



中华人民共和国国家标准

GB/T 17778—2025

代替 GB/T 17778—2005



预混合饲料中 D-生物素的测定

Determination of D-biotin in feed additive premix

2025-06-30 发布

2026-01-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 17778—2005《预混合饲料中 d-生物素的测定》，与 GB/T 17778—2005 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围，增加了检出限和定量限（见第 1 章，2005 年版的第 1 章）；
- b) 高效液相色谱法中增加了标准溶液保存有效期和标准曲线（见 4.2.6、4.2.7、4.2.8）；
- c) 高效液相色谱法中更改了原理、标准储备液浓度、定容体积和计算公式（见 4.1、4.2.6、4.5.1、4.6，2005 年版的 4.1、4.2.3.1、4.5.1、4.6）；
- d) 分光光度法中增加了标准溶液保存有效期（见 5.2.5、5.2.6）；
- e) 分光光度法中更改了溶剂、提取条件、反应体系和测定波长（见 5.2、5.5.1、5.5.2，2005 年版的 3.2、3.5.1、3.5.2）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：广州汇标检测技术中心、浙江新和成股份有限公司。

本文件主要起草人：郝燕娟、罗群、杨金枢、王智民、施东明、龙志曦、杨雨澄、罗梓峰、沈达荣、陈晓强、潘浣钰、章益明、权化丽、隋艳梅。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1999 年首次发布为 GB/T 17778—1999，2005 年第一次修订；
- 本次为第二次修订。

预混合饲料中 D-生物素的测定

1 范围

本文件描述了维生素预混合饲料、复合预混合饲料中 D-生物素的高效液相色谱和分光光度测定方法。

本文件适用于维生素预混合饲料、复合预混合饲料中 D-生物素的测定。

本文件高效液相色谱法的检出限为 1 mg/kg, 定量限为 3 mg/kg; 分光光度法的检出限为 1.5 mg/kg, 定量限为 5 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 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 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 高效液相色谱法

4.1 原理

试样中的 D-生物素用水提取, 高效液相色谱仪测定, 外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水: GB/T 6682, 一级。

4.2.2 乙腈: 色谱纯。

4.2.3 二乙烯三胺五乙酸(DTPA)。

4.2.4 5 mol/L 氢氧化钠溶液: 称取 20 g 氢氧化钠, 加入适量水溶解, 冷却至室温, 定容至 100 mL。

4.2.5 0.05% 三氟乙酸溶液: 量取 0.5 mL 三氟乙酸, 用水定容至 1 000 mL, 用氢氧化钠溶液(4.2.4)调节 pH 至 2.5。

4.2.6 标准储备溶液(0.2 mg/mL): 称取 D-生物素(CAS 号: 58-85-5, 纯度不低于 98%)标准品 10 mg (精确至 0.01 mg) 于 50 mL 容量瓶中, 加水、超声溶解, 用水定容, 混匀。于 2 °C~8 °C 保存, 有效期 3 个月。

4.2.7 标准中间溶液(20 μg/mL): 准确移取 D-生物素标准储备溶液(4.2.6) 5 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。于 2 °C~8 °C 保存, 有效期 2 个月。

4.2.8 标准系列溶液:准确移取适量标准中间溶液(4.2.7),用水稀释定容,配制成质量浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准系列溶液。临用现配。

4.2.9 微孔滤膜:0.45 μm ,水系。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管矩阵检测器。

4.3.2 分析天平:精度 0.01 mg、0.1 mg。

4.3.3 超声清洗器。

4.3.4 酸度计。

4.4 样品

按 GB/T 20195 规定制备试样,至少 200 g,充分混匀,装入密闭容器中,备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取维生素预混合饲料试样 2 g(精确至 0.1 mg)、复合预混合饲料试样 5 g(精确至 0.1 mg),置于 50 mL 容量瓶中,加入 0.1 g DTPA(4.2.3),加入 30 mL 水(4.2.1),超声提取 20 min,冷却至室温,用水定容(V),用微孔滤膜(4.2.9)过滤,待测。

4.5.2 测定

4.5.2.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm ;或性能相当者;
- b) 流动相:三氟乙酸溶液(4.2.5)-乙腈(4.2.2)(85:15,体积比);
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 进样体积:20 μL ;
- e) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- f) 检测波长:210 nm。

4.5.2.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列溶液(4.2.8)和试样溶液(4.5.1)上机测定。D-生物素标准溶液的液相色谱图见附录 A。

4.5.2.3 定性

以保留时间定性,试样溶液中 D-生物素保留时间应与标准系列溶液(质量浓度相当)D-生物素的保留时间一致,其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

4.5.2.4 定量

以标准系列溶液中的浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于 0.99。试样溶液与标准溶液中 D-生物素的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应将试样溶液(4.5.1)用水稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中 D-生物素的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中 D-生物素的含量,以质量分数 w 表示,单位为毫克每千克(mg/kg),多点校正按公式(1)计算,单点校正按公式(2)计算:

$$w = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中 D-生物素质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- m ——试样质量,单位为克(g);
- V ——试样溶液体积,单位为毫升(mL);
- f ——超出标准曲线范围后的稀释倍数;
- 1 000 ——换算系数。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times 1\,000}{A_s \times m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- A ——试样溶液中 D-生物素峰面积;
- ρ_s ——标准溶液中 D-生物素质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- A_s ——标准溶液 D-生物素峰面积;
- m ——试样质量,单位为克(g);
- V ——试样提取液的总体积,单位为毫升(mL);
- f ——稀释倍数;
- 1 000 ——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下,D-生物素含量不小于 100 mg/kg 时两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于 20%;D-生物素含量小于 100 mg/kg 时两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于 30%。

5 分光光度法

5.1 原理

试样中 D-生物素用无水乙醇提取,在硫酸乙醇溶液中 D-生物素和 4-二甲基氨基肉桂醛生成橙色化合物,在一定范围内颜色深浅与 D-生物素的含量成正比。

5.2 试剂和材料

警示:强酸应小心操作,取用均应在通风橱中进行。

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水:GB/T 6682,三级。

5.2.2 无水乙醇。

5.2.3 硫酸乙醇溶液:移取 2 mL 硫酸沿壁缓慢加入 98 mL 无水乙醇中,搅拌均匀。2 °C~8 °C 保存。

5.2.4 4-二甲基氨基肉桂醛无水乙醇溶液:称取适量 4-二甲基氨基肉桂醛,用无水乙醇(5.2.2)溶解配制成 2 g/L 的溶液,装入棕色瓶中,-18 °C 以下保存。

5.2.5 标准储备溶液(1 mg/mL):称取 D-生物素(CAS 号:58-85-5,纯度不低于 98%)标准品 50 mg(精确至 0.01 mg)于 50 mL 容量瓶中,加无水乙醇(5.2.2)超声溶解,定容,混匀。于 2 °C~8 °C 保存,有效期 3 个月。

5.2.6 标准工作溶液(20 μg/mL):移取 D-生物素标准储备溶液(5.2.5)1 mL 于 50 mL 容量瓶中,用无水乙醇(5.2.2)稀释至刻度,混匀。于 2 °C~8 °C 保存,有效期 2 个月。

5.2.7 快速定性滤纸。

5.3 仪器设备

5.3.1 分光光度计:波长精度±1 nm,配 1 cm 比色皿。

5.3.2 分析天平:精度 0.01 mg、0.1 mg。

5.3.3 超声清洗器。

5.4 样品

同 4.4。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取维生素预混合饲料 2 g(精确至 0.1 mg)、复合预混合饲料 5 g~10 g(精确至 0.1 mg),置于 50 mL 容量瓶中,加入 30 mL 无水乙醇(5.2.2)超声 20 min,冷却至室温,用无水乙醇(5.2.2)定容,混匀,用滤纸(5.2.7)过滤,备用。

5.5.2 测定

5.5.2.1 标准工作曲线绘制

准确移取 D-生物素标准工作溶液(5.2.6)0 mL、1 mL、2 mL、5 mL、8 mL、10 mL 于 25 mL 容量瓶中,分别准确加入无水乙醇(5.2.2)10 mL、9 mL、8 mL、5 mL、2 mL、0 mL,加入硫酸乙醇溶液(5.2.3)2.5 mL 和 4-二甲基氨基肉桂醛无水乙醇溶液(5.2.4)2.5 mL,摇匀,室温下放置 60 min,用无水乙醇(5.2.2)稀释至刻度,混匀。以试剂空白调零,用 1 cm 比色皿在 530 nm 波长处测定吸光度,以 D-生物素的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于 0.99。

5.5.2.2 试样溶液的测定

准确移取试样提取液(5.5.1)10 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入硫酸乙醇溶液(5.2.3)2.5 mL、4-二甲基氨基肉桂醛无水乙醇溶液(5.2.4)2.5 mL,摇匀,室温下放置 60 min,用无水乙醇(5.2.2)稀释至刻度,混匀。以试剂空白调零,用 1 cm 比色皿在 530 nm 波长处测定吸光度。试样溶液中 D-生物素的质量浓度应在标准曲线的线性范围内,若超出线性范围,应将试样溶液用无水乙醇稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中 D-生物素的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中 D-生物素的含量以质量分数 w 表示,单位为毫克每千克(mg/kg),多点校正按公式(3)计算,单点校正按公式(4)计算:

$$w = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中 D-生物素质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- m ——试样质量,单位为克(g);
- V ——试样溶液体积,单位为毫升(mL);
- f ——超出标准曲线范围后稀释倍数;
- 1 000 ——换算系数。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V \times 1\,000}{A_s \times m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- A ——试样溶液中 D-生物素吸光值;
- ρ_s ——标准溶液 D-生物素质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- A_s ——标准溶液 D-生物素吸光值;
- m ——试样质量,单位为克(g);
- V ——试样溶液体积,单位为毫升(mL);
- f ——稀释倍数;
- 1 000 ——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

5.7 精密度

同 4.7。

附录 A

(资料性)

D-生物素标准溶液液相色谱图

D-生物素标准溶液的液相色谱图见图 A.1。

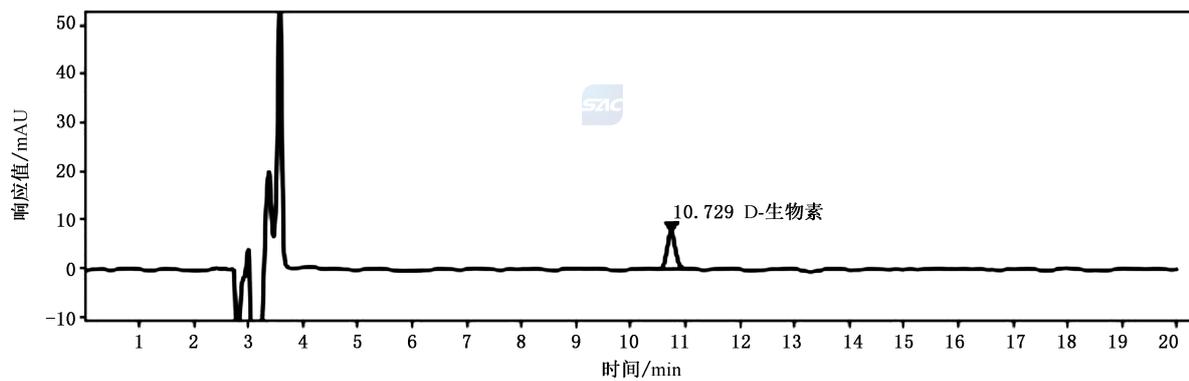


图 A.1 D-生物素标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液相色谱图