



中华人民共和国国家标准

GB/T 17778—2005
代替 GB/T 17778—1999

预混合饲料中 d-生物素的测定

Determination of d-biotin in premix

2005-09-05 发布

2006-02-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准是 GB/T 17778—1999《预混料中 d-生物素的测定》的修订版。

本标准与前版相比主要技术内容变化如下：

——补充了“高效液相色谱法”，并规定其为仲裁法。

——在“分光光度法”中“试样溶液的提取”增加了用水先溶解的步骤；在“测定”中用“吸光度的一阶导数的峰差值”代替原“吸光度”。

本标准自实施之日起，代替 GB/T 17778—1999。

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（武汉）。

本标准主要起草人：钱昉、屈利文、杨林、杨先奎。

预混合饲料中 d-生物素的测定

1 范围

本标准规定了用分光光度仪和高效液相色谱仪测定预混合饲料中 d-生物素含量的两种方法。

本标准规定的方法 1 和方法 2 适用于 d-生物素含量大于 1.0 mg/kg 的复合预混合饲料、维生素预混合饲料的测定。提取液的浓度范围为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

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。凡是注明日期的引用文件，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(neq ISO 3696:1987)

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 方法 1——分光光度法

3.1 原理

用乙醇水溶液将试样中 d-生物素提取出来，在硫酸乙醇溶液中 d-生物素和 4-二甲氨基肉桂醛生成橙色化合物，在一定范围内颜色深浅与 d-生物素含量成正比。

3.2 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。水符合 GB/T 6682 三级水的规定。

3.2.1 无水乙醇。

3.2.2 乙醇溶液：将 90 体积的乙醇与 10 体积的水混匀。

3.2.3 硫酸-乙醇溶液：将 2 体积的硫酸与 98 体积的无水乙醇混匀。

3.2.4 4-二甲氨基肉桂醛无水乙醇溶液：2 g/L。

3.2.5 d-生物素标准溶液

3.2.5.1 标准储备液：准确称取 0.100 0 g d-生物素标准品溶解于乙醇溶液(3.2.2)中，定量转入 100 mL 容量瓶中，用乙醇水溶液稀释至刻度，混匀。此液 1.00 mL 含 d-生物素 1.00 mg。

3.2.5.2 标准工作液：准确移取 d-生物素标准储备溶液(3.2.5.1) 1.00 mL 于 50 mL 容量瓶中，加乙醇溶液稀释至刻度，混匀。此液 1.00 mL 含 d-生物素 20.0 μg 。

3.3 仪器与设备

3.3.1 分光光度计(有一阶导数功能)。

3.3.2 实验室用超声波提取器。

3.3.3 分析天平：感量 0.000 1 g。

3.4 试样的制备

按 GB/T 14699.1 规定方法采样，选取饲料样品至少 500 g，四分法缩减至 100 g，磨碎，通过 0.42 mm 孔筛，混匀，装入密闭容器中，保存备用。

3.5 分析步骤

3.5.1 试样溶液的提取

称取维生素预混料约 2 g(精确至 0.000 1 g)、复合预混料约 5 g~10 g(精确至 0.000 1 g)，置于磨口平底烧瓶中，加入 5.00 mL 水置超声波提取器(3.3.2)中超声 20 min 后，再加入 20 mL 无水乙醇

(3.2.1)超声 20 min,然后转移到 50 mL 容量瓶中,用无水乙醇(3.2.1)稀释至刻度。过滤,弃去开始的 10 mL,余下作为试样提取液。

3.5.2 测定

3.5.2.1 标准工作曲线的绘制

精确吸取 d-生物素标准工作溶液(3.2.5.2)0.00、1.00、2.00、5.00、10.00 mL 于 25 mL 容量瓶中,分别加入乙醇水溶液(3.2.2)10.00、9.00、8.00、5.00、0.00 mL,加入硫酸-乙醇溶液(3.2.3)1 mL 和 4-二甲氨基肉桂醛无水乙醇溶液(3.2.4)2 mL,摇匀,室温下放置 1 h,用无水乙醇(3.2.1)稀释至刻度。用 1.0 cm 比色皿在 500 nm~580 nm 处,用分光光度计扫描吸光度的一阶导数,绘制 d-生物素含量与 520 nm 和 546 nm 处吸光度的一阶导数的峰差值的标准工作曲线。

3.5.2.2 精确吸取 3.5.1 试样提取液 10.00 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入硫酸-乙醇溶液(3.2.3)1 mL 和 4-二甲氨基肉桂醛无水乙醇溶液(3.2.4)2 mL,摇匀,室温下放置 1 h,用无水乙醇(3.2.1)稀释至刻度。用 1.0 cm 比色皿在 500 nm~580 nm 处,用分光光度计测定 520 nm 和 546 nm 处吸光度的一阶导数的峰差值,在标准工作曲线上查得试样提取液中 d-生物素的含量。

3.6 分析结果的计算和表述

3.6.1 试样中 d-生物素的含量按式(1)计算。

$$X = \frac{m_1 V_2}{m_2 V_1} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——试样中 d-生物素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

m_1 ——标准曲线上查得测定试样提取液中 d-生物素的质量,单位为微克(μ g);

m_2 ——试样质量,单位为克(g);

V_1 ——试样测定时吸取试样提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——试样提取液总体积,单位为毫升(mL)。

3.6.2 每个试样取两份试料进行平行测定,以其算术平均值为测定结果,保留三位有效数字。

3.7 精密度

3.7.1 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的相对偏差规定如表 1,以大于规定的相对偏差的情况不超过 5%为前提。

表 1

d-生物素含量/(mg/kg)	相对偏差/(%)
≥ 100	20
< 100	30

3.7.2 再现性

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的测定值的绝对差值不大于表 2 中所示的值,以大于表 2 中绝对差值的情况不超过 5%为前提。

表 2

d-生物素含量/(mg/kg)	绝对差值/(%)
≥ 100	± 40
< 100	± 60

4 方法2——高效液相色谱法(仲裁法)

4.1 原理

试样中的d-生物素用水提取后,将过滤离心后的试样溶液注入高效液相色谱仪中进行分离,用紫外检测器测定,外标法计算d-生物素的含量。

4.2 试剂和材料

除非另有说明,本法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 二乙三胺五乙酸(DTPA)。

4.2.2 三氟乙酸溶液,0.05%(体积分数),用氢氧化钠溶液 $[c(\text{NaOH})=5\text{ mol/L}]$ 调节pH至2.5。

4.2.3 d-生物素标准溶液

4.2.3.1 d-生物素标准储备溶液:准确称取0.1000g d-生物素溶解于水中,定量转入100 mL容量瓶中,用水稀释至刻度。此液1.00 mL含d-生物素1.00 mg。

4.2.3.2 d-生物素标准工作溶液:准确量取d-生物素标准储备溶液1.00 mL于50 mL容量瓶中,用水稀释至刻度。此液1.00 mL含d-生物素20.0 μg 。

4.3 仪器、设备

4.3.1 实验室用超声波提取器。

4.3.2 高效液相色谱仪,配有紫外或二极管矩阵检测器。

4.4 试样制备

同分光光度法3.4。

4.5 分析步骤

4.5.1 试样溶液的提取

称取维生素预混合饲料约2 g(精确至0.0001 g)、复合预混合饲料约5 g(精确至0.0001 g),置于100 mL容量瓶中(若预混合饲料中含有矿物质,加入0.1 g DTPA),加入三分之二体积的蒸馏水,在超声波提取器(4.3.1)中超声提取20 min,冷却后用水定容至刻度,过滤,滤液过0.45 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250 mm,内径4.6 mm,粒度5 μm 的 C_{18} 柱。

流动相:850 mL三氟乙酸溶液(4.2.2)加150 mL乙腈(色谱纯)。

流动相流速:1.0 mL/min。

进样体积:20 μL 。

检测器:紫外或二极管矩阵检测器,使用波长210 nm。

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。向色谱柱注入标准工作液(4.2.3.2)及试样提取液(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,样品多时,分析中间应插入标准工作液校正出峰时间。

4.6 分析结果的计算和表述

4.6.1 试样中d-生物素的含量按式(2)计算:

$$X = \frac{S_1 \times V \times c_0 \times V_0}{S_0 \times V_1 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X——试样中d-生物素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

m——试样质量,单位为克(g);

S_0 ——标准工作液峰面积；

S_1 ——试样提取液峰面积；

c_0 ——标准工作液浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

V_0 ——标准工作液进样体积，单位为微升(μL)；

V_1 ——试样提取液进样体积，单位为微升(μL)；

V ——试样提取液总体积，单位为毫升(mL)。

4.6.2 每个试样取两份试料进行平行测定，以其算术平均值为测定结果，保留三位有效数字。

4.7 精密度

4.7.1 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的相对偏差规定如表 3，以大于规定的相对偏差的情况不超过 5% 为前提。

表 3

d-生物素含量/(mg/kg)	相对偏差/(%)
≥ 100	20
< 100	30

4.7.2 再现性

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的测定值的绝对差值不大于表 4 中所示的值，以大于表 4 中所列绝对差值的情况不超过 5% 为前提。

表 4

d-生物素含量/(mg/kg)	绝对差值/(%)
≥ 100	± 40
< 100	± 60