

中华人民共和国国家标准

《饲料中维生素 D₃ 的测定 高效液相色谱法》

编制说明

(定向征求意见稿)

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

2023 年 12 月

目 录

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、工作过程等.....	2
（一）任务来源.....	2
（二）修订背景.....	2
（三）主要工作过程.....	2
二、标准编制原则、主要内容及其确定依据.....	4
（一）标准编制原则.....	4
（二）技术内容及其确定的依据.....	5
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果.....	6
（一）固相萃取方法验证.....	6
（二）在线固相萃取法验证.....	14
（三）直提法方法验证.....	19
（四）小结.....	24
四、与国际、国外同类标准技术内容、有关数据对比情况.....	25
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准.....	25
六、与有关法律、法规的关系.....	25
七、重大分歧意见的处理经过和依据.....	25
八、涉及专利的有关说明.....	25
九、贯彻标准的要求和措施建议.....	26
十、其他应当说明的事项.....	26

中华人民共和国国家标准

饲料中维生素 D₃的测定 高效液相色谱法

编制说明

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、工作过程等

（一）任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2020 年第三批推荐性国家标准计划的通知》（国标委发 [2020] 48 号），“饲料中维生素 D₃的测定 高效液相色谱法”（GB/T 17818—2010）标准修订项目计划编号 20203889- T-469，起草单位为中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、山东省饲料质量检验所、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。

（二）修订背景

维生素 D 以多种形式存在，其中两个最重要的是维生素 D₂（钙化甾醇或麦角钙化甾醇）和维生素 D₃（胆钙化醇），维生素 D₃ 在自然界存在较为广泛，多存在于鱼肝油和脂肪组织中，主要用于防止动物佝偻病，改进骨骼中钙与磷的转化率，从而促进动物骨骼的生长，因此，维生素 D₃ 是保证动物健康生长必不可少的营养型添加剂，也是国家监督抽查必检项目。现行标准是 2010 年颁布实施，因饲料中维生素 D₃ 含量较低，杂质干扰明显，是维生素 D₃ 检测的难点。

但随着近年检测技术的发展，特别是固相萃取技术的普及、其与高效液相色谱的结合（在线固相萃取的应用）、柱切换二维液相色谱发展、以及液相色谱串联质谱应用，为提高维生素 D₃ 检测方法总体性能、提高准确度、可靠性，提高实验室工作效率提供了有力的技术支撑。也为本次《饲料中维生素 D₃ 测定》的修订，提供了更加广阔的工作空间。

（三）主要工作过程

接到修订任务后，成立了赵小阳、宋荣、虞哲高、张凤枰、朱高群、刘志英、郭红双、马晓忠、汪忠艳、李俊玲、谢丽、宋艳、杜斌、张辉、李丽蓓、冯秀燕、曹林等成员的标准起草小组。于 2021 年 5 月，主持单位在北京组织起草单位，科研院所技术人员召开标准修订启动会，会上详细研讨修订路线，明

确各起草单位工作分工，中牧实业股份有限公司、广州爱保农生物科技有限公司承担维生素预混合饲料添加回收率样品的制备及直接提取方法的验证，安捷伦科技公司介绍了本单位工作基础及科研进展，四川威尔检测技术股份有限公司查阅整理了国内外文献资料，并承担定向征求意见汇总；在广泛调查研究、讨论和实验室以往试验工作的基础上，拟修订内容如下：

- a)皂化提取法范围增加精料补充料（见第1章，2010年版的第1章）；
- b)更改了直接提取法的定量限（见第1章，2010年版的第1章）；
- c)皂化提取法提取剂更改为石油醚（30℃-60℃）（见第4章，2010年版第3章）；
- d)增加了维生素D3标准工作液（见4.2.20）；
- e)第一法中配合饲料、精料补充料、浓缩饲料样品制备方法更改为试样全部通过1mm孔筛（见4.4，2010年版第3章）；
- f)增加固相萃取法、在线固相萃取法（见4.5.1.2和4.5.1.3）；
- g)删除3.6.1.4高效液相色谱净化柱净化（2010年版第3章）；
- h)删除3.6.2.1高效液相色谱净化条件（2010年版第3章）；
- i)删除3.6.2.2.1正相色谱（2010年版第3章）；
- j)增加了液相色谱参考条件（见4.5.2.2和4.5.2.3）；
- k)增加了定性（见4.5.2.5和5.5.2.3），定量增加了多点校正（见4.5.2.6）；
- l)更改了“第二法 直接提取法”（见第5章，2010年版第4章）。

2023年9月XX日，向生产企业、饲料企业等使用单位以及科研院所和饲料质量监督检测实验室等30个单位发函征求意见，共收到XX个单位回函，各类意见XXX条。

2023年10月，标准起草组认真考虑所征求的意见，其中采纳意见XX条，部分采纳XX条，未采纳的XX条。并据此修改标准编制说明与标准文本，形成预审稿。

2023年6月，河南省兽药饲料监察所、北京市饲料兽药监察所、辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心、上海天祥质量技术服务有限公司、钛和中谱检测技术（江苏）有限公司、苏州市农产品质量安全监测中心完成验证工作。

2023年11月XX日，起草单位组织专家对该标准进行预审，专家组由 组成。专家组提出如下修改意见：

根据预审会专家意见，形成预审会审查意见和预审专家关于文本与编制说明所提意见的意见汇总表。标准起草组进一步修改了标准文本和编制说明，形成公开征求意见稿。

2023年XX月XX日，收到公开征求意见X条：

2023年XX月XX日由饲料工业标准化技术委员会对该标准进行审查。审查意见见附件1,标准起草组据此修改标准文本和完善了编制说明,形成报批稿。

二. 标准编制原则、主要内容及其确定依据

(一) 编制原则

现行国内外相关标准方法中,待测样品前处理采用氢氧化钾乙醇溶液皂化,石油醚提取,净化、浓缩后,处理好的样品溶液,采用高效液相色谱方法检测。见表1。

表1 国内外相关标准

序号	标准号	标准名称
1	ISO 14892:2002	Dried skimmed milk — Determination of vitamin D content using high-performance liquid chromatography
2	AOAC official Method 995.05	Vitamin D Infant Formulas and Enteral Products Liquid Chromatographic Method First Action 1995
3	GB 5009.82-2016	食品中维生素A、D、E的测定
4	GB 5009.296.2023	食品中维生素D的测定

由于这些标准方法都是针对食品的,所以都使用了皂化法,没有涉及直提法。有的方法在皂化后用液液萃取或/和固相萃取提取和净化,然后用反相C18柱高相液相色谱分离、紫外检测定量或串联质谱定量。最常用的液液提取剂是石油醚(ISO法、GB 5009.296-2023第一法、GB 5009.82-2016第四法)和正己烷(AOAC法、GB 5009.296-2023第三法、GB 5009.82-2016第四法),少数用乙酸乙酯+正己烷(GB 5009.296-2023第二法)提取。固相萃取净化过去用的正相硅胶柱(AOAC法、GB 5009.82-2016第三法和GB 5009.296-2023第三法),最近开始用聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS-DVB)共聚物柱固相萃取。有三个方法(ISO法、GB5009.82-2016第四法和GB 5009.296-2023第一法)在液液萃取或固相萃取后,又增加正相硅胶柱半制备液相色谱的净化。5009.296-2023第二法则在液液萃取或PS-DVB固相萃取后,又用柱切换高效液相色谱的一维C8柱净化,然后用二维多环芳烃(PAH)柱分离、UV检测定量。不难看出,上述标准根据自身检测对象的特点,及时采用了分析检测领域的最新技术进步,为本次修标提供了借鉴。

但值得注意的是我们的标准是《饲料中维生素D3的测定》,样品基质中主要是植物性材料,所含维生素D含量甚少,主要注重的是为保证、促进动物生长而添加的维生素D。根据2625号公告,尽管维生素D2和D3均属饲料添加剂,但养殖动物的饲料中维生素D2与维生素D3不得同时使用,而实际生产和市场上

饲料中添加的主要是维生素D3。食品中不管是食品本身还是配方食品都要测定维生素D2与维生素D3。

(二) 主要技术内容及其确定的依据

在农业农村部2625号公告“饲料添加剂安全使用规范”中，规定了猪、鸡、牛、羊、鱼类配合饲料或全混合日粮中维生素D3的推荐添加量和最高限量，见表2，根据公告规定，标准在第一法范围中，应补充精料补充料。

表2 维生素D3的推荐添加量和最高限量

通用名称	适用动物	在配合饲料或全混合日粮中的推荐添加量（以维生素计）	在配合饲料或全混合日粮中的最高限量（以维生素计）
维生素D ₃	养殖动物	猪150~500IU/kg	猪——仔猪代乳料10000IU/kg ——其他猪5000IU/kg
		鸡400~2000IU/kg 鸭500~800IU/kg 鹅500~800IU/kg	家禽5000IU/kg
		牛275~450IU/kg	牛——犊牛代乳料10000IU/kg ——其他牛4000IU/kg
		羊150~500IU/kg	羊、马4000IU/kg
		鱼类500~2000IU/kg	鱼类3000IU/kg
			其他动物2000IU/kg

与国内外现行标准相比，原标准的皂化法在技术上确有一些不足：1) 原标准的皂化法中萃取溶剂用乙醚，乙醚是易燃、属于有毒类危险品，拟改用正己烷或石油醚（30-60℃），因后者更经济，故更换为石油醚；2) 液液萃取有机溶剂使用量大，处理时间过长，应增加固相萃取法。通过选择性吸附、选择性洗脱的方式对样品进行富集、分离、净化，使提取净化更为简便，有利于提高检测结果重现性，减少环境污染，同时又可提高实验室工作效率。根据目前的固相萃取发展和仪器设备的联用水平，综合现有先进标准中，半制备液相色谱净化和柱切换一维柱的净化作用；3) 初步净化后，实现柱切换二维色谱的净化、测定；4) 实现在线固相萃取—二维柱切换液相色谱的测定。通过上述改进，使方法操作更为简便，快捷，总体性能进一步提高。

原标准中直接提取法只适用于明胶包被的维生素D3，针对目前市场上开始使用的淀粉包被的维生素D3，需用水先超声溶解将淀粉包被打开，再用甲

醇提取，方法修改后，适用于不同包被基质的维生素 D₃ 含量的测定。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

(一) 固相萃取方法验证

用碱溶液皂化试样后，经固相萃取柱富集、分离、净化、浓缩后，残渣溶于适当溶剂，注入高效液相色谱仪分离，在波长264nm条件下测定，外标法计算维生素D₃含量。

固相萃取色谱条件II需要在色谱条件I的基础上，增加一台二元泵，一个二位六通阀。

1. 不同品牌固相萃取柱的选择

根据维生素 D₃ 的性质特点，应选择吸附特性为非极性的净化小柱。用配合饲料碱溶液皂化试样后，经固相萃取柱富集、分离、净化、浓缩后，残渣溶于适当溶剂，注入 HPLC 分离，在波长 264 nm 条件下测定，外标法计算维生素 D₃ 含量。

由于需要通过固相萃取技术实现 VD₃（希望能够兼顾 VA 和 VE）的富集，同时需要去除皂化液中的强碱以保护分析色谱柱，因此固相萃取柱均选择商品化聚合物反相填料表面亲水能力强的类型，如果选择聚苯乙烯-二乙烯基苯-吡咯烷酮聚合物填料的类型，亲水基团键合在填料内部，疏水性物质的保留能力就弱了。实验中比较了安捷伦 Bond Elut HLB（200mg，6mL），Bond Elut Plexa（200mg，6mL），Thermo PEP（200mg，6mL），Waters Oasis HLB（200mg，6mL）和纳谱 PSS（200mg，6mL）等 5 种不同品牌的聚合物反相固相萃取 SPE 柱，其中 Oasis HLB 和 Bond Elut HLB 均为二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮共聚物反相吸附材料，而 Bond Elut Plexa、PEP 和 PSS 均为聚苯乙烯和二乙烯基苯聚合物填料。取 6mL 均匀分散的配合饲料皂化液，分别加入等量 VA 视黄醇、VD₃ 和 VE 生育酚的标准样品，混合均匀后过柱，经 10mL 水淋洗后，5mL 乙腈洗脱。综合考虑维生素 A、D₃、E 的回收率结果，Agilent Bond Elut Plexa 和

Thermo PEP 固相萃取柱回收率满足方法要求，见图 1。但由于 PEP 柱流速过慢，最终选择 Plexa 柱进行进一步方法优化。

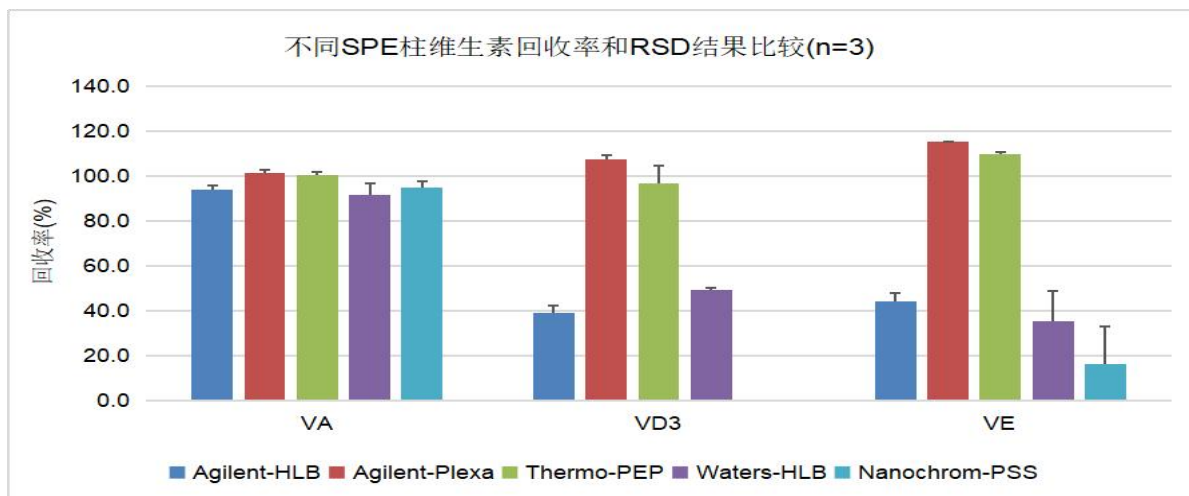


图 1 不同 SPE 柱维生素回收率和 RSD 结果比较 (n=3)

2. 固相萃取柱淋洗条件优化

取 6mL 均匀分散的皂化液，分别加入等量视黄醇、VD₃ 和生育酚的标准样品，混合均匀后过柱，碱性皂化液上样后，需要采用足量的淋洗溶剂对碱液进行去除（用 pH 试纸测定最后淋洗流出液为中性），分别比较了采用 8mL 5%、10%、20%、30%、40%、50% 甲醇水溶液进行淋洗，考察在保证回收率的前提下，淋洗去除碱液的效果，见图 2，由实验结果可以看出，几种淋洗条件均可保证三种维生素的回收率，考虑到高水相对碱液的良好淋洗去除效果，综合不同淋洗溶剂对于共萃取基质干扰物的去除，最终选择 8mL 10% 的甲醇溶液作为固相萃取的淋洗溶剂。

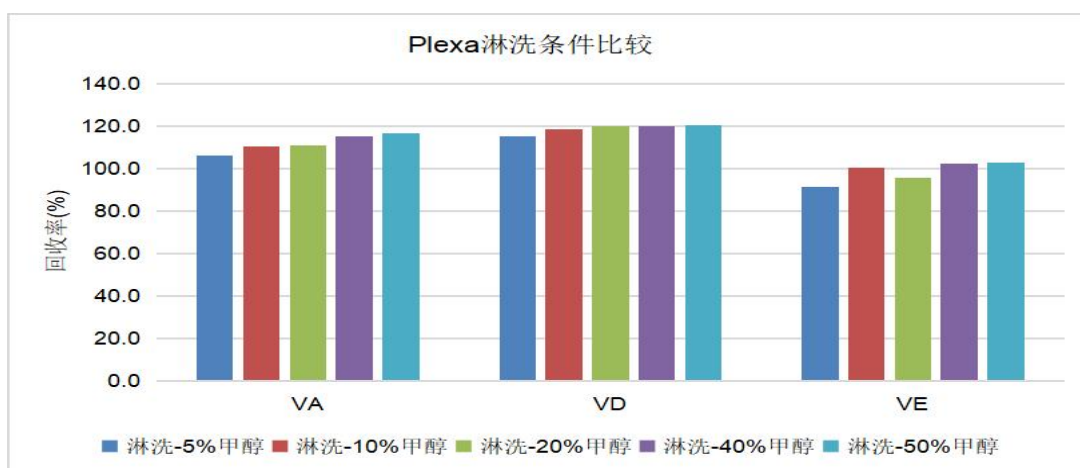


图2 Plexa 淋洗条件比较

3. 固相萃取柱洗脱溶剂优化

取 6mL 均匀分散的皂化液，分别加入等量 VD_3 标准样品，混合均匀后过柱，8mL 10% 甲醇溶液充分淋洗后，抽干小柱，选择甲醇，乙腈，乙酸乙酯三种不同的溶剂各 5mL 进行洗脱， VD_3 洗脱后响应面积见图 3。由此选择乙腈作为本方法的洗脱溶剂。并在此基础上进行乙腈洗脱体积的优化，数据表明 3mL 乙腈可以足够保证 VD_3 的洗脱。为保证良好洗脱效果，实际操作采用 3mL 乙腈分三次洗脱方式（每次 1mL），合并洗脱液，并根据饲料中维生素 VD_3 的含量，进行氮吹浓缩。

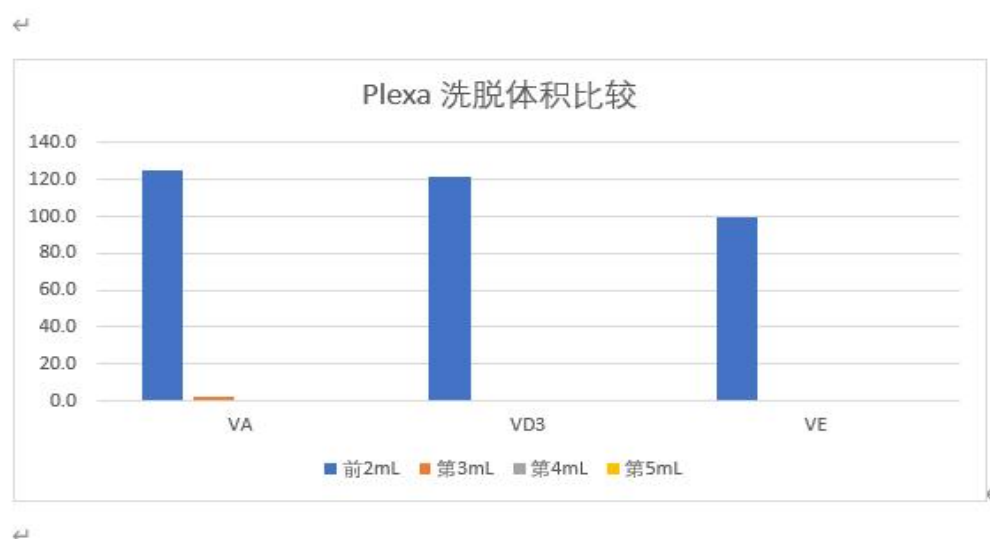


图3 洗脱体积比较

4. 方法定量限

原标准方法第一法定量限为500 IU/kg,检测方法的检出限与定量限由信噪比(S/N)计算,LOD定义为 S/N=3时对应的待分析物浓度,LOQ定义为S/N=10 时对应的待分析物浓度。将维生素D₃标准溶液用乙醇溶液逐级稀释,当维生素D₃的浓度为0.2 IU/mL,软件计算得到的S/N=10,当定量限为0.2 IU/mL时,按照文件中规定的固相萃取方法,称取10 g饲料样品,定容至100 mL,取6 mL溶液于固相萃取柱洗脱净化,洗脱液定容至1 mL,方法的定量限为333 IU/kg,符合原标准方法中规定的500 IU/kg定量限。检出限色谱图见图4,定量限色谱图见图5。

图4 检出限色谱图

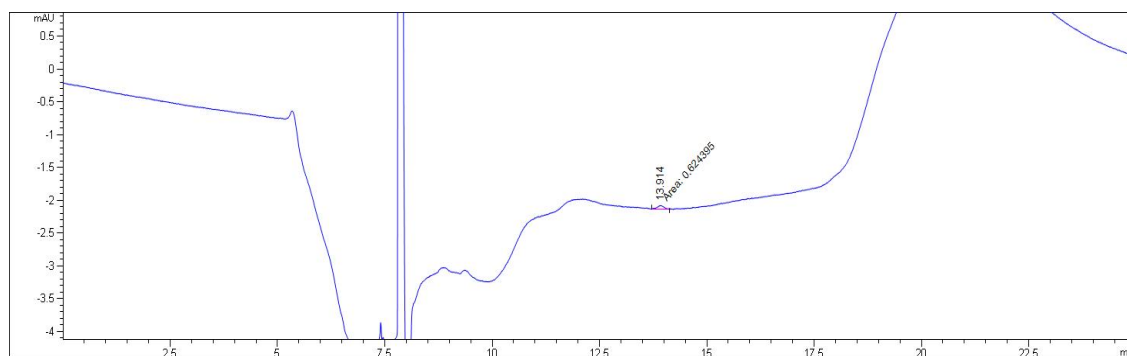
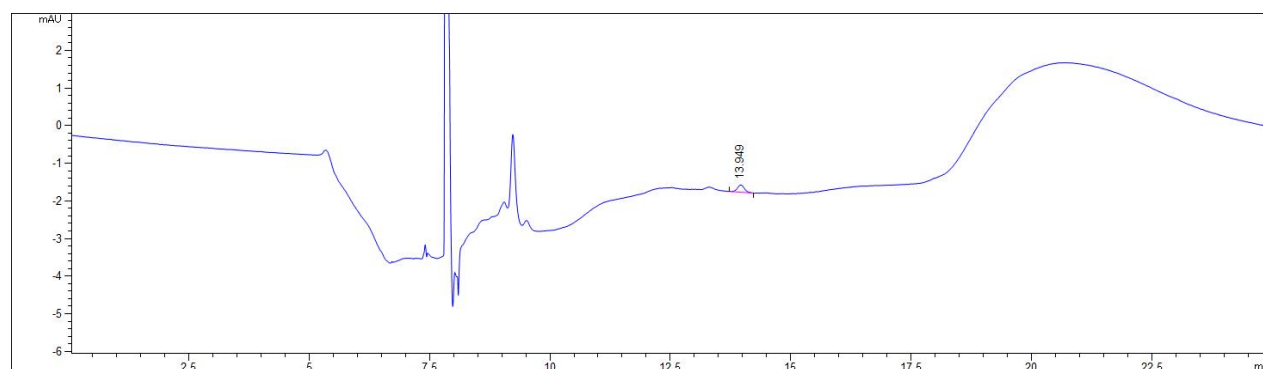


图5 定量限色谱图



5. 维生素 D3 不同浓度标准溶液与峰面积响应值线性关系

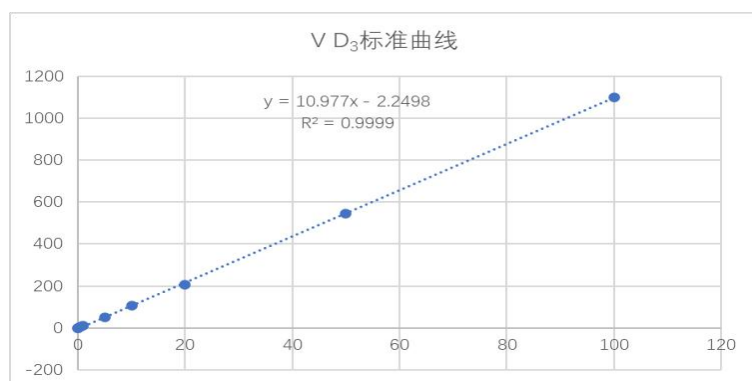
取维生素 D₃ 标准储备溶液,用甲醇稀释,配制系列标准工作溶液,见表 3,最终浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.5、1、5、10、20、50、100IU/mL,按照所述

色谱条件测定,结果表明,浓度在 0.05~100 IU/mL 范围内,峰面积(Y)与浓度(X)线性相关性良好,回归线性方程为 $Y=10.977x-2.2498$,线性相关系数 $R^2=0.9999$ 。标准曲线见图 6。

表 3 维生素 D₃ 标准溶液线性

维生素 D ₃ 标准溶液浓度 (IU/mL)	保留时间 (min)	峰面积
0.05	13.896	0.59
0.1	13.925	1.1
0.2	13.941	2.2
0.5	13.940	5.7
1	13.942	10.4
5	13.949	51.4
10	13.953	106
20	13.959	208.2
50	13.966	544.4
100	13.962	1098.5

图 6 标准曲线



6. 回收率试验

6.1 试样溶液的制备

用已知本底含量的猪配合饲料、产蛋鸡复合预混合饲料、猪浓缩饲料、牛精料补充料按照 1 倍、2 倍、10 倍本底含量添加维生素 D₃, 在空白配合饲料中按照方法定量限 1 倍、2 倍、5 倍添加,按照文件 4.5.1.2.2 中规定的方法制备试样溶液。

6.2 色谱参考条件

按照文件 4.5.2.2 中色谱参考条件 II 规定。标准溶液色谱图见图 7，样品溶液色谱图见图 8~图 15。回收率试验结果见表 4。

图 7 维生素 D3 标准溶液色谱图（浓度 13.2 IU/mL）

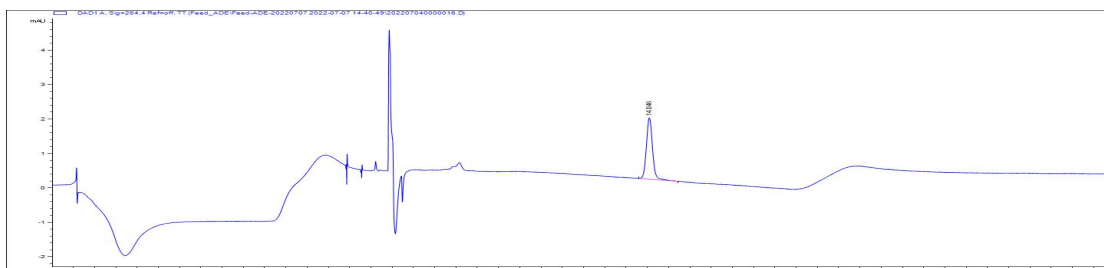


图 8 配合饲料空白色谱图

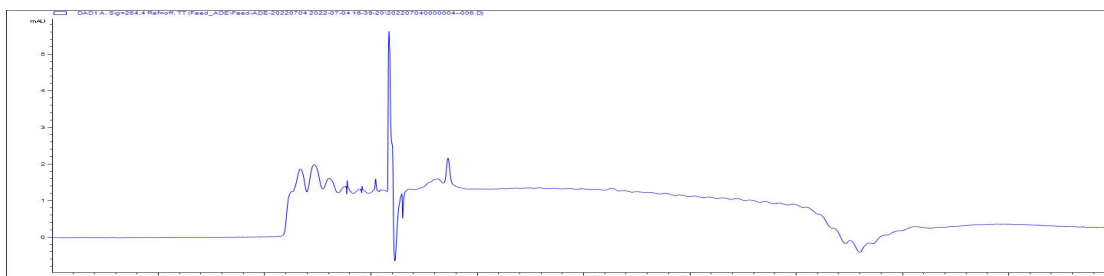


图 9 配合饲料添加回收色谱图（添加浓度：9200 IU/kg）

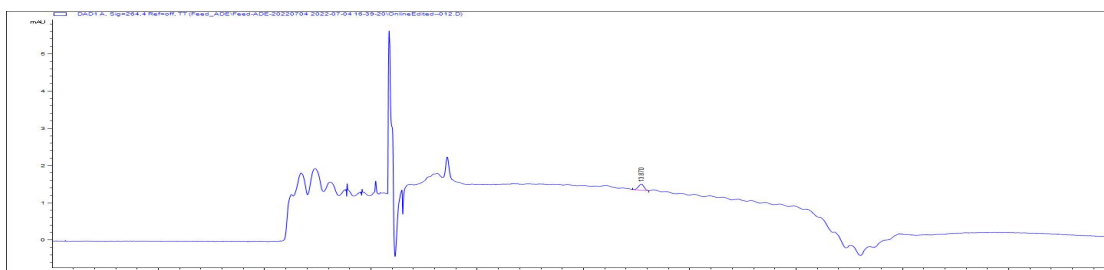


图 10 复合预混合饲料空白色谱图

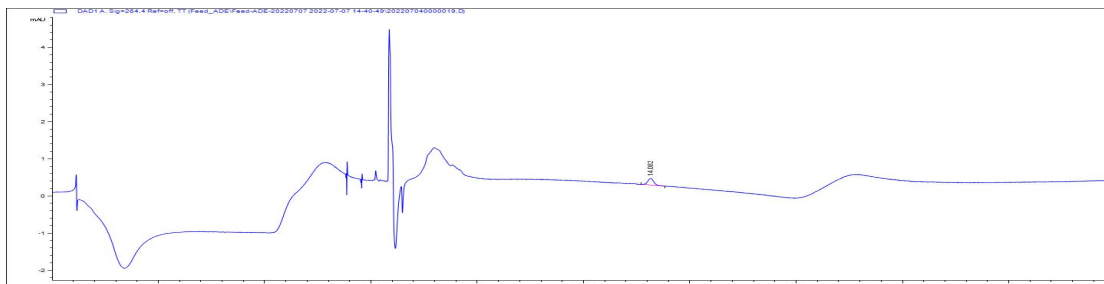


图 11 复合预混合饲料添加回收色谱图（添加浓度：264000 IU/kg）

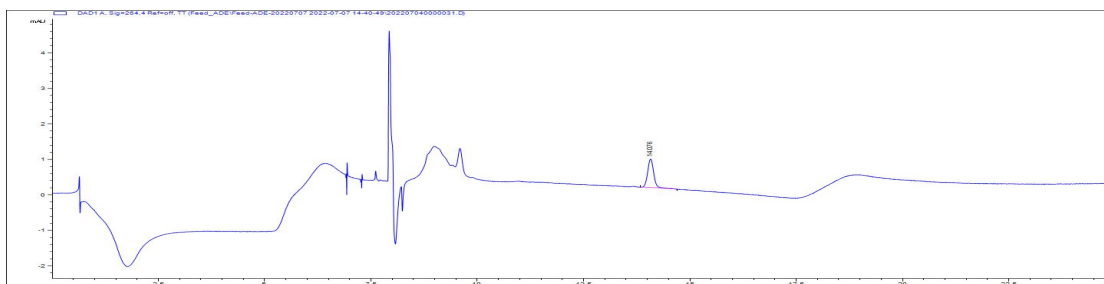


图 12 浓缩饲料空白色谱图

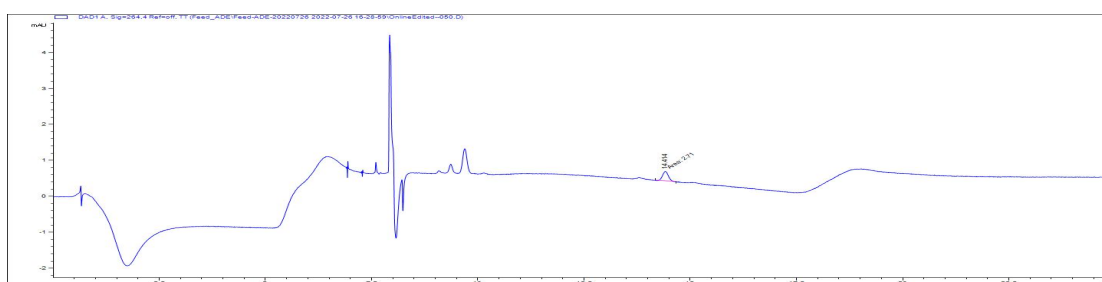


图 13 浓缩饲料添加回收色谱图（添加浓度：16600 IU/kg）

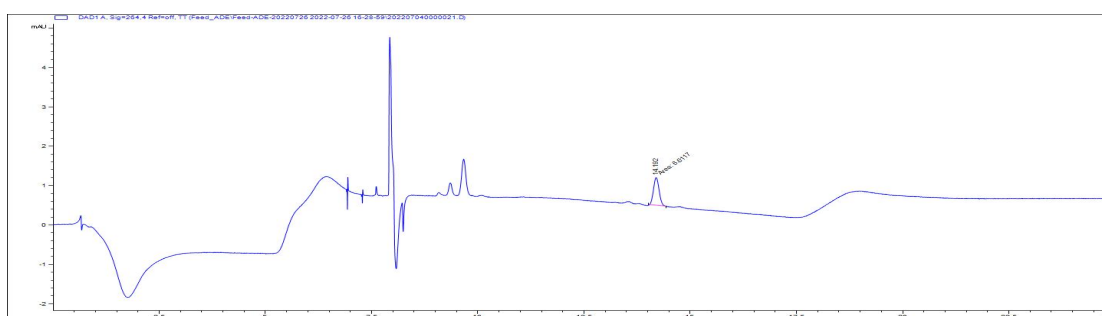


图 14 精料补充料空白色谱图

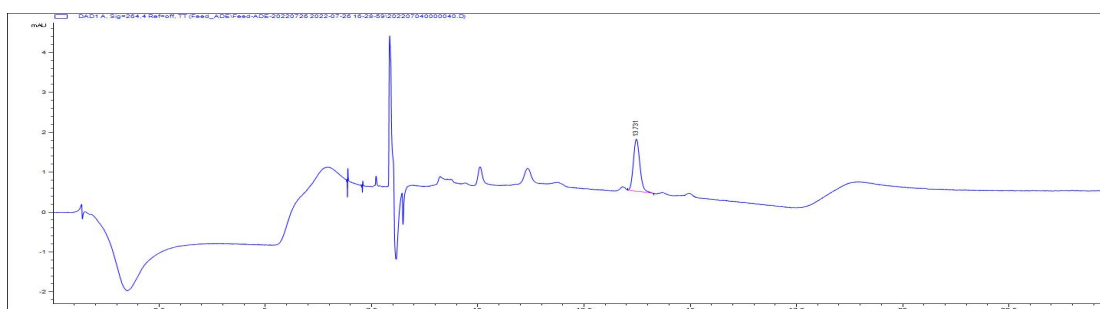


图 15 精料补充料添加回收色谱图（添加浓度：1650 IU/kg）

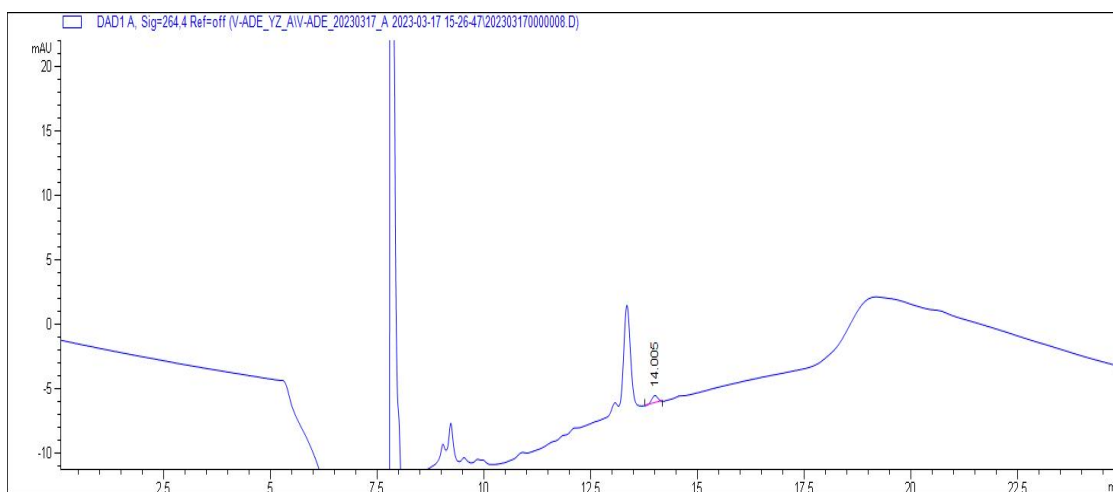


表 4 回收率试验结果

样品类型	添加浓度 (IU/kg)	回收率(%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
配合饲料 (猪)	4600	98.46	103.85	82.31	96.15	96.15	88.46	94.23	8.13
	9200	86.54	88.46	86.92	90.38	87.31	86.92	87.76	1.65
	46000	88.85	88.08	100.38	105.77	104.23	104.23	98.59	8.16
复合预混料 (产蛋鸡)	132000	84.85	87.88	87.88	96.97	96.97	93.94	91.41	5.71
	264000	98.48	98.48	93.94	90.91	89.39	89.39	93.43	4.55
	1320000	94.24	94.85	95.45	99.70	99.70	99.39	97.22	2.71
浓缩饲料 (猪)	8300	104.35	108.70	108.70	113.04	104.35	113.04	108.70	3.58
	16600	97.83	97.83	106.52	95.65	97.83	97.83	98.91	3.87
	83000	90.43	91.74	94.35	100.43	100.43	101.30	96.45	5.04
精料补充料 (牛)	825	108.70	117.39	117.39	113.04	104.35	104.35	110.87	5.41
	1650	117.39	110.87	110.87	100.00	117.39	117.39	112.32	6.08
	8250	93.26	93.26	84.29	93.26	102.23	84.29	91.77	7.36
配合饲料	500	103.34	103.34	103.34	100.0	100.0	100.0	101.7	1.80
	1000	100.0	100.0	100.0	98.39	96.77	98.39	98.9	1.33
	5000	101.72	101.38	102.41	102.41	101.72	101.38	101.8	0.46

从表4中可以看出，在不同添加水平下，回收率范围为82.31%~117.39%，平均回收率为87.76%~112.32%，相对标准偏差为0.46~8.16%；表明方法可行。

4. 重复性

同一批次样品重复六次检测结果见表 5，标准偏差不大于 10.60%。

表 5 同一批次重复六次检测结果

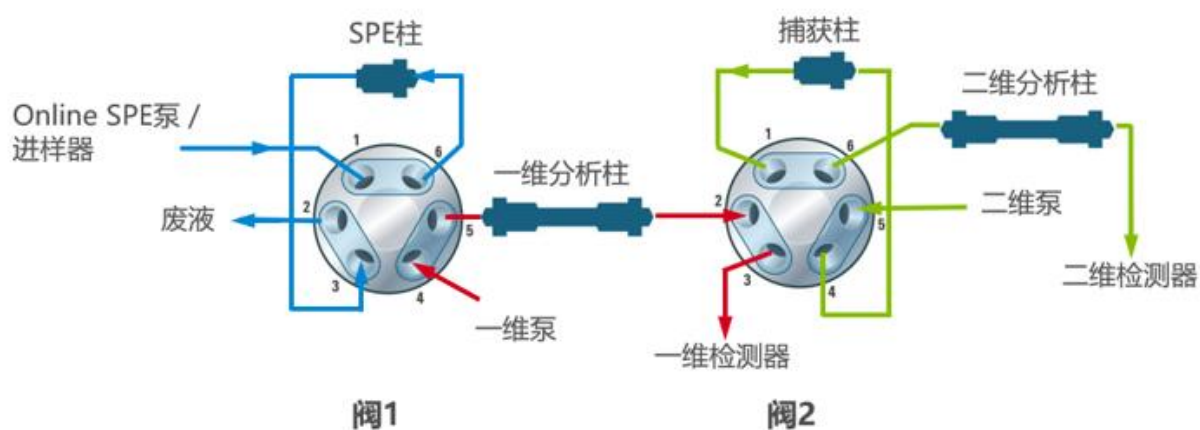
	猪配合饲料	产蛋鸡配合饲料	犊牛精料补充料	奶牛精料补充料	猪浓缩饲料	产蛋鸡复合预混饲料
1	8031.7	6443.0	5476.6	3000.0	10204.3	65551.8
2	8396.8	6120.9	5154.4	3126.8	9419.4	66020.1
3	8396.8	5798.7	5476.6	3211.3	9811.8	64615.4
4	8761.9	5798.7	5476.6	3549.3	9743.5	63678.9
5	8396.8	5798.7	5476.6	2704.2	10104.3	65083.6
6	8396.8	6120.9	5798.7	2704.2	9382.6	64615.4
平均含量 (IU/kg)	8396.8	6013.5	5476.6	3049.3	9777.6	64927.5
标准偏差 (%)	2.75	4.37	3.72	10.60	3.47	1.26

5. 方法再现性

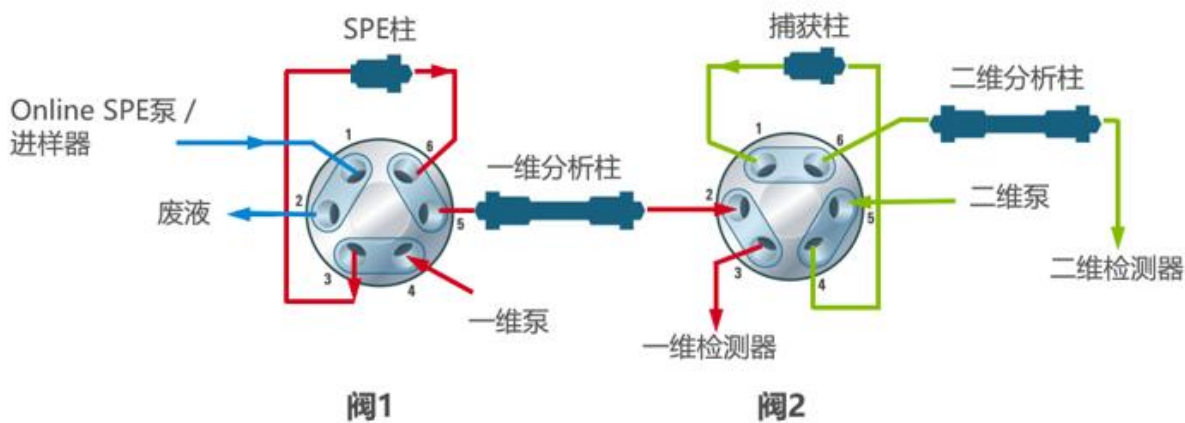
按照文件中规定的方法，在河南省兽药饲料监察所、北京市饲料兽药监察所、辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心方法验证符合要求，表明四个实验室比对实验有较好的再现性。见验证报告。

(二) 在线固相萃取方法验证

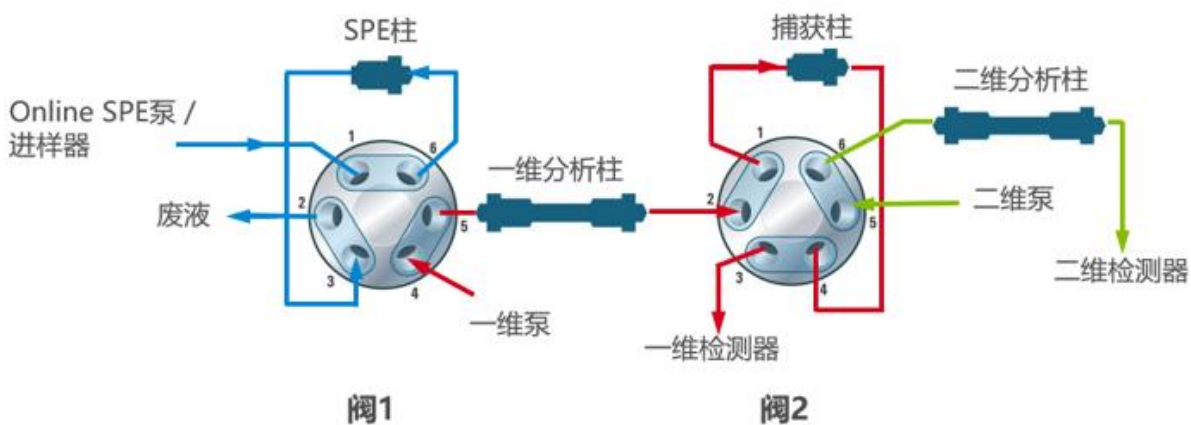
在线固相萃取色谱条件 III 在色谱条件 II 基础上再增加一个四元泵和二位六通阀。在线的固相萃取小柱及分析色谱柱前各需要一个在线过滤器。在线固相萃取阀的流程图见图 16。



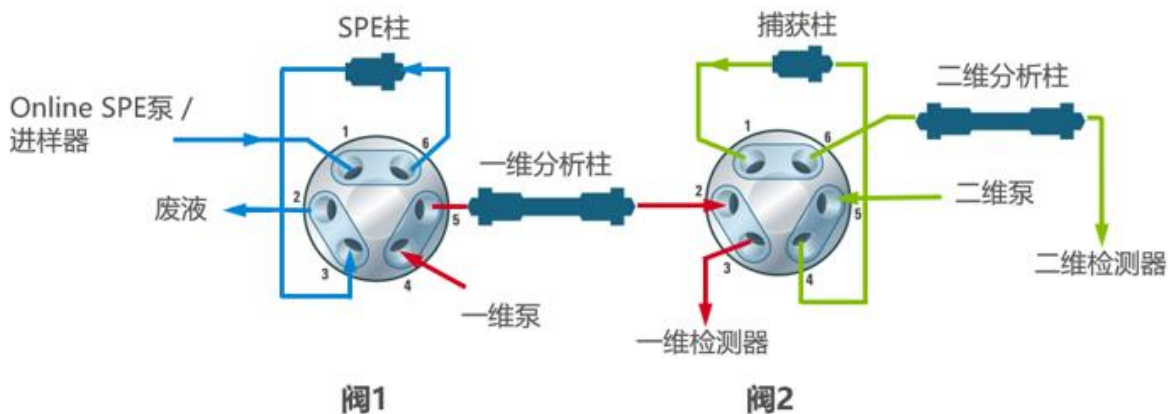
第一阶段：阀 1 将位置 1—6 相连，用洗脱液将注入 SPE 小柱内的强碱性盐溶液洗脱出柱。



第二阶段：阀 1 将位置 1—2 相连，一维色谱流动相将包含 VD_3 组份从 SPE 小柱洗脱至一维色谱柱上再次净化。



第三阶段：在 VD_3 即将从一维色谱柱流出前，阀 2 将位置切换为 1—2 相连，使流出一维色谱柱的 VD_3 被捕获柱捕获。



第四阶段：在 VD_3 全部被捕获柱捕获后，阀 2 将位置切换为 1—6 相连，二维色谱流动相将 VD_3 从捕获柱洗脱至二维色谱柱上分离

图 16 在线固相萃取阀的流程图

1. 试样溶液的制备

按照文件 4.5.1.2.3 中规定方法制备试样溶液。

2. 色谱参考条件

按照文件 4.5.2.3 中色谱参考条件 III 规定。

3. 维生素 D₃ 不同浓度标准溶液与峰面积响应值线性关系

按照文本 (4.2.18) 配制标准工作溶液, 取维生素 D₃ 标准贮备溶液, 用 50 % 乙醇稀释, 配制系列标准工作溶液 0.16 IU/mL、0.40 IU/mL、0.80 IU/mL、1.6 IU/mL、4.0 IU/mL、8.0 IU/mL、16 IU/mL, 按照所述色谱条件测定, 结果表明, 浓度在 0.16~16 IU/mL 范围内, 峰面积(Y)与浓度(X)线性相关性良好, 回归线性方程为 $Y=199.24 X+13.18$, 线性相关系数 $R^2=0.9999$ 。标准曲线见图 17, 维生素 D₃ 标准溶液色谱图见图 18。

图 17 维生素 D₃ 标准曲线

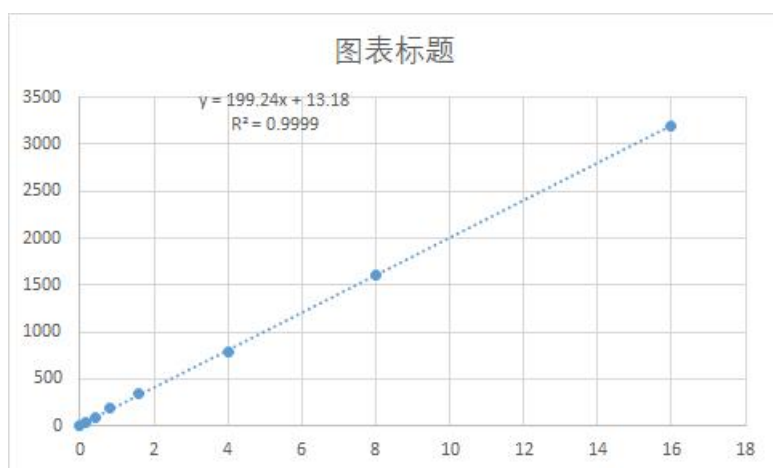
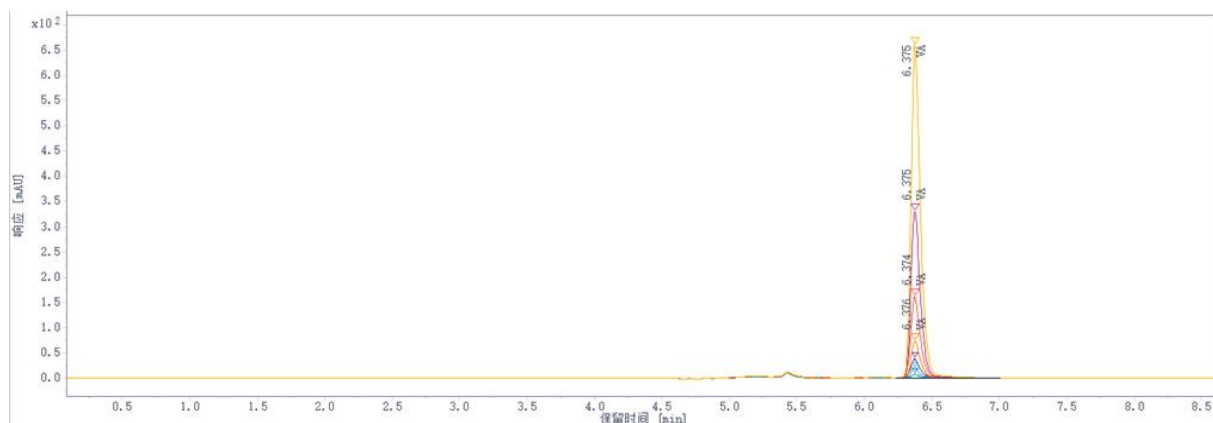


图 18 维生素 D₃ 标准溶液色谱图



4. 精密度试验

取一批磨细和均质过的饲料样品，按照 GB/T 20195 制备试样，磨细，全部通过 1 mm 孔径的试验筛，混匀，装入密闭容器，避光低温保存备用。制备六份样品溶液，根据文本 4.5.1.2.3 方法测试并计算六份样品中 VD₃ 的含量，结果见表 6。对于极低含量的 VD₃ 样品，6 个样品的相对标准偏差小于 10%，表明该方法有较好的精密度。

表 6 精密度试验结果 (n=6)

VD ₃ 的测定值 (IU/kg)						平均值 (IU/kg)	相对标准偏差 (%)
2912	2737	2432	2796	2820	3020	2785	7.18%

5. 加标回收率试验

用作精密度试验的饲料样品也用于加标回收率试验。将精密度试验测试的饲料中 VD₃ 含量的平均值作为该批饲料中 VD₃ 的本底，在 3 个添加水平进行回收率试验，每个水平重复 3 次。3 个添加水平依次为饲料中 VD₃: 添加 VD₃ 标样=2: 1，饲料中 VD₃: 添加 VD₃ 标样=1: 1，饲料中 VD₃: 添加 VD₃ 标样=1: 2。测得的回收率约 97%，相对标准偏差为 5.2%~6.8%，结果见表 7。

表 7 添加回收率试验结果 (n=3)

添加水平	添加回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
本底值: 添加值		
2: 1	96.84	5.5(n=3)
1: 1	97.17	6.8(n=3)
1: 2	96.50	5.2(n=3)

选用猪复合预混合饲料、宠物饲料、鸡配合饲料做添加回收率试验，回收率范围为 80.0 %~110.0 %，表明方法可行，检测结果见表 8。色谱图见图 19、

图 20、图 21。

表 8 不同样品添加回收率试验

样品类型	本底值 (IU/kg)	实测值 (IU/kg)	加标量 (IU/mL)	加标回收率 (IU/kg)
猪复合预混合饲料	56800	171200	120	95.3
	77200	253600	200	88.2
	95600	216400	120	100.7
	120800	231600	120	92.3
	164000	399200	240	98.0
宠物饲料 (猫)	5920	10320	4.0	110.0
	6400	8960	3.2	80.0
	7560	14560	8.0	87.5
	8840	13000	4.0	104.0
	9080	12480	4.0	85.0
禽类配合饲料	2480	9560	8.0	88.5
	3560	10600	8.0	88.0
	4080	11800	8.0	96.5
	4480	11520	8.0	88.0

图 19 猪复合预混合饲料色谱图

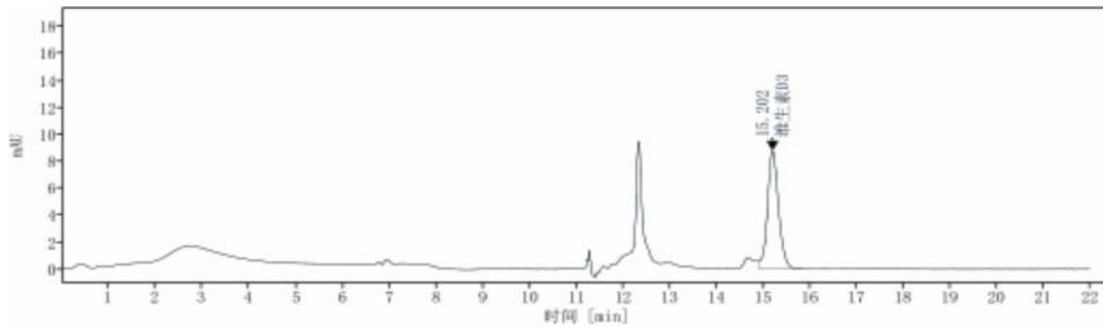


图 20 宠物饲料 (猫) 色谱图

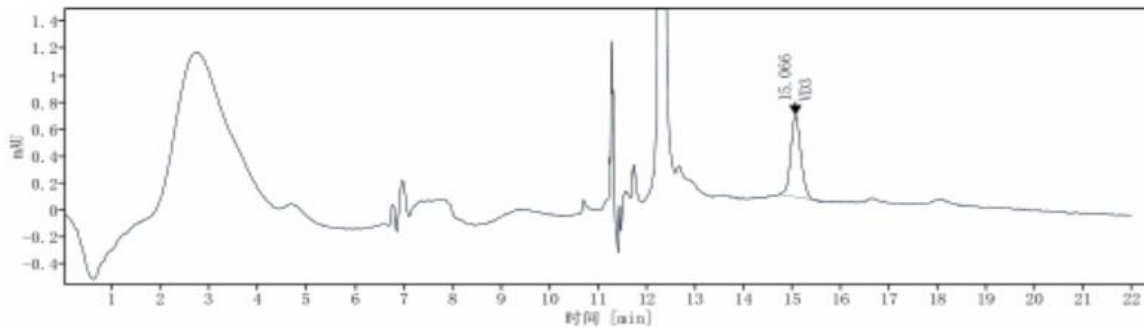
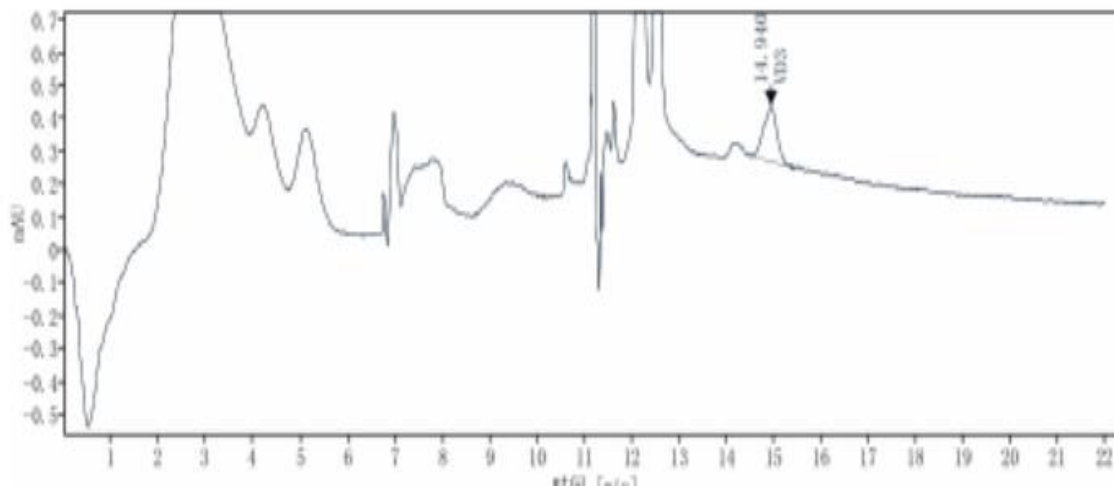


图 21 禽类配合饲料色谱图



6. 不同分析方法测定结果的比较

在线固相萃取-二维液相色谱串联法与现行国标方法比较，两种方法测试结果接近，相对偏差为 1.3%，见表 9。

表 9 不同分析方法对饲料中维生素 D₃ 测试结果的比较

方法	GB/T17818-2010（皂化法）			在线固相萃取-二维液相法		
	1	2	平均值	1	2	平均值
维生素 D ₃ 含量 (IU/kg)	2896	2781	2839	2824	3008	2916
两种结果的相对偏差, %	1.3					

（三）直接提取方法验证

目前维生素 D₃ ($\geq 5.0 \times 10^5$ IU/g) 粉剂的载体组成有明胶、淀粉混合包被，也有淀粉、麦芽糊精、玉米油包被等，原国标检测方法用甲醇在 65℃ 时超声提取维生素 D₃，对于个别淀粉包被的产品，不能提取完全，回收率偏低，为了使方法可以覆盖所有不同工艺生产的产品，将方法改为先用 10 mL 水超声提取，再用甲醇超声提取维生素 D₃，经实验验证，该方法对不同包被材料的维生素 D₃ 提取

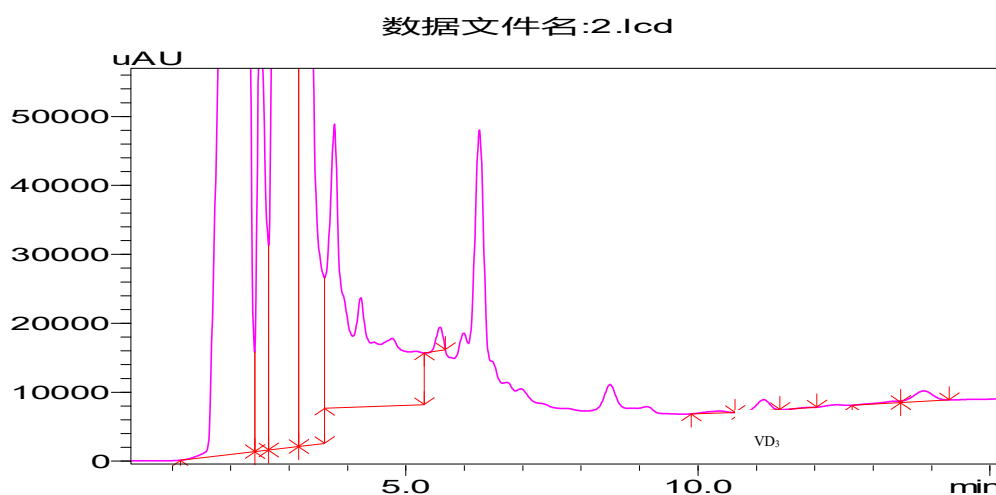
回收率满足测定要求。

1. 方法定量限

选含量约 100 万 IU/kg 维生素预混合饲料，按照文件中 5.5.1 规定的方法，制备试样溶液。色谱条件同 5.5.2.1 。

VD₃ 色谱峰保留时间 11.126 分钟，峰面积为 25484，检测结果为 157.34 万 IU/kg，信噪比 S/N 为 19.12.经计算检出限为 25 万 IU/kg，定量限定为 82 万 IU/kg，根据维生素预混合饲料中维生素 D₃ 的含量，确定定量限为 100 万 IU/kg。定量限图谱见图 22。

图 22 维生素预混合饲料中维生素 D₃ 定量限色谱图



2. 维生素 D₃ 原料提取方法回收率与精密度

收集五个厂家产品，用 GB/T 17818-2010 中规定的直提方法检测，同时按照文件中规定的方法检测，检测结果见表 10，两种方法回收率差值范围为 0.23%~11.1%，对于大多数厂家产品两种方法检测结果差异不大，对于个别厂家产品有差异，为了保证检测方法适合尽可能多产品的检测，直提方法按照文件中规定的方法检测。

表 10 不同分析方法对维生素 D₃ 原料测试结果的比较

GB/T 17818-2010				加水检测（加水 10mL 65℃ 超声 5 分钟, 再加甲醇超声 30 分钟）				
厂家	称样量 (g)	回收率 (%)	平均值 (%)	厂家	称样量 (g)	回收率 (%)	平均值 (%)	方法差值 (%)
TX	0.1646	106.12	105.84	TX	0.1520	105.22	104.34	1.50
	0.1552	105.56			0.1738	103.47		
TH	0.1475	106.80	106.80	TH	0.1459	107.14	107.03	0.23
	0.1681	106.79			0.1735	106.91		
XF	0.1696	105.12	105.09	XF	0.1625	104.59	104.55	0.55
	0.1760	105.06			0.1737	104.50		
XHC	0.1692	105.96	103.22	XHC	0.1678	103.10	100.83	2.39
	0.1526	101.97			0.1628	96.46		
	0.1608	101.01			0.1708	102.78		
	0.1720	103.94			0.1441	100.99		
HS	0.5295	95.4	95.7	HS	0.5295	110.2	109.8	11.1
	0.5385	93.0			0.5385	109.4		

2. 方法回收率与精密度

按照维生素预混合饲料中维生素 D₃ 实际含量, 制备含量分别为 700 万 IU/kg、1080 万 IU/kg、2000 万 IU/kg 维生素预混合饲料, 每个浓度重复测定六次, 计算添加回收率及重复性, 回收率范围为 89.29%~110.05%, 相对标准偏差为 3.89%~5.95%, 表明方法可行, 测定结果见表 11, 标准溶液色谱图见图 23, 添加水平 1、2、3 色谱图见图 24、25、26。

表 11 回收率与精密度测定结果

	称样量(g)	峰面积	检测值 (万 IU/kg)	占标识量 (%)	平均值 (万 IU/kg)	占标识量 (%)	标准差	RSD (%)
猪用多维 (2010CHT)	1.0918	103607	682.80	97.54	701.87	100.27	35.18	5.01
	1.0782	97177	648.50	92.64				
	1.0092	99646	710.44	101.49				
	1.0716	109442	734.85	104.98				
	1.0748	111014	743.19	106.17				
	1.0152	97560	691.46	98.78				
畜禽通用多维	1.0902	151222	998.06	92.41	1101.75	102.01	65.50	5.95
	1.0742	168180	1126.52	104.31				
	1.0688	158555	1067.41	98.83				
	1.083	178891	1188.52	110.05				
	1.0632	168108	1137.68	105.34				
	1.0352	157154	1092.32	101.14				
蛋鸡多维	1.0772	267361	1785.87	89.29	1895.30	94.77	73.79	3.89
	0.9904	260941	1895.74	94.79				
	1.0558	280569	1912.08	95.60				
	1.0614	296563	2010.41	100.52				
	1.0528	279590	1910.84	95.54				
	1.0738	277112	1856.86	92.84				

图 23 标准溶液色谱图

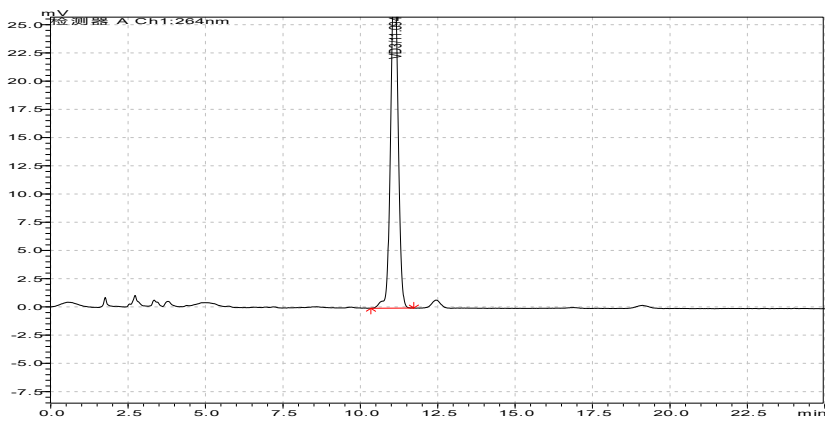


图 24 添加水平 1 (700 万 IU/kg) 色谱图

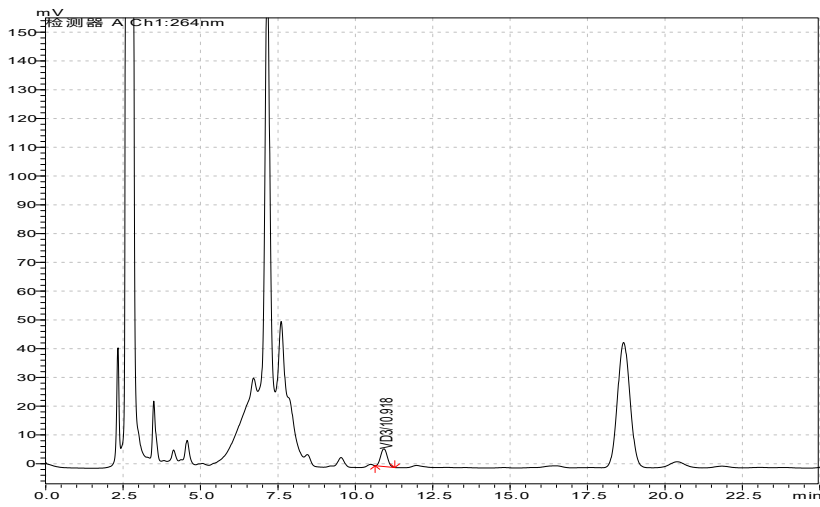


图 25 添加水平 2 (1080 万 IU/kg) 色谱图

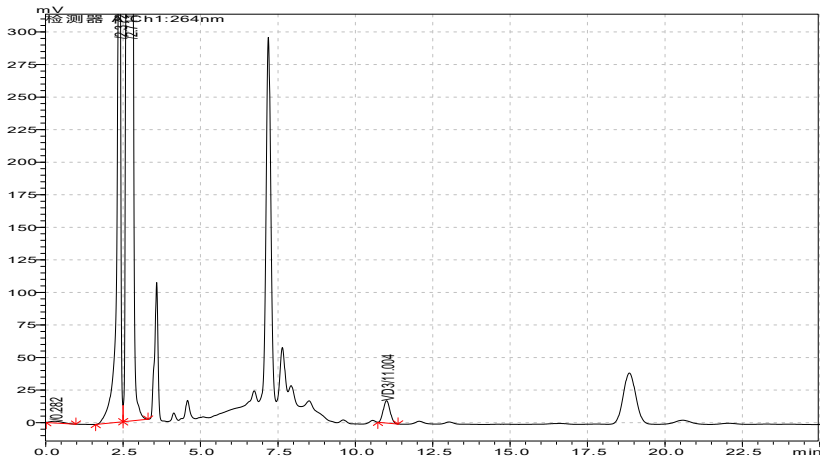
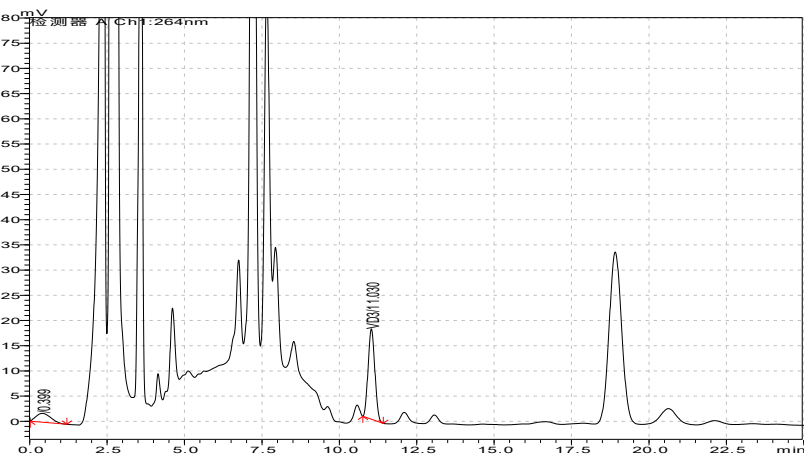


图 26 添加水平 3 (2000 万 IU/kg) 色谱图



（四）小结

本文件样品前处理补充固相萃取方法、在线萃取方法，第一法给出了三个色谱条件，对于用液液萃取法的，可选用色谱参考条件一，该色谱参考条件与现行标准色谱条件一致。

配合饲料、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料选用液液萃取法或固相萃取法，或当所测样品的维生素D3标示量在每千克低于10000IU范围时，按照液相色谱参考条件II，分别取维生素D3标准系列溶液和试样溶液上机测定。

若选用在线固相萃取法，按照液相色谱参考条件III，分别取维生素D3标准系列溶液和试样溶液上机测定。

固相萃取方法线性范围从0.05 IU/mL~100 IU/mL，线性相关性良好；在不同添加水平下，回收率范围为82.31%~117.39%，平均回收率为87.76%~112.32%，相对标准偏差为0.46~8.16%；同一批次样品重复6次实验结果标准偏差不大于10.60%，该方法色谱条件采用二维液相色谱条件，解决了杂质干扰维生素D₃检测的困扰，提高了方法的准确度。

在线固相萃取方法的样品前处理最简单，只需做样品皂化这一步，其余的都由仪器完成，具有操作简便，仪器自动化程度高的特点。对于碱性溶液的洗脱，目标分析物转移至分析色谱柱，均是通过在线固相萃取系统完成的，在分析方法的开发上，在线固相萃取系统的条件需与色谱分离系统的条件相匹配，因此增加了色谱参考条件三。实验结果表明浓度在0.16~16 IU/mL范围内，峰面积(Y)与浓度(X)线性相关性良好，回归线性方程为 $Y=199.24 X+13.18$ ，线性相关系数 $R^2=0.9999$ ，选用猪复合预混合饲料、宠物饲料、鸡配合饲料做添加回收率试验，回收率范围为80.0%~110.0%，与现行国标方法比较，两种方法测试结果接近，相对偏差为1.3%，表明方法可行。

直接提取法样品前处理改为先用水超声提取，对于明胶与淀粉混合包被及淀粉包被的产品，提取效果好，再用甲醇超声提取，色谱条件同原标准方法中的色谱条件，我们收集淀粉包被和明胶包被的维生素D₃原料样品，用原标准方法和修订的方法检测含量，回收率分别是95.7%和109.8%，测定结果表明方法改进后适合不同包被材料的原料，方法可行。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

国际标准、AOAC方法中，采用氢氧化钾乙醇溶液皂化，石油醚提取，净化、浓缩后，处理好的样品溶液，采用高效液相色谱方法检测，与本文件第一法液液萃取方法相同。

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

合规引用。

六、与有关法律、法规的关系

本文件的制定遵循现行法律、行政法规的规定，配套标准包括“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”。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

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。

九、贯彻标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

建议按照推荐性国家标准管理办法设置自发布日期至实施日期的过渡期，并在过渡期间，评估是否需要购进或改进技术装备、检测手段等，以配合产品的相关检测。

十、其他应当说明的事项

无。