

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4688—2025

饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇 (25-羟基维生素D₃)

Feed additive—25-Hydroxy cholecalciferol
(25-Hydroxy Vitamin D₃)

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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、宋荣、张进、曹金党、梁彦明、梁伟杰、朱宁、饶辉、杨素萍、杜海峰、张健、宋艳、石宝石、何雷、张耀、唐飞、钱国平、姚园园、陈梨花、张辉。



饲料添加剂 25-羟基胆钙化醇
(25-羟基维生素 D₃)

1 范围

本文件给出了 25-羟基胆钙化醇(25-羟基维生素 D₃)(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 606 化学试剂 水分测定通用方法 卡尔·费休法
- 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 饲料中总砷的测定
- GB/T 14699.1 饲料 采样

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-3 β ,25-二醇一水合物;CAS 号:63283-36-3。
- 4.2 分子式:C₂₇H₄₄O₂·H₂O。
- 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。

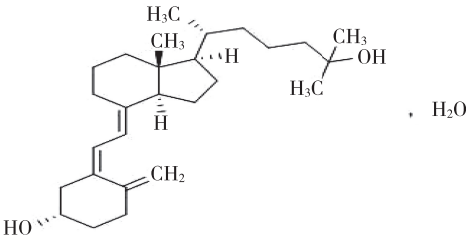


图 1 25-羟基胆钙化醇结构式

5 技术要求

5.1 外观与性状

白色或类白色粉末状晶体。

5.2 鉴别

试样的红外吸收光谱图与标准品红外吸收光谱图一致,试样液相色谱图与标准液相色谱图中主峰保留时间一致。

5.3 理化指标

应符合表 1 的规定。

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

按照 GB/T 14699.1 的规定执行,依据批量大小和包装规格,采集份样,形成不少于 75 g 的总份样,缩分成 3 份实验室样品,每份实验室样品不少于 25 g,按照 9.2 中规定进行包装,9.3 中规定进行运输,样品送到实验室后,按 9.4 中规定储存。

7 试验方法

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。水符合 GB/T 6682 中规定的三级水。

7.1 外观与性状

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 的规定,用红外吸收光谱仪在 $4\,000\text{ cm}^{-1} \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内测定吸收光谱,标准品的红外扫描光谱图见附录 A。

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与标准工作溶液(7.3.2.5)主峰的保留时间相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 范围内。25-羟基胆钙化醇标准溶液色谱图见附录 B。

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,用高效液相色谱测定,外标法定量。

7.3.2 试剂或材料

7.3.2.1 水:GB/T 6682 规定的一级水。

7.3.2.2 甲醇:色谱级。

7.3.2.3 甲醇水溶液: $V+V=80+20$ 。

7.3.2.4 标准储备溶液(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。—18℃以下保存,有效期 6 个月。

7.3.2.5 标准工作溶液:准确移取标准储备溶液(7.3.2.4)5 mL 于 50 mL 的棕色容量瓶中,用甲醇水溶液(7.3.2.3)稀释定容。临用现配。

7.3.2.6 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 0.01 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 2 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 甲醇溶解并定容至刻度,混匀。准确吸取 5 mL 置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇水溶液(7.3.2.3)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

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

7.3.4.2.2 流动相:甲醇(7.3.2.2)+水(7.3.2.1)=80+20。

7.3.4.2.3 流速:1.0 mL/min。

7.3.4.2.4 检测波长:265 nm。

7.3.4.2.5 进样量:20 μL 。

注: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。

7.3.4.3 测定

在仪器最佳状态下,将标准工作溶液(7.3.2.5)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。色谱图见附录 B。

7.3.4.4 试验数据处理

试样中 25-羟基胆钙化醇(以 C₂₇H₄₄O₂·H₂O 计)含量以质量分数 w 计,数值以百分含量(%)表示,按式(1)计算。

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

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的数值,单位为毫升(mL);

C ——25-羟基胆钙化醇标准溶液的的质量浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

m ——试样质量的数值,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,2次独立测定结果与其算术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甾醇类物质的峰面积与对照溶液25-羟基胆钙化醇的峰面积比较,计算各相关甾醇类物质。

7.4.2 试剂或材料

7.4.2.1 水:GB/T 6682规定的一级水。

7.4.2.2 甲醇:色谱级。

7.4.2.3 甲醇水溶液: $V+V=80+20$ 。

7.4.2.4 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0.01 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(7.4.2.2)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,用甲醇水溶液(7.4.2.3)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 mL 25-羟基胆钙化醇标准工作溶液(7.3.2.5)倒入具有螺旋瓶盖的10 mL螺口试管中,旋紧瓶盖,置于50 $^{\circ}\text{C}$ 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的色谱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比例,以符合对分离度的要求。色谱图见附录C。

7.4.4.5 测定

按7.4.4.3的色谱条件,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)色谱图中相关甾醇类物质(预25-羟基胆钙化醇除外)(见表3)的峰面积如果均小于对照溶液(7.4.4.2)中25-羟基胆钙化醇的峰面积,则判定相关甾醇类物质符合要求。相关甾醇类物质的液相色谱图见附录D。

表3 相关甾醇类物质与25-羟基胆钙化醇的相对保留时间

相关甾醇类物质	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 606 的规定执行。

7.6 总砷

按 GB/T 13079 的规定执行。

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(1 000 $\mu\text{g/mL}$):称取硝酸铅 0.159 9 g,置 1 000 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,作为储备液。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 6 个月。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。

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 1 000 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(7.7.1.7)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 至 3.5,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。变色范围 pH 8.3~10.0(无色→红)。

7.7.1.12 铅标准工作溶液(20 $\mu\text{g/mL}$):准确移取铅标准溶液(7.7.1.5)2 mL,置 100 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。临用现配。

7.7.2 仪器设备

7.7.2.1 分析天平:感量 0.1 mg。

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 $^{\circ}\text{C}$ 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

在待测管、标准管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,肉眼观察比较待测管与标准管的颜色,如待测管所显颜色未深于标准管,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：外观与性状、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的规定时，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的规定，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、运输和储存

9.1 标签

按 GB 10648 的规定执行。

9.2 包装

包装材料应无毒无害，密闭避光、充氮或真空包装。

9.3 运输

运输过程中应防潮、防高温、防止包装破损，不应与有毒有害物质混运。

9.4 储存

储存时防止日晒、雨淋、不应与有毒有害物质混储，8℃以下避光储存，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、储存条件下，产品保质期应与标签标识的保质期一致。

附 录 A

(资料性)

325-羟基胆钙化醇标准品红外吸收光谱图

25-羟基胆钙化醇标准品红外吸收光谱图见图 A. 1。

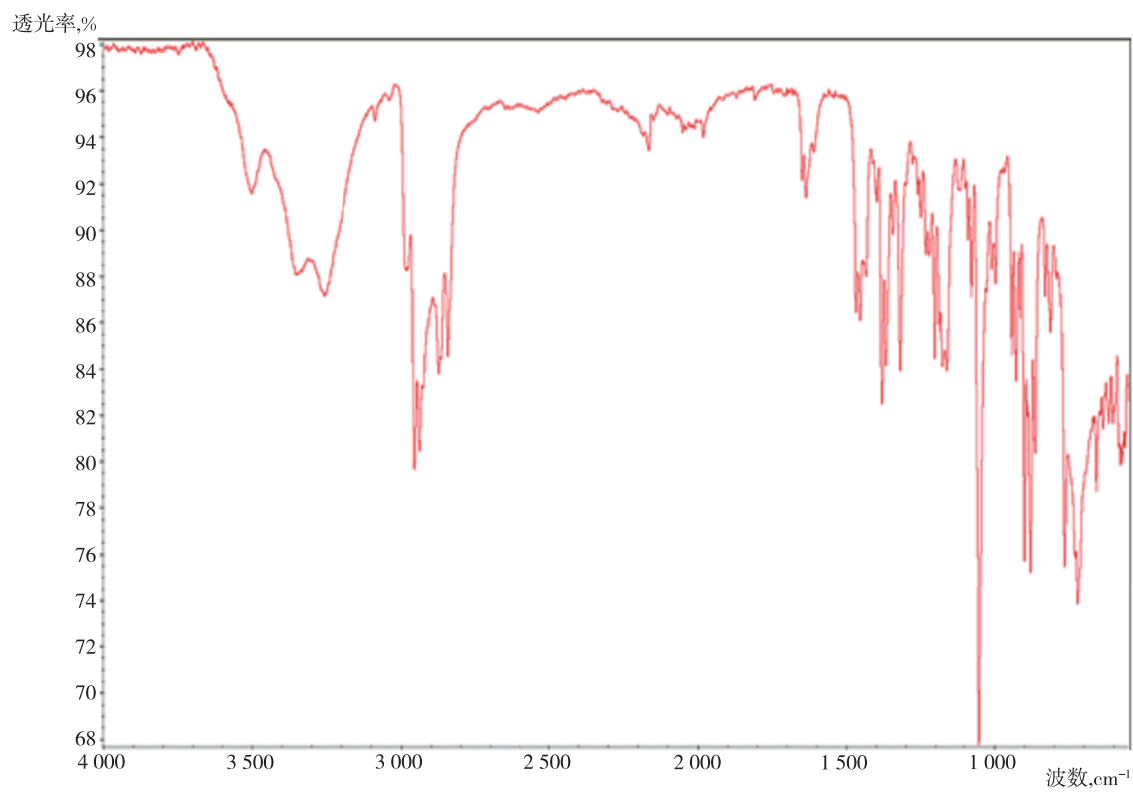


图 A. 1 25-羟基胆钙化醇标准品红外吸收光谱图

附 录 B

(资料性)

2325-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。

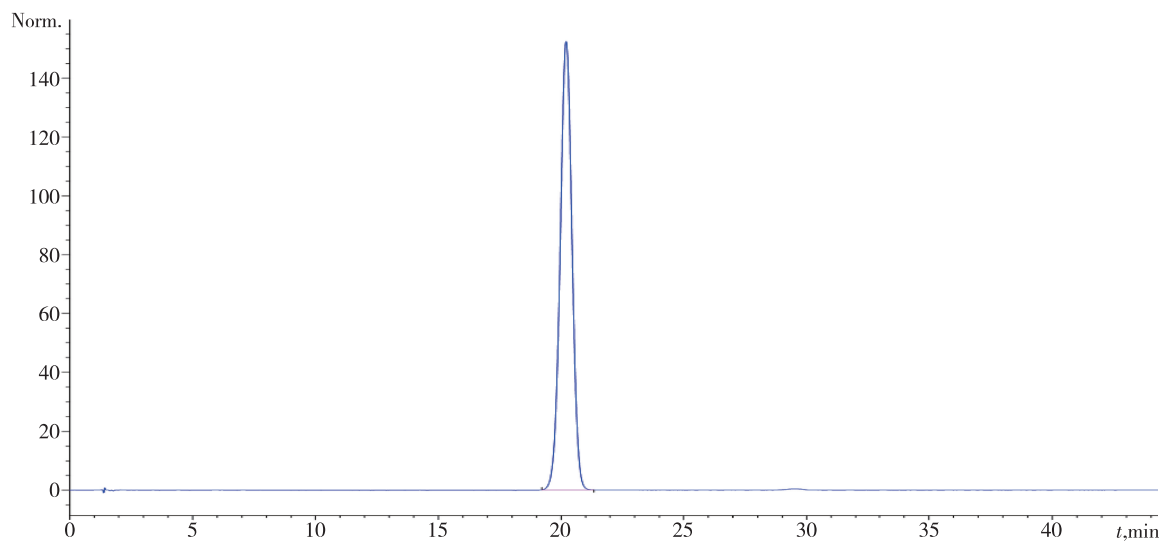


图 B. 1 25-羟基胆钙化醇标准工作溶液(0.1 mg/mL)高效液相色谱图

附 录 C
(资料性)

4725-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。

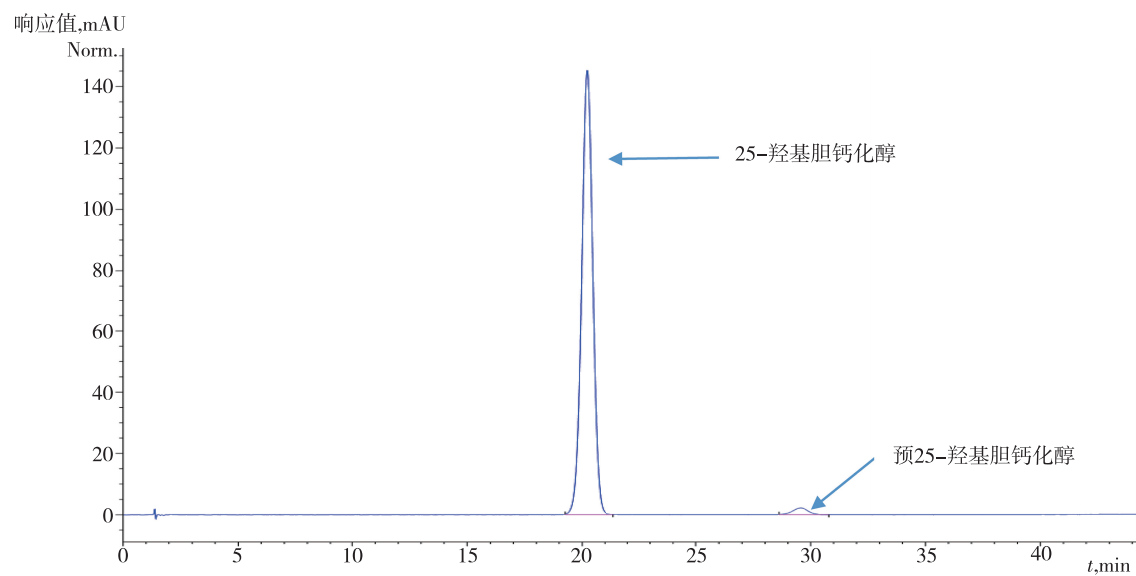
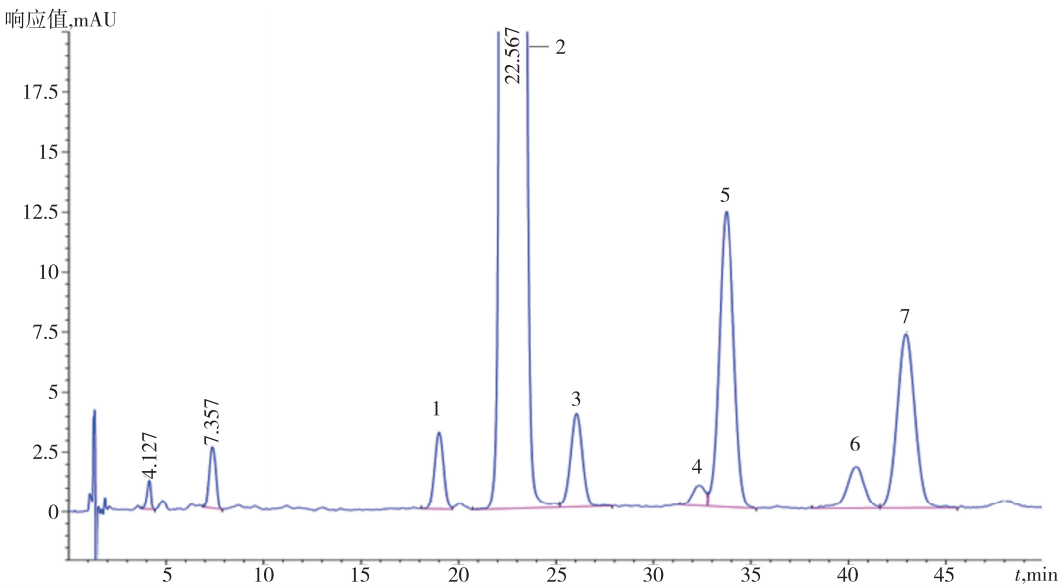


图 C. 1 25-羟基胆钙化醇系统适用性试验高效液相色谱图

附 录 D
(资料性)

25-羟基胆钙化醇及相关甾醇类物质高效液相色谱图

25-羟基胆钙化醇及相关甾醇类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甾醇类物质高效液相色谱图