

团 体 标 准

T/CFIAS 00X—2023

宠物配合饲料中 8 种水溶性维生素的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of 8 water-soluble vitamins in pet feeds—

Liquid chromatography—tandem mass spectrometry

(报批稿)

2023 - XX - XX 发布

2023 - XX - XX 实施

中国饲料工业协会发布

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。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

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、北京市兽药饲料监测中心、健合（中国）有限公司、上海天祥质量技术服务有限公司、岛津企业管理（中国）有限公司、天津雀巢普瑞纳宠物食品有限公司、乖宝宠物食品集团股份有限公司、深圳红瑞生物科技有限公司、皇誉宠物食品（上海）有限公司、上海宠幸宠物用品有限公司、新疆畜牧科学院畜牧业质量标准研究所。

本文件主要起草人：严华、李兰、樊霞、贾铮、王继彤、姚婷、刘晓露、赵玲玲、张益乐、边涛、陈莉莉、薛德时、冯玉超、魏佩玲、马海建、朱逸、周淼佳、田天、杨文翰、秦华、徐法典、胡玉珍、田甜、刘芳、高慧、陈姝、谢爽、吕少骏、刘淑琴、徐思远、田静、娄迎霞、李征、曹林、冯秀燕。

宠物配合饲料中 8 种水溶性维生素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了宠物配合饲料中8种水溶性维生素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于固态宠物配合饲料中维生素 B₁、维生素 B₂、烟酸、烟酰胺、D-泛酸、维生素 B₆、D-生物素和叶酸的测定。

本文件方法定量限为 0.2 mg/kg。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的水溶性维生素在酸性条件下提取，用液相色谱-串联质谱仪测定，烟酰胺和叶酸用内标法定量，其余6种水溶性维生素用外标法定量。

5 试剂或材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲酸：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 甲醇：色谱纯。

5.5 盐酸溶液 I：量取8.3 mL盐酸，用水稀释至1000 mL，混匀。

5.6 盐酸溶液 II：移取 5 mL 盐酸，用水稀释至 500 mL，混匀。

5.7 氨水溶液：移取 10 mL 氨水，用水稀释至 100 mL，混匀。

5.8 碳酸钠溶液：称取 1.06 g 碳酸钠，加水溶解并稀释至 100 mL，混匀。

5.9 甲酸溶液：取 1 mL 甲酸（5.2），用水稀释至 1000 mL，混匀。

5.10 甲酸乙腈溶液：取 1 mL 甲酸（5.2），用乙腈（5.3）稀释至 1000 mL，混匀。

警示：5.11–5.19 操作应避免强光照射。

5.11 维生素 B₁（硝酸硫胺）、维生素 B₂、烟酸、烟酰胺、D-泛酸钙、维生素 B₆（盐酸吡哆醇）、D-生物素、叶酸、烟酰胺-D₄、叶酸-D₄ 标准品信息见附录 A。

5.12 维生素 B₁ 标准储备溶液（1 mg/mL）：精确称取硝酸硫胺（以硫胺素计）适量（精确到 0.01 mg），置于棕色容量瓶，用盐酸溶液 I（5.5）溶解并定容，混匀。2℃~8℃ 避光保存，有效期 6 个月。

5.13 维生素 B₂ 标准储备溶液（0.1 mg/mL）：精确称取维生素 B₂ 适量（精确到 0.01 mg），置于棕色容量瓶，用 1 mL 盐酸超声溶解后，用水定容，混匀。2℃~8℃ 避光保存，有效期 6 个月。

5.14 叶酸标准储备溶液（1 mg/mL）：精确称取叶酸适量（精确到 0.01 mg），置于棕色容量瓶，用碳酸钠溶液（5.8）溶解并定容，混匀。2℃~8℃ 避光保存，有效期 6 个月。

5.15 烟酸、烟酰胺、维生素 B₆、D-泛酸钙、D-生物素标准储备溶液（1 mg/mL）：精确称取烟酸、烟酰胺、维生素 B₆（以吡哆醇计）、D-泛酸钙（以 D-泛酸计）、D-生物素各适量（精确到 0.01 mg），分别置于棕色容量瓶，用甲醇（5.4）溶解并定容，混匀。2℃~8℃ 避光保存，有效期 6 个月。

5.16 混合标准中间溶液（10 μg/mL）：分别移取适量的标准储备溶液（5.12，5.13，5.14，5.15），用水定容，混匀。2℃~8℃ 避光保存，有效期 1 个月。

5.17 内标储备溶液（0.1 mg/mL）：精确称取烟酰胺-D₄和叶酸-D₄各适量（精确至 0.1 mg），分别置于棕色容量瓶中，烟酰胺-D₄用甲醇（5.4）溶解并定容，混匀；叶酸-D₄用碳酸钠溶液（5.8）溶解并定容，混匀。2℃~8℃ 避光保存，有效期 6 个月。

5.18 内标混合溶液（10 μg/mL）：准确移取一定体积的内标储备溶液（5.17）于棕色容量瓶中，用水定容，混匀。2℃~8℃ 避光保存，有效期 1 个月。

5.19 混合标准系列溶液：准确量取混合标准中间溶液（5.16）和内标混合溶液（5.18）适量，用水配成浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 和 2000 ng/mL，内标浓度均为 20 ng/mL 的标准系列溶液。临用现配。

5.20 微孔滤膜：0.22 μm。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：精度为 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 酸度计：精度为 ±0.01。

- 6.4 涡旋混合器。
 6.5 超声波清洗仪。
 6.6 恒温水浴锅：控温精度为 ± 1 °C。

7 样品

按GB/T 20195制备试样，至少200 g，粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的分析筛，充分混匀，密闭容器中避光保存，备用。

8 试验步骤

警示：以下操作应避免强光照射。

8.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样 1 g（精确至 0.1 mg）于 50 mL 离心管中，加入 100 μ L 内标混合溶液（5.18），加入 20 mL 盐酸溶液 II（5.6），涡旋 1 min，将离心管置于 50°C 水浴中加热 40 min（中间旋摇两次），冷却至室温，用氨水溶液（5.7）调节 pH 值至 6.0，用水转移至 50 mL 容量瓶中，定容，摇匀。静置，取上清液微孔滤膜（5.20）过滤，待测。

8.2 仪器参考条件

8.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（用极性小分子封端），柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 3.0 μ m，或性能相当者；
 b) 流动相：A——甲酸溶液（5.9），B——甲酸乙腈溶液（5.10）；
 c) 梯度洗脱：梯度洗脱程序见表1；
 d) 流速：0.30 mL/min；
 e) 柱温：25°C；
 f) 进样量：2 μ L。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.01	95	5
1.0	95	5
3.0	80	20
7.0	10	90
9.0	10	90
9.1	95	5
12.0	95	5

8.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI+）；
 b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
 c) 喷雾电压：5.5 kV；
 d) 离子源温度：500℃；
 e) 雾化气流速：50 L/min；
 f) 辅助气流速：50 L/min；
 g) 气帘气流速：20 L/min；
 h) 雾化气、辅助气、气帘气、碰撞气为高纯氮气；
 i) 监测离子对、碰撞能量和去簇电压见表2。

表2 水溶性维生素及其内标的监测离子对、碰撞能量和去簇电压参考值

待测物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量/eV	去簇电压/V
维生素 B ₁	265.0	122.3 ^a	18.7	60
		144.2	15.0	
维生素 B ₂	377.0	242.8 ^a	30.0	100
		198.0	46.8	
烟酸	124.0	80.0 ^a	28.0	40
		78.0	29.0	
烟酰胺	123.0	80.0 ^a	28.0	40
		78.0	29.0	
D-泛酸	220.1	90.1 ^a	18.0	40
		202.0	17.0	
吡哆醇	170.0	152.1 ^a	19.0	40
		134.2	30.0	
D-生物素	245.0	227.0 ^a	23.4	60
		97.0	17.3	
叶酸	442.1	295.0 ^a	24.0	60
		120.0	50.0	
烟酰胺-D ₄	127.0	84.0	28.0	40
叶酸-D ₄	446.4	299.1	24.0	60

^a 定量离子。

8.3 测定

8.3.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列溶液（5.19）和试样溶液上机测定。标准溶液的定量离子对色谱图见附录B。

8.3.2 定性

在相同试验条件下，试样溶液中待测物的保留时间应与标准系列工作溶液（浓度相当）中待测物的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。根据表2选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物监测离

子对的相对离子丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应的监测离子对的相对离子丰度,若最大允许偏差不超过表3规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

8.3.3 定量

8.3.3.1 维生素B₁、维生素B₂、烟酸、D-泛酸、吡哆醇和D-生物素

在仪器最佳条件下,混合标准系列溶液与试样溶液交替进样,采用外标法定量。以标准溶液中的被测组分的峰面积为纵坐标,标准溶液中被测组分的浓度为横坐标绘制标准曲线,其相关系数应不低于0.99。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围,需根据测定浓度用水稀释后进行重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

8.3.3.2 烟酰胺和叶酸

在仪器最佳条件下,混合标准系列溶液与试样溶液交替进样,采用内标法定量。以标准溶液中的被测组分的峰面积与内标的峰面积比为纵坐标,标准溶液中被测物浓度与内标的浓度比为横坐标绘制标准曲线,其相关系数应不低于0.99。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围,需根据测定浓度调整称样量,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中待测物的含量以质量分数 w_i 计,单位为毫克每千克(mg/kg)。多点校准按式(1)计算,单点校准时,外标法按式(2)计算,内标法按式(3)计算:

$$w_i = \frac{\rho_i \times V}{m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液中待测物的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

n ——超出曲线范围后试样溶液的稀释倍数;

m ——试样的质量,单位为克(g)。

$$W_i = \frac{\rho_s \times A_i \times V}{A_s \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中:

ρ_s ——标准工作液中待测物的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_i ——试样溶液中待测物的色谱峰面积；
 V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；
 n ——超出曲线范围后试样溶液的稀释倍数；
 A_s ——标准工作液中待测物的色谱峰面积；
 m ——试样的质量，单位为克（g）。

$$W_i = \frac{\rho_s \times \rho_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V}{\rho'_{is} \times A_s \times A_{is} \times m \times 1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ρ_s ——标准工作液中待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 ρ_{is} ——试样溶液中内标的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 A_i ——试样溶液中待测物的峰面积；
 A'_{is} ——标准溶液中内标的峰面积；
 V ——定容体积，单位为毫升（mL）；
 ρ'_{is} ——标准溶液中内标的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 A_s ——标准溶液中待测物的峰面积；
 A_{is} ——试样溶液中内标的峰面积；
 m ——试样质量，单位为克（g）。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 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绝对差值不大于该算术平均值的 20%。

附录 A
(规范性)
标准物质信息

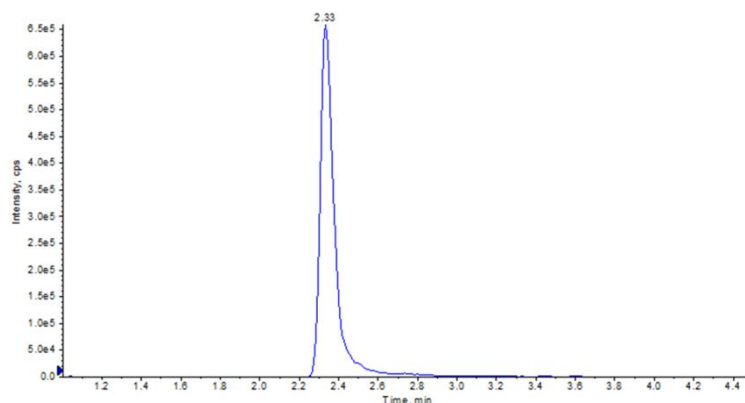
A.1 标准物质信息见表 A.1

表 A.1 标准物质信息

化合物中文名称	化合物英文名称	CAS 号	分子式	纯度
维生素 B ₁ (硝酸硫胺)	Thiamine mononitrate	532-43-4	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄ S	≥97%
维生素 B ₂	Riboflavin	83-88-5	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	≥97%
烟酸	Nicotinic acid	59-67-6	C ₆ H ₅ NO ₂	≥97%
烟酰胺	Nicotinamide	98-92-0	C ₆ H ₆ N ₂ O	≥97%
D-泛酸钙	D-Calcium Pantothenate	137-08-6	C ₉ H ₁₇ NO ₅ · 1/2Ca	≥97%
维生素 B ₆ (盐酸吡哆醇)	Pyridoxine hydrochloride	58-56-0	C ₈ H ₁₁ NO ₃ · HCl	≥97%
D-生物素	Biotin	58-85-5	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	≥97%
叶酸	Folic acid	59-30-3	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	≥95%
烟酰胺-D ₄	Nicotinamide-D ₄	347841-88-7	C ₆ H ₂ D ₄ N ₂ O	≥97%
叶酸-D ₄	Folic acid-D ₄	171777-72-3	C ₁₉ H ₁₅ D ₄ N ₇ O ₆	≥97%

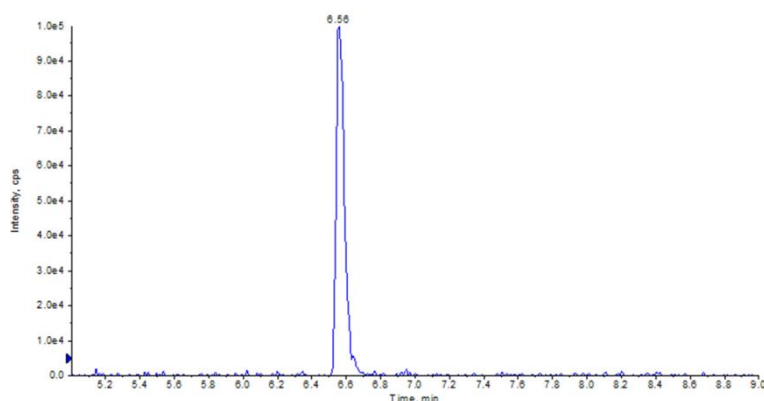
附录 B
(资料性)
水溶性维生素标准溶液定量离子色谱图

B.1 维生素B₁标准溶液定量离子色谱图见图B.1。



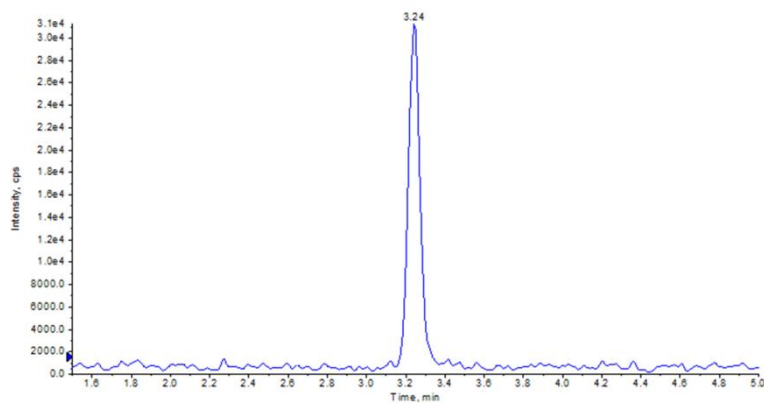
图B.1 维生素B₁的标准溶液定量离子色谱图 (50 ng/mL)

B.2 维生素B₂标准溶液定量离子色谱图见图B.2。



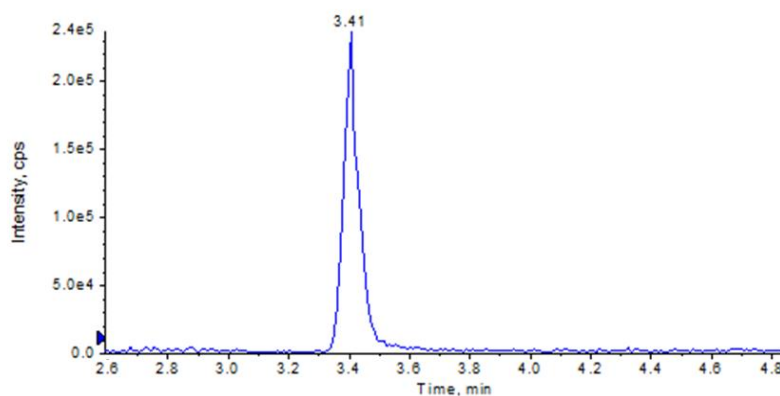
图B.2 维生素B₂的标准溶液定量离子色谱图 (50 ng/mL)

B.3 烟酸标准溶液定量离子色谱图见图B.3。



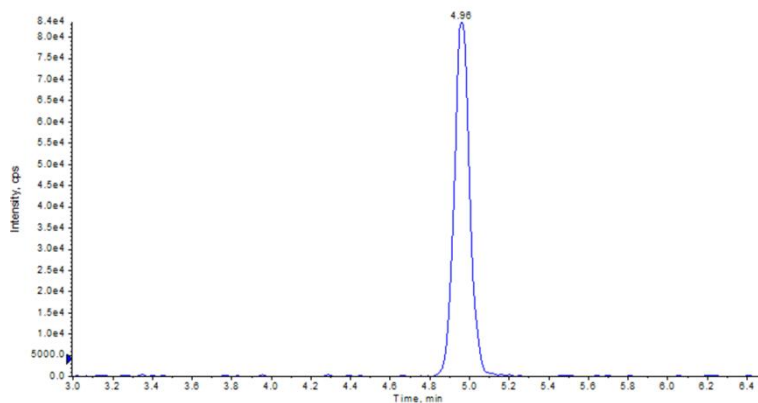
图B.3 烟酸的标准溶液定量离子色谱图 (50 ng/mL)

B.4 烟酰胺标准溶液定量离子色谱图见图B.4。



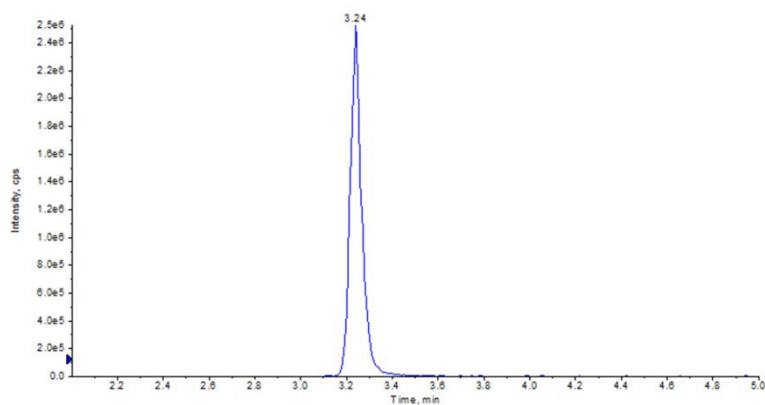
图B.4 烟酰胺的标准溶液定量离子色谱图（50 ng/mL）

B.5 D-泛酸标准溶液定量离子色谱图见图B.5。



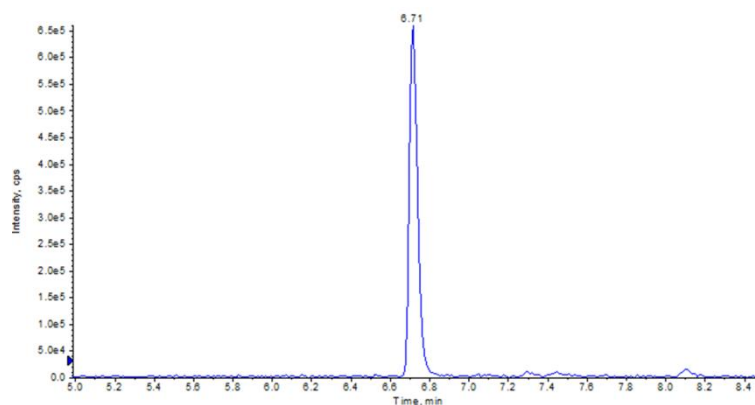
图B.5 D-泛酸的标准溶液定量离子色谱图（50 ng/mL）

B.6 吡哆醇标准溶液定量离子色谱图见图B.6。



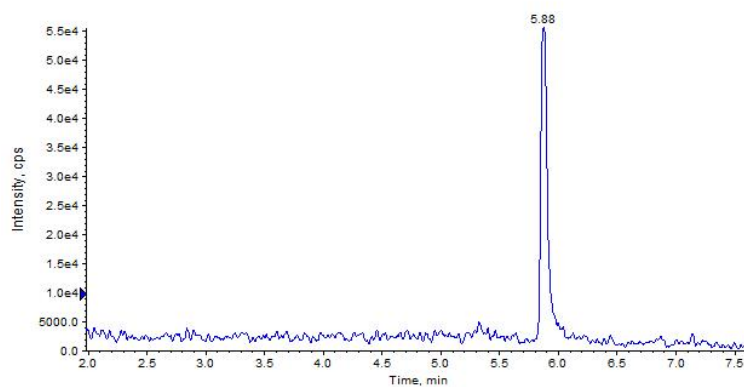
图B.6 吡哆醇的标准溶液定量离子色谱图（50 ng/mL）

B.7 D-生物素标准溶液定量离子色谱图见图B.7。



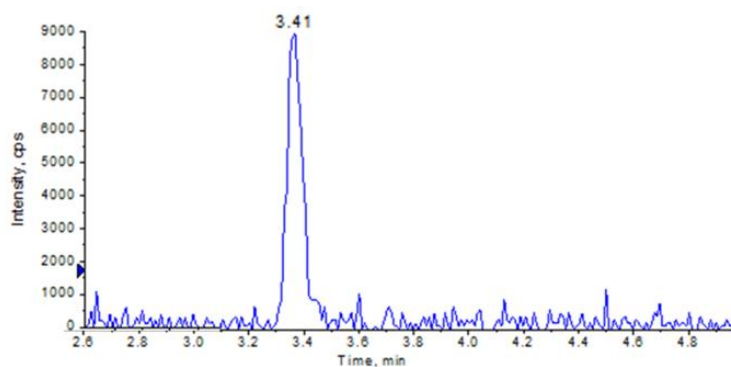
图B.7 D-生物素的标准溶液定量离子色谱图（50 ng/mL）

B.8 叶酸标准溶液定量离子色谱图见图B.8。



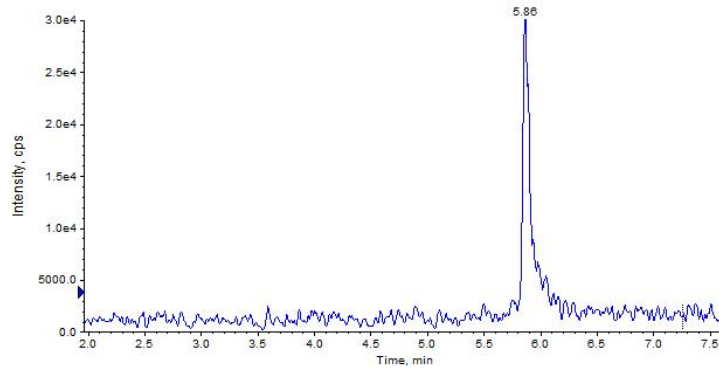
图B.8 叶酸的标准溶液定量离子色谱图（50 ng/mL）

B.9 烟酰胺-D₄标准溶液定量离子色谱图见图B.9。



图B.9 烟酰胺-D₄的标准溶液定量离子色谱图（20 ng/mL）

B.10 叶酸-D₄标准溶液定量离子色谱图见图B.10。



图B.10 叶酸-D₄的标准溶液定量离子色谱图（20 ng/mL）