

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 14701—2019  
代替 GB/T 14701—2002

---

## 饲料中维生素 B<sub>2</sub> 的测定

Determination of vitamin B<sub>2</sub> in feeds

2019-06-04 发布

2020-01-01 实施

国家市场监督管理总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 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 14701—2002《饲料中维生素 B<sub>2</sub> 的测定》。

本标准与 GB/T 14701—2002 相比,主要技术内容修改如下:

- 修改了方法 1、方法 2 适用范围以及检出限、定量限(见第 1 章,2002 年版的第 1 章);
- 规定了不同饲料类型的仲裁法(见第 1 章,2002 年版的第 1 章);
- 修改了样品的粉碎粒度(见第 3 章,2002 年版的第 3 章);
- 补充了维生素 B<sub>2</sub> 紫外检测色谱条件下和荧光检测色谱条件下的标准色谱图(见附录 A 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 14701—1993、GB/T 14701—2002。



## 饲料中维生素 B<sub>2</sub> 的测定

### 1 范围

本标准规定了饲料中维生素 B<sub>2</sub> (即核黄素 C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>10</sub>) 测定的荧光分光光度法和高效液相色谱法。

本标准方法 1 适用于动物性和植物性饲料原料、配合饲料、浓缩饲料中维生素 B<sub>2</sub> 的测定, 定量限为 0.25 mg/kg。

本标准方法 2 适用于维生素预混合饲料、复合预混合饲料、浓缩饲料中维生素 B<sub>2</sub> 的测定, 以荧光检测器检测时, 定量限为 5 mg/kg; 以紫外检测器检测时, 定量限为 10 mg/kg。

浓缩饲料中维生素 B<sub>2</sub> 的测定, 方法 1 为仲裁法; 维生素预混合饲料、添加剂预混合饲料中维生素 B<sub>2</sub> 的测定, 方法 2 中的高效液相色谱荧光检测器方法为仲裁法。

### 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

维生素 B<sub>2</sub> (核黄素) 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荧光强度的比值计算样品中维生素 B<sub>2</sub> 的含量。

#### 3.2 试剂或溶液

除非另有说明, 所用试剂均为分析纯试剂, 水为蒸馏水, 符合 GB/T 6682 中三级用水或相当纯度的水。

3.2.1 氢氧化钠溶液: 0.05 mol/L。

3.2.2 氢氧化钠溶液: 1.0 mol/L。

3.2.3 盐酸溶液: 0.1 mol/L。

3.2.4 盐酸溶液: 1.0 mol/L。

3.2.5 连二亚硫酸钠 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)。

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, 0.02 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, 分析当天制备。

3.2.10 维生素 B<sub>2</sub> 标准溶液

3.2.10.1 维生素 B<sub>2</sub> 贮备液 I:称取在五氧化二磷干燥器里干燥 24 h 的维生素 B<sub>2</sub> 标准品(纯度大于 95%)25 mg(精确至 0.000 1 g)于 250 mL 棕色锥形瓶中,加入约 200 mL 冰乙酸溶液(3.2.8),在沸水浴中煮沸直至溶解,冷却后转移至 250 mL 棕色容量瓶中,用冰乙酸溶液(3.2.8)稀释至刻度。滴加甲苯覆盖,2 °C~8 °C 冰箱保存,保存期 6 个月。该溶液含 0.1 mg/mL 维生素 B<sub>2</sub>。

3.2.10.2 维生素 B<sub>2</sub> 贮备液 II:取维生素 B<sub>2</sub> 贮备液 I(3.2.10.1)10 mL 用冰乙酸溶液(3.2.8)稀释至 100 mL,置于棕色容量瓶中滴加甲苯覆盖,2 °C~8 °C 冰箱保存,保存期 3 个月。该溶液中含 10 μg/mL 维生素 B<sub>2</sub>。

3.2.10.3 维生素 B<sub>2</sub> 标准工作液:取维生素 B<sub>2</sub> 贮备液 II(3.2.10.2)10 mL,用水稀释至 100 mL,分析前制备。该溶液中含 1 μg/mL 维生素 B<sub>2</sub>。

### 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,置于棕色瓶中 2 °C~8 °C 冰箱保存。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,置于棕色瓶中 2 °C~8 °C 冰箱保存。该溶液中含 0.05 μg/mL 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 溶解,再加水稀释至 200 mL。变色范围 pH 3.6~5.2。

## 3.3 仪器设备

3.3.1 分析天平:感量 0.000 1 g。

3.3.2 电热恒温水浴。

3.3.3 具塞玻璃刻度试管:15 mL。

3.3.4 荧光分光光度计。

## 3.4 试样制备

按 GB/T 14699.1 的规定,选取具有代表性的样品至少 500 g,用四分法缩减至 100 g;按 GB/T 20195 的规定制备样品,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。

## 3.5 试验步骤

以下操作应避免强光照射。

### 3.5.1 试样溶液的制备

称取饲料原料、配合饲料、浓缩饲料 1 g~2 g(精确至 0.001 g)置于 100 mL 棕色具塞锥形瓶中。加入 65 mL 盐酸溶液(3.2.3),于沸水浴中煮沸 30 min。在加热开始时,每隔 5 min~10 min 摇动锥形瓶一次,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 值至 6.0~6.5,立即加盐酸溶液(3.2.4)使 pH 值调至 4.5(溴甲酚绿指示剂变为草绿色)。转移至 100 mL 棕色容量瓶中,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 棕色锥形瓶中。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。再次过滤作为待测试液。

### 3.5.2 杂质氧化

于 a、b、c 三支 15 mL 刻度试管(3.3.3)中各吸入试样溶液(3.5.1)10 mL,同时做平行,向试管 a 中加入水 1 mL,向试管 b 中加入维生素 B<sub>2</sub> 标准工作液(3.2.10.3)1 mL。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,使气泡逸出。

### 3.5.3 测定

用荧光素标准工作液(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,发射波长 525 nm,测定试管 a、试管 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荧光空白。若溶液出现浑浊,不能读数。

### 3.6 试验数据处理

试样中维生素 B<sub>2</sub> 的含量  $w_i$  以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算:

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

式中:

$T_1$ ——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 B<sub>2</sub> 标样的量,单位为微克( $\mu\text{g}$ );

$V$  ——试液的初始体积,单位为毫升(mL);

$V_1$ ——测试时分取试液的体积,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,调整称样量或者稀释倍数。

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 精密度

对于维生素 B<sub>2</sub> 含量低于 5 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 15%;

对于维生素 B<sub>2</sub> 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%;

对于维生素 B<sub>2</sub> 含量大于 50 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%。

## 4 方法 2:高效液相色谱法

### 4.1 原理

试样中核黄素经酸性溶液超声提取后,经离心、过滤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,用紫外检测器(二极管矩阵检测器)或荧光检测器检测,外标法计算维生素 B<sub>2</sub> 的含量。

### 4.2 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。

4.2.1 二水合乙二胺四乙酸二钠(EDTA):优级纯。

4.2.2 庚烷磺酸钠(PICB<sub>7</sub>):优级纯。

4.2.3 磷酸二氢钠:优级纯。

4.2.4 冰乙酸:优级纯。

4.2.5 三乙胺:色谱纯。

4.2.6 甲醇:色谱纯。

4.2.7 提取液:在1 000 mL容量瓶中,称50 mg(精确至0.001 g)EDTA(4.2.1),加入约700 mL去离子水,超声使EDTA完全溶解。加入25 mL冰乙酸(4.2.4)、5 mL三乙胺(4.2.5),用去离子水定容至刻度摇匀。

4.2.8 磷酸二氢钠溶液:称取3.9 g磷酸二氢钠,溶于1 000 mL去离子水,过膜备用。

4.2.9 流动相I:在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),加入约700 mL去离子水,超声使固体全部溶解。加入25 mL冰乙酸(4.2.4)、5 mL三乙胺(4.2.5),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 $3.70 \pm 0.10$ ,过0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜。取该溶液800 mL与200 mL甲醇(4.2.6)混合,超声脱气,备用。

4.2.10 维生素B<sub>2</sub>标准溶液

4.2.10.1 维生素B<sub>2</sub>标准贮备液:称取在五氧化二磷干燥器里干燥24 h的维生素B<sub>2</sub>(纯度大于95%)10 mg(精确至0.000 1 g)于250 mL锥形瓶中,加1 mL冰乙酸(4.2.4)在沸水浴煮沸30 min,待固体颗粒完全溶解,取出冷却至室温后转移入250 mL棕色容量瓶中,用去离子水定容至刻度。此溶液中维生素B<sub>2</sub>浓度为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,置于冰箱2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$ 保存,可使用6个月。

4.2.10.2 维生素B<sub>2</sub>标准工作液:测定维生素预混合饲料样品,可直接使用维生素B<sub>2</sub>标准贮备液(4.2.10.1)中的标准溶液作为上机标准溶液;测定复合预混合饲料、浓缩饲料样品,应准确吸取5 mL维生素B<sub>2</sub>标准贮备液(4.2.10.1)于50 mL棕色容量瓶中,用提取液定容至刻度。该标准工作液中维生素B<sub>2</sub>浓度为5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,分析前稀释备用。

### 4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪:带紫外检测器(二极管矩阵检测器)或荧光检测器。

4.3.2 pH计:带温控,精度0.01。

4.3.3 恒温水浴锅:0  $^{\circ}\text{C}$ ~100  $^{\circ}\text{C}$ 。

4.3.4 针头过滤器:备0.45  $\mu\text{m}$ 水系滤膜。

### 4.4 试样的制备

按GB/T 14699.1的规定采样,选取有代表性的饲料样品至少500 g,四分法缩减至100 g;按GB/T 20195的规定制备样品,磨碎,全部通过0.425 mm孔筛,混匀,装入密闭容器中,避光低温保存备用。

### 4.5 试验步骤

以下操作应避免强光照射。

#### 4.5.1 试样溶液的制备

称取维生素预混合饲料试样0.25 g~0.50 g(精确至0.000 1 g)或复合预混合饲料、浓缩饲料2 g~3 g(精确至0.001 g),于100 mL棕色锥形瓶中,加入约70 mL的提取液(4.2.7)于100  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中煮沸30 min~40 min,最初的几分钟里,摇动锥形瓶以防止固体结块。待冷却后,转移至100 mL棕色容量瓶中,用提取液定容至刻度,混匀、过滤。对于维生素预混合饲料,需要使用提取液进一步稀释5~10倍。

上液相色谱仪测定前所有试液均需经 0.45 μm 滤膜(4.3.4)过滤。

## 4.5.2 测定

### 4.5.2.1 高效液相色谱参考条件 I

色谱柱: C<sub>18</sub>, 长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒度 5 μm, 或性能相当的 C<sub>18</sub> 柱。

流动相: 见 4.2.9。

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。

波长: 267 nm。

### 4.5.2.2 高效液相色谱参考条件 II

色谱柱: C<sub>18</sub>, 长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒度 5 μm, 或性能相当的 C<sub>18</sub> 柱。

流动相: A: 磷酸二氢钠溶液(4.2.8); B: 甲醇, 梯度淋洗, 见表 1。

流速: 1.0 mL/min;

柱温: 25 °C ~ 28 °C。

进样体积: 10 μL ~ 20 μL。

检测器: 荧光检测器激发波长 440 nm; 发射波长 525 nm。

表 1 流动相梯度淋洗表

时间/min	A: 磷酸二氢钠/%	B: 甲醇/%
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

### 4.5.2.3 定量测定

色谱柱注入维生素 B<sub>2</sub> 标准贮备液(4.2.10.1)或者维生素 B<sub>2</sub> 标准工作液(4.2.10.2)和试样溶液(4.5.1), 得到色谱峰面积的响应值, 用外标法定量测定, 维生素 B<sub>2</sub> 色谱图参见附录 A。

## 4.6 试验数据处理

试样中维生素 B<sub>2</sub> 的含量  $\omega_i$  以质量分数表示, 单位为毫克每千克(mg/kg), 按式(2)计算:

$$\omega_i = \frac{A_i \times V \times c \times V_{sti}}{A_{sti} \times m \times V_i} \quad \dots\dots\dots(2)$$

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

$V_{\text{sti}}$  ——标准溶液进样体积,单位为微升( $\mu\text{L}$ );

$A_{\text{sti}}$  ——标准溶液峰面积平均值;

$V_i$  ——试样溶液进样体积,单位为微升( $\mu\text{L}$ );

$m$  ——试样质量,单位为克( $\text{g}$ );

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。

#### 4.7 精密度

对于维生素 B<sub>2</sub> 含量大于 5 mg/kg 而小于 1 000 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%;

对于维生素 B<sub>2</sub> 含量大于 1 000 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%。



附录 A  
(资料性附录)  
维生素 B<sub>2</sub> 标准色谱图

液相色谱紫外检测色谱条件下维生素 B<sub>2</sub> 标准色谱图见图 A.1,液相色谱荧光检测色谱条件下维生素 B<sub>2</sub> 标准色谱图见图 A.2。

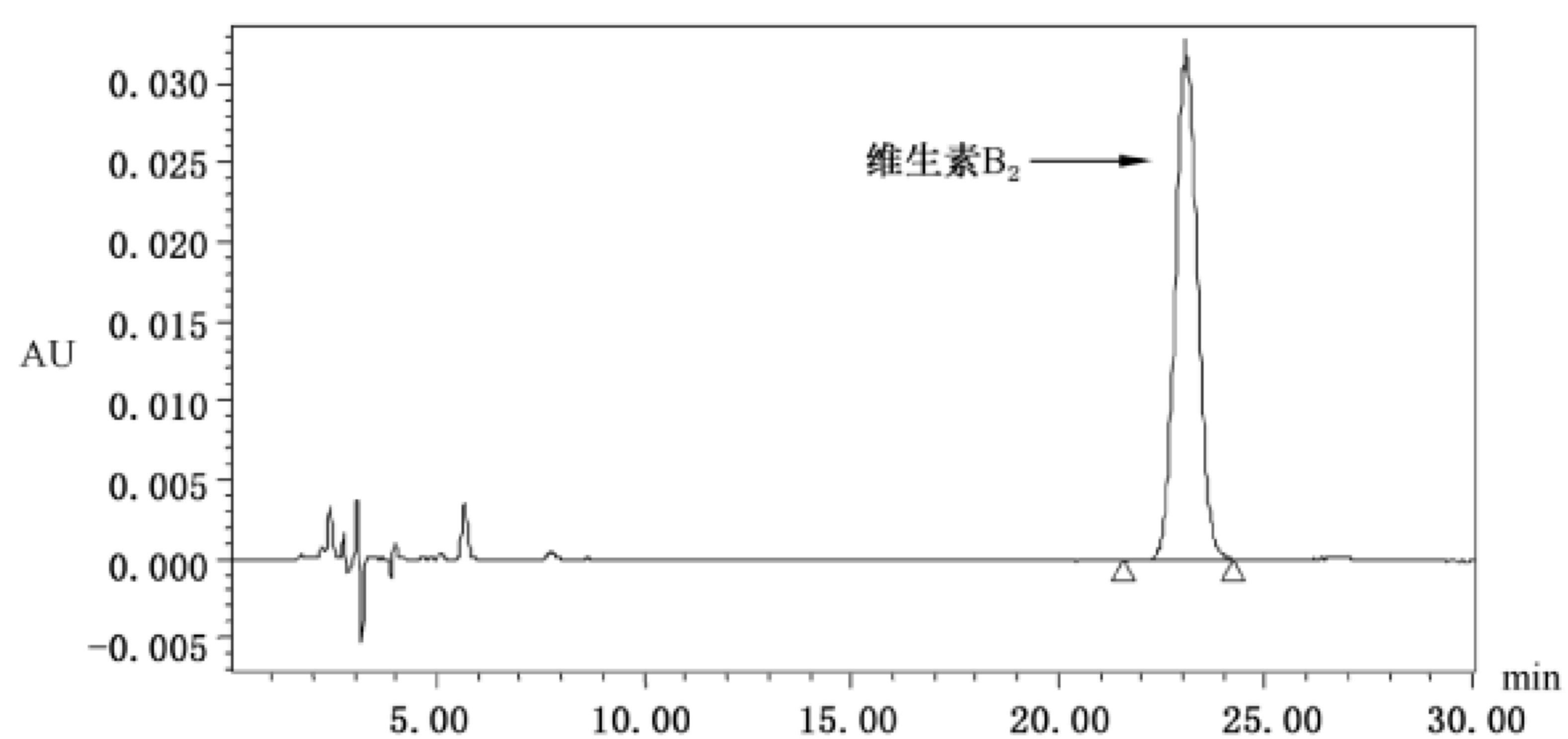


图 A.1 液相色谱紫外检测色谱条件下维生素 B<sub>2</sub> 标准色谱图(维生素 B<sub>2</sub> 浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

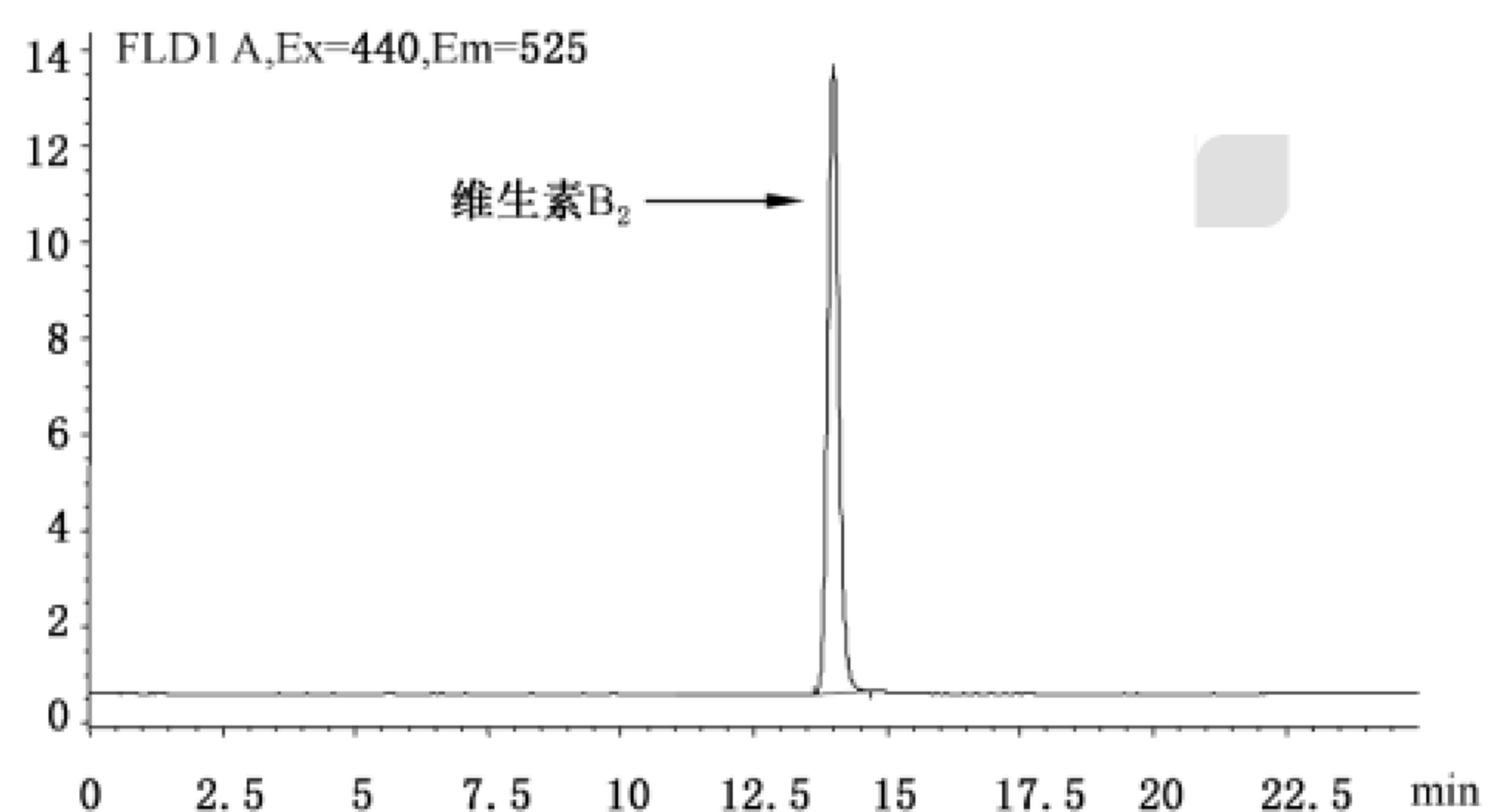


图 A.2 液相色谱荧光检测色谱条件下维生素 B<sub>2</sub> 标准色谱图(维生素 B<sub>2</sub> 浓度为 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )