

广东省分析测试协会团体标准
《虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液
相色谱法》
编制说明

《虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法》编制组

2025年1月

目录

1 项目背景	3
2 工作简况	4
2.1 任务来源	4
2.2 主要工作过程	4
2.2.1 标准初稿的起草	4
2.2.2 标准计划立项	4
2.3 征求意见稿的起草	5
2.4 标准的征求意见	5
2.5 本标准与国内外标准关系的说明	5
3 标准编制原则和主要内容的依据	6
3.1 标准编制原则	6
3.2 确定标准主要内容的依据	6
4 方法研究报告	7
4.1 试剂和材料	7
4.2 仪器和设备	7
4.3 方法原理	7
4.4 实验方案	7
4.4.1 标准溶液配制	7
4.4.2 试样制备过程	7
4.4.3 参考色谱条件	8
4.4.4 空白试验	8
4.4.5 分析结果的表述	8
4.5 结果与讨论	9
4.5.1 色谱行为	9
4.5.2 色谱条件的选择	9
4.5.3 前处理的优化	10
5 试验验证情况	11
5.1 基本情况	11
5.2 方法验证单位结果	12
5.2.1 标准曲线	12
5.2.2 方法检出限和定量限	12
5.2.3 方法重复性	13
5.2.4 方法正确度	13
5.2.5 实际典型样品测定	14
5.3 结论	15
6 预期的社会效益	15
7 贯彻实施标准的要求、措施等建议	15
8 其他应当说明的事项	15
9 附件材料	15

1 项目背景

β -蜕皮甾酮（称为“蜕皮激素，蜕皮甾酮和 20-羟基蜕皮甾酮等”）是从鸭跖草科植物珍珠露水草根部提取得到的一种活性物质，是一种天然存在的类固醇成分，具有多种生理活性和应用价值。 β -蜕皮甾酮是“脱壳素”的主要功效成分，是水生甲壳类（虾、蟹等）生长发育、脱壳变态所必需的物质。现今， β -蜕皮甾酮作为饲料添加剂，已被广泛应用于虾蟹类饲料中。虾蟹类饲料不仅提供了虾蟹等水产所需的能量和基本营养素，还包含了增强免疫力、促进生长发育的特殊添加剂。该类饲料具有多种分类和型号，以满足不同生长阶段和养殖需求的营养供给。虾蟹类硬壳动物的蜕壳是其生长和发育的标志特征，蜕壳贯穿于个体发育的始终。虾蟹类均有以大吃小互相残食的习性，如果能提高蜕壳整齐度，可减少互相残食的机率，提高成活率；如果能及时蜕壳，可清除机体有害寄生物，促进生长；虾蟹蜕壳还可以促进新陈代谢和体内蛋白质合成，增强抗应激力。虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮含量必须适中，如果含量过低，达不到预期脱壳效果；如果含量过高，又会导致虾蟹脱壳过频，造成营养不足而导致大面积死亡。目前，关于“虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的分析测定”相关研究文献较少，报道较多的产品类型主要集中在露水草提取物、昆虫血清、中药草和药剂等。而且并无现行有效的国际、国家、行业、地方和团体标准，仅有的标准方法为：“《中国兽药典》（2020 年版）二部露水草提取物项下”，该方法规定了：露水草提取物中主要成分（ β -蜕皮甾酮）的含量测定，该方法并不完全适用于虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮含量的测定。饲料基质比较复杂，采用上述分析方法时，会出现：基质干扰较大，提取不充分等问题。本项目拟通过优化前处理条件和色谱条件，建立具有干扰较小，灵敏度高，重现性好和回收率高的分析方法，实现虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的准确度和定量。

意义：1.本项目拟建立的方法可弥补相关检测空白。2.该方法的建立为饲料中 β -蜕皮甾酮含量测定提供方法依据，可以确保产品质量，使其达到预期的促进生长和脱壳的效果。3.提高养殖效率：适量的 β -蜕皮甾酮能够促进虾蟹及时脱壳，提高生长率，这对于提高养殖效率和经济效益至关重要。检测方法的建立有助于监控和调整饲料配方，以达到最佳养殖效果。4.保障产品安全：准确的检测方法有助于监控饲料中的 β -蜕皮甾酮含量，确保其在安全范围内，进而可保障水产品的食用安全。5.科研与技术创新：建立虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的检测方法，可

以促进相关领域的科研和技术创新，开发出更高效、更环保的提取和检测技术，推动水产养殖业的可持续发展。6.还可为其他类型产品（例如保健食品，化妆品等）中 β -蜕皮甾酮的方法开发提供技术借鉴。

2 工作简况

2.1 任务来源

根据《广东省分析测试协会关于下达 2023 年第一批团体标准立项的公》（粤测协字〔2023〕08 号），广东省分析测试协会下达了编制“饲料中 B-蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法”的项目计划，项目计划编号为 GAIA/JH20230106，任务书起止时间为：2023 年 3 月至 2024 年 3 月。广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）承担该标准的制订工作。饲料种类很多，一般水生甲壳类（虾、蟹等）饲料才会添加 B-蜕皮甾酮，因此“饲料中 B-蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法”更改为“虾蟹类饲料中 B-蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法”。

2.2 主要工作过程

2.2.1 标准初稿的起草

2022 年 3 月组织成立标准起草小组，确定工作进度时间表。2022 年 3 月至 4 月，标准起草小组对该方法进行调研，查阅相关文献和标准方法等资料，了解国内外相关分析方法的研究开展情况。在此基础上确定了本标准制定拟采用的原则、方法和技术依据，确定了本标准的适用范围。本标准方法所用到的实验室设备、试剂和耗材等门槛较低，容易普及。标准起草小组针对虾蟹类饲料产品，通过优化样品前处理条件和色谱条件，建立了虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的分析方法，该方法适用于虾蟹类饲料中 B-蜕皮甾酮的测定，并起草了标准文本的初稿。2023 年 3 月，标准起草小组将完成的团标初稿和标准制修订计划项目任务书提交至广东省分析测试协会。

2.2.2 标准计划立项

在 2023 年 3 月由广东省分析测试协会组织召开的团体标准立项评估会上，该项目顺利通过专家质询，由广东省分析测试协会批准立项。根据《广东省分析测试协会关于下达 2023 年第一批团体标准立项的公》（粤测协字〔2023〕08 号），“饲料中 B-蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法”计划项目编号为 GAIA/JH20230106，计划完成时间为 2024 年 3 月。

2.3 征求意见稿的起草

团体标准立项后，标准起草小组组织并邀请相关饲料企业、检测机构等专家参与标准的制修订。标准起草单位扩充后分别为广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、广州市华莱科检测技术有限公司、广东蔚来生物科技有限公司、西北农林科技大学、广东德宁水产科技有限公司、广州飞禧特生物科技有限公司、沈阳师范大学、长江大学、天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心。

（1）2023年3月~5月，建立标准起草小组，制定本标准开发的技术路线和进度时间表。

（2）2023年6月~2024年2月，通过优化色谱条件（色谱柱的选择，检测波长的选择，流动相种类的选择和梯度优化等），建立虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的高效液相色谱分析方法；针对虾蟹类饲料产品，选择合适的提取方法并进行优化，确保样品前处理条件重现性好，提取效率高和操作简便；对上述优化后的方法进行方法学验证，最终建立虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的高效液相色谱分析方法并用于实际样品测定；

（4）2024年6月~12月，4个单位对本标准方法进行验证，根据验证结果和建议，对本标准方法进行完善，并完成《虾蟹类饲料中B-蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法》(征求意见稿)及编制说明。

（5）2025年1月~2月，广泛征集企业，高校和科研院所、检测机构等相关领域的专家意见，对专家意见进行汇总，根据专家意见对征求意见稿进行修改，完成《虾蟹类饲料中B-蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法》（送审稿）及相应的编制说明，并于2025年3月向广东省分析测试协会提交送审申请。

2.4 标准的征求意见后的工作安排

2025年3月向广东省分析测试协会提交标准送审稿。

2.5 本标准与国内外标准关系的说明

目前关于 β -蜕皮甾酮的检测并无现行有效的国际、国家、行业、地方和团体标准，仅有的标准方法为：“《中国兽药典》（2020年版）二部 露水草提取物 项下”，该方法规定了：露水草提取物中主要成分（ β -蜕皮甾酮）的含量测定，该方法并不完全适用于虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮含量的测定。饲料基质比较复杂，

采用上述分析方法时，会出现：基质干扰较大，提取不充分等问题。

3 标准编制原则和主要内容的依据

3.1 标准编制原则

制定《虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法》遵循以下原则：

(1) 规范性

按 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》和 GB/T 1.2-2020《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》的要求进行制定。

(2) 一致性

与现行有效的相关 β -蜕皮甾酮含量测定的国家法律、法规、标准规范保持一致，对方法提要、分析步骤、结果计算和试验报告等要求作出相应的规定。

(3) 适用性

充分考虑虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定方法现状和现实情况，优化了样品前处理过程、色谱条件等，适用于虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮含量的测定。

(4) 可操作性

标准内的条文清晰、明确，试验方法中的仪器、试剂、实验步骤、结果计算等内容详细、明确，可操作性强。

(5) 先进性

在制定本标准时，参考了现有 β -蜕皮甾酮分析方法等技术标准、指导原则等，对方法的样品前处理步骤、色谱条件、试验结果参数等进行优化，体现了标准的技术性、科学性和先进性。

3.2 确定标准主要内容的依据

目前，“《中国兽药典》（2020年版）二部 露水草提取物 项下”规定了：露水草提取物中主要成分（ β -蜕皮甾酮）的含量测定，然而对于虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮含量的测定，目前还未有现行有效的标准方法，相关研究文献较少。 β -蜕皮甾酮的提取方法有超声波辅助提取法、涡旋振荡法、溶剂回流法和浸提法等，检测方法有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法和紫外分光光度法等，其中高效液相色谱法为常用方法。饲料基质比较复杂，采用上述“露水草提取物”中 β -蜕皮甾酮的分析方法时，会出现：基质干扰较大，提取不充分。

因此，本项目拟通过优化前处理条件（包括：选择合适的提取剂，提取方式和提取参数等）和色谱条件（色谱柱的选择，流动相的优化等），建立具有干扰较小，灵敏度高，重现性好和回收率高的分析方法，实现虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的准确定性和定量分析。

4 方法研究报告

4.1 试剂和材料

甲醇（色谱纯）；甲醇（分析纯）；乙腈（色谱纯）；丙酮（分析纯）；乙醇（分析纯）；一级水（实验用水应符合 GB/T 6682 要求的一级水规格）； β -蜕皮甾酮（98.0%）。

4.2 仪器和设备

Agilent 1260 型高效液相色谱仪，配紫外检测器；BT125D 电子天平；TDZ5-WS 离心机；FB15067 型超声波清洗器；数显电热恒温水浴锅；multi reax 多位试管涡旋震荡器；SY-2230 恒温水浴摇床。

4.3 方法原理

以 40% 甲醇为提取剂，采用超声波辅助提取后，通过高效液相色谱分离，紫外检测器检测试样中 β -蜕皮甾酮，根据保留时间定性，外标法定量。

4.4 实验方案

4.4.1 标准溶液配制

标准储备溶液(200 mg/L)：称取0.01020 g于50 mL容量瓶，用40%甲醇溶解并定容至50 mL。

系列标准工作溶液：分别准确移取 β -蜕皮甾酮标准储备溶液适量，用40%甲醇稀释并定容，配制成浓度分别为10.0 mg/L，5.00 mg/L，2.00 mg/L，0.500mg/L 和0.200 mg/L的标准工作溶液。

4.4.2 试样制备过程

(1) 试样制备

按照 GB/T 20195制备试样，磨碎，通过0.60 mm孔筛，混匀，装入密闭容器中，备用。

(2) 样品前处理

称取试样约1.0g（精确至0.1 mg）于50 mL具塞离心管内，以40%甲醇为提取剂，加入30 mL后超声提取20 min，4000 r/min 离心5min，上清液转移至50 mL

容量瓶，残渣再加入15mL的40%甲醇，重复超声提取一次，合并上清液并定容至50 mL，用0.45 μm微膜过滤，上机测试。

注意：根据试样溶液中β-蜕皮甾酮的浓度高低，可进行适当的稀释，确保上机浓度在标准溶液的线性范围内。

4.4.3 参考色谱条件

色谱柱：C₁₈色谱柱(250mm×4.6mm,5μm)或具同等性能的色谱柱。

流动相A：一级水；

流动相B：甲醇。梯度洗脱，见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	0	11	15	15.1	18
流动相 A/%	70	5	5	70	70
流动相 B/%	30	95	95	30	30

流速：1.0 mL/min。

波长：246 nm。

柱温：35 °C。

进样体积：10 μL。

试样溶液的测定：将制备好的试样溶液注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中β-蜕皮甾酮的浓度。

4.4.4 空白试验

除不加试样外，按“4.4.2”测定步骤进行。

4.4.5 分析结果的表述

结果计算

试样中β-蜕皮甾酮的含量X按下式计算：

$$X=C \times V / m$$

式中：

X——试样中各组分的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

C——试样溶液中β-蜕皮甾酮的浓度，单位为毫克每升(mg/L)；

V——试样溶液的体积，单位为毫升(mL)；

m——试样的质量，单位为克(g)。

结果表示：计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

4.5 结果与讨论

4.5.1 色谱行为

采用本试验方法对 β -蜕皮甾酮标准溶液和试样溶液进行测定，所得色谱图见图 1。由图 1 可知， β -蜕皮甾酮色谱峰形良好，分离度高，干扰较小。

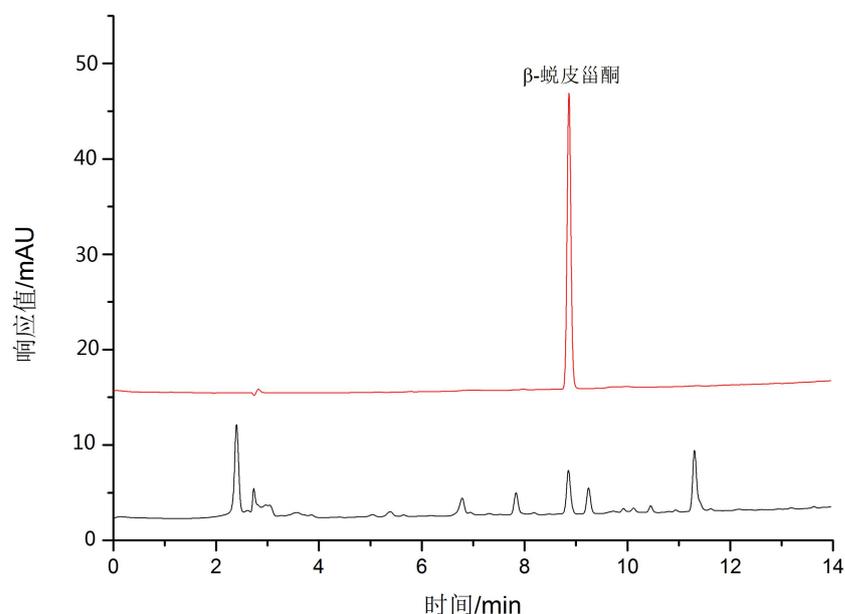


图1 β -蜕皮甾酮标准溶液和样品色谱图

4.5.2 色谱条件的选择

(1) 检测波长的选择

采用紫外分光光度计在(190-400nm)范围内对 β -蜕皮甾酮进行全波长扫描。由光谱图可知 β -蜕皮甾酮在(190-220nm)和(240-250nm)范均有较强吸收，由于(190-220nm)接近常用有机溶剂(甲醇、乙腈等)的紫外吸收截止波长，在梯度洗脱时容易引起较大的基线噪音，因此检测波长选择 246nm。

(2) 色谱柱的选择

常用的反相色谱柱有 C_{30} 柱， C_{18} 柱和 C_8 柱。在同等色谱条件下，分别采用 C_{30} 柱， C_{18} 柱和 C_8 柱对试样溶液进行测定，样品中 β -蜕皮甾酮均可实现良好分离，但是 β -蜕皮甾酮出峰时间逐次延长，其中 C_{18} 柱中 β -蜕皮甾酮保留时间为 8.9 min，保留时间适中，而且 C_{18} 柱应用最广，简单易得。综合考虑选定 C_{18} 柱。

(3) 流动相优化

在反相高效液相色谱中，流动相常选甲醇-水体系或乙腈-水体系。采用甲醇-水体系时，由图 1 可知 β -蜕皮甾酮具有较好的分离度、理论塔板数和不对称因

子，而且甲醇成本低于乙腈，毒性较小，综合考虑选定甲醇-水体系作为色谱流动相。

(4) 柱温的选择

考察柱温（20℃、25℃、30℃、35℃、40℃）对β-蜕皮甾酮保留时间和选择性的影响。柱温升高，流动相的粘度降低，柱压逐渐减小；柱温越高，分子动能增大，氢键断裂，疏水作用减弱，β-蜕皮甾酮保留时间减小。综合考虑，选择柱温为 35℃。

4.5.3 前处理的优化

(1) 提取剂种类的选择

样品为虾类饲料，分别采用甲醇、乙醇、乙腈和丙酮为提取剂。其他前处理步骤同“4.4.2”。结果见图 2，可知甲醇提取率最高，而且色谱峰形良好。综上所述，选择甲醇作为提取剂。

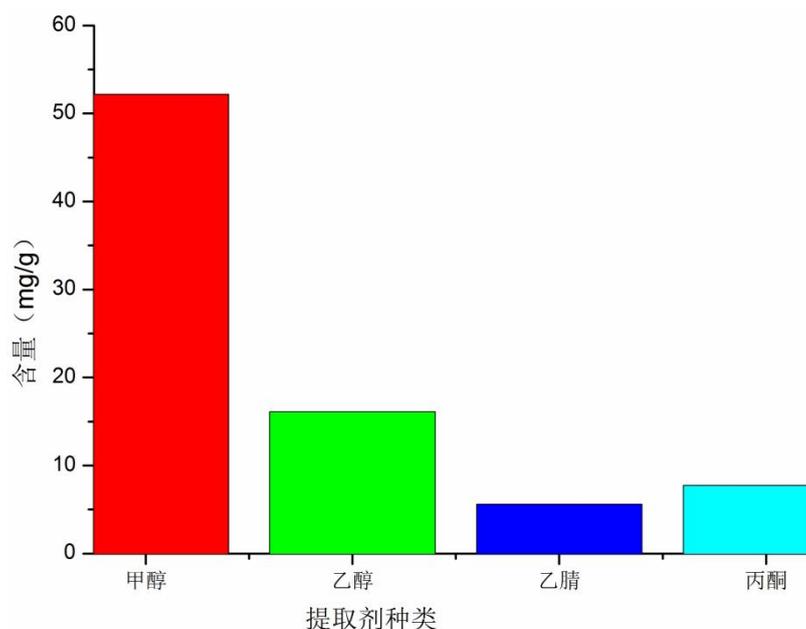


图 2 提取剂种类对β-蜕皮甾酮含量的影响

(2) 甲醇溶液浓度的优化

样品为虾类饲料，分别采用 100%、80%、60%、40%、20%、0%的甲醇溶液为提取剂。其他前处理步骤同“4.4.2”。结果见图 3，结果表明 40%的甲醇溶液测得提取率最高，因此选择 40%甲醇溶液为提取剂。

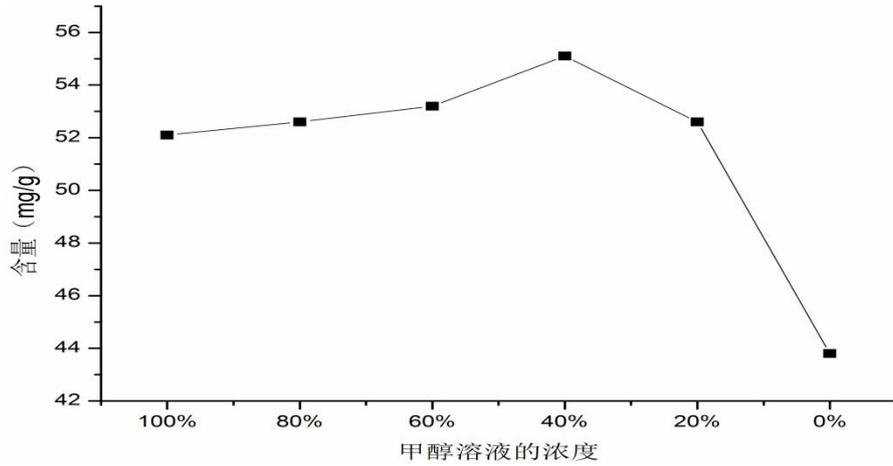


图3 甲醇溶液浓度对 β -蜕皮甾酮含量的影响

(3) 提取方式的选择

样品为虾类饲料，提取剂为甲醇，提取方式分别为：涡旋提取法，振荡提取法，超声波辅助提取法、回流提取法和溶剂浸提法，其他前处理步骤同“4.4.2”。结果见图4，结果表明超声波辅助提取法与回流提取法的测得含量均较高，溶剂浸提法最低。综合考虑，提取方式选择声波辅助提取法。

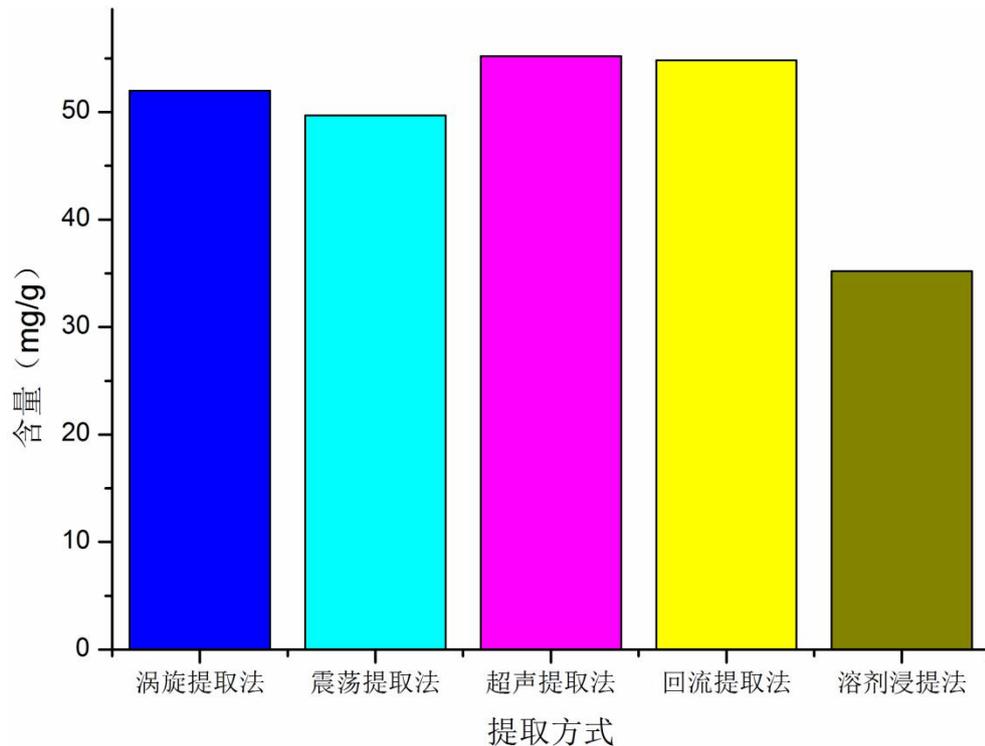


图4 提取方式对 β -蜕皮甾酮含量的影响

5 试验验证情况

5.1 基本情况

为确保本方法通则的统一性、协调性、适用性、一致性、规范性和可操作性，

标准起草工作小组组织 4 个实验室，包括广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、广州市华莱科检测技术有限公司、西北农林科技大学和天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心对本标准方法进行了验证。

5.2 方法验证结果

5.2.1 标准曲线

将 β -蜕皮甾酮的系列标准工作液分别注入高效液相色谱仪中，测得相应的峰面积，以系列标准工作液质量浓度(mg/L)为横坐标(X)，色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。各方法确认单位测试 β -蜕皮甾酮的工作标准曲线和相关系数如表 2 所示，可见在 0.200 $\mu\text{g/mL}$ -10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内， β -蜕皮甾酮的浓度与峰面积的线性相关性好，4 家单位测试得到的标准曲的相关系数均在 0.999 以上。

表 2 标准曲线和相关系数结果汇总

验证单位	标准曲线范围（0.200 $\mu\text{g/mL}$ -10.0 $\mu\text{g/mL}$ ）	
	回归方程	相关系数（r）
广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）	$Y=26.14X+1.054$	0.99996
西北农林科技大学	$Y=26.19X+1.285$	0.99961
天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心	$Y=27.39X-1.530$	0.99925
广州市华莱科检测技术有限公司	$Y=62.8X-2.6$	0.9999

5.2.2 方法检出限和定量限

检出限通常通过信噪比（S/N）来确定，以仪器信噪比(SN)=3 时， β -蜕皮甾酮的浓度作为检出限，以仪器信噪比(SN)=10 时， β -蜕皮甾酮的浓度作为定量限。4 家单位测试结果见表 3。当称样量为 1.0g，定容体积为 50.0mL，进样量为 20 μL ，稀释倍数为 1 时，本方法的检出限范围为 1.5 mg/kg-3.5 mg/kg，定量限范围为 5.0 mg/kg-10.0 mg/kg。

表 3 方法检出限和定量限结果汇总

验证单位	β -蜕皮甾酮（mg/kg）
------	----------------------

	检出限	定量限
广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）	1.5	5.0
西北农林科技大学	2.0	6.0
天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心	3.5	10.0
广州市华莱科检测技术有限公司	1.5	5.0

5.2.3 方法重复性

4 家单位分别对虾类饲料和蟹类饲料样品进行重复性精密度测定，每个样品均称取 6 个平行，计算 β -蜕皮甾酮含量的精密度。4 家单位测试结果见表 4。由表 4 可知，虾类饲料样品中 β -蜕皮甾酮含量的精密度范围为 2.28%-4.51%，蟹类饲料样品中 β -蜕皮甾酮含量的精密度范围为 2.01%-3.12%。

表 4 方法重复性结果汇总

验证单位	β -蜕皮甾酮精密度 (%)	
	虾类饲料	蟹类饲料
广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）	3.50	2.26
西北农林科技大学	4.51	3.12
天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心	3.00	2.74
广州市华莱科检测技术有限公司	2.28	2.01

5.2.4 方法正确度

方法的正确度通过加标回收率考查。虾类饲料和蟹类饲料均称取 6 份平行样，分别加入低、中和高 3 个质量浓度，每个加标水平均做 6 平行，计算求得加标回收率及精密度，结果见表 5。由表 5 可知虾类饲料在 3 个浓度加标水平的回收率范围为 91.5%~101.4%，精密度范围为 1.51%~5.73%；蟹类饲料在 3 个浓度加标水平的回收率范围为 93.4%~99.7%，精密度范围为 1.75%~5.93%。

表 5 方法正确度结果汇总

验证单位	虾类饲料加标回收率
------	-----------

	加标 1（低浓度）		加标 2（中浓度）		加标 3（高浓度）	
	回收率%	精密度%	回收率%	精密度%	回收率%	精密度%
广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）	95.0	1.51	95.9	1.96	101.4	2.16
西北农林科技大学	96.4	3.03	95.3	3.57	99.3	4.11
天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心	96.4	5.62	99.0	5.73	97.2	4.93
广州市华莱科检测技术有限公司	91.5	3.60	97.8	5.16	98.0	4.56
验证单位	蟹类饲料加标回收率					
	加标 1（低浓度）		加标 2（中浓度）		加标 3（高浓度）	
	回收率%	精密度%	回收率%	精密度%	回收率%	精密度%
广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）	95.8	1.75	96.8	3.95	98.3	2.37
西北农林科技大学	99.3	5.93	95.1	4.65	95.9	4.17
天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心	97.3	4.54	99.7	2.37	97.8	4.29
广州市华莱科检测技术有限公司	98.4	3.77	94.9	4.67	93.4	3.64

5.2.5 实际典型样品测定

选取三种常见的虾蟹类饲料样品（罗氏虾料，螃蟹料和斑节虾料）进行测定，每个样品均做 2 平行。结果见表 6。由表 6 可知实验室间罗氏虾料中 β -蜕皮甾酮的精密度为 1.22%；蟹料中 β -蜕皮甾酮的精密度为 1.45%；斑节虾料中 β -蜕皮甾酮的精密度为 2.76%。

表 6 实际典型样品测定含量汇总

验证单位	β -蜕皮甾酮					
	罗氏虾料		蟹料		斑节虾料	
	含量 (mg/kg)	精密度%	含量 (mg/kg)	精密度%	含量 (mg/kg)	精密度%
广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）	37.4	1.22	25.5	1.45	15.0	2.76
西北农林科技大学	38.1		25.9		15.4	
天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心	37.9		25.4		14.4	
广州市华莱科检测技术有限公司	37.1		25.0		15.0	

5.3 结论

实验结果表明： β -蜕皮甾酮在 0.200~10.0 mg/L 范围内线性良好；方法检出限和定量限较低；方法重复性精密度良好；方法准确可靠；实验室间重现性良好；操作简便快速、干扰较小，适用于虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的准确定性和定量。

6 预期的社会效益

1.关于虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮含量的测定，目前还未有现行有效的标准方法，本标准的制定可弥补相关空白。

2.本标准的方法简单易行，易于被相关生产企业采纳；也可为饲料中 β -蜕皮甾酮的监管提供检测方法参考和技术支撑。

7 贯彻实施标准的要求、措施等建议

无。

8 其他应当说明的事项

无。

9 附件材料

附件 1 方法确认报告--西北农林科技大学

附件 2 方法验证报告-天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心

附件 3 方法验证报告-广州市华莱科检测技术有限公司

广东省分析测试协会团体标准 方法确认报告

项目名称：虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法

委托单位：广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)

验证单位：西北农林科技大学



编 制：王建龙

验证时间：2024年6月1日-2024年10月31日

一、验证内容

1 方法来源：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）

2 验证内容：验证《虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法》的标准曲线和相关系数、检出限、定量限、精密度和正确度。

二、方法验证主要内容

1 试剂和材料

β -蜕皮甾酮（98.0%）；一级水（实验用水应符合 GB/T 6682 要求的一级水规格）；甲醇（色谱纯）；甲醇（分析纯）。

2 仪器和设备

Agilent 1260 型高效液相色谱仪，配紫外检测器；BT125D 电子天平；KQ2200 型超声波清洗器；TDZ5-WS 离心机。

3 实验步骤

3.1 标准溶液配制

标准储备溶液：称取 0.01021 g 于 50.0 mL 容量瓶，用 40%甲醇溶解并定容至 50.0 mL，标准溶液浓度为 200 mg/L。

系列标准工作溶液：分别移取 β -蜕皮甾酮标准储备溶液适量，用 40%甲醇稀释并定容，配制成浓度分别为 10.0 mg/L，5.00 mg/L，2.00 mg/L，0.500mg/L 和 0.200 mg/L 的标准工作溶液。

3.2 供试品溶液制备

3.2.1 试样制备

按照 GB/T 20195 制备试样，磨碎，全部通过 0.60 mm 孔筛，混匀，装入密闭容器中，备用。

3.2.2 样品前处理

称取试样约 1.0 g（精确至 0.1 mg）于 50.0 mL 具塞离心管内，以 40%甲醇为提取剂，加入 30.0 mL 后超声提取 20 min，4000 r/min 离心 5.0 min，上清液转移至 50.0 mL 容量瓶，残渣再加入 15.0 mL 的 40%甲醇，重复超声提取一次，合并上清液并定容至 50.0 mL，用 0.45 μ m 微膜过滤，上机测试。

注意：根据供试品溶液中 β -蜕皮甾酮的浓度高低，可进行适当的稀释，确保上机浓度在标准溶液的线性范围内。

3.3 参考色谱条件

3.3.1 色谱柱：C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m)或具同等性能的色谱柱。

3.3.2 流动相A：一级水；流动相B：甲醇。梯度洗脱，见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	0	11	15	15.1	18
流动相 A/%	70	5	5	70	70
流动相 B/%	30	95	95	30	30

3.3.3 流速：1.0 mL/min。

3.3.4 波长：246 nm。

3.3.5 柱温：35 °C。

3.3.6 进样体积：20 μL。

3.3.7 试样溶液的测定

将制备好的试样溶液注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，根据标准曲线得到待测液中的β-蜕皮甾酮的浓度。

3.4 空白试验

除不加试样外，按上述测定步骤进行。

3.5 分析结果的表述

3.5.1 结果计算

试样中β-蜕皮甾酮的含量X按下式计算：

$$X=C \times V/m$$

式中：

X——试样中各组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)；

C——试样溶液中β-蜕皮甾酮的浓度,单位为毫克每升(mg/L)；

V——试样溶液的体积,单位为毫升(mL)；

m——试样的质量，单位为克（g）。

3.5.2 结果表示

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

4 方法学验证

4.1 线性范围、检出限和定量限

4.1.1 线性范围

以系列标准工作液质量浓度(mg/L)为横坐标(X)，色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。求得线性回归方程为 $Y=26.19X+1.285$ 。相关系数(r)为 0.99961。由此可知 β-蜕皮甾

酮在 0.200~10.0mg/L 范围内线性良好。

4.1.2 检出限和定量限

以仪器信噪比(SN)=3 时, β -蜕皮甾酮的浓度作为检出限, 以仪器信噪比(SN)=10 时, β -蜕皮甾酮的浓度作为定量限。当称样量为 1.0 g, 定容体积为 50.0 mL, 进样量为 20 μ L, 稀释倍数为 1 时, 本方法的检出限为 2.0 mg/kg, 定量限为 6.0 mg/kg。

4.2 方法重复性精密度

按照“3.2.2”称取虾类饲料和蟹类饲料各 6 份平行样, 上机测定 β -蜕皮甾酮的含量, 结果见表 2。由表 2 可知虾类饲料和蟹类饲料的精密度分别为 4.51%和 3.12%, 表明该方法的重复性良好。

表 2 方法重复性

虾类饲料 (含量)	1	2	3	4	5	6	平均值	相对标准 偏差%
mg/kg	37.9	38.2	38.3	39.8	39.1	34.8	38.0	4.51
蟹类饲料 (含量)	1	2	3	4	5	6	平均值	相对标准 偏差%
mg/kg	27.7	26.2	25.5	26.2	26.1	27.4	26.5	3.12

4.3 正确度试验

方法的正确度通过加标回收率考查。虾类饲料和蟹类饲料各称取 6 份平行样, 分别加入低、中和高 3 个质量浓度, 每个加标水平均做 6 平行, 计算求得加标回收率及精密度, 结果见表 3 和表 4。结果表明该方法的准确度和加标回收率的精密度良好。

表 3 虾类饲料方法正确度。

序列号	样品	本底值/ (mg/kg)	添加量/(μg)	回收率 (%)	平均回收率/%	RSD/%
1				96.6		
2				94.9		
3	虾类饲料	38.0	20	101.1	96.4	3.03
4				92.3		
5				96.2		
6				97.3		
7				94.4		
8				92.2		
9	虾类饲料	38.0	30	94.9	95.3	3.57
10				94.6		
11				93.5		
12				101.9		
13				95.4		
14				99.3		
15	虾类饲料	38.0	40	103.3	99.3	4.11
16				102.5		
17				93.4		
18				101.9		

表 4 蟹类饲料方法正确度。

序列号	样品	本底值/ (mg/kg)	添加量/(μg)	回收率 (%)	平均回收率/%	RSD/%
1				94.9		
2				92.8		
3	蟹类饲料	26.5	20	100.8	99.3	5.93
4				109.4		
5				100.8		
6				97.2		
7				93.0		
8				103.3		
9	蟹类饲料	26.5	30	92.9	95.1	4.65
10				92.0		
11				97.3		
12				92.4		
13				94.0		
14				92.8		
15	蟹类饲料	26.5	40	94.9	95.9	4.17
16				94.6		
17				103.9		
18				95.1		

4.4 实际典型样品测定

选取三种常见的虾蟹类饲料样品（罗氏虾料，螃蟹料和斑节虾料）进行测定，每个样品均做 2 平行。结果见表 5。

表 5 实际典型样品测定含量汇总

β-蜕皮甾酮					
罗氏虾料		蟹料		斑节虾料	
含量 (mg/kg)	相对偏差 %	含量 (mg/kg)	相对偏差 %	含量 (mg/kg)	相对偏差 %
38.1	0.79	25.9	1.00	15.4	1.00

5 结论

实验结果表明：该方法在指定的标准曲线范围内，线性相关系数良好；检出限和定量限较低；方法的重复性精密度和正确度良好；总之该方法能够满足虾蟹类饲料中 β-蜕皮甾酮的测定要求。

广东省分析测试协会团体标准 方法确认报告

项目名称：虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法

委托单位：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）

验证单位：天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心

编 制：史艳艳

验证时间：2024年6月1日-2024年10月31日



一、验证内容

1 方法来源：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）

2 验证内容：验证《虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法》的标准曲线和相关系数、检出限、定量限、精密度和准确度。

二、方法验证主要内容

1 试剂和材料

甲醇（色谱纯）；甲醇（分析纯）、一级水（实验用水应符合 GB/T 6682 要求的一级水规格）； β -蜕皮甾酮（98.0%）。

2 仪器和设备

Agilent 1200 型高效液相色谱仪，配紫外检测器；ME155DU 电子天平；IEC CL31R 离心机；CX-250 型超声波清洗机。

3 实验步骤

3.1 标准溶液配制

标准储备溶液：称取 0.01020 g 于 50.0 mL 容量瓶，用 40%甲醇溶解并定容至 50.0 mL，标准溶液浓度为 200 mg/L。

系列标准工作溶液：分别移取 β -蜕皮甾酮标准储备溶液适量，用 40%甲醇稀释并定容，配制成浓度分别为 10.0 mg/L，5.00 mg/L，2.00 mg/L，0.500mg/L 和 0.200 mg/L 的标准工作溶液。

3.2 供试品溶液制备

3.2.1 试样制备

按照 GB/T 20195 制备试样，磨碎，全部通过 0.60 mm 孔筛，混匀，装入密闭容器中，备用。

3.2.2 样品前处理

称取试样约 1.0 g（精确至 0.1 mg）于 50.0 mL 具塞离心管内，以 40%甲醇为提取剂，加入 30.0 mL 后超声提取 20 min，4000 r/min 离心 5.0 min，上清液转移至 50.0 mL 容量瓶，残渣再加入 15.0 mL 的 40%甲醇，重复超声提取一次，合并上清液并定容至 50.0 mL，用 0.45 μ m 微膜过滤，上机测试。

注意：根据供试品溶液中 β -蜕皮甾酮的浓度高低，可进行适当的稀释，确保上机浓度在标准溶液的线性范围内。

3.3 参考色谱条件

3.3.1 色谱柱： C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)或具同等性能的色谱柱。

3.3.2 流动相A：一级水；流动相B：甲醇。梯度洗脱，见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	0	11	15	15.1	18
流动相 A/%	70	5	5	70	70
流动相 B/%	30	95	95	30	30

3.3.3 流速：1.0 mL/min。

3.3.4 波长：246 nm。

3.3.5 柱温：35 ℃。

3.3.6 进样体积：20 μL。

3.3.7 试样溶液的测定

将制备好的试样溶液注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，根据标准曲线得到待测液中的β-蜕皮甾酮的浓度。

3.4 空白试验

除不加试样外，按上述测定步骤进行。

3.5 分析结果的表述

3.5.1 结果计算

试样中β-蜕皮甾酮的含量X按下式计算：

$$X=C \times V/m$$

式中：

X——试样中各组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)；

C——试样溶液中β-蜕皮甾酮的浓度,单位为毫克每升(mg/L)；

V——试样溶液的体积,单位为毫升(mL)；

m——试样的质量，单位为克（g）。

3.5.2 结果表示

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

4 方法学验证

4.1 线性范围、检出限和定量限

4.1.1 线性范围

以系列标准工作液质量浓度(mg/L)为横坐标(X)，色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。求得线性回归方程为 $Y=27.39X-1.530$ 。相关系数(R)为 0.99925。由此可知β-蜕皮甾

酮在 0.200~10.0mg/L 范围内线性良好。

4.1.2 检出限和定量限

以仪器信噪比(SN)=3 时, β -蜕皮甾酮的浓度作为检出限, 以仪器信噪比(SN)=10 时, β -蜕皮甾酮的浓度作为定量限。当称样量为 1.0g, 定容体积为 50.0mL, 进样量为 20 μ L, 稀释倍数 1 时, 本方法的检出限为 3.5 mg/kg, 定量限为 10.0 mg/kg。

4.2 方法重复性精密度

按照“3.2.2”称取虾类饲料和蟹类饲料各 6 份平行样, 上机测定 β -蜕皮甾酮的含量, 结果见表 2。由表 2 可知虾类饲料和蟹类饲料的精密度分别为 3.00%和 2.74%, 表明该方法的重复性良好。

表 2 方法重复性

虾类饲料 (含量)	1	2	3	4	5	6	平均值	相对标准 偏差%
mg/kg	36.8	39.2	36.4	39.1	38.1	37.7	37.9	3.00
蟹类饲料 (含量)	1	2	3	4	5	6	平均值	相对标准 偏差%
mg/kg	25.8	24.2	25.0	24.5	24.9	25.9	25.1	2.74

4.3 正确度试验

方法的正确度通过加标回收率考查。虾类饲料和蟹类饲料各称取 6 份平行样, 分别加入低、中和高 3 个质量浓度, 每个加标水平均做 6 平行, 计算求得加标回收率及精密度, 结果见表 3 和表 4。结果表明该方法的准确度和加标回收率的精密度良好。



表 3 虾类饲料方法正确度。

序列号	样品	本底值/ (mg/kg)	添加量/(μg)	回收率 (%)	平均回收率/%	RSD/%
1				93.7		
2				107.1		
3	虾类饲料	37.9	20	92.6	96.4	5.62
4				97.1		
5				94.3		
6				93.8		
7				90.0		
8				102.3		
9	虾类饲料	37.9	30	103.8	99.0	5.73
10				94.6		
11				104.2		
12				99.4		
13				103.0		
14				93.5		
15	虾类饲料	37.9	40	91.8	97.2	4.93
16				103.1		
17				95.6		
18				96.2		

表 4 蟹类饲料方法正确度。

序列号	样品	本底值/ (mg/kg)	添加量/ (μg)	回收率 (%)	平均回收率/%	RSD/%
1				98.5		
2				102.1		
3	蟹类饲料	25.1	20	99.1	97.3	4.54
4				93.5		
5				100.1		
6				90.4		
7				98.7		
8				103.6		
9	蟹类饲料	25.1	30	98.4	99.7	2.37
10				97.5		
11				101.7		
12				98.4		
13				93.9		
14				99.8		
15	蟹类饲料	25.1	40	104.1	97.8	4.29
16				94.6		
17				100.3		
18				94.2		

4.4 实际典型样品测定

选取三种常见的虾蟹类饲料样品（罗氏虾料，螃蟹料和斑节虾料）进行测定，每个样品均做平行样。结果见表 5。

表 5 实际典型样品测定含量汇总

β-蜕皮甾酮					
罗氏虾料		蟹料		斑节虾料	
含量 (mg/kg)	相对偏差 %	含量 (mg/kg)	相对偏差 %	含量 (mg/kg)	相对偏差 %
37.9	1.17	25.4	3.79	14.4	2.37

5 结论

实验结果表明：该方法在指定的标准曲线范围内，线性相关系数良好；检出限和定量限较低；方法的重复性精密度和正确度良好；总之该方法能够满足虾蟹类饲料中β-蜕皮甾酮的工作要求。

广东省分析测试协会团体标准

方法确认报告

项目名称：虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法

委托单位：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）

验证单位：广州市华莱检测技术有限公司

编制：黄芙蓉

验证时间：2024年12月1日-2024年12月29日



海子三集

一、验证内容

1 方法来源：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）

2 验证内容：验证《虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法》的标准曲线和相关系数、检出限、定量限、精密度和正确度。

二、方法验证主要内容

1 试剂和材料

β -蜕皮甾酮（98.0%）；一级水（实验用水应符合GB/T 6682要求的一级水规格）；甲醇（色谱纯）；甲醇（分析纯）。

2 仪器和设备

Waters e2695型高效液相色谱仪，配紫外检测器；BSA224S电子天平；SB25-12DTD型超声波清洗器；TG16离心机。

3 实验步骤

3.1 标准溶液配制

标准储备溶液：称取0.01021 g于50.0 mL容量瓶，用40%甲醇溶解并定容至50.0 mL，标准溶液浓度为200 mg/L。

系列标准工作溶液：分别移取 β -蜕皮甾酮标准储备溶液适量，用40%甲醇稀释并定容，配制成浓度分别为10.0 mg/L，5.00 mg/L，2.00 mg/L，0.500mg/L和0.200 mg/L的标准工作溶液。

3.2 供试品溶液制备

3.2.1 试样制备

按照 GB/T 20195制备试样，磨碎，全部通过0.60 mm孔筛，混匀，装入密闭容器中，备用。

3.2.2 样品前处理

称取试样约1.0 g（精确至0.1 mg）于50.0 mL具塞离心管内，以40%甲醇为提取剂，加入30.0 mL后超声提取20 min，4000 r/min 离心5.0 min，上清液转移至50.0 mL容量瓶，残渣再加入15.0 mL的40%甲醇，重复超声提取一次，合并上清液并定容至50.0 mL，用0.45 μ m 微膜过滤，上机测试。

注意：根据供试品溶液中 β -蜕皮甾酮的浓度高低，可进行适当的稀释，确保上机浓度在标准溶液的线性范围内。

3.3 参考色谱条件

3.3.1 色谱柱： C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)或具同等性能的色谱柱。

3.3.2 流动相A：一级水；流动相B：甲醇。梯度洗脱，见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	0	11	15	15.1	18
流动相 A/%	70	5	5	70	70
流动相 B/%	30	95	95	30	30

3.3.3 流速：1.0 mL/min。

3.3.4 波长：246 nm。

3.3.5 柱温：35 ℃。

3.3.6 进样体积：20 μL。

3.3.7 试样溶液的测定

将制备好的试样溶液注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，根据标准曲线得到待测液中的β-蜕皮甾酮的浓度。

3.4 空白试验

除不加试样外，按上述测定步骤进行。

3.5 分析结果的表述

3.5.1 结果计算

试样中β-蜕皮甾酮的含量X按下式计算：

$$X=C \times V/m$$

式中：

X——试样中各组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)；

C——试样溶液中β-蜕皮甾酮的浓度,单位为毫克每升(mg/L)；

V——试样溶液的体积,单位为毫升(mL)；

m——试样的质量，单位为克（g）。

3.5.2 结果表示

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

4 方法学验证

4.1 线性范围、检出限和定量限

4.1.1 线性范围

以系列标准工作液质量浓度(mg/L)为横坐标(X)，色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。求得线性回归方程为 $Y=62.8X-2.6$ 。相关系数(r)为 0.9999。由此可知β-蜕皮甾酮在 0.200~10.0mg/L 范围内线性良好。

4.1.2 检出限和定量限

以仪器信噪比(SN)=3 时，β-蜕皮甾酮的浓度作为检出限，以仪器信噪比(SN)=10 时，β-蜕皮甾酮的浓度作为定量限。当称样量为1.0 g，定容体积为50.0 mL，进样量为10

μL，稀释倍数为1时，本方法的检出限为1.5 mg/kg，定量限为5.0 mg/kg。

4.2 方法重复性精密度

按照“3.2.2”称取虾类饲料和蟹类饲料各6份平行样，上机测定β-蜕皮甾酮的含量，结果见表2。由表2可知虾类饲料和蟹类饲料的精密度分别为2.28%和2.01%，表明该方法的重复性良好。

表2 方法重复性

虾类饲料1 (含量)	2	3	4	5	6	平均值	相对标准偏 差%
mg/kg	35.1	36.8	37.3	36.9	35.7	36.1	2.28
蟹类饲料1 (含量)	2	3	4	5	6	平均值	相对标准偏 差%
mg/kg	24.2	24.7	24.2	25.3	23.9	24.6	2.01

4.3 正确度试验

方法的正确度通过加标回收率考查。虾类饲料和蟹类饲料各称取6份平行样，分别加入低、中和高3个质量浓度，每个加标水平均做6平行，计算求得加标回收率及精密度，结果见表3和表4。结果表明该方法的准确度和加标回收率的精密度良好。

表3 虾类饲料方法正确度。

序列号	样品	本底值/ (mg/kg)	添加量/ (μg)	回收率 (%)	平均回收率/%	RSD/%
1				91.4		
2	虾类饲料	36.3	20	89.8	91.5	3.60
3				86.8		
4				91.2		

5				96.4		
6				93.7		
7				97.5		
8				93.2		
9	虾类饲料	36.3	30	95.1	97.8	5.16
10				106.2		
11				101.0		
12				93.7		
13				96.2		
14				95.3		
15	虾类饲料	36.3	40	100.7	98.0	4.56
16				105.8		
17				96.2		
18				93.8		

表4 蟹类饲料方法正确度。

序列号	样品	本底值/ (mg/kg)	添加量/ (μ g)	回收率 (%)	平均回收率/%	RSD/%
1				98.7		
2				94.2		
3	蟹类饲料	24.5	20	99.8	98.4	3.77
4				103.1		
5				100.7		
6				93.8		
7				90.3		
8	蟹类饲料	24.5	30	91.0	94.9	4.67
9				98.4		

10				97.4		
11				100.7		
12				91.8		
13				93.9		
14				91.4		
15	蟹类饲料	24.5	40	92.7	93.4	3.64
16				90.2		
17				92.2		
18				99.8		

4.4 实际典型样品测定

选取三种常见的虾蟹类饲料样品（罗氏虾料，螃蟹料和斑节虾料）进行测定，每个样品均做2平行。结果见表5。

表5 实际典型样品测定含量汇总

β-蜕皮甾酮					
罗氏虾料		蟹料		斑节虾料	
含量 (mg/kg)	相对偏差 %	含量 (mg/kg)	相对偏差 %	含量 (mg/kg)	相对偏差 %
37.1	1.08	25.0	2.40	15.0	4.81

5 结论

实验结果表明：该方法在指定的标准曲线范围内，线性相关系数良好；检出限和定量限较低；方法的重复性精密度和正确度良好；总之该方法能够满足虾蟹类饲料中β-蜕皮甾酮的测定要求。



广东省分析测试协会团体标准 方法确认报告

项目名称：虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法

委托单位：广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)

验证单位：广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)

编 制：王和平

验证时间：2024年6月1日-2024年10月31日



一、验证内容

1 方法来源：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）

2 验证内容：验证《虾蟹类饲料中 β -蜕皮甾酮的测定 高效液相色谱法》的标准曲线和相关系数、检出限、定量限、精密度和正确度。

二、方法验证主要内容

1 试剂和材料

β -蜕皮甾酮（98.0%）；一级水（实验用水应符合 GB/T 6682 要求的一级水规格）；甲醇（色谱纯）；甲醇（分析纯）。

2 仪器和设备

Agilent 1260 型高效液相色谱仪，配紫外检测器；BT125D 电子天平；TDZ5-WS 离心机；FB15067 型超声波清洗器。

3 实验步骤

3.1 标准溶液配制

标准储备溶液：称取 0.01020 g 于 50.0 mL 容量瓶，用 40%甲醇溶解并定容至 50.0 mL，标准溶液浓度为 200 mg/L。

系列标准工作溶液：分别移取 β -蜕皮甾酮标准储备溶液适量，用 40%甲醇稀释并定容，配制成浓度分别为 10.0 mg/L，5.00 mg/L，2.00 mg/L，0.500mg/L 和 0.200 mg/L 的标准工作溶液。

3.2 供试品溶液制备

3.2.1 试样制备

按照 GB/T 20195 制备试样，磨碎，全部通过 0.60 mm 孔筛，混匀，装入密闭容器中，备用。

3.2.2 样品前处理

称取试样约 1.0 g（精确至 0.1 mg）于 50.0 mL 具塞离心管内，以 40%甲醇为提取剂，加入 30.0 mL 后超声提取 20 min，4000 r/min 离心 5.0 min，上清液转移至 50.0 mL 容量瓶，残渣再加入 15.0 mL 的 40%甲醇，重复超声提取一次，合并上清液并定容至 50.0 mL，用 0.45 μ m 微膜过滤，上机测试。

注意：根据供试品溶液中 β -蜕皮甾酮的浓度高低，可进行适当的稀释，确保上机浓度在标准溶液的线性范围内。

3.3 参考色谱条件

3.3.1 色谱柱：C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m)或具同等性能的色谱柱。

3.3.2 流动相A：一级水；流动相B：甲醇。梯度洗脱，见表1。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	0	11	15	15.1	18
流动相 A/%	70	5	5	70	70
流动相 B/%	30	95	95	30	30

3.3.3 流速：1.0 mL/min。

3.3.4 波长：246 nm。

3.3.5 柱温：35 ℃。

3.3.6 进样体积：20 μL。

3.3.7 试样溶液的测定

将制备好的试样溶液注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，根据标准曲线得到待测液中的β-蜕皮甾酮的浓度。

3.4 空白试验

除不加试样外，按上述测定步骤进行。

3.5 分析结果的表述

3.5.1 结果计算

试样中β-蜕皮甾酮的含量X按下式计算：

$$X=C \times V / m$$

式中：

X——试样中各组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)；

C——试样溶液中β-蜕皮甾酮的浓度,单位为毫克每升(mg/L)；

V——试样溶液的体积,单位为毫升(mL)；

m——试样的质量，单位为克（g）。

3.5.2 结果表示

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

4 方法学验证

4.1 线性范围、检出限和定量限

4.1.1 线性范围

以系列标准工作液质量浓度(mg/L)为横坐标(X)，色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。求得线性回归方程为 $Y=26.14X+1.054$ 。相关系数(r)为 0.99996。由此可知 β-蜕皮甾

酮在 0.200~10.0mg/L 范围内线性良好。

4.1.2 检出限和定量限

以仪器信噪比(SN)=3 时, β -蜕皮甾酮的浓度作为检出限, 以仪器信噪比(SN)=10 时, β -蜕皮甾酮的浓度作为定量限。当称样量为 1.0 g, 定容体积为 50.0 mL, 进样量为 20 μ L, 稀释倍数为 1 时, 本方法的检出限为 1.5 mg/kg, 定量限为 5.0 mg/kg。

4.2 方法重复性精密度

按照“3.2.2”称取虾类饲料和蟹类饲料各 6 份平行样, 上机测定 β -蜕皮甾酮的含量, 结果见表 2。由表 2 可知虾类饲料和蟹类饲料的精密度分别为 4.51%和 3.12%, 表明该方法的重复性良好。

表 2 方法重复性

虾类饲料 (含量)	1	2	3	4	5	6	平均值	相对标准 偏差%
mg/kg	38.3	37.8	37.7	38.5	37.5	34.9	37.4	3.50
蟹类饲料 (含量)	1	2	3	4	5	6	平均值	相对标准 偏差%
mg/kg	25.5	26.0	26.1	25.4	24.5	25.4	25.5	2.26

4.3 正确度试验

方法的正确度通过加标回收率考查。虾类饲料和蟹类饲料各称取 6 份平行样, 分别加入低、中和高 3 个质量浓度, 每个加标水平均做 6 平行, 计算求得加标回收率及精密度, 结果见表 3 和表 4。结果表明该方法的准确度和加标回收率的精密度良好。

表 3 虾类饲料方法正确度。

序列号	样品	本底值/ (mg/kg)	添加量/(μg)	回收率 (%)	平均回收率/%	RSD/%
1				97.2		
2				95.9		
3	虾类饲料	37.4	20	94.1	95.0	1.51
4				94.6		
5				93.1		
6				94.9		
7				96.8		
8				98.5		
9	虾类饲料	37.4	30	94.0	95.9	1.96
10				93.4		
11				96.2		
12				96.3		
13				104.1		
14				102.5		
15	虾类饲料	37.4	40	98.8	101.4	2.16
16				98.7		
17				102.6		
18				101.6		

表 4 蟹类饲料方法正确度。

序列号	样品	本底值/ (mg/kg)	添加量/(μg)	回收率 (%)	平均回收率/%	RSD/%
1				98.3		
2				96.7		
3	蟹类饲料	25.5	20	95.7	95.8	1.75
4				95.5		
5				93.2		
6				95.4		
7				99.7		
8				102.2		
9	蟹类饲料	25.5	30	93.5	96.8	3.95
10				92.8		
11				94.2		
12				98.1		
13				97.2		
14				98.3		
15	蟹类饲料	25.5	40	101.4	98.3	2.37
16				97.5		
17				95.0		
18				100.5		

4.4 实际典型样品测定

选取三种常见的虾蟹类饲料样品（罗氏虾料，螃蟹料和斑节虾料）进行测定，每个样品均做 2 平行。结果见表 5。

表 5 实际典型样品测定含量汇总

β-蜕皮甾酮					
罗氏虾料		蟹料		斑节虾料	
含量 (mg/kg)	相对偏差 %	含量 (mg/kg)	相对偏差 %	含量 (mg/kg)	相对偏差 %
37.4	2.14	25.5	3.14	15.0	4.0

5 结论

实验结果表明：该方法在指定的标准曲线范围内，线性相关系数良好；检出限和定量限较低；方法的重复性精密度和正确度良好；总之该方法能够满足虾蟹类饲料中 β-蜕皮甾酮的测定要求。

