

刘泽辉,宣岩芳,雷胡龙,等. 饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的检测[J]. 上海农业学报,2020,36(6):114-118

## 饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的检测

刘泽辉<sup>1</sup>, 宣岩芳<sup>1\*</sup>, 雷胡龙<sup>2</sup>, 黄志英<sup>1</sup>, 凌超<sup>1</sup>, 赵志辉<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所,上海 201403;<sup>2</sup>上海市农业科学院畜牧兽医研究所,上海 201106)

**摘要:** 为了建立饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的检测方法,采用高效液相色谱法通过空白样品添加回收试验验证检测方法的可靠性。样品用甲基叔丁基醚萃取,以甲醇:水(V:V = 95:5)为流动相,采用 XSelect<sup>®</sup> HSS T3 色谱柱进行分离,紫外检测器 TUV Detector( $\lambda = 265$  nm)进行检测。结果表明:方法的线性范围为 0.05—100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,线性相关系数为 0.9998,定量限(LOQ)为 0.3 mg/kg。添加水平在 0.3 mg/kg、0.6 mg/kg 和 3 mg/kg 时,两种不同的饲料基质的回收率均在 90% 以上,RSD 均在 3.00% 以下。该方法准确率高,操作简便,是饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 较为理想的分析方法。

**关键词:** 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>; 高效液相; 饲料; 饲料添加剂

**中图分类号:** S816.17 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3924(2020)06-114-05

## Determination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in feed

LIU Zehui<sup>1</sup>, XUAN Yanfang<sup>1\*</sup>, LEI Hulong<sup>2</sup>, HUANG Zhiying<sup>1</sup>, LIN Chao<sup>1</sup>, ZHAO Zhihui<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Agro-food Standards and Testing Technologies, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; <sup>2</sup> Institute of Animal Husbandry & Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

**Abstract:** The high performance liquid chromatography was applied to develop the method of analyzing 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in feed. Recovery test was performed to verify the reliability of the method. Samples were extracted with Methyl tertiary butyl ether (MTBE), then analyzed by separation on an XSelect<sup>®</sup> HSS T3 chromatographic Column with methanol and H<sub>2</sub>O (V:V = 95:5) solution as mobile phase, and detected with a TUV detector ( $\lambda = 265$  nm). The results showed that the linear range of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate was 0.05—100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and the linear correlation coefficient is 0.9998. The limit of quantitation (LOQ) was 0.3 mg/kg. When 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg or 3 mg/kg 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate was added to 3 kinds of feed, the average recovery rates were above 90%, and the relative standard deviations (RSD) were less than 2.9%. The method is accurate and simple operation, which is an ideal method for the analysis of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in feed.

**Key words:** 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate; High performance liquid chromatography (HPLC); Feed; Feed additives

维生素 D 是动物机体维持正常生命活动所必需的营养素之一,不仅能调节机体钙磷代谢、促进骨骼发育<sup>[1]</sup>,而且具有重要的抗氧化<sup>[2]</sup>和免疫调节功能<sup>[3-4]</sup>,还有研究表明饲料中添加维生素 D<sub>3</sub> 可提高畜禽生产性能<sup>[5-6]</sup>、改善肉品质<sup>[7]</sup>。

饲料中添加的维生素 D<sub>3</sub> 主要有两种形式:维生素 D<sub>3</sub> (又名胆钙化醇)和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> (又名骨化二醇)。25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 是维生素 D<sub>3</sub> 的活性形式。被肠道吸收的维生素 D<sub>3</sub> 首先在肝脏中发生 C25 羟

收稿日期:2019-06-18

基金项目:上海市农委标准预研项目(2016-029)

作者简介:刘泽辉(1980—),女,博士,助理研究员,研究方向为农产品质量安全。E-mail:liuzehui33@163.com

\* 共同第一作者,E-mail:xuanyan2010@hotmail.com

\*\* 通信作者,E-mail:zhao9912@hotmail.com

基化,生成 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>,并在肾脏线粒体中进一步转化为 1,25-二羟基 D<sub>3</sub> 后被转运至小肠粘膜,促进钙磷吸收<sup>[6]</sup>、沉积和钙蛋白质的合成<sup>[8-9]</sup>。25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 不仅具有普通维生素 D<sub>3</sub> 的全部功能,还具有以下优势:作为一种活性形式吸收后不需要经过肝脏代谢和转化,直接供人或动物利用,缩短了维生素 D<sub>3</sub> 在机体的代谢过程,其生物学效价更高<sup>[7]</sup>;25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 具有更强的生理活性,参与了免疫细胞分化与功能调节,其在血浆中的含量是维生素 D<sub>3</sub> 营养状态的重要标志<sup>[10]</sup>。因此,25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 是饲料中更为有效的维生素 D<sub>3</sub> 的添加形式,并于 1995 年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证,经美国 FDA 批准可以在畜禽饲料中使用的新型营养性添加剂。我国于 2014 年 2 月 1 日将其列入《饲料添加剂品种目录(2013)》(原农业部公告第 2045 号),允许作为饲料添加剂使用。

目前,25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 在畜禽养殖中应用十分广泛,在畜禽饲料生产中也多直接添加 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>。但是值得注意的是其生物学活性高的同时,其毒性也是 VD<sub>3</sub> 的 5—10 倍<sup>[11]</sup>,因此生产实践中要避免过量添加。然而目前尚无饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的检测方法标准,而饲料生产企业质量控制和行业监测都迫切需要建立准确、可靠的饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的检测方法。基于此,本研究对饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的检测方法进行研究,一方面可以满足目前动物精准营养研究的需要,另一方面也可为饲料质量安全监测提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用的配合饲料和预混合饲料样本从上海某饲料厂采集。

### 1.2 主要仪器与试剂

ACQUITY UPLC,紫外检测器 TUV Detector,Empower 色谱工作站;XSelect HSS T3 色谱柱(5 μm, 4.6 mm HSS T3),Talboys 数显多管涡旋混合器。

25-羟基维生素 D<sub>3</sub>(C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>,CAS 号 63283-36-3,Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度 >98.1%);甲醇(色谱纯)、甲基叔丁基醚(色谱纯)、氯化钠(化学纯)和水(一级水)。

### 1.3 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 标准溶液的配制

#### 1.3.1 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 标准母液(1 000 mg/L)的配制

称取 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 约 10 mg(准确到 0.000 1 g),置于 10 mL 棕色容量瓶中,加入 5 mL 的甲醇,在超声波水浴中超声 5 min 助溶,用甲醇定容至刻度,混匀配制为 1 000 mg/L 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 标准母液,-18 ℃ 以下保存,有效期 6 个月。

#### 1.3.2 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 标准储备液(100 mg/L)的配制

吸取 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 标准母液(1.3.1)10 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,混匀配制为 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 储备液,-18 ℃ 以下保存,有效期 3 个月。

#### 1.3.3 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 标准工作液的配制

用甲醇将 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 储备液(1.3.2)稀释得到质量浓度分别为 0.05 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、10 mg/L 和 100 mg/L 的标准工作溶液,现用现配。

### 1.4 试验样品的制备

按 GB/T 14 699.1 规定,取有代表性的饲料样品至少 500 g,四分法缩减至 100 g,磨碎,过 0.28 mm 孔径样品筛,混匀装入密闭容器中,避光低温保存备用。

### 1.5 试验样品的前处理

称取维生素/复合预混合饲料 1 g,或配合饲料 2 g(精确至 0.000 1 g),置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 蒸馏水,加盖涡旋混匀后置于 Talboys 数显多管涡旋混合器上以 2 500 r/min 振摇 15 min,取出加入 1 g 氯化钠混匀,再准确加入 10.0 mL 甲基叔丁基醚,加盖涡旋充分混匀提取 2 min 后,Talboys 数显多管涡旋混合器上以 2 500 r/min 振摇 15 min,然后在 3 000 r/min 的转速下离心 5 min。精密吸取适量上清液(上层有机相)至 10 mL 棕色玻璃管中,40 ℃ 水浴中 N<sub>2</sub> 吹干,取出用适量甲醇复溶,超声波水浴中超声 2 min 助溶,涡旋混匀,过 0.45 μm 有机系微孔滤膜,滤液供高效液相色谱仪分析。

## 1.6 液相色谱分析条件

流动相为 95% 甲醇水溶液(体积比 95:5),进样体积 10 $\mu$ L;流速 1 mL/min,柱温 30  $^{\circ}$ C,检测波长 265 nm,25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 保留时间 6.047 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取试剂的选择

试验选择甲基叔丁基醚作为溶剂萃取试剂,与乙醚相比,甲基叔丁基醚的沸点没有那么低,特别是夏天气温较高时的提取操作,不容易像乙醚一样涡旋时溢出或放置时挥发而造成损失。

### 2.2 萃取过程的优化

由于预混合饲料和配合饲料中的组分复杂,在样品中加入适量的纯净水,一方面可以去除饲料中的水溶性杂质,另一方面可以将饲料样品充分润湿避免结块儿,为后续溶剂萃取作准备。

在溶剂萃取前需要加入适量加氯化钠,这是因为氯化钠会溶解到水中,使得水溶液的极性更强,从而加大和有机溶剂之间的极性差别,有助于水相和有机相分离,避免乳化。且采用密度小于水的有机溶剂时,NaCl 溶解到水里之后加大了水相的密度,从而加大水相和有机相的密度差,加快了两相之间的分层。试验对比了萃取前加与不加氯化钠,由图 1 可以看出,加氯化钠可以提高萃取效率,提高目标物的检测值。

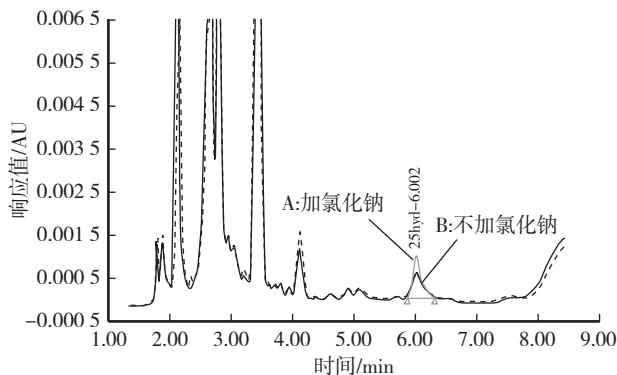


图 1 预混料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> HPLC 重叠色谱

Fig. 1 HPLC overlapping chromatograms of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in compound premix feed

### 2.3 HPLC 条件的优化

#### 2.3.1 流动相的优化

试验比较了不同比例甲醇-水作为流动相对目标化合物的分离效果的影响,结果表明,采用甲醇:水(V/V) = 95:5 可以更好地分离复杂基质中的目标物(图 2、图 3)。

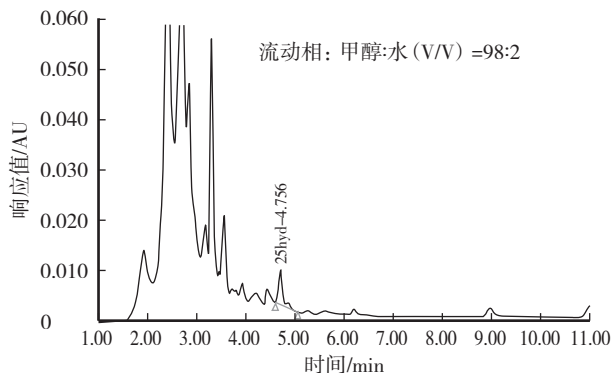


图 2 预混料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in compound premix feed

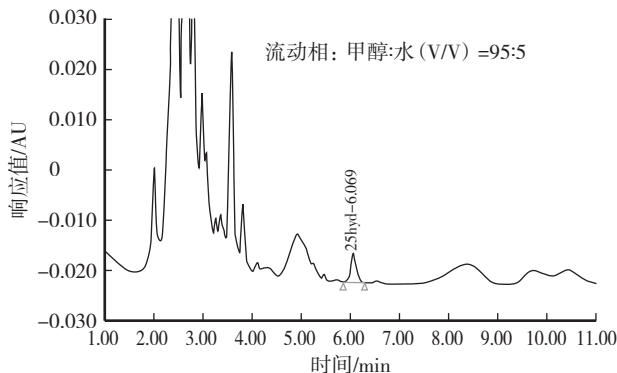


图 3 预混料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> HPLC 色谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in compound premix feed

#### 2.3.2 色谱系统的适应性

采用 1.6 的色谱条件,对畜禽预混合饲料和配合饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的含量进行检测,结果表

明本试验所优化的色谱条件可广泛应用于各种饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的测定。

## 2.4 线性范围及定量限

将 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 储备液配置成质量浓度分别为 0.05 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、10 mg/L 和 100 mg/L 的标准工作溶液,然后以 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 峰面积  $Y$  对质量浓度  $X$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 绘制标准曲线,线性方程为: $Y = 2.90 \times 10^4 X + 1.07 \times 10^4$ , 方程的决定系数 ( $R^2$ ) 为 0.999 8,表明在 0.05—100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内有良好的线性关系。以信噪比 ( $S/N$ )  $\geq 10$  计算,方法的定量限为 0.3 mg/kg。

## 2.5 加标回收率

取猪配合饲料和猪复合预混合饲料样品基质 2 g,分别添加 0.3 mg/kg、0.6 mg/kg 和 3 mg/kg 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>,进行加标回收率试验,每个添加水平重复 6 次。结果表明:25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的平均回收率为 90%—97% (表 1),相对标准偏差为 1%—4%。证实该方法的准确度较高,满足测定要求。

表 1 不同饲料样品中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的添加回收率和相对标准偏差 ( $n = 6$ )

Table 1 Recovery rates and relative standard deviations of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in feeds ( $n = 6$ )

重复	猪配合饲料/(mg·kg <sup>-1</sup> )				猪维生素预混合饲料/(mg·kg <sup>-1</sup> )				肉鸡维生素预混合饲料/(mg·kg <sup>-1</sup> )				蛋鸡预混合饲料/(mg·kg <sup>-1</sup> )											
	0.3		0.6		3		0.3		0.6		3		0.3		0.6		3							
	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%	测定值/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	回收 率/%						
1	0.271	90	0.571	95	2.89	96	0.281	94	0.564	94	2.83	94	0.294	98	0.576	96	2.78	93	0.256	85	0.545	91	2.68	89
2	0.275	92	0.579	97	2.87	96	0.265	88	0.579	97	2.93	98	0.279	93	0.58	97	2.75	92	0.268	89	0.549	92	2.63	88
3	0.273	91	0.563	94	2.88	96	0.278	93	0.576	96	2.79	93	0.283	94	0.575	96	2.95	98	0.269	90	0.556	93	2.86	95
4	0.289	96	0.577	96	2.79	93	0.272	91	0.568	95	2.77	92	0.296	99	0.592	99	2.86	95	0.274	91	0.568	95	2.72	91
5	0.282	94	0.558	93	2.79	93	0.267	89	0.578	96	2.76	92	0.282	94	0.588	98	2.84	95	0.289	96	0.558	93	2.76	92
6	0.275	92	0.566	94	2.76	92	0.274	91	0.572	95	2.85	95	0.279	93	0.562	94	2.92	97	0.268	89	0.562	94	2.85	95
平均回 收率/%	93		95		94		91		96		94		95		97		95		90		93		92	
RSD/%	4		1		2		2		1		2		3		2		3		4		2		3	

## 2.6 精密度

取同一复合预混合饲料样品,重复测定 10 次,样品中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 含量的相对标准偏差小于 5% (表 2),满足饲料中营养成分检测的要求。

表 2 复合预混合饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 含量的测定

Table 2 Determination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in compound premix feed

重复	样品称样量/g	25-羟基维生素 D <sub>3</sub> 含量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	含量测定值平均值/(mg·kg <sup>-1</sup> )	相对标准偏差(RSD)/%
1	2.120 5	35.3	33.5	4
2	2.051 8	30.8		
3	2.029 5	31.3		
4	2.018 8	31.6		
5	2.035 6	31.7		
6	2.065 4	36.4		
7	2.057 7	35.3		
8	2.029 5	36.2		
9	2.106 2	33.9		
10	2.024 7	32.5		

## 2.7 方法适用性验证

选取添加了 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的饲料产品(蛋鸡维生素预混合饲料、蛋鸡复合预混合饲料、种畜禽维生素预混合饲料、种畜禽复合预混合饲料鸡饲料以及动物保健产品)进行了测定。结果表明:应用本方法检测饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的含量其相对偏差均小于 5% (表 3),符合饲料检测标准要求。

表 3 不同饲料样品中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的测定  
Table 3 Determination of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> monohydrate in feeds

样品编号	重复	产品标示值/(mg·kg <sup>-1</sup> )	测定值/(mg·kg <sup>-1</sup> )	平均值/(mg·kg <sup>-1</sup> )	RSD/%
A	1	35	30.8	32.0	4
	2		33.5		
	3		31.8		
B	1	90	94.4	92.5	3
	2		89.5		
	3		93.5		
C	1	50	45.2	47.2	5
	2		49.6		
	3		46.8		
D	1	90	85.6	87.4	2
	2		87.3		
	3		89.2		
E	1	130	132.2	128.0	4
	2		122.6		
	3		129.8		
F	1	5	5.12	5.15	4
	2		4.98		
	3		5.35		

### 3 结论

试验结果表明,采用高效液相色谱法分析饲料中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的保留时间重现性好,含量和峰面积比值之间呈良好的线性关系,加标回收率准确度高,精密度高。该法测定饲料中的 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 含量简便、快速、准确。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] HODGKINSON A J, WALLACE O A M, KRUGER M C, et al. Effect of the dietary delivery matrix on vitamin D<sub>3</sub> bioavailability and bone mineralisation in vitamin-D<sub>3</sub>-deficient growing male rats[J]. British Journal of Nutrition, 2018, 119(2):143-152.
- [ 2 ] STORZHOK N M, DARIUKHINA E N, TSVETKOVA E, et al. Kinetics and action mechanism of vitamin D<sub>3</sub> in the process of lipid and blood plasma oxidation in model system[J]. Biomed Khim 2005, 51(6):662-672.
- [ 3 ] MURIS A H, SMOLDERS J, ROLF L, et al. Immune regulatory effects of high dose vitamin D<sub>3</sub> supplementation in a randomized controlled trial in relapsing remitting multiple sclerosis patients receiving IFNbeta; the SOLARIUM study[J]. Journal of Neuroimmunology, 2016, 300:47-56.
- [ 4 ] 贾洪阁,魏时来,杨德志,等.日粮中 25-OH-D<sub>3</sub>、VD<sub>3</sub> 不同水平组合对肉仔鸡生长性能的影响[J].中国畜牧兽医,2007,34(8):10-13.
- [ 5 ] ATENCIO A, EDWARDS H M, PESTI G. Effects of vitamin D<sub>3</sub> dietary supplementation of broiler breeder hens on the performance and bone abnormalities of the progeny[J]. Poultry Science, 2005, 84(7):1058-1068.
- [ 6 ] 叶慧,郑玲玲,雷建平,等.25 羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 1α 羟基维生素 D<sub>3</sub> 代替维生素 D<sub>3</sub> 对 42-63 日龄黄羽肉鸡生长性能、血清生化指标和胫骨发育的影响[J].动物营养学报,2013,25(8):1752-1761.
- [ 7 ] GARCIA A F, MURAKAMI A E, DUARTE C R, et al. Use of vitamin d<sub>3</sub> and its metabolites in broiler chicken feed on performance, bone parameters and meat quality[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2013, 26(3):408-415.
- [ 8 ] CHENG J B, MOTOLA D L, MANGELSDORF D J, et al. De-orphanization of cytochrome P450 2R1; a microsomal vitamin D 25-hydroxylase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(39):38084-38093.
- [ 9 ] TAKEYAMA K, KITANAKA S, SATO T, et al. 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis[J]. Science, 1997, 277(5333):1827-1830.
- [ 10 ] BAEKE F, ETTEN E V, OVERBERGH L, et al. Vitamin D<sub>3</sub> and the immune system; maintaining the balance in health and disease[J]. Nutrition Research Reviews, 2007, 20(1):106-118.
- [ 11 ] YARGER J, QUARLES C, HOLLIS B, et al. Safety of 25-hydroxycholecalciferol as a source of cholecalciferol in poultry rations[J]. Poultry Science, 1995, 74(9):1437-1446.

(责任编辑:张睿)