



中华人民共和国国家标准

GB/T 14702—2002
代替 GB/T 14702—1993

饲料中维生素 B₆ 的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin B₆ in feeds—
High-performance of liquid chromatography



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 14702—1993《饲料中维生素 B₆ 的测定方法》，较修订前具有高效、快捷、准确的特点。本标准参考“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》而制定。

本标准与 GB/T 14702—1993 的主要技术差异：标准规定了高效液相色谱法测定饲料中的维生素 B₆，确定了试样的提取条件、色谱条件、重复性要求；确定了适用范围为维生素 B₆ 含量大于 30 mg/kg 的复合预混合饲料及维生素预混合饲料。

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、杨文军。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：GB/T 14702—1993。

饲料中维生素 B₆ 的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱仪测定饲料中维生素 B₆ 含量的方法。

本标准适用于维生素 B₆ 含量大于 30 mg/kg 的复合预混合饲料、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 原理

试样中维生素 B₆ 经酸性提取液超声提取后，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（或二极管矩阵检测器）检测，外标法计算维生素 B₆ 的含量。

4 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 6682.1 中一级用水规定。

4.1 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)。

4.2 庚烷磺酸钠(PICB₇)，优级纯。

4.3 冰乙酸，优级纯。

4.4 三乙胺，色谱纯。

4.5 甲醇，色谱纯。

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

4.7 提取液：在已装入约 700 mL/L 去离子水的 1 000 mL 容量瓶中，加入 50 mg EDTA(4.1)待全部溶解后，加入 25 mL 冰乙酸(4.3)、5 mL 三乙胺(4.4)，用去离子水定容至刻度摇匀。取 860 mL 上述溶液与 140 mL 甲醇混合，即得。

4.8 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(4.1)、1.1 g(精确至 0.001 g)庚烷磺酸钠(4.2)，待全部溶解后加入 25 mL 冰乙酸(4.3)、5 mL 三乙胺(4.4)，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 μm 滤膜。取该溶液 860 mL 与 140 mL 甲醇(4.5)混合，超声脱气，待用。

4.9 维生素 B₆ 标准溶液：

- a) 维生素 B₆ 标准贮备液：准确称取维生素 B₆ 0.050 0 g 于 100 mL 棕色容量瓶中，加盐酸溶液(4.6)约三分之二体积，超声 15 min，待全部溶解后，用盐酸溶液(4.6)定容至刻度。此溶液浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ ，冰箱 4℃ 避光保存，可使用 3 个月。

- b) 维生素 B₆ 标准工作液 A:准确吸取 2.00 mL 维生素 B₆ 标准贮备液[4.9 a)]于 50 mL 棕色容量瓶中,用流动相(4.8)定容至刻度。该标准工作液浓度为 20 μg/mL。
- c) 维生素 B₆ 标准工作液 B:准确吸取 5.00 mL 维生素 B₆ 标准工作液 A[4.9 b)]于 50 mL 棕色容量瓶中,用流动相(4.8)定容至刻度。该标准工作液浓度为 2.0 μg/mL。

5 仪器、设备

- 5.1 实验室常用玻璃器皿。
- 5.2 pH 计(带温控,精确至 0.01)。
- 5.3 超声波提取器。
- 5.4 针头过滤器,备 0.45 μm(或 0.2 μm)滤膜。
- 5.5 高效液相色谱仪,带紫外或二极管矩阵检测器。

6 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。

7 分析步骤

以下操作避光进行。

7.1 试样溶液的制备

称取维生素预混合饲料 0.25 g~0.50 g,精确至 0.000 1 g;复合预混合饲料 2 g~3 g,精确至 0.001 g,于 100 mL 棕色容量瓶中,加入三分之二体积的提取液(4.7)在超声波提取器(5.3)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(若滤液浑浊则需离心)。取部分清澈的溶液过 0.45 μm(或 0.2 μm)滤膜,浓度约为 2.0 μg/mL~20 μg/mL 待上机。

7.2 测定

7.2.1 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 μm,或相当的 C₁₈柱。

流动相流速:0.80 mL/min。

温度:25℃~28℃。

进样体积:10 μL。

检测器:紫外或二极管矩阵检测器,使用波长 280 nm。

保留时间:4 min~5 min。

7.2.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数。根据所测样品维生素 B₆ 的含量向色谱仪注入工作液 A[4.9 b)]或 B[4.9 c)]及试样溶液(7.1),得到色谱峰面积的响应值,用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。

8 结果计算

8.1 试样中维生素 B₆ 的含量按式(1)计算:

$$\omega_i = \frac{P_i \times V \times c_i \times V_{st}}{P_{sti} \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ω_i ——试样中维生素 B₆ 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);

$\overline{P_{sti}}$ ——标准溶液峰面积平均值。

8.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留有效数字 3 位。

9 重复性

同一分析者对同一试样同时两次平行测定结果的相对偏差:

维生素 B ₆ 含量/(mg/kg)	相对偏差/(%)
$\geq 5.00 \times 10^2$	$\leq \pm 5.0$
$< 5.00 \times 10^2$	$\leq \pm 10.0$
