

ICS 65.120
B 46



中华人民共和国国家标准

GB/T 14700—2002
代替 GB/T 14700—1993

饲料中维生素 B₁ 的测定

Determination of vitamin B₁ in feeds

2002-10-31 发布

2003-04-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准修订了 GB/T 14700—1993《饲料中维生素 B₁ 的测定》，修订后的方法具有适用范围广、检测限低、高效、快捷、准确的特点。本标准参考了美国“化学分析协会”第六十七期发表的《复合预混合饲料中抗坏血酸、烟酰胺、吡哆醇、硫胺素及核黄素的液相色谱分析方法》和美国公职分析化学家协会（1990 版）《食物和维生素制品中的硫胺素荧光测定法》而制定。

本标准与 GB/T 14700—1993 的主要技术差异：本标准规定了两种方法，方法 1 为荧光分光光度法，保留 GB/T 14700—1993 的全部内容；在范围中补充了复合预混合饲料；将重复性允许差“相对相差”改为“相对偏差”；方法 2 为高效液相色谱法，确定了试样的提取条件、色谱条件及重复性要求，并确定了该法适用于维生素 B₁ 含量大于 20 mg/kg 的复合预混合饲料及维生素预混合饲料。

本标准规定了荧光分光光度法为仲裁法。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：国家饲料质量监督检验中心（北京）。

本标准主要起草人：李兰、陈必芳、索德成。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：GB/T 14700—1993。

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仪和高效液相色谱仪测定饲料中维生素 B₁ (硫胺素) 含量的两种方法。

本标准规定的方法 1 适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料中的维生素 B₁ 的测定。萃取液的溶液范围为 0.02 μg/mL~0.2 μg/mL (在有吸附硫胺素或影响硫胺素荧光干扰物质存在的情况, 本方法不适用)。

本标准规定的方法 2 适用于维生素 B₁ 含量大的配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件, 其随后所有的修改单 (不包括勘误的内容) 或修订版均不适用于本标准。然而, 鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是未注日期的引用文件, 其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682—2002 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699—2005 饲料采样方法

3 方法 1: 荧光分光光度法 (仲裁法)

3.1 原理

试样中的维生素 B₁ (即硫胺素, $C_{12}H_{17}ON_4S_2$) 经稀酸消化、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 试剂和溶液

除非另有说明, 所用试剂均为分析纯的试剂, 水为蒸馏水, 符合 GB/T 6682 中 3 级用水或相当纯度的水。

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

$c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 2.0 \text{ mol/L}$: 取 164 g 无水乙酸钠或 272 g 结晶乙酸钠 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 溶于水, 稀释至 1 000 mL。

3.2.4 淀粉酶悬浮液

100 g/L: 用乙酸钠溶液 (3.2.3) 悬浮 10 g 淀粉酶制剂 (活性 1:250, Takadiastase, 或相当活性的其他磷酸酯酶), 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

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($V_1 \rightarrow V_2$)。

3.2.11 人造沸石

60 目~80 目,使用前应活化,方法如下:将适量人造石置于大烧杯中,加入 10 倍容积的热乙酸溶液(3.2.10),用玻璃棒均匀搅动 10 min,使沸石在乙酸溶液中悬浮,待沸石沉降后,弃去上层乙酸液,重复上述操作两次。换用 5 倍其容积的热氯化钾溶液(3.2.5)搅动清洗两次,每次 15 min。再用热乙酸溶液洗 10 min。最后用热蒸馏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,100℃烘干,贮于磨口瓶中备用。

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%,须重新活化沸石。

3.2.12 维生素 B₁ 标准溶液

3.2.12.1 维生素 B₁ 贮备液 I:盐酸硫胺素纯品(中国药典参照标准),于五氧化二磷干燥器中干燥 24 h,称取 0.050 0 g,溶解于 pH3.5~4.3 的 20%($V_1 \rightarrow V_2$)乙醇溶液中并定容至 500 mL,盛于棕色瓶中 4℃冰箱保存,保存期 3 个月。该溶液含 0.1 mg/mL 维生素 B₁。

3.2.12.2 维生素 B₁ 贮备液 II:取维生素 B₁ 贮备液 I(3.2.12.1)10 mL 用酸性 20%乙醇溶液定容至 100 mL,盛于棕色瓶中 4℃冰箱保存,保存期 1 个月。该溶液含 10 μg/mL 维生素 B₁。

3.2.12.3 维生素 B₁ 标准工作液:取贮备液 II(3.2.12.2)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,用水定容至 100 mL,现用现配。该溶液含 0.2 μg/mL 维生素 B₁。

3.2.13 硫酸奎宁溶液

3.2.13.1 硫酸奎宁贮备液:称取硫酸奎宁 0.100 0 g,用硫酸(3.2.2)溶解并定容至 1 000 mL。贮于棕色瓶中冰箱 4℃保存。若溶液混浊则需重新配制。

3.2.13.2 硫酸奎宁工作液:取贮备液(3.2.13.1)3 mL,用硫酸(3.2.2)定容至 1 000 mL。贮于棕色瓶中,冰箱 4℃保存。该溶液含 0.3 μg/mL 硫酸奎宁。

3.2.14 正丁醇

其荧光强度不超过硫酸奎宁工作液的 4%,否则需用全玻璃蒸馏器重蒸馏,取 114℃~118℃馏份。

3.2.15 无水硫酸钠

3.3 仪器、设备

3.3.1 荧光分光光度计,备 1 cm 石英比色杯。

3.3.2 电热恒温水浴。

3.3.3 电热恒温箱。

3.3.4 实验室用样品粉碎机。

3.3.5 分析天平:感量 0.000 1 g。

3.3.6 注射器:10 mL。

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

3.3.8 反应瓶,具塞离心管 25 mL。

3.4 试样的制备

按 GB/T 14699.1 饲料采样方法采样,选取有代表性的饲料样品,至少 500 g,四分法缩减至 100 g,磨碎,通过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

3.5 分析步骤

3.5.1 称样

称取原料、配合饲料、浓缩饲料或复合预混合饲料 1 g~2 g(约含维生素 B₁ 4 μg~20 μg),精确至 0.001 g;维生素预混合饲料称取 0.25 g~0.50 g,精确至 0.000 1 g,置于 100 mL 容量瓶中。

3.5.2 试样溶液的制备

3.5.2.1 水解:将盐酸(3.2.1)65 mL 加入盛有试样(3.5.1)容量瓶中,经沸水浴加热 30 min(或于 121℃~123℃ 15 kg 高压釜中加热 30 min),开始加热 5 min~10 min 内不时摇动容量瓶,以防结块。

3.5.2.2 酶解¹⁾,冷却容量瓶至 50℃ 以下,加 5 mL 淀粉酶悬浮液(3.2.4),摇匀。该试液的 pH 约为 4.0~4.5,将容量瓶于 45℃~50℃ 恒温箱中保温 3 h,取出冷却调整 pH 至 3.5,用水稀释至 100 mL。

3.5.2.3 过滤:将试液通过无灰滤纸过滤弃去初滤液 5 mL,收集滤液于锥形瓶中。预混料提取液需逐级稀释,使之含维生素 B₁ 约为 0.2 μg/mL,作为试样溶液。

3.5.3 试样溶液的提纯

3.5.3.1 制备吸附柱:取 1.5 g 活化人造沸石(3.2.11)置于 50 mL 小烧杯中,加入 3% 乙酸溶液(3.2.10)浸泡。将脱脂棉置于吸附柱底部,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),过柱流速小于等于 1 mL/min 为宜。再用 10 mL 近沸的水洗柱一次。

3.5.3.2 吸 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 近沸的水洗柱三次,弃去洗液。

3.5.3.3 用 25 mL 60℃~70℃ 酸性氯化钾(3.2.6)分三次连续加入吸附柱,收集洗脱液于 25 mL 容量瓶中,冷却后用酸性氯化钾定容,混匀。

3.5.3.4 同时用 25 mL 维生素 B₁ 标准工作液(3.2.12.3)。重复 3.5.3.1~3.5.3.3 操作,作为外标。

3.5.4 氧化与萃取

注意:以下操作避光进行。

3.5.4.1 于两只反应管中各吸入 5 mL 洗脱液(3.5.3.3),记作 A、B。

3.5.4.2 向 B 管加 3 mL 氢氧化钠溶液(3.2.7),再向 A 管中加 3 mL 氧化剂碱性铁氰化钾溶液(3.2.9),轻轻旋摇。依次立即向 A 管加入 15 mL 正丁醇(3.2.14)加塞,剧烈地振摇 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 用注射器吸去下层水相,向各反应管加入约 2 g 无水硫酸钠(3.2.15),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),置入另两只反应管,相应地记作 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(3.2.13.2)调整荧光仪,使其稳定于一定数值,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 处测定各反应管中萃取液(3.5.4.3)和(3.5.4.4)的荧光强度。

3.6 结果计算

3.6.1 计算公式:试样中维生素 B₁ 含量按式(1)计算:

$$\omega_1 = \frac{T_1 - T_2}{T_3 - T_4} \times c \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{V_0}{m} \dots\dots\dots (1)$$

1) 测定预混合饲料时,可省略酶解。

式中：

- ω_1 ——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;
- c ——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)。

3.6.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留有效数字 2 位。

3.7 重复性

同一分析者对同一试样同时或快速连续进行两次测定,所得结果的相对偏差:

维生素 B ₂ 含量/(mg/kg)	相对偏差
≤ 1.0	± 15
≥ 5.0	± 10
≥ 50	± 5

4 方法 2: 高效液相色谱法

4.1 原理

试样中维生素 B₁ 经酸性提取液超声提取后,将过滤离心后的试样溶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 试剂和溶液

除特殊说明外,所用试剂均为分析纯,均为蒸馏水,色谱用水为去离子水,符合 GB/T 6682 中 1 级用水规定。

4.2.1 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)

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 乙醇溶液

25%($V_1 \rightarrow V_2$)。

4.2.7 提取液

在已装入约 700 mL 去离子水的 1 000 mL 容量瓶中,加入 50 mg EDTA(4.2.1)待全部溶解后,加入 25 mL 冰乙酸(4.2.3)、5 mL 三乙胺(4.2.4),用去离子水定容至刻度摇匀。取 860 mL 上述溶液与 140 mL 甲醇(4.2.5)混合即得。

4.2.8 流动相

在已装入约 700 mL 去离子水的 1 000 mL 容量瓶中,加入 50 mg EDTA(4.2.1)精确至 0.001 g, 1.1 g 庚烷磺酸钠(4.2.2)精确至 0.001 g,待全部溶解后加入 25 mL 冰乙酸(4.2.3)、5 mL 三乙胺(4.2.4),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 3.40 ± 0.02 ,过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜。取该溶液 860 mL 与 140 mL 甲醇(4.2.5)混合,超声脱气,待用。

4.2.9 维生素 B₁ 标准溶液

4.2.9.1 维生素 B₁ 标准贮备液:准确称取维生素 B₁ 0.050 0 g 于 100 mL 棕色容量瓶中,加乙醇溶液(4.2.6)超声 15 min,待全部溶解后,用乙醇溶液定容至刻度。此溶液浓度为 $500 \mu\text{g/mL}$,置 4℃ 冰箱保存,保存期 3 个月。

4.2.9.2 维生素 B₁ 标准工作液 A:准确吸取 2.00 mL 维生素 B₁ 标准贮备液 A(4.2.9.1)于 50 mL 棕色容量瓶中,用流动相(4.2.8)定容至刻度,该标准工作液浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ 。

4.2.9.3 维生素 B₁ 标准工作液 B:准确吸取 5.00 mL 维生素 B₁ 标准工作液 A(4.2.9.2)于 50 mL 棕色容量瓶中,用流动相(4.2.8)定容至刻度,该标准工作液浓度为 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 。

注:维生素 B₁ 标准工作液 A 和 B 需单独配制,并置于冰箱中保存,且:与其他维生素配制混合标准时在 4℃ 冰箱中最多保存两天。

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,精确至 0.01)。

4.3.3 超声波提取器。

4.3.4 针头过滤器(各 $0.45 \mu\text{m}$ (或 $0.2 \mu\text{m}$))。

4.3.5 高效液相色谱仪(带紫外或二极管阵列检测器)。

4.4 试样的制备

按 GB/T 14699.1 采样,选取有代表性的饲料样品至少 500 g,四分法缩减至 100 g,磨碎,全部通过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

4.5 分析步骤

注意:以下操作避光进行。

4.5.1 试样溶液的制备

称取维生素预混合饲料 $0.25 \text{ g} \sim 0.50 \text{ g}$,精确至 $0.000 1 \text{ g}$;称取预混合饲料 $1 \text{ g} \sim 3 \text{ g}$,精确至 0.001 g ,置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入三分之二体积的提取液(4.2.7),在超声波提取器(4.3.3)中超声提取 20 min(中间旋摇一次以防样品附着瓶底),待温度降至室温后用提取液定容至刻度,过滤,滤液过 $0.45 \mu\text{m}$ (或 $0.2 \mu\text{m}$)滤膜,待上机。

4.5.2 测定

4.5.2.1 高效液相色谱条件

色谱柱:长 150 mm,内径 3.9 mm,不锈钢柱。

固定相:NoVa-pak C₁₈,粒度 $4 \mu\text{m}$,或相当的 C₁₈ 柱。

流动相流速: 0.80 mL/min 。

温度: $25^\circ\text{C} \sim 28^\circ\text{C}$ 。

进样体积: $10 \mu\text{L}$ 。

检测器:紫外或二极管矩阵检测器,使用波长:多种维生素联检为 280 nm,单检维生素 B₁ 为 246 nm。

保留时间:约 7 min~8 min。

4.5.2.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数。根据所测样品中维生素 B₁ 的含量向色谱柱注入标准工作液 A(4.2.9.2)或 B(4.2.9.3)及试样溶液(4.5.1),得到色谱峰面积的响应值,取标准溶液峰面积

的平均值定量计算。

标准工作液应在分析始末分别进样,在样品多时,分析中间应插入标准工作液校正出峰时间。

4.6 结果计算

4.6.1 试样中维生素 B₁ 含量按式(2)计算:

$$\omega_1 = \frac{P_i \times V \times c_i \times V_{st}}{\overline{P_{st}} \times m \times V_i} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

ω_1 ——试样中维生素 B₁ 的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

m ——试样质量,单位为克(g);

V_i ——试样溶液进样体积,单位为微升(μ L);

P_i ——试样溶液峰面积值;

c_i ——标准溶液浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);

V_{st} ——标准溶液进样体积,单位为微升(μ L);

$\overline{P_{st}}$ ——标准溶液峰面积平均值。

4.6.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留有效数字 3 位。

4.7 重复性

同一分析者对同一试样同时两次测定所得结果的相对偏差:

维生素 B ₁ 含量/(mg/kg)	相对偏差/(%)
$\geq 5.00 \times 10^2$	$\leq \pm 5.0$
$< 5.00 \times 10^2$	$\leq \pm 10.0$
