For Internal Use Only

ICS 65.120
CCS B 46

NY

中 华 人 民 共 和 国 农 业 行 业 标 准

NY/T XXXX-XXXX

饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇
（25-羟基维生素 D_3）

Feed additive 25- Hydroxycholecalciferol
(25-Hydroxy Vitamin D_3)

（公开征求意见稿）

××××-××-××发布 ××××-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 发布

For Internal Use Only

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。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、帝斯曼维生素（上海）有限公司、山东海能生物工程有限公司、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。

本文件主要起草人：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、张健、宋艳、石宝石、唐飞、钱国平、姚园园、张辉。

饲料添加剂　25-羟基胆钙化醇（25-羟基维生素 D_3 ）

1　范围

本文件给出了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”）的化学名称、分子式、相对分子质量和结构式，规定了饲料添加剂25-羟基胆钙化醇产品的技术要求、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期，描述了采样和试验方法。

本文件适用于以25-羟基-7-去氢胆固醇为起始原料，经化学制备、精制获得的25-羟基胆钙化醇的生产、销售、检测、认证和监管等。

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 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 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 26626-2011 动植物油脂 水分含量测定 卡尔费休法（无吡啶）

3　术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4　化学名称、分子式、相对分子质量和结构式

4.1　化学名称

(5Z,7E)-9,10-开环胆甾-5,7,10(19)-三烯-3β,25-二醇一水合物；CAS 号：63283-36-3。

4.2　分子式

$C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$

4.3　相对分子质量

418.7

注：按2019年国际相对原子质量。

4.4　结构式

见图 1。

For Internal Use Only

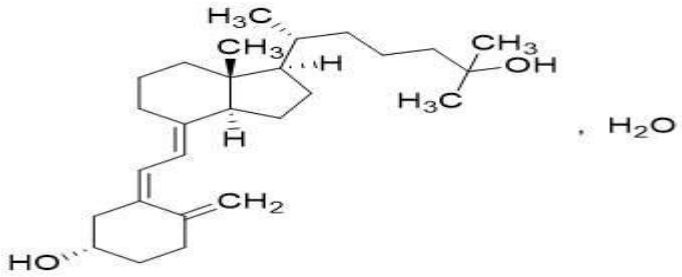


图1　25-羟基胆钙化醇结构式

5　技术要求

5.1　外观

白色或类白色粉末状晶体。

5.2　鉴别

应符合红外光谱法或高效液相色谱法的要求。

5.3　理化指标

应符合表1规定。

表1　理化指标

项　　目		指标
25-羟基胆钙化醇　（以 $C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$ 计）/ %		≥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

5.4　卫生指标

应符合表2的规定。

表2 卫生指标

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

6　取样

按GB/T 14699.1规定执行。

7　试验方法

7.1　外观检验

取适量样品置于清洁干燥的白瓷盘中，在自然光线下观察其色泽与形态。

7.2　鉴别

7.2.1　红外光谱法

取25-羟基胆钙化醇试样与标准品各约2 mg，分别与225 mg溴化钾进行磨碎压片，按照GB/T 6040规定，用红外吸收光谱仪在4000 cm^{-1}～400 cm^{-1}波数范围内测定吸收光谱，试样所得的红外扫描光谱图与标准品的红外扫描光谱图一致，见附录A的图A.1。

7.2.2 高效液相色谱法

25-羟基胆钙化醇按7.3试验,试样溶液7.3.4.1色谱图中主峰的保留时间应与标准工作溶液（7.3.2.6）主峰的保留时间一致；相对偏差≤ ±2.5%。25-羟基胆钙化醇标准溶液色谱图见附录B的图B.1。

7.3 25-羟基胆钙化醇含量测定

7.3.1 原理

试样用甲醇溶解后，经色谱柱分离，在波长265 nm下，用高效液相色谱（配有二极管矩阵检测器或紫外检测器）测定，外标法计算。

7.3.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

7.3.2.1 水：GB/T 6682 一级。

7.3.2.2 甲醇。

7.3.2.3 甲醇：色谱纯。

7.3.2.4 稀释剂：甲醇（7.3.2.2）+水（V+V）=80+20。

7.3.2.5 标准贮备溶液（1 mg/mL）：称取25-羟基胆钙化醇一水化合物标准品（CAS号：63283-36-3，纯度不低于98.0 %）25 mg（精确至0.01 mg）于25 mL的棕色容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度。贮备溶液于棕色密闭的试剂瓶内，在-20℃的条件下，可保存6个月。

7.3.2.6 标准工作溶液:准确移取标准贮备溶液(7.3.2.5)5 mL于50 mL的棕色容量瓶中,用稀释剂(7.3.2.4)稀释定容。临用时现配。

7.3.2.7 微孔滤膜：有机系0.2 μm。

7.3.3 仪器设备

7.3.3.1 高效液相色谱仪：配有二极管矩阵检测器或紫外检测器。

7.3.3.2 分析天平：感量0.1 mg，0.01 mg。

7.3.4 试验步骤

7.3.4.1 试样溶液的制备

注意：实验过程在避光条件下进行。

平行做两份试验。称取试样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（7.3.2.2）溶解并定容至刻度，准确吸取5.00 mL置于50 mL容量瓶中，用稀释剂（7.3.2.4）定容。混匀，用0.2 μm滤膜过滤,供高效液相色谱仪分析。

7.3.4.2 色谱参考条件

色谱柱：Zorbax Eclipse XDB[1] C18,4.6mm×150 mm，5 μm，或性能相当者。

流动相：甲醇（7.3.2.3）+水（V+V）=80+20。

流速：1.0 mL/min。

检测波长：265 nm。

进样量：20 μL。

7.3.4.3 测定

在仪器最佳状态下，将标准工作溶液（7.3.2.6）及试样溶液（7.3.4.1）进样，用液相色谱测定，以保留时间定性，按外标法以色谱峰面积定量。

7.3.4.4 试验数据处理

1） Zorbax Eclipse XDB 是由安捷伦（Agilent）科技有限公司提供的色谱柱的商品名。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

For Internal Use Only

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$w$计，数值以百分率（%）表示，按式（1）计算：

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

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。

7.3.4.5 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算数平均值的绝对差值不大于该算术平均值的1 %。

7.4 25-羟基胆钙化醇中相关甾醇类物质测定

7.4.1 原理

将一定量的试样溶于甲醇，用液相色谱法分离，以相对保留时间定性，测量试样溶液色谱图上各相关物质的峰面积与对照溶液25-羟基胆钙化醇的峰面积比较，计算各相关物质。

7.4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

7.4.2.1 水：GB/T 6682 一级。

7.4.2.2 甲醇。

7.4.2.3 甲醇：色谱纯。

7.4.2.4 稀释剂：甲醇（7.3.2.2）+水（V+V）=80+20。

7.4.2.5 微孔滤膜：有机系0.2 μm。

7.4.3 仪器设备

7.4.3.1 高效液相色谱仪：配有二极管矩阵检测器或紫外检测器。

7.4.3.2 分析天平：感量0.1 mg，0.01 mg。

7.4.3.3 恒温水浴锅。

7.4.4 试验步骤

7.4.4.1 试样溶液

称取25-羟基胆钙化醇试样约50 mg（精确至0.01 mg），置于50 mL棕色容量瓶中，加入甲醇（7.5.1.2）溶解并定容至刻度，混匀。

7.4.4.2 对照溶液

准确移取1 mL试样溶液(7.4.4.1)于100 mL的容量瓶中，用稀释剂（7.4.2.4）稀释至刻度摇匀。

7.4.4.3 色谱参考条件

同7.3.4.2。

7.4.4.4 色谱系统适用性试验

移取5.0 mL25-羟基胆钙化醇标准工作溶液（7.3.2.6）倒入具有螺旋瓶盖的10 mL螺口试管中，旋紧瓶盖，置于50℃恒温水浴中，放置3 h后取出，冷却至室温，将试管内的溶液适量装入进样小瓶，按7.4.4.3的条件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-羟基胆钙化醇的保留时间相比，其相对保留时间约为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不应小于5.0。如达不到分离度要求，需要调整流动相组分的比例，以符合对分离度的要求。色谱图参见附录C的图C.1。

7.4.4.5 测定

按7.4.4.3的条件，分别取试样溶液（7.4.4.1）和对照溶液（7.4.4.2）注入液相色谱仪，记录色谱图至25-羟基胆钙化醇的保留时间的2.5倍。试样溶液（7.4.4.1）色谱图中如有表3中的相关物质（预25-羟基胆钙化醇外），各相关物质峰面积不得大于对照溶液（7.4.4.2）25-羟基胆钙化醇峰面积（1.0%）。相关物质的液相色谱图见附录D的图D.1。

表3 相关物质与25-羟基胆钙化醇的相对保留时间

相关物质	与25-羟基胆钙化醇保留时间的比值
脱氢-25-羟基胆钙化醇	0.84
速甾-25-羟基胆钙化醇	1.15
异-速甾-25-羟基胆钙化醇	1.43
预-25-羟基胆钙化醇	1.49
反式-25-羟基胆钙化醇	1.78
异-25-羟基胆钙化醇	1.89

7.5 水分

称取试样100 mg（精确至0.1 mg），按GB/T 26626-2011规定执行。

7.6 总砷

称取试样2.5 g（精确到0.001 g），按GB/T 13079-2006中第5章测定，样品前处理按GB/T 13079-2006中5.4.1.3规定执行。

7.7 重金属

7.7.1 试剂或材料

7.7.1.1 硫酸。注意：硫酸是强腐蚀液，操作者需戴防护眼镜、手套，以防灼伤。

7.7.1.2 硝酸。

7.7.1.3 盐酸。

7.7.1.4 乙醇。

7.7.1.5 铅标准溶液：1000 μg/mL，称取硝酸铅 0.1599 g，置 1000 ml 量瓶中，加硝酸 5 ml 与水 50 ml 溶解后，用水稀释至刻度，摇匀，作为贮备液（按 GB/T 602 的规定）。或者市售铅单元素标准溶液。

7.7.1.6 氨水溶液（10 %）：取氨水 40 mL，加水适量使成 100 mL，摇匀（按 GB/T 603 制备）。

7.7.1.7 盐酸溶液 I：取盐酸 63 mL，加水适量使成 100 mL，摇匀。

7.7.1.8 盐酸溶液 II：取盐酸 18 mL，加水适量使成 100 mL，摇匀。

7.7.1.9 硫化钠溶液：取硫化钠 100 g，加水使溶解成 1000 mL。

7.7.1.10 乙酸盐缓冲液（pH 3.5）：取乙酸铵 25 g，加水 25 mL 溶解，加盐酸溶液 I（7.10.1.7）38 mL，用盐酸溶液 II（7.7.1.8）或氨水溶液（7.7.1.6）准确调节 pH 值至 3.5（电位计指示），用水稀释至 100 mL，摇匀。

7.7.1.11 酚酞指示液：取酚酞 1 g，加乙醇 100 ml 使溶解，即得（按 GB/T 603 制备）。变色范围 pH 8.3～10.0(无色→红)。

7.7.1.12 铅标准工作溶液：精密量取铅标准溶液（7.7.1.5）2 mL，置 100 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀（每毫升相当于 20 μg 的 Pb）。

7.7.2 仪器设备

7.7.2.1 分析天平：感量 0.1 mg。

For Internal Use Only

7.7.2.2 高温炉。

7.7.2.3 纳氏比色管：25 mL。外表面应无划痕，色泽一致，管内径和刻度线高度均匀一致。

7.7.3 试验步骤

7.7.3.1 试样溶液制备

称取试样 1 g（精确至 1 mg），置瓷坩埚中，缓缓炽灼至完全炭化，放冷。加硫酸（7.7.1.1）0.5 mL～1 mL 使湿润，低温加热至硫酸蒸气除尽后，在 500℃炽灼使完全灰化，放冷。加硝酸（7.7.1.2）0.5 mL，蒸干至氧化氮蒸气除尽后，放冷。加盐酸（7.7.1.3）2.0 mL，置水浴上蒸干后加水 15 mL，滴加氨水溶液（7.7.1.6）至对酚酞指示液（7.7.1.11）显微红色，再加乙酸盐缓冲液（7.7.1.10）2.0 mL，微热溶解后，移置纳氏比色管，加水稀释成 25 mL，作为待测管。

7.7.3.2 标准比色溶液制备

另取制备试样溶液的试剂硫酸（7.7.1.1）0.5 mL~1 mL，置瓷坩埚中低温加热至硫酸蒸气除尽后，加硝酸（7.7.1.2)0.5 mL，蒸干至氧化氮蒸气除尽后，放冷。加盐酸(7.7.1.3)2.0 mL，置水浴上蒸干后加水 15 mL，滴加氨水溶液(7.7.1.6)至对酚酞指示液(7.7.1.11)显微红色，再加乙酸盐缓冲液(7.7.1.10)2.0 mL 微热溶解后，移置纳氏比色管中，加铅标准工作溶液（7.7.1.12）1.00 mL，再用水稀释成 25 mL，作为标准管。

7.7.3.3 测定与结果判定

在甲、乙两管中分别加硫化钠溶液（7.7.1.9）各 5 滴，摇匀，放置 2 min，同置白纸上，自上向下透视，肉眼观察比较甲管与乙管的颜色，如乙管所显颜色未深于甲管，则判定为符合规定。

8 检验规则

8.1 组批

以相同材料、相同生产工艺、连续生产或同一班次生产的同一规格的产品为一批，每批不应少于5 kg。

8.2 出厂检验

8.2.1 每批产品应经企业质检部门检验合格并附合格证后方可出厂。

8.2.2 检验项目：外观和性状、25-羟基胆钙化醇含量、水分。

8.3 型式检验

型式检验项目为第5章规定的所有项目。在正常生产情况下，每半年至少进行1次型式检验。有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

a）产品定型投产时；

b）生产工艺、配方或主要原料来源有较大改变，可能影响产品质量时；

c）停产3个月以上，重新恢复生产时；

d）出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；

e）饲料行政管理部门提出检验要求时。

8.4 判定规则

8.4.1 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。

8.4.2 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时，可自同批产品中重新加倍取样进行复检。若复检结果仍不符合本文件规定，则判定该批产品不合格。

8.4.3 各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 中修约值比较法执行。

9 标签、包装、运输和贮存

9.1 标签

按GB 10648执行。

9.2 包装

包装材料应无毒无害并符合相应的标准要求，25-羟基胆钙化醇应密闭避光充氮或真空包装。

9.3 运输

在运输过程中应防潮、防高温、防止包装破损，搬运装卸,小心轻放,不应与有毒有害物质混运。

9.4 贮存

贮存时防止日晒、雨淋、不应与有毒有害物质混储。25-羟基胆钙化醇在8℃以下，避光贮存，开封后尽快用完。

10 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。

For Internal Use Only

附录 A
（资料性）
25-羟基胆钙化醇标准品红外光谱图

25-羟基胆钙化醇标准品红外光谱图见图 A.1。

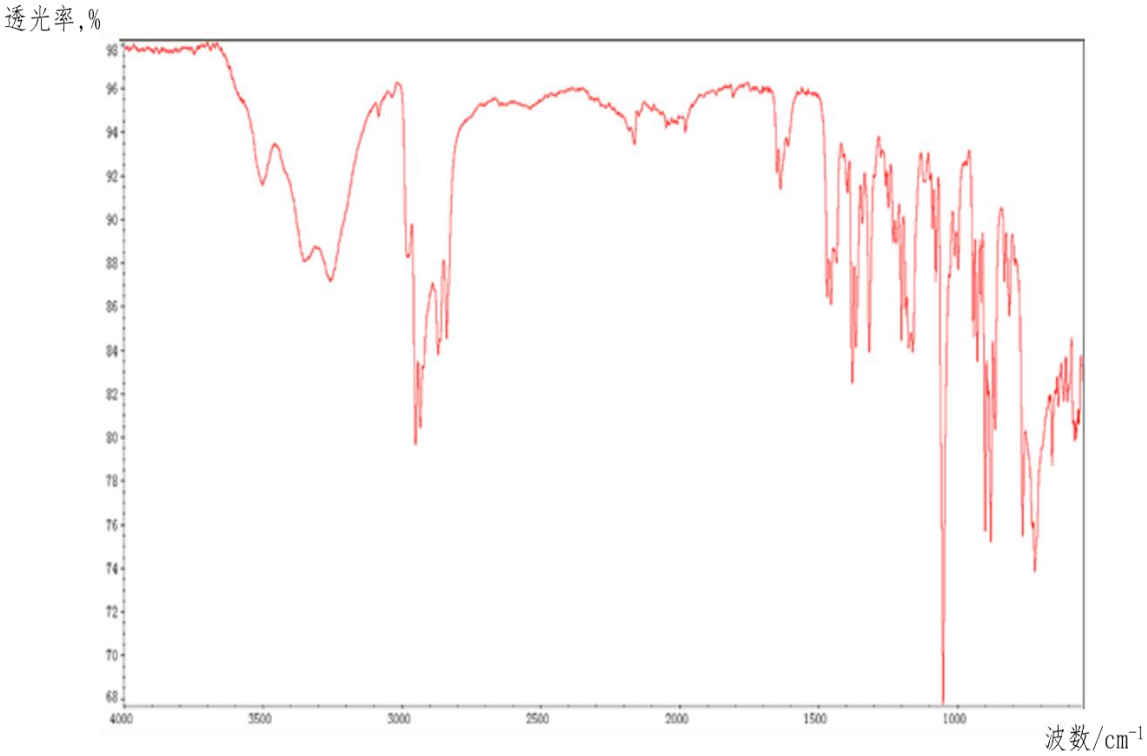


图 A.1 25-羟基胆钙化醇标准品红外光谱图

附录 B
（资料性）
25-羟基胆钙化醇标准工作溶液的高效液相色谱图

25-羟基胆钙化醇标准工作溶液（0.1 mg/mL）高效液相色谱图见图 B.1。

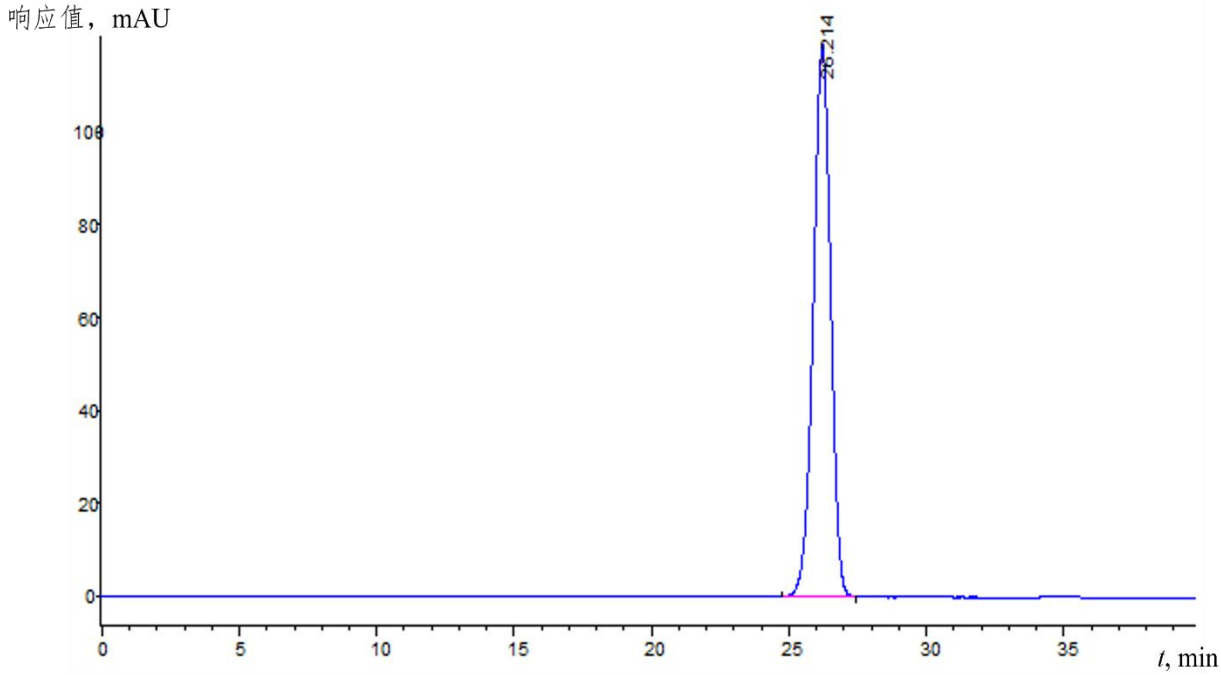


图 B.1 25-羟基胆钙化醇标准工作溶液（0.1 mg/mL）高效液相色谱图

For Internal Use Only

附录 C
（资料性）
25-羟基胆钙化醇系统适用性试验高效液相色谱图

25-羟基胆钙化醇系统适用性试验高效液相色谱图见图 C.1。

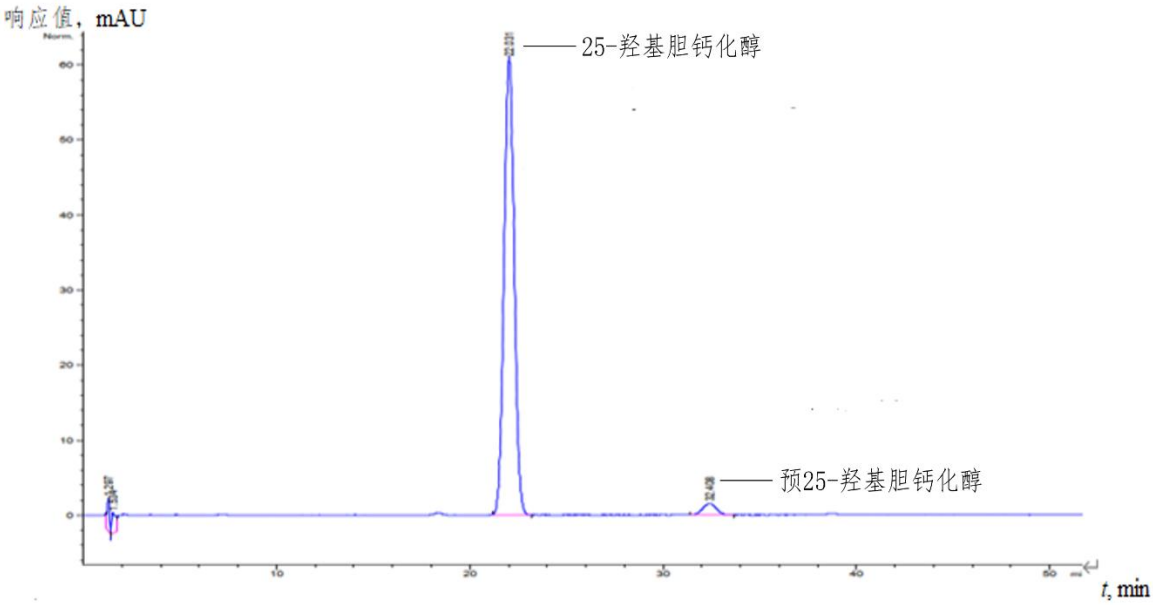
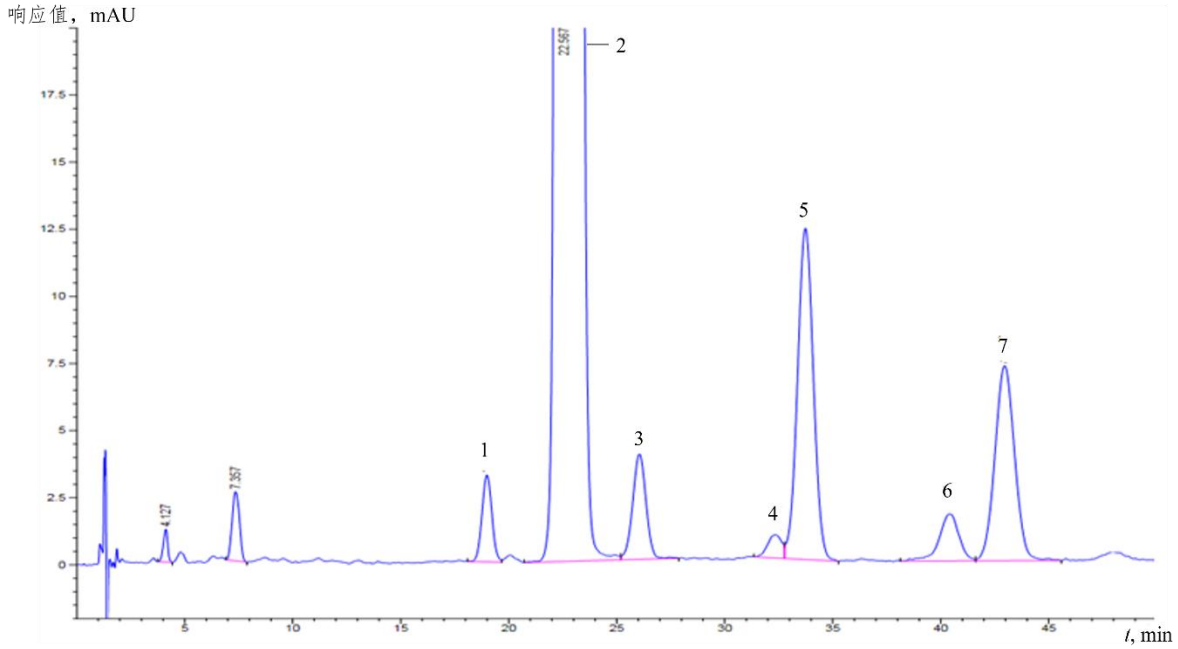


图 C.1 25-羟基胆钙化醇系统适用性试验高效液相色谱图

附录 D
（资料性）
25-羟基胆钙化醇及相关物质高效液相色谱图

25-羟基胆钙化醇及相关物质高效液相色谱图见图 D.1。



标引序号说明：

1——脱氢- 25-羟基胆钙化醇；

2——25-羟基胆钙化醇；

3——速甾-25-羟基胆钙化醇；

4——异速甾- 25-羟基胆钙化醇；

5——预-25-羟基胆钙化醇；

6——5、6 反式- 25-羟基胆钙化醇；

7——异- 25-羟基胆钙化醇。

图 D.1 25-羟基胆钙化醇及相关物质高效液相色谱图