

中华人民共和国农业行业标准

饲料中姜黄素的测定

(公开征求意见稿)

编制说明

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)]

2024年07月

中华人民共和国农业行业标准

饲料中姜黄素的测定

编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

本标准制订任务来源于农业农村部农产品质量安全监管司[农质标函[2022]66号]（序号：243），项目编号为 NYB-22177，由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）]负责标准的起草标准，归口单位为全国饲料工业标准化技术委员会。

（二）制定背景

近年来，抗生素在畜牧业的滥用所引发的人体健康和生态环境方面的危害已引起社会广泛关注。为彻底治理畜牧业抗生素滥用的问题，2019年农业部公告第194号规定自2020年1月1日起，退出除中药外的所有促生长类药物饲料添加剂品种，兽药生产企业停止生产、进口兽药代理商停止进口相应兽药产品。因此，当前饲料行业迫切需要开发一些新的替代抗生素的产品，比如植物提取物、微生物制剂等。研究表明，植物提取物既能促进动物生长，又能提高动物免疫力，其作为新饲料添加剂，具有替代抗生素的潜力，有着广泛应用前景。

姜黄素是从姜科姜黄属植物姜黄（*curcuma longa linn*）的根茎中提取的一种天然的黄色酸性酚类混合物，是姜黄发挥药理作用的最主要的活性成分。姜黄中提取的姜黄素是混合物，由姜黄素（Curcumin，简称 Cur I）、去甲氧基姜黄素（Demethoxycurcumin，简称 Cur II）、双去甲氧基姜黄素（Bisdemethoxycurcumin，简称 Cur III）三种化合物构成。植物提取物中 Cur I 的含量约为 70%，Cur II 约为 10%-20%，而 Cur III 约为 10%。为区别起见，本文以总姜黄素指代这三种化合物的混合物。

姜黄素在动物饲养中的作用主要包括两方面：一是促进动物生长，二是提高动物免疫力。研究表明，在肉鸡日粮中添加 200 mg/kg 的姜黄素，可促进肉鸡食欲，增加采食量，使肉鸡全期增重提高 4.48%，料重比降低 7.39%，提高肉鸡整体

生长性能。大黄鱼饲料里面添加 0.04%的姜黄素，可在很大程度上提高鱼的生长速度，且当增加姜黄素的用量后，能够改善鱼类的皮肤颜色，有利于提升鱼的外观美感。从生理学功能上讲，姜黄素主要具有抗氧化、抑菌、抗炎和调节脂质代谢的功能，从而起到提高动物免疫力的作用。还有研究发现，姜黄素对猪病源抗体的效价影响上与抗菌药物喹烯酮相当，甚至有些显著高于喹烯酮的效果。

2014年7月，农业部公告第2131号批准姜黄素为新饲料添加剂，适用于淡水鱼类，在鱼配合饲料中的推荐添加量为200 mg/kg~400 mg/kg，最高限量为600 mg/kg。2019年农业部公告第123号又将姜黄素的适用范围扩大至肉仔鸡，在肉仔鸡配合饲料中的推荐添加量为50 mg/kg~150 mg/kg，最高限量为150 mg/kg。通过查询企业标准信息平台，目前生产饲料添加剂或混合型饲料添加剂姜黄素的厂家已逾百家，各企业标准中规定产品中的姜黄素含量差异较大，使用范围包括水产动物、养殖动物，还有部分产品用作水质改良剂。鉴于市场上的姜黄素产品存在质量参差不齐以及超范围使用等问题，且由于没有相关的检测方法标准，目前仍属于监管的盲区，因此非常有必要制定饲料中姜黄素的检测方法标准，以规范姜黄素的生产和使用，促进产业健康发展。

（三）工作过程

2022年4月底，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）]接到制标任务。

2022年5月上旬：系统汇总分析国内外有关标准资料、产品类型和主要生产企业的情况，进行了广泛的调查和深入研究工作，拟定了标准的范围、要求等内容，并对有关试验工作与制标起草工作做了具体分工与安排。

2022年6月中旬-2023年4月：牵头单位在资料汇总、调研的基础上，进行方法学研究，优化检测参数，形成了《饲料中姜黄素的测定》（征求意见稿）。并委托3家质检机构对标准进行了验证。

2023年4月-8月：广泛征求各方面意见，包括但不限于饲料质检机构和饲料生产企业，共发函20家单位，收到回函20份，收到意见147条，采纳123条，部分采纳或不采纳24条，形成《征求意见汇总表》，并在《征求意见汇总表》的基础上进行修改，形成《饲料中姜黄素的测定》（预审稿）。

2024年1月：向中国饲料工业协会报送预审稿，并提交预审申请。

2024年1月24日：召开预审会，与会专家一致同意标准起草单位按照预审意

见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

预审会意见主要包括：

- (1) 建议标准名称修改为《饲料中姜黄素的测定 高效液相色谱法》；
- (2) 适用范围增加混合型饲料添加剂，并补充相关试验数据；
- (3) 补充高含量浓缩饲料和添加剂预混合饲料的添加回收率和精密度试验数据；
- (4) 按照 GB/T 1.1—2020 和 GB/T 20001.4—2015 的要求和上述意见规范标准文本及编制说明。

2024 年 2 月-7 月，标准起草单位按照预审意见修改标准文本及编制说明，并再次委托 3 家质检机构对混合型饲料添加剂、浓缩饲料和预混合饲料的添加回收率和精密度进行了验证，形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

(一) 标准编制原则

本标准根据 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构与起草规则》、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。

(二) 标准主要内容

本标准在参考 GB 1886.76—2015《食品安全国家标准 食品添加剂 姜黄素》、SN/T 4890—2017《出口食品中姜黄素的测定 高效液相色谱法和液相色谱-质谱/质谱法》、T/CCCMHPIE 1.48—2019《植物提取物 姜黄素》测定方法的基础上，确定饲料中总姜黄素提取过程和检测条件。

适用范围：本方法适用于饲料中总姜黄素的测定。

技术指标：本方法可实现饲料中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素 3 种化合物完全分离，即相邻两色谱峰的分度度 >1.0 ；方法中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素 3 种化合物的在配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中的检出限为 1.0 mg/kg，定量限为 2.5 mg/kg，在添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中的检出限为 3.0 mg/kg，定量限为 10 mg/kg。本标准方法的回收率为：90%~110%，符合 GB/T 27417-2017 对方法回收率的偏差要求；精密度 RSD $\leq 10\%$ 。

(三) 标准内容确定的依据

3.1 术语和定义

“姜黄素”作为一种新饲料添加剂，农业部公告第 2131 号中指定其主要成分包括姜黄素（Cur I）、去甲氧基姜黄素（Cur II）和双去甲氧基姜黄素（简称 Cur III）。在文献中，“姜黄素”既可能代指姜黄素单体，又可能代指姜黄素类化合物，亦称“姜黄色素”，存在定义不清的问题。本研究中，姜黄素（Curcuminoids）包括姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素等 3 种化合物，分子结构见图 1。

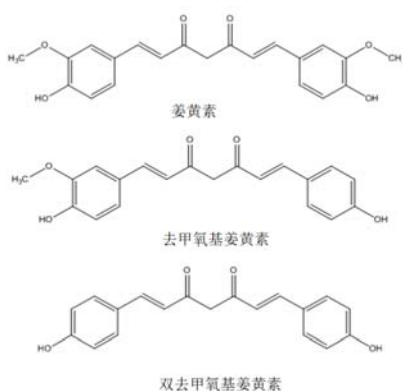


图 1 姜黄素、去甲氧基姜黄素及双去甲氧基姜黄素分子结构式

3.2 标准物质

3.2.1 标准物质及标准溶液配制

购买了 Cur I、Cur II 和 Cur III 等 3 种标准物质，标准物质信息见表 1。3 种标准物质的标识纯度均大于 95%。

表 1 姜黄素标准物质信息

产品名称-中文	产品名称-英文	简称	CAS 号	厂家	纯度
姜黄素	Curcumin	Cur I	458-37-7	LGC/DrE	96.83%
去甲氧基姜黄素	Demethoxycurcumin	Cur II	22608-11-3	CATO	98.9%
双去甲氧基姜黄素	Bisdemethoxycurcumin	Cur III	33171-05-0	CATO	97.1%

根据姜黄素类化合物的溶解性质，选择甲醇为溶剂配制姜黄素类化合物的标准溶液。对 3 个姜黄素类化合物单标进行液相色谱分离，对标准物质的纯度进行验证，所得液相色谱图见图 2。

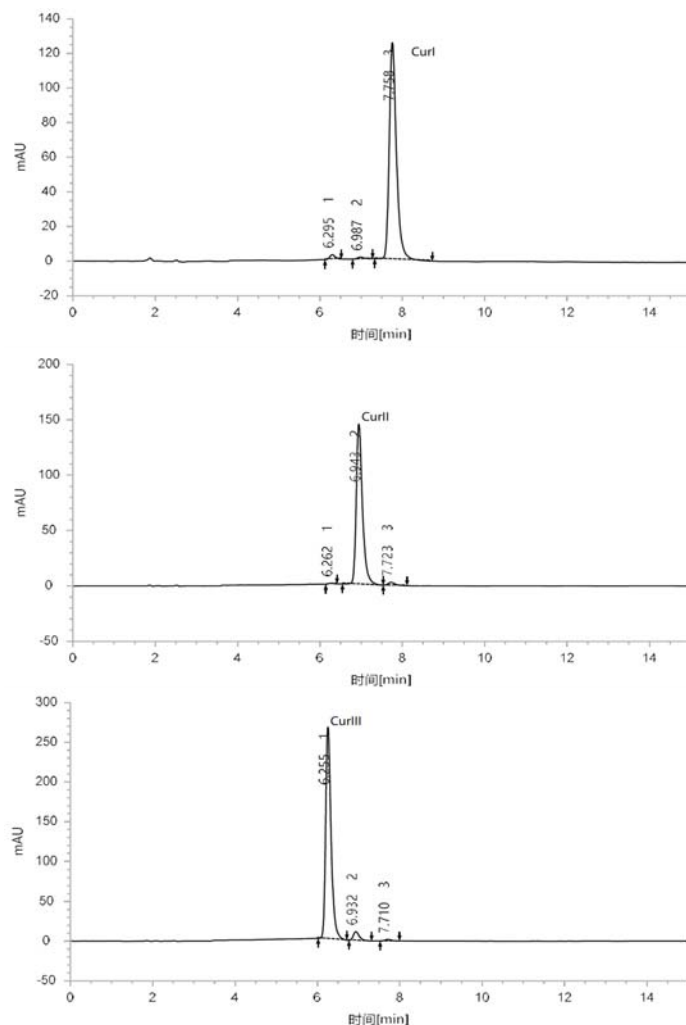


图 2 姜黄素类化合物液相色谱图

从图 2 可以看出，Cur I、Cur II 和 Cur III 的保留时间分别为 7.758、6.943 和 6.255 min。对 3 个单标的色谱图进行分析，发现 3 个单标的色谱图除主峰外，均存在一定的杂质，且分别对应其它两种目标化合物。对色谱峰进行归一化统计分析，结果见表 2。姜黄素标准品中 Cur I 占比为 97.880%，Cur II 和 Cur III 占比分别为 1.535% 和 0.585%；去甲氧基姜黄素标准品中 Cur II 占比为 97.541%，Cur I 和 Cur III 占比分别为 2.064% 和 0.393%；双去甲氧基姜黄素标准品中 Cur III 占比为 98.062%，Cur I 和 Cur II 占比分别为 0.676% 和 1.263%。3 种标准物质的纯度高于 95%，相互干扰不显著，因此在混标配制过程中不进行折算。

表 2 姜黄素类化合物标准物质色谱峰面积归一化结果

化合物名称	姜黄素	去甲氧基姜黄素	双去甲氧基姜黄素
Cur I (%)	97.880	2.064	0.676
Cur II (%)	1.535	97.541	1.263
Cur III (%)	0.585	0.393	98.062

3.2.2 标准溶液配制

标准储备溶液：分别准确称取 0.05 g Cur I、Cur II 和 Cur III（精确至 0.0001 g）于 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇溶解并定容，配制成浓度分别为 1 mg/mL 的标准储备液。将溶液转移至棕色试剂瓶中，于 4℃ 保存。

混合标准中间溶液：分别吸取适量 Cur I、Cur II 和 Cur III 标准储备溶液，用甲醇稀释成浓度为 50 μg/mL 的混合标准中间溶液，于 4℃ 保存。

混合标准系列溶液：分别吸取适量混合标准中间溶液于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释定容，配制成 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。

3.2.3 标准溶液稳定性试验

分别于 1、2、3、4 和 6 个月取出标准储备液，首先观察有无晶体析出，再进行液相色谱分析。通过观察发现标准储备液在不同时间段均呈溶液状态，无晶体析出。移取一定量的标准储备液，用甲醇稀释到 10 μg/mL，进行液相色谱分析，检测 Cur I、Cur II 和 Cur III 的峰面积，结果见图 3，从图 3 可见 Cur I、Cur II 和 Cur III 的峰面积在 6 个月内变化不大，说明姜黄素类化合物标准溶液含量稳定，在避光、冷藏条件下至少可保存 6 个月。

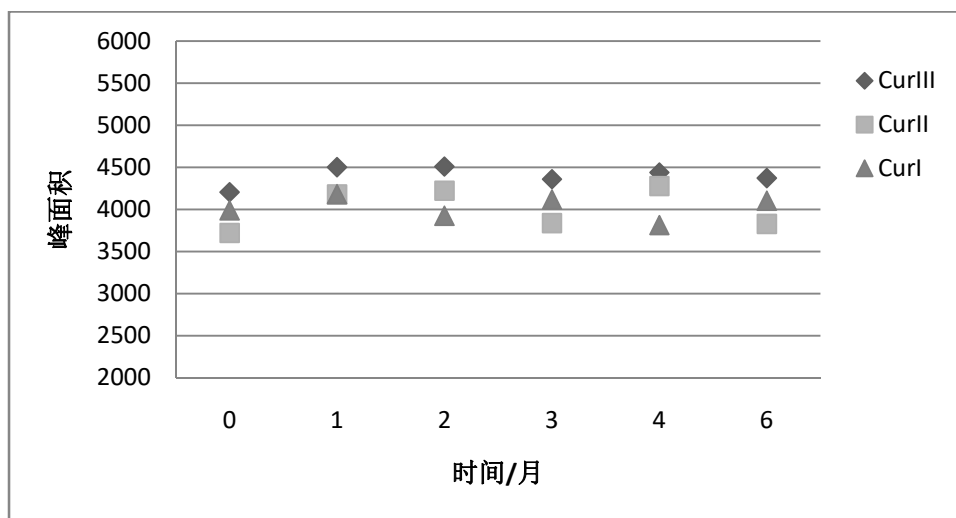


图 3 姜黄素类化合物标准溶液稳定性试验结果

3.3 色谱条件的建立

3.3.1 检测波长的选择

从 Cur I、Cur II、Cur III 的分子结构可以看出，三种化合物的结构相似，Cur II 和 Cur III 分别由姜黄素脱去一个甲氧基和两个甲氧基所得，标准品的颜色为黄色至橙色，溶液为黄色。分别取 Cur I、Cur II、Cur III 的标准储备液，用甲醇稀释至 50 $\mu\text{g/mL}$ ，用紫外可见分光光度计进行光谱扫描，扫描波长范围为 250 nm~650 nm，三种化合物的光谱图见图 4。

从图 4 可见，Cur I、Cur II、Cur III 均在 320 nm~480 nm 之间有明显吸收带，最大吸收波长为 420 nm，因此确定检测波长为 420 nm。

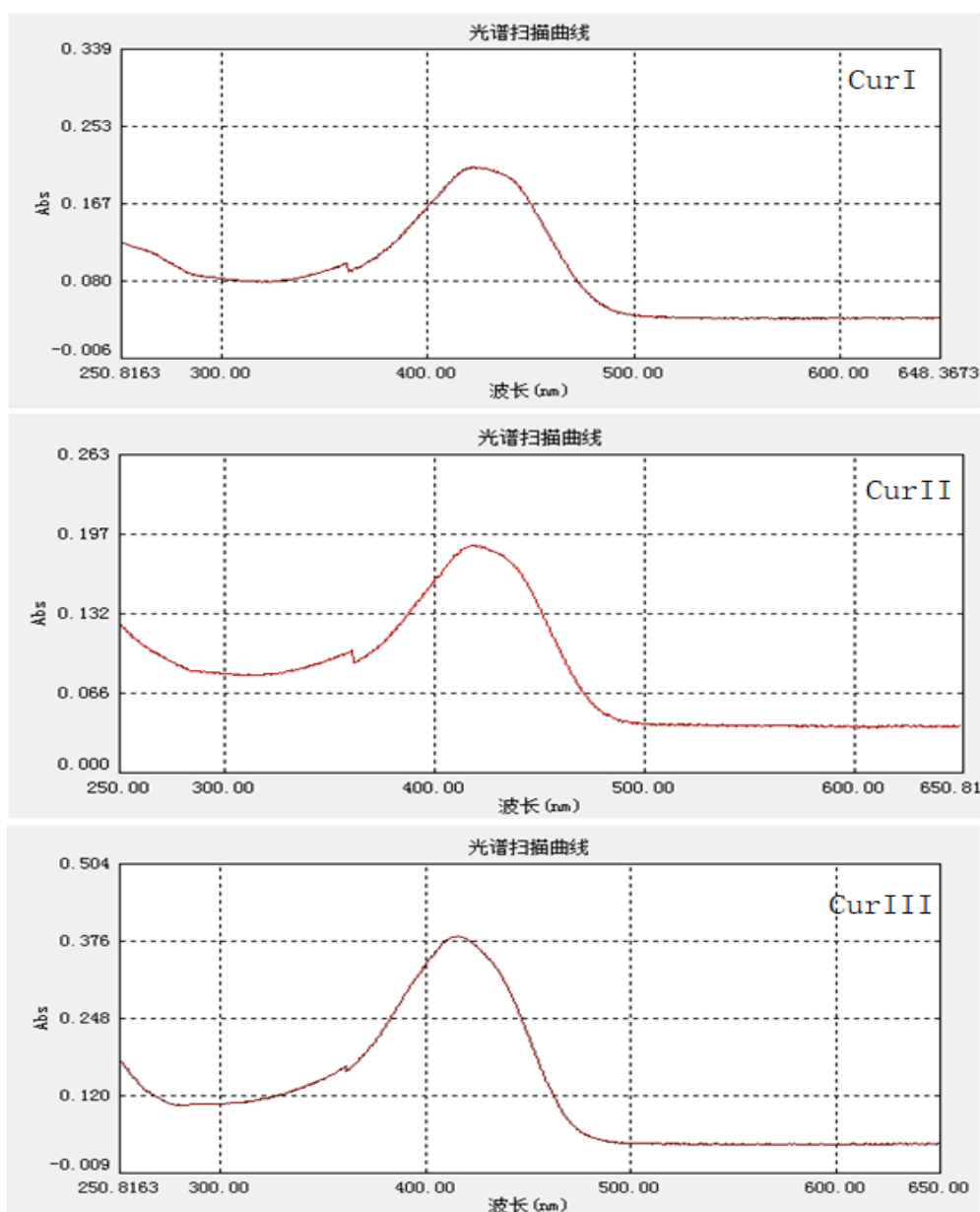


图 4 Cur I、Cur II、Cur III 紫外可见光谱图

3.3.3 流动相条件优化

文献报道：姜黄素类化合物分离可采用的流动相包括0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液、0.1%甲酸甲醇溶液和0.1%甲酸水溶液。本研究比较了流动相中水相为H₂O、0.1%甲酸溶液、50 mmol/L NH₄Ac溶液、50 mmol/L KH₂PO₄溶液对姜黄素类化合物色谱分离效果的影响，结果见图5。从图5可见，当有机相为乙腈，水相为50 mmol/L NH₄Ac溶液时，3种化合物分离效果较差，未达到基线分离；流动相为H₂O时，3种化合物分离度尚可，但峰形较宽；水相为0.1%甲酸溶液时，3种化合物分离度进一步得到改善，但存在色谱峰前延的现象；当水相为50 mmol/L KH₂PO₄溶液时，3种化合物分离度最好，色谱峰形对称，无拖尾和前延现象，因此选择50 mmol/L KH₂PO₄溶液为水相。

等度洗脱条件下，比较有机相为甲醇和乙腈时对分离结果的影响。发现当有机相为甲醇时，甲醇比例为45%时，无法将3种化合物洗脱，甲醇比例为80%和90%时，仅双去甲氧基姜黄素被洗脱，其余两种化合物未被洗脱（图6）。采用乙腈可将3种化合物洗脱并分离。比较乙腈比例对分离效果的影响，结果见图7，当乙腈的比例低于50%时，色谱峰变宽，峰形较差，洗脱时间长。乙腈的比例在50%-65%之间，容易洗脱，且3种化合物能达到基线分离，乙腈的比例高于65%，出峰较快，3种化合物不能达到基线分离。55%的乙腈分离效果最佳，因此选择乙腈比例为55%。

综合检测时间与分离效果，实验最终选定 10 mmol/L KH₂PO₄-乙腈（45：55）作为流动相。

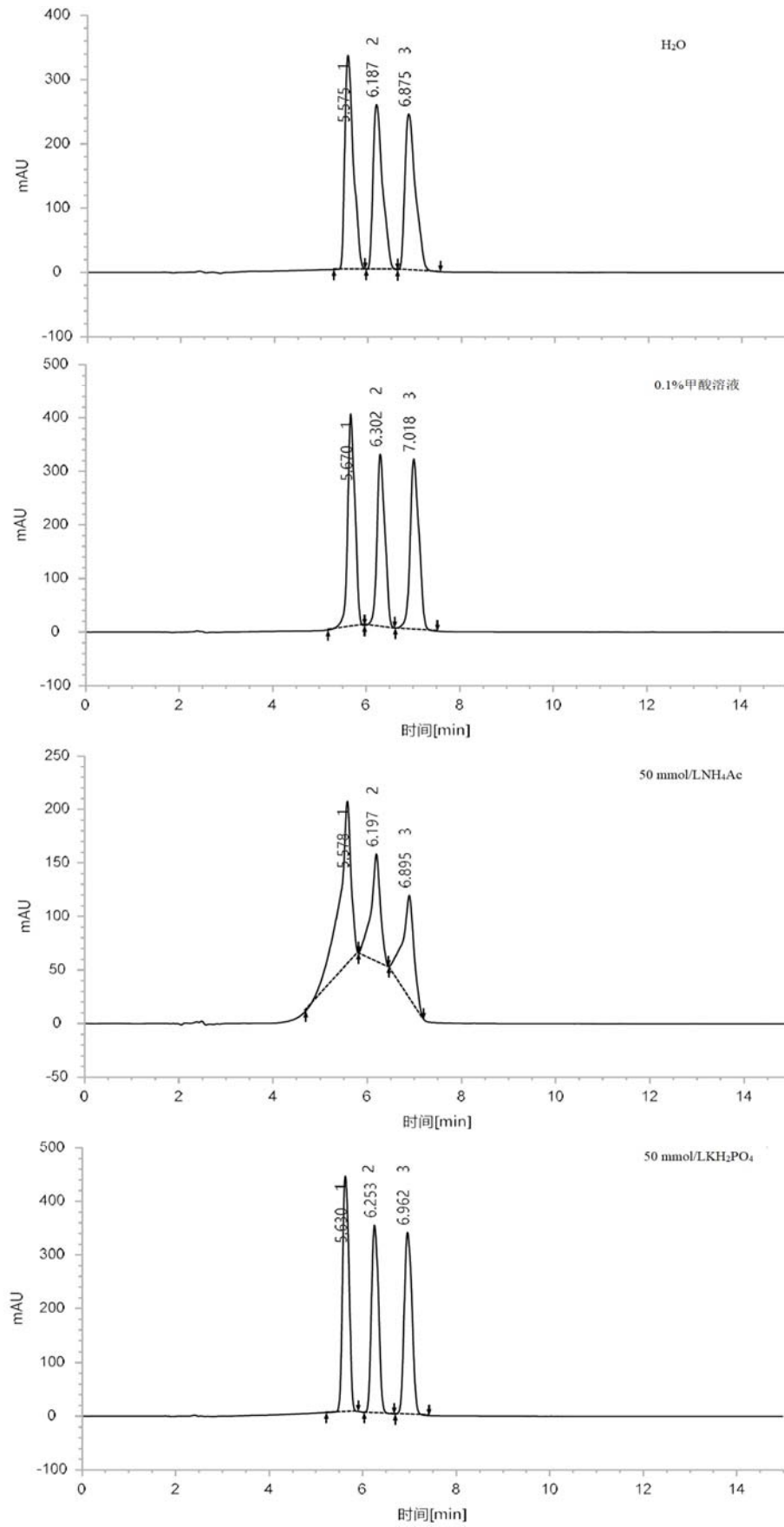


图5 水相组成对姜黄素类化合物分离效果的影响

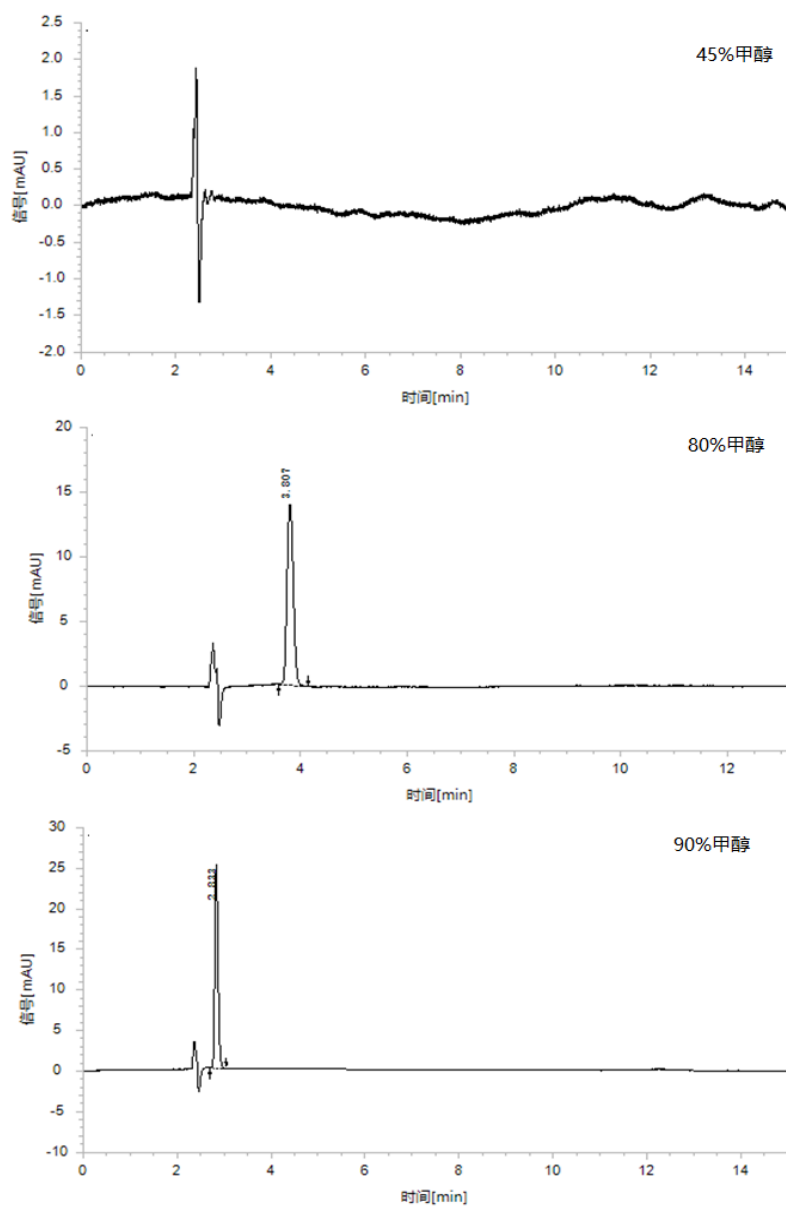


图 6 甲醇比例对姜黄素类化合物分离效果的影响

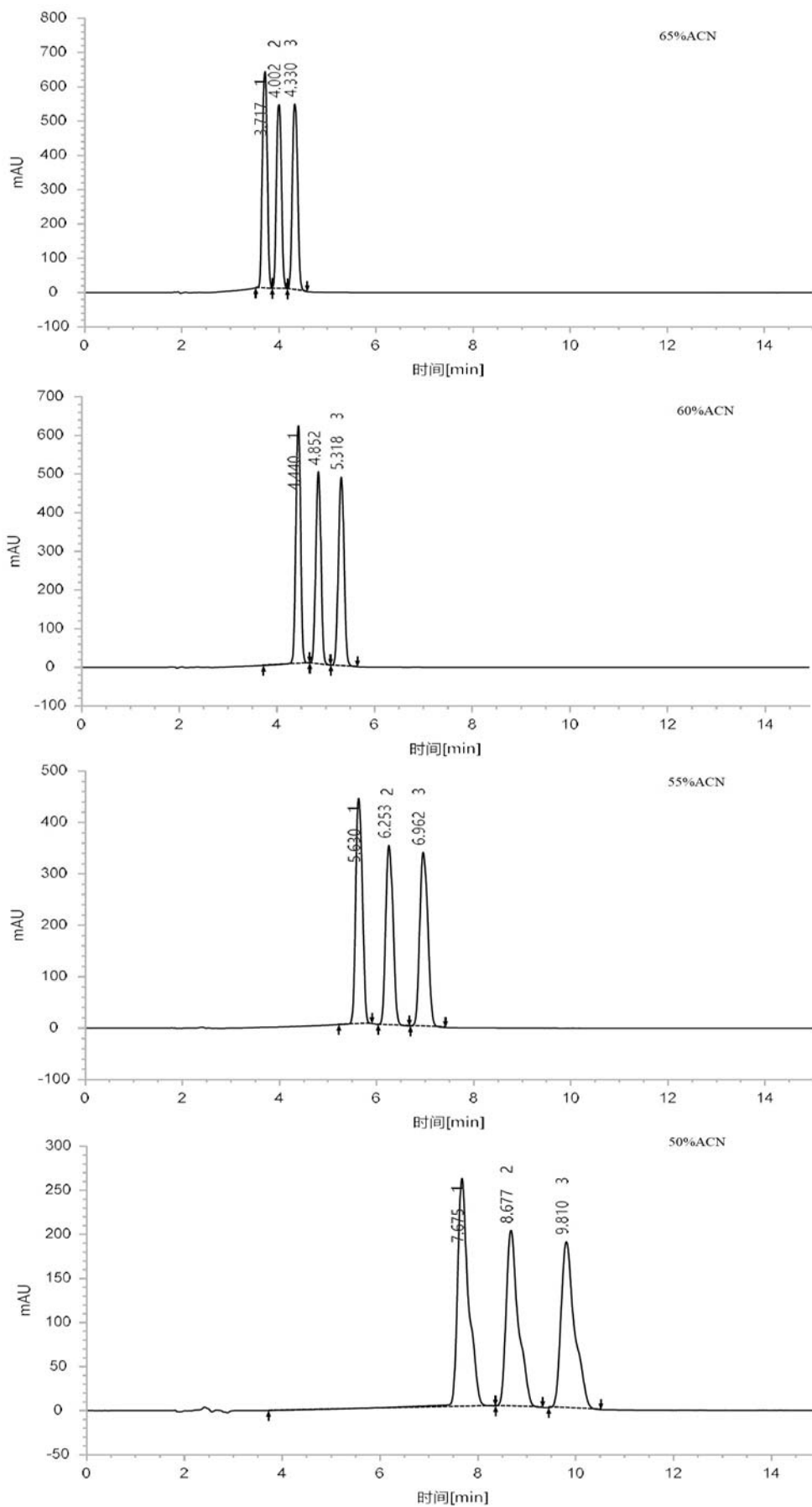


图 7 乙腈比例对姜黄素类化合物分离效果的影响

3.3.4 流速的选择

流速对色谱峰的保留时间和峰型有较大影响, 考察了流速为 0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min 时分离效果, 不同流速下姜黄素类化合物的色谱图见图 8, 分离度和保留时间结果见表 3。结果表明, 在不同流速下, 3 种姜黄素类化合物均能达到基线分离, 当流速增大到 1.2 mL/min 时, 3 种姜黄素类化合物的保留时间提前, 色谱峰峰型更加尖锐, 但同时系统压力增大。当流速降低到 0.6 mL/min 时, 色谱分析超过 12 min, 色谱峰峰色展宽。综合分离度、保留时间和色谱峰峰型等因素, 选择流速为 1.0 mL/min。

表 3 流动相流速对分离效果的影响

色谱柱型号	流速/mL·min ⁻¹	分离度	保留时间/min		
			Cur I	Cur II	Cur III
CNW Athena C18-WP (4.6×250mm)	0.6	2.885, 3.041	12.537	11.298	10.217
	0.8	2.752, 2.903	9.483	8.525	7.687
	1.0	2.787, 3.009	9.605	8.595	7.758
	1.2	2.794, 2.818	6.475	5.855	5.288

3.3.5 色谱柱柱温的选择

在色谱分离条件中, 柱温是影响分配系数的一个重要参数。考察了柱温分别为 25℃、30℃、35℃、40℃及 45℃时姜黄素类化合物色谱分离效果, 不同温度下色谱图见图 9, 分离度和保留时间结果见表 4。结果可见, 温度对姜黄素类化合物色谱保留时间有显著影响, 柱温升高, 色谱出峰提前, 当温度从 25℃升高至 45℃时, Cur I、Cur II、Cur III 的保留时间分别从 8.728 min、8.017 min、7.377 min 提前到 7.353 min、6.562 min、5.892 min, 随着柱温升高, Cur I /Cur II 及 Cur II /Cur III 的分离度也有增大趋势。综合比较保留时间、峰形及柱压等因素, 选择柱温为 40℃。

表 4 色谱柱柱温对分离效果的影响

色谱柱型号	柱温/℃	分离度	保留时间/min		
			Cur I	Cur II	Cur III
CNW Athena C18-WP (4.6×250mm)	25	2.242, 2.334	8.638	7.908	7.290
	30	2.459, 2.542	8.288	7.540	6.883
	35	2.658, 2.711	7.808	7.140	6.450
	40	2.862, 2.975	7.738	6.950	6.273
	45	2.954, 3.104	7.515	6.730	6.058

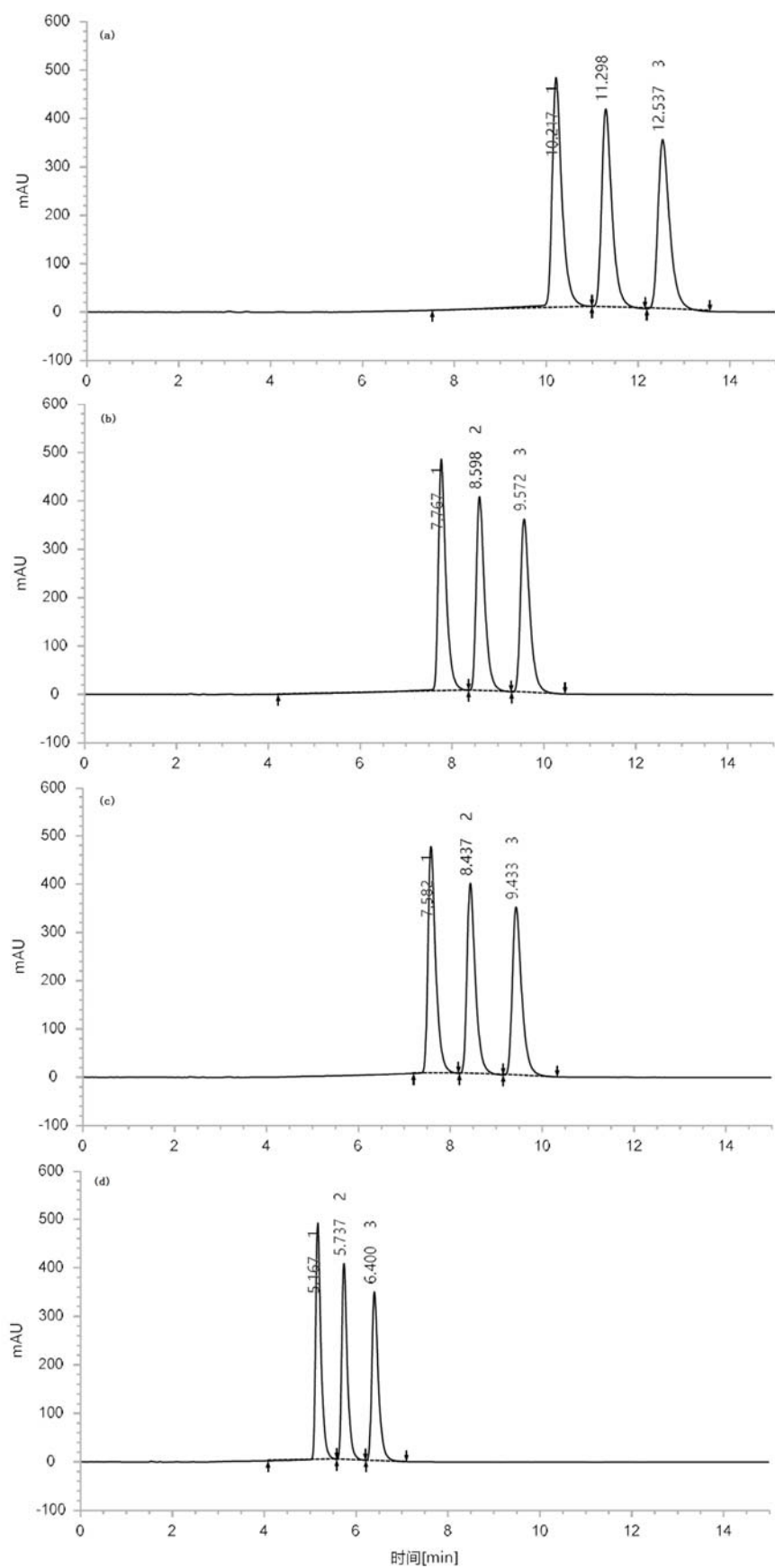


图 8 流速对分离效果的影响(a)0.6 mL/min, (b)0.8 mL/min, (c)1.0mL/min,(d)1.2mL/min

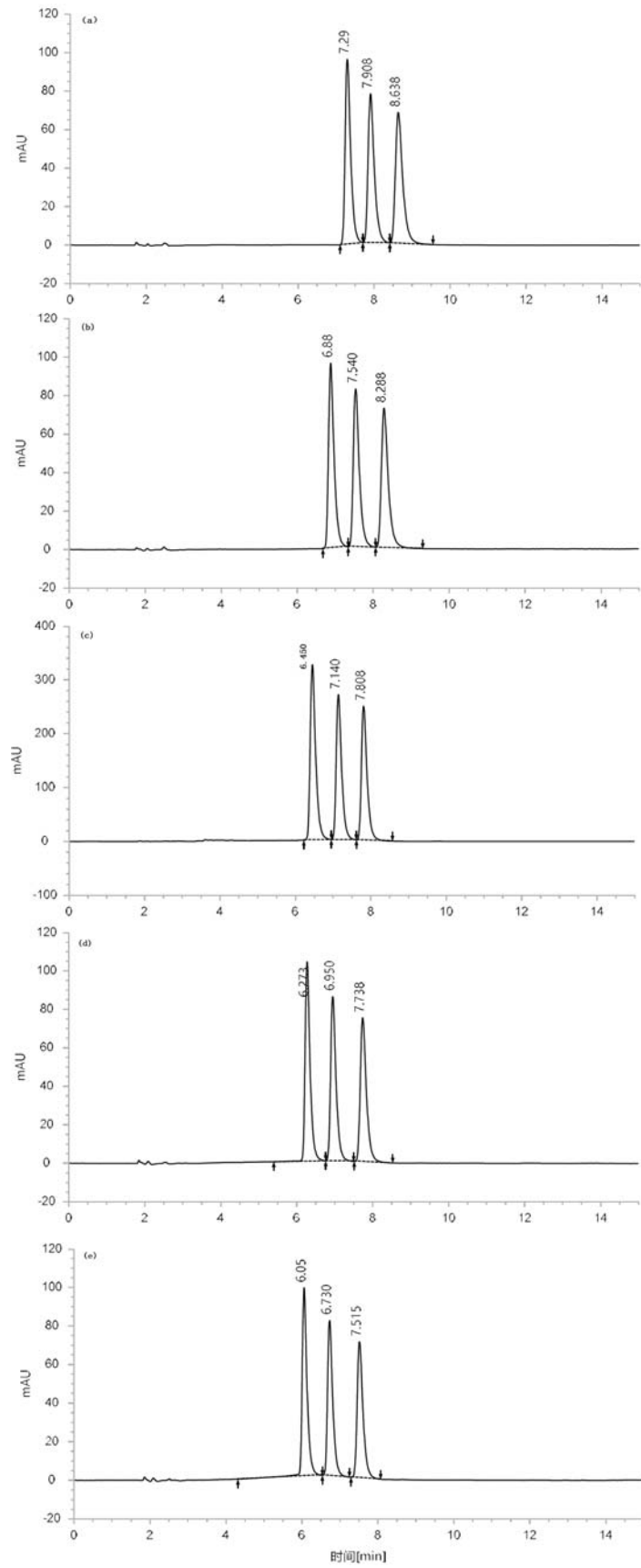


图9 温度对分离效果的影响 (a) 25°C, (b) 30°C, (c) 35°C, (d) 40°C, (e) 45 °C

3.3.6 色谱柱的选择

选择了不同品牌的规格均为 4.6mm×250mm 的 C18 反相色谱柱,以 50 mmol/L KH₂PO₄-乙腈 (45: 55) 作为流动相,考察方法在不同品牌色谱柱上的适用性,姜黄素类化合物在不同品牌色谱柱上的分离结果见表 5, 色谱图见图 10。

通过对相邻色谱峰间的分离度、保留时间等参数进行比较,发现 3 种化合物在 5 种不同品牌的 C18 反相色谱柱均能较好的分离。Inertsil ODS-3 色谱柱的保留时间最长,分离度最大,其他 4 种品牌的色谱柱保留时间差异不大, Cur I /Cur II 及 Cur II /CurIII 的分离度均>2,说明采用市面上常见的 C18 柱均能实现分离。方法的适用性较强。

表 5 姜黄素类化合物在不同色谱柱上分离度的比较

序号	色谱类型	色谱柱型号	分离度 R	保留时间/min
1	反相色谱	GL Sciences Inertsil ODS-3 (4.6mm×250mm, 5μm) 色谱柱	3.395, 3.423	7.785, 8.622, 9.580
2	反相色谱	Thermo ODS Hypersil™ (4.6mm×250mm, 5μm) 色谱柱	2.352, 2.245	5.855, 6.310, 6.820
3	反相色谱	CNW Athena C18-WP, (4.6mm×250mm, 5μm) 色谱柱	2.889, 2.974	6.140, 6.802, 7.558
4	反相色谱	Kromasil 100-5-C18 (250mm×4.6mm, 5μm) 色谱柱	2.245, 2.321	5.648, 6.275, 6.978
5	反相色谱	Agilent SB C18 (250mm×4.6mm, 5μm) 色谱柱	2.761, 2.931	5.408, 6.017, 6.728

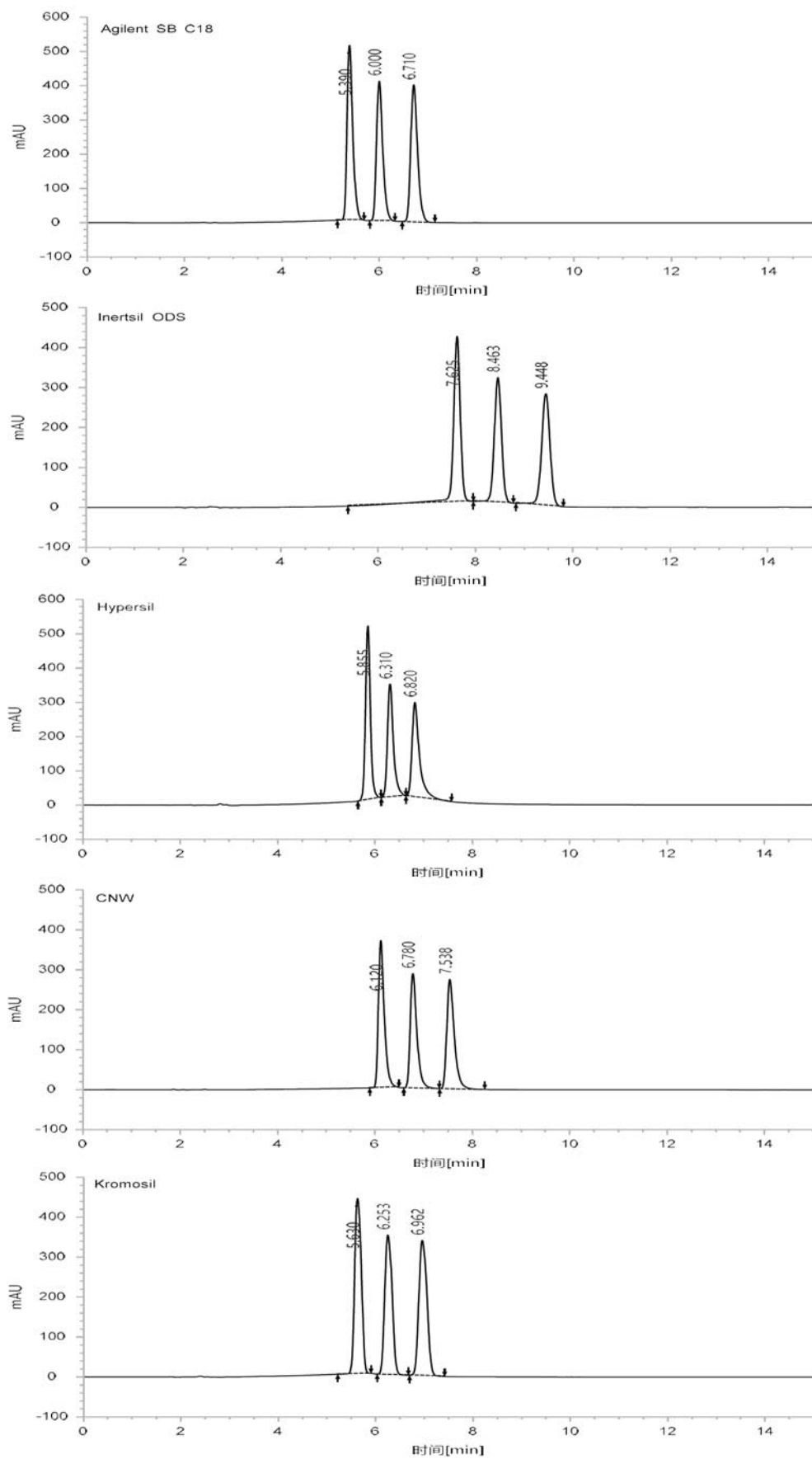


图 10 姜黄素类化合物在不同品牌色谱柱上分离效果的比较

3.4 样品前处理方法的优化

实验通过对已知添加姜黄素类化合物的配合饲料和添加剂预混合饲料进行提取，考察了不同提取溶剂、提取方式、提取时间及提取温度对姜黄素类化合物提取效率的影响，从而优化出最佳前处理条件。

3.4.1 提取溶剂的影响

根据文献资料，姜黄素类化合物在不同有机溶剂中的溶解性为：丙酮>乙酸乙酯>甲醇>乙醇>1,2-二氯乙烷>异丙醇>醚>苯>己烷。试验首先比较了丙酮、乙腈、甲醇、乙醇作为提取剂的提取效果，发现姜黄素类化合物虽然易溶于丙酮，但丙酮提取后杂质多，不适合直接上色谱分离，且丙酮作为易制毒溶剂，挥发性大，对实验人员危害较大，因此不采用丙酮做溶剂。乙腈提取液分离后也出现较多杂质，乙酸乙酯与水溶液的互溶性不好，不适合直接上色谱分离。用乙醇水体系提取并离心后，提取液较为浑浊；而甲醇水体系所得提取液较澄清，所以选择不同比例甲醇-水作为提取溶剂进一步进行对比。在空白样品中加标，用不同比例的甲醇-水进行提取，比较回收率，结果见图 11。试验结果表明，在配合饲料、浓缩饲料、精料补充料及添加剂预混合饲料中，3 种化合物的回收率均存在甲醇>90%甲醇-水>70%甲醇-水>50%甲醇-水的规律，甲醇的提取效率最高，因此选择甲醇为提取试剂。

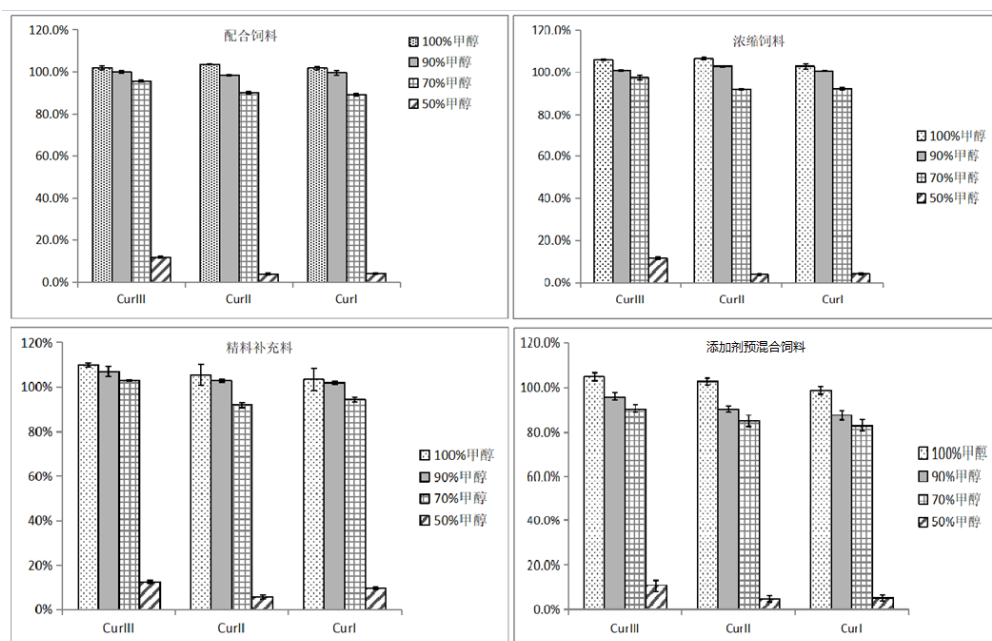


图 11 不同提取溶剂对提取效率的影响

3.4.2 提取方式和提取时间的选择

选取已知添加姜黄素类化合物的鱼配合饲料和添加剂预混合饲料作为实际样品，分别采取振荡提取和超声提取两种提取方法，提取时间分别为 5、10、15、20 和 30 min，考察了提取方式和提取时间的影响，结果见图 12 和图 13。从图 12 可见，鱼配合饲料受提取方式的影响较大，振荡提取测得实际含量仅为超声提取的 60%左右，超声提取的提取效率显著高于振荡提取的提取效率。添加剂预混合饲料受提取方式的影响不大，超声提取的提取效率略高于振荡提取（图 13）。对提取时间进行比较，发现提取 15 min 以后逐渐达到平衡，因此，选择超声 20 min 作为提取条件。

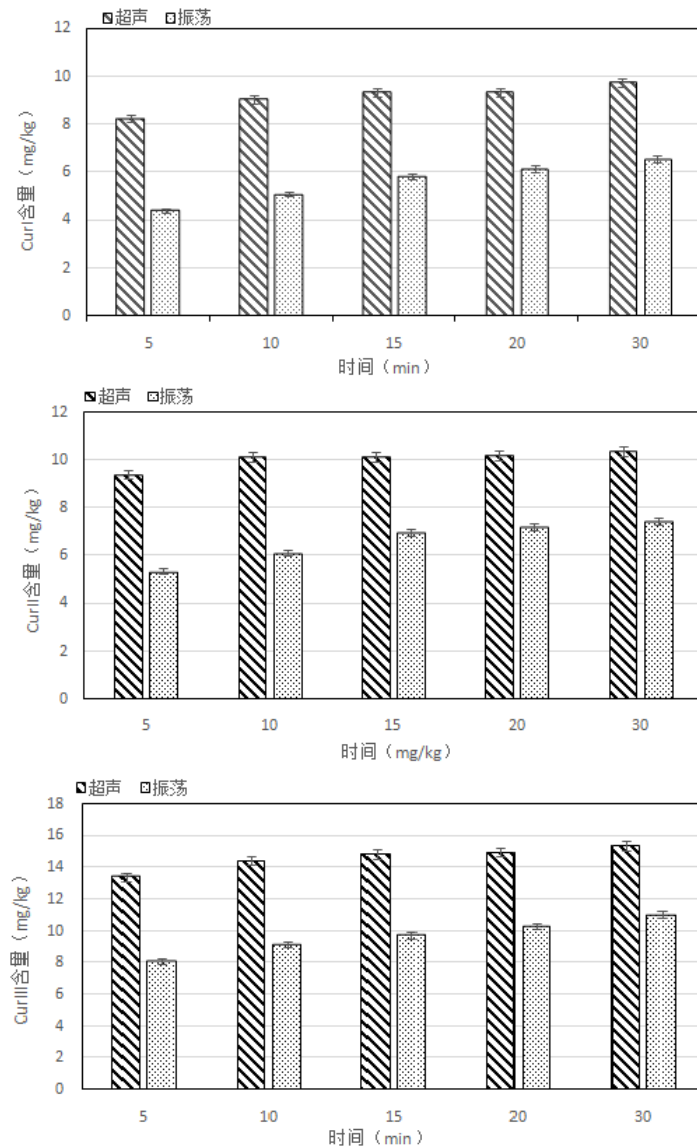


图 12 不同提取方式对鱼配合饲料提取效率的影响

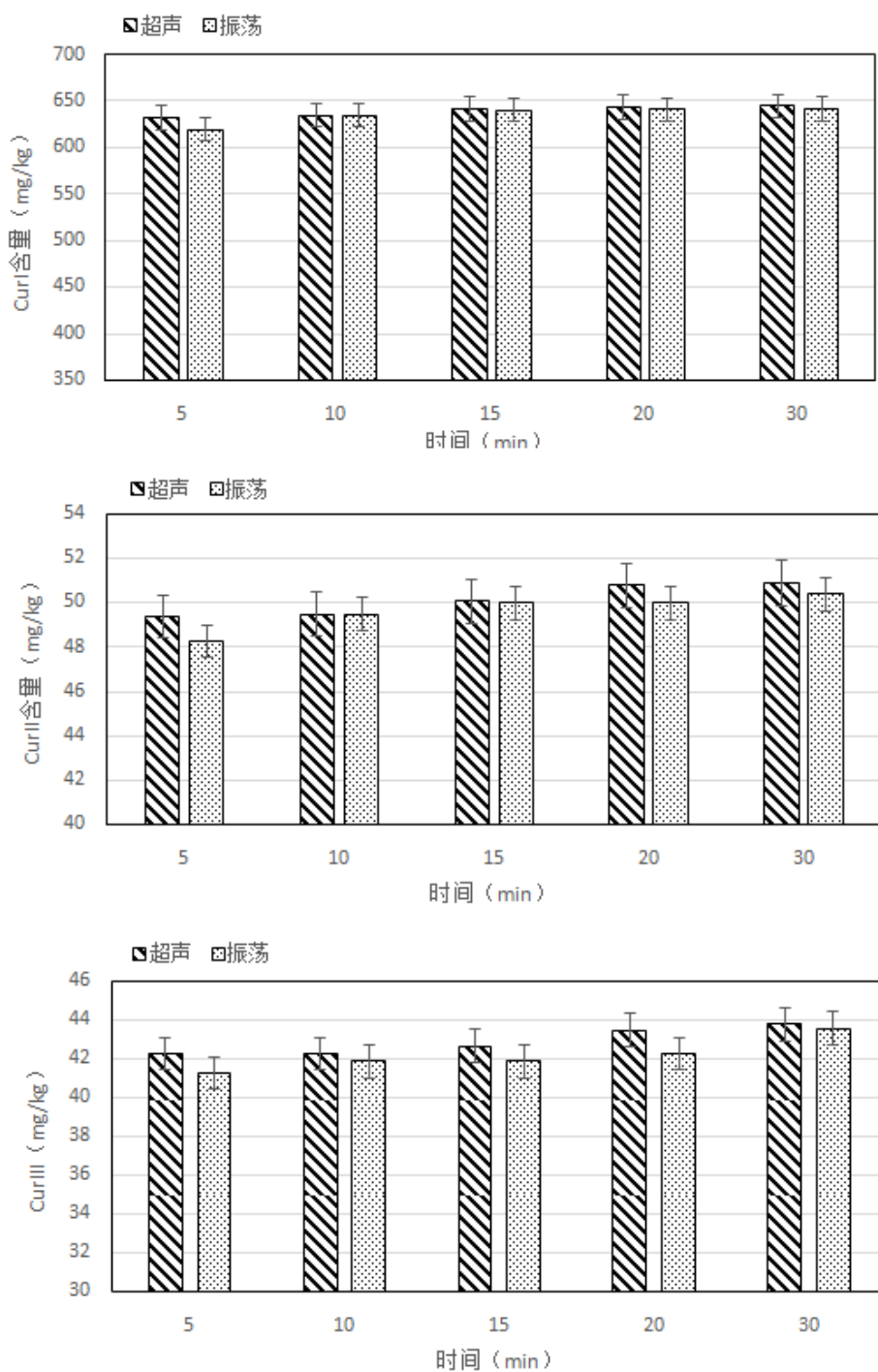


图 13 不同提取方式对添加剂预混合饲料提取效率的影响

3.5 标准技术指标的论证

3.5.1 线性范围

移取适量的姜黄素类化合物混合标准储备液用甲醇稀释成质量浓度为 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0 和 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作溶液，按照上述条件

进行液相色谱分析。以待测物的浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线，得到的校正曲线见图 14。

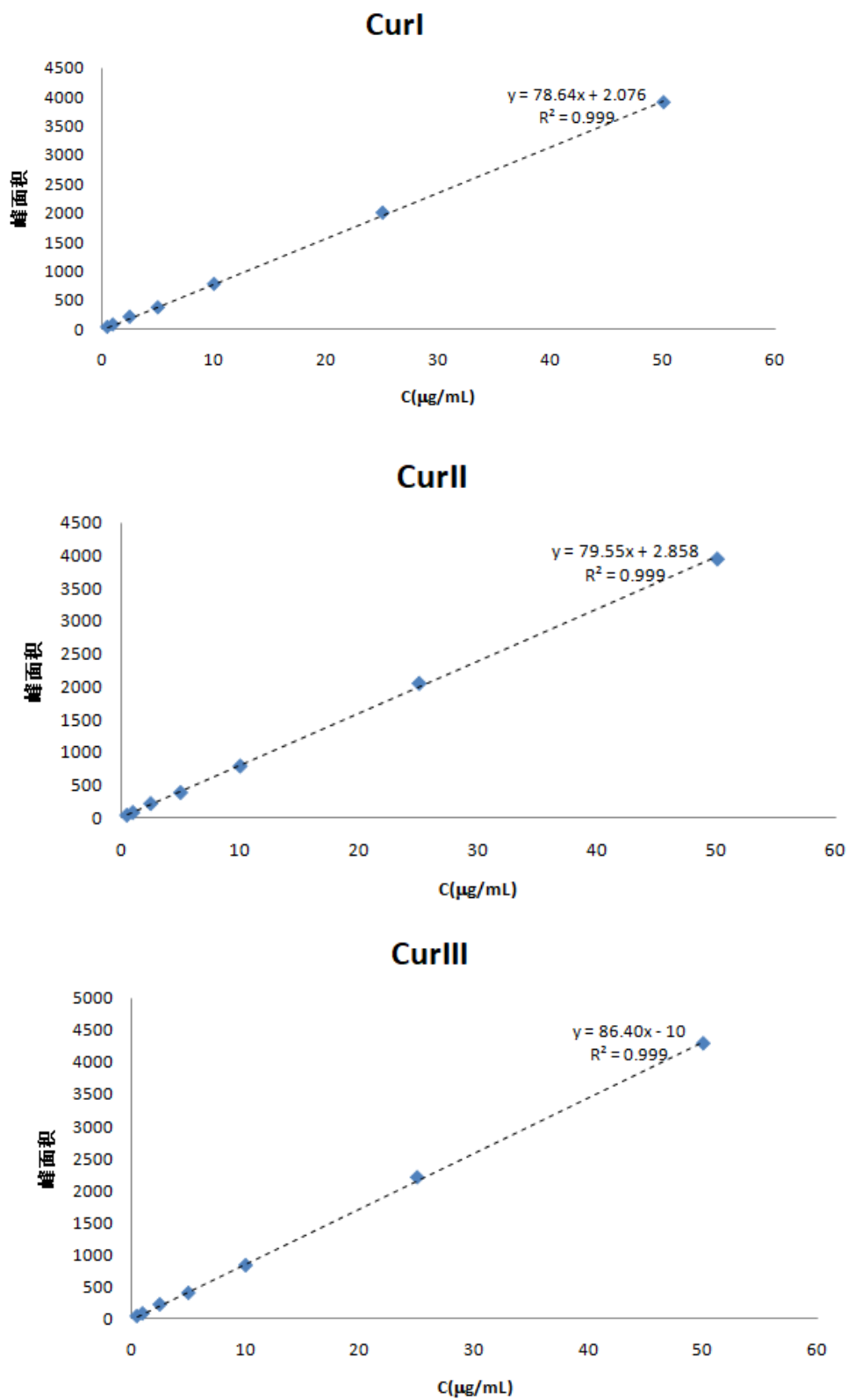


图 14 HPLC 法测定姜黄素类化合物的校正曲线

对相关数据进行线性回归分析后,结果表明,姜黄素类化合物在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~50 $\mu\text{g/mL}$ 范围均具有良好的线性,所得方程和相关系数见表 7。

表 7 HPLC 法测定姜黄素类化合物的校正曲线方程及相关系数

待测物	线性回归方程	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	相关系数 r^2
Cur I	$y=78.64x+2.076$	0.10-50	0.9999
Cur II	$y=79.55x+2.858$	0.10-50	0.9999
Cur III	$y=86.4x-10.0$	0.10-50	0.9998

3.5.2 方法检出限和定量限

在最优的色谱条件下,对不同浓度梯度的姜黄素类化合物混合标准溶液进行检测,确定最优色谱条件下仪器的检出限和定量限。

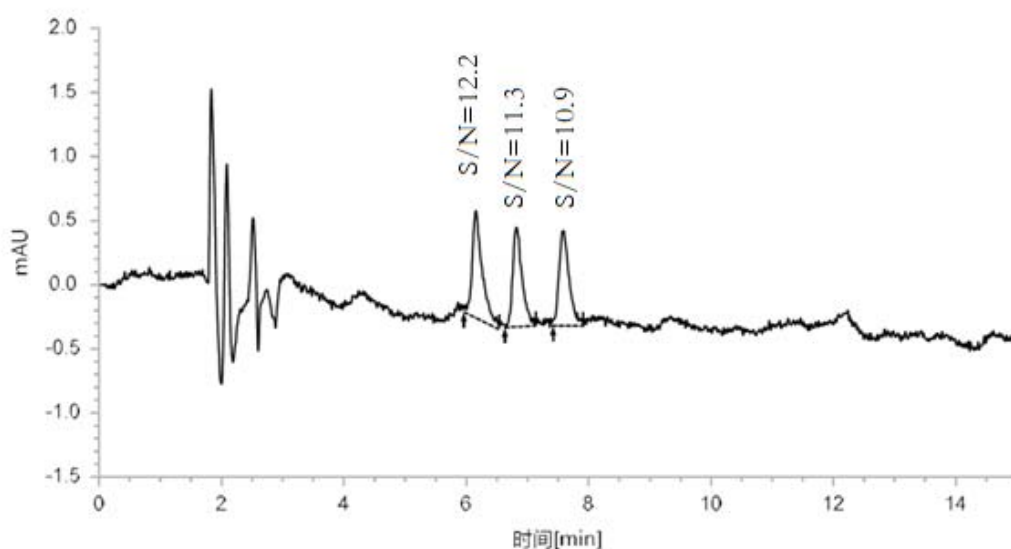
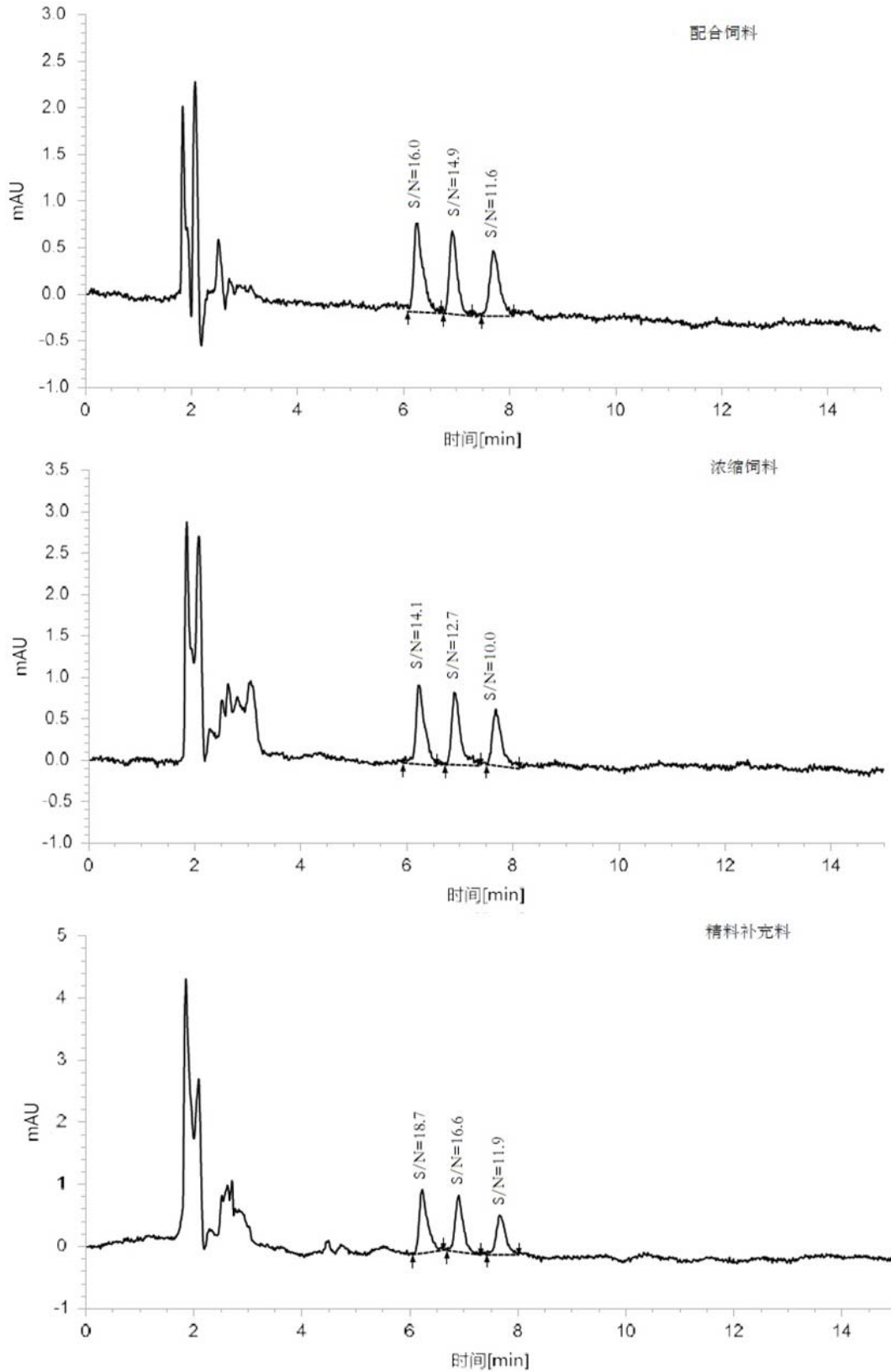


图 15 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准溶液的液相色谱图

0.1 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准溶液的液相色谱图见图 15,通过计算得出姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素的信噪比(S/N)分别为 10.9、11.3 和 12.2。由此确定仪器检出限(S/N=3)为 0.03 $\mu\text{g/mL}$,仪器定量限(S/N=10)为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。在此基础上,分别称取 2.0 g 空白配合饲料、浓缩饲料和精料补充料及 0.5 g 添加剂预混合饲料、混合型饲料添加剂,分别添加 0.5 mL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液,按照确定的样品前处理方法和 HPLC 方法进行测定,并计算信噪比,结果见图 16。从结果可知,配合饲料、浓缩饲料、精料补充料在 2.5 mg/kg 的添加水平上,添加剂预混合饲料和混合型添加剂在 10 mg/kg 的添加水平上,姜黄素、去甲氧基姜黄

素和双去甲氧基姜黄素的信噪比均大于 10。因此确定方法在配合饲料、浓缩饲料及精料补充料中的检出限为 1.0 mg/kg，定量限为 2.5 mg/kg，在添加剂预混合饲料及混合型饲料添加剂中的检出限为 3.0 mg/kg，定量限为 10 mg/kg。



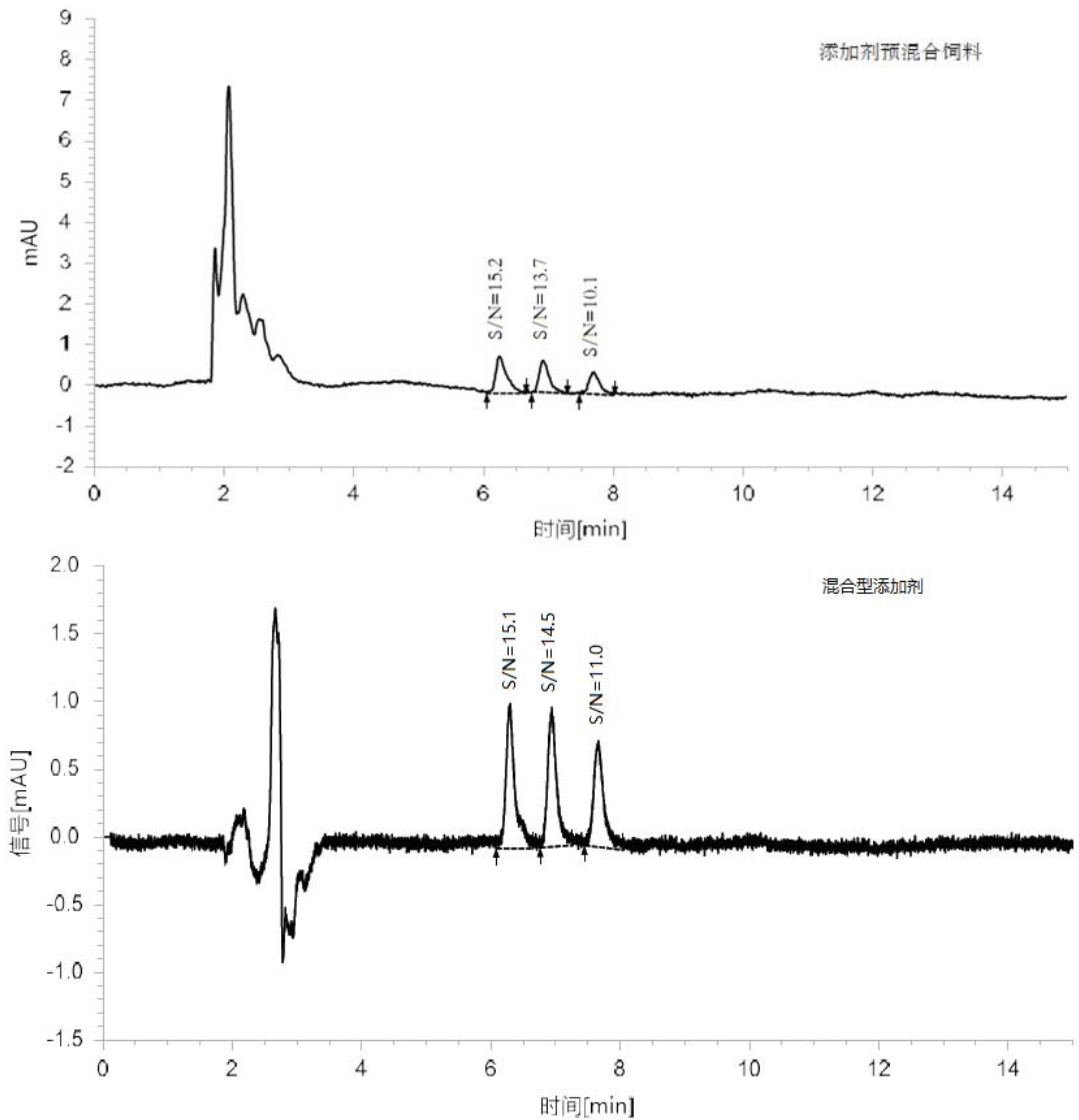


图 16 不同类型饲料定量限色谱图

3.5.3 方法回收率与精密度

通过考察配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料以及混合型饲料添加剂 5 种不同饲料基质中姜黄素类化合物的添加回收率及精密度，评价方法的准确度和精密度。

加标样品的制备方法为，配合饲料、精料补充料及浓缩饲料各称取样品 2.0 g，添加剂预混合饲料及混合型饲料添加剂（以石粉和 SiO_2 作为基质）各称取样品 0.5 g，分别添加定量限及三个浓度水平的姜黄素混合标准溶液，每个浓度 6 个平行，涡旋混合后进行前处理，同时做空白。结果见表 8-表 13。

鱼配合饲料添加回收实验结果表明，鱼配合饲料在 2.5 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg 和 75 mg/kg 四个添加水平下，Cur I、Cur II 和 Cur III 的平均添加回收率介于

90.7%~101.6%，RSD 介于 0.73%~3.49%。

精料补充料添加回收实验结果表明，精料补充料在 2.5 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg 和 75 mg/kg 四个添加水平下，Cur I、Cur II 和 Cur III 的添加回收率介于 96.2%~105.7%，RSD 介于 0.56%~5.67%。

浓缩饲料添加回收实验结果表明，Cur I 在 2.5 mg/kg、48.5 mg/kg、72.7 mg/kg 和 121 mg/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.2%、94.3%、99.5%和 97.6%，RSD 分别为 6.20%、3.17%、2.80%和 3.22%；Cur II 在 2.5 mg/kg、57.6 mg/kg、86.5 mg/kg 和 144 mg/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.8%、91.6%、92.9%和 93.5%，RSD 分别为 4.84%、4.18%、2.79%和 3.33%；Cur III 在 2.5 mg/kg、80.4 mg/kg、121 mg/kg 和 201 mg/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 98.7%、96.7%、101.5%和 98.1%，RSD 分别为 5.02%、3.71%、2.68%和 1.77%。

预混合饲料添加剂回收实验结果表明，Cur I 在 10 mg/kg、1.25 g/kg、2.50 g/kg 和 5.00 g/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.3%、94.5%、94.9%和 90.6%，RSD 分别为 2.53%、2.31%、3.52%和 1.47%；Cur II 在 10 mg/kg、1.50 g/kg、3.00 g/kg 和 6.00 g/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.1%、92.8%、94.5%和 90.2%，RSD 分别为 2.34%、2.30%、3.66%和 1.46%；Cur III 在 10 mg/kg、2.15 g/kg、4.30 g/kg 和 8.60 g/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.6%、94.6%、94.5%和 92.8%，RSD 分别为 2.13%、1.87%、2.86%和 5.21%。

混合型饲料添加剂（石粉基质）添加回收实验结果表明，Cur I 在 10 mg/kg、5.00 g/kg、12.5 g/kg 和 25.0 g/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.6%、101.5%、99.4%和 97.6%，RSD 分别为 2.60%、1.74%、3.97%和 4.32%；Cur II 在 10 mg/kg、6.0 g/kg、15.0 g/kg 和 30.0 g/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.4%、98.7%、101.8%和 97.6%，RSD 分别为 2.55%、4.68%、4.90%和 4.47%；Cur III 在 8.60 g/kg、21.5 g/kg、43.0 mg/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 96.0%、98.3%、99.4%和 99.6%，RSD 分别为 2.32%、4.91%、4.41%和 2.46%。

混合型饲料添加剂（SiO₂ 基质）添加回收实验结果表明，Cur I 在 10 mg/kg、5.00 g/kg、12.5 g/kg 和 25.0 g/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 94.8%、99.7%、96.7%和 98.2%，RSD 分别为 2.18%、2.67%、2.30%和 3.87%；Cur II 在 10 mg/kg、6.0 g/kg、15.0 g/kg 和 30.0 g/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.1%、98.2%、99.3%和 98.1%，RSD 分别为 1.53%、4.20%、4.42%和 3.86%；Cur III 在 8.6 g/kg、21.5 g/kg、43.0 g/kg 四个添加水平下，平均添加回收率分别为 95.4%、98.5%、103.7%和 99.9%，RSD 分别为 1.97%、3.11%、4.92%和 3.76%。

以上结果表明本方法准确度高，精密度高，适用于不同类型的饲料中姜黄素的提取与定性定量分析。

表 8 鱼配合饲料加标回收率及精密度

化合物	添加量 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)						本底值 (mg/kg)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
Cur I	2.5	10.4	10.7	10.6	10.2	10.8	10.9	8.07	101.6	2.39
Cur II	2.5	11.2	11.2	11.3	10.8	11.0	10.9	8.67	95.9	1.83
Cur III	2.5	13.0	13.4	12.8	13.0	13.2	13.5	10.7	98.4	2.10
Cur I	25	31.0	30.7	31.6	30.2	30.8	30.9	8.07	91.3	2.48
Cur II	25	33.9	34.1	32.6	31.5	31.4	32.3	8.67	95.8	3.49
Cur III	25	34.7	34.4	32.8	32.9	32.8	33.5	10.7	91.2	1.39
Cur I	50	53.0	53.7	54.1	52.9	53.5	53.4	8.07	93.6	1.10
Cur II	50	57.9	58.4	59.5	57.8	58.5	57.3	8.67	99.1	1.30
Cur III	50	57.2	57.9	58.5	57.1	57.8	56.7	10.7	90.7	0.82
Cur I	75	76.1	75.6	76.7	76.7	77.0	76.9	8.07	91.8	2.00
Cur II	75	80.8	83.4	83.2	79.4	82.3	82.4	8.67	97.7	1.91
Cur III	75	78.9	81.0	81.2	76.9	79.3	80.0	10.7	91.2	0.73

表 9 精料补充料加标回收率及精密度

化合 物	添加量 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)						本底值 (mg/kg)	平均回收 率 (%)	RSD (%)
Cur I	2.5	2.36	2.48	2.67	2.53	2.35	2.29	N.D	97.9	5.76
Cur II	2.5	2.57	2.36	2.42	2.37	2.43	2.57	N.D	98.1	3.85
Cur III	2.5	2.43	2.56	2.43	2.35	2.61	2.37	N.D	98.3	4.25
Cur I	25	24.7	24.6	24.2	24.2	23.6	23.2	N.D	96.2	2.39
Cur II	25	25.9	25.7	25.9	25.4	28.2	26.6	N.D	105.0	3.85
Cur III	25	27.8	27.3	27.6	25.3	25.8	25.1	N.D	105.7	4.61
Cur I	50	49.5	49.4	49.4	48.2	47.6	48.6	N.D	97.6	1.55
Cur II	50	50.7	50.9	50.0	50.4	53.4	51.3	N.D	102.3	2.36
Cur III	50	53.2	52.9	53.5	50.7	51.6	51.1	N.D	104.3	2.27
Cur I	75	70.9	72.7	73.6	71.9	73.2	72.8	N.D	96.7	1.30

Cur II	75	72.9	73.8	73.5	73.2	73.6	72.8	N.D	97.7	0.56
Cur III	75	75.6	74.7	77.7	75.3	72.2	72.7	N.D	99.6	2.71

表 10 浓缩饲料加标回收率及精密度

化合物	添加量 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)						本底值 (mg/kg)	平均回收 率(%)	RSD (%)
Cur I	2.5	2.24	2.18	2.35	2.55	2.48	2.48	N.D	95.2	6.20
Cur II	2.5	2.31	2.26	2.57	2.47	2.33	2.43	N.D	95.8	4.84
Cur III	2.5	2.32	2.58	2.60	2.53	2.42	2.34	N.D	98.7	5.02
Cur I	48.5	47.5	47.4	44.0	44.5	45.4	45.7	N.D	94.3	3.17
Cur II	57.6	51.6	50.0	46.4	46.6	48.3	48.4	N.D	91.6	4.18
Cur III	80.4	82.2	79.5	74.7	74.7	77.5	77.8	N.D	96.7	3.71
Cur I	72.7	75.2	74.7	70.7	71.0	71.6	71.0	N.D	99.5	2.80
Cur II	86.5	83.2	83.2	78.5	78.7	79.2	79.2	N.D	92.9	2.79
Cur III	121	126.8	127.3	120.2	120.3	121.2	121.2	N.D	101.5	2.68
Cur I	121	122.9	123.0	114.6	115.4	116.4	116.4	N.D	97.6	3.22
Cur II	144	139.8	140.9	130.4	131.6	132.8	132.6	N.D	93.5	3.33
Cur III	201	199.4	202.8	193.1	194.5	196.7	196.8	N.D	98.1	1.77

表 11 添加剂预混合饲料加标回收率及精密度

化合物	添加量 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)						本底值 (mg/kg)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
Cur I	10	9.36	9.67	9.45	9.54	9.24	9.92	N.D	95.3	2.53
Cur II	10	9.75	9.64	9.24	9.37	9.34	9.74	N.D	95.1	2.34
Cur III	10	9.43	9.65	9.58	9.53	9.88	9.28	N.D	95.6	2.13
Cur I	1250	1216	1183	1170	1187	1136	1198	N.D	94.5	2.31
Cur II	1500	1441	1398	1380	1402	1342	1392	N.D	92.8	2.30
Cur III	2150	2077	2056	2032	2063	1979	2001	N.D	94.6	1.87
Cur I	2500	2417	2417	2436	2414	2323	2222	N.D	94.9	3.52
Cur II	3000	2890	2896	2914	2888	2779	2648	N.D	94.5	3.66

CurIII	4300	4124	4132	4162	4124	3971	3870	N.D	94.5	2.86
Cur I	5000	4553	4551	4584	4591	4462	4430	N.D	90.6	1.47
Cur II	6000	5431	5435	5479	5489	5331	5296	N.D	90.2	1.46
CurIII	8600	7672	7683	7750	7764	8542	8498	N.D	92.8	5.21

表 12 混合型饲料添加剂（石粉基质）加标回收率及精密度

化合物	添加量 (mg/kg)		实测值 (mg/kg)					本底值 (mg/kg)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
Cur I	10	9.45	9.84	9.56	9.38	9.26	9.87	N.D	95.6	2.60
Cur II	10	9.68	9.34	9.45	9.87	9.23	9.69	N.D	95.4	2.55
CurIII	10	9.86	9.54	9.84	9.26	9.54	9.58	N.D	96.0	2.32
Cur I	5.0×10 ³	5.21×10 ³	5.07×10 ³	5.00×10 ³	5.06×10 ³	5.14×10 ³	4.97×10 ³	N.D	101.5	1.74
Cur II	6.0×10 ³	5.90×10 ³	6.46×10 ³	5.84×10 ³	5.93×10 ³	5.76×10 ³	5.66×10 ³	N.D	98.7	4.68
CurIII	8.6×10 ³	8.33×10 ³	8.17×10 ³	8.24×10 ³	8.32×10 ³	8.39×10 ³	9.29×10 ³	N.D	98.3	4.91
Cur I	1.25×10 ⁴	1.23×10 ⁴	1.33×10 ⁴	1.20×10 ⁴	1.28×10 ⁴	1.21×10 ⁴	1.21×10 ⁴	N.D	99.4	3.97
Cur II	1.50×10 ⁴	1.46×10 ⁴	1.59×10 ⁴	1.54×10 ⁴	1.64×10 ⁴	1.48×10 ⁴	1.46×10 ⁴	N.D	101.8	4.90
CurIII	2.15×10 ⁴	2.05×10 ⁴	2.26×10 ⁴	2.20×10 ⁴	2.20×10 ⁴	2.08×10 ⁴	2.04×10 ⁴	N.D	99.4	4.41
Cur I	2.50×10 ⁵	2.45×10 ⁴	2.59×10 ⁴	2.42×10 ⁴	2.49×10 ⁴	2.27×10 ⁴	2.41×10 ⁴	N.D	97.6	4.32
Cur II	3.00×10 ⁴	2.92×10 ⁴	3.08×10 ⁴	2.88×10 ⁴	2.96×10 ⁴	2.70×10 ⁴	3.02×10 ⁴	N.D	97.6	4.47
CurIII	4.30×10 ⁴	4.23×10 ⁴	4.47×10 ⁴	4.18×10 ⁴	4.29×10 ⁴	4.19×10 ⁴	4.32×10 ⁴	N.D	99.6	2.46

表 13 混合型饲料添加剂（SiO₂基质）加标回收率及精密度

化合物	添加量 (mg/kg)		实测值 (mg/kg)					本底值 (mg/kg)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
Cur I	10	9.28	9.54	9.68	9.26	9.36	9.74	N.D	94.8	2.18
Cur II	10	9.36	9.46	9.52	9.75	9.38	9.59	N.D	95.1	1.53
CurIII	10	9.26	9.39	9.77	9.61	9.53	9.67	N.D	95.4	1.97
Cur I	5.0×10 ³	5.02×10 ³	5.13×10 ³	5.15×10 ³	4.92×10 ³	4.86×10 ³	4.84×10 ³	N.D	99.7	2.67
Cur II	6.0×10 ³	6.04×10 ³	6.14×10 ³	5.48×10 ³	6.08×10 ³	5.82×10 ³	5.78×10 ³	N.D	98.2	4.20
CurIII	8.6×10 ³	8.75×10 ³	8.49×10 ³	8.74×10 ³	8.42×10 ³	8.04×10 ³	8.40×10 ³	N.D	98.5	3.11
Cur I	1.25×10 ⁴	1.19×10 ⁴	1.17×10 ⁴	1.20×10 ⁴	1.22×10 ⁴	1.23×10 ⁴	1.24×10 ⁴	N.D	96.7	2.30

Cur II	1.50×10^4	1.49×10^4	1.56×10^4	1.41×10^4	1.45×10^4	1.57×10^4	1.46×10^4	N.D	99.3	4.42
Cur III	2.15×10^4	2.06×10^4	2.36×10^4	2.28×10^4	2.14×10^4	2.27×10^4	2.28×10^4	N.D	103.7	4.92
Cur I	2.50×10^5	2.57×10^4	2.47×10^4	2.42×10^4	2.54×10^4	2.41×10^4	2.31×10^4	N.D	98.2	3.87
Cur II	3.00×10^4	3.08×10^4	2.96×10^4	2.91×10^4	3.04×10^4	2.90×10^4	2.76×10^4	N.D	98.1	3.86
Cur III	4.30×10^4	4.49×10^4	4.32×10^4	4.25×10^4	4.44×10^4	4.23×10^4	4.04×10^4	N.D	99.9	3.76

3.6 实际样品分析

目前，农业部公告批准姜黄素的适用范围为鱼配合饲料和鸡配合饲料。经市场调研，发现姜黄素主要用于鱼配合饲料、禽配合饲料、添加剂预混合饲料及混合型饲料添加剂中，搜集了部分配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料以及混合型添加剂进行实际样品分析，结果见表 14。结果可见，在实际添加姜黄素类化合物的样品中，小鸡全价饲料、蛋鸭颗粒饲料、鱼配合饲料中总姜黄素含量分别为 20.6 mg/kg、20.8 mg/kg 和 29.4 mg/kg，小鸡全价饲料（图 17）检测结果与标示量（每吨添加 20 g 姜黄素）相差不大，蛋鸭颗粒饲料（图 18）和鱼配合饲料（图 19）检测结果分别高于标示量的 38%和 47%。姜黄素在淡水鱼配合饲料中的推荐添加量为 200 mg/kg~400 mg/kg，最高限量为 600 mg/kg（以姜黄素总量计），在肉仔鸡配合饲料中的推荐添加量为 50 mg/kg~150 mg/kg，最高限量为 150 mg/kg。检测结果表明，市面上的配合饲料产品中姜黄素的添加量并未按推荐量进行添加，而是远低于推荐量，同时还存在超范围使用的问题。

在 1 份白羽鸡添加剂预混料和 2 份猪用添加剂预混料中检测到姜黄素，白羽鸡预混料、猪用预混料 I 和猪用预混料 II 中总姜黄素含量分别为 930 mg/kg、1665 mg/kg 和 1760 mg/kg，白羽鸡预混料（图 20）中 Cur I、Cur II、Cur III 的比例分别为 90.7%、5.8%和 3.5%，猪用预混料 I 号（图 21）产品中 Cur I、Cur II、Cur III 的比例分别为 76.0%，6.8%和 17.2%，猪用预混料 II 号（图 22）产品中 Cur I、Cur II、Cur III 的比例分别为 95.7%、1.8%和 2.5%。白羽鸡预混料和猪用预混料 II 号产品中 Cur I 的比例高于 90%，而猪用预混料 I 号产品中 Cur I 的比例仅为 76%，不同产品中 Cur I、Cur II、Cur III 的比例存在较大差异，且标识值与实测值差异较大。添加剂预混料也存在超范围使用的问题。

在浓缩饲料和精料补充料的样品中未发现添加姜黄素，含量均 < 2.5 mg/kg。

对市售混合型饲料添加剂姜黄素进行了分析，发现混合型添加剂产品中 Cur I、Cur II、Cur III 的比例也存在较大差异。如混合型饲料添加剂 I 和 II 号样品中（图 23、24），Cur I 的占比大于 95%，混合型添加剂 III 号样品中（图 25），Cur I、Cur II、Cur III 占比分别为 33.4%、28.1%和 38.6%，混合型添加剂 IV 号样品中（图 26），Cur I、Cur II、Cur III 占比分别为 42.7%、21.4%和 36.0%。不同厂家之间产品中姜黄素的差异可能与姜黄素的原料来源以及生产工艺有关。

表 14 实际样品测定结果

样品名称	Cur I mg/kg	Cur II mg/kg	Cur III mg/kg	总姜黄素含量 mg/kg	标示量
小鸡配合饲料	8.30	5.28	7.00	20.6	每吨添加 20 g 姜黄素
蛋鸭颗粒饲料	9.03	4.61	7.13	20.8	每吨添加 15 g 姜黄素
鱼配合饲料	9.92	9.30	10.2	29.4	每吨添加 20 g 姜黄素
白羽鸡预混料	844	53.6	32.2	930	未标识
猪用预混料 I	1265	113	287	1665	1.25 g/kg
猪用预混料 II	1684	32.9	43.4	1760	1.25 g/kg
浓缩饲料-1	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	未标识
浓缩饲料-2	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	未标识
浓缩饲料-3	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	未标识
精补料-1	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	未标识
精补料-2	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	未标识
精补料-3	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	未标识
混添 I 号	9.78×10^4	0.28×10^4	0.05×10^4	10.1×10^4	10%
混添 II 号	4.81×10^4	0.19×10^4	0.08×10^4	5.08×10^4	5%
混添 III 号	3.34×10^4	2.81×10^4	3.86×10^4	10.0×10^4	10%
混添 IV 号	2.16×10^4	1.09×10^4	1.83×10^4	5.08×10^4	5%

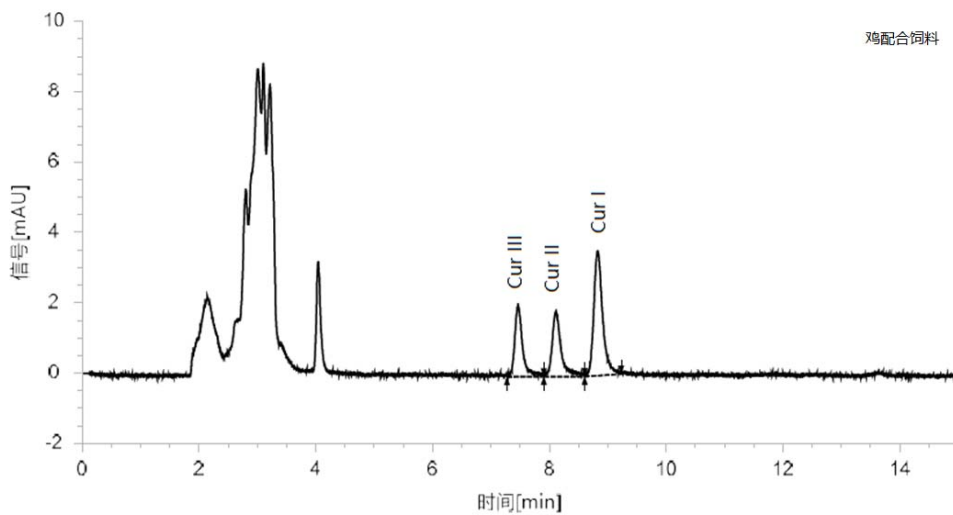


图 17 鸡配合饲料样品液相色谱图

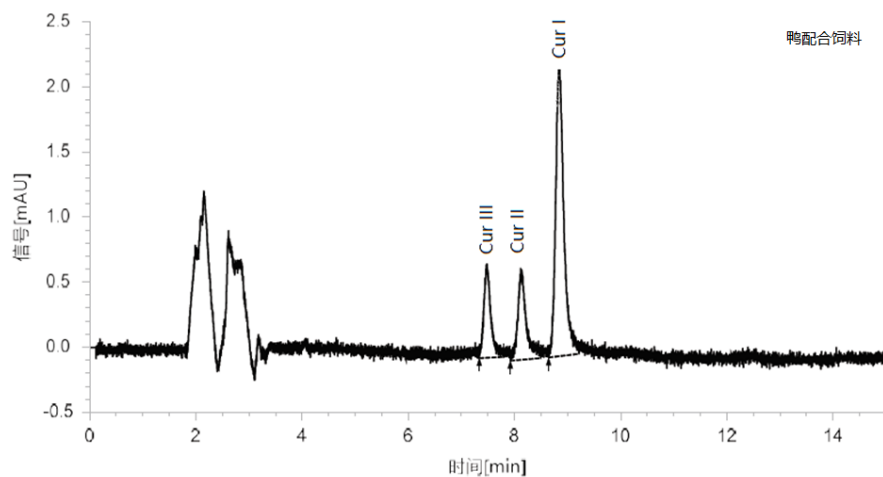


图 18 蛋鸭颗粒饲料样品色谱图

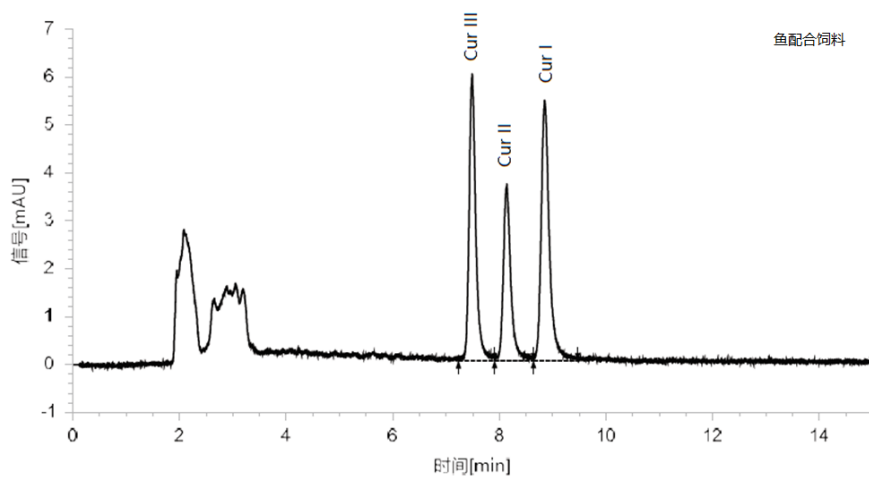


图 19 鱼配合饲料样品色谱图

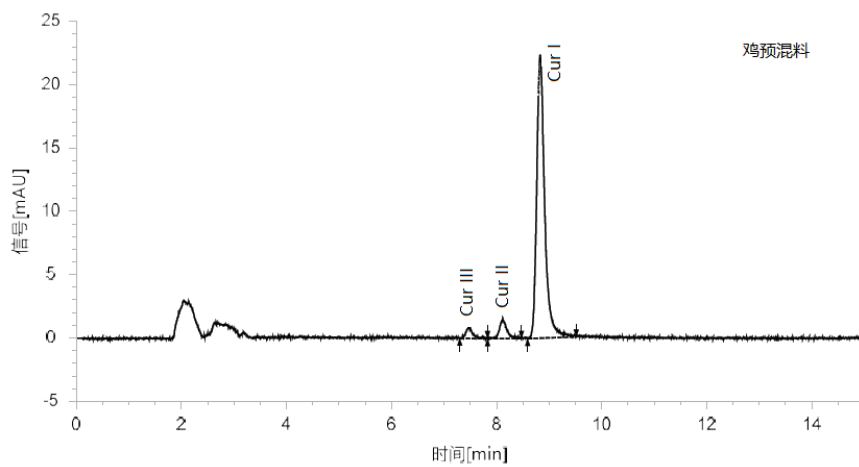


图 20 鸡预混合饲料样品色谱图

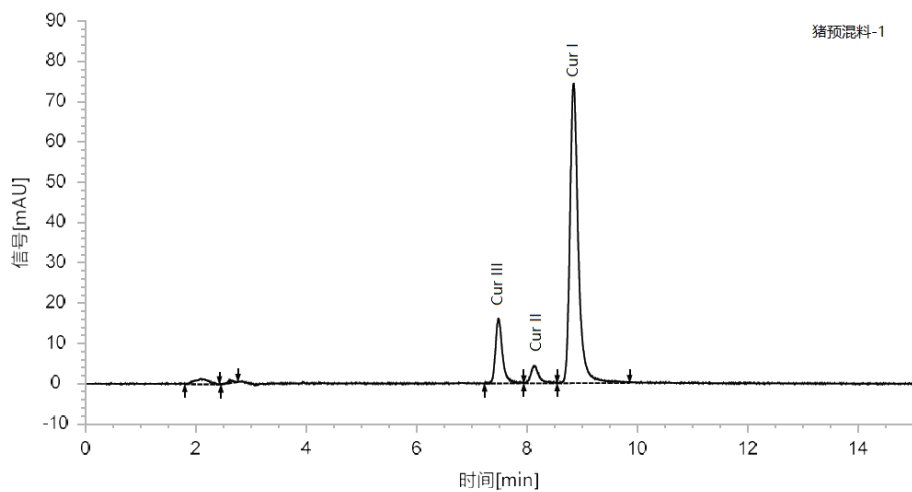


图 21 猪用预混料 I 号样品色谱图

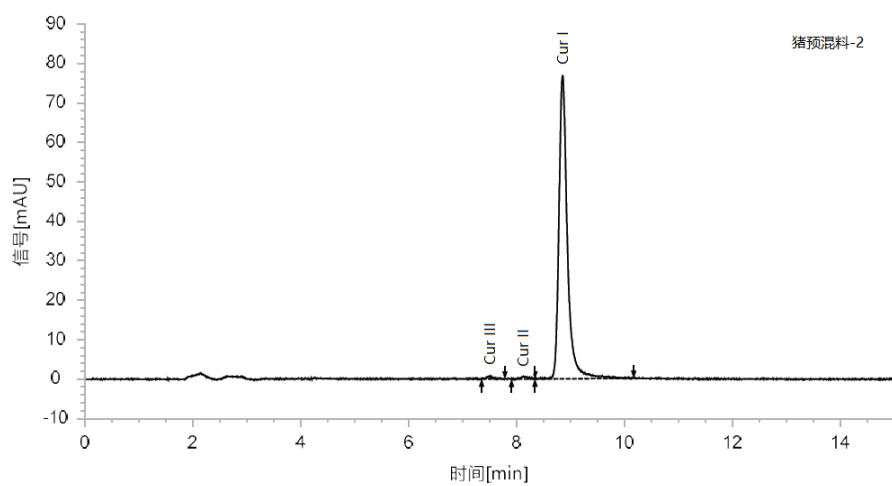


图 22 猪用预混料 II 号样品色谱图

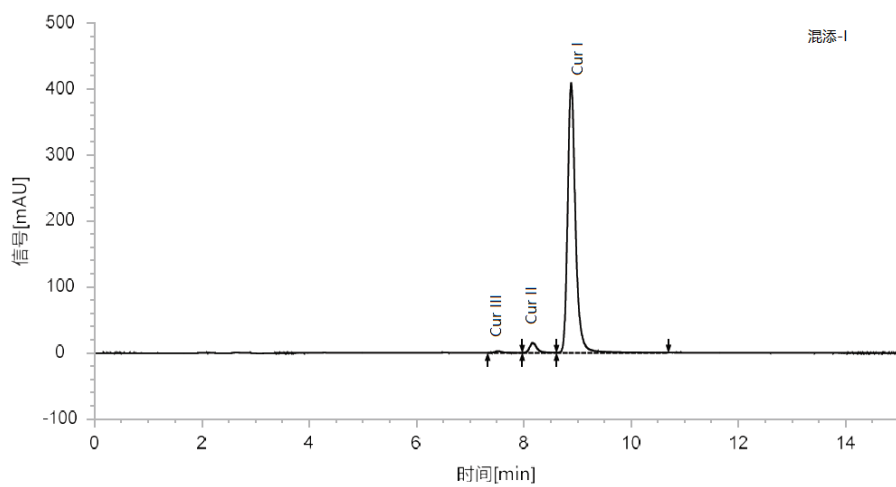


图 23 混合型饲料添加剂 I 号样品色谱图

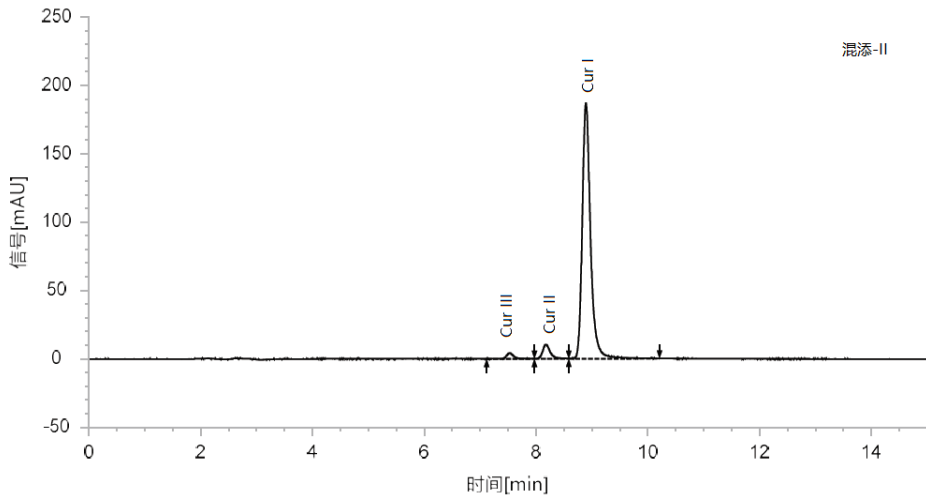


图 24 混合型饲料添加剂 II 号样品色谱图

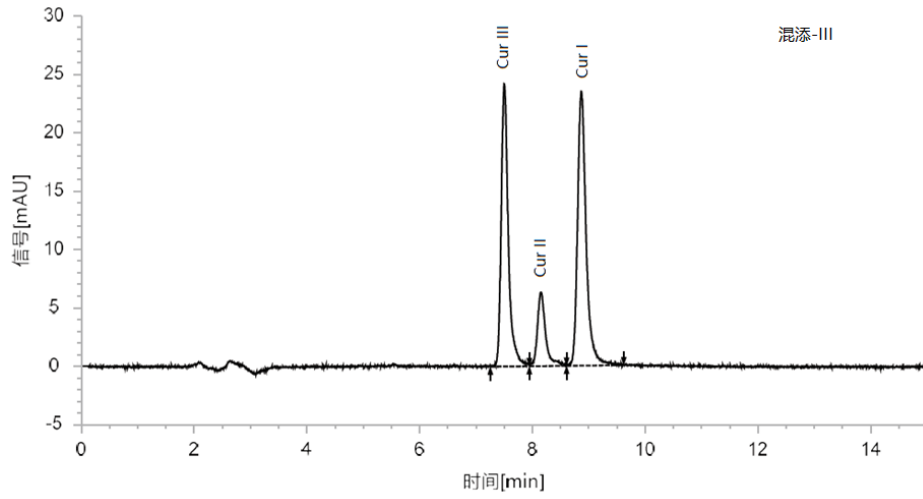


图 25 混合型饲料添加剂 III 号样品色谱图

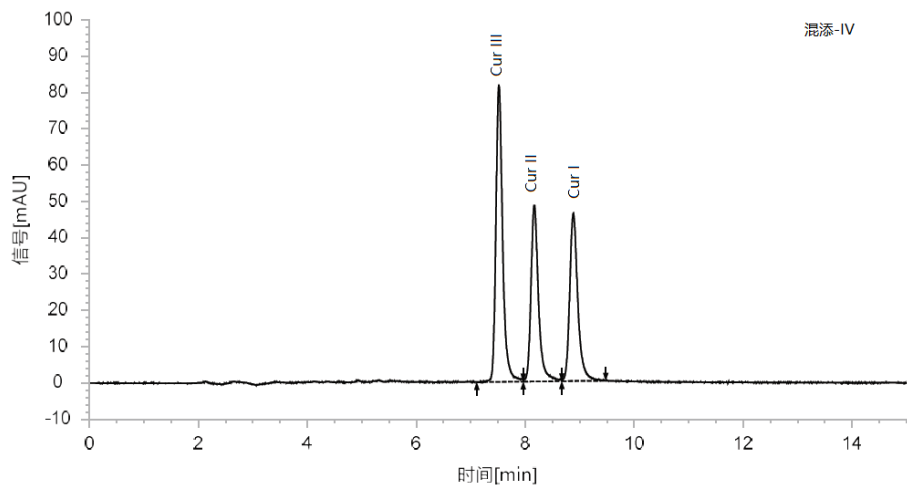


图 26 混合型饲料添加剂 IV 号样品色谱图

3.7 结论

本研究建立的高效液相色谱法测定饲料中姜黄素类化合物的测定方法，具有检测时间短、前处理操作简便、适用性强等特点，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含量的检测需求，弥补了相应检测方法的空白。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

标准征求意见稿的技术内容经过 3 家饲料行业内权威检测机构的试验验证，得出结论：饲料中姜黄素类化合物的测定原理合理，检测方法的过程具有有效性，可操作性，能够快速、准确检测出饲料中姜黄素类化合物的含量。

同时，该方法满足饲料中姜黄素类化合物的测定要求，标准曲线相关系数可达 0.99，方法检出限、定量限可达规定的水平，回收率、精密度符合 GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》的要求。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

对于饲料中姜黄素类化合物含量的高效液相色谱测定方法，国内外均未有同类标准。

在技术内容方面，部分参考了国内食品中姜黄素的测定方法，优化了配合饲料、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的提取方法和检测过程。

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

本标准未采用国内外标准，不涉及采标内容。

六、与有关法律、法规的关系

本标准的制定，综合考虑了标准与《饲料和饲料添加剂管理条例》、《饲料标签》（GB 10648-2013）、《饲料添加剂品种目录》和《饲料添加剂安全使用规范》（农业部公告第 2625 号）、《批准姜黄素、胆汁酸为新饲料添加剂》（农业部公告 2014 年第 2131 号）、《决定将姜黄素的适用范围扩大至肉仔鸡》（农业

农村部公告 2019 年第 123 号) 一致性, 保证了本标准内容与上述法规、标准和规范的协调一致、相互衔接。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在制定过程中广泛征求意见, 包括科研院所、检验机构和饲料生产企业, 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。

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利相关内容。

九、贯彻标准的要求, 以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

为了贯彻实施本标准, 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。

十、其他应当说明的事项

无。