



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 17817—2024

代替 GB/T 17817—2010

## 饲料中维生素 A 的测定 高效液相 色谱法

Determination of vitamin A in feeds—High performance liquid chromatography

2024-11-28 发布

2025-06-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 第一法 皂化提取法 .....	1
4.1 原理 .....	1
4.2 试剂或材料 .....	1
4.3 仪器设备 .....	2
4.4 样品 .....	2
4.5 试验步骤 .....	3
4.6 试验数据处理 .....	6
4.7 精密度 .....	7
5 第二法 直接提取法 .....	7
5.1 原理 .....	7
5.2 试剂或材料 .....	7
5.3 仪器设备 .....	7
5.4 样品 .....	8
5.5 试验步骤 .....	8
5.6 试验数据处理 .....	8
5.7 精密度 .....	9
附录 A (规范性) 维生素 A 和维生素 A 乙酸酯标准储备溶液的质量浓度校正方法 .....	10
附录 B (资料性) 在线固相萃取阀的切换流程图 .....	11
附录 C (资料性) 维生素 A 标准溶液的液相色谱图 .....	12
附录 D (资料性) 维生素 A 乙酸酯标准溶液色谱图 .....	14

## 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 17817—2010《饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法》，与 GB/T 17817—2010 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围，增加了精料补充料和复合预混合饲料，更改了“第二法 直接提取法”定量限（见第1章，2010年版的第1章）；
- b) 增加了“第一法 皂化提取法”中维生素A标准系列溶液（见4.2.19）；
- c) 将“第一法 皂化提取法”中配合饲料、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（见4.4，2010年版的3.5）；
- d) 将“第一法 皂化提取法”提取剂更改为“石油醚”（沸程30℃~60℃）（见4.5.1.2.1，2010年版的3.6.1.2）；
- e) 增加了离线固相萃取法（见4.5.1.2.2）和在线固相萃取法（见4.5.1.2.3）；
- f) 删除了正相色谱条件（见2010年版的3.6.2.1.1）；
- g) 增加了液相色谱参考条件（见4.5.2.2和4.5.2.3）；
- h) 增加了定性检测方法，定量检测增加多点校正（见4.5.2.5，4.5.2.6）；
- i) 更改了“第一法 皂化提取法”中试验数据处理（见4.6，2010年版的3.6.2.3.1）；
- j) 在“第二法 直接提取法”中增加了维生素A标准系列溶液（见5.2.5）；
- k) 更改了“第二法 直接提取法”提取温度，由65℃改为室温（见5.5.1，2010年版的4.6.1）；
- l) 更改了“第二法 直接提取法”中试验数据处理（见5.6，2010年版的4.6.2.3）；
- m) 增加了校正维生素A及维生素A乙酸酯标准储备溶液质量浓度的方法（见附录A）；

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：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、山东省畜产品质量安全中心、帝斯曼维生素（上海）有限公司、四川威尔检测技术股份有限公司、中牧实业股份有限公司、广州爱保农生物科技有限公司。

本文件主要起草人：赵小阳、宋荣、虞哲高、张凤枰、刘向阳、朱高群、刘志英、郭红双、汪忠艳、张玮、谢丽、李丽蓓、张辉、宋艳、冯秀燕、曹林。

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 17817—1999，2010年第一次修订；

——本次为第二次修订。



# 饲料中维生素 A 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 A 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、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料中维生素 A 的测定；“第二法 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 A 乙酸酯的测定。

本文件第一法定量限为 1 000 IU/kg，第二法定量限为 20 000 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 石油醚（沸程 30 °C~60 °C）。

4.2.4 甲醇：色谱纯。

4.2.5 乙腈：色谱纯。

4.2.6 异丙醇：色谱纯。

4.2.7 95% 乙醇。

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 L，混匀。

- 4.2.12 乙醇溶液 I (70%, 体积分数): 量取无水乙醇 70 mL, 用水稀释, 定容至 100 mL, 混匀。
- 4.2.13 乙醇溶液 II (50%, 体积分数): 量取无水乙醇 50 mL, 用水稀释, 定容至 100 mL, 混匀。
- 4.2.14 甲醇溶液 (10%, 体积分数): 量取甲醇 10 mL, 用水稀释, 定容至 100 mL, 混匀。
- 4.2.15 甲酸溶液 (0.1%, 体积分数): 量取甲酸 1 mL, 用水稀释, 定容至 1 L, 混匀。
- 4.2.16 乙醇溶液 III (40%, 体积分数): 量取无水乙醇 40 mL, 用水稀释, 定容至 100 mL, 混匀。
- 4.2.17 乙腈-异丙醇混合溶液 [ $V(\text{乙腈}) : V(\text{异丙醇}) = 50 : 50$ ]: 量取 50 mL 乙腈与 50 mL 异丙醇混合均匀, 超声脱气。
- 4.2.18 维生素 A 标准储备溶液 (1 000 IU/mL): 称取维生素 A 乙酸酯标准品 (CAS 号: 127-47-9, 纯度  $\geq 95.0\%$ , 或标准物质/标准样品) 34.4 mg (精确至 0.000 01 g), 置于皂化瓶中, 进行皂化 (4.5.1.1) 和提取 (4.5.1.2.1), 将石油醚提取液全部浓缩蒸发至干, 用无水乙醇 (4.2.2) 溶解残渣, 置于预先加入 100 mg BHT 的棕色容量瓶中, 稀释至刻度, 混匀后,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -18\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存, 有效期 6 个月。临用前将储备溶液回温至室温, 按照附录 A 规定进行浓度校正。
- 4.2.19 维生素 A 标准系列溶液: 准确移取适量标准储备溶液 (4.2.18), 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 液液萃取法和固相萃取法用无水乙醇 (4.2.2) 稀释并定容, 混匀; 配制成质量浓度分别为 0.2 IU/mL、0.5 IU/mL、1 IU/mL、5 IU/mL、10 IU/mL、20 IU/mL、50 IU/mL 标准系列溶液, 临用现配; 在线固相萃取法用乙醇溶液 II (4.2.13) 稀释并定容, 混匀, 配制成质量浓度分别为 0.16 IU/mL、0.40 IU/mL、0.80 IU/mL、1.60 IU/mL、4.0 IU/mL、8.0 IU/mL、16.0 IU/mL 标准系列溶液, 临用现配。
- 4.2.20 酚酞指示剂 (10 g/L): 称取 1 g 酚酞, 用 95% 乙醇 (4.2.7) 溶解, 稀释至 100 mL, 混匀。
- 4.2.21 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。
- 4.2.22 在线固相萃取柱: 填料为聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物, 长度为 12.5 mm, 内径为 4.6 mm, 粒径为  $15\text{ }\mu\text{m} \sim 20\text{ }\mu\text{m}$ , 或性能相当者。
- 4.2.23 微孔滤膜: 孔径  $0.2\text{ }\mu\text{m}$ , 有机系。
- 4.2.24 氮气: 纯度 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阵列检测器; 在线柱切换-液相色谱系统: 配有紫外检测器。
- 4.3.2 紫外可见分光光度计: 带 1 cm 石英比色皿。
- 4.3.3 分析天平: 精度分别为 0.001 g、0.000 1 g 和 0.000 01 g。
- 4.3.4 回流装置: 圆底烧瓶和冷凝管。
- 4.3.5 恒温水浴: 控温精度  $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3.6 旋转蒸发器。
- 4.3.7 离心机: 转速不低于 10 000 r/min。
- 4.3.8 固相萃取装置。
- 4.3.9 氮吹仪。
- 4.3.10 涡旋混合器。

### 4.4 样品

配合饲料、精料补充料、浓缩饲料试样, 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,  $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  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,  $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$  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：**使用的所有器皿不含有氧化性物质；分液漏斗活塞玻璃表面不涂油；处理过程避光操作；提取过程在通风柜中操作。

#### 4.5.1.1 皂化

平行做2份试验。称取配合饲料、精料补充料、浓缩饲料10 g（精确至0.001 g），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0.000 1 g），置于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（4.2.2）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，防止试样黏附在瓶壁上，皂化结束，分别用5 mL无水乙醇（4.2.2）、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（4.2.3）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（4.2.3）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（4.2.3）提取液至中性[可用酚酞指示剂（4.2.20）检测下层溶液，直至无色]，初次水洗时轻轻旋摇，防止乳化。

配合饲料、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料石油醚提取液经约3 g无水硫酸钠（4.2.10）脱水，转移至旋转蒸发仪烧瓶中，在水浴温度约50℃、真空条件下旋转蒸发至干或用氮气吹干。

对于配合饲料、精料补充料、浓缩饲料，残渣用无水乙醇（4.2.2）溶解并稀释至10 mL，取一定体积于离心管中，调整离心机转速为5 000 r/min，离心5 min，或过0.2 μm微孔滤膜至进样瓶中，待测。

对于复合预混合饲料，吹干后的残渣用无水乙醇（4.2.2）溶解并稀释至100 mL，取一定体积于离心管中，调整离心机转速为5 000 r/min，离心5 min，或过0.2 μm微孔滤膜至进样瓶中，待测。

对于维生素预混合饲料石油醚提取液经约3 g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（4.2.3）稀释至刻度，混匀。取一定体积石油醚提取液用氮气吹干，用无水乙醇（4.2.2）稀释，过0.2 μm微孔滤膜至进样瓶中，待测。

##### 4.5.1.2.2 离线固相萃取法

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Ⅰ（4.2.12）洗涤瓶内的残渣并将溶液并入容量瓶内，重复洗涤2次，用乙醇溶液Ⅰ（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、活化固相萃取柱，弃去淋洗液。对于配合饲料、精料补充料和浓缩饲料皂化上清液，混匀后准确移取6.0 mL，加2 mL水，于15 mL具塞离心管中涡旋均匀，全部加载至固相萃取柱中，控制流速小于2 mL/min，用甲醇溶液（4.2.14）每次2 mL，洗涤2次离心管过柱，再用4 mL甲醇溶液（4.2.14）淋洗固相萃取柱。负压抽干固相萃取柱，用乙腈（4.2.5）洗脱3次，每次1 mL，合并洗脱液，于40℃下用氮气吹干，准确加入1 mL乙腈（4.2.5），涡旋均匀，过0.2 μm微孔滤膜至进样瓶中，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，加0.5 mL水，于5 mL具塞离心管中涡旋均匀，全部加载至固相萃取柱中，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，乙腈洗脱液需收集至5 mL容量瓶中，并用乙腈

(4.2.5) 定容，混匀，过 0.2 μm 微孔滤膜至进样瓶中，待测。

#### 4.5.1.2.3 在线固相萃取法

将配合饲料、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料皂化液（4.5.1.1）全部转移至 250 mL 棕色容量瓶中，用适量乙醇溶液 II（4.2.13）洗涤瓶内的残渣并将洗液并入容量瓶内，用乙醇溶液 II（4.2.13）定容，混匀，取一定体积皂化液于离心管中，10 000 r/min 离心 15 min，取适量上清液过 0.2 μm 滤膜至进样瓶中，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：C<sub>18</sub>柱，长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：甲醇（4.2.4）+ 水 = 95 + 5；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：室温；
- e) 进样量：20 μL；
- f) 检测波长：325 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 C<sub>8</sub>柱，长度 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（4.2.15），B 相为乙腈（4.2.5），C 相为甲醇（4.2.4），梯度洗脱程序见表 1；

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

- c) 柱温：35 °C；
- d) 进样量：10 μL；
- e) 检测波长：325 nm。

#### 4.5.2.3 液相色谱参考条件 III

液相色谱参考条件 III 见表 2，在线固相萃取高效液相色谱仪阀的切换流程图见附录 B。

表2 液相色谱参考条件Ⅲ

色谱参考条件	配置系统	
	在线固相萃取系统	色谱分离系统
色谱柱	聚苯乙烯/二乙烯基苯(PLRP-S)聚合物柱,长12.5 mm,内径4.6 mm,粒径15 μm~20 μm,或性能相当者	C <sub>8</sub> 柱,长100 mm,内径4.6 mm,粒径4 μm,或性能相当者
流动相	A相为40%乙醇溶液Ⅲ(4.2.16) B相为50%乙腈-异丙醇混合溶液(4.2.17)	A相为水 B相为乙腈(4.2.5)
梯度洗脱程序	见表3	见表4
流速/(mL/min)	1.0	1.5
进样体积/μL	100	
柱温箱温度/°C	35	
检测波长/nm	325	
阀1切换阀位置	0 min~4 min, 切换阀位置1~6 4 min~6 min, 切换阀位置1~2 6 min~25 min, 切换阀位置1~6	

表3 在线固相萃取系统梯度洗脱程序

时间/min	A相/%	B相/%
0.0	100	0
4.0	100	0
4.1	0	100
11.0	0	100
11.1	100	0
25.0	100	0

表4 色谱分离系统梯度洗脱程序

时间/min	A相/%	B相/%
0.0	20	80
6.0	20	80
16.0	0	100
19.0	0	100
19.1	20	80
25.0	20	80

## 4.5.2.4 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 A 标准系列溶液（4.2.19）和试样溶液（4.5.1.2.1）上机测定，维生素 A 标准溶液的液相色谱图见附录 C 中图 C.1；
- 若选用离线固相萃取法（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 A 标准系列溶液（4.2.19）和试样溶液（4.5.1.2.2）上机测定，维生素 A 标准溶液的液相色谱图见图 C.2；
- 若选用在线固相萃取法（4.5.1.2.3），按照液相色谱参考条件 III（4.5.2.3），分别取维生素 A 标准系列溶液（4.2.19）和试样溶液（4.5.1.2.3）上机测定，维生素 A 标准溶液的液相色谱图见图 C.3。

4.5.2.5 定性

在相同试验条件下，试样溶液中待测物的保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中待测物的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.2.6 定量

以维生素 A 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，其线性相关系数应不低于 0.999。试样溶液中维生素 A 的质量浓度应在标准曲线的线性范围内，若超出线性范围，液液萃取法使用无水乙醇稀释后进样，离线固相萃取法使用乙腈稀释后进样，在线固相萃取法使用 50% 乙醇水溶液稀释后进样。单点校准定量时，试样溶液中维生素 A 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 A 的含量以质量分数  $w_1$  计，单位为国际单位每千克（IU/kg）。多点校正按公式（1）计算，单点校正按公式（2）计算。

$$w_1 = \frac{\rho_1 \times V_1 \times V_3 \times n}{m_1 \times V_2} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- $\rho_1$  —— 从标准曲线查得的试样溶液中维生素 A 的质量浓度，单位为国际单位每毫升（IU/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）；
- $n$  —— 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）；
- 1 000 —— 换算系数。

$$w_1 = \frac{A_1 \times \rho_{s1} \times V_1 \times V_3 \times n}{A_{s1} \times m_1 \times V_2} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- $A_1$  —— 试样溶液中维生素 A 峰面积值；
- $\rho_{s1}$  —— 标准溶液维生素 A 的质量浓度，单位为国际单位每毫升（IU/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）；
- $n$  —— 超出标准曲线范围后的稀释倍数；

- $A_{s1}$  —— 标准溶液中维生素A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）；  
 1 000 —— 换算系数。

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术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的百分数，见表5。

表5 相对偏差

维生素A含量/（IU/kg）	相对偏差/%
$1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^4$	20
$>1.00 \times 10^4 \sim 1.00 \times 10^5$	15
$>1.00 \times 10^5 \sim 1.00 \times 10^6$	10
$>1.00 \times 10^6$	5

## 5 第二法 直接提取法

### 5.1 原理

用甲醇提取试样中的维生素A乙酸酯，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。

5.2.3 甲醇：色谱纯。

5.2.4 维生素A乙酸酯标准储备溶液（1 000 IU/mL）：称取维生素A乙酸酯标准品（CAS号：127-47-9，纯度 $\geq 95.0\%$ ，或标准物质/标准样品）34.4 mg（精确至0.000 01 g），置于100 mL棕色容量瓶中，加入100 mg BHT，用甲醇（5.2.3）溶解并稀释至刻度，混匀，将溶液转移至棕色试剂瓶中，密封后， $-20\text{ }^\circ\text{C} \sim -18\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存，有效期6个月。临用前将储备溶液回温至室温，按照附录A规定进行浓度校正。

5.2.5 维生素A乙酸酯标准系列溶液：准确移取0.1 mL、0.3 mL、0.6 mL、1.5 mL、3 mL、6 mL维生素A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）稀释定容，混匀，配制成质量浓度分别为1.0 IU/mL、3.0 IU/mL、6.0 IU/mL、15.0 IU/mL、30.0 IU/mL、60.0 IU/mL标准系列溶液，临用现配。

5.2.6 微孔滤膜：孔径0.45  $\mu\text{m}$ ，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阵列检测器。

5.3.2 紫外可见分光光度计：带1 cm石英比色皿。

5.3.3 分析天平：精度分别为 0.000 1 g 和 0.000 01 g。

5.3.4 超声波清洗器：频率不低于 35 000 Hz。

#### 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

平行做 2 份试验。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 0.000 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，在室温下超声提取 30 min，期间振摇 1 次~2 次，冷却至室温，用甲醇（5.2.2）稀释至刻度，充分摇匀，取适量溶液过微孔滤膜至进样瓶中，待测。如果试样中维生素 A 乙酸酯的标示量高于 1 000 万 IU/kg，则需将溶液用甲醇（5.2.2）进一步稀释。

##### 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<sub>18</sub>柱，长度 150 mm，内径 4.6 mm，粒度 5 μm，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：325 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 A 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 A 乙酸酯标准溶液的液相色谱图见附录 D。

###### 5.5.2.3 定性

在相同试验条件下，试样溶液中待测物的保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中待测物的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

###### 5.5.2.4 定量

以维生素 A 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，其线性相关系数应不低于 0.999。试样溶液中维生素 A 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（5.2.3）稀释后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中维生素 A 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 A 乙酸酯的含量以质量分数  $w_2$  计，单位为国际单位每千克（IU/kg）。多点校正按公式（3）计算，单点校正按公式（4）计算。

$$w_2 = \frac{\rho_2 \times V \times n}{m_2} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- $\rho_2$  —— 从标准曲线查得的试样溶液中维生素A乙酸酯的质量浓度，单位为国际单位每毫升（IU/mL）；
- $V$  —— 试样溶液（5.5.1）的总稀释体积，单位为毫升（mL）；
- $n$  —— 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）。
- 1 000 —— 换算系数。

$$w_2 = \frac{A_2 \times \rho_{s2} \times V \times n}{A_{s2} \times m_2} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中：

- $A_2$  —— 试样溶液中维生素A乙酸酯峰面积值；
- $\rho_{s2}$  —— 标准溶液维生素A乙酸酯的质量浓度，单位为国际单位每毫升（IU/mL）；
- $V$  —— 试样溶液的总稀释体积，单位为毫升（mL）；
- $n$  —— 超出标准曲线范围后的稀释倍数；
- $A_{s2}$  —— 标准溶液中维生素A乙酸酯峰面积值；
- $m_2$  —— 试样质量，单位为克（g）；
- 1 000 —— 换算系数。

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，2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的 10%。

附录 A  
(规范性)

维生素 A 和维生素 A 乙酸酯标准储备溶液的质量浓度校正方法

维生素 A 和维生素 A 乙酸酯标准储备溶液配制后，在使用前需要对其质量浓度进行校正，具体操作如下。

- a) 准确移取维生素 A 标准储备溶液 (4.2.18) 1.0 mL，置于 100 mL 棕色容量瓶中，用无水乙醇 (4.2.2) 定容至刻度，混匀，用 1 cm 石英比色皿，以无水乙醇为空白参比，在波长 325 nm 处测定其吸光度。

准确移取维生素 A 标准储备溶液 (4.2.18) 1.0 mL，置于 100 mL 棕色容量瓶中，按照维生素 A 标准系列溶液 (4.2.19) 规定的溶液稀释至刻度。取适量于进样小瓶中，按照“4.5.2 测定”中规定的色谱参考条件进样，获取色谱图。在色谱图中，小于维生素 A 峰面积 0.01 倍的色谱峰忽略不计，用面积归一化法计算维生素 A 峰面积占色谱峰总面积的百分比。

维生素 A 标准储备溶液 (4.2.18) 的质量浓度按公式 (A.1) 计算。

$$\rho_1 = \frac{A \times 3.333 \times 10^6}{1\ 835} \times P \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

- $\rho_1$  —— 维生素 A 标准储备溶液的质量浓度，单位为国际单位每毫升 (IU/mL)；
- $A$  —— 维生素 A 储备稀释溶液的吸光度值；
- $3.333 \times 10^6$  —— 单位换算转换系数；
- $P$  —— 面积归一化法求得的维生素 A 峰面积占色谱峰总面积的百分比；
- 1 835 —— 维生素 A 在无乙醇中的百分吸光系数。

- b) 准确移取维生素 A 乙酸酯标准储备溶液 (5.2.4) 1 mL，置于 100 mL 棕色容量瓶中用无水乙醇 (4.2.2) 定容至刻度，混匀，用 1 cm 石英比色皿，以无水乙醇为空白参比，在波长 325 nm 处测定其吸光度。

准确移取维生素 A 乙酸酯标准储备溶液 (5.2.4) 1.0 mL，置于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度。取适量于进样小瓶中，按照“5.5.2 测定”中规定的色谱参考条件进样，获取色谱图。在色谱图中，小于维生素 A 乙酸酯峰面积 0.01 倍的色谱峰忽略不计，用面积归一化法计算维生素 A 峰面积占色谱峰总面积的百分比。

维生素 A 乙酸酯标准储备溶液 (5.2.4) 的质量浓度按公式 (A.2) 计算。

$$\rho_2 = \frac{A \times 2.907 \times 10^6}{1\ 560} \times P \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

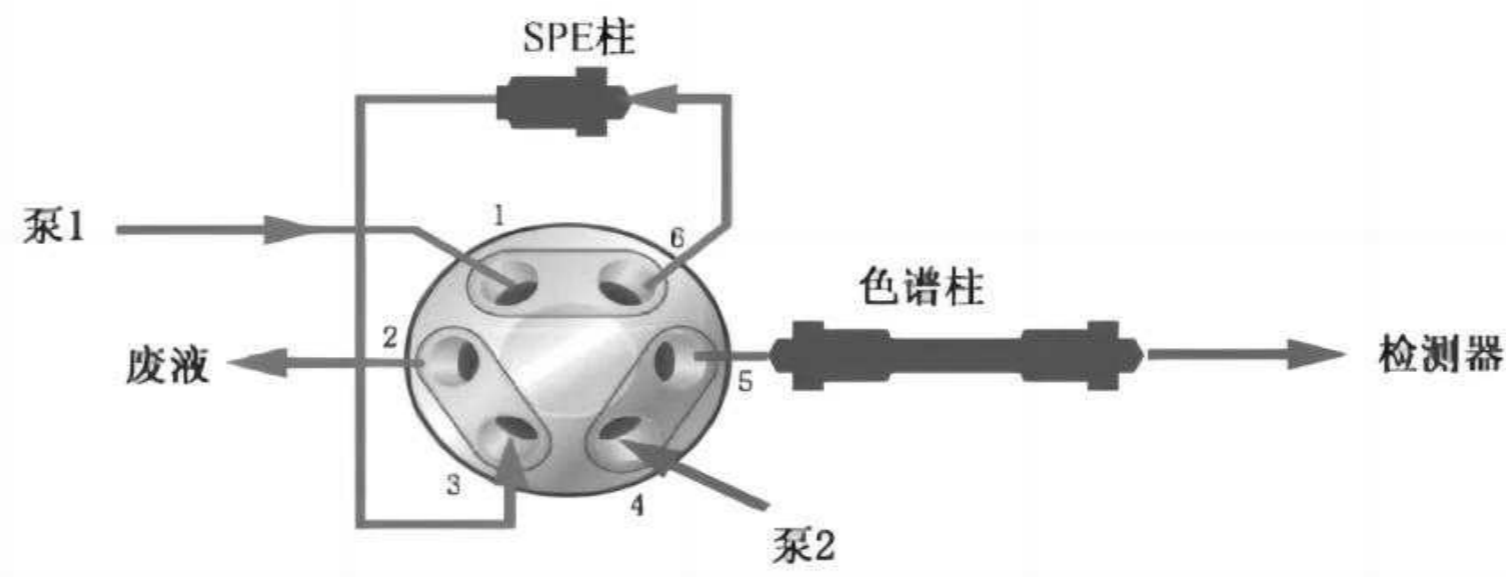
- $\rho_2$  —— 维生素 A 乙酸酯标准储备溶液的质量浓度，单位为国际单位每毫升 (IU/mL)；
- $A$  —— 维生素 A 乙酸酯储备稀释溶液的吸光度值；
- $2.907 \times 10^6$  —— 单位换算转换系数；
- $P$  —— 面积归一化法求得的维生素 A 乙酸酯峰面积占色谱峰总面积百分比；
- 1 560 —— 维生素 A 乙酸酯在无乙醇中的百分吸光系数。

附录 B

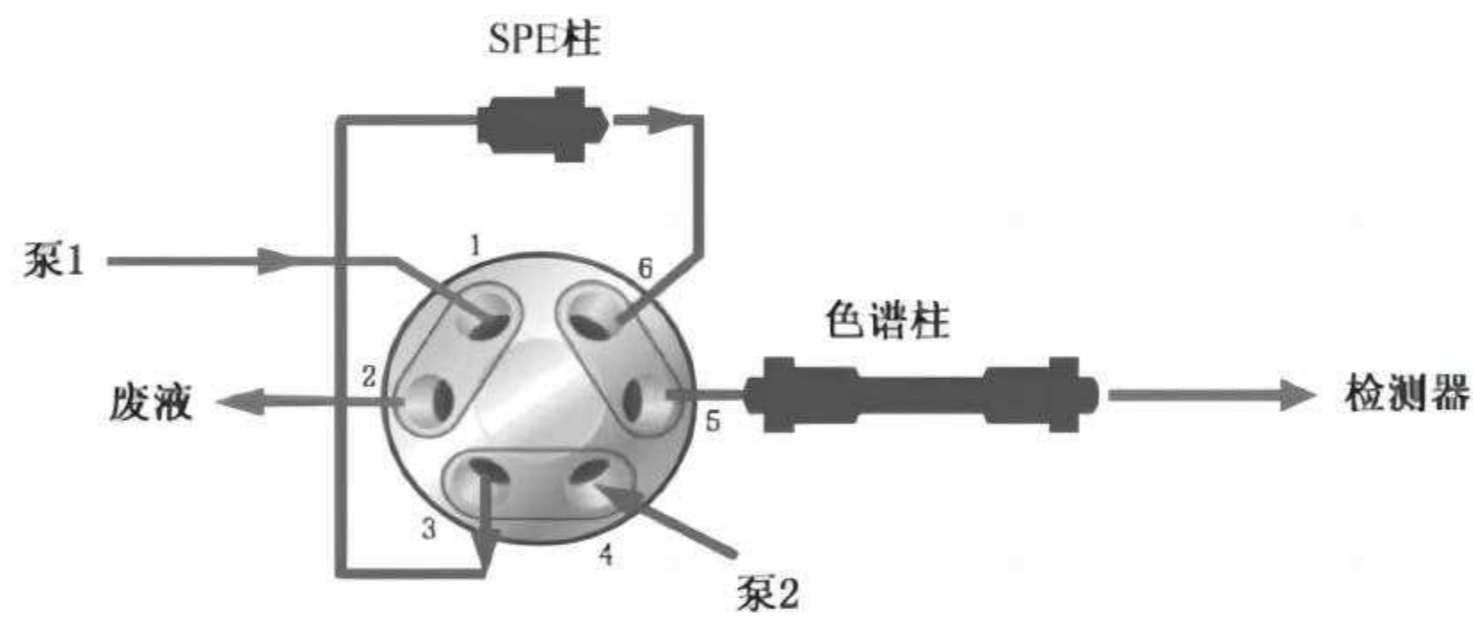
(资料性)

在线固相萃取阀的切换流程图

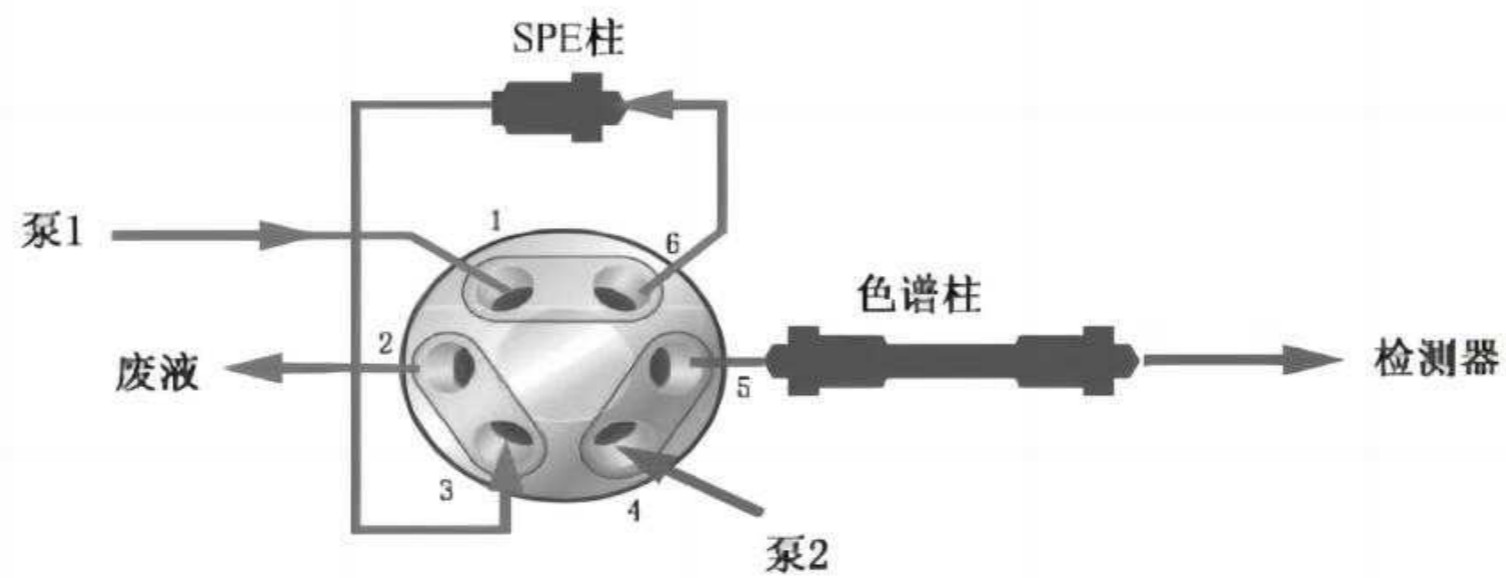
在线固相萃取阀的切换流程图见图 B.1。



第一阶段：SPE小柱富集样品中维生素A等物质，并洗脱碱液及大极性物质



第二阶段：SPE柱内的VA等物质洗脱至色谱柱内



第三阶段：VA在色谱柱内分离后，进入检测器检测

图 B.1 在线固相萃取阀的切换流程图

附录 C  
(资料性)

维生素 A 标准溶液的液相色谱图

C.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 A 标准溶液 (5 IU/mL) 的液相色谱图见图 C.1。

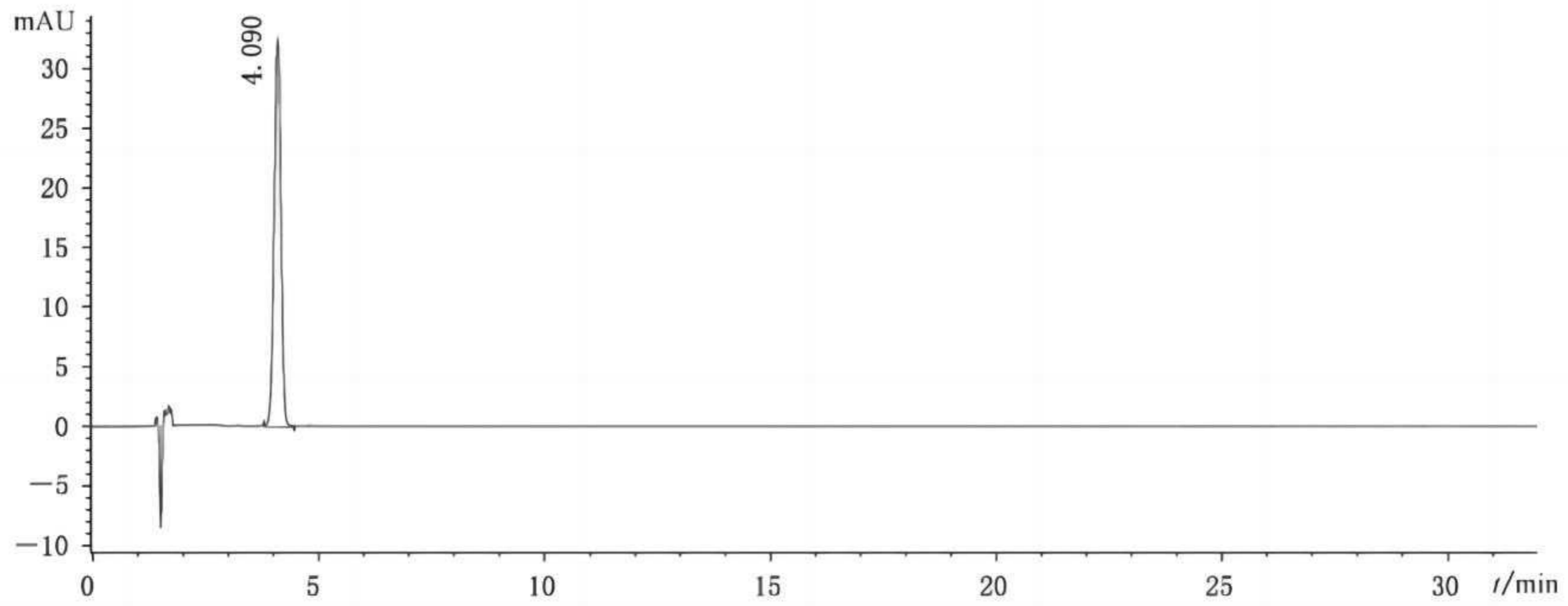


图 C.1 液相色谱参考条件 I 的维生素 A 标准溶液 (5 IU/mL) 的液相色谱图

C.2 液相色谱参考条件 II 的维生素 A 标准溶液 (1 IU/mL) 的液相色谱图见图 C.2。

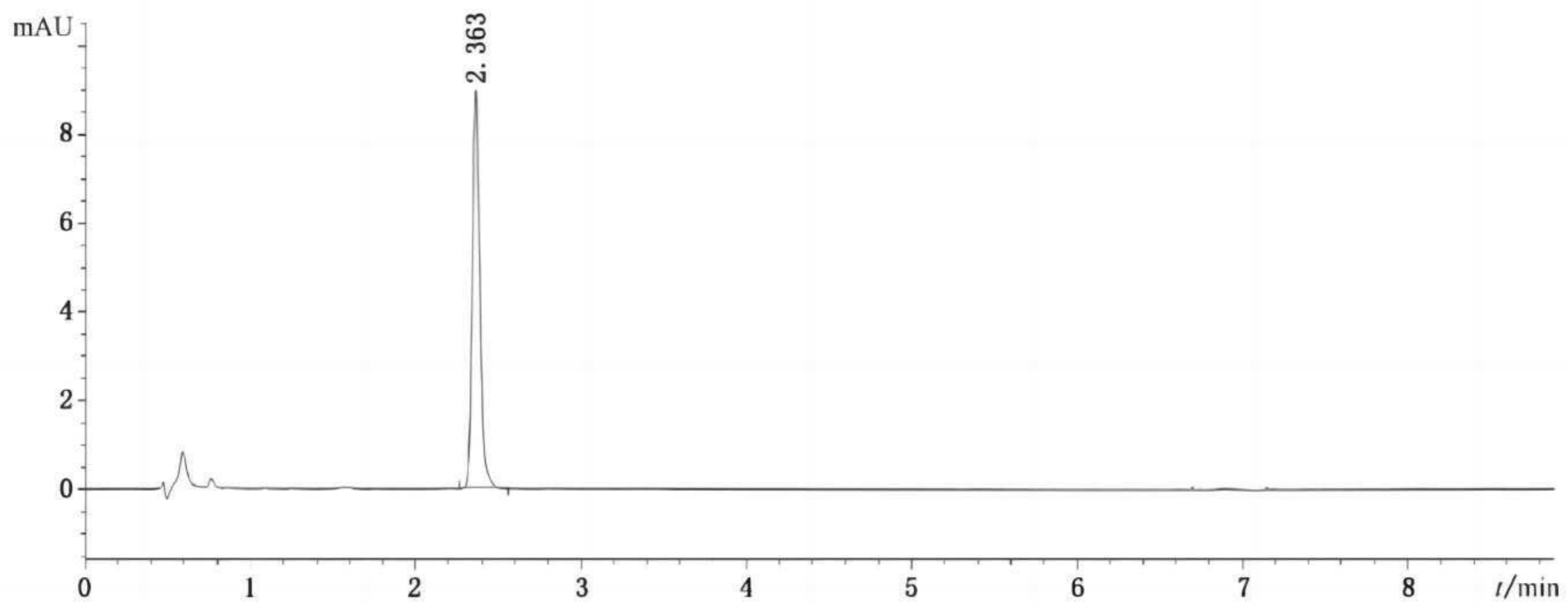


图 C.2 液相色谱参考条件 II 的维生素 A 标准溶液 (1 IU/mL) 的液相色谱图

C.3 液相色谱参考条件 III 的维生素 A 标准溶液 (4 IU/mL) 的液相色谱图见图 C.3。

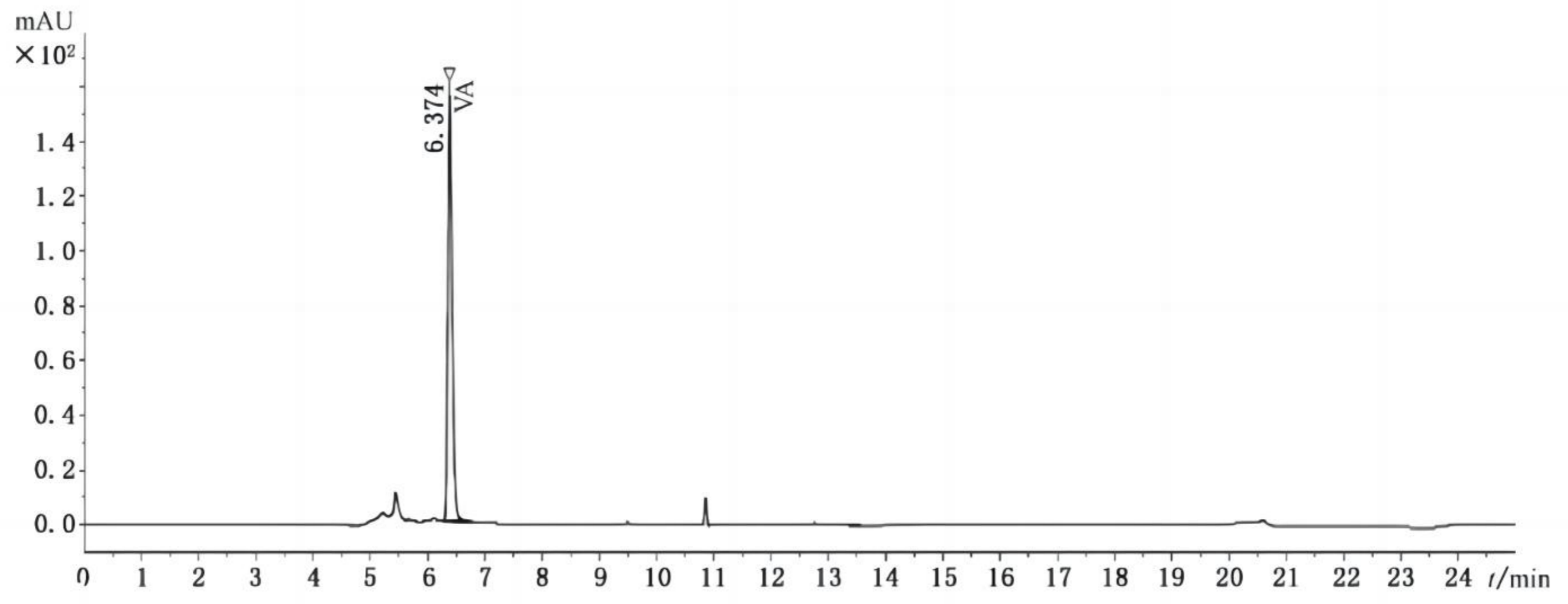


图 C.3 液相色谱参考条件Ⅲ的维生素 A 标准溶液 (4 IU/mL) 的液相色谱图

附录 D

(资料性)

维生素 A 乙酸酯标准溶液色谱图

维生素 A 乙酸酯标准溶液 (19.42 IU/mL) 液相色谱图见图 D.1。

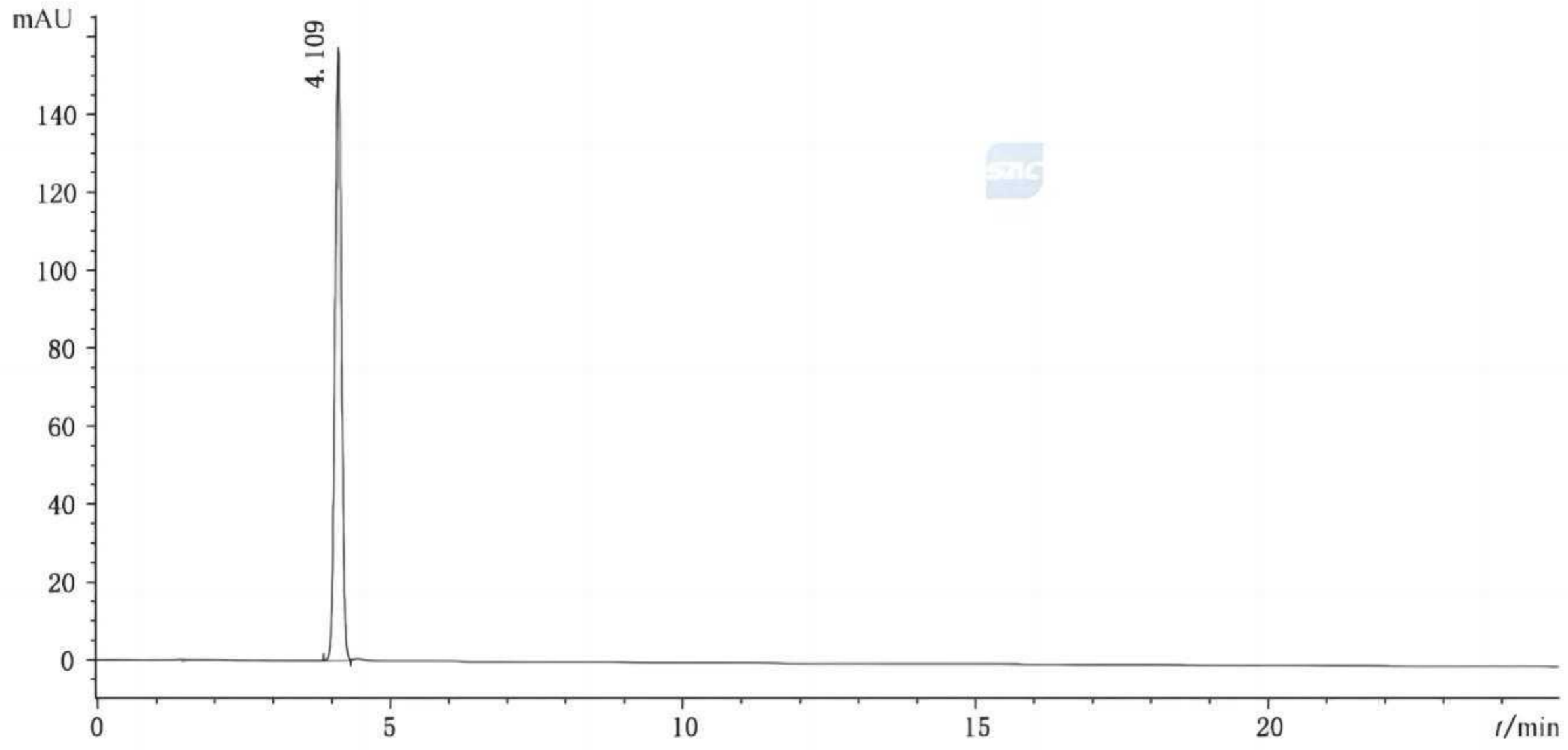


图 D.1 维生素 A 乙酸酯标准溶液 (19.42 IU/mL) 液相色谱图