

团 体 标 准

T/CFIAS 6011—2024

宠物添加剂预混合饲料中 6 种水溶性维生素的测定 高效液相色谱法

Determination of 6 water-soluble vitamins in pet feed additive premix—
High performance liquid chromatography

2024-09-23 发布

2024-10-19 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、浙江医药股份有限公司昌海生物分公司、中牧农业连锁发展有限公司、上海天祥质量技术服务有限公司、乖宝宠物食品集团股份有限公司、天津雀巢普瑞纳宠物食品有限公司、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。

本文件主要起草人：樊霞、李兰、贾铮、严华、王继彤、姚婷、田静、徐思远、刘晓露、温善萍、蒋小英、王宁娟、何继红、张驰中、李园、周淼佳、杨文瀚、秦华、徐法典、田甜、胡玉珍、吕少骏、刘淑琴、陈姝、谢爽、烟利亚、薛德时、娄迎霞、李征、曹林、冯秀燕。

宠物添加剂预混合饲料中 6 种水溶性维生素的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了宠物添加剂预混合饲料中6种水溶性维生素含量测定的高效液相色谱法。

本文件适用于标称含有水溶性维生素的宠物添加剂预混合饲料中维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、烟酸、烟酰胺、叶酸的测定。

本文件中维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、烟酰胺的定量限为30 mg/kg；烟酸、叶酸的定量限为50 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

试样中的维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、烟酰胺经酸性溶液提取；烟酸经水提取，固相萃取小柱净化；叶酸经碱性溶液提取。高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 庚烷磺酸钠：色谱纯。

5.4 三乙胺：优级纯。

5.5 0.1 mol/L 盐酸溶液：移取 8.5 mL 盐酸，用水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.6 1 %冰乙酸溶液：移取 1 mL 冰乙酸用水稀释至 100 mL，混匀。

5.7 甲醇/氯化铵溶液（1+9）：称取 54 g 氯化铵溶解于 500 mL 水中，用盐酸调节 pH 为 3~4，取 450 mL 该溶液与 50 mL 甲醇混合。

5.8 2 mol/L 碳酸钠溶液：称取 21.2 g 碳酸钠溶解于 100 mL 水中，混匀。

5.9 5%甲酸溶液：移取 5 mL 甲酸用水稀释至 100 mL，混匀。

5.10 流动相：称取 1.1 g 庚烷磺酸钠（5.3）、100 mg 乙二胺四乙酸二钠（EDTA 二钠盐）于 1 000 mL 烧杯中，加入约 950 mL 水，加入 5 mL 三乙胺（5.4），用约 25 mL 冰乙酸调节溶液 pH 为 3.70。加水定容至 1 000 mL 容量瓶中，混匀，微孔滤膜（5.20）过滤。取该溶液 800 mL 与 200 mL 甲醇（5.2）混合，脱气，备用。

警示：5.11~5.19 条款操作应避免强光照射

5.11 维生素 B₁ 标准储备溶液（以硝酸硫胺计，1 mg/mL）：称取 50 mg 硝酸硫胺标准品（CAS 号：532-43-4，纯度≥97%）（精确至 0.1 mg）于 50 mL 棕色容量瓶中，加入盐酸溶液（5.5）超声溶解并定容。2℃~8℃保存，有效期 6 个月。

注：也可以使用盐酸硫胺标准品（CAS 号：67-03-8，纯度≥97%），结果以盐酸硫胺表达。

5.12 维生素 B₂ 标准储备溶液（以核黄素计，100 μg/mL）：称取 25 mg 核黄素标准品（CAS 号：83-88-5，纯度≥97%）（精确至 0.1 mg）于 250 mL 棕色锥形瓶中，加入 2.5 mL 冰乙酸、约 200 mL 水，于 100℃水浴中加热至完全溶解，冷却后转移至 250 mL 棕色容量瓶中，用水定容。2℃~8℃保存，有效期 6 个月。

5.13 维生素 B₆ 标准储备溶液（以盐酸吡哆醇计，1 mg/mL）：称取 50 mg 盐酸吡哆醇标准品（CAS 号：58-56-0，纯度≥97%）（精确至 0.1 mg）于 50 mL 棕色容量瓶中，加入盐酸溶液（5.5）超声溶解并定容。2℃~8℃保存，有效期 6 个月。

5.14 烟酸标准储备溶液（1 mg/mL）：称取 50 mg 烟酸标准品（CAS 号：59-56-0，纯度≥99%）（精确至 0.1 mg）于 50 mL 棕色容量瓶中，用水溶解、定容。2℃~8℃保存，有效期 6 个月。

5.15 烟酰胺标准储备溶液（1 mg/mL）：称取 50 mg 烟酰胺标准品（CAS 号：98-92-0，纯度≥99%）（精确至 0.000 1 g）于 50 mL 棕色容量瓶中，用水溶解、定容。2℃~8℃保存，有效期 6 个月。

5.16 叶酸标准储备溶液（0.5 mg/mL）：称取 25 mg 叶酸标准品（CAS 号：59-30-3，纯度≥95%）（精确至 0.1 mg）于 50 mL 棕色容量瓶中，加入碳酸钠溶液（5.8）2 mL、约 45 mL 水，超声溶解，用水定容。2℃~8℃保存，有效期 6 个月。

5.17 5 种维生素混合标准系列溶液：分别准确移取维生素标准储备溶液（5.11-5.15）适量，用水稀释并定容，配制成维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酸和烟酰胺浓度分别为 1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的混合标准系列溶液。临用现配。

5.18 叶酸标准系列溶液：准确移取叶酸标准储备溶液（5.16）适量，用水稀释并定容，配制成浓度为 1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL 的标准系列溶液。临用现配。

5.19 阳离子交换固相萃取小柱：200 mg/6 mL，或性能相当者。

5.20 微孔滤膜：0.45 μm，水系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器（或二极管阵列检测器）。

6.2 分析天平：精度为 0.1 mg。

6.3 恒温水浴锅：控温精度为±1℃。

6.4 超声波清洗仪。

6.5 离心机：转速不低于 7000 r/min。

6.6 酸度计：精度为±0.01。

7 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，密闭容器中避光保存，备用。膏状或液体原包装保存，备用。

8 试验步骤

警示：以下操作应避免强光照射。

8.1 维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、烟酰胺的提取

平行做两份试验。称取试样适量（称样量按附录A执行），精确至0.1 mg，置于100 mL棕色锥形瓶中，加入约70 mL冰乙酸溶液（5.6），充分混匀，置于100 °C水浴中加热30 min（中间旋摇两次，避免样品附着于瓶底），冷却至室温后转移至100 mL棕色容量瓶中，用水定容。移取约5 mL该溶液，于7 000 r/min离心10 min，取上清液微孔滤膜（5.20）过滤，待测。

8.2 含吸附剂的粉状试样中维生素 B₁的提取

平行做两份试验。称取试样适量（称样量按附录A执行），精确至0.1 mg，置于100 mL棕色容量瓶中，加入约70 mL甲醇/氯化铵溶液（5.7），超声提取30 min（中间旋摇两次，避免样品附着于瓶底），冷却至室温后，用甲醇/氯化铵溶液（5.7）定容。移取约5 mL该溶液，于7 000 r/min离心10 min，取上清液微孔滤膜（5.20）过滤，待测。

注：沸石粉、蒙脱石、膨润土、凹凸棒等常作为吸附剂使用。

8.3 烟酸的提取和净化

8.3.1 提取

平行做两份试验。称取试样适量（称样量按附录A执行），精确至0.1 mg，置于100 mL容量瓶中，加入约70 mL水，超声提取30 min（中间旋摇两次，避免样品附着于瓶底），冷却后用水定容，摇匀。移取约5 mL该溶液，于7 000 r/min离心10 min，取上清液微孔滤膜（5.20）过滤，备用。

8.3.2 净化

依次用6 mL甲醇、6 mL水活化固相萃取小柱（5.19），准确加入3 mL提取液（8.3.1），分别用1 mL水、1 mL甲醇淋洗小柱，挤干，用3 mL洗脱液（5.9）洗脱，收集洗脱液，用洗脱液定容至3 mL，涡旋混匀，微孔滤膜（5.20）过滤，待测。

8.4 叶酸的提取

平行做两份试验。称取试样适量（称样量按附录A执行），置于100 mL棕色容量瓶中，（固体试样需加入与称样量相同量的EDTA二钠盐）加入2 mL碳酸钠溶液（5.8），充分混匀，再加入约85 mL水超声提取30 min（中间旋摇两次，避免样品附着于瓶底），冷却后用水定容至刻度。移取约5 mL该溶液，于7 000 r/min离心10 min，取上清液微孔滤膜（5.20）过滤，备用。

8.5 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；
- 流动相：见（5.10）；
- 流速：1.0 mL/min；
- 柱温：30 °C；
- 检测波长：275 nm（或者采用各维生素最大吸收波长：维生素 B₁：242 nm；维生素 B₂：267 nm；维生素 B₆：290 nm；烟酸：262 nm；烟酰胺：267 nm；叶酸：282 nm）；
- 进样量：10 μL。

8.6 测定

8.6.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器最佳工作条件下，分别取混合系列标准溶液（5.17、5.18）和试样溶液（8.1-8.4）上机测定。待测物标准溶液色谱图见附录B。

8.6.2 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。

8.6.3 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。以标准溶液中待测物的峰面积为纵坐标，以标准溶液中待测组分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待测物的响应值应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围，需根据测定浓度稀释或重新测定。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 ω_i 计，单位以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（1）计算，单点校准按公式（2）计算：

$$\omega_i = \frac{\rho_i \times V \times n}{m} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

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；
- m ——试样质量，单位为克（g）；

$$\omega_i = \frac{A_i \times \rho_i \times V \times n}{A_{Si} \times m} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

式中：

- A_i ——试样溶液中待测物的色谱峰面积；
- ρ_i ——标准工作溶液中待测物的质量浓度，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_{Si} ——标准工作溶液中待测物的色谱峰面积；
- 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10%。

附 录 A
(规范性)
参考称样量

参考称样量见表A.1。

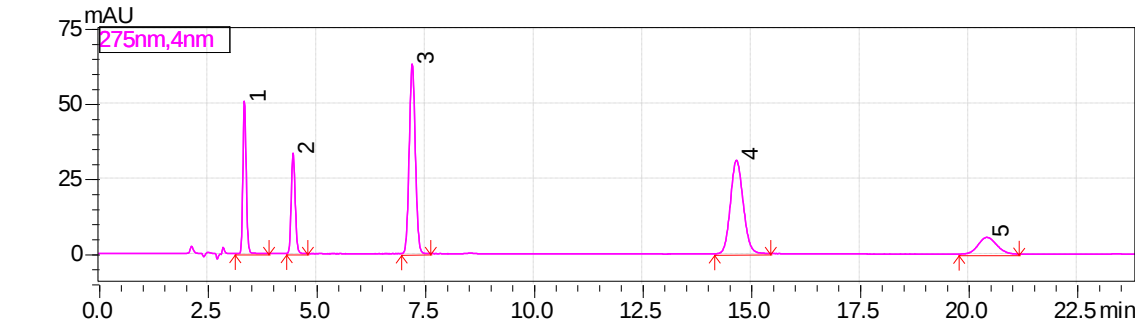
表A.1 参考称样量

维生素含量 ^a (mg/kg)	<100	100~1000	>1000
称样量 (g)	3~5	1~3	0.5
注： ^a 是指6种水溶性维生素中标示量最低的维生素含量。			



附录 B
(资料性)
标准溶液液相色谱图

B.1 5 种维生素混合标准工作溶液液相色谱图见图 B.1。

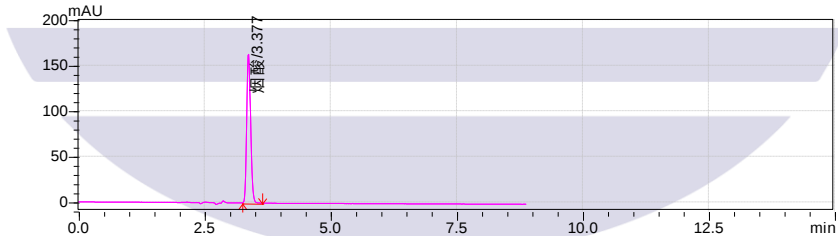


标引序号说明：

- [1]—烟酸；
- [2]—烟酰胺；
- [3]—维生素B₆；
- [4]—维生素B₁；
- [5]—维生素B₂。

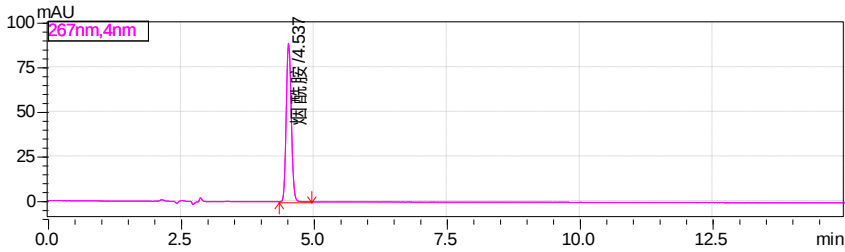
图B.1 维生素混合标准工作溶液（烟酸、烟酰胺、维生素 B₆、维生素 B₁ 浓度为 50.0 μg/mL；维生素 B₂ 浓度为 5 μg/mL）色谱图

B.2 烟酸标准工作溶液液相色谱图见图 B.2。



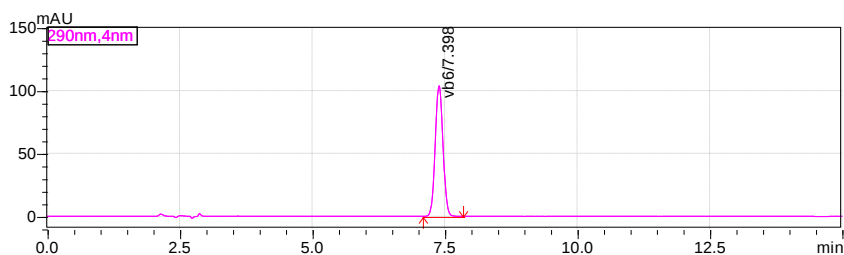
图B.2 烟酸标准工作溶液（50.0 μg/mL）色谱图

B.3 烟酰胺标准工作溶液液相色谱图见图 B.3。

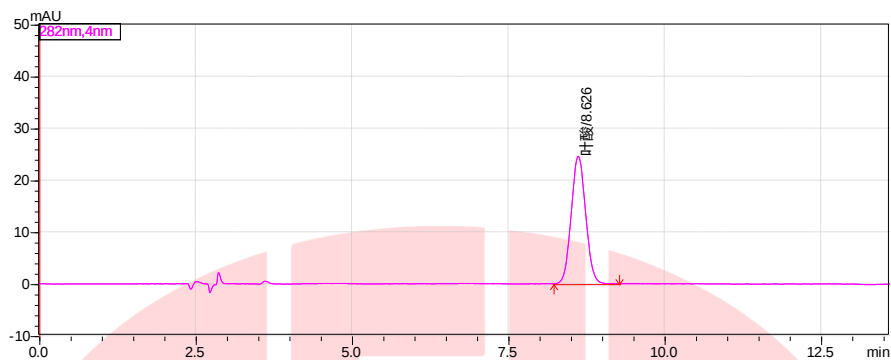


图B.3 烟酰胺标准工作溶液（50.0 μg/mL）色谱图

B.4 维生素 B₆ 标准工作溶液液相色谱图见图 B.4。

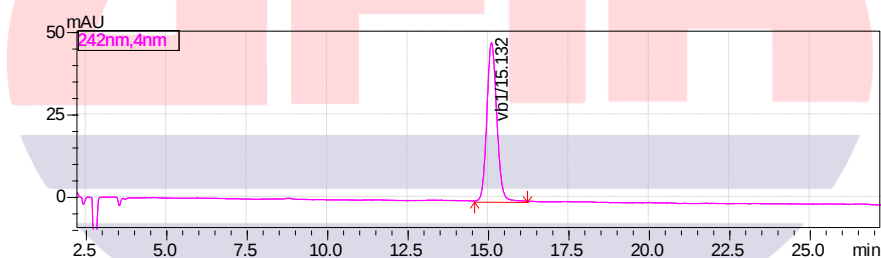
图B.4 维生素 B₆ 标准工作溶液 (50.0 μg/mL) 色谱图

B.5 叶酸标准工作溶液液相色谱图见图 B.5。

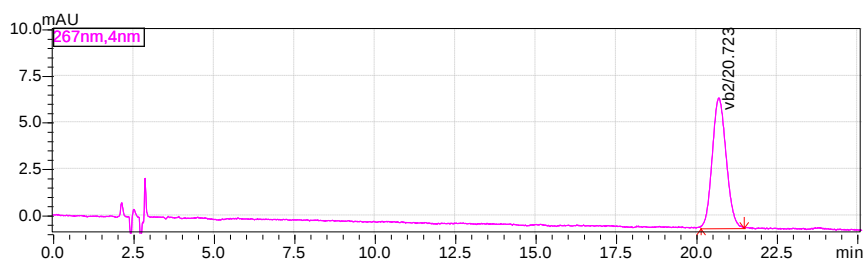


图B.5 叶酸标准工作溶液 (50.0 μg/mL) 色谱图

B.6 维生素 B₁ 标准工作溶液液相色谱图见图 B.6。

图B.6 维生素 B₁ 标准工作溶液 (50.0 μg/mL) 色谱图

B.7 维生素 B₂ 标准工作溶液液相色谱图见图 B.7。

图B.7 维生素 B₂ 标准工作溶液 (5.0 μg/mL) 色谱图

