

编制说明

(公开征求意见稿)

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中香芹酚和百里香酚的测定》

编制说明

一、标准制定背景及任务来源

1.1 任务来源

本项目为推荐性农业行业标准项目，是农业部 2010 年农业行业标准制定和修订任务（农财发[2010]49 号），由中华人民共和国农业部畜牧业司提出，全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口，中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心（北京）]承担该项目的制定工作，任务编号为农财发[2010]49 号-178。

1.2 制定背景

牛至油（Oregano Oil）是从天然植物牛至（*Origanum vulgare L.*）中提取的一种淡黄色澄清油状液体，它在牛至全草中的大致含量为 1%~10%，其主要成分为酚类和烯萜类化合物，具有抗菌、抗氧化、增强机体免疫力等功效，是我国农业农村部批准使用的饲料药物添加剂之一。众多研究报道表明：牛至油具有较好的促进动物生长作用。牛至油作为新型的天然植物来源的抗菌物质，与传统化药抗生素相比，具有来源广泛、抗菌效果显著、不易产生耐药性、不良反应小、适用范围广等特点，是一种天然、环保、安全的绿色添加剂。

美国农业部的“植物化学和植物生态学”数据库里记载，牛至油中包含香芹酚、麝香草酚、月桂烯、P-聚伞花素、 γ -松油烯、石竹烯等约 50 种不同的化合物。因牛至的产地不同，牛至油的主要成分、种类及相对含量均具有一定的差异，但都具有香芹酚、百里香酚这两种酚类化合物，且这两种酚类物质为牛至油的主要组成，约占 80%左右。

香芹酚（Carvacrol，分子式为 $C_{10}H_{14}O$ ，分子量 152.2）和百里香酚（Thymol，分子式 $C_{10}H_{14}O$ ，分子量 152.2）是一对同分异构体，具有特殊的百里香和麝香草香气，天然存在于牛至等植物精油中。香芹酚和百里香酚可通过使细胞膜中的蛋白质变性而改变细胞膜的通透性，或与细胞膜中的磷脂反应，破坏了蛋白质的合成，使微生物细胞的生长受到抑制。又因香芹酚和百里香酚本身特有的香味能提高动物的进食欲望，增强动物肠胃蠕动，具有一定的促进生长、改进饲料效率以及控制禽、畜细菌性下痢等功能。

牛至油中起抗菌作用的有效成分主要为香芹酚和百里香酚这两种酚类化合物。

农业部公告第 168 号《饲料药物添加剂使用规范》中提到“饲料药物添加剂 牛至油预混剂”的有效成分为 5-甲基-2-异丙基苯酚和 2-甲基-5-异丙基苯酚，即香芹酚与百里香酚。其含量规格为每 1000 g 中含 5-甲基-2-异丙基苯酚和 2-甲基-5-异丙基苯酚 25 g。用于预防和治疗猪、鸡大肠杆菌、沙门氏菌所致的下痢，促进畜禽生长。牛至油预混剂的用法及用量为混饲，即在 1000 kg 饲料中添加本品。用于预防疾病，猪 500-700 g，鸡 450 g；用于治疗疾病，猪 1000-1300g，鸡 900 g；用于促进生长时，猪、鸡添加量为 50-500g。

随着饲料全面“禁抗”的开展，香芹酚和百里香酚促进畜禽生长的功能已不被提及，而其作为香味剂的功能被逐渐重视。香芹酚和百里香酚作为香味剂可改善饲料适口性，增强动物食欲，提高采食量，并能赋予饲料商品独特的风格，是饲料生产企业非常关注的一类饲料添加剂。天然植物型饲料添加剂随着饲料工业发展而壮大，现国内已经有多家专用于生产牛至油等天然提取物的饲料添加剂生产企业，对饲料工业的发展起到了明显的推动作用。然而，目前我国市场上销售的香芹酚和百里香酚饲料添加剂产品种类众多，行业中尚无规范的产品标准及检测方法。如何对市场上存在的此类饲料产品进行质量监控，成为研究关注的重点。因此，建立饲料中香芹酚和百里香酚的检测方法标准，对香芹酚、百里香酚进行定量检测，可有效的规范饲料产品市场，为合理使用牛至油类饲料产品提供有力的技术支撑。

二、主要工作过程

标准制定项目任务下达后，我单位成立了标准起草小组，负责标准的研制和编制起草工作。编制组成立后，由于前期未能获取到牛至油饲料产品，初期未能开展相关工作。2017 年开始，编制组进行了广泛的调查和深入研究工作，获取了牛至油饲料的样品后，开始启动该项标准的制定工作，具体工作过程如下：

2017 年 1 月~3 月：检测技术资料收集分析及仪器分析条件的优化。通过检索收集国内外关于饲料中牛至油的检测方法标准和文献资料，在现有研究基础上综合分析后，拟定样品前处理方法和仪器检测条件等初步实验方案。

2017 年 4 月~9 月：饲料中牛至油的仪器分析方法和样品前处理方法的确定。考虑到标准方法的精密性和适用性，本标准采用了气相色谱法进行饲料中牛至油的检测，通过优化选择合适的提取溶剂、提取方式以及净化方法等，建立了饲料中牛至油的检测方法。

2017 年 9 月~12 月：方法学评价和验证比对。对建立检测方的法进行方法学评价，包括实验室内的准确度（回收率）、精密度、线性范围等。按照检测方法农业行业标准的格式，起草完成的征求意见稿和编制说明。

2018 年 01 月~04 月：起草标准征求意见稿。通过发函征询意见，并请北京市

饲料监察所、湖北省饲料监测所和浙江省兽药饲料监察所等 3 家饲料质检机构进行方法验证，形成标准预审稿，提交标准审查。

2018 年 11 月 15 日：组织专家对标准进行审查，专家组提出修改意见，建议修改标准名称、修改适用范围，增加方法检出限等。

2018 年 11 月~2020 年 8 月：根据审查会专家们提出的意见，补充实验数据，对标准进行修改，并针对修改后的标准内容，委托北京市饲料监察所、辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心和中国农业科学院饲料研究所等 3 家单位重新对标准进行验证；同时，基于研究内容，在《饲料工业》上发表《气相色谱法同步测定饲料中的 4 种香味物质》和在《动物营养学报》上发表《液相色谱-荧光法结合基质分散固相萃取净化技术测定饲料中香芹酚和百里香酚的含量》等 2 篇研究论文。

2020 年 9 月-2021 年 6 月：严格按照 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》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定，对标准文本进行修改和完善，形成公开征求意见稿上报饲料工业标委会。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

3.1 标准编制原则

本标准按照 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》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定进行编制和起草。

3.2 主要技术内容确定的依据

编制过程中，查阅了国内国外有关文献资料，参考了其他行业部门制定的类似的标准方法，本着严格遵循科学依据，与国际水平接轨，并且准确、实用的原则，完成了检测方法标准的研究工作，起草了标准的征求意见稿和编制说明。

适用范围：本方法适用饲料中香芹酚和百里香酚含量的测定。

技术指标：牛至油的有效成分为香芹酚和百里香酚，且含量约占牛至油的 90% 左右。本标准第一法规定了饲料添加剂、添加剂预混合饲料、浓缩饲料、配合饲料中香芹酚和百里香酚的气相色谱-氢火焰离子化检测器（GC-FID）测定方法，香芹酚和百里香酚的检出限为 2.0 mg/kg，定量限为 5.0 mg/kg。本标准第二法规定了配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中香芹酚和百里香酚的液相色谱测定方法，其中使用紫外检测器香芹酚和百里香酚的检出限为 2.0 mg/kg，定量限为 5.0 mg/kg；使用荧光检测器的检出限为 0.02 mg/kg，定量限为 0.05 mg/kg。方法的回收率为：80%~110%，符合在一定浓度水平上的回收率范围；变异系数（CV）≤10%。

3.3 标准主要内容的确定

3.3.1 气相色谱方法的研究及实验条件的确定

3.3.1.1 标准溶液的配制

混合标准储备溶液：准确称取香芹酚和百里香酚标准品各 0.05 g（精确至 0.0001g），置于 100 mL 容量瓶中，用乙醇稀释并定容至刻度，制备香芹酚和百里香酚的混合标准储备溶液，此时香芹酚和百里香酚标准储备液的浓度为 0.5 mg/mL。稳定性实验（见表 1）表明，混合标准储备溶液应在 2℃~8℃ 之间避光储存，有效期 1 个月。

混合标准工作溶液：准确移取 100 μL、200 μL、500 μL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL、50 mL 香芹酚和百里香酚的混合标准储备溶液置于 50 mL 棕色容量瓶中，用乙醇定容至刻度，配制成香芹酚和百里香酚的线性范围为 1 μg/mL~500 μg/mL 的混合标准工作溶液。混合标准工作溶液应临用现配。

表 1 混合标准储备溶液 (0.5 mg/mL) 稳定性实验

日期	20180517	20180523	20180530	20180607	20180619	20180708
香芹酚	886	877	873	883	874	868
百里香酚	830	821	829	845	819	822

3.3.1.2 色谱条件的建立

3.3.1.2.1 色谱柱的选择

通过检索收集国内外关于牛至油中香芹酚和百里香酚的检测方法标准和文献资料，标准编制组发现牛至油的检测方法中以气相色谱法应用最为广泛。由于牛至油的主要成分香芹酚和百里香酚为弱极性化合物，沸点为 232℃~238℃。因此我们选择使用中等极性的毛细管色谱柱对其进行分离检测。

在现有研究基础上，标准编制组选择了 2 种不同的中等极性柱对香芹酚和百里香酚进行分离分析。实验中的载气流量及升温程序等条件参考了董茂锋、窦茂鑫等人撰写的多篇相关文献，在较优色谱条件的基础上得到的结果见表 2。

表 2 香芹酚和百里香酚在不同色谱柱上的分离度

序号	色谱柱类型	色谱柱型号	分离度 R	保留时间 (min)
1	中等极性	Agilent DB-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm; 美国 Agilent 公司)	3.33	15.8-16.1
2	中等极性	Agilent innowax (30 m×0.32 mm×0.25 μm; 美国 Agilent 公司)	5.70	12.7-13.0

通过表 2 中对相邻两色谱峰间的分离度、保留时间与色谱峰峰型等参数进行比较，实验发现使用 Agilent innowax 毛细管色谱柱的分离效果最佳，分析时间较短。而 Agilent DB-5 毛细管色谱柱也可达到香芹酚和百里香酚的基线分离，但峰型较差。

因此，我们选择了 Agilent innowax 毛细管色谱柱作为固定相，进一步研究升温程序对分离效果的影响。

3.3.1.2.2 气相升温程序的确定

气相色谱技术主要是利用物质的沸点、极性及对固定相吸附性质的差异来实现混合物的分离。由于样品中各组分的沸点、极性或吸附性能不同，每种组分都在流动相和固定相之间进行反复多次的分配或吸附/解吸，在载气中浓度大的组分先流出色谱柱，而在固定相中分配浓度大的组分后流出，从而达到了分离的目的。由此可见，气相分离主要受目标物的汽化难易程度和分子对固定相的吸附影响。因此，气相升温程序是我们考察的另一个主要参数。

表3 升温程序对色谱分离的影响

色谱柱型号	升温程序	R (香芹酚、百里香酚) 分离度	保留时间 (min)
Agilent DB-5 (30 m×0.25 mm×0.25μm)	60 °C, 以 10 °C/min 升至 140 °C, 以 4 °C/min 升至 200 °C, 保持 2 min	4.33	15.8-16.1
	100 °C, 保持 2 min, 以 10 °C/min 温 至 240 °C, 保持 5 min	0.98	12.3-12.4
Agilent innowax (30 m×0.32 mm×0.25 μm)	60 °C, 以 10 °C/min 升温至 140 °C, 以 4 °C 升至 200 °C, 保持 2 min	5.48	14.8-15.1
	100 °C, 保持 2 min, 以 10 °C/min 温 至 240 °C, 保持 5 min	5.70	12.7-13.0

由表 3 数据分析，当使用 Agilent DB-5 毛细管柱时，升温程序对目标物的分离度影响较大，使用简化的升温程序无法将目标物分离；而使用 innowax 毛细管柱时，升温程序对分离度影响并不显著。因此，综合分离度、保留时间和色谱峰峰型等因素，实验最终选择以 Agilent innowax (30 m×0.32 mm×0.25 μm) 为固定相，升温程序为 100 °C，保持 2 min，以 10 °C/min 温至 240 °C，保持 3 min。

3.3.1.2.3 流速的选择

由于载气流速对色谱峰的保留时间和峰型有较大影响。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，但色谱峰峰型将变得更好。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。同时载气流速过低时，色谱峰峰型会变差，色谱峰展宽，一定程度上造成分离度降低。

因此，我们对流速进行优化，研究 0.8 mL/min、1.0 mL/min、1.2 mL/min、1.5 mL/min 的条件下香芹酚和百里香酚的色谱结果，结果见表 4。

表 4 载气流速对色谱分离的影响

色谱柱型号	流速 (mL/min)	分离度	保留时间 (min)
Agilent innowax (30 m×0.32 mm× 0.25 μm)	0.8	5.72	15.0
	1.0	5.97	14.2
	1.2	5.69	13.7
	1.5	5.70	13.0

实验发现，载气流速对分离度、保留时间的影响较小，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 1.5 mL/min。

3.3.1.3 仪器检出限的确定

在较优的色谱条件下，对不同浓度梯度的香芹酚和百里香酚的混标溶液进行检测，确定最优色谱条件下，仪器的定量限与检出限值。具体试验步骤为：取一定体积的混合标准中间溶液（50 μg/mL）逐级稀释，使其浓度分别为 0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL，气相色谱进样。香芹酚及百里香酚标准品气相色谱图（C=1.0 μg/mL）见图 A.1。其仪器检出限为 0.2 μg/mL，定量限为 0.5 μg/mL。

3.3.1.4 样品前处理方法的确定

研究表明，香芹酚和百里香酚具有较好的热稳定性，80 °C 以上加热处理，饲料、制剂、产品中有效成分损失仅为 0.79%。香芹酚和百里香酚极性较低，极易溶于乙醚、乙酸乙酯、正己烷等弱极性有机溶剂中。同时，一般预混剂产品中香芹酚和百里香酚的含量很高，基质干扰较少，无需过多净化处理。针对这些产品特性，编制组认为，对于香芹酚和百里香酚产品，可使用有机溶剂对样品进行直接提取或超声提取，再将提取溶液稀释至一定体积后直接进样，以此来减少样品处理过程对香芹酚和百里香酚带来的损失，提高回收率。

实验通过基质添加，检测回收率的方法，考察了不同**提取溶剂、提取方式、提取时间、提取温度**对香芹酚和百里香酚提取效率的影响，从而优化出最佳前处理条件。加标样品的制备：取样品基质 5.0 g，加入到 50 mL 离心管中。在基质中添加加入 5.0 mg/mL 混标溶液 0.1 mL，涡旋混合后放置在通风橱内过夜。

3.3.1.4.1 提取溶剂的影响

合适的提取溶剂决定了对香芹酚和百里香酚的提取效果，试验首先考察了 7 种常规有机溶剂的提取效果，通过加入 50 mL 提取溶剂，超声提取，比较石油醚、正己烷、丙酮、乙醚、乙酸乙酯、乙醇和乙腈对不同饲料样品中香芹酚和百里香酚的提取效率，结果见表 5-表 7。

表 5 不同提取溶剂对香芹酚和百里香酚回收率的影响（样品基质：添加剂预混合饲料）

提取溶剂	化合物	标示量 (%)	峰面积	测量值 (mg/g)	测量值/标示量 (%)
乙醇	香芹酚	10	678.10	9.57	97.65
	百里香酚		13.24	0.19	
乙腈	香芹酚	10	668.29	9.43	96.19
	百里香酚		12.75	0.18	
乙醚	香芹酚	10	681.19	9.62	98.11
	百里香酚		13.40	0.19	
丙酮	香芹酚	10	672.34	9.49	96.85
	百里香酚		13.38	0.19	
乙酸乙酯	香芹酚	10	711.07	10.04	102.41
	百里香酚		14.02	0.20	
石油醚	香芹酚	10	638.64	9.02	90.82
	百里香酚		4.54	0.07	
正己烷	香芹酚	10	681.93	9.63	98.24
	百里香酚		13.58	0.20	

表 6 不同提取溶剂对香芹酚和百里香酚回收率的影响 (样品基质: 配合饲料)

提取溶剂	化合物	加标量 (mg/kg)	峰面积	测量值 (mg/g)	回收率 (%)
乙醇	香芹酚	200	9.17	195.9	97.93
	百里香酚	200	8.68	186.1	93.03
乙腈	香芹酚	200	8.18	174.7	87.36
	百里香酚	200	8.03	172.1	86.06
乙醚	香芹酚	200	9.18	196.1	98.04
	百里香酚	200	9.10	195.1	97.53
丙酮	香芹酚	200	9.12	194.8	97.40
	百里香酚	200	9.02	193.3	95.45
乙酸乙酯	香芹酚	200	9.35	199.7	101.14
	百里香酚	200	9.23	197.8	97.67
石油醚	香芹酚	200	7.36	157.2	78.60
	百里香酚	200	7.09	152.0	75.99
正己烷	香芹酚	200	8.67	185.2	92.59
	百里香酚	200	8.30	177.9	88.96

表 7 不同提取溶剂对香芹酚和百里香酚回收率的影响 (样品基质: 水溶性包覆牛至油预混剂)

提取溶剂	化合物	标示量 (%)	峰面积	测量值 (mg/g)	测量值/标示量 (%)
乙酸乙酯	香芹酚	7.5	194.34	4.10	54.67
	百里香酚	2.5	68.92	1.43	57.39
乙醇	香芹酚	7.5	200.31	4.22	56.27
	百里香酚	2.5	72.13	1.50	60.07
正己烷	香芹酚	7.5	163.34	3.44	45.87
	百里香酚	2.5	54.27	1.13	45.19
先加入 2.5mL 水润湿，再加入乙醇提取	香芹酚	7.5	337.88	7.12	94.93
	百里香酚	2.5	127.29	2.65	106.00

由表 5-表 7 可以看出，对于添加剂预混合饲料和配合饲料，乙酸乙酯对百里香酚和香芹酚的提取效果最好，当乙酸乙酯为提取溶剂时，香芹酚和百里香酚的含量明显高于其他 6 种试剂提取的含量；同时发现，7 种溶剂中石油醚的提取效率最低，对于配合饲料，石油醚提取的回收率低于 80%；而乙醇等 4 种溶剂的提取效率介于乙酸乙酯和石油醚之间，且 4 种溶剂的提取能力没有显著差别，对于添加剂预混合饲料和配合饲料，4 种溶剂的回收率均在 90%以上；而对于水溶性包被的饲料添加剂样品（如果胶包被），乙醇、乙酸乙酯、正己烷的提取效率均较低，测量值仅为标示量的 50%-60%，这严重影响了样品的检测结果。

通过实验我们发现，当使用少量的去离子水对样品进行润湿，然后使用乙醇作为提取溶剂，该方式对以果胶包被的水溶性样品具有很好的效果，其测量值/标示量大于 90%。因此，最终我们选择的提取溶剂为水和乙醇。具体为：首先加入 2.5 mL 的水润湿，再加入乙醇超声提取，然后将提取溶液取出，加入乙醇重复提取一次，合并提取溶剂，定容至 50 mL。

3.3.1.4.2 提取时间的影响

对于提取时间的考察，我们分别对 5 min、20min、40min、60min 等不同时间的提取效果进行了评价，结果见表 8。

表 8 不同提取时间对回收率的影响（配合饲料）

提取时间 (min)	化合物	加标量 (mg/kg)	峰面积	测量值 (mg/g)	回收率 (%)
5	香芹酚	200	7.87	169.17	84.59
	百里香酚	200	7.74	174.95	87.48
20	香芹酚	200	8.78	188.73	94.37
	百里香酚	200	8.32	188.07	94.03
40	香芹酚	200	8.88	190.89	95.44
	百里香酚	200	8.41	190.10	95.05
60	香芹酚	200	8.09	195.40	97.70
	百里香酚	200	8.62	194.85	97.42

在提取时间方面，香芹酚和百里香酚的含量随着提取时间增加而增加。当超声提取 5 min 时，提取两次的收率已经达到 85% 左右。随着时间的延长，香芹酚和百里香酚的回收率进一步增加，当 20 min 时，回收率已达到 94%。在 20 min 到 60 min 超声提取阶段，香芹酚和百里香酚的含量虽然继续增加，但增加幅度并不显著。同时随着时间的增加，样品中的杂质被提到溶液中，对检测造成了明显的干扰。综合考量基质干扰和提取效率，最终我们选择的提取时间为 20 min。

3.3.1.4.3 提取温度的影响

同样，在提取温度方面，香芹酚和百里香酚的含量随着温度增加而增加。但通过对室温和 60℃ 条件下的提取效果，我们发现 60℃ 条件下，香芹酚和百里香酚的增加幅度并不显著。同时考虑基质干扰和提取效率，最终我们选择的提取温度为室温。

表 9 不同提取温度对回收率的影响

提取温度	化合物名称	加标量 (mg/kg)	测量值 (mg/g)	回收率 (%)
室温	香芹酚	200	188.73	94.37
	百里香酚	200	188.07	94.03
60℃	香芹酚	200	193.90	96.95
	百里香酚	200	201.63	100.81

3.3.1.4.4 不同提取方式

实验以乙醇和乙醚为提取溶剂，考察了超声提取和索氏提取两种提取方式对饲料样品中香芹酚和百里香酚提取效率的影响。将超声提取时间设定为 20 min，重复提取 2 次，索氏提取时间设定为 40 min。将 2 种方式提取得到的溶液在 50 mL 容量瓶中定容后上机检测，结果见表 10。

表 10 不同提取方式对色谱分离的影响

提取方式	提取溶剂	添加量 (mg/kg)	色谱峰面积	测量值 (mg/kg)	回收率 (%)
超声提取	乙醚	200	9.18	196.1	98.04
		200	9.10	195.1	97.53
	乙醇	200	9.17	195.9	97.93
		200	8.68	186.1	93.03
索氏提取	乙醚	200	8.11	183.2	91.62
		200	8.47	173.8	86.92
	乙醇	200	8.02	179.8	89.89
		200	8.31	171.9	85.96

由表 10 可以看出，在提取时间相同的情况下（40 min），超声提取的效率更高，回收率较好。实验最终选取超声提取作为本标准的样品前处理方法。

3.3.1.4.5 净化方法的优化

为了防止色谱柱，降低样品基质对检测的干扰。实验尝试使用中性氧化铝、C18、PSA（乙二胺-N-丙基硅烷）、活性炭、二氧化硅、弗罗里硅土等 6 种常用吸附材料对提取溶液净化，考察其对香芹酚和百里香酚的吸附作用。2 mL 试样溶液中添加 100 mg 吸附材料，净化后香芹酚和百里香酚的回收率变化见图 1。

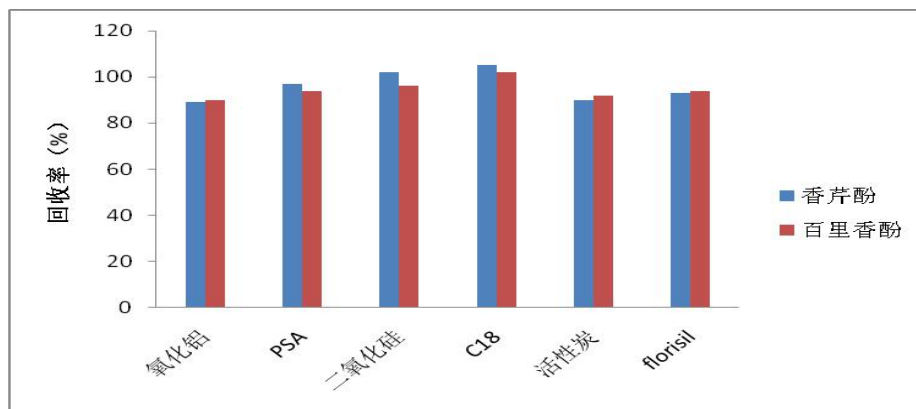


图 1 不同吸附材料对香芹酚和百里香酚的吸附影响

在香芹酚和百里香酚的标准溶液中加入 100 mg 吸附剂后，香芹酚和百里香酚的回收率都有不同程度的降低，但是 6 种吸附材料对两种目标物的吸附较少，回收率在 87.6%~104.9%之间。而在样品提取溶液中添加各吸附剂后，C18、二氧化硅、弗罗里硅土的添加没有显著变化，而活性炭、中性氧化铝和 PSA 的添加使得样品提取液的变得澄清，颜色明显变浅。因此，实验选定使用 100 mg PSA、100 mg 活性炭和 50 mg 中性氧化铝混合后作为吸附剂用于样品净化，其净化结果见图 2。

由图 2 可以看出，吸附剂可使提取溶液变浅，但提取色谱峰没有显著变化。因此，可选用 PSA+活性炭+中性氧化铝作为吸附剂对样品进行净化。

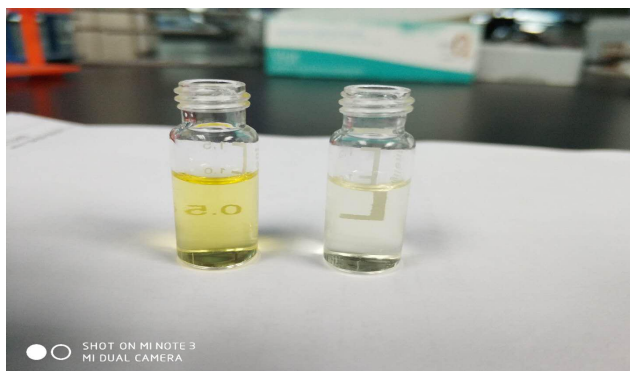


图 2 净化效果图

3.3.1.5 标准技术指标的论证

3.3.1.5.1 线性实验

配制香芹酚和百里香酚浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL} \sim 1 \text{ mg/mL}$ 标准溶液，以上述最优条件进行检测，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 11。

表 11 香芹酚和百里香酚对照溶液线性实验结果

化合物名称	标准曲线范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数 (R^2)	LOD	LOQ
百里香酚	0.5-1000	$Y=441.8X-29.05$	0.9990	0.2	0.5
香芹酚	0.5-1000	$Y=461.0X-29.35$	0.9990	0.2	0.5

从表 11 中可以看出：香芹酚和百里香酚标准溶液在 $0.5 \mu\text{g/mL} \sim 1 \text{ mg/mL}$ 的范围内线性关系良好。如果样品中香芹酚和百里香酚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。

3.3.1.5.2 方法定量限

在确定了色谱条件和样品前处理方法之后，我们对方法的检测极限进行确定。由上述实验可知，香芹酚和百里香酚的仪器定量限在 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 附近。因此，方法定量限为 5.0 mg/kg ，对其进行添加回收验证，其验证结果见表 12-表 15。

3.3.1.5.3 方法回收率与精密度实验

在确定样品预处理方法后，我们用仔猪预混料、奶牛浓缩饲料、配合饲料、精料补充料等不同样品类型作为空白基质，进行加标回收率实验，以考察方法的准确度和重现性。配制不同浓度的香芹酚和百里香酚的试样，每批次内的同一浓度做 5 平行实验，共进行 3 个浓度水平添加。

表 12 仔猪预混料添加香芹酚和百里香酚的回收率及变异系数

添加量 (mg/kg)	批次	香芹酚		百里香酚		实测值 (mg/kg)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
		峰面积	含量 (mg/kg)	峰面积	含量 (mg/kg)			
50	1	9.7417	209.41	8.9549	202.42	411.83	103.0	2.7
	2	8.9812	193.06	8.7391	197.54	390.60	97.6	
	3	9.0869	195.33	8.7290	197.31	392.65	98.2	
	4	9.0493	194.52	8.8221	199.41	393.94	98.5	
	5	8.8414	190.06	8.5062	192.27	382.33	95.6	
10	1	4.0893	87.90	3.8928	87.99	175.90	87.9	6.0
	2	4.0016	86.02	3.7620	85.04	171.06	85.5	
	3	4.2996	92.43	4.0858	92.35	184.78	92.4	
	4	4.5139	97.03	4.4945	101.59	198.62	99.3	
	5	4.2832	92.07	4.3494	98.31	190.39	95.2	
5	1	0.8863	19.05	0.8873	20.06	39.11	97.8	3.2
	2	0.9305	20.00	0.9549	21.58	41.59	104.0	
	3	0.8553	18.39	0.9075	20.51	38.90	97.2	
	4	0.9912	21.31	0.8520	19.26	40.57	101.4	
	5	0.9763	20.99	0.9092	20.55	41.54	103.8	

表 13 奶牛浓缩饲料添加香芹酚和百里香酚的回收率及变异系数

添加量 (mg/kg)	批次	香芹酚		百里香酚		实测值 (mg/kg)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
		峰面积	含量 (mg/kg)	峰面积	含量 (mg/kg)			
50	1	7.8015	167.70	8.4568	191.16	358.86	89.7	3.4
	2	7.7716	167.06	8.0347	181.62	348.67	87.2	
	3	8.1781	175.80	8.6408	195.32	371.11	92.8	
	4	8.6589	186.13	7.9949	180.72	366.85	91.7	
	5	8.8721	190.71	8.4559	191.14	381.85	95.5	
10	1	3.9311	84.50	3.7090	83.84	168.34	84.2	5.1
	2	3.8211	82.14	3.7620	85.04	167.18	83.6	
	3	4.3995	94.57	4.0858	92.35	186.93	93.5	
	4	3.9694	85.33	3.8511	87.05	172.38	86.2	
	5	4.0754	87.61	4.2492	96.05	183.65	91.8	
5	1	1.0571	22.72	0.9403	21.25	43.98	109.9	6.2
	2	0.9590	20.61	0.9144	20.67	41.28	103.2	
	3	0.9438	20.29	0.8240	18.62	38.91	97.3	
	4	0.7861	16.90	0.9137	20.65	37.55	93.9	
	5	0.9345	20.09	0.8602	19.44	39.53	98.8	

表 14 配合饲料中添加香芹酚和百里香酚的回收率及变异系数

添加量 (mg/kg)	批次	香芹酚		百里香酚		实测值 (mg/kg)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
		峰面积	含量 (mg/kg)	峰面积	含量 (mg/kg)			
50	1	9.5732	205.79	9.9577	9.1523	412.67	103.2	3.5
	2	9.0823	195.23	9.4721	8.7060	392.02	98.0	
	3	9.2081	197.94	9.9887	9.1808	405.46	101.4	
	4	9.0452	194.44	9.1274	8.3892	384.06	96.0	
	5	9.7488	209.56	10.0098	9.2002	417.52	104.4	
10	1	4.2708	91.81	4.1993	3.8597	179.05	89.5	1.3
	2	4.3646	93.82	4.1043	3.7723	179.09	89.5	
	3	4.2907	92.23	4.4265	4.0685	184.20	92.1	
	4	4.2417	91.18	4.4218	4.0642	183.05	91.5	
	5	4.1715	89.67	4.3321	3.9817	179.67	89.8	
5	1	0.8790	17.15	0.7751	17.52	34.66	86.7	2.0
	2	0.9032	17.62	0.7728	17.47	35.09	87.7	
	3	0.9098	17.75	0.7261	16.41	34.16	85.4	
	4	0.9199	17.94	0.7497	16.95	34.89	87.2	
	5	0.9453	18.44	0.7808	17.65	36.09	90.2	

表 15 精料补充料中添加香芹酚和百里香酚的回收率及变异系数

添加量 (mg/kg)	批次	香芹酚		百里香酚		实测值 (mg/kg)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
		峰面积	含量 (mg/kg)	峰面积	含量 (mg/kg)			
50	1	9.3497	200.98	9.1601	207.05	408.04	102.01	2.3
	2	8.8833	190.96	9.2897	209.98	400.94	100.24	
	3	8.7098	187.23	8.9927	203.27	390.50	97.62	
	4	9.2487	198.81	9.1832	207.58	406.39	101.60	
	5	9.4856	203.90	9.3824	212.08	415.98	104.00	
10	1	4.8019	103.22	4.5517	102.89	206.11	103.05	3.3
	2	4.8788	104.87	4.3494	98.31	203.19	101.59	
	3	4.5264	97.30	4.6881	105.97	203.27	101.64	
	4	4.5075	96.89	4.3835	99.09	195.98	97.99	
	5	4.4212	95.04	4.1976	94.88	189.92	94.96	
5	1	0.7454	16.02	0.7203	16.28	32.31	80.76	4.0
	2	0.7906	17.00	0.7419	16.77	33.76	84.41	
	3	0.8024	17.25	0.8315	18.80	36.04	90.11	
	4	0.7661	16.47	0.7752	17.52	33.99	84.98	
	5	0.7981	17.16	0.7168	16.20	33.36	83.39	

由表 12-表 15 可以看出，不同基质中香芹酚和百里香酚的回收率为：80%~110%，符合在一定浓度水平上的回收率范围；变异系数（CV%）≤10%。

3.3.2 液相色谱法的建立

相较于气相色谱，液相色谱仪在饲料企业的使用更为普及，为了拓宽标准的可操作性，降低饲料企业的检测成本，特制定饲料中香芹酚和百里香酚的液相色谱测定方法。

3.3.2.1 标准溶液的配制

准确移取 1 mL 的 0.5 mg/mL 混合标准溶液置于 100 mL 容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，则香芹酚和百里香酚浓度为 5.0 μg/mL。溶液现用现配。

准确移取 100 μL、200 μL、500 μL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10mL、20 mL 的混合标准中间溶液（5.0 μg/mL）置于 100 mL 棕色容量瓶中，无水乙醇定容至刻度，配制成香芹酚和百里香酚的浓度分别为 5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 的混合标准工作溶液。混合标准工作溶液应临用现配。

3.3.2.2 色谱条件的选择

3.3.2.2.1 紫外吸收波长的确定

香芹酚和百里香酚为同分异构体，仅苯环上酚羟基的取代位置不同。由于结构相似，香芹酚和百里香酚的紫外吸收光谱和荧光光谱特征基本一致。使用紫外检测器对香芹酚和百里香酚标准溶液（1 mg/mL）进行光谱扫描，扫描范围：210 nm~400 nm，结果如图 3。

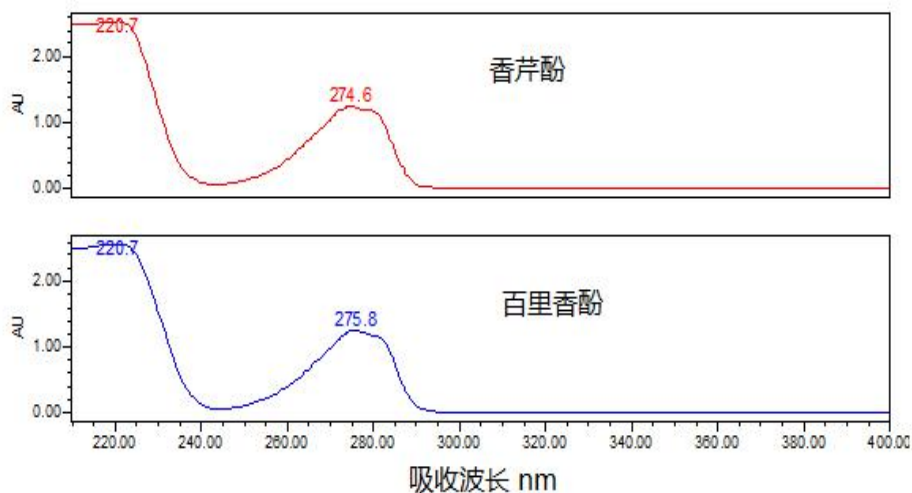


图 3 紫外检测器光谱扫描图

由图 3 可知，香芹酚和百里香酚的最大吸收波长为 220 nm 和 275 nm，当使用 220 nm 进行扫描时，发现溶剂峰很多，干扰较大，因此选择使用 275 nm 作为检测波长。

3.3.2.2.2 激发波长和发射波长的确定

使用荧光检测器对香芹酚标准溶液（1 mg/mL）进行激发光谱扫描，扫描范围：200 nm~300 nm，结果如图 4。

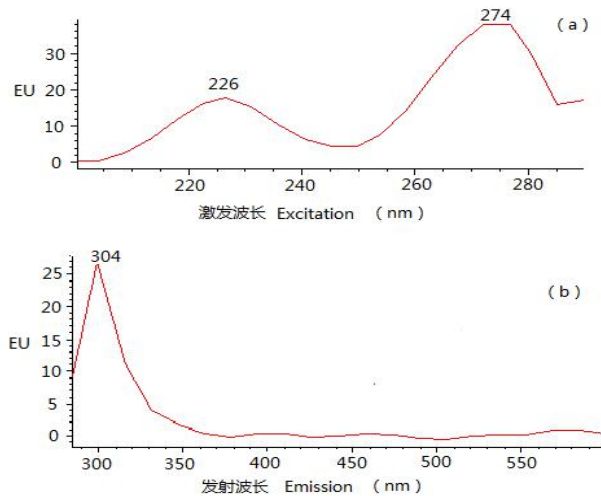


图 4 香芹酚标准溶液的激发 (a) 和发射 (b) 光谱

从图可以看出，当激发波长为 226 nm 和 274 nm，香芹酚的荧光信号较强。当使用 226 nm 作为激发波长时，液相色谱基线漂移程度较大，有明显的溶剂峰干扰，而使用 274 nm 作为激发波长时，基线漂移较小，且目标峰信号显著增强。固定激发波长为 274 nm 对发射波长进行扫描（扫描范围为 290 nm~600 nm），发现发射波长在 304 nm 处其荧光响应最强。因此确定荧光激发波长为 274 nm，发射波长为 304 nm。

3.3.2.2.3 流动相的确定

香芹酚和百里香酚易溶于醇类等有机试剂，不溶于水，因此选择流动相时优先考虑有机试剂，使用甲醇作为有机相时，由于甲醇在低波长有较大吸收，出现溶剂峰干扰，峰型较差且干扰目标峰，当有机相使用乙腈时，溶剂峰消失，因此有机相选择乙腈，在有机相和水相比例上，优先考虑较大的有机相比例，将乙腈的比例从 90% 逐渐降低，结果发现当乙腈和水的比例为 65:35 时，目标峰出峰时间和分离效果均达到要求，因此选定乙腈：水（65+35，V/V）作为流动相。

3.3.2.3 前处理条件的优化

同 3.3.1.4。

3.3.2.4 技术指标的论证

3.3.2.4.1 线性实验与检测极限

配置香芹酚和百里香酚浓度为 5 ng/mL~1 μg/mL、0.5 μg/mL~1000 μg/mL 标准溶液，以上述最优条件进行检测，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 16。

表 16 香芹酚和百里香酚对照溶液线性实验结果

使用仪器	化合物名称	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数 (R^2)	LOD	LOQ
HPLC-UV	百里香酚	0.5-1000	$y=5932.2x-229.8$	0.9998	0.2	0.5
	香芹酚	0.5-1000	$y=5886.4x-1251.2$	0.9992	0.2	0.5
HPLC-FLR	百里香酚	0.005-1.0	$y=10966x+33517$	0.9993	0.002	0.005
	香芹酚	0.005-1.0	$y=10619x+38311$	0.9999	0.002	0.005

从表 16 中可以看出：当使用紫外检测器进行测定时，香芹酚和百里香酚标准溶液在 $1 \mu\text{g/mL} \sim 1000 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好；当使用荧光检测器进行测定时，香芹酚和百里香酚标准溶液在 $5 \text{ ng/mL} \sim 1 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。如果样品中香芹酚和百里香酚浓度不在线性范围内，可以通过稀释对样品进行处理，再进行检测。

在确定了色谱条件和样品前处理方法之后，对方法的检测极限进行确定。由上述实验可知，当使用紫外检测器时，香芹酚和百里香酚的检出限为 2.0 mg/kg 、定量限在 5.0 mg/kg 。当使用荧光检测器时，香芹酚和百里香酚的检出限为 0.02 mg/kg 、定量限在 0.05 mg/kg 。选择不同种类饲料对其进行 3 个浓度水平的添加回收验证，其验证结果见表 17。

3.3.2.4.2 方法回收率与精密度实验

在确定样品预处理方法后，选用猪浓缩料、鸡配合料、蛋鸡预混合饲料作为空白基质，进行加标回收率实验，以考察方法准确度和重现性。配制不同浓度香芹酚和百里香酚的试样，每批次内的同一浓度做 5 平行实验，共进行 3 个浓度水平添加。

表 17 不同饲料中添加香芹酚、百里香酚的回收率及精密度

方法	项目	浓度 (mg/kg)	鸡配合饲料		猪浓缩饲料		蛋鸡复合预混料	
			批内回收率 \pm 相对标准偏差	批间变 异系数	批内回收率 \pm 相对标准偏差	批间变 异系数	批内回收率 \pm 相对标准偏差	批间变 异系数
荧光法	百里香酚	0.05	108.1 ± 3.4	5.4	101.8 ± 10.2	3.9	97.7 ± 5.6	3.8
		0.10	103.1 ± 4.9	3.6	102.1 ± 7.7	2.4	102.6 ± 3.2	4.2
		0.50	97.6 ± 5.2	3.7	95.8 ± 5.7	2.5	92.0 ± 4.9	2.8
	香芹酚	0.05	108.6 ± 3.8	2.2	101.7 ± 7.9	4.8	98.7 ± 6.1	4.2
		0.10	109.0 ± 5.5	5.8	100.0 ± 2.2	3.6	101.4 ± 3.8	2.4
		0.50	96.0 ± 4.7	3.0	90.5 ± 3.9	4.9	92.5 ± 2.8	1.8
紫外法	百里香酚	5	86.7 ± 3.8	4.7	81.3 ± 9.2	7.9	91.2 ± 8.4	6.8
		10	97.1 ± 8.0	6.2	97.4 ± 6.8	5.4	99.6 ± 8.9	5.2
		50	91.4 ± 6.2	5.1	93.6 ± 4.7	5.5	104.4 ± 5.9	4.8
	香芹酚	5	85.0 ± 4.3	6.5	83.3 ± 5.5	6.8	87.7 ± 8.1	5.5
		10	100.9 ± 3.9	3.8	94.9 ± 3.9	3.9	97.4 ± 5.0	3.4
		50	109.0 ± 9.6	4.1	108.1 ± 6.0	3.2	97.1 ± 3.8	3.0

由表 17 可以看出，不同基质中香芹酚和百里香酚的回收率为：80%~110%，符合在一定浓度水平上的回收率范围，且变异系数（CV） \leq 10%。

3.4 实际样品的检测

通过建立方法对市场上收购的 5 种样品进行检测，结果见表 18。

表 18 实际样品测定结果

样品名称	标示值 (%)	样品质量 (g)	化合物名称	测定值 (%)		
				GC-FID	LC-UV	LC-FLR
天然牛至油	8	1.0003	香芹酚	8.12	8.18	8.18
			百里香酚	0.25	0.26	0.26
牛至粉	5	1.0021	香芹酚	3.22	3.31	3.32
			百里香酚	0.05	0.05	0.05
配合饲料	5	1.0003	香芹酚	3.41	3.44	3.45
			百里香酚	0.53	0.50	0.51
天然牛至油 添加剂	10	1.0001	香芹酚	10.2	10.2	10.2
			百里香酚	0.24	0.24	0.24
牛至油预混 剂	10	1.0021	香芹酚	10.3	10.3	10.3
			百里香酚	0.25	0.25	0.25

由表 18 可以看出，对于不同的饲料样品，三种检测方法的测定值与标示值基本一致，该方法可以满足对实际样品的检测需求。

3.5 结论

使用该标准测定饲料中的香芹酚和百里香酚，具有检测时间短、前处理操作简便等特点，方法有良好的线性关系、准确性和精密度，可以满足对饲料中香芹酚和百里香酚含量的检测。

四、采用国际标准和国外标准的程度

无。

五、与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系

本标准的制定可为饲料质量安全的评价、相关质量标准指标的制订和贯彻执行提供直观的指导。

与有关的现行法律法规和强制性国家标准没有冲突和重复。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准的制定广泛征求意见，包括科研院所、检验机构、生产企业，根据反馈意见对标准的《征求意见稿》进行修改，无重大分歧意见。

七、标准作为强制性或推荐性国家标准的意见

该标准经制定后建议作为推荐性标准发布。

八、贯彻国家标准的要求和措施建议

为了贯彻实施本国家标准，建议相关职能部门指导和指定科研机构对相关的人员进行技术培训。

九、废止现行有关标准的建议

建议替代《饲料中香芹酚和百里香酚的测定 气相色谱法》(NY/T 3137-2017)。

十、其他应予说明的事项

无。

参考文献

- [1] Nutchana Sanla-Ead, Anuvat Jangchud, Vanee Chonhenchob, et al. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films [J]. *Packaging Technology and Science*, 2012, 25(1): 7-17.
- [2] TIIHONEN K, KETTUNEN H, BENTO M H L, et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota[J]. *British Poultry Science*, 2010, 51(3) : 381-392.
- [3] 宫玲玲, 李会荣. 气相色谱法同步测定饲料添加剂中百里香酚、香芹酚的研究[J]. *中国饲料*, 2014, 2(6): 38 - 40.
- [4] 窦茂鑫, 赵迪, 侯永清, 等. 饲料添加剂牛至油中香芹酚和百里香酚含量的测定[J]. *饲料工业*, 2013, 34(20): 12-14.
- [5] 窦茂鑫, 赵迪, 侯永清, 等. 饲料添加剂肉桂油中肉桂醛含量的测定[J]. *饲料工业*, 2013, 3: 71-72.
- [6] 董茂锋, 杨海锋, 白冰, 等. 气相色谱法测定饲料中香芹酚和百里香酚的含量[J]. *饲料工业*, 2015, 36(1):47-51.
- [7] 李会荣, 宫玲玲. 利用气相色谱法同步测定饲料香味剂中麝香草酚、丁香酚和香兰素的研究[J]. *中国饲料*, 2017(14): 36-38.

附件:

附录 A

香芹酚和百里香酚的色谱图

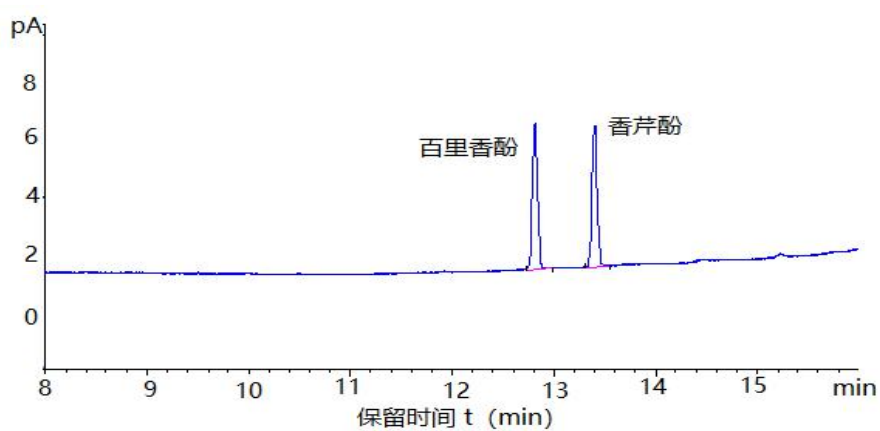


图 A.1 香芹酚及百里香酚标准品的气相色谱图 (C=1.0 $\mu\text{g/mL}$)

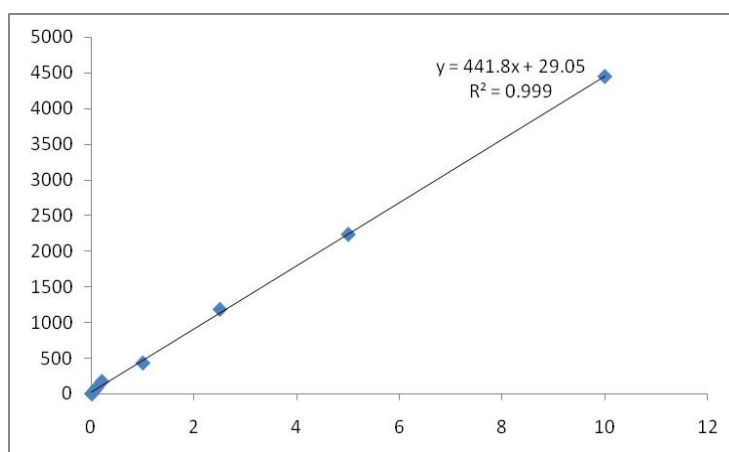


图 A.2 百里香酚的外标曲线

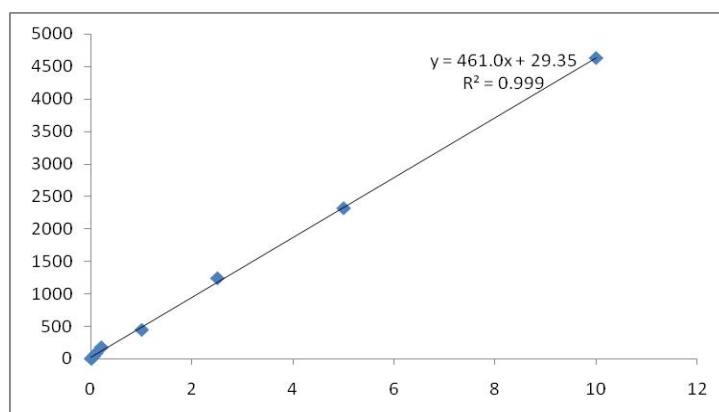


图 A.3 香芹酚的外标曲线

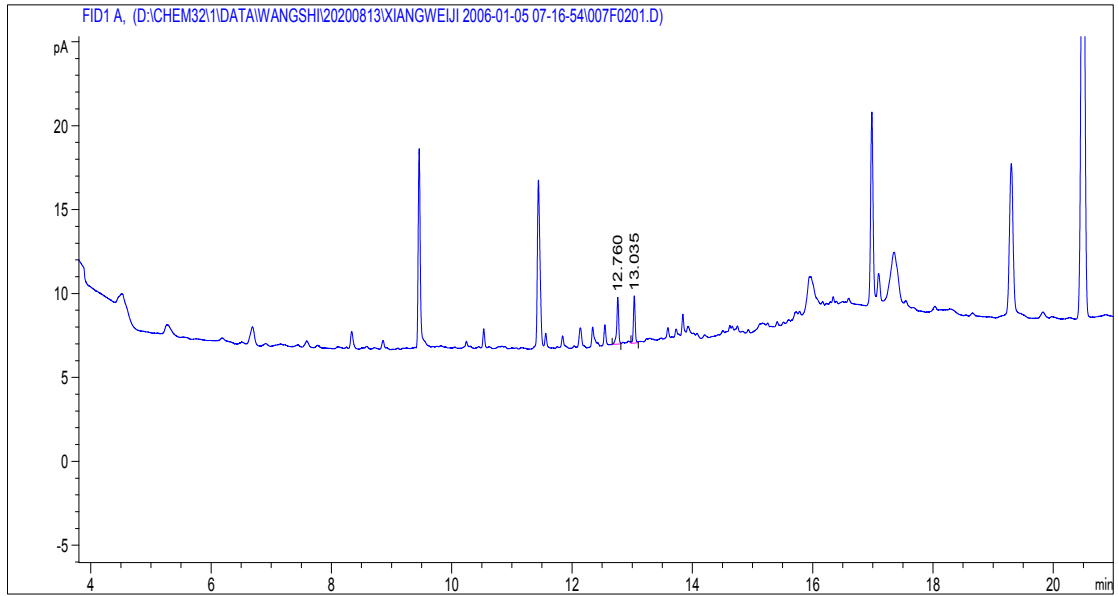


图 A.4 仔猪预混料添加香芹酚和百里香酚的气相色谱图 ($C=5.0 \text{ mg/kg}$)

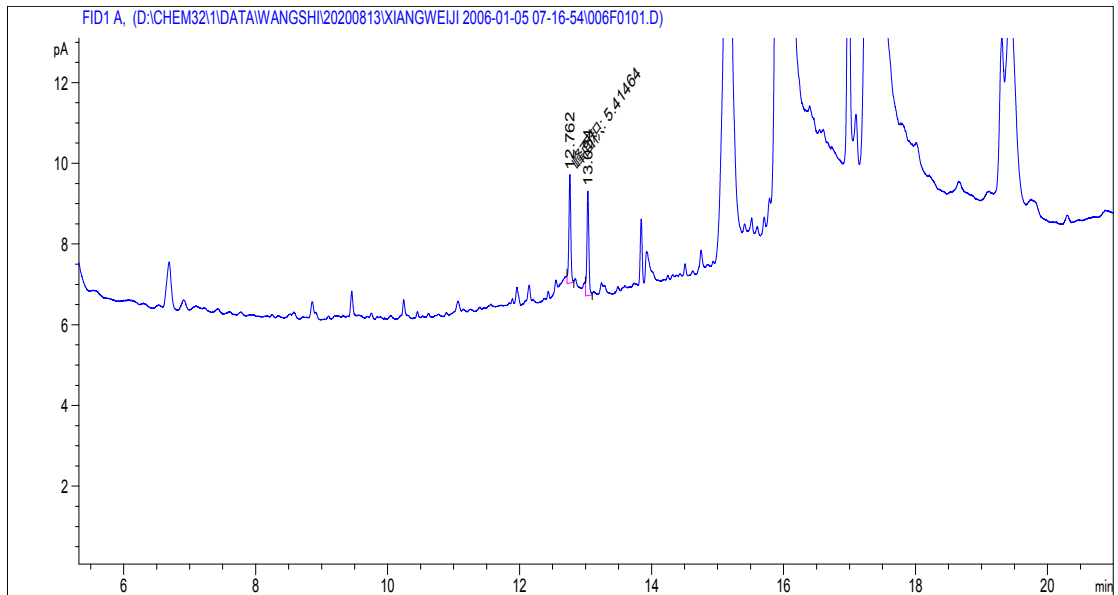


图 A.5 奶牛预混料添加香芹酚和百里香酚的气相色谱图 ($C=5.0 \text{ mg/kg}$)

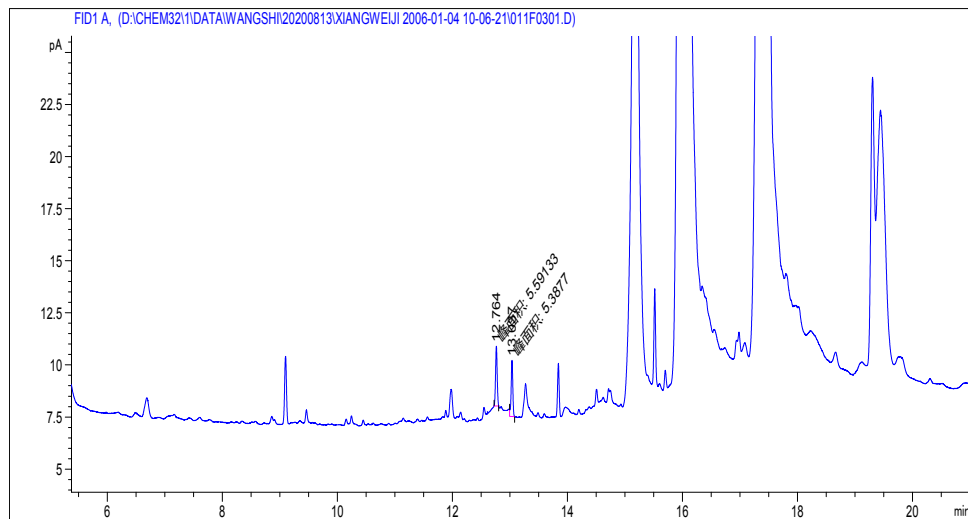


图 A.6 奶牛浓缩饲料添加香芹酚和百里香酚的气相色谱图 ($C=5.0 \text{ mg/kg}$)

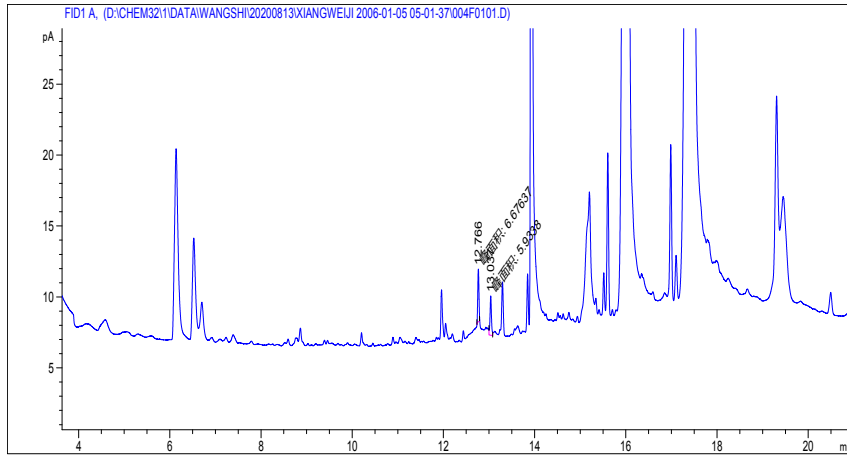


图 A.7 配合饲料中添加香芹酚和百里香酚的气相色谱图 (C=5.0 mg/kg)

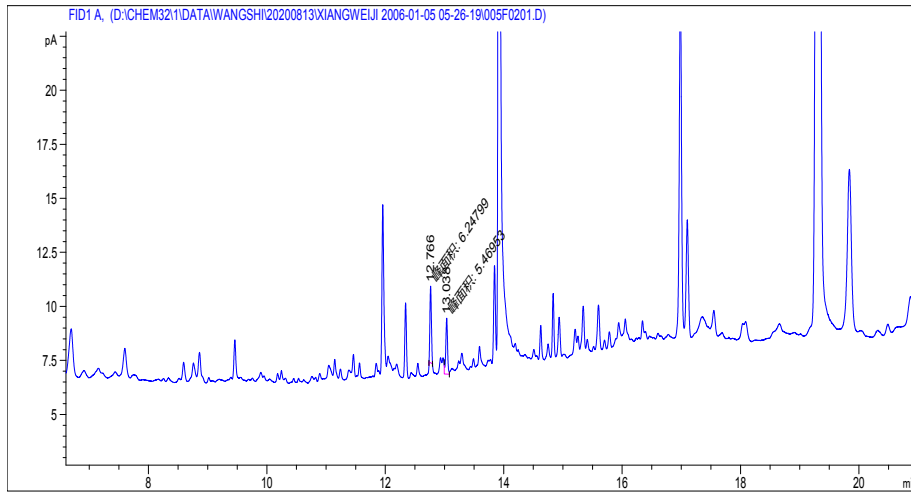


图 A.8 羊精料补充料中添加香芹酚和百里香酚的气相色谱图 (C=5.0 mg/kg)

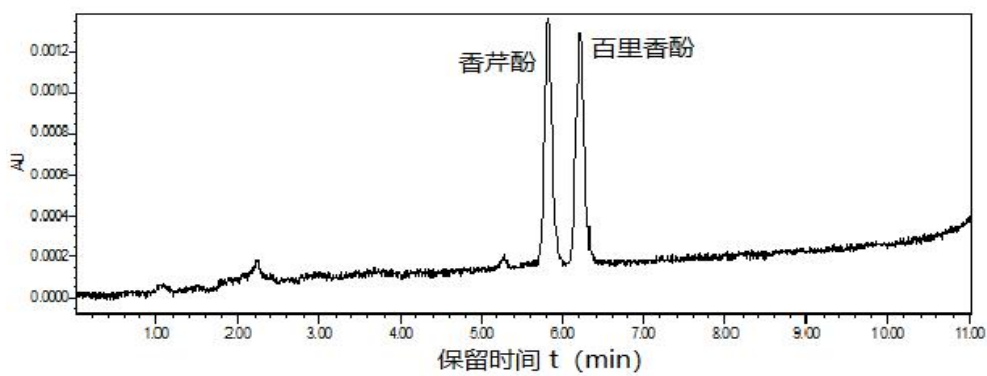


图 A.9 香芹酚和百里香酚的液相色谱-紫外检测器色谱图 ($C=1.0 \mu\text{g/mL}$)

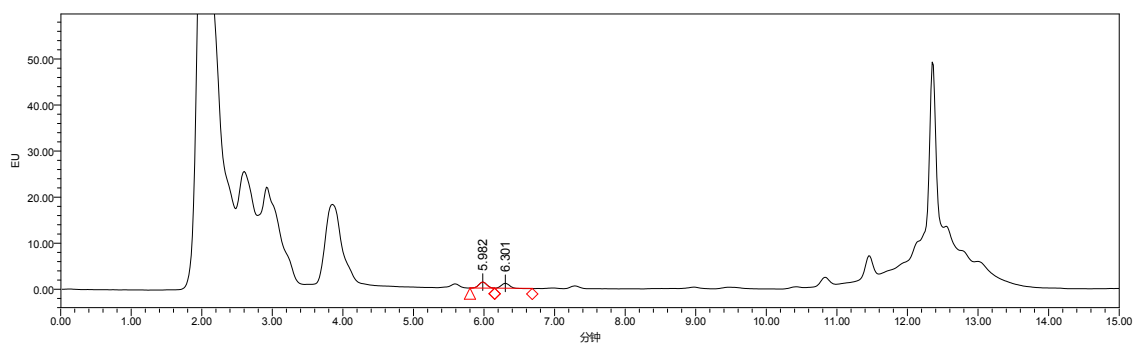


图 A.10 猪浓缩饲料中添加香芹酚和百里香酚的液相色谱-紫外检测器色谱图 ($C=0.05 \text{ mg/kg}$)

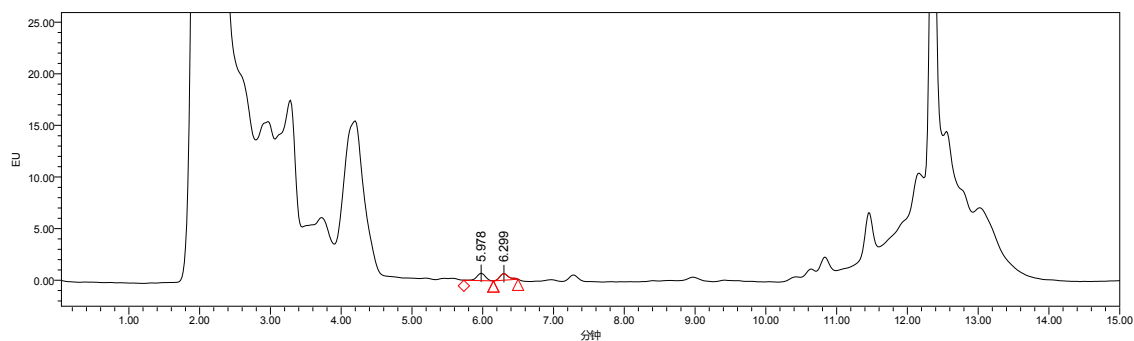


图 A.11 鸡配合饲料中添加香芹酚和百里香酚的液相色谱-紫外检测器色谱图 ($C=0.05 \text{ mg/kg}$)

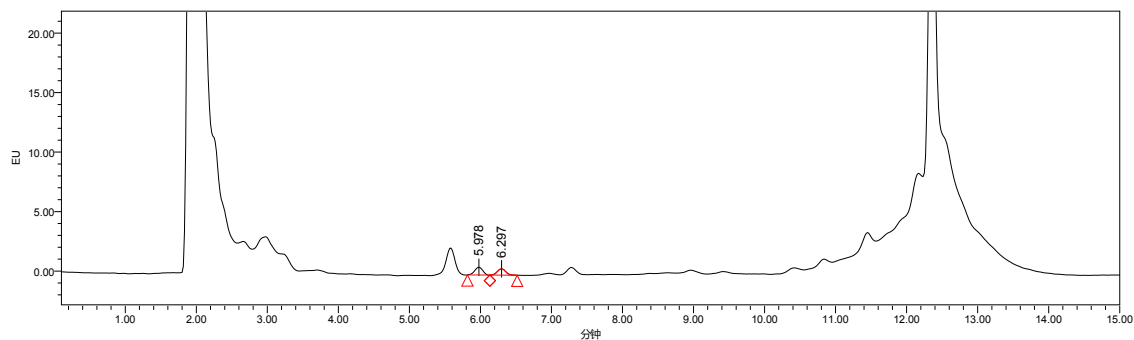


图 A.12 蛋鸡预混料中添加香芹酚和百里香酚的液相色谱-紫外检测器色谱图 ($C=0.05 \text{ mg/kg}$)

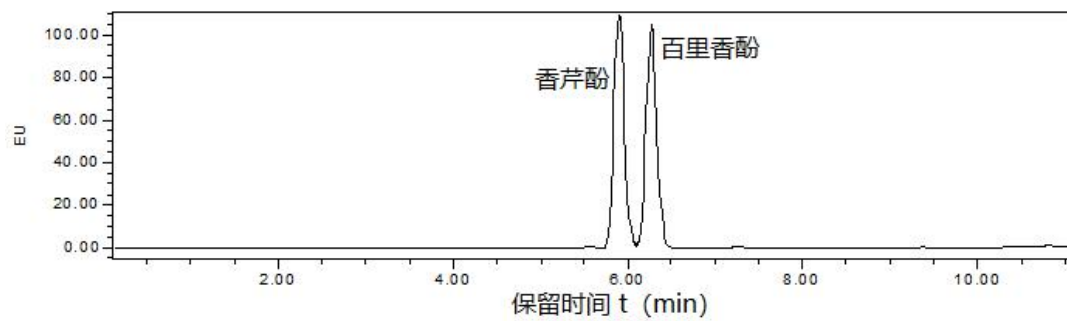


图 A.13 香芹酚和百里香酚的液相色谱-荧光检测器色谱图 ($C=1.0 \mu\text{g/mL}$)

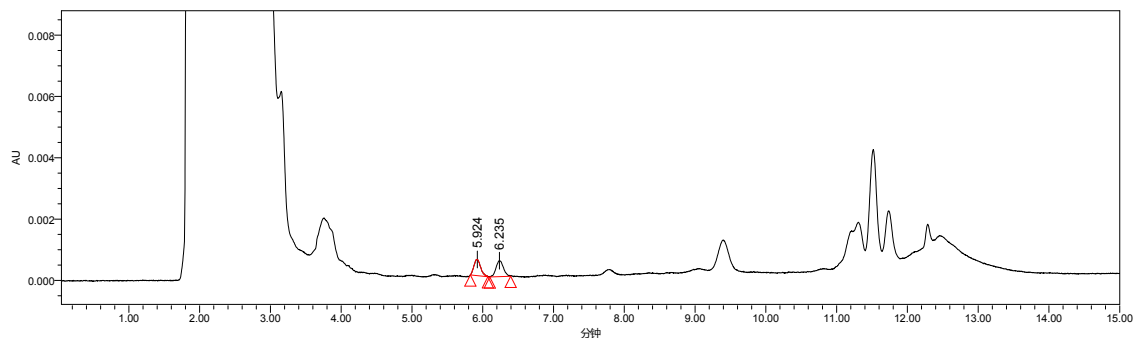


图 A.14 猪浓缩饲料中添加香芹酚和百里香酚的液相色谱-荧光检测器色谱图 ($C=5 \text{ mg/kg}$)

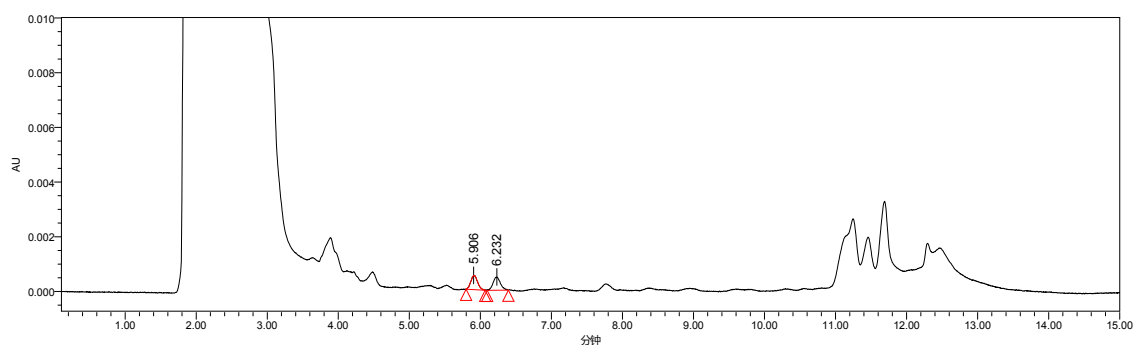


图 A.15 鸡配合饲料中添加香芹酚和百里香酚的液相色谱-荧光检测器色谱图 ($C=5 \text{ mg/kg}$)

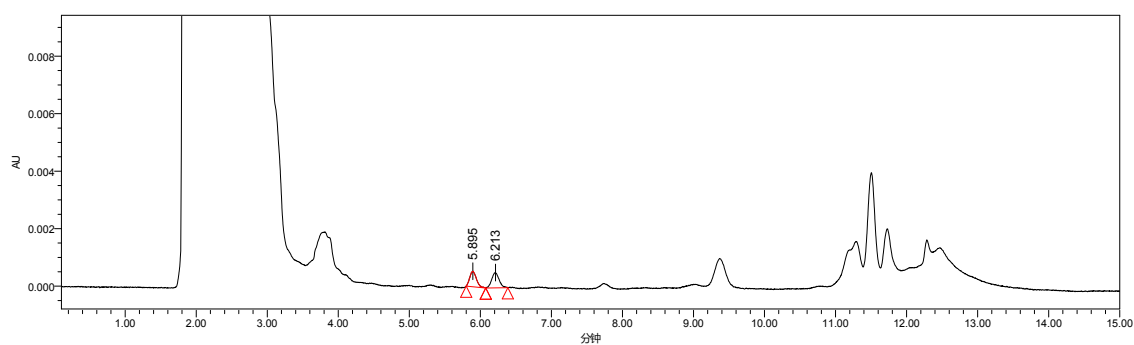


图 A.16 蛋鸡预混料中添加香芹酚和百里香酚的液相色谱-荧光检测器色谱图 ($C=5 \text{ mg/kg}$)