



中华人民共和国国家标准

GB/T 17817—2010
代替 GB/T 17817—1999

饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin A in feeds—
High-performance liquid chromatography

2010-09-26 发布

2011-01-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 17817—1999《饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法》。

本标准与 GB/T 17817—1999 主要差异如下：

——增加资料性附录 A；

——原标准方法为第一法皂化提取法；

——补充第二法直接提取法，适用于维生素预混合饲料中维生素 A 乙酸酯的测定。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位：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)]、北京桑普生物化学技术有限公司、广东爱保农科技有限公司、帝斯曼维生素(上海)有限公司、深圳市蛇口牡丹开发有限公司、广州立达尔生物科技有限公司。

本标准主要起草人：赵小阳、施文娟、虞哲高、吴革华、史瑞江、陶正国、陈小兵、李俊玲、李永才、张进、商军。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 17817—1999。

饲料中维生素 A 的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中维生素 A 和维生素预混合饲料中维生素 A 乙酸酯的高效液相色谱法测定。

本标准第一法适用于配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料中维生素 A 的测定,定量限为 1 000 IU/kg。

本标准第二法适用于维生素预混合饲料中维生素 A 乙酸酯的测定,定量限为 344 mg/kg(10^6 IU/kg)。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

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 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 第一法 皂化提取法

3.1 原理

碱溶液皂化试样后,用乙醚将维生素 A 提取出来,蒸除溶剂,残渣溶于适当溶剂,注入高效液相色谱仪分离,在波长 326 nm 条件下测定,外标法计算维生素 A 含量。

3.2 试剂和溶液

除特殊注明外,本标准所用试剂均为分析纯,水符合 GB/T 6682 中三级用水规定,色谱用水符合 GB/T 6682 中一级用水规定,溶液按照 GB/T 603 配制。

3.2.1 无水乙醚(不含过氧化物)

3.2.1.1 过氧化物检查方法:用 5 mL 乙醚加 1 mL 碘化钾溶液(3.2.9),振摇 1 min,如有过氧化物则放出游离碘,水层呈黄色,或加淀粉指示液(3.2.10),水层呈蓝色。该乙醚需处理后使用。

3.2.1.2 去除过氧化物的方法:乙醚用硫代硫酸钠溶液(3.2.11)振摇,静置,分取乙醚层,再用水振摇,洗涤两次,重蒸,弃去首尾 5% 部分,收集馏出的乙醚,再检查过氧化物,应符合规定。

3.2.2 无水乙醇。

3.2.3 正己烷:色谱纯。

3.2.4 异丙醇:色谱纯。

3.2.5 甲醇:色谱纯。

3.2.6 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)。

3.2.7 无水硫酸钠。

3.2.8 氮气(纯度 99.9%)。

3.2.9 碘化钾溶液:100 g/L。

3.2.10 淀粉指示液:5 g/L(临用现配)。

3.2.11 硫代硫酸钠溶液:50 g/L。

3.2.12 氢氧化钾溶液:500 g/L。

3.2.13 L-抗坏血酸乙醇溶液:5 g/L。取0.5 g L-抗坏血酸结晶纯品溶解于4 mL 温热的水中,用无水乙醇(3.2.2)稀释至100 mL,临用前配制。

3.2.14 酚酞指示剂:10 g/L。

3.2.15 维生素 A 乙酸酯标准品:维生素 A 乙酸酯含量 $\geq 99.0\%$ 。

3.2.16 维生素 A 标准贮备液:称取维生素 A 乙酸酯标准品(3.2.15)34.4 mg(精确至0.000 01 g)于皂化瓶中,按分析步骤(3.6)皂化和提取,将乙醚提取液全部浓缩蒸发至干,用正己烷溶解残渣置入100 mL 棕色容量瓶中并稀释至刻度,混匀,4 °C 保存。该贮备液浓度为344 $\mu\text{g/mL}$ (1 000 IU/mL),临用前用紫外分光光度计标定其准确浓度。

3.2.17 维生素 A 标准工作液:准确吸取1.00 mL 维生素 A 标准贮备液(3.2.16),用正己烷(3.2.3)稀释100倍;若用反相色谱测定,将1.00 mL 维生素 A 标准贮备液置入100 mL 棕色容量瓶中,用氮气吹干,用甲醇(3.2.5)稀释至刻度,混匀,配制工作液浓度为3.44 $\mu\text{g/mL}$ (10 IU/mL)。

3.3 仪器和设备

3.3.1 分析天平,感量0.001 g。

3.3.2 分析天平,感量0.000 1 g。

3.3.3 分析天平,感量0.000 01 g。

3.3.4 圆底烧瓶,带回流冷凝器。

3.3.5 恒温水浴或电热套。

3.3.6 旋转蒸发器。

3.3.7 超纯水器。

3.3.8 高效液相色谱仪,带紫外可调波长检测器(或二极管矩阵检测器)。

3.4 采样

按照 GB/T 14699.1 的规定执行。

3.5 试样制备

按照 GB/T 20195 制备试样,磨碎,全部通过0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

3.6 分析步骤

3.6.1 试样溶液的制备

3.6.1.1 皂化

称取试样配合饲料或浓缩饲料10 g,精确至0.001 g,维生素预混合饲料或复合预混合饲料1 g~5 g,精确至0.000 1 g,置入250 mL 圆底烧瓶中,加50 mL L-抗坏血酸乙醇溶液(3.2.13),使试样完全分散、浸湿,加10 mL 氢氧化钾溶液(3.2.12),混匀。置于沸水浴上回流30 min,不时振荡防止试样粘附在瓶壁上,皂化结束,分别用5 mL 无水乙醇(3.2.2)、5 mL 水自冷凝管顶端冲洗其内部,取出烧瓶冷却至约40 °C。

3.6.1.2 提取

定量转移全部皂化液于盛有100 mL 无水乙醚(3.2.1)的500 mL 分液漏斗中,用30 mL~50 mL 水分2次~3次冲洗圆底烧瓶并入分液漏斗,加盖、放气、随后混合,激烈振荡2 min,静置、分层。转移水相于第二个分液漏斗中,分次用100 mL、60 mL 乙醚重复提取两次,弃去水相,合并三次乙醚相。用水每次100 mL 洗涤乙醚提取液至中性,初次水洗时轻轻旋摇,防止乳化。乙醚提取液通过无水硫酸钠(3.2.7)脱水,转移到250 mL 棕色容量瓶中,加100 mg BHT(3.2.6)使之溶解,用乙醚定容至刻度(V_1)。以上操作均在避光通风柜内进行。

3.6.1.3 浓缩

从乙醚提取液(V_1)中分取一定体积(V_2) (依据样品标示量、称样量和提取液量确定分取量)置于旋转蒸发器烧瓶中,在水浴温度约 50 ℃,部分真空条件下蒸发至干或用氮气吹干。残渣用正己烷溶解(反相色谱用甲醇溶解),并稀释至 10 mL(V_3)使其维生素 A 最后浓度为每毫升 5 IU~10 IU,离心或通过 0.45 μm 过滤膜过滤,用于高效液相色谱仪分析。以上操作均在避光通风柜内进行。

3.6.2 测定

3.6.2.1 色谱条件

3.6.2.1.1 正相色谱

色谱柱:硅胶 Si60,长 125 mm,内径 4 mm,粒度 5 μm (或性能类似的分析柱);

流动相:正己烷+异丙醇(98+2);

流速:1.0 mL/min;

温度:室温;

进样量:20 μL ;

检测波长:326 nm。

3.6.2.1.2 反相色谱

色谱柱: C_{18} 型柱,长 125 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm (或性能类似的分析柱);

流动相:甲醇+水(95+5);

流速:1.0 mL/min;

温度:室温;

进样量:20 μL ;

检测波长:326 nm。

3.6.2.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数,向色谱柱注入相应的维生素 A 标准工作液(3.2.17)和试样溶液(3.6.1),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量测定,维生素 A 标准色谱图参见图 A.1。

3.6.2.3 结果计算

3.6.2.3.1 试样中维生素 A 的含量,以质量分数 X_1 计,数值以国际单位每千克(IU/kg)或毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$X_1 = \frac{P_1 \times V_1 \times V_3 \times p_1}{P_2 \times m_1 \times V_2 \times f_1} \times 1000 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

P_1 ——试样溶液(3.6.1)峰面积值;

V_1 ——提取液的总体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——试样溶液最终体积,单位为毫升(mL);

p_1 ——维生素 A 标准工作液(3.2.17)浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

P_2 ——维生素 A 标准工作液(3.2.17)峰面积值;

m_1 ——试样质量,单位为克(g);

V_2 ——从提取液(V_1)中分取的溶液体积,单位为毫升(mL);

f_1 ——转换系数,1 国际单位(IU)相当于 0.344 μg 维生素 A 乙酸酯,或 0.300 μg 视黄醇活性。

3.6.2.3.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留三位有效数字。

3.6.2.4 重复性

同一分析者对同一试样同时两次平行测定所得结果的相对偏差见表 1。

表 1 相对偏差

维生素 A 含量/(mg/kg)	相对偏差/%
$1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^4$	±20
$>1.00 \times 10^4 \sim 1.00 \times 10^5$	±15
$>1.00 \times 10^5 \sim 1.00 \times 10^6$	±10
$>1.00 \times 10^6$	±5

4 第二法 直接提取法

4.1 原理

维生素预混料中的维生素 A 乙酸酯用甲醇溶液提取,试液注入高效液相色谱柱,在 326 nm 处测定,外标法计算维生素 A 乙酸酯含量。

4.2 试剂和溶液

除特殊注明外,本标准所用试剂均为分析纯,水符合 GB/T 6682 中三级用水规定,色谱用水符合 GB/T 6682 中一级用水规定。

4.2.1 维生素 A 乙酸酯标准品:维生素 A 乙酸酯含量 $\geq 99.0\%$ 。

4.2.2 维生素 A 乙酸酯标准贮备液:称取维生素 A 乙酸酯标准品(4.2.1)34.4 mg(精确至 0.000 01 g),于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(3.2.5)溶解并稀释至刻度,混匀,4 ℃ 保存。该贮备液浓度为 344 $\mu\text{g/mL}$ (1 000 IU/mL),临用前用紫外分光光度计标定其准确浓度。

4.2.3 维生素 A 乙酸酯标准工作液:准确吸取维生素 A 乙酸酯标准贮备液(4.2.2)1.0 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(3.2.5)稀释至刻度,混匀,配制工作液浓度为 3.44 $\mu\text{g/mL}$ (10 IU/mL)。

4.3 仪器和设备

4.3.1 超声波水浴。

4.3.2 其他同 3.3。

4.4 采样

同 3.4。

4.5 试样制备

同 3.5。

4.6 分析步骤

4.6.1 试样溶液的制备

称取试样 1 g,精确至 0.000 1 g,置于 100 mL 的棕色容量瓶中,加入约 80 mL 的甲醇,瓶塞不要拧紧,于 65 ℃ 超声波水浴中超声提取 30 min,冷却至室温,用甲醇稀释至刻度,充分摇匀。如果试样中维生素 A 乙酸酯的标示量低于 10^7 IU/kg,则将溶液过 0.45 μm 滤膜,进样测定,否则需将溶液用甲醇进一步稀释,使维生素 A 乙酸酯的进样浓度与维生素 A 乙酸酯标准工作液浓度接近。

4.6.2 测定

4.6.2.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 型柱,长 150 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm (或性能类似的分析柱);

流动相:甲醇+水(98+2);

流速:1.0 mL/min;

温度:室温;

进样量:20 μL ;

检测波长:326 nm。

4.6.2.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数,向色谱柱注入相应的维生素 A 乙酸酯标准工作液(4.2.3)和试样溶液(4.6.1),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量测定,维生素 A 乙酸酯标准色谱图参见图 A.2。

4.6.2.3 结果计算

4.6.2.3.1 试样中维生素 A 乙酸酯的含量,以质量分数 X_2 计,数值以国际单位每千克(IU/kg)或毫克每千克(mg/kg)表示,按式(2)计算:

$$X_2 = \frac{P_3 \times V \times \rho_2}{P_4 \times m_2 \times f_2} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

P_3 ——试样溶液(4.6.1)峰面积值;

V ——试样溶液(4.6.1)的总稀释体积,单位为毫升(mL);

ρ_2 ——维生素 A 乙酸酯标准工作液(4.2.3)浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

P_4 ——维生素 A 乙酸酯标准工作液(4.2.3)峰面积值;

m_2 ——试样质量,单位为克(g);

f_2 ——转换系数,1 国际单位(IU)相当于 0.344 μg 维生素 A 乙酸酯。

4.6.2.3.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留三位有效数字。

4.6.2.4 重复性

同一分析者对同一试样同时两次平行测定所得结果的相对偏差不大于 10%。

附录 A
(资料性附录)

维生素 A、维生素 A 乙酸酯标准色谱图

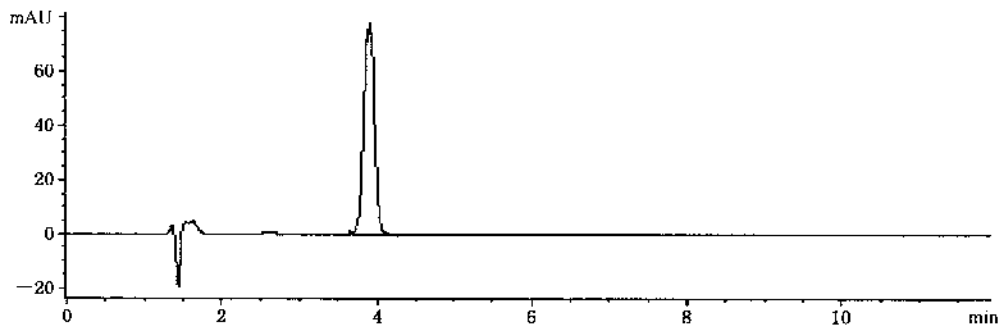


图 A.1 维生素 A 标准色谱图

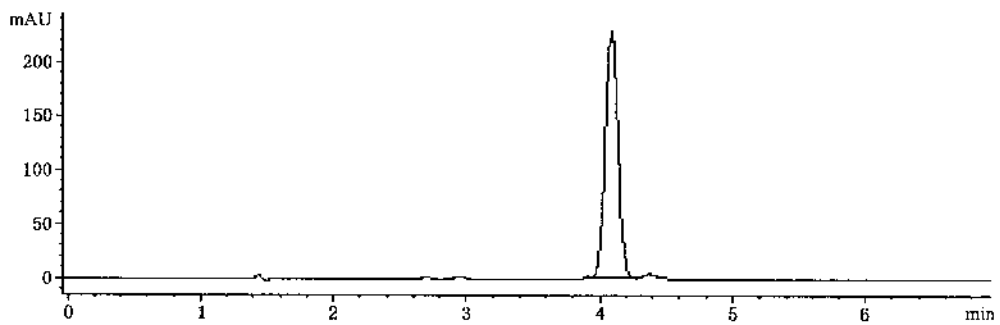


图 A.2 维生素 A 乙酸酯标准色谱图