



中华人民共和国国家标准

GB/T 18872—2002

饲料中维生素 K₃ 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin K₃ in feeds—
High-performance liquid chromatography

2002-10-31 发布

2003-04-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准在查阅国内外文献的基础上,参考《美国全国饲料协会(NFIA)分析方法概要》发表的方法《高效液相色谱法(HPLC)测定全价饲料、预混料和维生素浓缩制剂中的维生素 K₃》而制定。

本标准在技术内容上参考国外方法,其方法原理、基本操作步骤相同;对范围、称样量、试样提取条件、高效液相色谱测定条件进行了改进,并做了明确规定。

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提出并归口。

本标准起草单位:国家饲料质量监督检验中心(北京)。

本标准主要起草人:陈必芳、赵晓阳。

饲料中维生素 K₃ 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱仪测定饲料中维生素 K₃ 含量的方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料和维生素预混合饲料中维生素 K₃(亚硫酸氢钠甲萘醌)的测定。测量范围为每千克样品中含维生素 K₃ 在 2.0 mg 以上。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料采样方法

3 原理

用三氯甲烷氨溶液提取维生素 K₃ 并转化成游离甲萘醌,蒸发三氯甲烷,残渣溶解于甲醇中。用高效液相色谱测定,维生素 K₃(甲萘醌)经反相 C₁₈ 柱得到分离,紫外检测器检测,外标法计算。若以亚硫酸氢钠甲萘醌计需乘以校正系数。

4 试剂和材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.1 水,GB/T 6682 一级用水或相当纯度的超纯水。

4.2 三氯甲烷。

4.3 甲醇,色谱纯。

4.4 氢氧化氨 25%。

4.5 硅藻土(宾式盐)和无水硫酸钠混合物:3+20(按质量)混合。

4.6 甲萘醌,纯度 99.9%(作校准用)。

4.7 标准溶液:

a) 标准贮备液:称取约 50 mg 甲萘醌纯品(4.6)准确至±0.1 mg,溶于 50 mL 甲醇(4.3)中,其贮备液浓度为每毫升含甲萘醌 1 mg,贮于棕色容量瓶中,在≤4℃冰箱中保存一周是稳定的。

b) 标准工作液:精确吸取甲萘醌标准贮备液[4.7 a)],用甲醇稀释 200 倍,使该标准工作液浓度为每毫升含甲萘醌 5 μg。标准工作液当日配制。

4.8 氮气,99.9%。

5 仪器设备

5.1 实验室常用仪器设备。

5.2 超纯水装置(Millipore 或全磨口玻璃蒸馏器)。

- 5.3 旋转振荡器,200 r/min。
- 5.4 旋转蒸发器。
- 5.5 离心机,3 000 r/min。
- 5.6 高效液相色谱仪,带紫外检测器、积分仪、记录仪。

6 试样制备

按 GB/T 14699 采样,选取有代表性的饲料样品至少 500 g,四分法缩减至 100 g,磨碎,全部通过 0.28 mm 孔径筛,混匀,装入密闭容器中,避光,低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 总则

因维生素 K₃ 对空气和紫外光具敏感性,而且所用提取剂三氯甲烷氨溶液有异臭,所以全部操作均应避光并在通风厨内进行。

7.2 试样溶液的制备

7.2.1 称取试样(6):维生素预混合饲料 0.25 g~0.5 g(精确至 0.1 mg)或复合预混合饲料 1 g 或浓缩饲料、配合饲料 5 g(精确至 1 mg),置入 100 mL 具塞锥形瓶中,准确加入 50 mL 三氯甲烷(4.2)放在旋转振荡器(5.3)上旋转振荡 2 min。加 6 mL 25%氢氧化氨(4.4)旋转振荡 3 min。再加 10 g 硅藻土和无水硫酸钠混合物(4.5),于旋转振荡器上振荡 30 min,然后,用中速滤纸过滤(或移入离心管,离心 10 min)。

7.2.2 根据三氯甲烷提取液中甲萘醌的预计浓度(依据样品标示量、称样量和提取液量确定分取量,见附录 A),吸取一定量的提取液(7.2.1)移入蒸发瓶中,连接旋转蒸发器(5.4)真空减压浓缩,水浴温度不超过 40℃,小心蒸发至体积约为 0.5 mL,解除真空时通入氮气避免氧化。(或定量吸取三氯甲烷提取液置入小容量瓶内用氮气流吹干)。用甲醇(4.3)或移动相溶解残渣,稀释定容,使其最后溶液浓度为每毫升含甲萘醌 1 μg~5 μg,如果需要可通过 0.45 μm 滤膜过滤,供注入 HPLC 测定。

7.3 测定

7.3.1 高效液相色谱条件

色谱柱:NoVa-pak C₁₈,粒度 5 μm,长 15 cm,内径 3.9 mm,或相当的 C₁₈柱。

流动相:甲醇(4.3)+水(4.1)为 750 mL+250 mL。

流速:1 mL/min。

温度:室温。

检测器:紫外检测器,使用波长 251 nm。

7.3.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数和灵敏度(AUFS),色谱峰分离 R≥1.5。用两次以上相应的标准工作液对系统进行校正,向色谱柱交替注入相应的甲萘醌标准工作液[4.7 b]和试样溶液(7.2.2)得到色谱峰面积响应值(P_{st}, P_i),用外标法定量测定。

8 结果计算

8.1 计算公式:饲料中维生素 K₃ 的含量,按式(1)计算。

$$\omega_i = \frac{P_i \times V \times n \times \rho_i \times V_{st} \times f}{P_{st} \times m \times V_i} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

ω_i——每千克试样中维生素 K₃ 的含量,单位为毫克(mg);

m——试样质量,单位为克(g);

V ——提取液的总体积,单位为毫升(mL);

n ——提取液稀释倍数;

ρ_i ——维生素 K₃(甲萘醌)标准溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V_{st} ——维生素 K₃(甲萘醌)标准溶液进样体积,单位为微升(μL);

V_i ——从试样溶液(7.2.2)中分取的进样体积,单位为微升(μL);

P_{st} ——与标准溶液进样体积(V_{st})相应的峰面积响应值;

P_i ——与从试样溶液(7.2.2)中分取的进样体积(V_i)相应的峰面积响应值;

f ——校正系数,结果按甲萘醌计时,系数为 1;以亚硫酸氢钠甲萘醌计时系数为 1.918 2。

8.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留小数后一位。

9 重复性

同一操作者对同一试样同时两次平行测定所得结果相对偏差。

每千克试样中维生素 K ₃ 含量/mg	相对偏差/(%)
<100	$\leq \pm 20$
100~1 000	$\leq \pm 15$
>1 000	$\leq \pm 10$

附录 A
(资料性附录)

饲料样品标示量、称样量及甲萘醌提取液稀释度示例

表 A.1 饲料样品标示量、称样量及甲萘醌提取液稀释度

饲料类别	维生素 K ₃ 标示量 (mg/kg)	样品量(m)/g	三氯甲烷体积 (V)/mL	提取液中甲 萘醌浓度/ (μg/mL)	提取液稀释 倍数(n)	注入 HPLC 预计浓度/ (μg/mL)
维生素预混合饲料	20,000	0.25	50.0	100.0	20	5
	2,000	0.5	50.0	20.0	4	5
复合预混合饲料	1 000	1.0	50.0	20.0	4	5
	100	1.0	50.0	2.0	1	2
浓缩饲料	20	5.0	50.0	2.0	0.5	2
配合饲料	10	5.0	50.0	1.0	0.5	2
	2	10.0	75	0.27	0.2	1.35