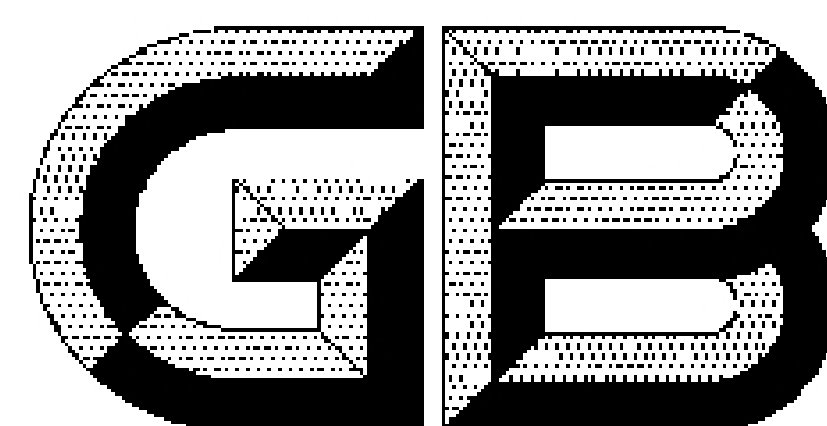




中华人民共和国国家标准

GB/T 17819—2017
代替 GB/T 17819—1999

添加剂预混合饲料中维生素 B₁₂ 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin B₁₂ in additive premix—
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 17819—1999《维生素预混料中维生素 B₁₂ 的测定 高效液相色谱法》。与 GB/T 17819—1999 相比,主要技术内容差异如下:

- 标准名称改为《添加剂预混合饲料中维生素 B₁₂ 的测定 高效液相色谱法》。
- 删除 1999 年版中附录 A。
- 增加资料性附录 A。
- 在范围和方法中删除维生素 B₁₂ 预混制剂的测定。
- 将 1999 年版中方法进行了修改,补充固相萃取净化处理方法。
- 补充了使用 C₁₈ 色谱柱的色谱参考条件。
- 增加了对标准工作液的赋值方法。

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)]。

本标准主要起草人:索德成、李兰、赵小阳、虞哲高。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 17819—1999。

添加剂预混合饲料中维生素 B₁₂ 的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了添加剂预混合饲料中维生素 B₁₂ 含量测定的高效液相色谱方法。
本标准适用于复合预混合饲料、维生素预混合饲料中维生素 B₁₂ 的测定。
本标准的方法检出限为 0.1 mg/kg, 定量限为 0.5 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 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

试样中维生素 B₁₂ 用水提取, 经 SPE 净化富集后, 采用高效液相色谱仪分离检测, 外标法定量。

4 试剂和溶液

除特殊注明外, 本标准所用试剂均为分析纯, 色谱用水应满足 GB/T 6682 中一级水的要求。实验用水应满足 GB/T 6682 中三级水的要求。

- 4.1 乙腈: 色谱纯。
- 4.2 甲醇: 色谱纯。
- 4.3 氮气(纯度 99.9%)。
- 4.4 乙酸: 优级纯。
- 4.5 己烷磺酸钠: 色谱级。
- 4.6 维生素 B₁₂ 标准品: 维生素 B₁₂ 含量 ≥ 96.0%。
- 4.7 维生素 B₁₂ 标准储备溶液: 准确称取 0.1 g(精确到 0.000 1 g) 维生素 B₁₂ 标准品(4.6), 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加适量的甲醇(4.2)使其溶解, 并稀释定容至刻度, 摇匀。该标准储备液维生素 B₁₂ 含量为 1 mg/mL。-18 °C 保存, 有效期一年。
- 4.8 维生素 B₁₂ 标准工作液: 准确吸取 1 mL 维生素 B₁₂ 标准储备溶液(4.7)于 100 mL 棕色容量瓶中, 用水定容稀释至刻度, 摇匀。

维生素 B₁₂ 标准工作液的浓度按下述方法测定和计算:

以水为空白溶液, 用紫外分光光度计测定维生素 B₁₂ 标准工作液在 361 nm 处的吸光值。维生素 B₁₂ 标准工作液的浓度 X 以微克每毫升(μg/mL)表示, 按式(1)计算:

$$X = \frac{A \times 10\,000}{207}$$

.....(1)

- 式中：
- A —— 维生素 B₁₂标准工作液在 361 nm 波长处测得的吸光值；
 - 10 000—— 维生素 B₁₂标准工作液浓度单位换算系数；
 - 207 —— 维生素 B₁₂标准百分系数($E_{1\%}^{1\text{cm}}=207$)。

也可根据实验需要配置相应浓度的标准工作液。

- 4.9 己烷磺酸钠溶液：称取 1.1 g 己烷磺酸钠(4.5)溶于 1 000 mL 水中，加入 10 mL 乙酸(4.4)，超声混匀。
- 4.10 1%磷酸溶液：取 1 mL 磷酸加入 1 000 mL 水中，超声脱气。

5 仪器和设备

- 5.1 实验室常用仪器、设备。
- 5.2 电子天平：感量 0.000 1 g、感量 0.001 g。
- 5.3 离心机：可达 5 000 r/min(相对离心力为 2 988 g)。
- 5.4 超声波水浴。
- 5.5 固相萃取装置。
- 5.6 高效液相色谱仪：配紫外可调波长检测器(或二极管矩阵检测器)。
- 5.7 氮吹装置。
- 5.8 紫外分光光度计。
- 5.9 C₁₈固相萃取小柱：500 mg/6 mL 或相当性能的固相萃取小柱。

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，避光保存备用。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 维生素预混合饲料的提取

称取试样 2 g~3 g(精确到 0.001 g)，置于 50 mL 离心管中，准确加入水 20 mL，充分摇动 30 s，再置于超声水浴中超声提取 30 min，期间摇动 2 次。于离心机上 5 000 r/min 离心 5 min，取上清液，如果样品溶液为含量大于 10 mg/kg 的维生素预混料，则过 0.45 μm 微孔滤膜，上 HPLC 测定。若测得样品液中维生素 B₁₂浓度小于 2 μg/mL，则需按 7.2 净化方法处理；若测得样品液中维生素 B₁₂浓度大于 100 μg/mL，应根据检测结果，用一定体积的水稀释，使稀释后维生素 B₁₂的含量在 2 μg/mL~100 μg/mL之间，重新测定。

7.1.2 复合预混合饲料的提取

称取试样 2 g~3 g(精确到 0.001 g)，置于 50 mL 离心管中，准确加入水 20 mL，充分摇动 30 s，再置于超声水浴中超声提取 30 min，期间摇动 2 次。于离心机上 5 000 r/min 离心 5 min，取上清液，进行

下一步净化。

7.2 试样净化

固相萃取小柱分别用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化,准确移取 10 mL 上清液(7.1)过柱,用 5 mL 水淋洗,近干后,用 5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液。50 ℃ 氮气吹至近干,准确加入 1 mL 水溶解,过 0.45 μm 微孔滤膜,上 HPLC 测定。若测得上机试样溶液中维生素 B₁₂ 浓度超出线性范围,应根据检测结果,用一定体积的水稀释,使稀释后维生素 B₁₂ 的含量在 1 μg/mL~100 μg/mL 之间,重新测定。

7.3 测定

7.3.1 参考色谱条件

7.3.1.1 氨基柱

色谱柱:氨基柱,长 250 mm,内径 4 mm,粒度 5 μm(或相当性能类似的分析柱);
流动相:乙腈+1%磷酸水(25+75);
流速:1.0 mL/min;
温度:室温;
检测波长:361 nm。

7.3.1.2 C₁₈ 柱

色谱柱:C₁₈ 型柱,长 150 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm(或相当性能类似的分析柱);
流动相:甲醇+己烷磺酸钠溶液(25+75);
流速:1.0 mL/min;
温度:室温;
检测波长:546 nm。

7.3.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数,向色谱柱注入相应的维生素 B₁₂ 标准工作液(4.8)和试样溶液,得到色谱峰面积响应值,用外标法定量测定,维生素 B₁₂ 标准色谱图参见附录 A。

8 结果计算

试样中维生素 B₁₂ 的含量,以质量分数 X 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(2)计算:

$$X = \frac{P_1 \times V \times C}{P_2 \times m}$$

.....(2)

式中:

- P_1 ——试样溶液峰面积值;
- V ——稀释体积,单位为毫升(mL);
- C ——维生素 B₁₂ 标准工作液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- P_2 ——维生素 B₁₂ 标准工作液峰面积值;
- m ——试样质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。



9 重复性

对于维生素 B₁₂ 含量小于或等于 50 mg/kg 的添加剂预混合饲料,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 B₁₂ 含量大于 50 mg/kg 的添加剂预混合饲料,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)
维生素 B₁₂ 标准色谱图

维生素 B₁₂ 标准色谱图(氨基柱)见图 A.1;维生素 B₁₂ 标准色谱图(C₁₈ 柱)见图 A.2。

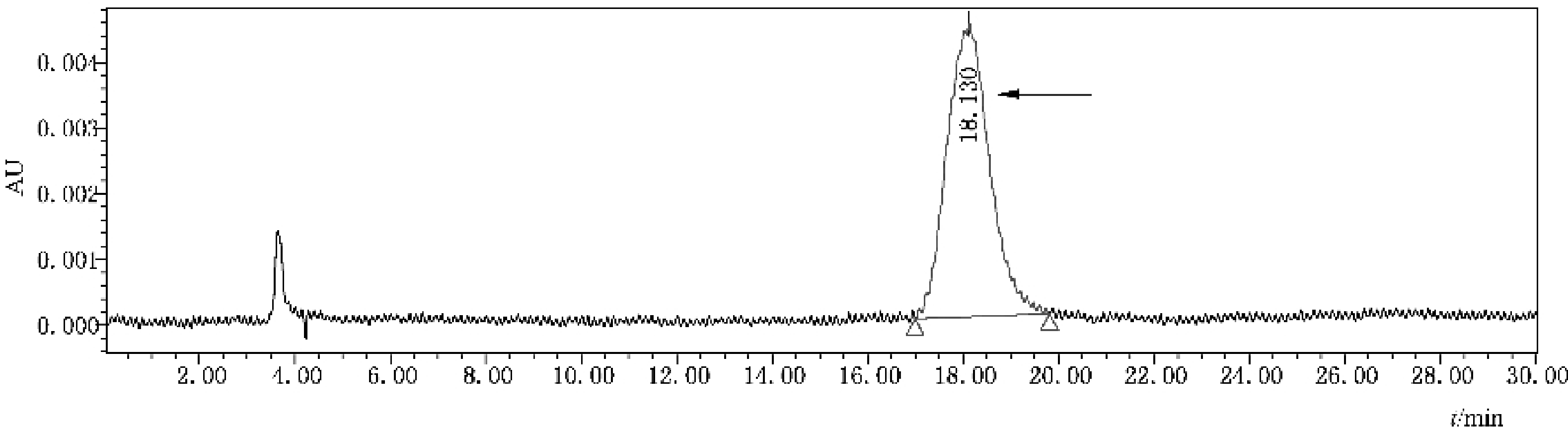


图 A.1 10 μg/mL 维生素 B₁₂ 标准溶液色谱图(氨基柱)

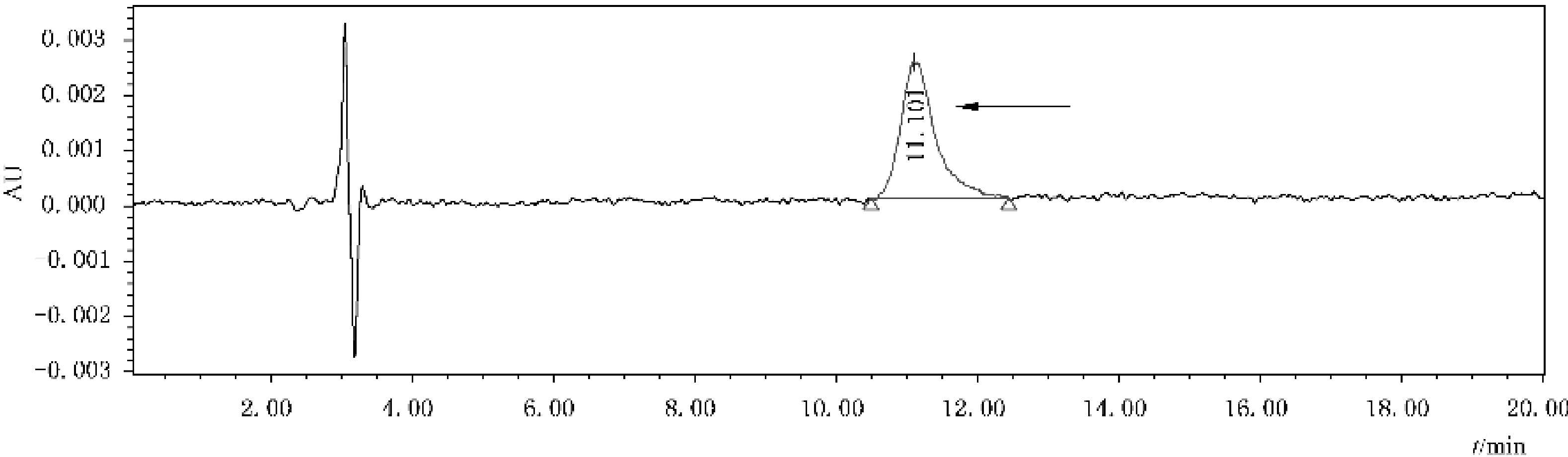


图 A.2 10 μg/mL 维生素 B₁₂ 标准溶液色谱图(C₁₈ 柱)