

中华人民共和国国家标准

GB/T 17812—2025

代替 GB/T 17812—2008

饲料中维生素 E 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin E in feeds—High performance liquid chromatography

2025-01-24 发布

2025-08-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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。

本文件代替 GB/T 17812—2008《饲料中维生素 E 的测定 高效液相色谱法》，与 GB/T 17812—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 皂化提取法和直接提取法适用范围分别增加了精料补充料和复合预混合饲料(见第 1 章)；
- b) 提取剂更改为石油醚(沸程 30 ℃~60 ℃)(见第 4 章,2008 年版第 3 章)；
- c) 增加了维生素 E(*dl*- α -生育酚)标准系列溶液(见 4.2.16)；
- d) 更改了试样制备要求(见 4.4,2008 年版的 3.5)；
- e) 增加了固相萃取法(见 4.5.1.2.2)；
- f) 删除了正相色谱条件(见 2008 年版的第 3 章)；
- g) 更改了检测波长(见 4.5.2.1,2008 年版的 3.6.2.1.2)；
- h) 增加了液相色谱参考条件 II(见 4.5.2.2)；
- i) 增加了定性方法,定量方法增加了多点校正(见 4.5.2.4 和 4.5.2.5)；
- j) 更改了试验数据处理(见 4.6 和 5.6,2008 年版的 3.6.2.3 和 4.6.2.3)；
- k) 增加了维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)标准系列溶液(见 5.2.5)；
- l) 更改了提取温度(见 5.5.1,2008 年版的 4.6.1)；
- m) 增加了定性方法,定量方法增加了多点校正(见 5.5.2.3 和 5.5.2.4)。

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。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：山东省畜产品质量安全中心(山东省畜禽屠宰技术中心)、四川威尔检测技术股份有限公司、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、帝斯曼维生素(上海)有限公司。

本文件主要起草人：张玮、张凤枰、张芸、孙延军、谢丽、闫传琦、布岩林、王英英、朱良智、樊霞、李俊玲、李会荣、赵学峰、赵小阳、虞哲高、吴立国、张超、吴金玉。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1999 年首次发布为 GB/T 17812—1999,2008 年第一次修订；
- 本次为第二次修订。

饲料中维生素 E 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了饲料中维生素 E 的高效液相色谱测定方法。

本文件中皂化提取法适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料中维生素 E(*dl*- α -生育酚)的测定;直接提取法适用于复合预混合饲料、维生素预混合饲料中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)的测定。

本文件皂化提取法定量限为 1.1 IU/kg;直接提取法定量限为 20 IU/kg。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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 第一法 皂化提取法

4.1 原理

试样中的维生素 E 用碱溶液皂化,经液液萃取或固相萃取净化,高效液相色谱仪测定,外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2.2 无水乙醇:色谱纯。

4.2.3 无水乙醇。

4.2.4 石油醚:沸程 30 °C~60 °C。

4.2.5 甲醇:色谱纯。

4.2.6 乙腈:色谱纯。

4.2.7 甲酸:色谱纯。

4.2.8 L-抗坏血酸。

4.2.9 二丁基羟基甲苯(BHT)。

4.2.10 无水硫酸钠。

4.2.11 氢氧化钾溶液(500 g/L):称取 500 g 氢氧化钾,加水溶解,冷却后用水定容至 1 000 mL,混匀,于聚四氟乙烯瓶中保存。

4.2.12 乙醇溶液(70%,体积分数):量取无水乙醇(4.2.3)70 mL,用水稀释,定容至 100 mL,混匀。

4.2.13 甲醇溶液(10%,体积分数):移取甲醇(4.2.5)10 mL,用水稀释,定容至 100 mL,混匀。

4.2.14 甲酸溶液(0.1%,体积分数):移取甲酸(4.2.7)1 mL,用水稀释,定容至 1 000 mL,混匀。

4.2.15 维生素 E(*dl*- α -生育酚)标准储备溶液(1 mg/mL):称取 *dl*- α -生育酚标准品(CAS 号:10191-41-0,纯度不低于 99.0%)100 mg(精确至 0.000 1 g)于 100 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇(4.2.2)溶解并定容,混匀。-18 °C 以下避光保存,有效期 6 个月。

4.2.16 维生素 E 标准系列溶液:准确移取适量的维生素 E 标准储备溶液(4.2.15),分别于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(4.2.5)稀释并定容,混匀,配制成质量浓度分别为 0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL 标准系列溶液。临用现配。

4.2.17 酚酞指示剂(10 g/L):称取 1 g 酚酞,用无水乙醇(4.2.3)溶解,并定容至 100 mL,混匀。

4.2.18 固相萃取柱:填料为聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物,200 mg/6 mL,或性能相当者。

4.2.19 微孔滤膜:孔径 0.22 μ m,有机系。

4.2.20 氮气:纯度不低于 99.9%。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管矩阵检测器。

4.3.2 分析天平:精度为 0.000 1 g 和 0.001 g。

4.3.3 回流装置:圆底烧瓶和冷凝管。

4.3.4 恒温水浴锅:控温精度 ± 2 °C。

4.3.5 旋转蒸发仪。

4.3.6 离心机:转速不低于 10 000 r/min。

4.3.7 固相萃取装置。

4.3.8 氮吹仪:带加热装置,温度精度 ± 2 °C。

4.3.9 涡旋混合器。

4.4 样品

配合饲料、浓缩饲料、精料补充料样品,按 GB/T 20195 制备试样,至少 200 g,粉碎至全部通过 1 mm 孔径的试验筛,混合均匀,装入密闭容器中;复合预混合饲料和维生素预混合饲料样品直接装入密闭容器中。2 °C~8 °C 避光保存,尽快测定。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样溶液的制备

注意:分液漏斗活塞玻璃表面不涂油,处理过程在避光下操作,提取过程在通风柜中操作。

4.5.1.1 皂化

平行做两份试验。配合饲料、浓缩饲料、精料补充料试样称取 5 g~10 g(精确至 0.001 g),复合预混合饲料试样称取 2 g~4 g(精确至 0.001 g),维生素预混合饲料试样称取 1 g(精确至 0.000 1 g),置入 250 mL 圆底烧瓶中,加 1 g L-抗坏血酸(4.2.8)、0.2 g BHT(4.2.9),加入 50 mL 无水乙醇(4.2.3),摇匀后加入 20 mL 氢氧化钾溶液(4.2.11),混合均匀,置于沸水浴上回流 30 min,不时振荡,防止试样黏附在瓶壁上。皂化结束,分别用 5 mL 无水乙醇(4.2.3)、5 mL 水自冷凝管顶端冲洗其内部,取出烧瓶冷却至

约 40 °C, 尽快提取净化。

4.5.1.2 提取净化

4.5.1.2.1 液液萃取法

将皂化液(4.5.1.1)全部转移至盛有 100 mL 石油醚(4.2.4)的 500 mL 分液漏斗中, 用 30 mL~50 mL 水分 2 次~3 次冲洗圆底烧瓶并转入分液漏斗, 再用 5 mL~10 mL 乙醇(4.2.3)冲洗转移, 加盖、混匀后放气, 激烈振荡 2 min, 静置、分层。转移水相于另一个分液漏斗中, 分别用 100 mL、60 mL 石油醚(4.2.4)各提取 1 次, 弃去水相, 合并 3 次石油醚相。用水每次 100 mL 洗涤石油醚提取液至中性[可用酚酞指示剂(4.2.17)检测下层溶液, 直至无色]。初次水洗时轻轻旋摇, 防止乳化。石油醚提取液通过无水硫酸钠(4.2.10)脱水, 转移至 250 mL 棕色容量瓶中, 用石油醚定容, 混匀。

从石油醚提取液中准确分取一定体积(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, 在约 50 °C 的条件下蒸发至干或用氮气吹干。残渣用甲醇(4.2.5)溶解, 并定容至 10 mL, 使获得的溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚)含量在标准系列溶液线性范围内, 过微孔滤膜(4.2.19), 待测。

4.5.1.2.2 固相萃取法

将皂化液(4.5.1.1)全部转移至 100 mL 棕色容量瓶中, 用 5 mL 乙醇溶液(4.2.12)洗涤瓶内的残渣并将溶液转入容量瓶内, 重复洗涤 2 次, 用乙醇溶液(4.2.12)定容, 混匀。取一定体积皂化液于离心管中, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清液待用。用 3 mL 甲醇、5 mL 水活化固相萃取柱。

对于配合饲料、浓缩饲料和精料补充料, 准确移取 5 mL 上清液于 15 mL 具塞离心管中, 加 2 mL 水, 涡旋混匀, 全部加载到已活化的固相萃取柱中, 控制流速小于 2 mL/min, 用甲醇溶液(4.2.13)洗涤 2 次离心管一并过柱, 每次 2 mL, 再用 4 mL 甲醇溶液(4.2.13)淋洗固相萃取柱, 抽干, 用乙腈(4.2.6)洗脱 3 次, 每次 1 mL, 合并洗脱液, 于 40 °C 下氮气吹干, 准确加入乙腈(4.2.6)1 mL, 超声溶解, 涡旋混匀, 过微孔滤膜(4.2.19), 待测。

对于复合预混合饲料, 准确移取 1.5 mL 上清液于 5 mL 具塞离心管中, 加 0.5 mL 水, 涡旋混匀, 全部加载到固相萃取柱中, 淋洗、洗脱步骤同配合饲料, 乙腈洗脱液需收集于 5 mL 容量瓶中, 用乙腈(4.2.6)定容, 混匀, 过微孔滤膜(4.2.19), 待测。

注: 该方法不适用于维生素预混合饲料。

4.5.2 测定

4.5.2.1 液相色谱参考条件 I

液相色谱参考条件 I 如下:

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱, 长 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μ m, 或性能相当者;
- b) 流动相: V[甲醇(4.2.5)] : V(水) = 95 : 5(体积比);
- c) 流速: 1 mL/min;
- d) 柱温: 室温;
- e) 进样量: 20 μ L;
- f) 检测波长: 294 nm。

4.5.2.2 液相色谱参考条件 II

液相色谱参考条件 II 如下:

- a) 色谱柱: 薄壳型 C₈ 柱, 长 50 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 2.7 μ m, 或性能相当者;

- b) 流动相:A相为0.1%甲酸溶液(4.2.14),B相为乙腈(4.2.6),C相为甲醇(4.2.5),梯度洗脱程序见表1;
- c) 流速:1 mL/min;
- d) 柱温:35 ℃;
- e) 进样量:10 μL;
- f) 检测波长:294 nm。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	A相 %	B相 %	C相 %
0	30	70	0
1	25	75	0
12	0	100	0
14	0	0	100
19	0	0	100
20	30	70	0
23	30	70	0

4.5.2.3 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,根据选用的试样溶液制备方法,选取液相色谱参考条件进行测定。

——若选用液液萃取法(4.5.1.2.1),按照液相色谱参考条件 I (4.5.2.1),分别取维生素 E(*dl*-α-生育酚)标准系列溶液(4.2.16)和试样溶液(4.5.1.2.1)上机测定,维生素 E(*dl*-α-生育酚)标准溶液的液相色谱图见附录 A 中图 A.1。

——若选用固相萃取法(4.5.1.2.2),按照液相色谱参考条件 I (4.5.2.1)或液相色谱参考条件 II (4.5.2.2),分别取维生素 E(*dl*-α-生育酚)标准系列溶液(4.2.16)和试样溶液(4.5.1.2.2)上机测定,维生素 E(*dl*-α-生育酚)标准溶液的液相色谱图见图 A.1 或图 A.2。

4.5.2.4 定性

以保留时间定性,试样溶液中维生素 E(*dl*-α-生育酚)的保留时间应与质量浓度相当标准系列溶液中维生素 E(*dl*-α-生育酚)的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.2.5 定量

以维生素 E(*dl*-α-生育酚)的质量浓度为横坐标、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。试样溶液中维生素 E(*dl*-α-生育酚)的质量浓度应在标准曲线的线性范围内,若超出线性范围,液液萃取和固相萃取应将试样溶液分别用甲醇和乙腈稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中维生素 E(*dl*-α-生育酚)的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过30%。

4.6 试验数据处理

试样中维生素 E(*dl*-α-生育酚)的含量以质量分数 w_1 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,多点校正按公式(1)计算,单点校正按公式(2)计算:

$$\omega_1 = \frac{\rho_1 \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{m_1 \times V_2 \times 1\,000} \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- ρ_1 ——从标准曲线查得的试样溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚)质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)；
- 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)；
- 1 000 ——换算系数；
- n ——超出标准曲线范围后的稀释倍数；
- 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)。

$$\omega_1 = \frac{A_1 \times \rho_{s1} \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{A_{s1} \times m_1 \times V_2 \times 1\,000} \times n \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- A_1 ——试样溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚)峰面积值；
- ρ_{s1} ——标准溶液维生素 E(*dl*- α -生育酚)质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)；
- 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)；
- 1 000 ——换算系数；
- n ——稀释倍数；
- A_{s1} ——标准溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚)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)。

试样中维生素 E 的含量以质量分数 ω_2 计,数值以国际单位每千克(IU/kg)表示,按公式(3)计算：

$$\omega_2 = \frac{\omega_1}{f_1} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- ω_1 ——试样中维生素 E(*dl*- α -生育酚)的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)；
- f_1 ——转换系数,1 IU 维生素 E 相当于 0.909 mg *dl*- α -生育酚。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下,两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百分数,见表 2。

表 2 相对偏差

维生素 E(<i>dl</i> - α -生育酚)含量 IU/kg	相对偏差 %
1.1~<11	±20
≥11	±10

5 第二法 直接提取法

5.1 原理

试样中的维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)用甲醇提取,高效液相色谱仪测定,外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水:GB/T 6682 一级。

5.2.2 甲醇:色谱纯。

5.2.3 甲醇。

5.2.4 维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)标准储备溶液(1 mg/mL):称取 *dl*- α -生育酚乙酸酯标准品(CAS号:7695-91-2,纯度不低于99.0%)100 mg(精确至0.000 1 g)于100 mL棕色容量瓶中,用甲醇(5.2.3)溶解并定容,混匀。-18℃以下避光保存,有效期6个月。

5.2.5 维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)标准系列溶液:准确移取适量的维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)标准储备溶液(5.2.4),分别置于100 mL棕色容量瓶中,用甲醇(5.2.3)稀释并定容,混匀,配制成质量浓度分别为0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、20 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL标准系列溶液。临用现配。

5.2.6 微孔滤膜:孔径0.22 μ m,有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管矩阵检测器。

5.3.2 分析天平:精度为0.000 1 g和0.001 g。

5.3.3 超声波清洗器。

5.4 样品

试样装入密闭容器中,2℃~8℃避光保存,尽快测定。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样溶液的制备

注意:处理过程在避光下操作,提取过程在通风柜中操作。

平行做两份试验。复合预混合饲料试样称取5 g~10 g(精确至0.001 g),置于250 mL的棕色容量瓶中,维生素预混合饲料试样称取0.5 g~1 g(精确至0.000 1 g),置于100 mL的棕色容量瓶中,加入约2/3容量瓶体积的甲醇(5.2.2),边加边摇匀,瓶塞不要拧紧,于超声波水浴中,在45℃下超声提取30 min,期间振摇1次~2次,冷却至室温,用甲醇(5.2.2)定容,摇匀,取适量溶液过微孔滤膜(5.2.6),上机测定。

5.5.2 测定

5.5.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,长150 mm,内径4.6 mm,粒度5 μ m,或性能相当者;
- b) 流动相: V [甲醇(5.2.3)]: V (水)=98:2(体积比);
- c) 流速:1 mL/min;

- d) 柱温:室温;
- e) 进样量:20 μL ;
- f) 检测波长:285 nm。

5.5.2.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)标准系列溶液(5.2.5)和试样溶液(5.5.1)上机测定。维生素 E 标准溶液(*dl*- α -生育酚乙酸酯)的液相色谱图见附录 B 中图 B.1。

5.5.2.3 定性

以保留时间定性,试样溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)色谱峰的保留时间应与质量浓度相当的标准系列溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)色谱峰的保留时间一致,其相对偏差应在 $\pm 2.5\%$ 之内。

5.5.2.4 定量

以维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)的质量浓度为横坐标,以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。试样溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)的质量浓度应在标准曲线的线性范围内,若超出线性范围,应将试样溶液用甲醇(5.2.2)稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)的含量以质量分数 w_3 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校正按公式(4)计算,单点校正按公式(5)计算:

$$w_3 = \frac{\rho_2 \times V \times 1\,000}{m_2 \times 1\,000} \times n \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- ρ_2 ——从标准曲线查得的试样溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V ——试样溶液(5.5.1)的总稀释体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数;
- n ——超出标准曲线范围后的稀释倍数;
- m_2 ——试样质量,单位为克(g)。

$$w_3 = \frac{A_2 \times \rho_{s2} \times V \times 1\,000}{A_{s2} \times m_2 \times 1\,000} \times n \quad \dots\dots\dots(5)$$

式中:

- A_2 ——试样溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)峰面积值;
- ρ_{s2} ——标准溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V ——试样溶液(5.5.1)的总稀释体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数;
- n ——稀释倍数;
- A_{s2} ——标准溶液中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)峰面积值;
- m_2 ——试样质量,单位为克(g)。

试样中维生素 E 的含量,以质量分数 w_4 计,数值以国际单位每千克(IU/kg)表示,按公式(6)计算:

$$\omega_4 = \frac{\omega_3}{f_2} \dots\dots\dots (6)$$

ω_3 ——试样中维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

f_2 ——转换系数,1IU 维生素 E 相当于 1.0 mg *dl*- α -生育酚乙酸酯。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下,两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)

皂化提取法维生素 E(*dl*- α -生育酚)标准溶液液相色谱图

皂化提取法液相色谱参考条件 I 的维生素 E(*dl*- α -生育酚)标准溶液的液相色谱图见图 A.1,液相色谱参考条件 II 的维生素 E(*dl*- α -生育酚)标准溶液的液相色谱图见图 A.2。

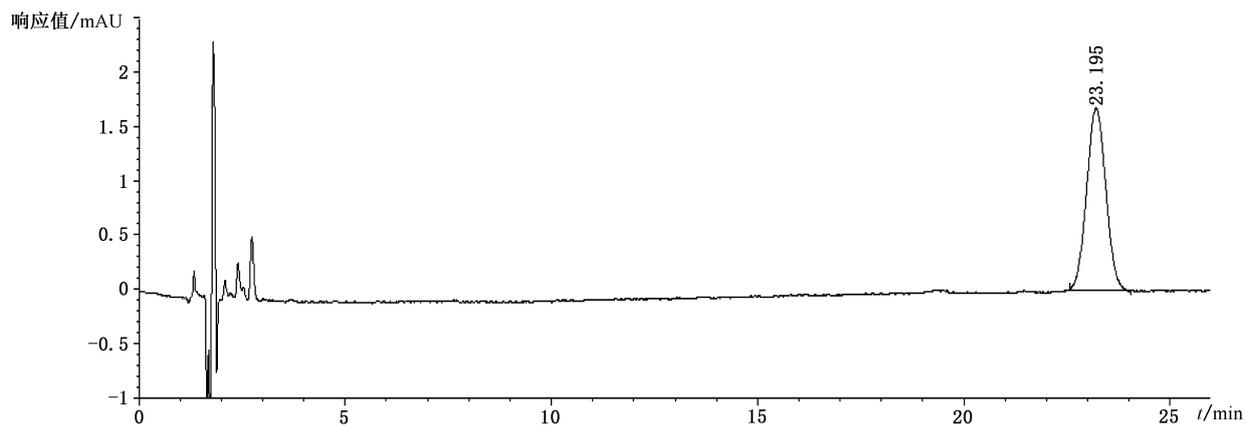


图 A.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 E(*dl*- α -生育酚)标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液相色谱图

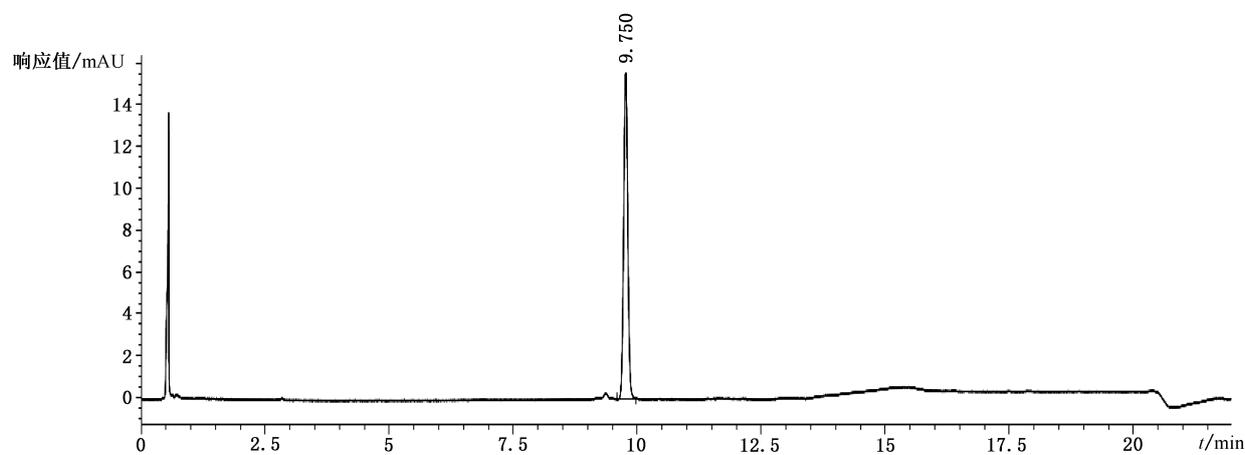


图 A.2 液相色谱参考条件 II 的维生素 E(*dl*- α -生育酚)标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液相色谱图

附录 B

(资料性)

直接提取法维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)标准溶液液相色谱图

直接提取法维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)标准溶液的液相色谱图见图 B.1。

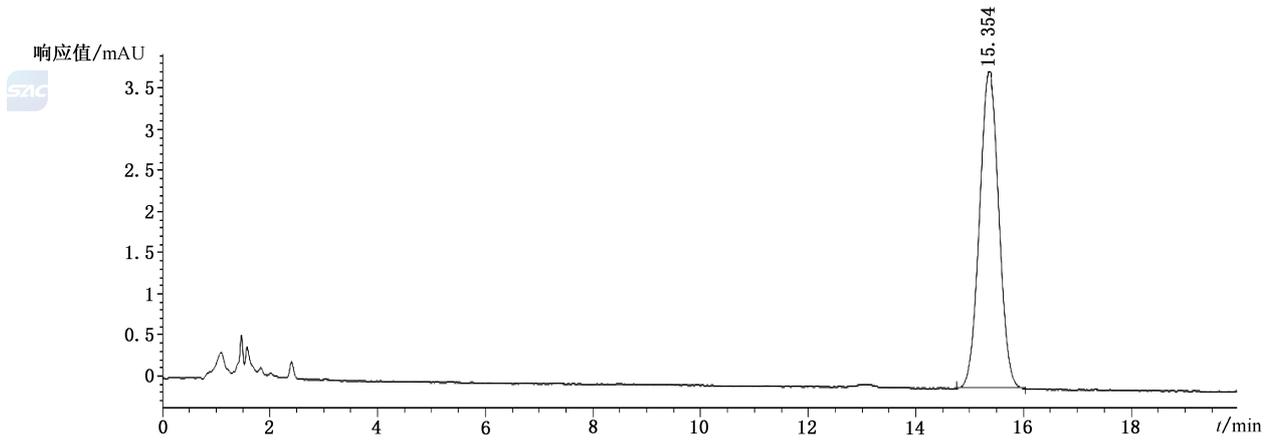


图 B.1 直接提取法维生素 E(*dl*- α -生育酚乙酸酯)标准溶液(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液相色谱图