

前 言

维生素预混料中维生素 B₁₂测定方法尚无国际标准。本标准参考《色谱科学杂志》第 15 卷和法国罗纳普朗克动物营养公司提出的分析方法,该法简捷、快速、准确,在技术内容上采用其中技术条件,在编写规格上,依据 GB/T 1.1—1993《标准化工作导则 第 1 单元:标准的起草与表述规则 第 1 部分:标准编写的基本规定》和 GB/T 1.4—1988《标准化工作导则 化学分析方法标准编写规定》。

本标准的附录 A 是标准的附录。

本标准由全国饲料工业标准化委员会提出并归口。

本标准由国家饲料质量监督检验中心(北京)负责起草。

本标准主要起草人:李兰、陈必芳、梁冬生。

中华人民共和国国家标准

维生素预混料中维生素 B₁₂ 的测定 高效液相色谱法

GB/T 17819—1999

Determination of vitamin B₁₂ in vitamins premix—
High-pressure liquid chromatography

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱法测定维生素预混料中维生素 B₁₂ 的方法。

本标准适用于维生素预混料、维生素 B₁₂ 预混制剂中维生素 B₁₂ 的测定。检测范围为每千克样品中维生素 B₁₂ 含量大于 0.25 mg。

2 方法原理

试样中维生素 B₁₂ 用水提取,经高效液相色谱反相柱分离,其峰面积与维生素 B₁₂ 的含量成正比。

3 试剂和材料

本标准所用试剂除特殊注明外,均为优级纯,水为去离子水。

3.1 乙腈:色谱纯。

3.2 正磷酸溶液。

3.3 25%乙醇溶液。

3.4 维生素 B₁₂ 标准溶液。

3.4.1 维生素 B₁₂ 标准贮备溶液:准确称取 0.100 0 g 维生素 B₁₂ 纯品(符合 USP),溶解于 100 mL 乙醇溶液(3.3)中,并稀释定容至刻度,摇匀。该标准贮备液每毫升含维生素 B₁₂ 1 mg。

3.4.2 维生素 B₁₂ 标准工作液:准确吸取维生素 B₁₂ 标准贮备液(3.4.1)1 mL 于 50 mL 容量瓶中,用移动相稀释定容刻度,摇匀。该标准工作液 1 mL 含维生素 B₁₂ 2 μg。

4 仪器、设备

4.1 实验室常用设备。

4.2 超声波水浴。

4.3 高效液相色谱仪,带自动进样器,紫外可调波长检测器。

4.4 超纯水装置。

4.5 离心机:3 000 r/min。

5 试样制备

取具有代表性样品至少 500 g,用四分法缩分至 100 g,粉碎,全部过 0.28 mm 孔筛,混匀,装入样品瓶内密闭,避光低温保存备用。

6 分析步骤

6.1 提取

6.1.1 维生素预混料中维生素 B₁₂的提取

称取试样 2~3 g(精确至±0.000 1 g),置于 100 mL 棕色容量瓶中,加约 60 mL 去离子水,在超声波水浴中超声提取 15 min,取出,用去离子水定容至刻度,混匀,过滤,滤液过 0.45 μm 滤膜,供高效液相色谱仪分析。

6.1.2 维生素 B₁₂制剂(1%~2%)的提取

称取试样 1 g(精确至±0.000 1 g)于 100 mL 棕色容量瓶中,加入约 60 mL 去离子水,在超声波水浴中超声提取 10 min,取出用去离子水定容过滤。精确吸取 1.00 mL 溶液于 50 mL 棕色容量瓶中,用去离子水定容至刻度,该液通过 0.45 μm 滤膜过滤,供高效液相色谱仪分析。

6.2 测定步骤

6.2.1 色谱条件

柱子:μ-Bondpak NH₂,粒度 5 μm,3.9 mm×300 mm。

柱温:30℃。

流动相:3%正磷酸水溶液 260 mL 与 700 mL 乙腈混合,超声脱气。

流速:1.7 mL/min。

检测波长:361 nm。

6.2.2 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数,用两次以上相应标准工作液,对系统进行校正。

将通过 0.45 μm 滤膜的样液(6.1.1)依次分装于自动进样小瓶中,依外标法上液相色谱仪测定。

6.2.3 也可采用反相离子对高效液相色谱测定维生素 B₁₂的方法(见附录 A)

7 测定结果的计算

测定结果按式(1)计算:

$$\omega_i = \frac{P_i \times V \times \rho_i \times V_{st}}{\bar{P}_{st} \times m \times V_i} \dots\dots\dots(1)$$

式中:ω_i——每千克样品中维生素 B₁₂的含量,mg;

m——试样质量,g;

V_i——试样溶液进样体积,μL;

P_i——试样溶液峰面积值;

V——试样稀释的体积,mL;

ρ_i——标准溶液浓度,μg/mL;

V_{st}——标准溶液进样体积,μL;

\bar{P}_{st} ——标准溶液峰面积平均值。

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。结果表示到每千克样品中维生素 B₁₂0.01 mg。

8 允许差

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应不大于 15%。

附录 A

(标准的附录)

反相离子对高效液相色谱

测定预混料中维生素 B₁₂

A1 原理

试样中维生素 B₁₂经水提取后,注入反相色谱柱上,由于输入了有机的反相离子对四丁基磷酸铵(PIC A)和己烷磺酸钠(PIC-B₆)溶液,维生素 B₁₂的阳离子与移动相中阴离子形成离子偶化合物,在移动过程中与固定相分开达到分离。

A2 试剂和材料

A2.1 甲醇(优级纯)。

A2.2 磷酸。

A2.3 四丁基磷酸铵(PIC A)。

A2.4 己烷磺酸钠(PIC-B₆)。

A3 测定色谱条件

柱 子:150 mm×4.0 mm(内径)不锈钢柱。

固定相:μ-Bondpak C₁₈(ODS)粒度 5 μm。

移动相:甲醇-水(250+750)约 980 mL,加入 PICA、PICB₆(各一小瓶)20 mL,用上述 25%甲醇水定容至 1 L,混匀,用磷酸调节 pH3。

流速:1 mL/min。

柱温:室温。

检测器:紫外检测器,使用波长 365 nm。

进样量:20 μL。

保留时间:约 7.0 min。

A4 其他各项与正文相同
