



中华人民共和国国家标准

GB/T 17812—202×

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

(征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××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) 第一法皂化提取法范围增加了精料补充料，直接提取法范围增加了复合预混合饲料（见第 1 章，2008 年版的第 1 章）；
- b) 第一法皂化提取法提取剂更改为石油醚（沸程 30℃-60℃）（见第 4 章，2008 年版第 3 章）；
- c) 第一法中皂化提取法增加了维生素 E 标准系列溶液（见 4.2.16）；
- d) 第一法中皂化提取法配合饲料、精料补充料、浓缩饲料样品制备方法更改为试样全部通过 1 mm 孔筛，复合预混合饲料试样、维生素预混合饲料更改试样装入密闭容器，尽快测定（见 4.4，2008 年版中 3.5）；
- e) 增加了固相萃取法（见 4.5.1.2.2）及其色谱图；
- f) 增加了液相色谱参考条件（见 4.5.2.2）；
- g) 增加了定性检测方法，定量检测增加多点校正（见第 4 章）；
- h) 删除了正相色谱条件（2008 年版第 3 章）；
- i) 更改了第一法皂化提取法中试验数据处理（见 4.6，2008 年版的 3.6.2.3）
- j) 增加了第二法直接提取法中维生素 E 标准系列溶液（见 5.2.5）；
- k) 更改了第二法直接提取法中试验数据处理（见 5.6，2008 年版的 4.6.2.3）
- l) 增加第一法皂化法提取法维生素 E 标准溶液的液相色谱图（见附录 A），增加第二法直接提取法 dl- α -生育酚乙酸酯的液相色谱图（见附录 B）。

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、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。

本标准主要起草人：

本文件及其所代替文件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“第一法 皂化提取法”适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、复合预混合饲料和维生素预混合饲料中维生素 E (*dl-α*-生育酚) 的测定,“第二法 直接提取法”适用于维生素预混合饲料、复合预混合饲料中维生素 E (*dl-α*-生育酚乙酸酯) 的测定。

本文件“第一法 皂化提取法”的定量限为 1 mg/kg,“第二法 直接提取法”的定量限为 20 mg/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

注意:使用的器皿不含有氧化性物质;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。

4.1 原理

试样用碱溶液皂化后,经液液萃取或固相萃取净化后,用高效液相色谱仪分离测定,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。
- 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。
- 4.2.12 70%乙醇溶液：取无水乙醇 70 mL，用水稀释，定容至 100 mL，混匀。
- 4.2.13 10%甲醇溶液：取甲醇 10 mL，用水稀释，定容至 100 mL，混匀。
- 4.2.14 0.1 %甲酸溶液：取甲酸 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（1.0 mg/mL）：称取100 mg *dl*- α -生育酚标准品（CAS号：10191-41-0，纯度 \geq 99.0%，或有证标准物质）（精确至0.000 01 g）于100 mL棕色容瓶中，用无水乙醇（4.2.2）溶解并稀释至刻度，混匀，-18 °C以下避光保存，有效期12个月。
- 4.2.16 维生素 E 标准系列溶液：准确吸取适量的维生素 E 标准储备溶液（4.2.15），于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（4.2.5）稀释并定容，混匀，配制质量浓度分别为 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、200 μ g/mL 标准系列溶液。
- 4.2.17 酚酞指示剂（10 g/L）：称取 1 g 酚酞，用 95%乙醇溶解，并稀释至 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 \geq 99.9%。

4.3 仪器和设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外吸收检测器（或二极管矩阵检测器）；
- 4.3.2 分析天平：精度为 0.01 mg 和 0.1mg。
- 4.3.3 回流装置：圆底烧瓶和冷凝管。
- 4.3.4 恒温水浴，控温精度 \pm 2 °C。
- 4.3.5 旋转蒸发器。
- 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，温度可控制在（50 \pm 2）°C。
- 4.3.9 涡旋混合器。

4.4 样品

配合饲料、浓缩饲料、精料补充料试样，按照 GB/T 20195 规定制备试样，至少 200 g，粉碎使其全部通过 1 mm 孔径的试验筛，混合均匀，装入密闭容器中，2 °C~8 °C避光保存，尽快测定。复合预混合饲料试样、维生素预混合饲料试样装入密闭容器中，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

4.5.1.1 皂化

平行做两份试验。称取配合饲料、浓缩饲料、精料补充料 10 g（精确至 0.001 g）；称取复合预混合饲料 4 g（精确至 0.001 g），维生素预混合饲料 1 g（精确至 0.0001 g）置入 250 mL 圆底烧瓶中，加 1 g 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）和 20 mL 50% 氢氧化钾溶液（4.2.11），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（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℃，备用。

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 次冲洗圆底烧瓶并入分液漏斗，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，分次用 100 mL、60 mL 石油醚（4.2.4）各提取 1 次，弃去水相，合并三次石油醚相。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。乙醚提取液通过无水硫酸钠（4.2.10）脱水，转移到 250 mL 棕色容量瓶中，用石油醚定容至刻度。

从石油醚提取液中分取一定体积（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，在部分真空、水浴温度约 50℃的条件下蒸发至干或用氮气吹干。残渣用甲醇溶解，并稀释至 10 mL 使获得的溶液中每毫升含维生素 E（*dl*- α -生育酚）50 μ g~100 μ g，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 70%乙醇溶液（4.2.12）洗涤瓶内的残渣并将溶液并入容量瓶内，重复洗涤两次，用 70%乙醇溶液（4.2.12）定容，混匀，取一定体积皂化液于离心管中，5 000 r/min 离心 5 min，上清液待用。

移取 3 mL 甲醇、5 mL 水分别淋洗、活化固相萃取小柱，弃去淋洗液。对于配合饲料、精料补充料和浓缩饲料，上清液混匀后准确移取 6 mL 于 15 mL 具塞离心管中，加 2 mL 水，涡旋均匀，全部加载到固相萃取柱中，控制流速小于 2 mL/min，用甲醇溶液（4.2.13）每次 2 mL，洗涤两次离心管过柱，再用 4 mL 甲醇溶液（4.2.13）淋洗固相萃取柱。将固相萃取柱抽干，用乙腈（4.2.6）洗脱 3 次，每次 1 mL，合并洗脱液，于 40℃下用氮气吹干，用乙腈（4.2.6）定容至 1 mL，涡旋复溶，过微孔滤膜（4.2.19），待测。对于复合预混合饲料皂化上清液，混匀后准确移取 1.5 mL，于 5 mL 具塞离心管中，加 0.5 mL 水，涡旋后，全部加载到固相萃取柱中，以下淋洗、洗脱步骤同配合饲料、精料补充料和浓缩饲料皂化上清液的淋洗、洗脱步骤，乙腈洗脱液需收集到 5 mL 容量瓶中，并用乙腈（4.2.6）定容，混匀，过微孔滤膜（4.2.19），待测。

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：甲醇（4.2.5）+水=95+5；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 温度：室温；
- e) 进样量：20 μ L；

f) 检测波长：280 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 μm，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) 柱温：35 °C；
- d) 进样量：10 μL；
- e) 检测波长：280 nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %	C 相 %	流速 mL/min
0.0	30	70	0	1.0
1.0	25	75	0	1.0
12.0	0	100	0	1.0
14.0	0	0	100	1.0
19.0	0	0	100	1.0
20.0	30	70	0	1.0

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 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 标准溶液的液相色谱图见附录 A 的图 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 II（4.5.2.2），分别取维生素 E 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 标准溶液的液相色谱图见附录 A 的图 A.2。

4.5.2.4 定性

以保留时间定性，试样溶液中维生素 E 的保留时间应与质量浓度相当标准系列溶液中维生素 E 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 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 的质量浓度应在标准曲线的线性范围内，若超出线性范围，应将试样溶液稀释后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中维生素 E 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 的含量，以质量分数 w_1 计，单位为国际单位（或毫克）每千克（IU 或 mg/kg），

多点校正按公式（1）计算，单点校正按公式（2）计算：

$$w_1 = \frac{\rho_1 \times V_1 \times V_3}{m_1 \times V_2 \times f_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- ρ_1 —从标准曲线查得的试样溶液中维生素 E 质量浓度，单位为国际单位每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
- 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）；
- 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，1IU 维生素 E 相当于 0.909 mg *dl*- α -生育酚，或 1.0 mg *dl*- α -生育酚乙酸酯。

$$w_1 = \frac{A_1 \times \rho_{s1} \times V_1 \times V_3}{A_{s1} \times m_1 \times V_2 \times f_1} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- A_1 —试样溶液中维生素 E 峰面积值；
- ρ_{s1} —标准溶液维生素 E 质量浓度，单位为国际单位每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
- 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）；
- A_{s1} —标准溶液中维生素 E 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，1IU 维生素 E 相当于 0.909 mg *dl*- α -生育酚，或 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。

4.7 精密度

在重复性条件下，2 次独立测定结果与其算数平均值的绝对差值不大于该算数平均值的百分数，见表 2。

表 2 相对偏差

<i>dl</i> - α -生育酚含量 (mg/kg)	相对偏差/%
1~10	20
≥ 10	10

5 第二法 直接提取法

注意：使用的器皿不含有氧化性物质，处理过程在避光下操作。

5.1 原理

维生素预混合饲料、复合预混合饲料中维生素 E（*dl*- α -生育酚乙酸酯）用甲醇溶液提取，试液注入

高效液相色谱色谱柱，用紫外检测器（或二极管阵列检测器）在 285 nm 处测定，外标法计算维生素 E（*dl*- α -生育酚乙酸酯）含量。

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。

5.2.3 甲醇：色谱纯。

5.2.4 维生素 E（*dl*- α -生育酚乙酸酯）标准储备溶液[1.0 mg/mL]：称取 *dl*- α -生育酚乙酸酯（CAS 号：7695-91-2，纯度 \geq 99.0%，或有证标准物质）100 mg（精确至 0.000 01 g），于 100 mL 棕色容量瓶中，用乙醇（5.2.3）溶解并稀释至刻度，混匀，-18℃以下避光保存，有效期 12 个月。

5.2.5 维生素 E（*dl*- α -生育酚乙酸酯）标准系列溶液：准确吸取适量的维生素 E 标准储备溶液（5.2.4），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 2 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、30 μ g/mL、60 μ g/mL、120 μ g/mL 标准系列溶液。

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：配有二极管矩阵检测器或紫外检测器。

5.3.2 分析天平，精度为 0.000 1 g 和 0.000 01 g。

5.3.3 超声波清洗器：频率不低于 35 000 Hz。

5.4 样品

同 4.4。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样溶液的制备

平行做两份实验。称取复合预混合饲料试样 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 0.5 g~1 g（精确至 0.0001 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，在室温下超声提取 30 min，期间振摇 1~2 次，冷却至室温，用甲醇（5.2.2）稀释至刻度，充分摇匀，取适量溶液过微孔滤膜（5.2.6），进样测定，使待测样品维生素 E 的进样浓度与标准溶液浓度接近。

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：C₁₈型柱，长 150mm，内径 4.6mm，粒度 5 μ m，或性能相当者；
- b) 流动相：甲醇（5.2.3）+水=（98+2）；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 温度：室温；

- e) 进样量: 20 μL;
f) 检测波长: 285nm。

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。

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 色谱峰的保留时间一致,其相对偏差应在±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 的质量浓度应在标准曲线的线性范围内,若超出线性范围,应将试样溶液稀释后,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中维生素 E 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 的含量,以质量分数 w_2 计,单位为国际单位(或毫克)每千克(IU 或 mg/kg)。多点校正按公式(3)计算,单点校正按公式(4)计算:

$$w_2 = \frac{\rho_2 \times V}{m_2 \times f_2} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- ρ_2 —从标准曲线查得的试样溶液中维生素 E 浓度,单位为国际单位每毫升(μg/mL);
 V —试样溶液(5.5.1)的总稀释体积,单位为毫升(mL);
 m_2 —试样质量,单位为克(g);
 f_2 —转换系数,1IU 维生素 E 相当于 0.909 mg *dl-α*-生育酚,或 1.0 mg *dl-α*-生育酚乙酸酯。

$$w_2 = \frac{A_2 \times \rho_{S2} \times V}{A_{S2} \times m_2 \times f_2} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- A_2 —试样溶液中维生素 E 峰面积值;
 ρ_{S2} —标准溶液中维生素 E 质量浓度,单位为国际单位每毫升(μg/mL);
 V —试样溶液(5.5.1)的总稀释体积,单位为毫升(mL);
 A_{S2} —标准溶液中维生素 E 峰面积值;
 m_2 —试样质量,单位为克(g);
 f_2 —转换系数,1IU 维生素 E 相当于 0.909 mg *dl-α*-生育酚,或 1.0 mg *dl-α*-生育酚乙酸酯;
平行测定结果用算术平均值表示,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)
维生素 E 标准溶液液相色谱图

A.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 E 标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

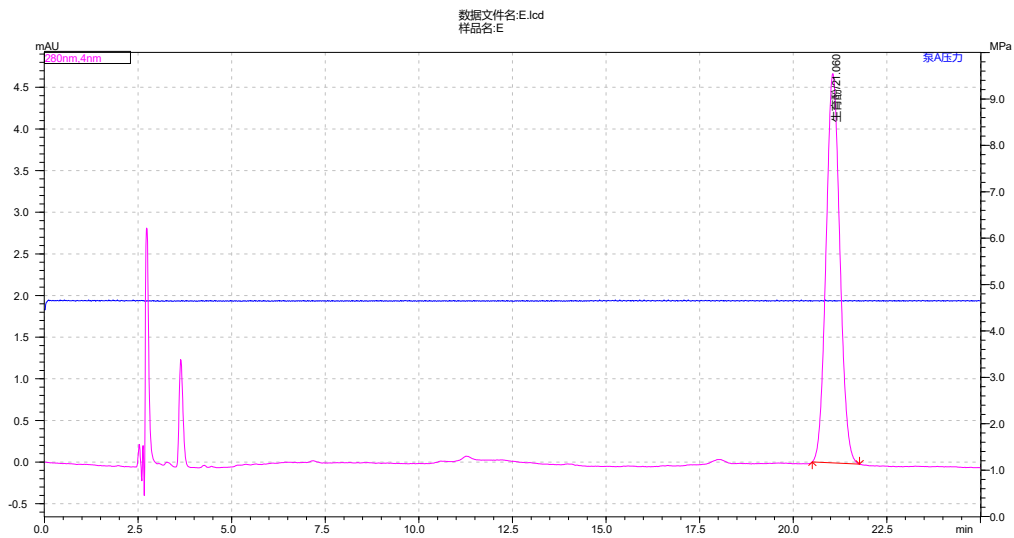


图 A.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 E 标准溶液 (5.0 μ g/mL) 的液相色谱图

A.2 液相色谱参考条件 II 的维生素 E 标准溶液的液相色谱图见图 A.2。

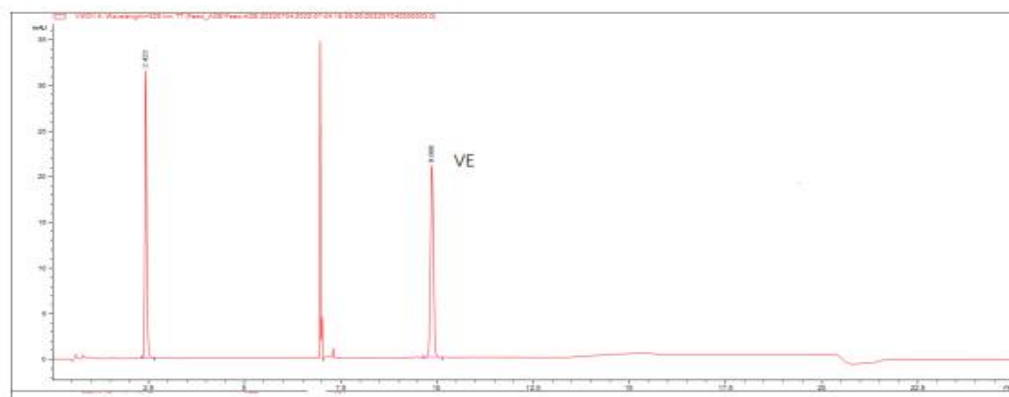


图 A.2 液相色谱参考条件 II 的维生素 E 标准溶液 (5.0 μ g/mL) 的液相色谱图

附录 B
(资料性)

维生素 E (*dl*- α -生育酚乙酸酯) 标准溶液液相色谱图

B.1 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。

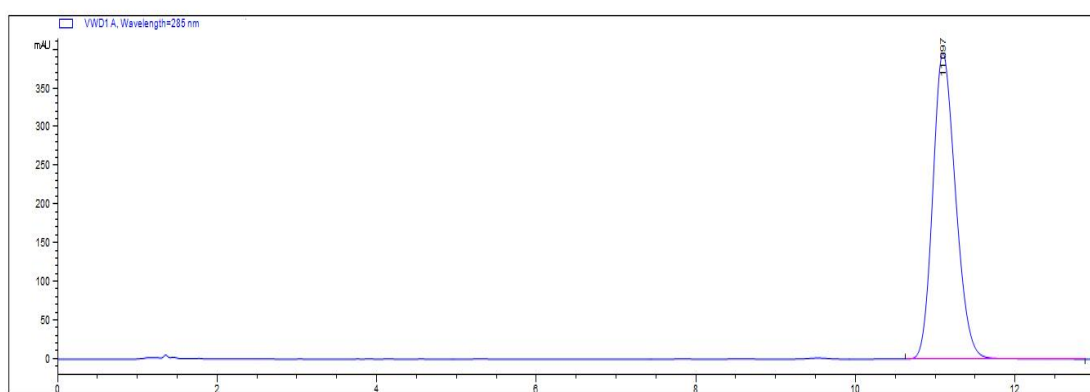


图 B.1 维生素 E (*dl*- α -生育酚乙酸酯) 标准溶液 (1.5 μ g/mL) 的液相色谱图