



# 中华人民共和国国家标准

GBXXXX-XXXX

代替GB/T 19422-2003

饲料添加剂  
维生素 B<sub>12</sub> (氰钴胺)  
Feed additive  
Vitamin B<sub>12</sub> (cyanocobalamin cobione)

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局

中国国家标准化管理委员会

发布



## 前 言

本标准的第 1 章、第 4 章、第 6 章为强制性条款，其余为推荐性条款。

本标准按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 9841-2006《饲料添加剂 维生素 B<sub>12</sub>（氰钴胺）粉剂》。

本标准与 GB/T 9841-2006 相比，除编辑性修改外主要技术差异如下：

—本标准增加维生素 B<sub>12</sub> 的晶体产品相关指标和检测方法。

—本标准粉剂产品不再包括标示量为 5%的产品（见 1，2006 年 1）。

—本标准粉剂产品中维生素 B<sub>12</sub> 含量项目指标定为的标示量的 96%~120%（以干基计）（见 4.3，2006 年 3.2）。

—修改了砷的限量（见 4.4，2006 年 3.2），补充了仲裁法（见 6.6.2）。

—增加镉的指标要求（见 4.4，2006 年 3.2）。

—修改检验规则、标签和标志、包装、运输和贮存（见 5,6,7 2006 年 5）。

—增加鉴别试验和粒度的检测方法（见 6.3 和 6.10）。

本标准由中华人民共和国农业农林部提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院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：索德成、赵小阳、李兰、张苏、田静、焦玉凤、马文革。

## 饲料添加剂 维生素 B<sub>12</sub>（氰钴胺）

### 1 范围

本标准规定了饲料添加剂 维生素B<sub>12</sub>（氰钴胺）晶体产品、液体产品和粉剂产品的技术要求、试验方法、检验规则及标签、包装、运输、贮存和保质期。

本标准适用于以微生物发酵生成含钴胺素的发酵液，经纯化和结晶得到氰钴胺晶体产品。

本标准适用于发酵生产的维生素B<sub>12</sub>（氰钴胺）及碳酸钙和玉米淀粉为辅料制成的规格为0.1%至2%粉剂产品”。

### 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 601 化学试剂 滴定分析(容量分析)用标准溶液的制备
- GB / T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备
- GB / T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备
- GB/T 6435 饲料中水分的测定
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 10648 饲料标签
- GB/T 13079 饲料中总砷的测定
- GB/T 13080 饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
- GB/T 13082 饲料中镉的测定方法
- GB/T 14699.1 饲料 采样

### 3 化学名称、分子式和相对分子量

化学名称：维生素B<sub>12</sub>（氰钴胺、钴胺素）

分子式：C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>CoN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P

相对分子质量：1355.38(1999 年国际相对原子质量)

### 4 技术要求

#### 4.1 外观和性状

晶体产品为暗红色、结晶状颗粒或粉末。

本品为浅红色至棕色细微粉末，具有吸湿性。

#### 4.2 鉴别

应符合紫外波长的最大吸收峰，或液相色谱的保留时间要求。

#### 4.3 理化指标

技术指标应符合表 1 规定。

表1 理化指标

项目	指标	
	晶体	粉剂
含量（以维生素 B <sub>12</sub> 计/%）	（以干基计） 96~102	（以干基计，占标示量的）96~120
有关物质，% ≤	2	-
干燥失重，/% ≤	12	以玉米淀粉为稀释剂 ≤ 12
		以碳酸钙为稀释剂 ≤ 5
粒度/%	-	全部通过 0.28mm 孔径标准筛（60 目）

#### 4.4 卫生指标

表2 卫生指标

项目	指标
总砷 / (mg/kg) ≤	2.0
铅 / (mg/kg) ≤	5.0
镉 / (mg/kg) ≤	2.0

#### 5 取样

按 GB/T 14699.1 规定执行。

#### 6 试验方法

除特殊说明外，所有使用的试剂均为分析纯和符合 GB/T 6682 中规定的三级水，色谱分析用水符合 GB/T 6682 中一级水的规定，试剂和溶液的制备应符合 GB/T 601、GB/T602 和 GB/T603 的规定。

##### 6.1 感官检验

晶体及粉剂产品：取适量试样置于清洁干燥的白瓷盘中，在自然光下观察其色泽。

## 6.2 鉴别试验

### 6.2.1 试剂或材料

6.2.1.1 乙腈：色谱纯。

6.2.1.2 甲醇：色谱纯。

6.2.1.3 冰乙酸：优级纯。

6.2.1.4 乙醇：分析纯。

6.2.1.5 己烷磺酸钠：色谱级。

6.2.1.6 维生素 B<sub>12</sub> 标准品：维生素 B<sub>12</sub> 含量≥96.0%。

6.2.1.7 维生素B<sub>12</sub>标准储备溶液：准确称取0.1g（精确到 0.0001g）维生素B<sub>12</sub>标准品（5.1.6），置于100mL棕色容量瓶中，加适量的乙醇（5.1.4）使其溶解，并稀释定容至刻度，摇匀。该标准储备液维生素B<sub>12</sub>含量为1mg/mL。于-18℃保存，有效期一年。

6.2.1.8 维生素B<sub>12</sub>标准工作液：准确吸取1mL维生素B<sub>12</sub>标准储备溶液（5.1.8）于100 mL棕色容量瓶中，用水定容稀释至刻度，摇匀。

### 6.2.2 仪器设备

6.2.2.1 超声波水浴。

6.2.2.2 超纯水装置。

6.2.2.3 紫外分光光度计(或二极管矩阵检测器)。

6.2.2.4 石英比色皿（1cm）。

6.2.2.5 高效液相色谱仪，带紫外可调波长检测器（或二极管矩阵检测器）。

6.2.2.6 天平：感量 0.001g；感量 0.0001g

### 6.2.3 鉴别方法

注意：以下操作过程，需在避光条件下进行。

6.2.3.1 取试样溶液，用分光光度计测定，以 1cm 石英比色皿在 300nm-600nm 波长范围内测定试样溶液的吸收光谱，应在 361 nm ± 1 nm, 550 nm ± 2 nm 的波长处有最大吸收峰。

6.2.3.2 称取试样约 0.1g~1g，（精确至 0.0001g），置于 100mL 棕色容量瓶中，加约 60mL 水，在超声波水浴中超声提取 15min，冷却至室温，用水定容至刻度，混匀，过滤，滤液过 0.45μm 滤膜。按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数，向色谱柱中注入维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液及试样溶液，维生素 B<sub>12</sub> 标准溶液与样品溶液的色谱峰保留时间应在 5% 以内。

## 6.3 粉剂产品维生素 B<sub>12</sub> 含量的测定

### 6.3.1 原理

试样中经水提取或稀释后，注入色谱柱上，用流动相洗脱分离，外标法计算维生素 B<sub>12</sub> 的含量。

### 6.3.2 试剂或材料

6.3.2.1 乙腈：色谱纯。

6.3.2.2 甲醇：色谱纯。

6.3.2.3 冰乙酸：优级纯。

6.3.2.4 乙醇：分析纯。

6.3.2.5 己烷磺酸钠：色谱级。

6.3.2.6 维生素 B<sub>12</sub> 标准品：维生素 B<sub>12</sub> 含量≥98.0%。

6.3.2.7 流动相：每升水溶液中含300mL的甲醇，1.1g的己烷磺酸钠(5.1.5)和10mL的冰乙酸（5.1.3），过滤，超声脱气。

6.3.2.8 维生素B<sub>12</sub>标准储备溶液：准确称取0.1g（精确到 0.0001g）维生素B<sub>12</sub>标准品（5.1.6），置于100mL棕色容量瓶中，加适量的乙醇（5.1.4）使其溶解，并稀释定容至刻度，摇匀。该标准储备液维生素B<sub>12</sub>含量为1mg/mL。于-18℃保存，有效期一年。

6.3.2.9 维生素B<sub>12</sub>标准工作液：准确吸取1mL维生素B<sub>12</sub>标准储备溶液（5.1.8）于100 mL棕色容量瓶中，用水定容稀释至刻度，摇匀。

维生素B<sub>12</sub>标准工作液的浓度按下述方法测定和计算：

以水为空白溶液，用紫外分光光度计测定维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液（5.1.9）在 361nm 处的吸光值。维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液的浓度 c 以微克每毫升(μg/mL)表示，按式(1)计算：

$$c = \frac{A \times 10000}{207} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A——维生素B<sub>12</sub>标准工作液在361nm波长处测得的吸光值；

207——维生素B<sub>12</sub>标准百分吸光系数( $E_{1cm}^{1\%} = 207$ )；

10000——维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液浓度单位换算系数。

也可根据实验需要配置相应浓度的维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液。

### 6.3.3 仪器设备

6.3.3.1 超声波水浴。

6.3.3.2 超纯水装置。

6.3.3.3 紫外分光光度计(或二极管矩阵检测器)。

6.3.3.4 石英比色皿（1cm）。

6.3.3.5 高效液相色谱仪，带紫外可调波长检测器（或二极管矩阵检测器）。

6.3.3.6 天平：感量 0.001g；感量 0.0001g

### 6.3.4 试验步骤

### 6.3.4.1 试液的制备

称取适量试样（参考附录 B，精确至 0.0001g），置于相应体积棕色容量瓶中，加约三分之二水，在超声波水浴中超声提取 15min，冷却至室温，用水定容至刻度，混匀，过滤，滤液过 0.45 $\mu$ m 滤膜，供高效液相色谱仪分析。

### 6.3.4.2 色谱条件

#### a) 氨基柱

色谱柱：氨基柱，长 250mm，内径 4mm，粒度 5 $\mu$ m（或相当性能类似的分析柱）；  
流动相：乙腈+1%磷酸水（25+75）；  
流速：1.0mL/min；  
温度：室温；  
检测波长：361nm。

#### b) C18 柱

色谱柱：C18 型柱，长 150mm，内径 4.6mm，粒度 5 $\mu$ m（或相当性能类似的分析柱）；  
流动相：甲醇+己烷磺酸钠溶液（30+70）；  
流速：1.0 mL/min；  
温度：室温；  
检测波长：361nm。

### 6.3.4.3 定量测定

按高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数，向色谱柱中分别注入维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液及试样溶液，得到色谱峰面积响应值，用外标法定量。

### 6.3.5 试验数据处理

试样中维生素 B<sub>12</sub> 含量  $\omega_1$  以质量分数（%）表示，按式（2）计算：

$$\omega_1 = \frac{P \times C \times 100}{P_{st} \times m \times (1 - x)} \times 10^{-4} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

P—样品试液（4.4.2.1）峰面积；

C—维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液（4.1.18）浓度，单位为微克每毫升（ $\mu$ g/mL）；

P<sub>st</sub>—维生素 B<sub>12</sub> 标准工作液（4.1.18）峰面积；

m—试样质量，单位为克（g）；

x—干燥失重，单位为%（%）

平行测定结果用算术平均值表示，保留三位有效数字。



试样中占维生素 B<sub>12</sub> 标示量的质量分数 (%), 以  $\omega_2$  表示, 按式 (3) 计算:

$$\omega_2 = \frac{\omega_1}{K} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

K—产品中维生素 B<sub>12</sub> 标示量;

### 6.3.6 精密度

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%。

## 6.4 晶体产品中维生素 B<sub>12</sub> 含量的测定

### 6.4.1 仪器和设备

分光光度计。

### 6.4.2 分析步骤

精确约称取 0.025g (精确至 0.1mg) 样品于 1000mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 混匀得到试样溶液。用紫外可见分光光度计测定。以水作空白, 采用 1cm 比色皿在 361nm 处测定试样溶液吸光度值。

### 6.4.3 结果计算

维生素 B<sub>12</sub> 含量 (以干基计) 的质量分数  $\omega_3$  按式 (4) 计算。

$$\omega_3 = \frac{A}{207} \times \frac{V}{m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

A——氰钴胺紫外吸光值;

207——氰钴胺 1% 的比色光吸光系数;

V——试样定容体积, 单位为毫升(mL);

m——试样量(以干基计), 单位为克(g);

实验结果以平行测定结果的算术平均值为准, 保留一位小数。

### 6.4.4 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不大于 2.0%。

## 6.5 有关物质的测定

GBXXXXX-XXXX

## 6.5.1 试剂或材料

6.5.1.1 氯胺T。

6.5.1.2 甲醇: 色谱纯。

6.5.1.3 磷酸氢二钠溶液: 0.028 mol/L。称取10.03g十二水合磷酸氢二钠, 加1000mL水溶解。

6.5.1.4 盐酸溶液: 0.05 mol/L。取4.5 mL盐酸, 加水至1000 mL, 混匀。

6.5.1.5 0.1 %氯胺T溶液: 量取0.1 g氯胺T, 用100 mL水溶解。

## 6.5.2 仪器设备

高效液相色谱仪

## 6.5.3 分析步骤

### 6.5.3.1 试样溶液的制备:

称取试样10 mg于10 mL容量瓶中, 用流动相溶解并定容至刻度, 混匀。

### 6.5.3.2 对照溶液的制备:

精密量取1 mL试样溶液(6.5.3.1)于100 mL量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 混匀。

### 6.5.3.3 系统适用性溶液的制备:

称取试样25 mg于25 mL容量瓶中, 加水10 mL溶解样品, 加入0.1%氯胺T溶液5 mL、0.05mol/L盐酸溶液0.5 mL, 用水稀释至刻度, 混匀, 静置5分钟。准确量取1mL上述溶液于10 mL量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 混匀。

### 6.5.3.4 灵敏度溶液的制备:

准确量取对照溶液(6.5.3.2) 1 mL于10 mL容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 混匀。

## 6.5.4 参考色谱条件

色谱柱: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的高效液相色谱柱, 或其它等效色谱柱。

流动相: 取260 mL甲醇和740 mL磷酸氢二钠溶液(A.6.2.6)混匀, 用磷酸调节pH值至3.5。

柱温: 25℃。

检测器: 波长为361 nm。

进样量: 10 μL。

## 系统适用性试验

在参考色谱条件下, 注入试样溶液(6.5.3.1)、对照溶液(6.5.3.2)、系统适用性溶液(6.5.3.3)和灵敏度溶液(6.5.3.4)进行测定。记录色谱图至主成分峰保留时间的3倍。

系统适用性溶液(6.5.3.3)中应出现氰钴胺峰与一个降解产物峰(相对保留时间约为1.4), 二者的

分离度应大于2.5，灵敏度溶液中主峰的信噪比应大于3。

### 6.5.5 测定

试样中有关物质的比值  $\omega_4$  (%) 按式 (5) 计算：

$$\omega_4 = \frac{A_1}{A_2} \times 100 \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中：A<sub>1</sub>—试样溶液中杂质峰面积的和

A<sub>2</sub>—试样溶液的主峰面积

## 6.6 砷的测定

### 6.6.1 砷斑法(快速法)

#### 6.6.1.1 原理

试样经消化后，以碘化钾、氯化亚锡将高价砷还原为三价砷，然后与锌粒和酸产生的新生态氢生成砷化氢，再与溴化汞试纸生成黄色至橙色的色斑，与标准砷斑比较定量。

#### 6.6.1.2 试剂

6.6.1.2.1 盐酸（分析纯）。

6.6.1.2.2 无砷锌粒。

6.6.1.2.3 硝酸-高氯酸混合液（4+1）：量取 80ml 硝酸，加 20ml 高氯酸，混匀。

6.6.1.2.4 碘化钾溶液（150g/L）：贮存于棕色瓶中。

6.6.1.2.5 酸性氯化亚锡溶液：称取 40g 氯化亚锡（SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O），加盐酸溶解并稀释至 100ml，摇匀，即得。

6.6.1.2.6 乙酸铅棉花：用乙酸铅溶液（100g/L）浸透脱脂棉后，压除多余溶液，并使疏松，在 100℃ 以下干燥后，贮存于玻璃瓶中。

6.6.1.2.7 砷标准溶液（1.0 μg/ml）：吸取 1.0ml 市售砷标准贮备液（100 μg/ml），置于 100ml 容量瓶中，加 1ml 稀硫酸，加水稀释至刻度，摇匀，即得。

6.6.1.2.8 溴化汞-乙醇溶液（50g/L）：称取 25g 溴化汞用少量乙醇溶解后，再定容至 500ml。

6.6.1.2.9 溴化汞试纸：将剪成直径 2cm 的圆形滤纸片，在溴化汞乙醇溶液（50g/L）中浸渍 1h 以上，保存于冰箱中，临用前取出置暗处阴干备用。

#### 6.6.1.3 试验步骤

##### 6.6.1.3.1 样品溶液制备

称取样品 1.00g 置于 150 ml 锥形瓶中，先加 3ml 水润湿，加入 15ml 硝酸-高氯酸混合液（4+1）和

GBXXXXX-XXXX

4~5 粒玻璃珠，放置片刻，置电热板上小火缓缓加热，待反应缓和时，提高加热温度，消化至白烟产生后又消失样品近干时停止加热，放冷。加入 10ml 混合酸继续消化至近干，如此重复 4 次，停止加热，放冷。加 10ml 水，在电热板上加热赶酸至近干，放冷。

#### 6.6.1.3.2 砷标准溶液制备

量取 2.00ml 砷标准使用液（ $1 \mu\text{g/ml}$ ）置于 150ml 锥形瓶中，以下操作同“5.7.4.1 样品溶液制备”。

#### 6.6.1.3.3 分析步骤

将上述制备的砷标准溶液及样品溶液分别转移至测砷瓶中，用水洗涤锥形瓶 3~4 次（总用水量约 25ml），洗液分别并入相应的测砷瓶中，各加 5ml 碘化钾溶液（150g/L）、5 滴酸性氯化亚锡溶液及 4ml 盐酸。于盛样品溶液、砷标准溶液的测砷瓶中各加 3g 锌粒，立即塞上预先装有乙酸铅棉花及溴化汞试纸的测砷管，于室温下放置 1h，取出试样的溴化汞试纸与标准砷斑比较。试样的溴化汞试纸所呈棕黄色不得深于标准。

#### 6.6.2 仲裁法

准确称取试样 1.00 g（准确至 0.001 g），按照 GB/T 13079 规定执行。

#### 6.7 铅的测定

准确称取试样 1.00 g（准确至 0.001 g），按照 GB/T 13080 中 7.1.1 干灰化法处理，然后按 7.3 测定。。

#### 6.8 镉的测定

准确称取试样 1.00 g（准确至 0.001 g），按照 GB/T 13082 规定执行。

#### 6.9 干燥失重的测定

准确称取试样 1.00 g（准确至 0.001 g），按 GB/T 6435 中 8.1 测定。

#### 6.10 粒度

称取试样 50 g（准确至 0.01 g），置于 0.28mm 孔径标准筛中进行筛分，5 min 内应全部通过分析筛。

### 7 检验规则

#### 7.1 组批

以相同材料、相同的生产工艺、连续生产或同一班次生产的产品为一批，但每批产品不得超过 40 t。

#### 7.2 出厂检验：

出厂检验项目为：

晶体产品：外观和性状、维生素 B<sub>12</sub> 含量、有关物质。

粉剂产品：外观和性状、维生素 B<sub>12</sub> 含量、干燥失重。

### 7.3 型式检验

型式检验项目为第3章的全部要求。产品正常生产时，每半年至少进行一次型式检验，但有下列情况之一时，应进行型式检验：

- a) 新产品投产时；
- b) 原料、配方、设备、生产工艺有较大改变时；
- c) 产品停产三个月以上，恢复生产时；
- d) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；
- e) 饲料管理部门提出进行型式检验要求时。

### 7.4 判定规则

7.4.1 所检项目检测结果均与本标准规定指标一致判定为合格产品。

7.4.2 检验结果中，如有一项指标不符合本标准规定时，可在原批中重新抽样对不符合项进行复检，若复检结果仍不符合本标准规定，则判定该批产品为不合格。

## 8 标签、包装、运输、贮存和保质期

### 8.1 标签

按 GB 10648 规定执行。

### 8.2 包装

包装材料应清洁、卫生、无毒、无污染，并具有避光、防潮、防漏等性能。

### 8.3 运输

运输工具应清洁卫生，能防暴晒、防雨淋、防受潮，不应与有害有毒物质混装、混运，避免包装破损。

### 8.4 贮存

贮存于防晒、通风、干燥处，防虫、防鼠，不应与有毒有害物混贮。

### 8.5 保质期

未开启包装的产品，在规定的运输和贮存条件下，晶体产品保质期为36个月。液体产品保质期为6个月。粉剂产品保质期为36个月。

维生素 B<sub>12</sub> 标准色谱图(氨基柱)见图 A.1; 维生素 B<sub>12</sub> 标准色谱图(C18 柱)见图 A.2。

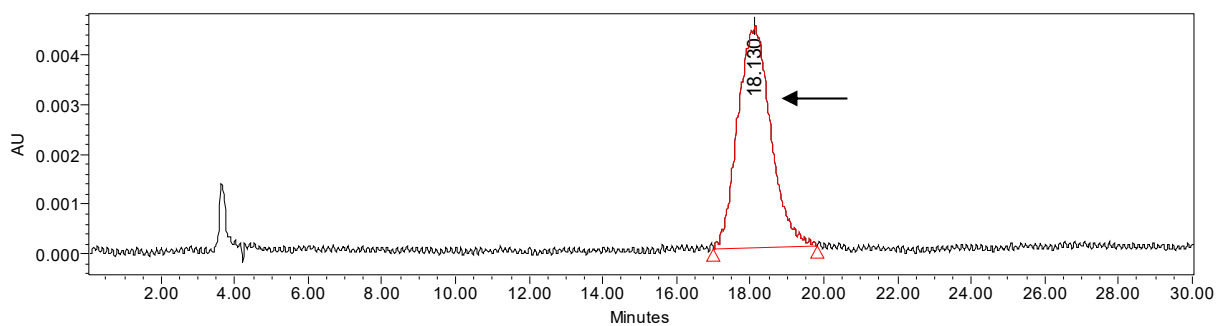


图 A.1 10 $\mu$ g/mL 维生素 B<sub>12</sub> 标准溶液色谱图(氨基柱)

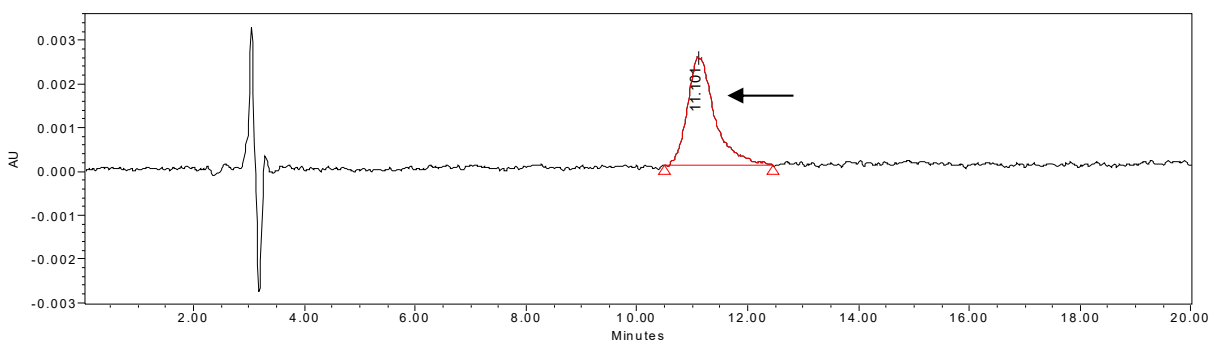


图 A.2 10 $\mu$ g/mL 维生素 B<sub>12</sub> 标准溶液色谱图(C18 柱)

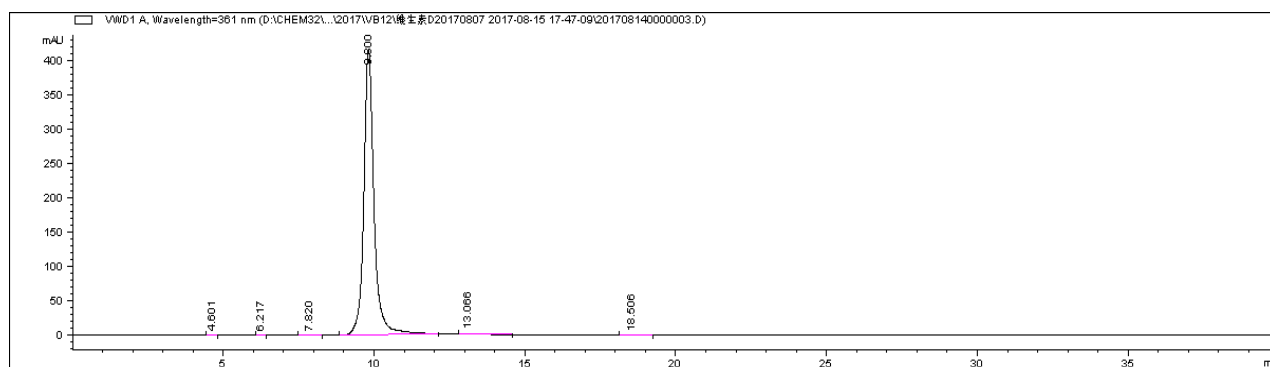


图 A.3 维生素 B<sub>12</sub> 标准溶液有关物质质谱图

## 附录 B (规范性附录)

产品中维生素 B<sub>12</sub> 的标示量、称样量及提取液稀释体积参考示例

表 B.1 标示量、称样量及提取液稀释体积示例

样品类型	标示量/%	称样量/g (mL)	提取液稀释体积/mL	提取液中维生素 B <sub>1</sub> 浓度/ $\mu\text{g/mL}$
粉剂产品	0.1	1.00	100	10
	0.5	0.20	100	10
	1.0	0.10	100	10
	2.0	0.10	200	10