

团 体 标 准

T/CFIAS 00X—2023

宠物饲料中牛磺酸的测定

Determination of taurine in pet feeds

(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[国家饲料质量检验检测中心（北京）]、北京市兽药饲料监测中心、新疆畜牧科学院畜牧业质量标准研究所、上海天祥质量技术服务有限公司、上海安谱实验科技股份有限公司、岛津企业管理（中国）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、上海宠幸宠物用品有限公司、皇誉宠物食品（上海）有限公司、天津雀巢普瑞纳宠物食品有限公司。

本文件主要起草人：贾铮、樊霞、王继彤、姚婷、严华、李兰、边涛、薛德时、冯玉超、魏佩玲、江晨舟、王利娟、秦华、徐法典、胡玉珍、田甜、吕少俊、刘淑琴、陈姝、谢爽、周淼佳、田天、杨文翰、张圆圆、骆丹、田静、徐思远、肖志明、李阳、刘晓露、张祯昊、韩梦、娄迎霞、曹林、李征、冯秀燕。

宠物饲料中牛磺酸的测定

1 范围

本文件描述了宠物饲料中牛磺酸含量测定的高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。

本文件适用于宠物饲料中牛磺酸含量的测定。

本文件高效液相色谱法的定量限为 100 mg/kg；液相色谱-串联质谱法的定量限为 5 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 第一法 高效液相色谱法

4.1 原理

试样中的牛磺酸用水提取，沉淀蛋白后，经丹磺酰氯衍生化，液相色谱仪测定，外标法定量。

删除[NFQC]: 高效

4.2 试剂或材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 乙腈：色谱纯。

4.2.3 盐酸溶液：移取9 mL盐酸，加水稀释至100 mL，混匀。

4.2.4 亚铁氰化钾溶液：称取15.0 g亚铁氰化钾，用水溶解并稀释至100 mL，混匀。

4.2.5 乙酸锌溶液：称取30.0 g乙酸锌，用水溶解并稀释至100 mL，混匀。

4.2.6 碳酸钠缓冲溶液（pH 9.5）：称取0.848 g无水碳酸钠，加约80 mL水溶解，用盐酸溶液（4.2.3）调节pH至9.5，用水定容至100 mL。

- 4.2.7 丹磺酰氯乙腈溶液：称取0.10 g丹磺酰氯，用乙腈溶解并稀释至100 mL。临用现配。
- 4.2.8 盐酸甲胺溶液：称取2.0 g盐酸甲胺，用水溶解并稀释至100 mL。2°C~8°C保存，有效期3个月。
- 4.2.9 乙酸钠缓冲溶液（pH 4.20）：称取0.820 g无水乙酸钠，加约900 mL水溶解，加冰乙酸调节pH至4.20，用水定容至1000 mL，混匀，微孔滤膜（4.2.12）过滤。
- 4.2.10 牛磺酸标准储备溶液（1 mg/mL）：称取0.1 g牛磺酸标准品（CAS号：107-35-7，纯度 $\geq 99\%$ ）（精确至0.1 mg），用水溶解并定容至100 mL。2°C~8°C保存，有效期7天。
- 4.2.11 牛磺酸标准系列溶液：准确移取牛磺酸标准储备溶液（4.2.10）适量，用水稀释并定容，配制成浓度分别为2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液。临用现配。
- 4.2.12 微孔滤膜：0.45 μm ，水系。

4.3 仪器设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器（或二极管阵列检测器）。
- 4.3.2 分析天平：精度为1 mg和0.1 mg。
- 4.3.3 超声波清洗仪。
- 4.3.4 离心机：转速不低于5000 r/min。
- 4.3.5 涡旋混合器。
- 4.3.6 酸度计：精度为 ± 0.01 。

4.4 样品

按GB/T 20195制备试样。固体试样至少200 g，粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的分析筛，充分混匀，密闭容器中保存；膏状或液体原包装保存，备用。

删除[NFQC]: 避光

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做两份试验。称取2 g~5 g（精确至1 mg）试样于50 mL离心管中，加入约40 mL水，充分混匀，超声20 min（中间振摇两次），冷却至室温，转移至100 mL容量瓶中，分次用少量水洗涤离心管，合并溶液至容量瓶中，加入1 mL亚铁氰化钾溶液（4.2.4），混匀，再加入1 mL乙酸锌溶液（4.2.5），混匀，用水定容，充分混匀。移取溶液约10 mL于5000 r/min离心10 min，上清液备用。

4.5.2 衍生化

4.5.2.1 试样溶液的衍生化

准确吸取上清液（4.5.1）1 mL于10 mL具塞试管中，准确加入1 mL碳酸钠缓冲溶液（4.2.6）、1 mL丹磺酰氯乙腈溶液（4.2.7），涡旋混匀，避光于60°C水浴中反应30 min后，立即加入0.1 mL盐酸甲胺溶液（4.2.8）涡旋混合，以终止反应。避光静置至室温，微孔滤膜（4.2.12）过滤，待测。

4.5.2.2 标准系列溶液的衍生化

分别准确移取1 mL标准系列溶液（4.2.11），与4.5.2.1操作同步进行。

4.5.3 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- 色谱柱：C₁₈色谱柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm ，或性能相当者；
- 柱温：30°C；

- c) 检测波长: 254 nm;
d) 进样量: 10 μL;
e) 流速: 1.0 mL/min;
f) 流动相: A——乙酸钠缓冲溶液(4.2.9), B——乙腈;
g) 梯度洗脱, 洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.0	80	20
1.0	80	20
3.0	60	40
10.0	5	95
13.0	5	95
13.1	80	20
18.0	80	20

4.5.4 测定

4.5.4.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳工作条件下, 分别取衍生后的标准系列溶液(4.5.2.2)和试样溶液(4.5.2.1)上机测定。牛磺酸标准溶液液相色谱图见附录A。

4.5.4.2 定性

在相同试验条件下, 试样溶液中牛磺酸的保留时间与标准系列溶液(浓度相当)中牛磺酸的保留时间一致, 其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.4.3 定量

在仪器最佳工作条件下, 标准系列溶液与试样溶液交替进样。以标准溶液中牛磺酸的峰面积为纵坐标, 标准溶液中牛磺酸的浓度为横坐标绘制标准工作曲线, 其相关系数应不低于0.99。试样溶液与标准溶液中牛磺酸的响应值均应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围, 需根据浓度用水稀释试样溶液后重新衍生或重新测定。单点校准定量时, 试样溶液中牛磺酸的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

4.5.5 试验数据处理

试样中牛磺酸的含量以质量分数 ω_1 表示, 单位为毫克每千克(mg/kg), 多点校准按式(1)计算, 单点校准按式(2)计算:

$$\omega_1 = \frac{\rho \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中牛磺酸的质量浓度, 单位为微克每毫升(μg/mL);

V ——试样提取溶液的体积, 单位为毫升(mL);

n ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数;

m ——试样质量, 单位为克(g)。

$$\omega_1 = \frac{A \times \rho \times V \times n}{A_s \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A ——试样溶液中牛磺酸的峰面积；

ρ ——标准溶液中牛磺酸的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（ mL ）；

n ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数；

A_s ——标准溶液中牛磺酸的峰面积；

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。

4.5.6 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绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

5 第二法 液相色谱-串联质谱法

5.1 原理

试样中的牛磺酸用水提取，沉淀蛋白后，上清液使用液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 甲酸：色谱纯。

5.2.3 乙腈：色谱纯。

5.2.4 甲酸溶液：移取1 mL甲酸（5.2.2），加水稀释至1000 mL，混匀。

5.2.5 亚铁氰化钾溶液：称取15.0 g亚铁氰化钾，用水溶解并稀释至100 mL，混匀。

5.2.6 乙酸锌溶液：称取30.0 g乙酸锌，用水溶解并稀释至100 mL，混匀。

5.2.7 牛磺酸标准储备溶液（1 mg/mL）：称取0.1 g牛磺酸标准品（CAS号：107-35-7，纯度 $\geq 99\%$ 。）（精确至0.1 mg），用水溶解并定容至100 mL，混匀。2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期7天。

5.2.8 牛磺酸标准中间溶液（10 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取牛磺酸标准储备溶液（5.2.7）1 mL于100 mL容量瓶，用水稀释并定容，混匀。临用现配。

5.2.9 牛磺酸标准系列溶液：分别准确移取牛磺酸标准储备溶液（5.2.8）适量，用水稀释并定容，配制成浓度分别为50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$ 、1000 $\mu\text{g/L}$ 和5000 $\mu\text{g/L}$ 标准工作溶液。临用现配。

5.2.10 微孔滤膜：0.22 μm ，水系。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。

5.3.2 分析天平：精度为1 mg和0.1 mg。

删除[NFQC]: 0.

5.3.3 超声波清洗仪。

5.3.4 离心机：转速不低于5000 r/min。

5.3.5 涡旋混合器。

5.4 样品

同4.4。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

平行做两份试验。称取 1 g~2 g (精确至 1 mg) 试样于 50 mL 离心管中, 加入约 40 mL 水, 充分混匀, 超声 20 min (中间振摇两次), 冷却至室温, 转移至 100 mL 容量瓶中, 分次用少量水洗涤离心管, 合并溶液至容量瓶中, 加入 1 mL 亚铁氰化钾溶液 (5.2.5), 混匀, 再加入 1 mL 乙酸锌溶液 (5.2.6), 混匀, 用水定容, 充分混匀。取上层溶液约 10 mL 于 5000 r/min 离心 10 min, 微孔滤膜 (5.2.10) 过滤, 待测。

设置格式[Windows 用户]: 字体: (默认) Times New Roman

5.5.2 液相色谱-串联质谱仪参考条件

5.5.2.1 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, 柱长100 mm, 内径2.1 mm, 粒径1.7 μm, 或性能相当者;

b) 柱温: 30°C;

c) 进样量: 5 μL。

d) 流速: 0.3 mL/min;

e) 流动相: A——0.1%甲酸溶液 (5.2.4), B——乙腈;

f) 梯度洗脱, 洗脱程序见表2。

删除[NFQC]: d

删除[NFQC]: e

表2 梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0	95	5
2.0	95	5
5.0	40	60
7.0	10	90
8.0	10	90
8.1	95	5
10.0	95	5

5.5.2.2 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) 毛细管电压: 3.5 kV;
 d) 脱溶剂气温度: 500°C;
 e) 脱溶剂气流速: 600 L/h;
 f) 监测离子对、锥孔电压及碰撞能量见表3。

表3 牛磺酸的多反应监测离子对、锥孔电压及碰撞能量

被测物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
牛磺酸	126	108 ^a	22	14
		44	22	18
^a 定量离子。				

5.5.3 测定

5.5.3.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下, 分别取标准系列溶液 (5.2.9) 和试样溶液 (5.5.1) 上机测定。牛磺酸标准溶液的监测离子对 (MRM) 色谱图见附录 B。

5.5.3.2 定性

在相同试验条件下, 试样溶液与标准系列工作溶液中牛磺酸的保留时间相对偏差在±2.5%之内。根据表 3 选择的定性离子对, 比较试样谱图中牛磺酸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 4 规定的范围, 则可判定为样品中存在对应的待测物。

表4 定性测定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
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

5.5.3.3 定量

在仪器最佳工作条件下, 标准系列溶液与试样溶液交替进样。以标准溶液中牛磺酸的峰面积为纵坐标, 标准溶液中牛磺酸的浓度为横坐标绘制标准工作曲线, 其相关系数应不低于0.99。试样溶液与标准溶液中牛磺酸的响应值均应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围, 需根据浓度用水稀释或重新测定。单点校准定量时, 试样溶液中牛磺酸的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

5.5.4 试验数据处理

试样中牛磺酸的含量以质量分数 ω_2 表示, 单位为毫克每千克 (mg/kg), 多点校准按式 (3) 计算, 单点校准按式 (4) 计算:

$$\omega_2 = \frac{\rho \times V \times n}{m \times 1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液牛磺酸的质量浓度, 单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$);

V ——试样提取溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

n ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数;

m ——试样质量，单位为克（g）；

1000 ——换算系数。

$$\omega_2 = \frac{A \times \rho \times V \times n}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

A ——试样溶液中牛磺酸的峰面积；

ρ ——标准溶液中牛磺酸的质量浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

n ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数；

A_s ——标准溶液中牛磺酸的峰面积；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1000 ——换算系数。

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。

5.5.5 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
(资料性)
牛磺酸标准溶液液相色谱图

A.1 牛磺酸标准溶液液相色谱图见图A.1。

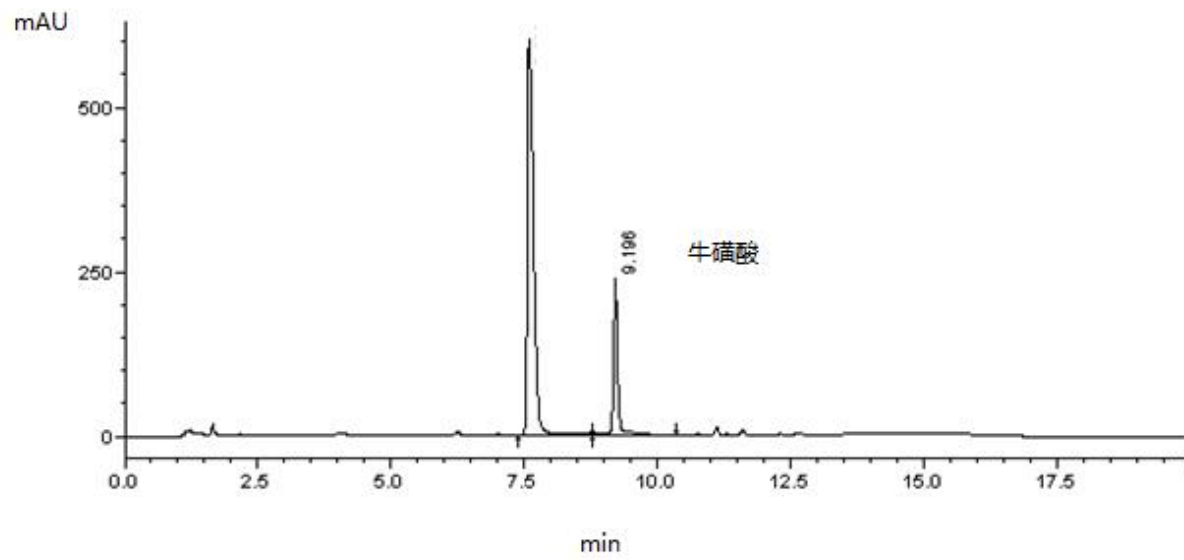


图 A.1 牛磺酸标准溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 高效液相色谱图

附录 B

(资料性)

牛磺酸标准溶液监测离子对 (MRM) 色谱图

B.1 牛磺酸标准溶液监测离子对 (MRM) 色谱图见图B.1。

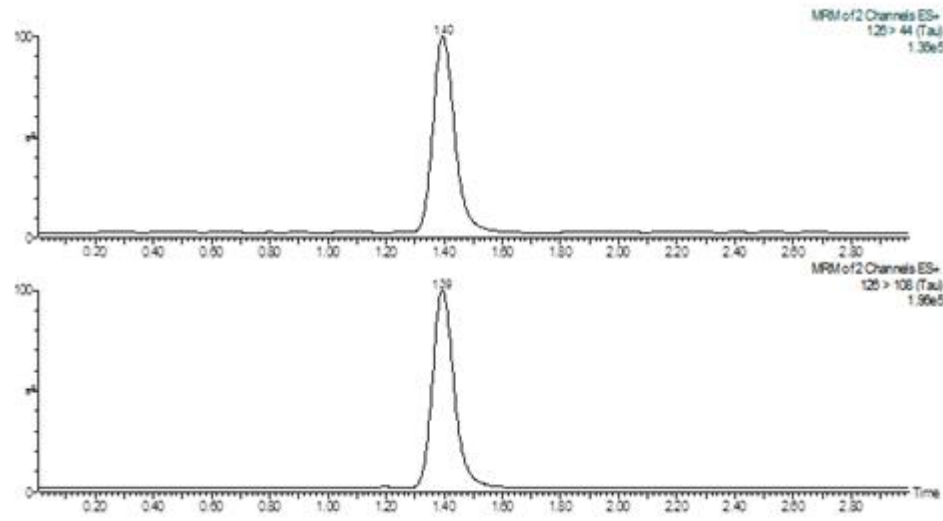


图 B.1 牛磺酸标准溶液 (100 $\mu\text{g/L}$) 监测离子色谱图