ICS 65.120
CCS B 46

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3879—2021

饲料中25-羟基维生素D_3的测定

Determination of 25-Hydroxy Vitamin D_3 in feeds

2021-05-07 发布

2021-11-01 实施

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:上海市兽药饲料检测所、帝斯曼维生素(上海)有限公司。

本文件主要起草人:黄士新、商军、曹莹、张浩然、王博、严凤、华贤辉、张亦菲、田恺、黄家莺、吴剑平、徐汀、张婧、贡松松、张进、王晓燕、虞哲高、肖平、石宝石。

饲料中25-羟基维生素D_3的测定

1 范围

本文件规定了饲料中25-羟基维生素D_3测定的高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。

本文件中高效液相色谱法适用于含量大于2 mg/kg的添加剂预混合饲料中25-羟基维生素D_3含量的测定；液相色谱-串联质谱法适用于配合饲料、浓缩饲料和含量小于等于2 mg/kg的添加剂预混合饲料中25-羟基维生素D_3含量的测定。

本文件高效液相色谱法中添加剂预混合饲料的检出限为0.2 mg/kg，定量限为1.0 mg/kg。液相色谱-串联质谱法中配合饲料的检出限为2 μg/kg，定量限为5 μg/kg；浓缩饲料的检出限为5 μg/kg，定量限为10 μg/kg；添加剂预混合饲料的检出限为50 μg/kg，定量限为100 μg/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 高效液相色谱法

4.1 原理

试样依次加水和甲醇，超声提取25-羟基维生素D_3，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

4.2 试剂或材料

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 甲醇：色谱纯。

4.2.3 85%甲醇溶液：取85 mL甲醇(4.2.2)，加水稀释至100 mL，混匀。

4.2.4 标准储备溶液(1 mg/mL)：称取25-羟基维生素D_3标准品($C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$，CAS号：63283-36-3，纯度不低于98%)25 mg，准确至0.01 mg，置于25 mL棕色容量瓶中，用甲醇(4.2.2)溶解定容。于−20 ℃下保存，有效期为2个月。

4.2.5 标准中间溶液Ⅰ(100 μg/mL)：准确移取25-羟基维生素D_3标准储备溶液(4.2.4)2.00 mL于20 mL棕色容量瓶中，用甲醇(4.2.2)定容。于4 ℃冷藏保存，有效期为2周。

4.2.6 标准中间溶液Ⅱ(25 μg/mL)：准确移取标准中间溶液1(4.2.5)5.00 mL于20 mL棕色容量瓶中，用甲醇(4.2.2)定容。临用现配。

4.2.7 标准系列溶液：分别准确移取标准中间溶液Ⅱ(4.2.6)适量于棕色容量瓶中，用85%甲醇溶液(4.2.3)稀释定容配成标准系列溶液，浓度分别为0.05 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL。临用现配。

4.2.8 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器/二极管阵列检测器。

4.3.2 分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

4.3.3 离心机：转速不低于 9 000 r/min。

4.3.4 超声波仪：功率不低于 280 W。

4.4 样品

按 GB/T 20195 的规定制备试样，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶中，避光保存，备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样溶液的制备

平行做 2 份试验。称取试样 3 g，准确至 0.000 1 g，置于 50 mL 离心管中，加水 10 mL，超声10 min，期间旋摇 1 次以防样品附着管底，加入甲醇(4.2.2)30 mL，摇匀，超声提取 20 min，以 6 000 r/min 的转速离心 5 min，将上清液转移至 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇(4.2.2)定容至刻度，摇匀；过 0.22 μm 滤膜，待上机。

4.5.2 液相色谱参考条件

色谱柱：Thermo AQUASIL[1] C_{18}柱，长 150 mm，内径 3 mm，粒径 3 μm，或性能相当者。

柱温：30 ℃。

检测波长：264 nm。

流动相：A 相为水，B 相为甲醇(4.2.2)，梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间，min	A 相，%	B 相，%
0.00	15	85
10.00	0	100
15.00	0	100
16.00	15	85
20.00	15	85

流速：0.6 mL/min。

进样量：50 μL。

4.5.3 测定

4.5.3.1 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(4.2.7)和试样溶液(4.5.1)上机测定。25-羟基维生素 D_3标准溶液的液相色谱图见附录 A。

4.5.3.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中 25-羟基维生素 D_3保留时间应与浓度相当的标准系列溶液的 25-羟基维生素 D_3的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.3.3 定量

以 25-羟基维生素 D_3的浓度为横坐标、色谱峰面积(响应值)为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.999。试样溶液中 25-羟基维生素 D_3的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用 85%甲醇溶液(4.2.3)稀释(n 倍)后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中 25-羟基维生素 D_3的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中 25-羟基维生素 D_3($C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$)含量以质量分数计。多点校准按公式(1)计算，单点校准按公式(2)计算。

1) Thermo AQUASIL 是由美国赛默飞世尔科技(Thermo)公司提供的色谱柱商品。给出这一信息是为了方便本部分的使用者，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。

$$w_1=\frac{\rho_1\times V_1\times 1\,000\times n}{m\times 1\,000} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

w_1 ——试样中 25-羟基维生素 D_3($C_{27}H_{44}O_2\cdot H_2O$)含量的数值，单位为毫克每千克(mg/kg)。

ρ_1 ——从标准曲线查得的试样溶液 25-羟基维生素 D_3 的质量浓度的数值，单位为微克每毫升(μg/mL)；

V_1 ——试样溶液的体积的数值，单位为毫升(mL)；

n ——试样溶液的稀释倍数；

m ——试样质量的数值，单位为克(g)。

$$w_1=\frac{A\times\rho_s\times V_1\times 1\,000\times n}{A_s\times m\times 1\,000} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

A ——试样溶液中 25-羟基维生素 D_3 色谱峰面积；

A_s ——标准溶液中 25-羟基维生素 D_3 的峰面积；

ρ_s ——标准溶液中 25-羟基维生素 D_3 的质量浓度的数值，单位为微克每毫升(μg/mL)；

V_1 ——试样溶液的体积的数值，单位为毫升(mL)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下，当试样中 25-羟基维生素 D_3 含量≥20 mg/kg 时，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 10%；当试样中 25-羟基维生素 D_3 含量<20 mg/kg 时，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 15%。

5 液相色谱-串联质谱法

5.1 原理

试样经加水混匀后，用甲基叔丁基醚(MTBE)振荡提取试样中的 25-羟基维生素 D_3，氮气吹干后，复溶，用液相色谱-串联质谱仪检测，内标法定量。

5.2 试剂或材料

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 甲基叔丁基醚(MTBE)：色谱纯。

5.2.3 甲醇：色谱纯。

5.2.4 甲酸：色谱纯。

5.2.5 0.1%甲酸甲醇溶液：1 mL 甲酸(5.2.4)，加甲醇(5.2.3)稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.6 0.1%甲酸溶液：1 mL 甲酸(5.2.4)，加水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.7 复溶液：85 mL 0.1%甲酸甲醇溶液(5.2.5)，加 0.1%甲酸溶液(5.2.6)稀释至 100 mL，混匀。

5.2.8 标准储备溶液(1 mg/mL)：称取 25-羟基维生素 D_3 标准品($C_{27}H_{44}O_2\cdot H_2O$，CAS 号：63283-36-3，纯度不低于 98%)25 mg，准确至 0.01 mg，置于 25 mL 棕色容量瓶中，用甲醇(5.2.3)溶解定容。于−20 ℃下保存，有效期为 2 个月。

5.2.9 标准中间溶液(1 μg/mL)：准确移取 25-羟基维生素 D_3 标准储备溶液(5.2.8)1.00 mL 于 1 000 mL棕色容量瓶中，用甲醇(5.2.3)定容。于 4 ℃冷藏保存，有效期为 1 周。

5.2.10 内标储备溶液(50 μg/mL)：称取 25-羟基维生素 D_3- d6 标准品(CAS 号：78782-98-6，纯度不低于 98%)2.5 mg，准确至 0.01 mg，置于 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇(5.2.3)溶解定容。于−20 ℃下保存，有效期为 2 个月。

5.2.11 内标工作溶液(1 μg/mL)：准确移取内标储备溶液(5.2.10)1.00 mL 于 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇(5.2.3)稀释定容。临用现配。

5.2.12 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液(5.2.9)和内标工作溶液(5.2.11)于棕色容量瓶中，

用复溶液(5.2.7)稀释定容,配成标准系列溶液,浓度分别为 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL。内标浓度为 100 ng/mL。临用现配。

5.2.13 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.3.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

5.3.3 离心机:转速不低于 9 000 r/min。

5.3.4 振荡器:振荡频率不低于 1 500 r/min。

5.3.5 涡旋混合器。

5.3.6 氮吹仪。

5.4 样品

按 GB/T 20195 的规定制备试样,至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中,避光保存,备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样溶液的制备

5.5.1.1 配合饲料试样溶液制备

平行做 2 份试验。称取试样 2 g,准确至 0.000 1 g,置于 50 mL 离心管中,准确加入 200 μL 内标工作溶液(5.2.11)和 5 mL 水,涡旋混匀后,于 1 500 r/min 振荡提取 20 min,准确加入 20.00 mL MTBE(5.2.2),混匀,继续振荡提取 20 min,于 9 000 r/min 离心 5 min,准确移取上清液 10.00 mL 于离心管中,50 ℃氮吹至干。准确加入 1.00 mL 复溶液(5.2.7)复溶,过 0.22 μm 滤膜,待上机。

5.5.1.2 浓缩饲料试样溶液制备

平行做 2 份试验。称取试样 2 g,准确至 0.000 1 g,置于 50 mL 离心管中,准确加入 400 μL 内标工作溶液(5.2.11)和 5 mL 水,涡旋混匀后,于 1 500 r/min 振荡提取 20 min,准确加入 20.00 mL MTBE(5.2.2),混匀,继续振荡提取 20 min,于 9 000 r/min 离心 5 min,准确移取上清液 10.00 mL 于离心管中,50 ℃氮吹至干。准确加入 2.00 mL 复溶液(5.2.7)复溶,过 0.22 μm 滤膜,待上机。

5.5.1.3 添加剂预混合饲料试样溶液制备

平行做 2 份试验。称取试样 2 g,准确至 0.000 1 g,置于 50 mL 离心管中,准确加入 40 μL 内标储备溶液(5.2.10)和 5 mL 水,涡旋混匀后,于 1 500 r/min 振荡提取 20 min,准确加入 20.00 mL MTBE(5.2.2),混匀,继续振荡提取 20 min,于 9 000 r/min 离心 5 min,准确移取上清液 1.00 mL 于离心管中,50 ℃氮气吹至干。准确加入 1.00 mL 复溶液(5.2.7)复溶,过 0.22 μm 滤膜,待上机。

5.2 液相色谱参考条件

色谱柱:Waters HSS T3[1] C_{18}柱,长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.8 μm,或性能相当者。

柱温:30 ℃。

流动相:A 相为 0.1%甲酸溶液(5.2.6),B 相为 0.1%甲酸甲醇溶液(5.2.5),梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

时间,min	A 相,%	B 相,%
0.00	15	85
1.00	15	85
3.00	0	100
6.00	0	100
10.00	15	85

1) Waters HSS T3 是由美国沃特世(Waters)公司提供的色谱柱商品。给出这一信息是为了方便本部分的使用者,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。

流速：0.3 mL/min。

进样量：10 μL。

5.5.3 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI^+）。

检测方式：多反应监测（MRM）。

离子源温度：350 ℃。

雾化器温度：350 ℃。

电离电压：3.5 kV。

多反应监测（MRM）离子对、透镜电压及碰撞能量见表 3。

表 3 25-羟基维生素 D_3 的多反应监测（MRM）离子对、透镜电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	检测离子对 m/z	透镜电压 V	碰撞能量 eV
25-羟基维生素 D_3	401.3>257.1	90	11
	401.3>383.2	90	11
	401.3>365.3[a]	90	11
25-羟基维生素 D_3- d6	407.2>371.6	93	10
[a] 为定量离子。			

5.5.4 测定

5.5.4.1 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（5.2.12）和试样溶液（5.5.1）上机测定。25-羟基维生素 D_3 和 25-羟基维生素 D_3- d6 的定量离子色谱图见附录 B。

5.5.4.2 定性

在相同试验条件下，试样溶液与标准系列溶液中 25-羟基维生素 D_3 的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。根据表 3 选择的定性离子对，比较试样谱图中 25-羟基维生素 D_3 定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表 4 规定的范围，则可判定为样品中存在对应的 25-羟基维生素 D_3。

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
最大允许偏差，%	±20	±25	±30

5.5.4.3 定量

以 25-羟基维生素 D_3 的浓度为横坐标，25-羟基维生素 D_3 与 25-羟基维生素 D_3- d6 色谱峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与标准溶液中 25-羟基维生素 D_3 的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出范围，应将试样溶液用复溶液（5.2.7）做相应稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中 25-羟基维生素 D_3 的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中 25-羟基维生素 D_3（$C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$）含量以质量分数计。多点校准按公式（3）计算；单点校准，内标法按公式（4）计算。

$$w_2 = \frac{\rho_2 \times V_2 \times V_3}{m \times V_4} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

w_2——试样中 25-羟基维生素 D_3（$C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$）含量的数值，单位为微克每千克（μg/kg）；

ρ_2——从标准曲线查得的试样溶液 25-羟基维生素 D_3 质量浓度的数值，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_2——提取溶液（MTBE）体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_3——氮气吹干后复溶液体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_4——移取上清液体积的数值，单位为毫升(mL)。

$$w_2=\frac{A\times A'_{is}\times\rho_s\times\rho_{is}\times V_2\times V_3}{A_{is}\times A_s\times\rho'_{is}\times V_4\times m} \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

A ——试样溶液中 25-羟基维生素 D_3 的色谱峰面积；

A'_{is}——标准溶液中内标的峰面积；

ρ_s ——标准溶液中 25-羟基维生素 D_3 质量浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

ρ_{is} ——试样溶液中内标质量浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

A_{is} ——试样溶液中内标的峰面积；

A_s ——标准溶液中 25-羟基维生素 D_3 的峰面积；

ρ'_{is} ——标准溶液中内标质量浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

5.7 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 20%。

AGRICULTURAL STANDARD PUBLISHING RESEARCH CENTER

附　录　A
（资料性）
25-羟基维生素 D_3 标准溶液（5 μg/mL）液相色谱图

25-羟基维生素 D_3 标准溶液（5 μg/mL）液相色谱图见图 A.1。

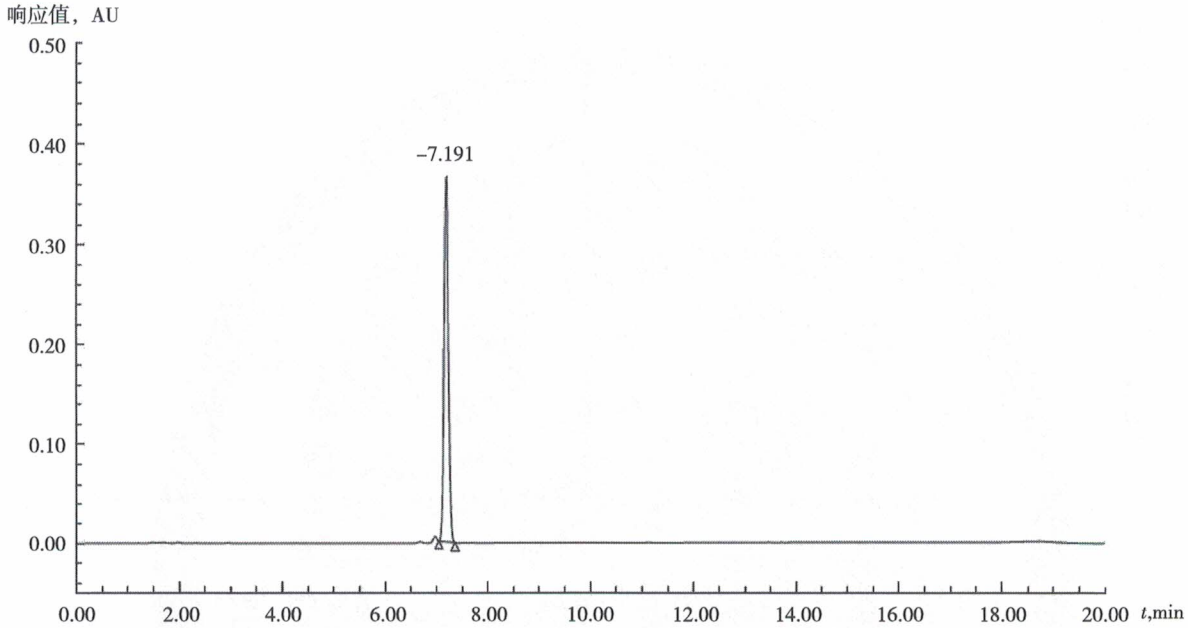
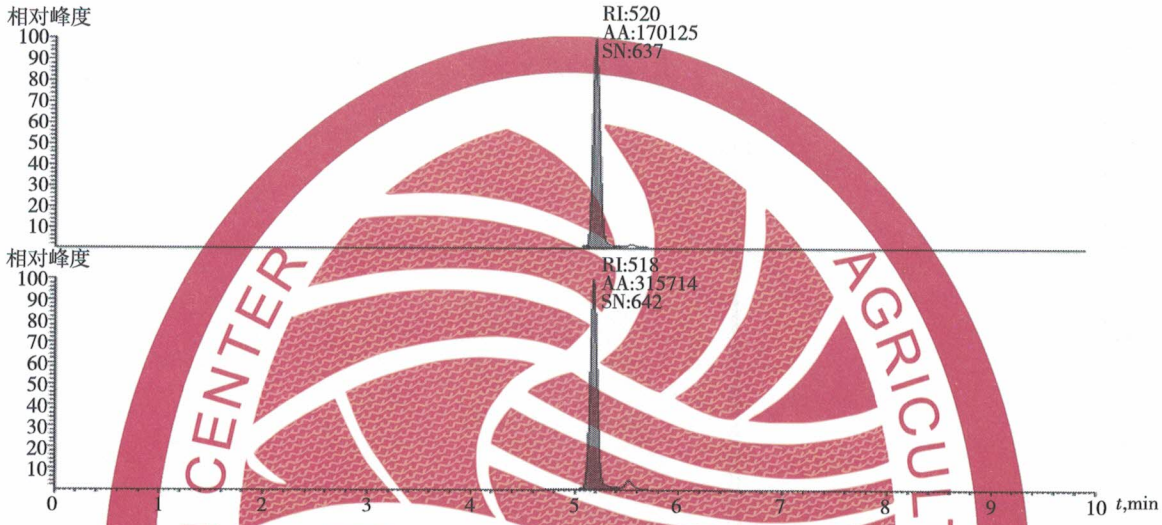


图 A.1　25-羟基维生素 D_3 标准溶液（5 μg/mL）液相色谱图

附　录　B
（资料性）
25-羟基维生素 D_3 标准溶液（50 ng/mL）定量离子色谱图

25-羟基维生素 D_3 标准溶液（50 ng/mL）液相色谱图见图 B.1。



注：由上而下依次为 25-羟基维生素 D_3、25-羟基维生素 D_3-d6。

图 B.1　25-羟基维生素 D_3 标准溶液（50 ng/mL）定量离子色谱图

AGRICULTURAL STANDARD PUBLISHING RESEARCH CENTER

NY/T 3879—2021

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
饲料中 25-羟基维生素 D_3 的测定
NY/T 3879—2021
*　*　*
中 国 农 业 出 版 社 出 版
（北京市朝阳区麦子店街 18 号楼）
（邮政编码：100125　网址：www.ccap.com.cn）
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行　各地新华书店经销
*　*　*
开本 880mm×1230mm 1/16　印张 1　字数 20 千字
2021 年 10 月第 1 版　2021 年 10 月北京第 1 次印刷
书号：16109・8671
定价：32.00 元

版权专有　侵权必究
举报电话：（010）59194261

NY/T 3879—2021