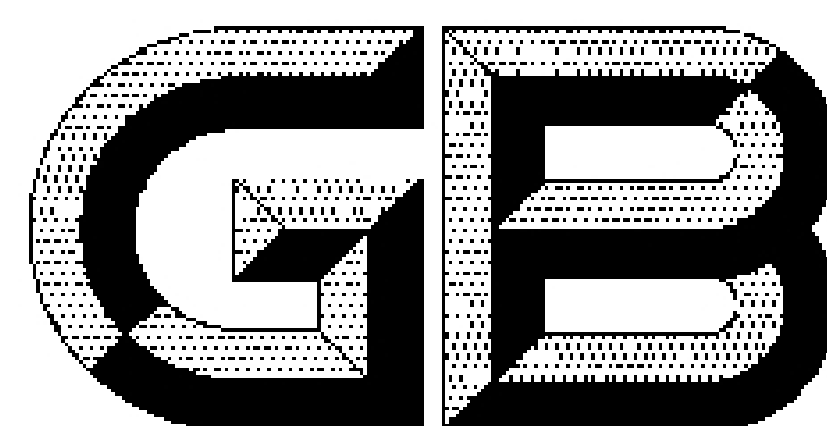




中华人民共和国国家标准

GB/T 14700—2018
代替 GB/T 14700—2002

饲料中维生素 B₁ 的测定

Determination of thiamine in feed

2018-05-14 发布

2018-12-01 实施

国家市场监督管理总局 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 14700—2002《饲料中维生素 B₁ 的测定》。

本标准与 GB/T 14700—2002 相比,主要技术变化如下:

- 修改了适用范围(见第 1 章,2002 年版的第 1 章);
- 删去了硫胺素的分子式(见第 3 章,2002 年版的 3.1);
- 酸性 20%乙醇溶液的制备给出具体配置过程(见第 3 章,2002 年版的 3.2);
- 样品制备中规定添加剂预混合饲料不粉碎(见第 4 章,2002 年版的 4.4);
- 复合预混合饲料提取液区别于维生素预混合饲料,改为酸性氯化铵甲醇溶液(见第 4 章,2002 年版的 4.2.9);
- 增加了维生素 B₁ 的色谱图和光谱图(见附录 A)。

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:李兰、贾铮、樊霞。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 14700—1999、GB/T 14700—2002。



饲料中维生素 B₁ 的测定

1 范围

本标准规定了用荧光分光光度法和高效液相色谱法测定饲料中维生素 B₁ 含量的两种方法。

本标准方法 1 适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料中的维生素 B₁ 的测定。方法的定量限为 1 mg/kg (在有吸附硫胺素或影响硫色素荧光干扰物质存在的情况,本方法不适用)。该方法所测定的维生素 B₁ 包括内源性以及添加量总和。

本标准规定的方法 2 适用于复合预混合饲料、维生素预混合饲料的测定。方法 2 的检出限为 3 mg/kg; 定量限为 15 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 方法 1: 荧光分光光度法



3.1 原理

试样中的维生素 B₁ 经稀酸以及消化酶分解、吸附剂的吸附分离提纯后,在碱性条件下被铁氰化钾氧化生成荧光色素-硫色素,用正丁醇萃取。硫色素在正丁醇中的荧光强度与试样中维生素 B₁ 的含量成正比,依此进行定量测定。

3.2 试剂或溶液

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。

3.2.1 盐酸溶液 $c(\text{HCl})=0.1\text{ mol/L}$ 。

3.2.2 硫酸溶液 $c(1/2\text{ H}_2\text{SO}_4)=0.05\text{ mol/L}$ 。

3.2.3 乙酸钠溶液 $c(\text{CH}_3\text{COONa})=2.0\text{ mol/L}$ 。

3.2.4 100 g/L 淀粉酶悬乳液:用乙酸钠溶液(3.2.3)悬浮 10 g 淀粉酶制剂,稀释至 100 mL,使用当日制备。

3.2.5 氯化钾溶液:250 g/L。

3.2.6 酸性氯化钾溶液:将 8.5 mL 浓盐酸加入至氯化钾溶液(3.2.5)中,并稀释至 1 000 mL。

3.2.7 氢氧化钠溶液:150 g/L。

3.2.8 铁氰化钾溶液:10 g/L。

3.2.9 碱性铁氰化钾溶液:移取 4.00 mL 的铁氰化钾溶液(3.2.8)与氢氧化钠溶液(3.2.7)混合使之成 100 mL,此液 4 h 内使用。

3.2.10 冰乙酸溶液:30 mL/L。

3.2.11 酸性 20%乙醇溶液:取 80 mL 水,用盐酸溶液(3.2.1)调节 pH 3.5~4.3,与 20 mL 无水乙醇混合。

3.2.12 人造沸石[0.25 mm~0.18 mm(60 目~80 目)]:使用前应活化,方法如下:将适量人造沸石置于大烧杯中,加入 10 倍容积,加热到 60 °C~70 °C 的冰乙酸溶液(3.2.10),用玻璃棒均匀搅动 10 min,使沸石在冰乙酸溶液中悬浮,待沸石沉降后,弃去上层冰乙酸液,重复上述操作 2 次。换用 5 倍容积,加热到 60 °C~70 °C 的氯化钾溶液(3.2.5)搅动清洗 2 次,每次 15 min。再用热冰乙酸溶液洗 10 min。最后用热水清洗沸石至无氯离子(用 10 g/L 硝酸银水溶液检验)。用布氏漏斗抽滤,105 °C 烘干,贮于磨口瓶可使用 6 个月。

使用前,检查沸石对维生素 B₁ 标准溶液的回收率,如达不到 92%,应重新活化沸石。

注:沸石对维生素 B₁ 回收率的检查:移取维生素 B₁ 标准中间液(3.2.13.2)2 mL 用酸性氯化钾溶液(3.2.6)定容至 100 mL。按照 3.5.4.1~3.5.4.3 步骤进行氧化,作为外标。另一份维生素 B₁ 标准工作液(3.2.13.3)移取 25 mL 重复 3.5.3.1~3.5.3.3 过柱操作,按照 3.5.4.1~3.5.4.3 步骤进行氧化。同时测定两份溶液荧光强度,依照式(1)计算,经换算为百分数就是沸石对维生素 B₁ 的回收率值。

3.2.13 维生素 B₁ 标准溶液

3.2.13.1 维生素 B₁ 标准贮备液:取硝酸硫胺素标准品(纯度大于 99%),于五氧化二磷干燥器中干燥 24 h。称取 0.01 g(精确至 0.000 1 g),溶解于酸性 20%乙醇溶液(3.2.11)中并定容至 100 mL,盛于棕色瓶中,2 °C~8 °C 冰箱保存,可使用 3 个月。该溶液含 0.1 mg/mL 维生素 B₁。

3.2.13.2 维生素 B₁ 标准中间液:取维生素 B₁ 标准贮备液(3.2.13.1)10 mL 用酸性 20%乙醇溶液(3.2.11)定容至 100 mL,盛于棕色瓶中,2 °C~8 °C 冰箱保存,可使用 48 h。该溶液含 10 µg/mL 维生素 B₁。

3.2.13.3 维生素 B₁ 标准工作液:取维生素 B₁ 标准中间液(3.2.13.2)2 mL 与 65 mL 盐酸溶液(3.2.1)和 5 mL 乙酸钠溶液(3.2.3)混合,定容至 100 mL,分析前制备。该溶液含 0.2 µg/mL 维生素 B₁。

3.2.14 硫酸奎宁溶液

3.2.14.1 硫酸奎宁贮备液:称取硫酸奎宁 0.1 g(精确至 0.001 g),用硫酸溶液(3.2.2)溶解并定容至 1 000 mL。贮于棕色瓶中,冷藏。若溶液混浊则需要重新配制。

3.2.14.2 硫酸奎宁工作液:取贮备液(3.2.14.1)3 mL,用硫酸溶液(3.2.2)定容至 1 000 mL。贮于棕色瓶中,冷藏。该溶液含 0.3 µg/mL 硫酸奎宁。

3.2.15 正丁醇:荧光强度不超过硫酸奎宁工作液(3.2.14.2)的 4%,否则需用全玻璃蒸馏器重蒸馏,取 114 °C~118 °C 馏分。

3.3 仪器设备

3.3.1 实验室常用玻璃器皿。

3.3.2 分析天平:感量 0.000 1 g,0.001 g。

3.3.3 高压釜,使用温度为 121 °C~123 °C 或压力达到 15 kg/cm²。

3.3.4 电热恒温箱,45 °C~50 °C。

3.3.5 吸附分离柱:全长 235 mm,外径×长度如下:上端贮液槽尺寸为 35 mm×70 mm,容量约为 50 mL,中部吸附管 8 mm×130 mm;下端 35 mm 拉成毛细管。

3.3.6 具塞离心管 25 mL。

3.3.7 荧光分光光度计,备 1 cm 石英比色杯。

3.3.8 注射器:10 mL。

3.4 样品

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 GB/T 20195 制备试样,粉

碎过 0.425 mm 孔径筛,充分混匀。

3.5 试验步骤

3.5.1 称样

称取原料、配合饲料、浓缩饲料 1 g~2 g,精确至 0.001 g,置于 100 mL 棕色锥形瓶中。

3.5.2 试样溶液的制备

3.5.2.1 水解:加入盐酸溶液(3.2.1)65 mL 于锥形瓶中,加塞后置于沸水浴加热 30 min[或于高压釜(3.3.2)中加热 30 min],开始加热 5 min~10 min 内不时摇动锥形瓶,以防结块。

3.5.2.2 酶解:冷却锥形瓶至 50 °C 以下,加 5 mL 淀粉酶悬浮液(3.2.4),摇匀。该溶液 pH 约为 4.0~4.5,将锥形瓶至于电热恒温箱(3.3.4)中 45 °C~50 °C 保温 3 h,取出冷却,用盐酸溶液(3.2.1)调整 pH 至 3.5,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用水定容至 100 mL,摇匀。

3.5.2.3 过滤:将全部试液通过无灰滤纸过滤,弃去初滤液 5 mL,收集滤液作为试样溶液。

3.5.3 试样溶液的纯化

3.5.3.1 制备吸附柱:称取 1.5 g 活化人造沸石(3.2.12)置于 50 mL 小烧杯中,加入 3% 冰乙酸溶液(3.2.10)浸泡,溶液液面没过沸石即可。将脱脂棉置于吸附分离柱(3.3.5)底部,用玻璃棒轻压。然后将乙酸浸泡的沸石全部洗入柱中(勿使吸附柱脱水),过柱流速控制在 1 mL/min 为宜。再用 10 mL 近沸的水洗柱 1 次。

3.5.3.2 吸取 25 mL 试样溶液(3.5.2.3),慢慢加入制备好的吸附柱中,弃去滤液,用每份 5 mL 近沸的水洗柱 3 次,弃去洗液。同时做平行样。

3.5.3.3 用 25 mL 60 °C~70 °C 酸性氯化钾溶液(3.2.6)分 3 次连续加入吸附柱,收集洗脱液于 25 mL 容量瓶中,冷却后用酸性氯化钾溶液定容,混匀。

3.5.3.4 同时用 25 mL 维生素 B₁ 标准工作液(3.2.13.3)。重复 3.5.3.1~3.5.3.3 操作,作为外标。

3.5.4 氧化与萃取

警示——以下操作避光进行。

3.5.4.1 于 2 只具塞离心管(3.3.6)中各吸入 5 mL 洗脱液(3.5.3.3),分别标记为 A、B。

3.5.4.2 在 B 管加入 3 mL 氢氧化钠溶液(3.2.7),再向 A 管中加 3 mL 碱性铁氰化钾溶液(3.2.9),轻轻旋摇。依次立即向 A 管加入 15 mL 正丁醇(3.2.15)加塞,剧烈振摇 15 s,再向 B 管加入 15 mL 正丁醇加塞,共同振摇 90 s,静置分层。

3.5.4.3 用注射器(3.3.8)吸去下层水相,向各反应管加入约 2 g 无水硫酸钠,旋摇,待测。

3.5.4.4 同时将 5 mL 作为外标的洗脱液(3.5.3.4),置入另 2 只具塞离心管,分别标记为 C、D,按 3.5.4.1~3.5.4.3 操作。

3.5.5 测定

3.5.5.1 用硫酸奎宁工作液(3.2.14.2)调整荧光仪,使其固定于一定数值,作为仪器工作的固定条件。

3.5.5.2 于激发波长 365 nm,发射波长 435 nm 处测定 A 管、B 管、C 管、D 管中萃取液的荧光强度。

3.6 试验数据处理

本方法测定的维生素 B₁ 以硝酸硫胺素计,如需要以盐酸硫胺素计,按 1 mg 盐酸硫胺素含 1.03 mg 硝酸硫胺素换算。

试样中维生素 B₁ 含量按式(1)计算:

$$w_i = \frac{T_1 - T_2}{T_3 - T_4} \times \rho \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{V_0}{m} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

w_i ——试样中维生素 B₁ 的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

T_1 ——A 管试液的荧光强度;

T_2 ——B 管试液空白的荧光强度;

T_3 ——C 管标准溶液的荧光强度;

T_4 ——D 管标准溶液空白的荧光强度;

ρ ——维生素 B₁ 标准工作液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_0 ——提取液总体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——分取溶液过柱的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——酸性氯化钾洗脱液体积,单位为毫升(mL);

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,保留三位有效数字。

3.7 重复性

对于维生素 B₁ 含量低于 5 mg/kg 的饲料,在重复性条件下,获得的 2 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 B₁ 含量大于 5 mg/kg 而小于 50 mg/kg 的饲料,在重复性条件下,获得的 2 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%;

对于维生素 B₁ 含量大于 50 mg/kg 的饲料,在重复性条件下,获得的 2 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 5%。

4 方法 2:高效液相色谱法

4.1 原理

试样经酸性提取液超声提取后,将过滤离心后的试液注入高效液相色谱仪反相色谱系统中进行分离,用紫外(或二极管矩阵检测器)检测,外标法计算维生素 B₁ 的含量。

4.2 试剂或溶液

除特殊说明外,所用试剂均分析纯,色谱用水符合 GB/T 6682 中一级用水规定。

4.2.1 氯化铵:优级纯。

4.2.2 庚烷磺酸钠(PICB₇):优级纯。

4.2.3 冰乙酸:优级纯。

4.2.4 三乙胺:色谱纯。

4.2.5 甲醇:色谱纯。

4.2.6 酸性乙醇溶液:20%,制备见 3.2.11。

4.2.7 二水合乙二胺四乙酸二钠(EDTA):优级纯。

4.2.8 维生素预混合饲料提取液:

称取 50 mg EDTA(4.2.7)于 1 000 mL 容量瓶中,加入约 1 000 mL 去离子水,同时加入 25 mL 冰乙酸(4.2.3)、约 10 mL 三乙胺(4.2.4),超声使固体溶解,调节溶液 pH 3~4,过 0.45 μm 滤膜,取 800 mL 该溶液,与 200 mL 甲醇混合既得。

4.2.9 复合预混合饲料提取液：

称取 107 g 氯化铵(4.2.1)溶解于 1 000 mL 水中，用 2 mol/L 盐酸调节溶液 pH 为 3~4。取 900 mL 氯化铵溶液与 100 mL 甲醇混合既得。

4.2.10 流动相：

称取庚烷磺酸钠(4.2.2)1.1 g、50 mg EDTA 于 1 000 mL 容量瓶中，加入约 1 000 mL 水，同时加入 25 mL 冰乙酸(4.2.3)、约 10 mL 三乙胺(4.2.4)，超声使固体溶解，pH 计调节溶液 pH 为 3.7，过 0.45 μm 滤膜，取 800 mL 该溶液，与 200 mL 甲醇(4.2.5)混合既得。

4.2.11 维生素 B₁ 标准溶液

4.2.11.1 维生素 B₁ 标准贮备液：制备过程同 3.2.13.1。

4.2.11.2 维生素 B₁ 标准工作液 A：准确吸取 1 mL 维生素 B₁ 标准贮备液(4.2.11.1)于 50 mL 棕色容量瓶中，用流动相(4.2.10)定容至刻度，该标准工作液浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ ，该溶液存于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱可以使用 48 h。

4.2.11.3 维生素 B₁ 标准工作液 B：准确吸取 5 mL 维生素 B₁ 标准工作液 A(4.2.11.2)于 50 mL 棕色容量瓶中，用流动相(4.2.10)定容至刻度，该标准工作液浓度 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ，该溶液使用前稀释制备。

4.3 仪器设备

4.3.1 实验室常用玻璃器皿。

4.3.2 pH 计(带温控，精准至 0.01)。

4.3.3 超声波提取器。

4.3.4 针头过滤器备 0.45 μm (或 0.2 μm)滤膜。

4.3.5 高效液相色谱仪带紫外或二极管矩阵检测器。

4.4 样品

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 GB/T 20195 制备试样，充分混匀。

4.5 试验步骤

警示——避免强光照射。

4.5.1 提取

4.5.1.1 维生素预混合饲料的提取

称取试样 0.25 g~0.5 g(精确到 0.000 1 g)，置于 100 mL 棕色容量瓶中，加入提取液(4.2.8)约 70 mL，边加边摇匀，置于超声水浴中超声提取 15 min，期间摇动 2 次，冷却，用提取液定容至刻度，摇匀。取少量溶液于离心机上 8 000 r/min 离心 5 min，上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，上 HPLC 测定。

4.5.1.2 复合预混合饲料的提取

称取试样约 3.0 g(精确到 0.001 g)，置于 100 mL 棕色容量瓶中，加入提取液(4.2.9)约 70 mL，边加边摇匀后置于超声水浴中超声提取 30 min，期间摇动 2 次，冷却，用提取液定容至刻度，摇匀。取少量溶液于离心机上 8 000 r/min 离心 5 min，上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，上 HPLC 测定。

4.5.2 参考色谱条件

色谱柱：C₁₈ 柱，长 250 mm，内径 4.6 mm，粒度 5 μm (或相当性能类似的分析柱)。

流动相:4.2.10。

流速:1.0 mL/min。

温度:25℃~28℃。

检测波长:242 nm。

进样量:20 μL。

4.5.3 定量测定

平衡色谱柱后,依分析物浓度向色谱柱注入相应的维生素 B₁ 标准工作液 A(4.2.11.2)或者维生素 B₁ 标准工作液 B(4.2.11.3)和试样溶液(4.5.1),得到色谱峰面积响应值,用外标法定量测定,维生素 B₁ 色谱图参见附录 A。

4.6 试验数据处理

本方法测定的维生素 B₁ 以硝酸硫胺素计,如需要以盐酸硫胺素计,按 1 mg 盐酸硫胺素含 1.03 mg 硝酸硫胺素换算。

试样中维生素 B₁ 的含量,按式(2)计算:

$$w = \frac{P_1 \times V \times \rho}{P_2 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

w ——为维生素 B₁ 质量分数,单位为毫克每千克(mg/kg);

m ——试样质量,单位为克(g);

V ——稀释体积,单位为毫升(mL);

ρ ——维生素 B₁ 标准工作液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

P_1 ——试样溶液峰面积值;

P_2 ——维生素 B₁ 标准工作液峰面积值。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

4.7 重复性

对于维生素 B₁ 含量低于 5 mg/kg 的饲料,在重复性条件下,获得的 2 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 B₁ 含量大于 5 mg/kg 而小于 50 mg/kg 的饲料,在重复性条件下,获得的 2 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%;

对于维生素 B₁ 含量大于 50 mg/kg 的饲料,在重复性条件下,获得的 2 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 5%。

附 录 A
(资料性附录)
维生素 B₁ 标准色谱图和光谱图

维生素 B₁ 标准色谱图见图 A.1;维生素 B₁ 标准光谱图见图 A.2。

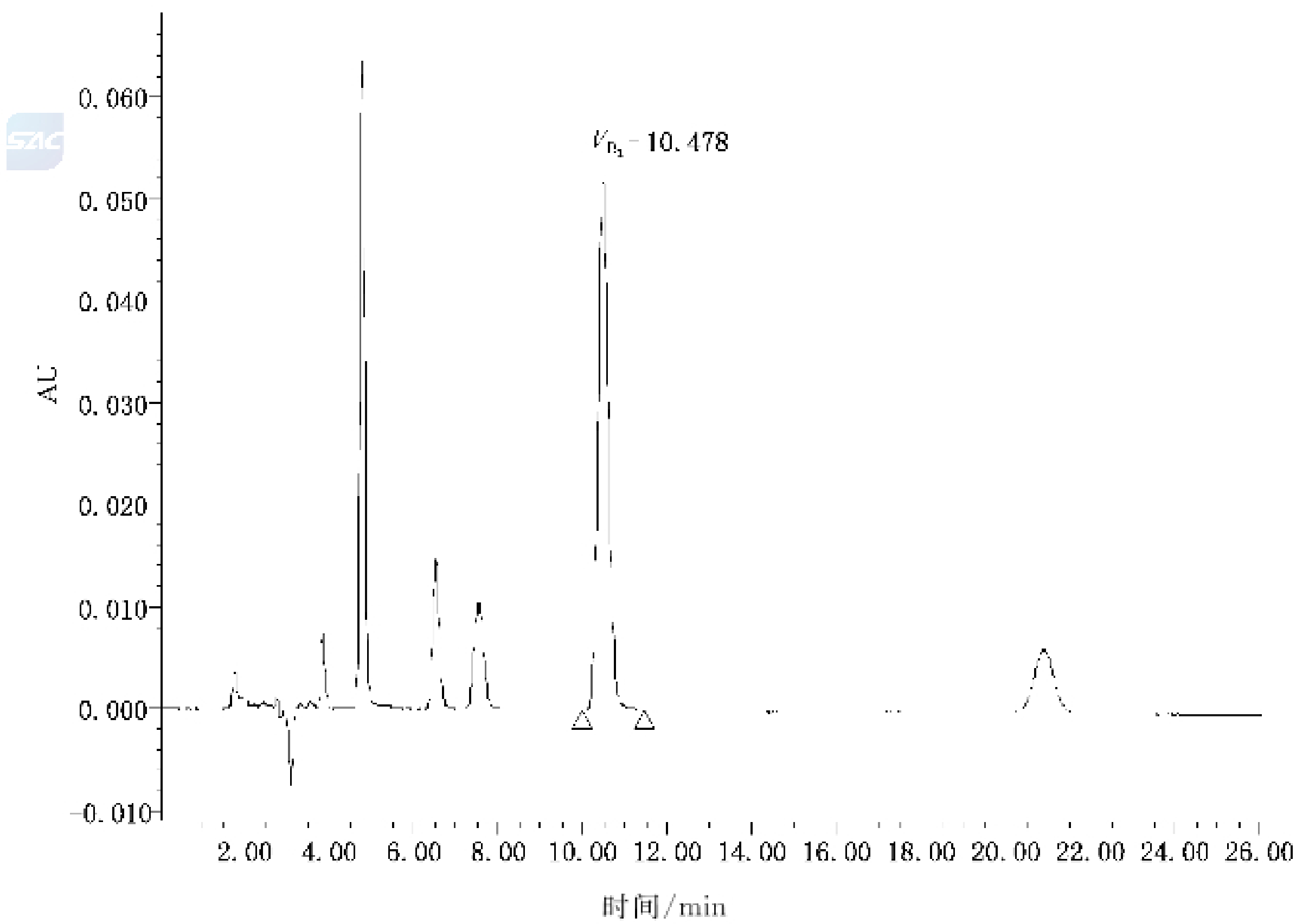


图 A.1 22 μg/mL 维生素 B₁ 标准色谱图(在 6 种水溶性维生素混合标准品中)

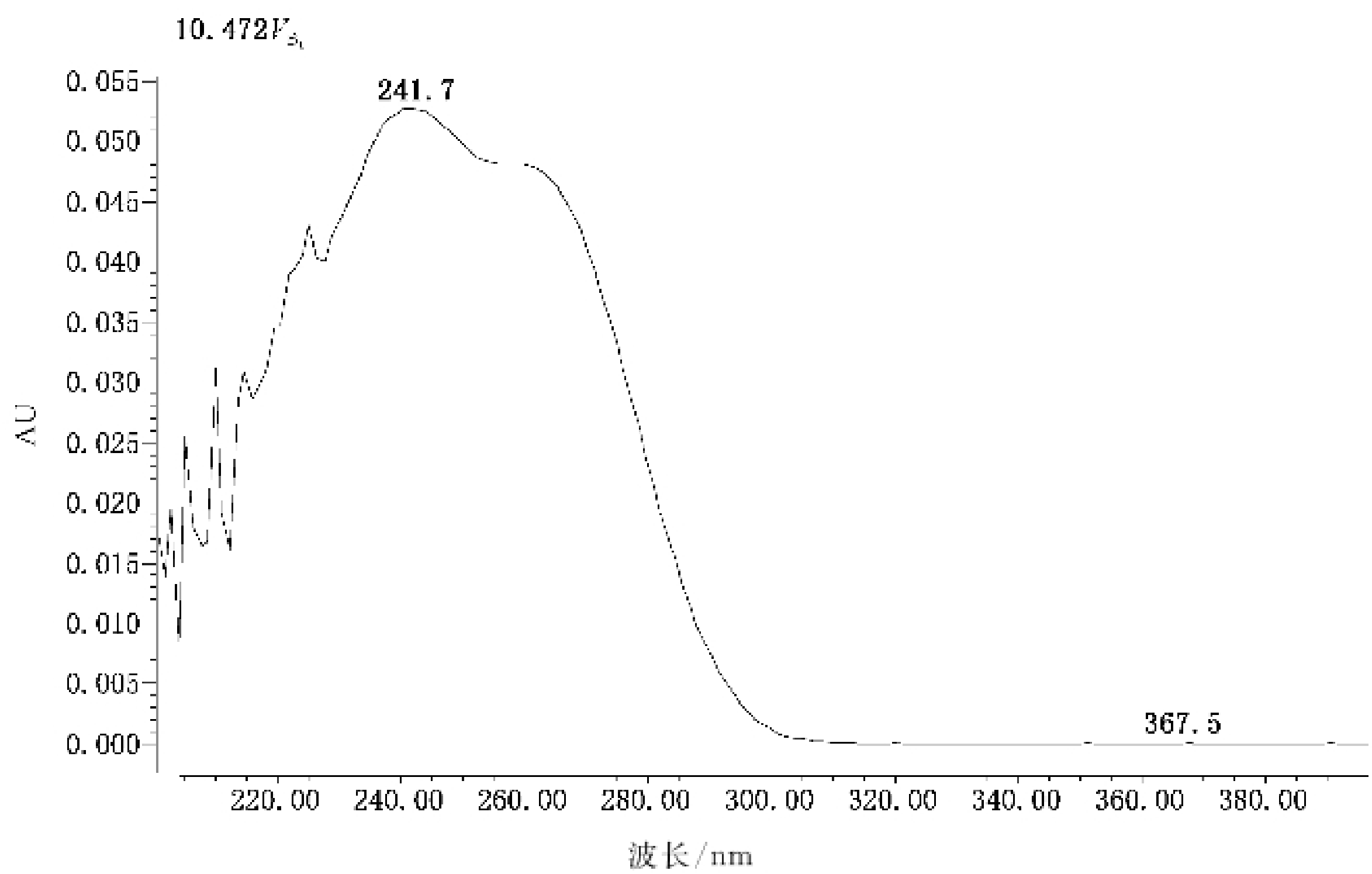


图 A.2 维生素 B₁ 标准光谱图