



中华人民共和国国家标准

GB/T 18872—2017
代替 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

2017-11-01 发布

2018-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18872—2002《饲料中维生素 K₃ 的测定 高效液相色谱法》。与 GB/T 18872—2002 相比,主要技术内容变化如下:

- 适用范围补充了精料补充料;增加饲料添加剂维生素 K₃ 的品种,即本方法还适用于以亚硫酸氢烟酰胺甲萘醌和二甲基嘧啶醇亚硫酸甲萘醌形式添加的维生素 K₃。
- 范围中明确了维生素 K₃ 的含量以甲萘醌计,测量范围 2 mg/kg 以上修改为定量限 0.4 mg/kg。
- 改进样品的提取方法,由氨水水解改为碳酸钠溶液水解。
- 增加了亚硫酸氢钠甲萘醌、亚硫酸氢烟酰胺甲萘醌、二甲基嘧啶醇亚硫酸甲萘醌与甲萘醌之间的转换系数。

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)]、广州爱保农饲料有限公司、中牧实业股份有限公司。

本标准主要起草人:赵小阳、刘志英、朱高群、汪忠艳、郭红双。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 18872—2002。

饲料中维生素 K₃ 的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中维生素 K₃ (亚硫酸氢钠甲萘醌、亚硫酸氢烟酰胺甲萘醌、二甲基嘧啶醇亚硫酸甲萘醌,以甲萘醌计)含量测定的高效液相色谱方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中维生素 K₃ 的测定。方法的定量限为 0.4 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 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 原理

试样经三氯甲烷和碳酸钠溶液提取并转化成游离甲萘醌,经反相 C₁₈ 柱分离,紫外检测器检测,外标法定量。

4 试剂和材料

- 除另有说明外,本标准所有试剂均为分析纯试剂,试验用水符合 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。
- 4.1 三氯甲烷。
 - 4.2 甲醇:色谱纯。
 - 4.3 无水碳酸钠。
 - 4.4 碳酸钠溶液: $c=1\text{ mol/L}$,称取无水碳酸钠(4.3)10.6 g,加 100 mL 水溶解,摇匀。
 - 4.5 无水硫酸钠。
 - 4.6 硅藻土。
 - 4.7 硅藻土和无水硫酸钠混合物:称取 3 g 硅藻土与 20 g 无水硫酸钠混匀。
 - 4.8 甲萘醌标准品:含量 $\geq 96\%$ 。
 - 4.9 甲萘醌标准贮备液:称取甲萘醌标准品(4.8)约 50 mg(精确至 0.000 01 g)于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解,稀释至刻度,混匀。该贮备液浓度约为 500 $\mu\text{g/mL}$, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期一年。
 - 4.10 甲萘醌标准工作液:准确吸取 1.00 mL 甲萘醌标准贮备液(4.9)于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解,稀释至刻度,混匀。该工作液浓度约为 5 $\mu\text{g/mL}$, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 3 个月。

5 仪器和设备

- 5.1 实验室常用仪器设备。
- 5.2 天平,感量 0.001 g。
- 5.3 天平,感量 0.0001 g。
- 5.4 天平,感量 0.000 01 g。
- 5.5 旋转振荡器,200 r/min。
- 5.6 离心机;不低于 5 000 r/min(相对离心力为 2 988 g)。
- 5.7 氮吹仪(或旋转蒸发仪)。
- 5.8 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)。

6 采样和试样制备

按照 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。

按照 GB/T 20195 制备试样,磨碎,全部通过 0.25 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

7 分析步骤

警示——因维生素 K_3 对空气和紫外光具敏感性,而且所用提取剂三氯甲烷溶液有一定毒性,所以全部操作均应避光并在通风橱内进行。

7.1 试样溶液的制备

称取维生素预混合饲料 0.25 g~0.5 g(精确至 0.000 1 g)或复合预混合饲料 1 g 或浓缩饲料 5 g(精确至 0.001 g)、配合饲料、精料补充料 5 g~10 g(精确至 0.001 g),置入 100 mL 具塞锥形瓶中,准确加入 50 mL 三氯甲烷(4.1)放在旋转振荡器(5.5)旋转振荡 2 min。加 5 mL 碳酸钠溶液(4.4)旋转振荡 3 min。再加 5 g 硅藻土和无水硫酸钠混合物(4.7),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,5 000 r/min 离心 10 min)。

依据样品预期量、称样量和提取液量确定分取量(参见表 A.1),准确吸取适量三氯甲烷提取液(V_2),用氮气吹干(或 40 °C 旋转减压蒸干)。用甲醇(4.2)溶解,定容(V_3),使试样溶液浓度为每毫升含甲萘醌 0.1 μg ~5 μg 。通过 0.45 μm 有机滤膜过滤,用于高效液相色谱仪分析。

7.2 测定

7.2.1 参考色谱条件

色谱柱: C_{18} 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(75+25);

流速:1.0 mL/min;

柱温:室温;

进样量:5 μL ~20 μL ;

检测波长:251 nm。

7.2.2 定量测定

依次注入相应的甲萘醌标准工作液(4.10)和试样溶液(7.1),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量测定,甲萘醌标准溶液色谱图参见图 B.1。

8 结果计算

试样中甲萘醌的含量 X ,以甲萘醌在样品中的质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算:

$$X = \frac{P_1 \times V_1 \times V_3 \times \rho}{P_2 \times m \times V_2}$$

.....(1)

式中:

- P_1 ——试样溶液峰面积值;
- V_1 ——提取液的总体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- ρ ——甲萘醌标准工作液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- P_2 ——甲萘醌标准工作液峰面积值;
- m ——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)。

注:饲料中维生素 K_3 的添加剂有亚硫酸氢钠甲萘醌、亚硫酸氢烟酰胺甲萘醌和二甲基嘧啶醇亚硫酸甲萘醌,与甲萘醌之间的转换系数为:1 mg 的甲萘醌相当于 1.918 2 mg 的亚硫酸氢钠甲萘醌;1 mg 的甲萘醌相当于 2.186 mg 的亚硫酸氢烟酰胺甲萘醌;1 mg 的甲萘醌相当于 2.198 mg 的二甲基嘧啶醇亚硫酸甲萘醌。

测定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。

9 重复性

对于维生素 K_3 含量小于 100 mg/kg 的饲料,在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的差值不大于这两个测定值算术平均值的 20%;

对于维生素 K_3 含量在 100 mg/kg~1 000 mg/kg 范围内的饲料,在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的差值不大于这两个测定值算术平均值的 15%;

对于维生素 K_3 含量大于 1 000 mg/kg 的饲料,在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的差值不大于这两个测定值算术平均值的 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倍数示例

饲料样品标示量、称样量及甲萘醌提取液稀释倍数示例见表 A.1。

表 A.1 饲料样品标示量、称样量及甲萘醌提取液稀释倍数

饲料类别	维生素 K ₃ 标示量 mg/kg	称样量 g	三氯甲烷体积 mL	提取液中维 生素 K ₃ 浓度 μg/mL	提取液稀释 倍数 n	注入 HPLC 试样 预计浓度 μg/mL
维生素预混合饲料	20 000	0.25	50.0	100.0	20	5.0
	2 000	0.5	50.0	20.0	4	5.0
复合预混合饲料	1 000	1.0	50.0	20.0	4	5.0
	100	1.0	50.0	2.0	1	2.0
浓缩饲料	20	5.0	50.0	2.0	1	2
配合饲料、精料补充料	10	5.0	50.0	1.0	0.5	2
	0.5	5.0	50.0	0.05	0.05	1.0

附 录 B
(资料性附录)
甲萘醌标准溶液色谱图

甲萘醌标准溶液色谱图见图 B.1。

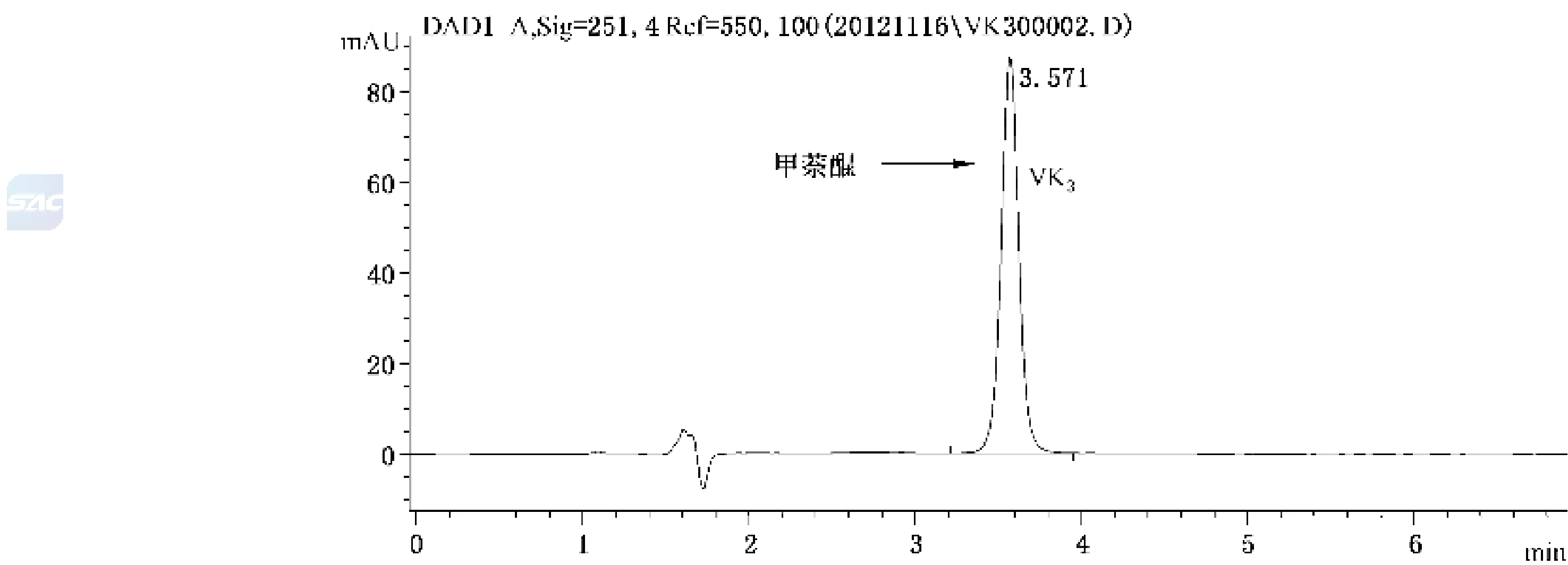


图 B.1 甲萘醌标准溶液(浓度为 5 μg/mL)色谱图