

预混合饲料中维生素 A 3 种提取方法的比较研究

刘雪芹¹, 周嘉明¹, 杨莹², 王兴², 李俊³, 陈岩^{1*}

(1. 青岛市华测检测技术有限公司, 青岛 266000; 2. 云南省兽药饲料检测所, 昆明 650021;
3. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘要: **目的** 比较预混合饲料中维生素 A 的 3 种提取方法。**方法** 抽取 10 个预混合饲料样品, 比较皂化提取法、直接提取法、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)提取法实验过程和维生素 A 的检测结果。**结果** 皂化提取法提取过程时间($t=130.4$ min)较长, 步骤(21 步)繁杂, 较其他 2 种提取方法检测结果准确性较差, 平行性较差。直接提取法与 DMSO 提取法提取过程时间较短, 步骤较简便, 检测结果准确性较好, 平行性较好。**结论** 直接提取法可以作为快速检测预混合饲料中维生素 A 含量的手段, 但检测结果使用受到 GB/T 17817-2010《饲料中维生素 A 的测定高效液相色谱法》限制。皂化提取法可用于低含量复杂样品检测。DMSO 法提取法, 相较于皂化提取法, 操作简便, 测试快速, 检测值准确性较好, 平行性较好, 能过有效弥补直接提取法与皂化提取法的缺点。

关键词: 维生素 A; 皂化提取法; 直接提取法; 二甲基亚砜提取法

Comparative study on 3 kinds of extraction methods of vitamin A in premixed feed

LIU Xue-Qin¹, ZHOU Jia-Ming¹, YANG Ying², WANG Xing², LI Jun³, CHEN Yan^{1*}

(1. Qingdao Centre Testing International Technology Co., Ltd., Qingdao 266000, China; 2. Yunnan Testing & Inspection Institute for Veterinary Drugs & Feedstuff, Kunming 650021, China; 3. Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To compare the 3 kinds of extraction methods of vitamin A in the premixed feed. **Methods** Ten samples of premixed feed were extracted. The feasibility of the experimental process and extraction efficiency of vitamin A of saponification extraction method, direct extraction method and DMSO extraction method were compared. **Results** The process of saponification extraction was time-consuming and complicated, the detection result was less accuracy and the parallelism was worse than the other two methods. The process of direct extraction method and DMSO extraction method less time were needed, the steps was simple, the detection result was more accurate, and the parallelism was better. **Conclusion** Direct extraction can be used as a rapid method for the determination of vitamin A in premixed feed. However, the determination of vitamin A in feed was limited by GB/T 17817-2010 *Determination of vitamin A in feed high efficiency liquid chromatography*. Saponification extraction method can be used for the detection of complex samples with low content. Compared with saponification extraction method, DMSO extraction method is easy to operate, quick to test, accurate detection value and good parallelism, which can make up the shortcomings of direct extraction method and saponification extraction method.

KEY WORDS: vitamin A; saponification extraction method; direct extraction method; dimethyl sulfoxide extraction method

*通讯作者: 陈岩, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: chenyan5@cti-cert.com

*Corresponding author: CHEN Yan, Master, Intermediate Engineer, Qingdao Centre Testing International Technology Co., Ltd., No.7, Gaochang Road, Qingdao 266000, China. E-mail: chenyan5@cti-cert.com

1 引言

维生素 A(vitaminA)又称视黄醇, 属于脂溶性维生素, 其主要生理功能为维持正常视觉功能、维护上皮组织细胞的健康和促进免疫球蛋白的合成、维持骨骼正常生长发育以及促进生长与生殖。有文献表明, 维生素 A 对动物的生长发育具有重要作用, 为维持动物的正常生存, 饲料中均含一定量的维生素 A; 如果缺少维生素 A, 动物在生长过程中会出现各种疾病, 最终对我们造成一定的损失^[1-4]。因此, 对饲料中维生素 A 的检测必不可少。

现今我国规定的饲料中维生素 A 检测方法为 GB/T 17817-2010《饲料中维生素 A 的测定高效液相色谱法》^[5,6], 其中包括第一法皂化提取法与第二法直接提取法; 还有由山东省饲料质量检验所与青岛市华测检测技术有限公司共同起草的《饲料中维生素 A、维生素 D₃、维生素 E 的同步快速测定高效液相色谱法》(DMSO 法)^[7,8], 以及其他检测方法在多篇文献中均有报道^[9-13]。目前, 对于以上维生素 A 提取及检测方法的比较研究较少, 为进一步制定及获取准确高效的维生素 A 检测方案, 本研究比较了以上 3 种提取方法实验过程和维生素 A 检测结果, 以期为今后制定维生素 A 检测方案提供科学的理论和实践基础。

2 材料及方法

2.1 仪器、试剂与材料

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(安捷伦科技有限公司); SPD-M20A 紫外检测器(日本岛津公司); N-1100S-WD 旋转蒸发器(北京莱伯泰科仪器有限公司); KQ-1000DB 超声波(昆山市超声仪器有限公司)。

维生素 A 乙酸酯对照品(纯度 98.5%), 视黄醇对照品(纯度 97.9%), 全部采购于德国 DR.E 公司。

甲醇、正己烷、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(色谱纯, 韩国德山公司); 氢氧化钾、石油醚(30~60 °C)、无水硫酸钠、无水乙醇、L-抗坏血酸、丁基羟甲基苯(butylated hydroxytoluene, BHT)(分析纯, 国药集团试剂有限公司); 0.22 μm 有机相滤膜(天津津腾公司); 实验室用水为超纯水。

从市场上抽取 6 种预混合饲料和 4 种政府有关部门的委托样品作为分析样品。

2.2 实验方法

2.2.1 采样及试样制备

抽取 10 种代表性的样品, 每种样品用四分法缩减取 200 g, 粉碎过 1.0 mm 分析筛, 充分混匀, 装入磨口瓶中备用。

若样品颗粒较小, 且混合均匀度较好, 则无需粉碎; 若样品中颗粒不均匀, 且混合较差, 则需要将样品粉碎过

1.0 mm 孔筛, 混匀, 装入密闭容器中, 避光低温保存备用。

2.2.2 维生素 A 提取

1) 皂化提取法^[5]

皂化: 称取适量样品, 置于 500 mL 棕色平底烧瓶中, 依次加入一定量乙醇抗坏血酸溶液, 氢氧化钾溶液(500 g/L), 摇匀。置于沸水浴上回流 30min, 期间不时摇晃防止试样粘壁糊底。皂化完成后急速冷却。

提取: 将皂化液全部转移至 500 mL 分液漏斗中, 加入 100 mL 石油醚。置于分液漏斗振荡器振荡, 静置分层, 将水相(下层相)转移至第二个分液分液漏斗中, 分别 100 mL、60 mL 石油醚重复提取 2 次。弃除水相, 合并石油醚相, 水洗醚相至中性。提取液通过无水硫酸钠脱水, 过滤至 250 mL 棕色旋蒸瓶中。加入约 0.1 g BHT。

浓缩: 抽真空状态, (40±1) °C 旋蒸至约 2mL, 用氮气吹干, 加入一定量(精确至 0.01 mL)甲醇复溶, 涡旋内壁, 使提取物全部溶解。溶液过 0.22 μm 滤膜, 待测。

2) 直接提取法^[5]

称取适量样品, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加入约 70 mL 甲醇溶液。加盖瓶塞, 但不要拧紧。超声提取 30 min(超声期间定期摇匀)。超声后冷却至室温, 用甲醇定容, 充分摇匀。溶液过 0.22 μm 滤膜, 待测。

3) DMSO 提取法

称取适量样品, 置于 500 mL 平底烧瓶中, 加 30 mL 的 DMSO 溶液, 在超声波提取器中超声提取 30 min(中间旋播 2~3 次以防样品附着瓶底); 取出放置冷却。待冷却至室温后, 准确加入 100 mL 正己烷, 加盖、剧烈振摇 15 min, 静置分层后再次准确加入 100 mL 正己烷, 重复提取 1 次, 静置; 待正己烷层变澄清透明, 且中间乳化层消失以后, 将全部正己烷层萃取液经析相分离纸过滤, 准确移取一定体积的滤液直接用氮气吹干。残渣用甲醇溶解。溶液过 0.22 μm 滤膜, 待测^[14,15]。

每种样品每种提取方法做 3 平行实验, 并记录每种方法提取实验时间(t/min)与主要操作步骤数。

2.3 液相色谱条件

色谱柱: C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)或性能相当者; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 流动相: 甲醇:水=97:3(V:V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 325 nm。

2.4 数据处理

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料以平均值±标准差的形式表示, 重复测量数据的方差分析作为组间均数的比较。P < 0.05 表示差别有显著性意义。

3 结果与分析

3.1 提取过程比较

通过分析表 1 可得, 皂化提取法所需时间最长, 主要

操作步骤最多, DMSO 法所需时间较短, 主要操作步骤较少, 直接提取法所需时间最短, 主要操作步骤最少。

表 1 提取过程所需时间和主要操作步骤数($n=10$)
Table 1 The extraction time and the number of main steps($n=10$)

提取方法	提取过程所需时间 t/min	主要操作步骤数
皂化提取法	130.4±5.5	21
直接提取法	52.9±2.0	5
DMSO 法	86.0±2.8	11

3.2 检测结果比较

10 种样品, 各样品每种检测方法结果如表 2 所示。由 3 种方法对各样品饲料检测结果可知, 皂化提取法检测结果均低于其他 2 种提取方式的检测结果, 且有明显差异 ($P < 0.05$)。直接提取法与 DMSO 提取法检测值无明显差异 ($P > 0.05$)。如表 3 所示, 通过分析各样品 3 种方法相对标准偏差可知, 皂化提取法相对标准偏差均大于其他 2 种提

取方式, 且有 4 个样品相对标准偏差均大于 2%, 1 个样品标准偏差大于 3%, 平行性较差。直接提取法和 DMSO 提取法相对标准偏差均小于 2%, 平行性较好。

结合表 1 对表 2、表 3 进行分析, 结果表明: 皂化提取法提取时间较长, 且步骤繁杂, 提取过程中维生素 A 易受到光照与空气的影响, 可控性较差, 所以检测结果较低, 平行性较差。但 GB/T17817-2010《饲料中维生素 A 的测定高效液相色谱法》规定其样品适用范围较广, 定量限较低, 为 1000 IU/kg。

直接提取法提取时间较短, 且操作简便, 受外界因素影响较少, 所以检测结果较高, 平行性较好。但 GB/T 17817-2010《饲料中维生素 A 的测定高效液相色谱法》规定其适用范围为维生素预混合饲料, 定量限较高, 为 10^6 IU/kg。DMSO 提取法提取时间与皂化提取法相比较短, 操作相对简单, 添加 DMSO 和正己烷后, 与空气隔绝, 以氮吹方式浓缩, 不宜被空气氧化。所以其检测结果较高, 平行较好。方法规定适用于复合预混合饲料、维生素预混合饲料, 定量限为 10000 IU/kg。

表 2 各样品 3 种方法检测结果($n=3$)
Table 2 The results of three methods for each sample ($n=3$)

样品名称	皂化提取法检测值/(万 IU/kg)	直接提取法检测值/(万 IU/kg)	DMSO 法检测值/(万 IU/kg)
优乳料①(委托样品)	20.61±0.77	21.96±0.10*	21.41±0.23
优乳料②(委托样品)	18.56±0.26	19.83±0.12	20.15±0.14*
92089③(委托样品)	8.47±0.18	8.84±0.11*	8.76±0.14
92089④(委托样品)	7.85±0.12	8.33±0.09*	8.24±0.11
0.5%仔猪复合预混合饲料	118.85±1.68	130.65±0.90*	128.48±1.00
1%猪通用复合预混合饲料	59.84±1.37	62.70±0.11*	61.95±0.28
4%乳猪复合预混合饲料	21.54±0.44	22.45±0.38	22.85±0.42*
10%仔猪复合预混合饲料	11.76±0.29	12.79±0.16*	12.32±0.11
0.5%蛋鸡育雏期复合预混合饲料	195.46±2.21	207.54±0.82	210.38±0.78*
1%种鸭产蛋期复合预混合饲料	84.39±1.47	89.01±0.53	89.68±0.74*

注: *为每个样品检测最大值。

表 3 各样品 3 种方法相对标准偏差($n=3$)
Table 3 The relative standard deviation of three methods for each sample($n=3$)

样品名称	皂化提取法检测值/%	直接提取法检测值/%	DMSO 法检测值/%
优乳料①(委托样品)	3.73	0.47	1.09
优乳料②(委托样品)	1.42	0.58	0.68
92089③(委托样品)	2.12	1.20	1.65
92089④(委托样品)	1.50	1.10	1.29
0.5%仔猪复合预混合饲料	1.41	0.69	0.78
1%猪通用复合预混合饲料	2.30	0.18	0.46
4%乳猪复合预混合饲料	2.04	1.71	1.84
10%仔猪复合预混合饲料	2.45	1.29	0.93
0.5%蛋鸡育雏期复合预混合饲料	1.13	0.39	0.37
1%种鸭产蛋期复合预混合饲料	1.74	0.59	0.82

4 结 论

通过比较皂化提取法、直接提取法、DMSO 提取法对预混合饲料中维生素 A 检测结果, 从整个实验过程可知, 直接提取法操作简便, 测试快速, 能够满足维生素 A 含量低于定量限(10^6 IU/kg)样品的检测, 可以作为快速检测预混合饲料中维生素 A 含量的手段, 但检测结果使用受到 GB/T 17817-2010《饲料中维生素 A 的测定高效液相色谱法》限制。

皂化提取法, 操作繁杂, 测试较慢, 检测结果相较于其他 2 种提取方法准确性差, 但其适用范围较大, 可用于低含量复杂样品检测。DMSO 法提取法, 相较于皂化提取法, 操作简便, 测试快速, 检测值准确性较好, 平行性较好, 方法规定适用于预混合饲料样品, 能够有效弥补直接提取法与皂化提取法的缺点。

参考文献

- [1] 李坤. 论述畜禽维生素 A 缺乏症[J]. 吉林畜牧兽医, 2017, 38(7): 56-59.
Li K. Discussion on vitamin A deficiency in livestock and poultry [J]. Jilin Anim Husb Vet Med, 2017, 38(7): 56-59.
- [2] 曲宁宇, 于蓬勃. 特种养殖中常见维生素缺乏症的防治[J]. 养殖与饲料, 2018, (6): 98-99.
Qu NN, Yu PB. Prevention and treatment of vitamin deficiency in special culture [J]. Anim Breed Feed, 2018, (6): 98-99.
- [3] 张小磊. 畜禽维生素 A 缺乏症的症状与治疗[J]. 当代畜禽养殖业, 2016, (1): 20.
Zhang XL. Symptoms and treatment of vitamin A deficiency in livestock and poultry [J]. Mod Anim Husb, 2016, (1): 20.
- [4] 李宝荣, 李宽阁, 吴秀芹. 动物维生素 A 缺乏的症状及防治[J]. 养殖技术顾问, 2013, (2): 105.
Li BR, Li KG, Wu XQ. Symptoms and prevention of vitamin A deficiency in animals [J]. Farm Technol Consul, 2013, (2): 105.
- [5] GB/T 17817-2010 饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法[S].
GB/T 17817-2010 Determination of vitamin A in feeds-High performance liquid chromatography [S].
- [6] 于家丰. 液相色谱-串联质谱法检测饲料原料中维生素 A、维生素 D₃、维生素 E[J]. 食品安全导刊, 2018, (28): 29-31.
Yu JF. Determination of vitamin A, vitamin D₃ and vitamin E in feed raw materials by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin Food Saf Magaz, 2018, (28): 29-31.
- [7] ISO 14565-2002 动物饲料维生素 A 含量的测定高效液相色谱法[S].
ISO 14565-2002 Animal feed determination of vitamin A in feeds-High-performance liquid chromatography [S].
- [8] AOAC Official Method 2001.13 Determination of vitamin A (Retinol) in foods-liquid chromatography (First Action 2001) [S].
- [9] 杨怡侠. 高效液相色谱法测定维生素 AD 滴剂中维生素 A 的含量[J]. 中国处方药, 2018, 16(12): 36-37.
Yang YX. The content of vitamin A in vitamin AD drops was determined by high performance liquid chromatography [J]. J China Prescrip Drug, 2018, 16(12): 36-37.
- [10] 王文郁, 杨钊. 高效液相色谱法测定红臀软膏中维生素 A 的含量[J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(19): 220-221.
Wang WY, Yang Z. Determination of vitamin A in hongbuttock ointment by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Mod Drug Appl, 2018, 12(19): 220-221.
- [11] 肖潇, 王庆国, 李菁, 等. 高效液相色谱法对市售乳及乳制品中维生素 A 和维生素 E 的含量测定[J]. 疾病预防控制中心通报, 2018, 33(2): 73-75.
Xiao X, Wang QG, Li J, et al. Determination of VA and VE in market milk and dairy through high performance liquid chromatography in Xinjiang [J]. Endem Dis Bull (China), 2018, 33(2): 73-75.
- [12] 王和平, 郑家概, 张飞, 等. 高效液相色谱法测定辣木叶中的维生素 A[J]. 山东化工, 2017, 46(2): 61-63.
Wang HP, Zheng JG, Zhang F, et al. Determination of vitamin A in moringoleifera leaves by high performance liquid chromatography [J]. Shandong Chem Ind, 2017, 46(2): 61-63.
- [13] 颜景超, 任国谱, 安静, 等. 高效液相色谱法测定乳制品中维生素 A 的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(9): 43-46.
Yan JC, Ren GP, An J, et al. Research advances in determining vitamin A in dairy products by high-performance liquid chromatography [J]. China Dairy Ind, 2011, 39(9): 43-46.
- [14] GB 5009.82-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定[S].
GB 5009.82-2016 National food safety standard-Determination of vitamins A, D and E in foods [S].
- [15] 李马成, 赵世元, 翟双双. 预混料中维生素稳定性影响因素研究进展[J]. 广东饲料, 2018, 27(9): 36-38.
Li MC, Zhao SY, Zhai SS. Research progress on factors affecting vitamin stability in premix [J]. Guangdong Feed, 2018, 27(9): 36-38.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘雪琴, 主要研究方向为食品安全与质量。

E-mail: liuxueqin@cti-cert.com



陈岩, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: chenyan5@cti-cert.com