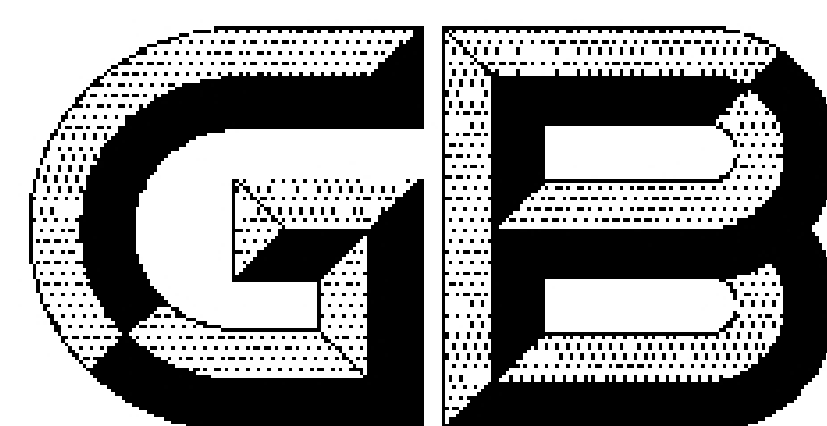




中华人民共和国国家标准

GB/T 14702—2018
代替 GB/T 14702—2002

添加剂预混合饲料中维生素 B₆ 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin B₆ in premix—
High performance liquid chromatograph

2018-09-17 发布

2019-04-01 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 14702—2002《饲料中维生素 B₆ 的测定 高效液相色谱法》。

本标准与 GB/T 14702—2002 相比,主要技术内容修改如下:

- 标准名称由《饲料中维生素 B₆ 的测定 高效液相色谱法》改为《添加剂预混合饲料中维生素 B₆ 的测定 高效液相色谱法》;
- 增加了高效液相色谱-荧光检测器的色谱条件(见第 7 章,2002 年版的 7.2.2);
- 增加了维生素 B₆ 液相色谱-紫外检测器色谱条件下以及液相色谱-荧光检测器色谱条件下的标准色谱图(见附录 A 中图 A.1 和图 A.2)。

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、索德成、魏书林。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 14702—1993、GB/T 14702—2002。



添加剂预混合饲料中维生素 B₆ 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 B₆ (盐酸吡哆醇) 测定的高效液相色谱法。
本标准适用于维生素预混合饲料和复合预混合饲料中维生素 B₆ 的测定。
紫外检测器色谱条件下的定量限为 30 mg/kg; 荧光检测器色谱条件下的定量限为 10 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 B₆ 经酸性提取液超声提取后, 注入高效液相色谱仪反相色谱系统中进行分离, 用紫外检测器(二极管矩阵检测器)或者荧光检测器检测, 外标法计算维生素 B₆ 的含量。

4 试剂或溶液

除特殊说明外, 所用试剂均为分析纯, 水为蒸馏水, 色谱用水为去离子水, 符合 GB/T 6682 中一级用水规定。

- 4.1 二水合乙二胺四乙酸二钠(EDTA): 优级纯。
- 4.2 庚烷磺酸钠(PICB₇): 优级纯。
- 4.3 冰乙酸: 优级纯。
- 4.4 三乙胺: 优级纯。
- 4.5 甲醇: 色谱纯。
- 4.6 盐酸溶液: 取 8.5 mL 盐酸, 用水定容至 1 000 mL。
- 4.7 磷酸二氢钠溶液: 3.9 g 磷酸二氢钠溶于 1 000 mL 超纯水中, 过 0.45 μm 水系滤膜。
- 4.8 提取剂: 在 1 000 mL 容量瓶中, 称 50 mg(精确至 0.001 g) EDTA(4.1)、依次加入 700 mL 去离子水, 超声使 EDTA 完全溶解。加入 25 mL 冰乙酸(4.3)、5 mL 三乙胺(4.4), 用去离子水定容至刻度, 摇匀。取该溶液 800 mL 与 200 mL 甲醇混合, 超声脱气, 待用。
- 4.9 流动相: 在 1 000 mL 容量瓶中, 称 50 mg(精确至 0.001 g) EDTA(4.1)、1.1 g(精确至 0.001 g) 庚烷磺酸钠(4.2), 依次加入 700 mL 去离子水, 25 mL 冰乙酸(4.3)、5 mL 三乙胺(4.4), 用去离子水定容至刻度, 摇匀。用冰乙酸、三乙胺调节该溶液 pH 至 3.70±0.10, 过 0.45 μm 滤膜。取该溶液 800 mL 与 200 mL 甲醇(4.5)混合, 超声脱气, 备用。

4.10 维生素 B₆ 标准溶液

4.10.1 维生素 B₆ 标准贮备液:准确称取维生素 B₆ (维生素 B₆ 纯度大于 98%) 0.05 g (精确至 0.000 1 g) 于 100 mL 棕色容量瓶中,加盐酸溶液(4.6)约 70 mL,超声 5 min,待全部溶解后,用盐酸溶液(4.6)定容至刻度。此溶液中维生素 B₆ 浓度为 500 μg/mL,2 °C~8 °C 冰箱避光保存,可使用 3 个月。

4.10.2 维生素 B₆ 标准工作液 A:准确吸取 2.00 mL 维生素 B₆ 标准贮备液(4.10.1)于 50 mL 棕色容量瓶中,用磷酸二氢钠溶液(4.7)定容至刻度。该标准工作液中维生素 B₆ 浓度为 20 μg/mL,2 °C~8 °C 冰箱避光保存,可使用一周。

4.10.3 维生素 B₆ 标准工作液 B:准确吸取 5.00 mL 维生素 B₆ 标准工作液 A(4.10.2)于 50 mL 棕色容量瓶中,用磷酸二氢钠溶液(4.7)定容至刻度。该标准工作液中维生素 B₆ 浓度为 2.0 μg/mL,上机测定前制备,可使用 48 h。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器(二极管矩阵检测器)或荧光检测器。

5.2 pH 计(带温控,精度为 0.01)。

5.3 超声波提取器。

5.4 针头过滤器:备 0.45 μm 水系滤膜。

6 试样制备

按 GB/T 14699.1 的规定,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,磨碎,通过 0.425 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

7 试验步骤

以下操作应避免强光照射。

7.1 试样溶液的制备

称取维生素预混合饲料试样 0.25 g~0.5 g (精确至 0.000 1 g);复合预混合饲料试样 2 g~3 g (精确至 0.000 1 g),于 100 mL 棕色容量瓶中,加入 70 mL 磷酸二氢钠溶液(4.7)在超声波提取器(5.3)中超声提取 20 min (中间旋摇一次以防样品附着于瓶底),待温度降至室温后用提取剂定容至刻度,过滤(若滤液浑浊则需 5 000 r/min 离心 5 min)。溶液过 0.45 μm 滤膜(5.4),其中维生素 B₆ 浓度约为 2.0 μg/mL~100 μg/mL,待上机。

7.2 测定

7.2.1 高效液相色谱参考条件 I

色谱柱:C₁₈,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm,或性能相当的 C₁₈ 柱。

流动相:见 4.9。

流速:1.0 mL/min。

柱温:25 °C~28 °C

进样体积:10 μL~20 μL。

检测器:紫外或二极管矩阵检测器,检测波长 290 nm。

7.2.2 高效液相色谱参考条件Ⅱ

色谱柱:C₁₈,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm,或性能相当的 C₁₈柱。
流动相:A:磷酸二氢钠溶液(4.7),B:甲醇。梯度淋洗程序参见表 1。

表 1 梯度淋洗程序

时间/min	磷酸二氢钠溶液(A)/%	甲醇(B)/%
0.00	99.0	1.0
3.00	88.0	12.0
6.50	70.0	30.0
12.00	70.0	30.0
12.10	99.0	1.0
18.00	99.0	1.0

流速:1.0 mL/min。
柱温:25 ℃~28 ℃。
进样体积:10 μL~20 μL。
检测器:荧光检测器,激发波长 293 nm;发射波长 395 nm。

7.2.3 定量测定

根据所测样品维生素 B₆ 的含量向色谱仪注入工作液 A(4.10.2)或工作液 B(4.10.3)及试样溶液(7.1),得到色谱峰面积的响应值,用外标法定量计算。维生素 B₆ 荧光检测器色谱图参见附录 A。

8 试验数据处理

试样中维生素 B₆ (盐酸吡多醇)的含量,以质量分数 ω 计,单位以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算

$$\omega = \frac{A_i \times V \times c \times V_{sti}}{A_{sti} \times m \times V_i}$$

.....(1)

式中:
 A_i ——试样溶液峰面积值;
 V ——试样稀释体积,单位为毫升(mL);
 c ——标准溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μL);
 V_{sti} ——标准溶液进样体积,单位为微升(μL);
 A_{sti} ——标准溶液峰面积平均值。
 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,结果保留三位有效数字。

9 精密度

对于维生素 B₆ 含量大于或者等于 500 mg/kg 的饲料,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 5%。

对于维生素 B₆ 含量小于 500 mg/kg 的饲料,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 B₆ 标准色谱图

液相色谱-紫外检测器色谱条件下维生素 B₆ 标准色谱图见图 A.1;液相色谱-荧光检测器色谱条件下维生素 B₆ 标准色谱图见图 A.2。

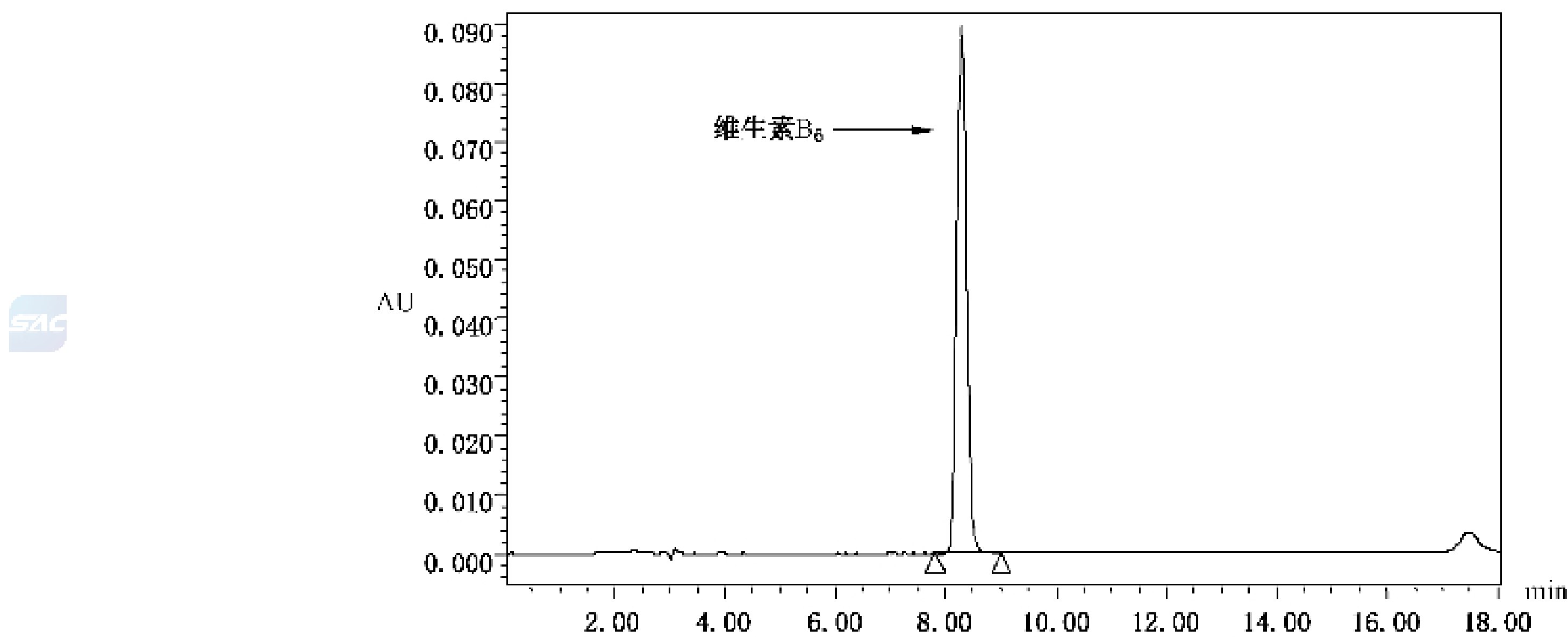


图 A.1 液相色谱-紫外检测器色谱条件下维生素 B₆ 标准色谱图(维生素 B₆ 浓度为 10 μg/mL)

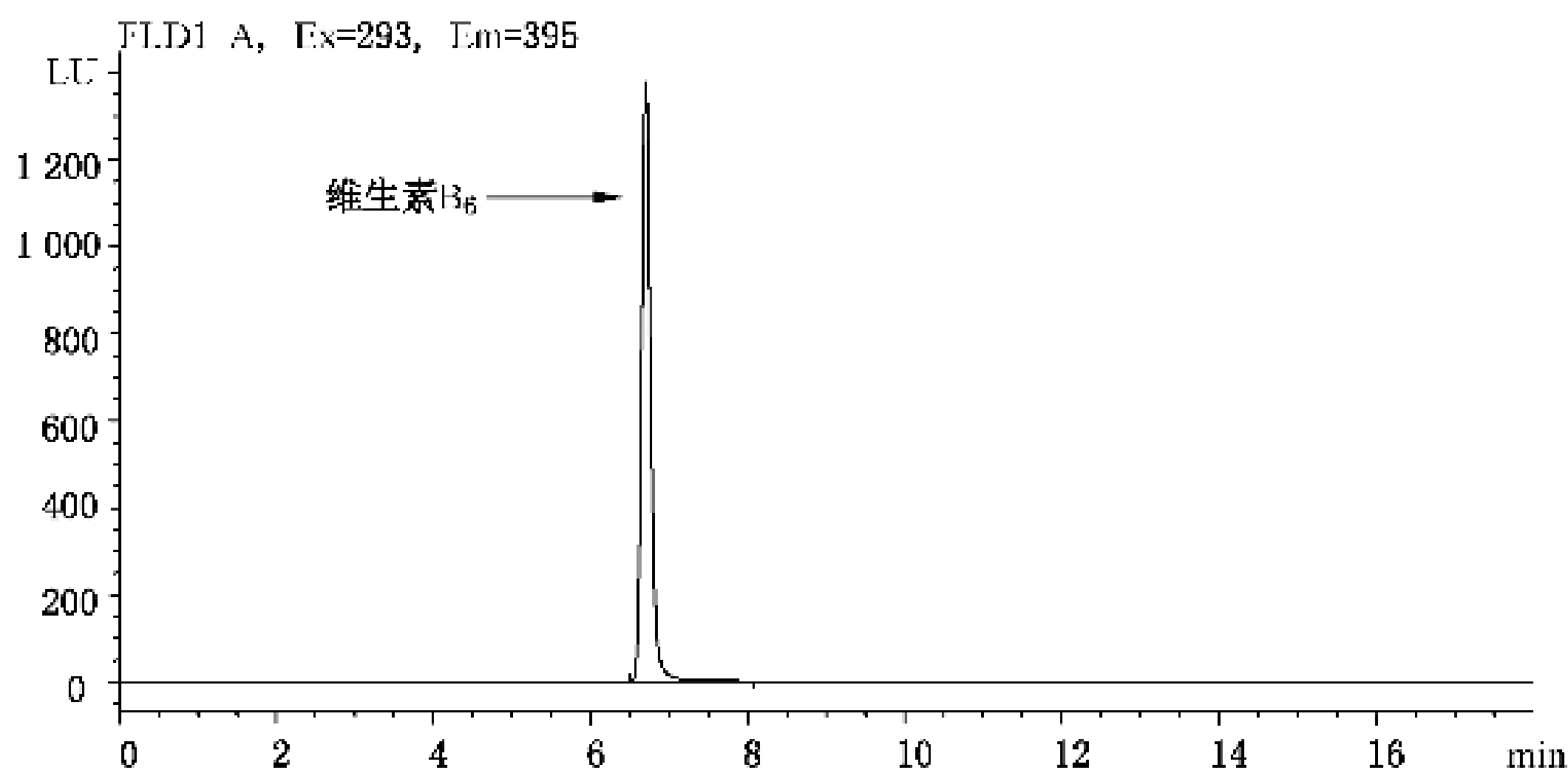


图 A.2 液相色谱-荧光检测器色谱条件下维生素 B₆ 标准色谱图(维生素 B₆ 浓度为 18 μg/mL)