中华人民共和国农业行业标准

饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇

（25-羟基维生素 D_3）

公开征求意见稿

编制说明

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

国家饲料质量检验检测中心（北京）

中华人民共和国农业行业标准
饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇
（25-羟基维生素 D_3 ）
公开征求意见稿编制说明

1 标准制定背景及任务来源

1.1 背景情况

1.1.1 关于饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇

饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇（25-羟基维生素 D_3)（以下称 25-羟基胆钙化醇）是维生素 D_3 代谢产物，维生素 D_3 是一种具有多种生理功能的类固醇类激素，天然形式的维生素 D_3 不具有生物活性，其活性形式为 1α，25-二羟基维生素 D_3。维生素 D_3 首先经肝脏在 25-羟基酶作用下，脱氢生成 25-羟基胆钙化醇，然后在肾脏中经 1α羟化酶羟化生成 1α，25-二羟基胆钙化醇[1]。25-羟基胆钙化醇是维生素 D_3 的第一个代谢产物，也是维生素 D_3 在血液循环中的主要活性形式，其生物效价是维生素 D_3 的 3~5 倍[2]。动物能通过采食饲料中的 25-羟基胆钙化醇，经吸收可在血液中获得 25-羟基胆钙化醇，可绕开肝脏的羟化反应，能更有效地转化成最终生物活性代谢物。目前以 25-羟基-7-去氢胆固醇为起始原料，经化学制备、精制、包被获得的 25-羟基胆钙化醇有 1.25 %、0.5 %等规格，在饲料中添加一定量的 25-羟基胆钙化醇，可调节动物体内的钙磷平衡，维持骨骼健康，改善免疫功能，调节能量代谢，并在提高畜禽生产性能、改善畜产品品质方面也有一定作用[2]。欧盟于 2006 年批准 25-羟基胆钙化醇作为饲料添加剂用于育肥鸡、产蛋鸡和火鸡，于 2009 年批准 25-羟基胆钙化醇作为饲料添加剂用于其他家禽和猪。实验研究表明，仔猪的耐受剂量是仔猪饲粮中 25-羟基胆钙化醇饲料添加剂添加推荐量的 5~10 倍。25-羟基胆钙化醇做为饲料添加剂于 2005 年由帝斯曼引进中国，质量复核检验由国家饲料质量检验检测中心（北京）完成。农业部第 2045 号《饲料添加剂品种目录（2013）》公告中，25-

羟基胆钙化醇被列为维生素及类维生素添加剂，第2625号公告《饲料添加剂安全使用规范》规定允许在猪及家禽中使用。我国目前已有几家企业生产该产品，25-羟基胆钙化醇已经得到广泛应用，但是还没有国家标准和农业行业标准与之配套，本标准的制定对于规范产品质量，加强市场监管，促进市场和产业发展，都具有非常重要的意义。

1.1.2 产品生产状况与工艺

目前25-羟基胆钙化醇的主要生产企业及产品类型见表1。

表1 25-羟基胆钙化醇企业标准代号及产品类型

序号	生产企业	企业标准	25-羟基胆钙化醇产品
1	帝斯曼维生素（上海）有限公司	欧盟	晶体（≥94%）
2	山东海能生物有限公司	Q/371102SHN 042-2018	晶体（≥94%）年产250kg，每批5kg。
3	太原市威尔潞威科技发展有限公司	Q/140112LW006-2019	晶体（≥94%）年产5吨，每批15kg。
4	浙江花园生物高科股份有限公司	Q/ZH 029-2018	晶体（≥94%）年产15.6吨，每批52kg。
5	浙江威仕生物科技有限公司	——	——
6	山东同辉生物科技有限公司	——	——
7	江西淳迪生物科技有限公司	Q/CDSW 001-2021	晶体（≥94%）年产10吨，每批40-50kg。
8	湖南引航生物科技有限公司	Q/YHSW001（01）-2021	晶体（≥94%）

帝斯曼产品在美国生产，由帝斯曼维生素（上海）有限公司在国内经销1.25 %饲料添加剂25-羟基胆钙化醇。

太原市威尔潞威科技发展有限公司，饲料添加剂25-羟基胆钙化醇晶体（含量≥94 %），满产年产能可达5吨，饲料添加剂25-羟基胆钙化醇年产能32吨，销售30吨。

山东海能生物有限公司25-羟基胆钙化醇晶体年产约0.25吨，饲料添加剂25-羟基胆钙化醇年产约60吨，生产销售随市场需求约30吨左右。

浙江花园生物高科股份有限公司年产能100吨，其子公司浙江花园营养有限公司年产能1200吨。

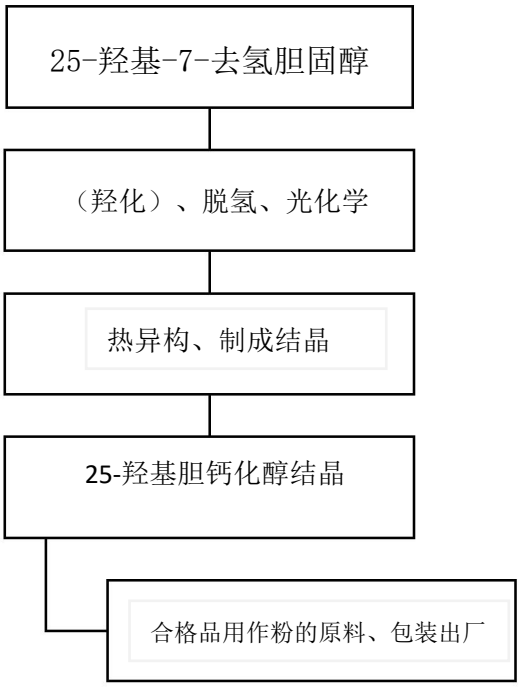
江西淳迪生物科技有限公司已建成年产1000吨饲料添加剂25-羟基胆钙化醇生产线，产品主要有饲料添加剂25-羟基胆钙化醇晶体（含量≥94 %），满产年产能可达10吨，

饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇有 1.25 %， 0.5 %两个规格，所有规格满产年产能达 1000 吨。

浙江威仕生物科技有限公司、山东同辉生物科技有限公司、湖南引航生物科技有限公司、浙江金郎博药业有限公司都具备生产能力。

25-羟基胆钙化醇生产工艺主要以 25-羟基-7-去氢胆固醇化合物为原料，经光化学反应、热异构、精制、结晶、得到的 25-羟基胆钙化醇晶体；原料和辅料应符合《饲料原料目录》、《饲料添加剂品种目录》以及《饲料卫生标准》的规定。生产工艺图如下：

25-羟基胆钙化醇晶体流程图



1.2 任务来源

2018 年，农业农村部农产品质量安全监管司下达农业行业标准“饲料添加剂 25-羟基维生素 D_3 ”制定任务，项目计划编号 2018-20-13（LX19417），由中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所主持起草，协作起草单位：帝斯曼维生素（上海）有限公司、山东海能生物有限公司、太原市威尔潞威科技发展有限公司、浙江花园生物高科

股份有限公司；2021 年 7 月，浙江威仕生物科技有限公司，山东同辉生物科技有限公司、江西淳迪生物科技有限公司，浙江金郎博药业有限公司先后参加标准研制工作；起草人：赵小阳、虞哲高、张进、曹金党、梁彦明、梁伟杰、宋荣、朱宁、饶辉、杨素萍、杜海峰、石宝石、何雷、张耀、宋艳、唐飞、钱国平、姚园园、张健、耿中科、陈梨花、王国强、王潇铝、李欣、陈玉龙。

1.3 制标思路

在农业农村部第 2045 号公告《饲料添加剂品种目录》中，该产品名称为 25-羟基胆钙化醇（25-羟基维生素 D_3),因此将标准名称改为与 2045 号公告中名称一致，即“饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇（25-羟基维生素 D_3）”；针对农业农村部农产品质量安全监管司下达的制标任务，我们首先对 25-羟基胆钙化醇饲料添加剂产品进行了调研。发现国内饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇的产品有 25-羟基胆钙化醇晶体和饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇预混剂两种。25-羟基胆钙化醇晶体作为饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇预混剂的生产原料只提供给饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇（微粒/粉剂）生产厂家（全国不到 10 家），而市场上大量流通的、提供给饲料生产企业（数千家）的产品主要是饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇预混剂。

农业部 2625 号公告《饲料添加剂安全使用规范》已规定了化学制备的 25-羟基胆钙化醇晶体的含量规格、配合饲料或全混合日粮中的推荐用量和最高限量。由于推荐的量很低，无法直接将 25-羟基胆钙化醇晶体用于配合饲料的生产中。从国内 25-羟基胆钙化醇产品的使用现状来看，25-羟基胆钙化醇晶体用作饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇预混剂生产的原料，饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇预混剂用作预混合饲料和配合饲料生产的原料。在文件中规定了 25-羟基胆钙化醇晶体的技术指标、卫生指标、试验方法和检验规则，以保证安全使用规范的有效实施。

2 主要工作过程

2018 年 8 月，接到制标任务后，成立标准起草小组，主持单位召开了标准制定启动会，帝斯曼维生素（上海）有限公司、山东海能生物有限公司、太原市威尔潞威科技发展有限公司、浙江花园生物高科股份有限公司四家生产企业技术专家参加会议，会上企业分别介绍了 25-羟基胆钙化醇生产、销售、企业质量标准执行情况，结合国内外文献，确定技术路线；决定标准包括 25-羟基胆钙化醇晶体和饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇预混剂质量标准，企业提供 25-羟基胆钙化醇样品。2021 年 7 月之后，浙江威仕生物科技有限公司、山东同辉生物科技有限公司、江西淳迪生物科技有限公司、浙江金郎博药业有限公司先后加入起草小组。

2019 年 6 月召开标准征求意见稿研讨会，通过实验分析，确立主要技术内容，同时认为标准名称应与“饲料添加剂品种目录”中名称一致，故将标准名称修改为“饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇（25-羟基维生素 D_3 ）”。

2021 年 5 月召开技术研讨会，补充实验数据，确定技术指标，完善标准文本。

2021 年 12 月 20 日向 25-羟基维生素胆钙化醇生产企业、饲料企业等使用单位以及科研院所和饲料质量监督检测实验室等 30 个单位发函征求意见，共收到 27 个单位回涵，各类意见 246 条。

2022 年 1 月标准起草组认真考虑了所征求的意见，其中采纳意见 181 条，部分采纳 27 条，未采纳的 38 条。并据此修改标准编制说明与标准文本，形成预审稿。

2022 年 4 月 28 日，起草组组织七家生产企业对预审稿适用范围、技术要求、检验规则等内容，参考企业标准及检测数据，逐条审核修改，完善预审稿。

2022 年 07 月 05 日，起草单位组织专家对该标准进行预审，专家组由石波、柏凡、张育润、常碧影、张若寒、杨青、商军、任玉琴、杨金枢组成。列席企业代表浙江威仕生物科技有限公司杜海峰、江西淳迪生物科技有限公司陈梨花和山东同辉生物科技有限

公司张健。专家组提出如下修改意见：

1）同意标准名称修改为“饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇（25-羟基维生素 D3）”，并在编制说明中补充标准名称修改的理由；

2）范围中完善产品工艺描述；

3）删除标准文本及编制说明中涉及 25-羟基胆钙化醇预混剂的内容；

4）按 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》、GB/T 20001.10-2014《标准编写规则第 10 部分：产品标准》规范标准文本，并完善编制说明。

因管理部门提出在《饲料添加剂安全使用规范》（农业部公告第 2625 号）中，规定了 25-羟基胆钙化醇含量规格不低于 94.0 %，文件不应包括以 25-羟基胆钙化醇晶体为原料经喷雾包被等制成的饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇预混剂，起草组和预审专家采纳删除标准文本及编制说明中涉及 25-羟基胆钙化醇预混剂的内容意见，根据预审会专家意见，形成预审会审查意见和预审专家关于文本与标制说明所提意见的意见汇总表。标准起草组进一步修改了标准文本和编制说明，形成公开征求意见稿。

2022 年 X 月 X 日由饲料工业标准化技术委员会对该标准进行审查。审查意见见附件 X，标准起草组据此修改标准文本和完善了编制说明，形成报批稿。

3 标准编制原则和主要技术内容确定的依据

3.1 标准制定遵循的基本原则

标准制定主要遵循《饲料添加剂安全使用规范》（农业部公告第 2625 号）。该公告规定饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇的通用名称为 25-羟基胆钙化醇（25-羟基维生素 D3 ），化学式 $C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$，来源为化学制备，含量不低于 94 %及在猪、家禽配合饲料或全混合日粮中的推荐量、最高限量，见表 2。

文件起草依据 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》、GB/T 20001.10-2014《标准编写规则第10部分：产品标准》的规定进行编制。

3.2 技术指标的确定

对于25-羟基胆钙化醇含量的制定，依据《饲料添加剂安全使用规范》（农业部公告第2625号），25-羟基胆钙化醇含量不低于94 %，这一规定与欧盟官方期刊发布的欧盟委员会条例（EC) No 887/2009中，关于授权25-羟基胆钙化醇作为饲料添加剂在肉鸡、火鸡、其它家禽及猪中允许使用的规定及25-羟基胆钙化醇企业标准（表4）一致，检测方法参照欧洲药典、美国药典等相关文献。

对于25-羟基胆钙化醇中相关甾醇类物质的限度，依据表3及表4中杂质的限度规定，规定单个的甾醇类物质不大于1 %，检测方法按照欧洲药典方法执行。

对于25-羟基胆钙化醇的水分，各企业的标准一致（表4），将水分规定为3.8％～5.0 %。

对于25-羟基胆钙化醇的卫生指标，结合各企业标准并依据实验结果，规定25-羟基胆钙化醇总砷的限度2 mg/kg，重金属的限度为20 mg/kg。

在欧盟标准（EC）No.887/2009中，规定了赤藓红的限度为5 mg/kg， 但这一指标在FDA，欧洲药典，美国药典中未列入。从生产企业了解到，赤藓红在生产过程中并未用到，且在生产过程中不会产生。本文件不规定赤藓红的限度。

对于25-羟基胆钙化醇溶剂残留指标，有两家企业标准在溶剂残留指标上有限度。考虑到欧盟标准（EC）No.887/2009，欧洲药典，美国药典未将溶剂限度列入标准，按照《中国药典四部》 0861 残留溶剂测定法测定，第三类溶剂（药品GMP或其质量要求限制使用）限度（%），不大于0.5％，实际检测中，样品溶液中有机溶剂均小于0.5％，检测结果符合要求;即使样品中有微量的溶剂残留也不会对终端产品带来安全上的问题，所以本标准不规定溶剂残留的限度。

美国药典、欧洲药典对医药级的25-羟基胆钙化醇没有要求铝的限量，FDA对饲料级的25-羟基胆钙化醇中铝的限量要求小于20 ppm,按照GB 5009.182-2017 《食品安全国家标准 食品中铝的测定》，各企业样品均未检出铝的含量，企标中也未要求铝的限量，因此文件中技术指标不设定铝的限量。

从这些表格可以看出，大家关注的主要技术参数：25-羟基胆钙化醇的含量、水分、

和化学制备过程中可能产生的一些杂质，如相关甾醇的含量和赤藓红，以及与卫生指标相关的重金属等。不难看出：欧盟、FDA 在主含量（25-羟基胆钙化醇的含量）与农业部 2625 号公告规定是基本一致的。水分、相关杂质的质量控制限量方面，欧盟、FDA 和企业标准也是大致相同的；因此，本文件对 25-羟基胆钙化醇技术指标作出初步规定，具体见表 6 和表 7。

以下通过具体的对该产品的试验方法的验证以及所收集产品的检测结果进一步证实这些参数和限量的合理性。

表 2 《饲料添加剂安全使用规范》（2017 年修订版）（农业部公告第 2625 号）

通用名称	英文名称	化学式或描述	来源	含量规格（%）	适用动物	在配合饲料或全混合日粮中的推荐添加量（以维生素计）	在配合饲料或全混合日粮中的最高限量（以维生素计）	其他要求
25-羟基胆钙化醇 （25-羟基维生素 D_3）	25-Hydroxyl- cholecalciferol (25-Hydroxy Vitamin D3)	$C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$	化学制备	≥94.0	猪、家禽	猪 3.75~12.5 μg/kg 鸡 10~50 μg/kg 鸭、鹅 12.5~20 μg/kg	猪 50 μg/kg 肉鸡、火鸡 100 μg/kg 其他家禽 80 μg/kg	1.和维生素 D_3 同时使用时，两种物质在配合饲料或全混合日粮中的总量不得超过：猪 125 μg/kg（其中仔猪代乳料 250 μg/kg），家禽 125μg/ kg；同时使用情况下，按 1μgVD_3 =40 IU VD_3 的比例换算 VD_3 的使用量。 2.不得与维生素 D_2 共同使用。

表 3 Official Journal of the European Union

ANNEX

Identification number of the additive	Name of the holder of authorisation	Additive	Composition, chemical formula, description, analytical method	Species or category of animal	Maximum age	Minimum content	Maximum content	Other provisions	End of period of authorisation
						mg/kg of complete feedingstuff with a moisture content of 12 %			
Category: nutritional additives. Functional group: vitamins, pro-vitamins and chemically well-defined substances having similar effect									
Sub classification: vitamin D									
3a670a	—	25-hydroxy cholecalciferol	Additive composition: Stabilised form of 25-hydroxycholecalciferol Characterisation of the active substance: 25-hydroxycholecalciferol, $C_{27}H_{44}O_2.H_2O$ CAS number: 63283-36-3 Purity criteria: 25-hydroxycholecalciferol > 94 % other related sterols < 1 % each erythrosine < 5 mg/kg Analytical method (1) Determination of 25-hydroxycholecalciferol: high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (HPLC-MS) Determination of vitamin D_3 in complete feedingstuff: reverse phase HPLC method with ultraviolet (UV) detection at 265 nm [EN 12821:2000]	Chickens for fattening	—		0,100	1. The additive shall be incorporated in feedingstuffs via the use of a premixture. 2. Maximum content of the combination of 25-hydroxycholecalciferol with vitamin D_3 (cholecalciferol) per kg of complete feedingstuff: — ≤ 0,125 mg (2) (equivalent to 5 000 IU of vitamin D_3) for chickens for fattening and turkeys for fattening, — ≤ 0,080 mg for other poultry, — ≤ 0,050 mg for pigs. 3. Simultaneous use of vitamin D_2 is not allowed. 4. The content of ethoxyquin shall be indicated in the label. 5. For safety: breathing protection shall be used.	16 October 2019
				Turkeys for fattening	—		0,100		
				Other poultry	—		0,080		
				Pigs	—		0,050		

(1) Details of the analytical methods are available at the following address of the Community Reference Laboratory: www.irmm.jrc.be/crl-feed-additives

(2) 40 IU cholecalciferol (vitamin D_3)= 0,001 mg cholecalciferol (vitamin D_3).

表 4　国际质量标准及药典对 25-羟基胆钙化醇的规定

项目	欧盟标准（EC）No.887/2009	FDA　CFR21　584.725	欧洲药典 10.0	美国药典 40
化学名称	25-羟基胆钙化醇	(5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3β,25-二醇	(5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3β,25-二醇一水合物	(5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3β,25-二醇一水合物
25-羟基胆钙化醇（以 $C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$ 计），%	>94	≥ 94.0	97.0～103.0	97.0～103.0
CAS 号	63283-36-3			63283-36-3
分子量	——	——	418.7	418.65
其他固醇含量（单个甾醇），%	≤ 1	≤ 1	≤ 1	——
赤藓红（四碘荧光素）	<5mg/kg	不得检出	——	——
水分，%		≤ 5	3.8~5.0	3.8~5.0
铅，ppm	——	≤ 20	——	——
铝，ppm	——	≤ 20	——	——
其他溶剂，%	——	≤ 1.0	——	——
检测方法	高效液相色谱法	——	HPLC 色谱条件： 色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶，柱长 0.15 米，内径 4.6 毫米； 检测波长：265 nm； 流动相：80 %甲醇水。	HPLC 色谱条件： 色谱柱：4mm×30cm,填料 L3； 检测波长：254 nm； 流动相：正庚烷：正庚烷饱和水溶液：二氯甲烷：乙酸乙酯=6：6：3：5

表 5　25-羟基胆钙化醇企业标准

<table>
<tr><td colspan="2">技术指标</td><td>企业一（花园）</td><td>企业二（威尔潞威）</td><td>企业三（海能）</td><td>企业四（帝斯曼）</td></tr>
<tr><td colspan="2">化学名称</td><td>(3β,5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3，25-二醇一水化物</td><td>(3β,5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3，25-二醇一水化物</td><td>(3β,5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3，25-二醇一水化物</td><td>(3β,5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3，25-二醇一水化物</td></tr>
<tr><td colspan="2">含量（以 $C_{27}H_{44}O_2$•H_2O 计），%</td><td>≥94.0</td><td>≥94.0</td><td>≥94.0</td><td>≥94.0</td></tr>
<tr><td rowspan="2">有关物质</td><td>单一杂质（除预 25-羟基胆钙化醇外），%</td><td>≤1.0</td><td>≤1.0</td><td>≤1.0</td><td>≤1.0</td></tr>
<tr><td>1α，25-$(OH)_2$-VD_3，%</td><td>不得检出</td><td>——</td><td>——</td><td>——</td></tr>
<tr><td colspan="2">水分，%</td><td>3.8～5.0</td><td>3.8～5.0</td><td>3.8～5.0</td><td>3.8～5.0</td></tr>
<tr><td colspan="2">砷（以 As 计）/（mg/kg）</td><td>≤2</td><td>≤2</td><td></td><td>——</td></tr>
<tr><td colspan="2">铝/（mg/kg）</td><td>——</td><td>——</td><td>——</td><td>——</td></tr>
<tr><td colspan="2">重金属（以 pb 计）/（mg/kg）</td><td>≤10</td><td>≤20</td><td>≤20</td><td>——</td></tr>
<tr><td rowspan="3">溶剂残留</td><td>异丙醇</td><td>≤5000 ppm</td><td rowspan="3">≤1.0 %</td><td rowspan="3">——</td><td rowspan="3">——</td></tr>
<tr><td>丙酮</td><td>≤5000 ppm</td></tr>
<tr><td>三乙胺</td><td>≤1000 ppm</td></tr>
<tr><td colspan="2">检测方法</td><td>色谱柱：XDB C18, 250 mm ×4.6 mm，粒度5μm或性能相当者；
流动相：甲醇：水（85：15）
流速：1.5mL/min；
检测波长：265 nm；
进样量：20 μL。
柱温：35℃</td><td>色谱柱：C18柱，250 mm ×4.6 mm，粒度 5 μm或性能相当者；
流动相：甲醇：水（90：10）；
流速：1.0 mL/min；
检测波长：265 nm；
进样量：20 μL。</td><td>色谱柱：C18柱，柱长250 mm，内径 4.6 mm，粒度 5 μm或性能相当者；
流动相：甲醇+水=94+6；
流速：1.0 mL/min；
检测波长：264 nm；
进样量：20 μL。</td><td>色谱柱：C18柱，250 mm ×4.6 mm，粒度 5 μm或性能相当者；
流动相：甲醇：水（80：20）；
流速：1.0 mL/min；
检测波长：265 nm；
进样量：20 μL。</td></tr>
</table>

表 5　25-羟基胆钙化醇晶体企业标准（续）

技术指标		企业五（同辉）	企业六（威仕）	企业七（淳迪）	企业八（引航）
化学名称		——	——	(3β,5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3，25-二醇一水化物	(3β,5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3，25-二醇一水化物
含量（以C27H44O2•H2O 计）,%		——	——	≥94.0	≥94.0
有关物质	单一杂质（除预25-羟基胆钙化醇外），%	——	——	——	——
	1α，25-(OH)2-VD3，%	——	——	——	——
水分，%		——	——	≤5.0	≤5.0
砷（以As计）/（mg/kg）		——	——	≤10	≤3.0
铝/（mg/kg）		——	——	——	——
重金属（以pb计）/（mg/kg）		——	——	≤20	≤10.0
溶剂残留	异丙醇	——	——	——	——
	丙酮				
	三乙胺				
检测方法		——	——	色谱柱：C18柱，柱长250 mm，内径 4.6 mm，粒度 5 μm或性能相当者； 流动相：甲醇+水=85+15； 流速：1.5 mL/min； 柱温：35℃； 检测波长：265 nm； 进样量：20 μL。	色谱柱：Agilent SB-C18柱，150 mm×4.6 mm，粒度 5 μm或性能相当者； 流动相：乙腈：甲醇：水（81：9：10）； 流速：1.0 mL/min； 柱温：40℃； 检测波长：265 nm； 进样量：5 μL。

表 6 技术指标

项　　目		指标
25-羟基维生素 D_3 （$C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$）的含量， %		≥94.0
相关甾醇类物质	单个甾醇（除预 25-羟基胆钙化醇外），%	≤1.0
水分，%		3.8～5.0

表 7 卫生指标

项　　目	指标
总砷（As）/（mg/kg）	≤2
重金属（以 Pb 计）/（mg/kg）	≤20

3.3 25-羟基胆钙化醇的鉴别实验及代表性样品的鉴别结果

文件中规定了两种鉴别方法，红外光谱法和高效液相色谱法。

3.3.1 红外光谱法

称取 25-羟基胆钙化醇试样适量，加溴化钾研磨均匀，压片，在 4000 cm^{-1}～400cm^{-1} 内录制试样和对照品的红外光谱图。试样的红外吸收图谱应与对照品的图谱一致；对照品图谱见图 1，样品图谱见图 2、图 3、图 4、图 5，对照品和样品重叠图谱见图 6。

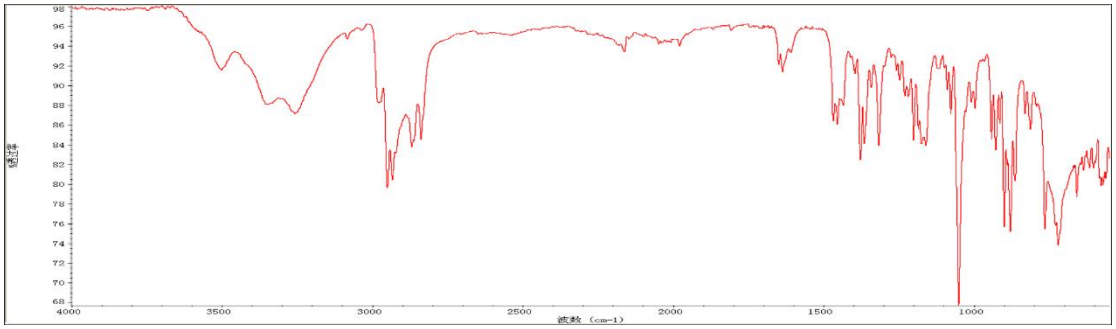


图 1 25-羟基胆钙化醇对照品红外光谱图

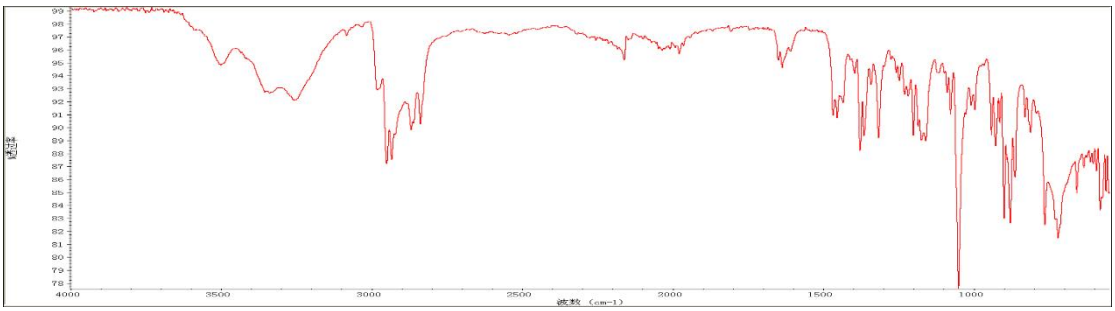


图 2　25-羟基胆钙化醇样品 1H 红外光谱图

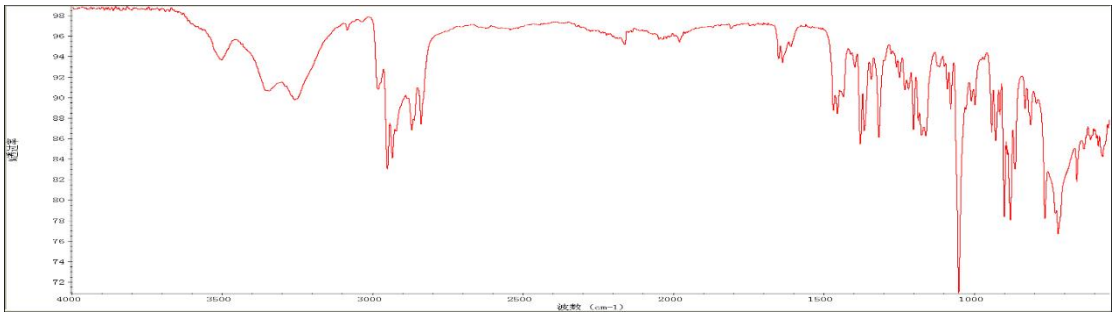


图 3　25-羟基胆钙化醇样品 2W 红外光谱图

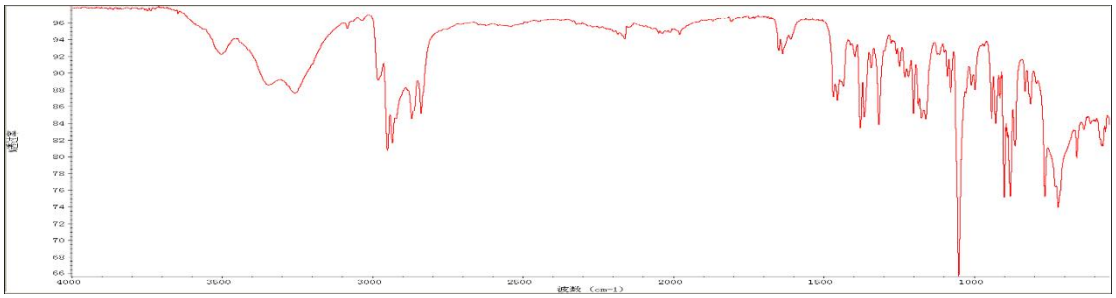


图 4 25-羟基胆钙化醇样品 3Y 红外光谱图

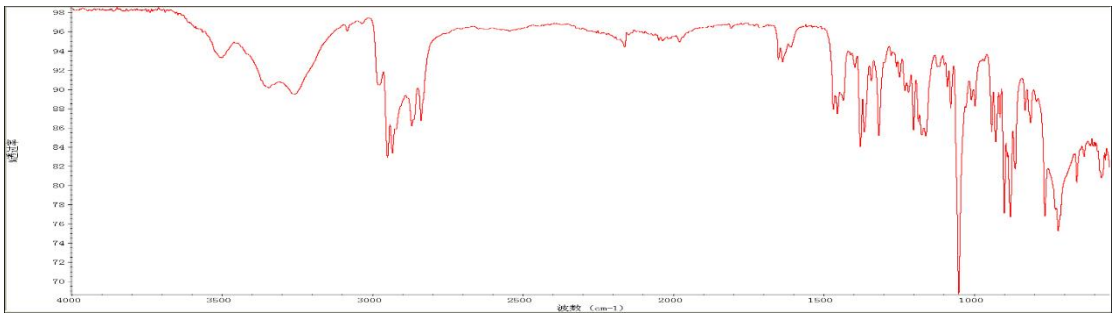


图 5　25-羟基胆钙化醇样品 4D 红外光谱图

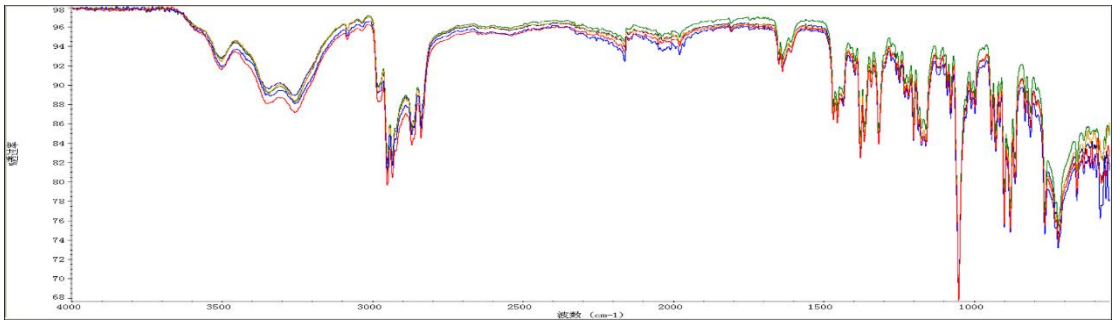


图 6　25-羟基胆钙化醇对照品和样品重叠红外光谱图

3.3.2　高效液相色谱法

按照含量测定色谱条件向色谱柱中注入 25-羟基胆钙化醇标准工作溶液和试样溶液，试样溶液中主峰的保留时间与标准溶液中 25-羟基胆钙化醇色谱峰的保留时间一致。标准工作溶液的色谱图见图 7、样品色谱图见图 8、图 9、图 10、图 11。

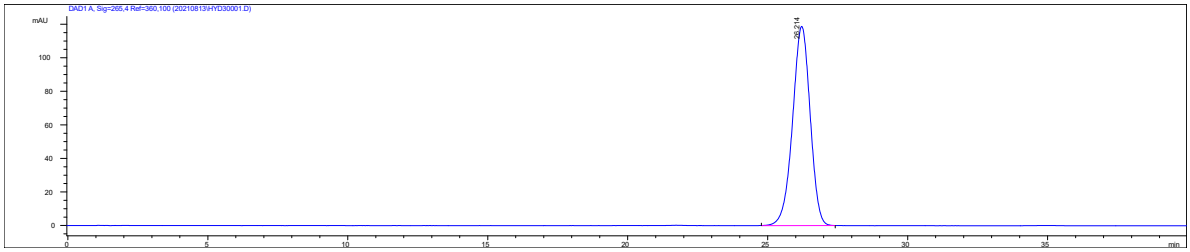


图 7　25-羟基胆钙化醇对照品色谱图

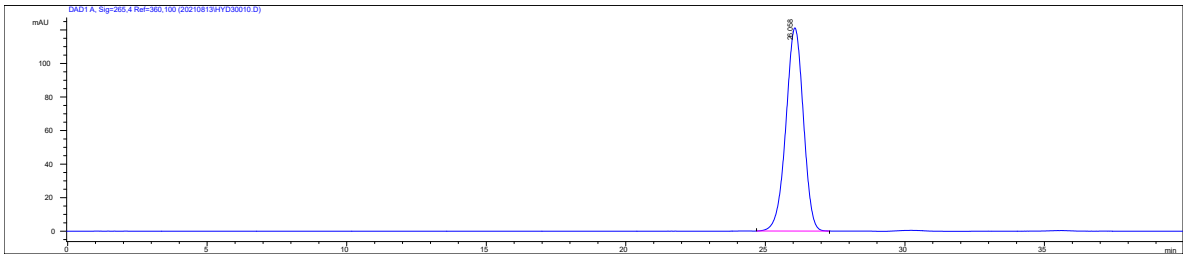


图 8　25-羟基胆钙化醇晶体样品 1H 色谱图

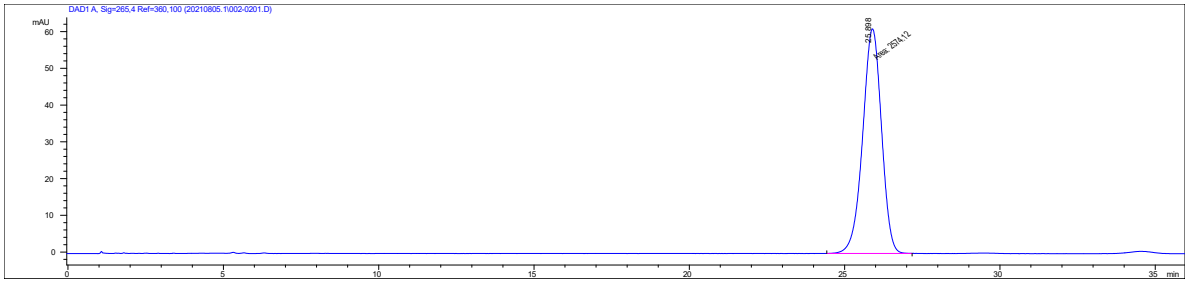


图 9　25-羟基胆钙化醇晶体样品 2W 色谱图

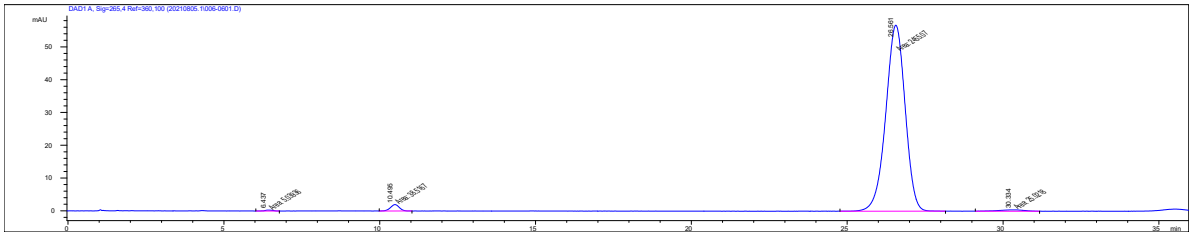


图 10　25-羟基胆钙化醇晶体样品 3Y 色谱图

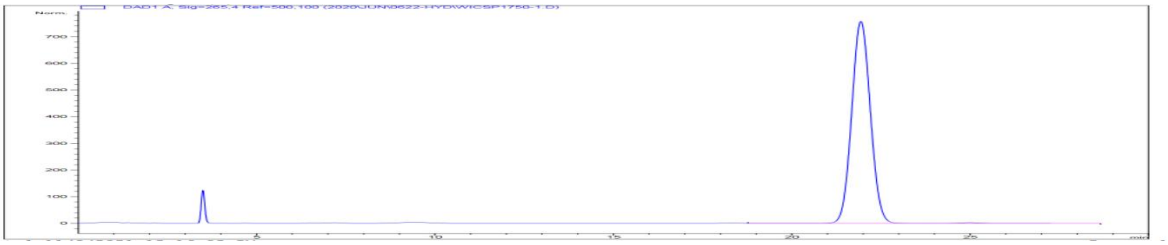


图 11　25-羟基胆钙化醇晶体样品 4D 色谱图

3.4　25-羟基胆钙化醇含量

3.4.1　测定方法研究

3.4.1.1　紫外吸收波长选择

25-羟基胆钙化醇为白色或类白色晶体，几乎不溶于水，易溶于乙醇、油脂，对空气、热和光敏感，在波长 265 nm、212 nm 处有光谱吸收，因紫外吸收光谱越靠近 200 nm 处，杂质吸收越多，且波长 265 nm 处吸收最强，紫外吸收光谱扫描图见图 12，因此检测波长选择 265 nm；文献及企业质量标准中，含量检测方法采用反相高效液相色谱法，本文件中采用反相高效液相色谱法检测含量。

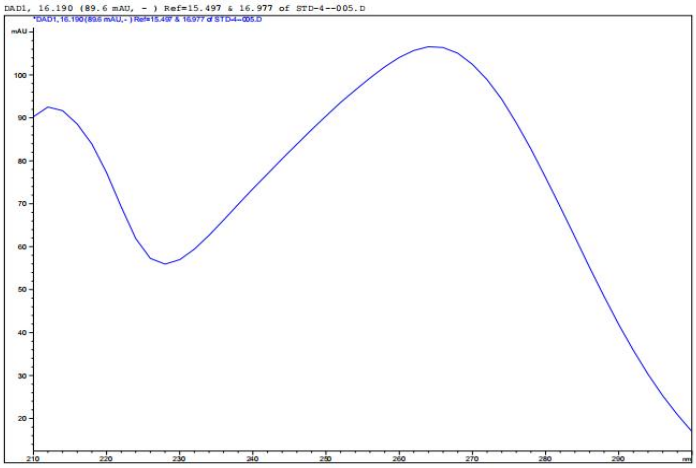


图 12 紫外吸收光谱扫描图

3.4.1.2　原理

试样中 25-羟基胆钙化醇，用甲醇溶解，经色谱柱分离，用液相色谱测定,以 265nm 为检测波长，经流动相洗脱分离后，外标法计算 25-羟基胆钙化醇的含量。

实验所用试剂、溶液、标准溶液的配置和仪器设备见文本。

3.4.1.3　试样溶液的制备

平行做两份试验，称取样品适量 50 mg（精确至 0.01 mg），置于 50 mL 棕色容量瓶中，加入约 40 mL 甲醇溶解并定容至刻度，吸取 5 mL 置于 50 mL 容量瓶中，用稀释剂定容。混匀,用 0.2μm 滤膜过滤,供高效液相色谱仪分析。

3.4.1.4　参考色谱条件

色谱柱： C18, 柱长 150 mm，内径 4.6mm，粒径 5 μm，或性能相当者。

流动相：甲醇+水=80+20。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：265 nm。

进样量：20 μL。

3.4.1.5　结果计算

试样中25-羟基胆钙化醇（$C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$）含量以质量分数$w_1$计，数值以百分率（%）表示，按式（1）计算：

$$w_1 = \frac{A \times V \times C}{A_{ST} \times m \times 10^6} \times 100 \quad \ldots\ldots (1)$$

式中：

A ——试样溶液中25-羟基胆钙化醇峰面积；

A_{ST}——标准溶液中25-羟基胆钙化醇峰面积；

V ——试样溶液的稀释总体积，单位为毫升（mL）；

C ——25-羟基胆钙化醇标准溶液的的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）”；

m ——试样质量，单位为克（g）；

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留至小数点后1位。

3.4.1.6 标准溶液稳定性试验

按照文件给出的方法，配制标准溶液，上机浓度为 80.50 μg/mL，保存条件-20℃，试验数据见表 8，根据实验数据，峰面积相对标准偏差 1.22 %，标准溶液在 6 个月内稳定。

表 8 标准溶液稳定性试验

标准品信息	实验日期	25-羟基维生素 D3
80.50μg/mL	2021.07.02	3916852
	2021.08.02	3855630
	2021.09.01	3921384
	2021.10.09	3954121
	2021.11.02	3894280
	2021.11.29	3990831
	2021.12.27	3904599
	2022.01.12	3845409

3.4.2 不同厂家实际样品的测定结果

检测不同厂家、26 批次样品，检测结果见表 9，最小值 96.3 %，最大值 102.4 %，含量均大于 94 %，平行测定结果相对偏差不大于 1 %，符合法规和文件中的规定。

表 9 25-羟基胆钙化醇含量测定结果

序号	编号	含 量（%)	平均含量（%）	相对偏差（%）	序号	编号	含 量（%）	平均含量（%）	相对偏差（%）
1	W1	100.9	100.6	0.3	14	H7	99.0	99.4	0.5
		100.2					99.9		
2	W2	100.9	100.4	0.4	15	Y1	98.9	98.5	0.3
		100.0					98.2		
3	W3	101.0	100.6	0.4	16	Y2	98.5	98.4	0.05
		100.1					98.4		
4	W4	102.4	101.8	0.6	17	D1	97.1	97.2	0.1
		101.1					97.3		
5	W5	99.8	100.0	0.2	18	D2	97.7	97.1	0.6
		100.2					96.6		
6	W6	99.7	99.5	0.2	19	D3	98.7	98.9	0.2
		99.3					99.1		
7	W7	99.5	99.7	0.2	20	D4	98.5	98.7	0.2
		99.9					98.9		
8	H1	99.2	99.9	0.7	21	D5	98.1	97.9	0.2
		100.6					97.7		

表 9 25-羟基胆钙化醇含量测定结果（续）

序号	编号	含 量（%)	平均含量（%）	相对偏差（%）	序号	编号	含 量（%）	平均含量（%）	相对偏差（%）
9	H2	99.7	99.2	0.5	22	D6	99.0	98.6	0.4
		98.7					98.2		
10	H3	99.9	99.8	0.1	23	D7	98.5	98.0	0.5
		99.7					97.5		
11	H4	98.9	99.2	0.3	24	D8	97.9	97.3	0.6
		99.5					96.7		
12	H5	99.3	99.5	0.2	25	YH	96.5	96.3	0.2
		99.7					96.1		
13	H6	101.1	101.2	0.1	26	YH	96.3	96.5	0.2
		101.4					96.7		

3.5 相关甾醇类物质的测定

如前所述 25-羟基胆钙化醇在制备和放置过程中可能产生一些相关的甾醇类物质，鉴于欧盟与 FDA 在该产品的法规中均规定了限量，为保证产品质量，我们也研究了合适的检测方法，考察了实际样品中这些相关物质的存在情况与大致含量，以证实这些物质含量的合理性。其中预 25-羟基胆钙化醇是由于温度的影响由 25-羟基胆钙化醇转化而来的，参照了维生素 D_3 结晶相关标准（GB 1903.50-2020、中国药典 2020 版），不将预 25-羟基胆钙化醇作为结晶产品的相关物质来处理。

3.5.1 检测方法确定

3.5.1.1 对照品溶液的制备

准确移取 25-羟基胆钙化醇标准贮备溶液液（文件 7.3.2.5）5.0 mL 于 50 mL 的棕色容量瓶中，用稀释剂稀释定容。临用时现配。

3.5.1.2 液相色谱系统适用性

移取 5.0 mL25-羟基胆钙化醇标准溶液（3.5.1.1）倒入具有螺旋瓶盖的 10 mL 试管中，旋紧瓶盖，置于 50℃恒温水浴中，放置 3 h 后取出，冷却至室温，按照（3.4.1.4）参考色谱条件，将 20 μL 标准工作溶液注入高效液相色谱仪，进样 6 次，记录色谱图，预 25-羟基胆钙化醇与 25-羟基胆钙化醇的相对保留时间约为 1.5。6 次进样获得的色谱图中，25-羟基胆钙化醇峰面积的相对标准偏差不超过 1%，且 25-羟基胆钙化醇与预 25-羟基胆钙化醇的分离度至少为 5.0。如达不到分离度要求，需要调整流动相组分的比例，

以满足对分离度的要求。得到 25-羟基胆钙化醇的色谱峰和预 25-羟基胆钙化醇色谱峰。色谱图见图 13。

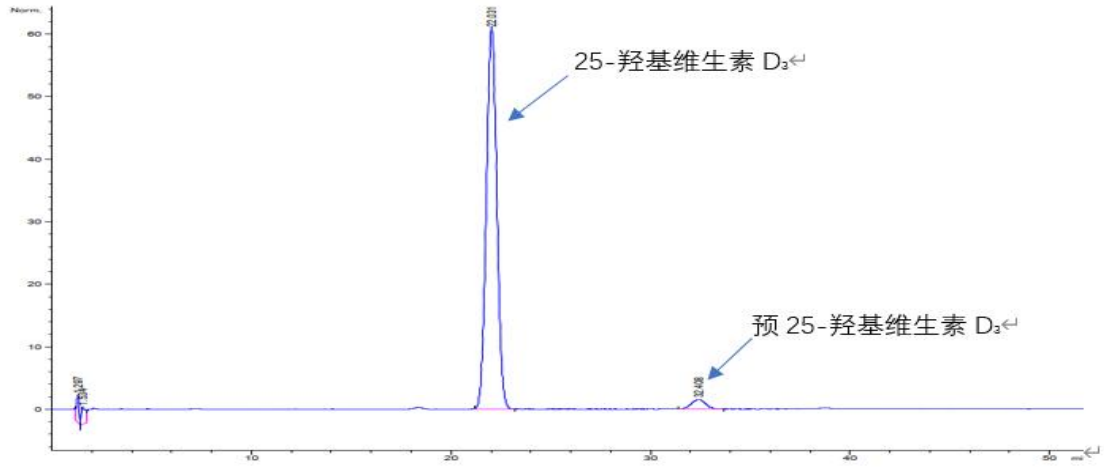


表 13 液相色谱系统适用性试验色谱图

3.5.1.3 相关甾醇类物质的定性与定量

3.5.1.3.1 相关物质的定性

称取试样约 50 mg（精确至 0.01 mg），置于 50 mL 棕色容量瓶中，加入约 40 mL 甲醇溶解并定容至刻度，混匀，作为试样溶液。

吸取 1.0 mL 上述试样溶液于 100 mL 的容量瓶中，用稀释剂（正文 7.3.2.4）稀释定容至刻度，作为对照溶液。

在本标准规定的测定主（25-羟基胆钙化醇）含量的色谱条件下，测定得到 25-羟基胆钙化醇相关物质测定的色谱图见图 14。

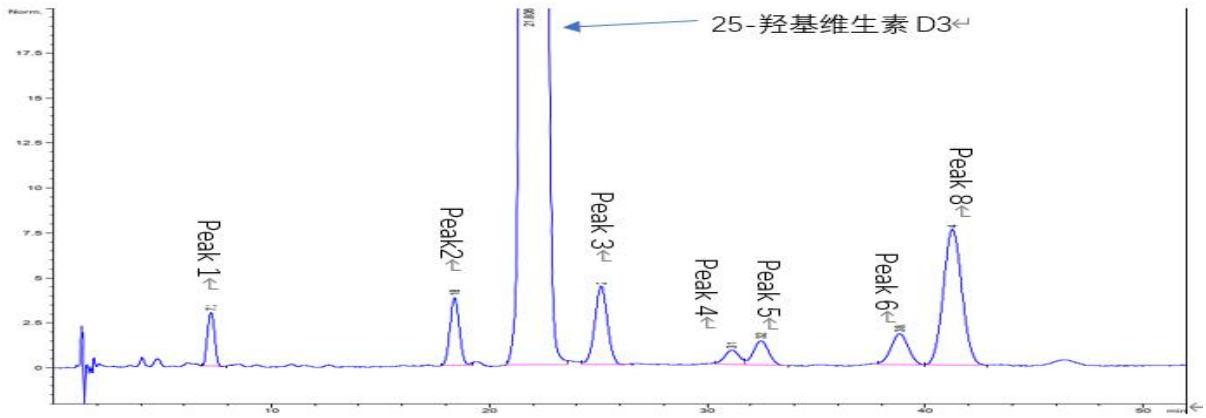


图 14 25-羟基维生素 D3 相关甾醇类物质测定的色谱图

在上述规定的条件下，图中各种相关甾醇类物质色谱峰与 25-羟基胆钙化醇的相对

保留时间，见表 10。

表 10　相关甾醇类物质与 25-羟基维生素 D3 的相对保留时间

相关甾醇类物质	相对于25-羟基维生素D_3的保留时间
脱氢（Dehydrogenation）- 25-羟基胆钙化醇	0.84
速甾 （Tachysterol）-25-羟基胆钙化醇	1.15
异-速甾（Isotachysterol）- 25-羟基胆钙化醇	1.43
预 （Pre）-25-羟基胆钙化醇	1.49
5,6反式（ transvitamin）- 25-羟基胆钙化醇	1.78
异（Isovitamin）- 25-羟基胆钙化醇	1.89

色谱图中有可能会出现除这 6 种甾醇类物质之外的色谱峰，但并非所出现的色谱峰一定是相关甾醇类物质峰。判断是否是相关甾醇类物质的手段是利用二极管矩阵检测器，采集该峰在 230～330nm 范围内光谱图。将采集到的光谱图与用二极管矩阵检测器采集对照溶液色谱峰的光谱图作比较，如果光谱图类似，将该未知峰作为相关甾醇类物质处理。

3.5.1.3.2　相关甾醇类物质的定量

将对照溶液注入高效液相色谱仪，得出 1% 试样溶液的主峰面积，试样溶液中各杂质蜂（预 25-羟基胆钙化醇除外）与对照溶液中主峰面积比较，按规定应不超过该主峰的面积，即 25-羟基胆钙化醇含量的 1.0 %。

3.5.2　不同厂家 25-羟基胆钙化醇产品中相关甾醇类物质的测定

按上述方法测定各厂家实际样品中相关甾醇类物质的结果见表 11。

表 11 25-羟基胆钙化醇相关甾醇类物质的测试结果

杂质	其他甾醇类杂质	脱氢 25-羟基胆钙化醇	速甾-25-羟基胆钙化醇	异-速甾-25-羟基胆钙化醇	预-25-羟基胆钙化醇	反式-25-羟基胆钙化醇	异 25-羟基胆钙化醇
保留时间（min）	6.7	16.9	22.9	28.5	29.6	35.3	37.6
样品 1	0.07%	0.42%	0.12%	0.30%	0.32%	0.62%	0.31%
样品 2	0.04%	0.41%	0.13%	0.23%	0.39%	0.77%	0.53%
样品 3	0.07%	0.33%	0.12%	0.24%	0.53%	0.59%	0.33%
WICS1750	—	0.22%	0.30%	0.07%	0.51%	0.18%	0.74%
WICS1751	—	0.20%	0.31%	0.08%	0.61%	0.19%	0.73%
WICS1766	—	0.16%	0.36%	0.05%	0.78%	0.15%	0.65%

从上表不难看出：25-羟基胆钙化醇产品中，各种相关甾醇类物质含量均低于 1.0％。证明将各种相关甾醇类杂质限量定为 1.0 ％，是适合的。

鉴于预-25-羟基胆钙化醇的含量也低于 1.0％,低于允许的标准偏差 2％。因此在这种情况下不必校准 25-羟基胆钙化醇的含量。

3.6 水分的测定

称取 25-羟基胆钙化醇试样 100 mg（精确到 0.1 mg），按 GB/T 26626 规定执行。检测结果见表 12。

表 12 水分检测结果

序号	样品编号	水分含量（%）
1	W1	4.46
2	W2	4.46
3	W3（210515）	4.54
4	W4（210525）	4.50
5	W5（210421）	4.48
6	W6	4.50
10	H1	4.37
11	H2	4.67
12	H3	4.34
13	H4	4.59
14	Y1	4.54
15	D1	4.14
16	D2	4.36
17	D3	4.16
18	D4	4.41
19	YH1	4.26
20	YH2	4.19

25-羟基胆钙化醇水分检测结果均在 3.8%-5.0%范围内，符合文件中规定。

3.7　总砷的测定

称取试样 2.5 g（精确至 0.001 g），按照 GB/T 13079—2006 中第 5 章测定，试样前处理按照 GB/T 13079——2006 中 5.4.1.3 规定执行，检测结果见表 13，均小于最低检测浓度 0.04 mg/kg，国外文献对总砷限量没有规定，参考国内企业标准，本文件规定 25-羟基胆钙化醇总砷不大于 2 mg/kg。

表 13　砷检测结果

序号	产品代码	砷（mg/kg）
1	W1	<0.04
2	W2	<0.04
3	W3	<0.04
4	W4	<0.04
5	H1	<0.04
6	H2	<0.04
7	H3	<0.04
8	H4	<0.04
9	D1	<0.04
10	D2	<0.04
11	D3	<0.04
12	D4	<0.04
13	Y1	<0.04
14	Y2	<0.04
15	Y3	<0.04
16	HY	<0.04
17	HY	<0.04
18	HY	<0.04

3.8 重金属的测定

FDA 对医药级的 25-羟基胆钙化醇要求重金属<20 mg/kg，欧盟和欧州药典对重金属限量没有规定，按照文件中规定的测定重金属的检测方法,重金属均不大于 20 mg/kg，参考企业标准中规定的限量，规定重金属不大于 20 mg/kg。检测结果见表 14。

表 14 重金属检测结果

序号	产品代码	重金属（mg/kg）
1	W1	<20
2	W2	<20
3	W3	<20
4	W4	<20
5	H1	<20
6	H2	<20
7	H3	<20
8	H4	<20
9	D1	<20
10	D2	<20
11	D3	<20
12	D4	<20
13	Y1	<20
14	Y2	<20
15	Y3	<20
16	HY	<20
17	HY	<20
18	HY	<20

3.9 保质期

未开启包装的产品，在规定的包装、运输、贮存条件下，产品保质期应与标签标识的保质期一致。

4 与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

产品含量、相关甾醇类物质（单个甾醇）检测方法采用欧洲药典、文献和企业标准中规定的方法，其他相关技术指标的规定及检测方法综合考虑国内外质量标准的规定，标准达到国内外同类标准先进水平。

5 采用国际标准和国外先进标准的程度

无国际标准。

6 与现行法律法规和强制性标准的关系

本标准的制定符合现行法律、行政法规，配套的推荐性标准包括 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 6040 «红外光谱分析方法通则»、GB/T 6682 «分析实验室用水规格和试验方法»、GB/T 8170 «数值修约规则与极限数值的表示和判定»、GB 10648 «饲料标签»、GB/T 13079-2006 «饲料中总砷的测定»、GB/T 14699.1 «饲料 采样»、GB/T 26626 «动植物油脂 水分含量测定 卡尔费休法（无吡啶）»。

7 重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

8 涉及专利的有关说明

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。

9 贯彻标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

建议设置自发布日期至实施日期的过渡期，并在过渡期期间，按照标准要求完成技术改造、成本投入、老旧产品退出市场。

对于违反标准的行为，依据《中华人民共和国标准化法》、《中华人民共和国标准化法实施条例》、《中华人民共和国产品质量法》（以下简称《质量法》）等法律、行政法规的规定处罚。

本标准颁布以后，推荐饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇的相关管理要求符合本产品标准。

10 废止现行有关标准的建议

无现行标准。

11 其他应予说明的事项

对于本标准中 25-羟基胆钙化醇和预 25-羟基胆钙化醇的相关问题，在此说明一下。25-羟基胆钙化醇在一定温度下会转化少量的预 25-羟基胆钙化醇，温度越高，越容易产生。本标准规定了晶体贮存的温度，建议 25-羟基胆钙化醇晶体保存在较低的温度环境中。在维生素 D3 产品的相关标准中，对于维生素 D3 的纯品，计算含量时仅计算维生素 D3(见参考文件[4])。

国外标准中 25-羟基胆钙化醇晶体的杂质控制并没有 1α,25-二羟基胆钙化醇这一项，按照本标准的规定，以化学制备的饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇（25-羟基维生素 D3 ）晶体为原料制备的饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇是不含有 1α,25-二羟基胆钙化醇；EU 和 FDA 均未对该物质单独做出规定，在本标准中规定了相关单个甾醇类物质的限度为 1%，即使存在少量的 1α,25-二羟基胆钙化醇，可将其作为“其他相关的甾醇类物质”考虑，在 1%限度下，假如 1α,25-二羟基胆钙化醇的量达到限度的 1%，根据表 2 推算，在配合饲料或全混合日粮中的推荐量水平下，猪饲料中引入的 1α,25-二羟基胆钙化醇的量不超过 0.125 ppb,鸡饲料中引入的 1α,25-二羟基胆钙化醇的量不超过 0.5 ppb,不会对产品产生安全性问题。本文件不将 1α,25-二羟基胆钙化醇纳入指标。

参考文献：

[1] 姬浩起, 张志飞, 鲍颖颖, 等. 哺乳动物妊娠期钙代谢的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(12): 21-26.

[2] 徐宏建, 李昕, 王丽华, 等. 25 羟基维生素 D3 的生理功能及其在动物生产中的应用[J]. 动物营养学报 2020, 32(4): 1491-1498.

[3] GB1903.50-2020 食品安全国家标准食品营养强化剂 胆钙化醇（维生素 D_3）[S]

[4] GB 9840-2017 饲料添加剂 维生素 D_3（微粒）[S].

[5] GB 7300.202-2019 饲料添加剂 第 2 部分: 维生素及类维生素 维生素 D_3 油[S].