

T B

团体标准

T/ NAIA×××- ××××

葡萄酒中维生素 B₂ 的测定 液相色谱串联质谱法

× ×-× ×发布

× ×-× ×实施

宁夏化学分析测试协会 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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监管重点实验室（枸杞和葡萄酒质量安全））、宁夏回族自治区药品检定研究院、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：张瑶、王泽岚、郭阳、汤丽华、张芦燕、王琛、吴明、吕毅、马桂娟、张小飞。本文件为首次发布。

葡萄酒中维生素 B₂ 的测定 液相色谱-串联质谱法

1. 范围

本文件规定了葡萄酒中维生素 B₂ 含量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于葡萄酒中维生素 B₂ 含量的测定和确证。

2. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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。

3. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4. 原理

样品经混匀、离心、过滤，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5. 试剂和材料

除另有说明，所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲酸铵(NH₄HCO₂)：色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH₃OH)：色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 5mmol/L 甲酸铵溶液：称取 0.1576g 甲酸铵(5.1.1)，用超纯水定容至 500mL 混合均匀。

5.3 标准品

维生素 B₂ 标准物质：纯度均不低于 99.0%，CAS 号：83-88-5，分子式：C₁₇H₂₀N₄O₆

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液（100.0μg/mL）：准确称取适量的标准物质（5.3），加入 2mL 盐酸水（1+1），超声溶解后转移至 100 mL 棕色容量瓶，用超纯水定容至 100 mL，制备浓度为 100.0 μg/mL 的标准储备液，于 4℃冰箱中避光保存。

5.4.2 标准中间液（1.0μg/mL）：吸取维生素 B₂ 标准储备液 1mL，用超纯水定容至 100 mL，得到浓度为 1.0 μg/mL 的标准中间液，4℃冰箱中避光保存。

5.4.3 标准工作液：移取适当体积的标准中间溶液，用流动相将维生素 B₂ 配制成质量浓度为 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0ng/mL 的标准工作液，现用现配。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾电离源。
- 6.2 分析天平：感量为 0.00001 g 和 0.01 g。
- 6.3 高速离心机：15000 r/min。
- 6.4 涡旋混合器。
- 6.5 具塞塑料离心管：2.0 mL。
- 6.6 超声波振荡器。
- 6.7 微孔滤膜（水相）：0.22 μm。

7 分析步骤

7.1 试样制备

起泡葡萄酒需预先脱气。将 100 mL 试样倒入带排气塞的瓶中，置于超声波振荡器(6.6)中脱气，直至无气体逸出。

7.2 试样的提取

将葡萄酒试样摇匀，取一定量试样于塑料离心管中，于 15000 r/min 离心 5 min，上清液过 0.22 μm 滤膜，供液相色谱-串联质谱分析。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C8 色谱柱（100 mm×2.1 mm，3.5 μm),或相当者；
- b) 柱温：30 °C；
- c) 进样量：5 μL；
- d) 流速：0.3 mL/min；
- e) 流动相 A：5mmol/L 甲酸铵溶液（5.2.1），流动相 B：甲醇（5.1.2）

7.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- b) 扫描方式:正离子扫描；
- c) 检测方式：多反应离子监测（MRM）；
- d) 脱溶剂气、碰撞气均为高纯氮气或其它合适气体；
- e) 破碎电压、碰撞能等参数应优化至最优灵敏度；
- f) 监测离子参数情况见表 1。

表 1 离子参数

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	破碎电压 V	碰撞能 eV	去簇电压 V
维生素 B ₂	387.0	243.1 ^a	135	32	55
		172.0	125	54	
a 为定量碎片离子。					

7.4 定性与定量测定

7.4.1 定性测定

在同样测试条件下，试样中维生素 B₂ 的保留时间与标准溶液中维生素 B₂ 的保留时间之比，偏差在±2.5%以内，且检测到的相对离子丰度，应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表 2 的要求。

表 2 定性测定时相对离子丰度最大允许偏差

相对丰度(基峰)	>50%	20%~50%(含)	10%~20%(含)	<10%
允许的相对偏差	±10%	±15%	±20%	±50%

7.4.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液，作校准曲线，以色谱峰面积定量，按外标法计算，标准溶液及试样溶液中维生素 B₂ 响应值均应在仪器检测的线性范围内，在上述液相色谱质谱条件下，维生素 B₂ 标准溶液的特征离子质量色谱图见附录 A。

7.5 空白试验

除不加试样外，采用相同的测定步骤进行操作。

8 结果计算和表述

试样中维生素 B₂ 各组分含量按标准曲线法或按公式（1）计算获得，计算结果应扣除空白值，并保留两位有效数字。

$$X = C \times f \tag{1}$$

式中：

- X —试样中维生素 B₂ 的含量，单位为微克每升（μg/L）；
- C —从标准曲线得到的试样中溶液维生素 B₂ 的浓度，单位为微克每升（μg/L）；
- f —样品稀释倍数。

9 定量限

维生素 B₂ 的为检出限 1.0 μg/L，定量限为 3.0μg/L。

10 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性)
维生素 B₂ 标准溶液色谱图

维生素 B₂ 标准溶液 (50.0 ng/mL) 的色谱图见图 A.1

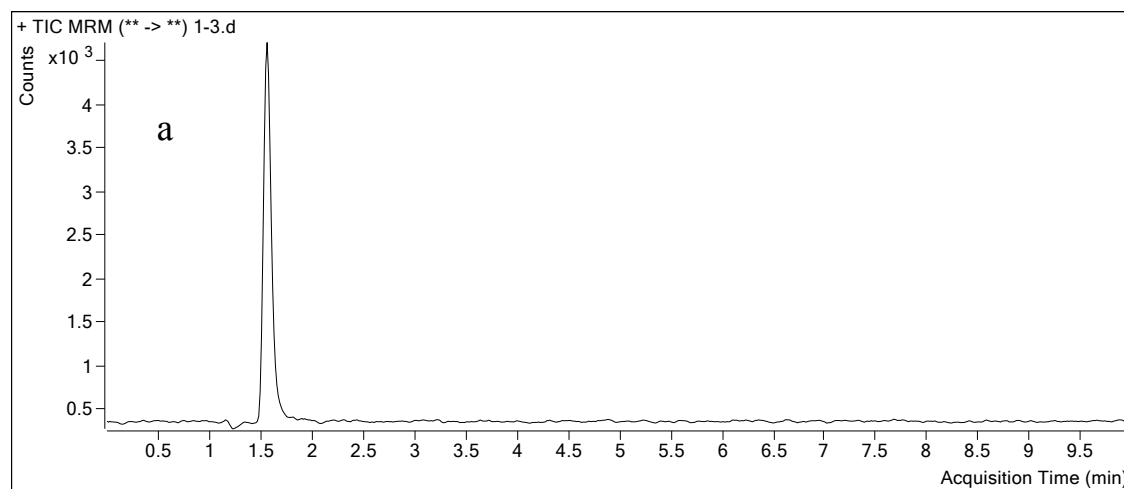


图 A. a 维生素 B₂ 标准溶液 (50.0 ng/mL) 离子流色谱图

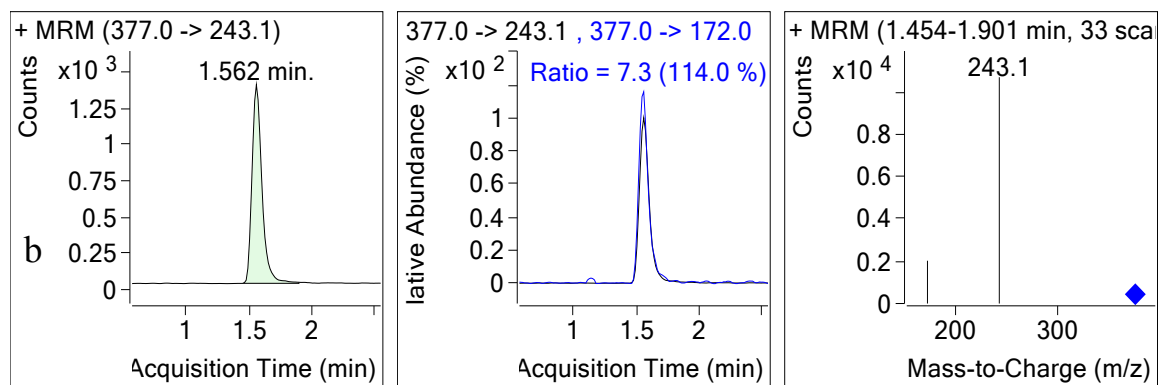


图 A. b 维生素 B₂ 特征离子谱图