



中华人民共和国国家标准

GB/T 17818—2010
代替 GB/T 17818—1999

饲料中维生素 D₃ 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin D₃ 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 17818—1999《饲料中维生素 D₃ 的测定 高效液相色谱法》。

本标准与 GB/T 17818—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，适用于维生素预混料中维生素 D₃ 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、拜耳(四川)动物保健有限公司。

本标准主要起草人：赵小阳、施文娟、虞哲高、吴革华、李俊玲、李永才、张进、商军、郑秋峰。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 17818—1999。

饲料中维生素 D₃ 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 D₃ 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 D₃ 的测定,定量限为 12.5 μg/kg(500 IU/kg)。

本标准第二法适用于维生素预混合饲料中维生素 D₃ 的测定,定量限为 125 mg/kg(5×10⁶ 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

用碱溶液皂化试样,乙醚提取维生素 D₃,蒸发乙醚,残渣溶解于甲醇并将部分溶液注入高效液相色谱反相净化柱,收集含维生素 D₃ 淋洗液,蒸发至干,溶解于适当溶剂中,注入高效液相色谱分析柱,在 264 nm 处测定,外标法计算维生素 D₃ 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 1,4-二氧六环。

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 氯化钠溶液:100 g/L。

3.2.16 维生素 D₃ 标准品:维生素 D₃ 含量≥99.0%。

3.2.17 维生素 D₃ 标准贮备液:称取 50 mg 维生素 D₃(胆钙化醇)标准品(3.2.16)(精确至 0.000 01 g)于 50 mL 棕色容量瓶中,用正己烷溶解并稀释至刻度,混匀,4 ℃ 保存。该贮备液浓度为 1.0 mg/mL。

3.2.18 维生素 D₃ 标准工作液:准确吸取维生素 D₃ 标准贮备液(3.2.17),用正己烷(3.2.3)按 1:100 比例稀释,若用反相色谱测定,将 1.0 mL 维生素 D₃ 标准贮备液置入 10 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,再按比例稀释,该标准工作液浓度为 10 μg/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 10 g~20 g,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~60 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),混合均匀,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 ℃。

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。用氯化钠溶液(3.2.15)100 mL 洗涤一次,再用水每次 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(V₁)。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,在部分真空,水浴温度 50 ℃的条件下蒸发至干,或用氮气吹干。残渣用正己烷(3.2.3)溶解(需净化时用甲醇溶解,按 3.6.1.4 进行),并稀释至 10 mL(V_3)使其获得的溶液中每毫升含维生素 D₃ 2 μg~10 μg(80 IU~400 IU),离心或通过 0.45 μm 过滤膜过滤,收集清液移入 2 mL 小试管,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。

3.6.1.4 高效液相色谱净化柱净化

用 5 mL 甲醇(3.2.5)溶解圆底烧瓶中的残渣,向高效液相色谱净化柱中注射 0.5 mL 甲醇溶液(按 3.6.2.1 所述色谱条件,以维生素 D₃ 标准甲醇溶液流出时间±0.5 min)收集含维生素 D₃ 的馏分于 50 mL 小容量瓶中,蒸发至干(或用氮气吹干),溶解于正己烷中。

所测样品的维生素 D₃ 标示量在每千克超过 10 000 IU 范围时,可以不使用高效液相色谱净化柱,直接用分析柱分析。

3.6.2 测定

3.6.2.1 高效液相色谱净化条件

色谱净化柱:Lichrosorb RP-8,长 25 cm,内径 10 mm,粒度 10 μm。

流动相:甲醇+水(90+10)。

流速:2.0 mL/min。

温度:室温。

检测波长:264 nm。

3.6.2.2 高效液相色谱分析条件

3.6.2.2.1 正相色谱

色谱柱:硅胶 Si60,长 125 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm(或性能类似的分析柱)。

流动相:正己烷+1,4 二氧六环(93+7)。

流速:1.0 mL/min。

温度:室温。

进样量:20 μL。

检测波长:264 nm。

3.6.2.2.2 反相色谱

色谱柱:C₁₈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:264 nm。

3.6.2.3 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数,为准确测量按要求对分析柱进行系统适应性试验,使维生素 D₃ 与维生素 D₃ 原或其他峰之间有较好分离度,其 $R \geq 1.5$ 。向色谱柱注入相应的维生素 D₃ 标准工作液(3.2.18)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。

3.6.2.4 结果计算

3.6.2.4.1 试样中维生素 D₃ 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:

$$X_1 = \frac{P_1 \times V_1 \times V_3 \times \rho_1 \times 1.25}{P_2 \times m_1 \times V_2 \times f_1} \times 1000 \quad \dots\dots\dots(1)$$

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);

ρ_i ——维生素 D₃ 标准工作液(3.2.18)浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

P_2 ——维生素 D₃ 标准工作液(3.2.18)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)维生素 D₃ 相当于 0.025 μg 胆钙化醇。

注:维生素 D₃ 对照品与试样同样皂化处理,所得标准溶液注入高效液相色谱分析柱以维生素 D₃ 峰面积计算时可不乘 1.25。

3.6.2.4.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留三位有效数字。

3.6.2.5 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 D ₃ 含量/(IU/kg)	相对偏差/%
$1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^5$	± 20
$>1.00 \times 10^5 \sim 1.00 \times 10^6$	± 15
$>1.00 \times 10^6$	± 10

4 第二法 直接提取法

4.1 原理

维生素预混合饲料中的维生素 D₃ 用甲醇溶液提取,试液注入高效液相色谱柱,在 264 nm 处测定,外标法计算维生素 D₃ 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 D₃ 标准品:维生素 D₃ 含量 $\geq 99.0\%$ 。

4.2.2 维生素 D₃ 标准贮备液:称取维生素 D₃ 标准品(4.2.1)100 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。该贮备液浓度为 1.0 mg/mL。

4.2.3 维生素 D₃ 标准工作液:准确吸取维生素 D₃ 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 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

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

紫,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,将溶液过0.45 μm滤膜,进样测定,使待测样品维生素D₃的进样浓度与标准溶液浓度接近。

4.6.2 测定

4.6.2.1 色谱条件

色谱柱:C₁₈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:264 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D₃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D₃标准色谱图参见图A.1。

4.6.2.3 结果计算

4.6.2.3.1 试样中维生素D₃的含量,以质量分数X₂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:

$$X_2 = \frac{P_3 \times V \times \rho_2}{P_4 \times m_2 \times f_2} \times 1.07 \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

P₃——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);

ρ₂——维生素D₃标准工作液(4.2.3)浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

P₄——维生素D₃标准工作液(4.2.3)峰面积值;

m₂——试样质量,单位为克(g);

f₂——转换系数,1国际单位(IU)维生素D₃相当于0.025 μg胆钙化醇;

1.07——提取时生成预维生素D₃的校正因子。

注:维生素D₃标准品与试样同样处理后,所得标准溶液注入高效液相色谱分析柱以维生素D₃峰面积计算时可不乘1.07。

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 D₃ 标准色谱图

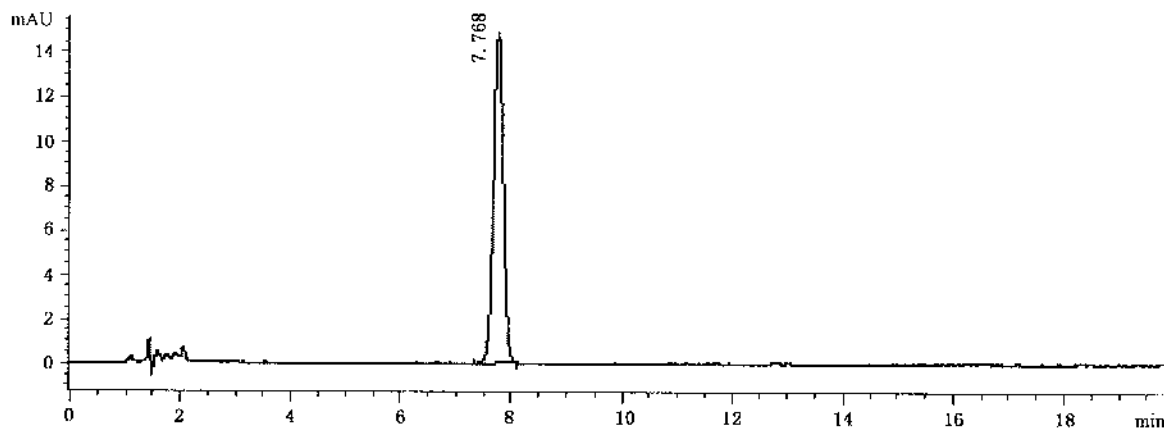


图 A.1 维生素 D₃ 标准色谱图