

团 体 标 准

T/CFIAS 6003—2022

饲料添加剂天然维生素 E 中生育酚和生育 三烯酚的测定 高效液相色谱法

Determination of tocopherol and tocotrienol in feed additive natural vitamin E
— High-performance liquid chromatography

2022-04-13 发布

2022-05-13 实施

中国饲料工业协会 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。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心（北京）]、辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院、浙江医药股份有限公司新昌制药厂、上海安谱实验科技股份有限公司、河南中标检测服务有限公司、陕西秦云农产品检验检测股份有限公司、浙江医药股份有限公司昌海生物分公司、浙江可明生物医药有限公司。

本文件主要起草人：王石、樊霞、陈玉艳、田静、梅娜、刘晓露、张天姝、肖志明、贾铮、张利英、温善萍、王继美、盛伟翔、许新德、汪军明、贺习文、江晨舟、张驰中。

饲料添加剂天然维生素 E 中生育酚和生育 三烯酚的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了饲料添加剂天然维生素 E 中生育酚和生育三烯酚含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于饲料添加剂天然维生素 E 中生育酚（包括 d- α -生育酚、d- β -生育酚、d- γ -生育酚、d- δ -生育酚）和生育三烯酚（d- α -生育三烯酚、d- β -生育三烯酚、d- γ -生育三烯酚、d- δ -生育三烯酚）的测定。

本文件中生育酚和生育三烯酚的定量限均为 0.1 mg/g。

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 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 原理

试样经甲醇浸润后，用乙酸乙酯-正己烷超声提取，高效液相色谱仪分离，用紫外检测器（或二极管矩阵检测器）检测，外标法计算生育酚和生育三烯酚含量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 正庚烷：色谱级。

5.2 四氢呋喃：色谱级。

5.3 流动相（四氢呋喃-正庚烷溶液）：1 000 mL 正庚烷（5.1）加入 40 mL 四氢呋喃（5.2），混合，并超声均质 15 min。

5.4 乙酸乙酯-正己烷溶液：取 30 mL 乙酸乙酯于 1 L 容量瓶中，加入正己烷定容至刻度。混匀，备用。

5.5 5% 甲醇的乙酸乙酯-正己烷溶液：取 50 mL 甲醇于 1 L 容量瓶中，加入乙酸乙酯-正己烷溶液（5.4）定容至刻度。混匀，备用。

5.6 生育酚及生育三烯酚标准品：纯度 $\geq 98\%$ 。

5.7 生育酚和生育三烯酚标准储备溶液 (1.0 mg/mL)：准确称取生育酚和生育三烯酚标准品 (5.6) 各 10.0 mg (精确至 0.01 mg)，分别置于 8 个 10 mL 容量瓶中，用 5% 甲醇的乙酸乙酯-正己烷溶液 (5.5) 稀释并定容至刻度，制备每种生育酚和生育三烯酚的标准储备溶液。所有溶液应在 2 °C~8 °C 之间避光储存，有效期 3 个月。

5.8 生育酚和生育三烯酚混合系列标准工作溶液：分别移取 0.05 mL、0.10 mL、0.25 mL、0.50 mL、2.50 mL、5.00 mL 的生育酚和生育三烯酚的标准储备溶液 (5.7) 置于 50 mL 棕色容量瓶中，5% 甲醇的乙酸乙酯-正己烷溶液 (5.5) 定容至刻度，配制成浓度 1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、50.0 μg/mL、100.0 μg/mL 的混合系列标准工作溶液。临用现配。

5.9 滤膜：0.45 μm，有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配备紫外检测器（或二极管矩阵检测器）。

6.2 天平：感量 0.1 mg、0.01 mg。

6.3 超声波清洗机。

6.4 漩涡振荡器。

7 样品

按照 GB/T 20195 制备试样，其中固体样品混合均匀，装入密闭容器中避光保存；液体样品使用机械搅拌器混合均匀，使所有独立物质完全分散，装入密闭容器中避光保存。

8 试验步骤

8.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取 1.0 g 试样 (精确至 0.1 mg) 于 100 mL 棕色容量瓶中，加入 5 mL 甲醇浸润样品，加约 75 mL 乙酸乙酯-正己烷溶液 (5.4)，振荡混匀后于超声波清洗机中超声提取 20 min。取出放至室温，用乙酸乙酯-正己烷溶液 (5.4) 稀释至刻度，摇匀，取上清液过 0.45 μm 有机滤膜 (5.9)，待测。

8.2 色谱条件

色谱柱：正相，二醇基硅胶柱，长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者。

柱温：35 °C。

进样量：10 μL。

流动相：四氢呋喃-正庚烷溶液 (5.3)。

流速：1.0 mL/min。

检测器：紫外检测器（或二极管矩阵检测器）。

检测波长：292 nm。

8.3 测定

8.3.1 混合系列标准工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合系列标准工作溶液 (5.8) 和试样溶液 (8.1) 上机测定。生育酚和生育三烯酚标准溶液的液相色谱图参见附录 A。

8.3.2 定性测定

以保留时间定性，试样溶液中生育酚和生育三烯酚保留时间应与混合系列标准工作溶液中生育酚和生育三烯酚的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

8.3.3 定量测定

以生育酚或生育三烯酚的浓度为横坐标，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5%甲醇的乙酸乙酯/正己烷溶液（5.5）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%。

9 试验数据处理

试样中生育酚或生育三烯酚的含量以质量分数 w_i 计，数值以毫克每克（mg/g）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times n}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液生育酚或生育三烯酚的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

n ——稀释倍数。

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

式中：

A_i ——试样溶液中生育酚或生育三烯酚色谱峰面积；

A_{si} ——标准溶液中生育酚或生育三烯酚的峰面积；

ρ_i ——标准溶液中生育酚或生育三烯酚的质量浓度，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）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

n ——稀释倍数。

试验结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果保留3位有效数字。

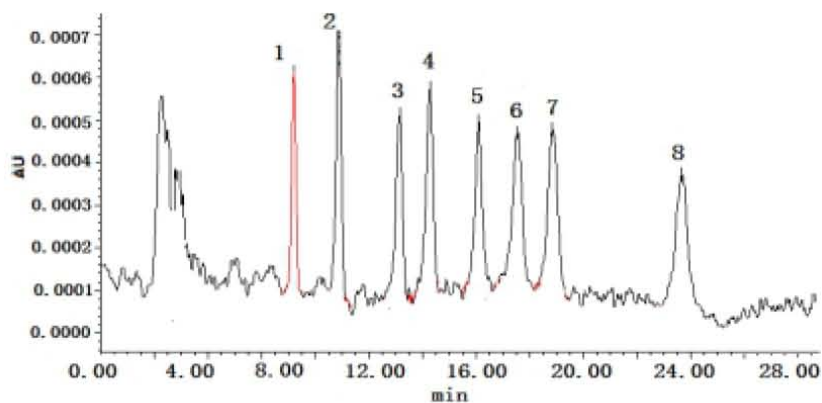
10 精密度

在重复性条件下，2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
(资料性附录)

生育酚和生育三烯酚混合标准工作溶液色谱图

生育酚和生育三烯酚混合标准工作溶液色谱图见图 A.1。



图A.1 生育酚和生育三烯酚混合标准工作溶液 ($\rho_1 = 1.0 \mu\text{g/mL}$) 色谱图
(图A.1中: 1. d- α -生育酚、2. d- α -生育三烯酚、3. d- β -生育酚、4. d- γ -生育酚、
5. d- β -生育三烯酚、6. d- γ -生育三烯酚、7. d- δ -生育酚、8. d- δ -生育三烯酚)

