



中华人民共和国国家标准

GB/T 14701—2002
代替 GB/T 14701—1993

饲料中维生素 B₂ 的测定

Determination of vitamin B₂ 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 14701—1993《饲料中维生素 B₂ 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核黄素荧光测定法》而制定。

本标准与 GB/T 14701—1993 的主要技术差异：标准规定了两种方法，方法 1 为荧光分光光度法，保留 GB/T 14701—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 B₂ 含量大于 10 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。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：GB/T 14701—1993。

饲料中维生素 B₂ 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 B₂ 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 B₂ 的测定。待测液中维生素 B₂ 检测浓度为 0.05 μg/mL~0.2 μg/mL。

本标准规定的方法 2 适用于维生素 B₂ 含量大于 10 mg/kg 的复合预混合饲料、维生素预混合饲料中维生素 B₂ 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。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料采样方法

3 方法 1: 荧光分光光度法(仲裁法)

3.1 原理

维生素 B₂ (即核黄素 C₁₇H₂₀N₄O₆) 在 440 nm 紫外光激发下产生绿色荧光,在一定浓度范围内其荧光强度与核黄素含量成正比。用连二亚硫酸钠还原核黄素成无荧光物质,由还原前后荧光强度之差与内标荧光强度的比值计算样品核黄素的含量。

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 氢氧化钠溶液, $c(\text{NaOH})=0.05 \text{ mol/L}$ 。

3.2.2 氢氧化钠溶液, $c(\text{NaOH})=1.0 \text{ mol/L}$ 。

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

3.2.4 盐酸溶液, $c(\text{HCl})=1.0 \text{ mol/L}$ 。

3.2.5 连二亚硫酸钠(Na₂S₂O₄) (保险粉),防止吸潮。

3.2.6 高锰酸钾溶液, 40 g/L。

3.2.7 冰乙酸。

3.2.8 冰乙酸溶液, $c(\text{CH}_3\text{COOH})=0.02 \text{ mol/L}$: 将 1.8 mL 冰乙酸用水稀释至 1 000 mL。

3.2.9 过氧化氢溶液, 100 mL/L, 现用现配。

3.2.10 维生素 B₂ 标准溶液:

3.2.10.1 维生素 B₂ 储备液 I: 核黄素纯品(中国药典参照标准)于五氧化二磷干燥器中干燥 24 h, 溶解于冰乙酸溶液(3.2.8)中, 在蒸气浴上恒速搅动直至溶解, 冷却后稀释至 500 mL。盛入棕色瓶滴加甲苯覆盖, 冰箱 4℃ 保存, 保存期 6 个月。该溶液含 0.1 mg/mL 维生素 B₂。

3.2.10.2 维生素 B₂ 贮备液 II: 取维生素 B₂ 贮备液 I (3.2.10.1) 10 mL 用冰乙酸溶液(3.2.8)稀释至 100 mL, 盛于棕色瓶中滴加甲苯覆盖, 冰箱 4℃ 保存, 保存期 3 个月, 该溶液中含 10 μg/mL 维生素 B₂。

3.2.10.3 维生素 B₂ 标准工作液:取维生素 B₂ 贮备液 I (3.2.10.2)10 mL,用水稀释至 100 mL,现用现配。该溶液中含 1 μg/mL 维生素 B₂。

3.2.11 荧光素标准溶液:

3.2.11.1 荧光素贮备液:称取荧光素 0.050 g,用水稀释至 1 000 mL,盛于棕色瓶中冰箱 4℃ 保存。该溶液中含 50 μg/mL 荧光素。

3.2.11.2 荧光素标准工作液:取 1 mL 荧光素贮备液(3.2.11.1),用水定容至 1 000 mL,盛入棕色瓶中,低温保存。该溶液每毫升中含 0.05 μg 荧光素。

3.2.12 溴甲酚绿 pH 指示剂

取溴甲酚绿 0.1 g,加氢氧化钠溶液(3.2.1)2.8 mL 使之溶解,再加水稀释至 200 mL。变色范围 pH3.6~5.2。

3.3 仪器、设备

3.3.1 荧光分光光度计。

3.3.2 分析天平:感量 0.0001 g。

3.3.3 电热恒温水浴。

3.3.4 具塞玻璃刻度试管,15 mL。

3.4 试样的制备

按 GB/T 14699.1 采样,选取具有代表性的样品至少 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

注意:全部操作避光进行。

3.5.1 称样

原料、配合饲料、浓缩饲料、复合预混合饲料称取 1 g~2 g,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 0.0001 g,将试样置于 100 mL 容量瓶中。

3.5.2 试样溶液的制备

向盛试样的容量瓶中加入 65 mL 盐酸溶液(3.2.3),于沸水浴中加热 30 min(或于 121℃~123℃ 15 kg 高压釜中加热 30 min),开始加热 5 min~10 min 时常摇动容量瓶,以防试样结块。冷却至室温后,用氢氧化钠溶液(3.2.2)调节 pH 至 6.0~6.5,然后立即加稀盐酸溶液(3.2.4)使 pH 值约为 4.5(溴甲酚绿指示剂变为草绿色)。用水稀释至刻度。通过中速无灰滤纸过滤,弃去最初 5 mL~10 mL 溶液,收集滤液于 100 mL 锥形瓶中。取整份清液,滴加稀盐酸检查蛋白质,如有沉淀生成,继续加氢氧化钠溶液,剧烈振摇,使之沉淀完全。对高含量样品,取整份的澄清液,用水稀释至一定体积使维生素 B₂ 约为 0.1 μg/mL。

3.5.3 杂质氧化

于 a、b、c 三支 15 mL 刻度试管(3.3.4)中各吸入试样溶液(3.5.2)10 mL,同时做平行,向试管 a 中加入 1 mL 蒸馏水,向试管 b 中加入 1 mL 维生素 B₂ 工作液(3.2.10.3)。然后各加入冰乙酸(3.2.7)1 mL,旋摇混匀后逐个加高锰酸钾溶液(3.2.6)0.5 mL,旋摇混匀,静置 2 min,再逐个加入过氧化氢溶液(3.2.9)0.5 mL 旋摇,使高锰酸钾颜色在 10 s 内消退。加盖摇动,使试管中的气体逸尽。

3.5.4 测定

用荧光素(3.2.11.2)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。调整激发波长 440 nm,测定试管 a、b 的荧光强度,试样溶液在仪器中受激发照射不超过 10 s。在试管 c 中加入 20 mg 连二亚硫酸钠(3.2.5),摇动溶解,并使试管中的气体逸出,迅速测定其荧光强度作为空白。若溶液出现浑浊,不能读数。

3.6 结果计算

3.6.1 计算公式:试样中维生素 B₂ 含量按式(1)计算:

$$\omega_1 = \frac{T_1 - T_3}{T_2 - T_1} \times \frac{m_0}{m} \times \frac{V}{V_1} \times n \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

ω_1 ——试样中维生素 B₂ 含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

T_1 ——试管 a(试液加水)的荧光强度;

T_2 ——试管 b(试液加标样)的荧光强度;

T_3 ——试管 c(试液加连二亚硫酸钠)的荧光强度;

m_0 ——加入维生素 B₂ 标样的量,单位为微克(μ g);

V ——试液的初始体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——测定时分取试液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

n ——稀释倍数。

$\frac{T_1 - T_3}{T_2 - T_1}$ 值应在 0.66~1.5,否则需调整样液的浓度。

3.6.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留有效数字 3 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/(%)
≤5.0	≤±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 B₂ 经酸性提取液在 80℃~100℃ 水浴煮沸提取后,经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 B₂ 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,水为蒸馏水,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)。

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 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。

4.2.7 流动相:在已装入约 700 mL 去离子水的 1 000 mL 容量瓶中,称入 50 mg(精确至 0.001 g)EDTA(4.2.1)、1.1 g(精确至 0.001 g)庚烷磺酸钠(4.2.2),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 μ 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。

4.2.8 维生素 B₂ 标准溶液

4.2.8.1 维生素 B₂ 标准贮备液:准确称取维生素 B₂ 0.010 0 g 于 200 mL 棕色容量瓶中,加 1 mL 冰乙

酸(4.3)在沸水浴 80℃~100℃煮沸 30 min,待冷至室温后,用去离子水定容至刻度。此溶液浓度为 50 μg/mL,冰箱 4℃避光保存,保存期 6 个月。

4.2.8.2 维生素 B₂ 标准工作液:准确吸取 5.0 mL 维生素 B₂ 标准贮备液(4.2.8.1)于 50 mL 棕色容量瓶中,用流动相(4.2.7)定容至刻度。该标准工作液浓度为 5 μg/mL,待上机。

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 恒温水浴,0℃~100℃。
- 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 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:全部操作避光进行。

4.5.1 试样溶液的制备

称取维生素预混合饲料 0.25 g(或 50 g,精确至 0.000 1 g;复合预混合饲料 1 g~5 g,精确至 0.001 g,于 100 mL 棕色容量瓶中,加入三分之一体积的提取液(4.2.6)于 80℃~100℃水浴中煮沸 30 min,待冷却后,加入 14 mL 甲醇(4.2.5),用提取液定容至刻度,混匀、过滤。维生素预混合饲料样液需由提取液进一步稀释 5 倍~10 倍,取部分滤液过 0.45 μm(或 0.2 μm)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:Novapak C₁₈,粒度 4 μm,或相当的固定相。

流动相流速:0.80 mL/min;

温度:25℃~30℃。

进样体积:10 μL。

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 B₂ 为 267 nm。

保留时间:约 10 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。向色谱柱注入维生素 B₂ 标准工作液(4.5.8.2)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 B₂ 的含量按式(2)计算:

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

式中:

ω_i——试样中维生素 B₂ 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(μL);

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($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V_{st} ——标准溶液进样体积,单位为微升(μL);

$\overline{P_{st}}$ ——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平均测定结果的相对偏差:

维生素 B ₂ 含量/(mg/kg)	相对偏差/(%)
$>1.00 \times 10^3$	$\leq \pm 5.0$
$10 \sim 1.00 \times 10^3$	$\leq \pm 10.0$
