

团 体 标 准

T/CFIAS 6005—2022

饲料中孟布酮的测定 高效液相色谱法

**Determination of menbutone in feeds —
High performance liquid chromatography**

2022-04-13 发布

2022-05-13 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这些专利的责任。

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：大连市检验检测认证技术服务中心、大连华肽生物科技有限公司、大连英翔生物技术有限公司、大连赛姆生物工程技术有限公司、辽宁省检验检测认证中心、大连计量检验检测研究院有限公司、黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站。

本文件主要起草人：刘雪红、袁奎敬、葛祥武、邓晓杰、段婷婷、王兴庄、靠吉祥、徐永平、王丽娜、田晓玲、孙进建、郑洁、孙程鹏、桂英爱、许炳雯、余巍、时明、林雷、陶娅、高云峰。

饲料中孟布酮的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了饲料中孟布酮的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊的配合饲料、浓缩饲料、精料补充料中孟布酮的测定。

本文件检出限为 0.06 mg/kg，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

试样中孟布酮经乙腈超声提取，固相萃取柱净化，用高效液相色谱仪检测，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 乙腈：色谱纯。

5.3 甲醇：色谱纯。

5.4 0.5%磷酸溶液：量取5 mL磷酸，加水定容至 1 000 mL，混匀。

5.5 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取孟布酮（ $C_{19}H_{14}O_4$ ，CAS号：3562-99-0，含量不低于99%）标准品 10 mg（精确至0.01 mg）置于 10 mL容量瓶中，用乙腈（5.2）溶解并定容，摇匀，于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期为 3 个月。

5.6 标准中间溶液（100 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确量取标准储备溶液（5.5）1 mL，置于10 mL容量瓶中，用甲醇（5.3）稀释至刻度，摇匀，于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期为 3 个月。

5.7 标准系列工作溶液：准确移取适量标准中间溶液（5.6）置于10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.3）稀释定容配成标准系列工作溶液，浓度分别为0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL，临用现配。

5.8 0.5%氨水溶液：量取0.5 mL氨水，加水定容至 100 mL，混匀。

5.9 9%氨化甲醇溶液：量取9 mL氨水，加甲醇（5.3）定容至 100 mL，混匀。

5.10 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

5.11 固相萃取柱：混合型弱阴离子填料，粒径40 μm，60 mg/3 mL或性能相当者。

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：感量 0.001 g和0.01 mg。

6.3 氮吹仪：可控温。

6.4 离心机：转速不低于 8 000 r/min。

6.5 固相萃取装置。

6.6 超声波清洗机。

7 样品

按 GB/T 20195 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，装入磨口瓶中保存，备用。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g（精确至0.001 g），于 50 mL 离心管中，准确加入乙腈（5.2）10 mL，涡旋混匀1 min，置于 50 °C 水浴超声提取 10 min，每隔 5 min 充分震荡一次。8 000 r/min 离心 10 min。取上清液于 50 mL 离心管中，残渣重复提取 1 次，合并两次提取液，混匀。准确移取 10 mL 提取液，于 50 °C下 氮气吹至近干，残留物中加入 0.5 %氨水溶液（5.8）5 mL，涡旋混匀，得到试样待净化溶液，备用。

8.2 净化

将固相萃取柱（5.11）依次用 3 mL甲醇（5.3）、3 mL水（5.1）进行活化，准确移取试样待净化溶液（8.1）5 mL 过柱，用 3 mL 甲醇（5.3）淋洗，抽干。用 3 mL 9 %氨化甲醇溶液（5.9）洗脱，收集洗脱液，于 50 °C下氮气吹至近干，准确加入 1 mL 甲醇（5.3）溶解，涡旋混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，得到试样溶液，供高效液相色谱仪测定。

8.3 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈柱，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 5.0 μm，或性能相当者。

柱温：30 °C。

检测波长：236 nm。

流速：1.0 mL/min。

进样量：10 μL。

流动相：A，乙腈（5.2）；B，0.5%磷酸溶液（5.4），梯度洗脱，洗脱程序见表1。

表 1 洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	10.0	90.0
1.00	10.0	90.0
2.00	60.0	40.0
8.00	60.0	40.0
8.10	90.0	10.0
9.00	90.0	10.0
9.10	10.0	90.0

8.4 测定

8.4.1 标准系列工作溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列工作溶液（5.7）和试样溶液（8.2）上机测定。孟布酮标准溶液的液相色谱图参见附录 A。

8.4.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中孟布酮保留时间应与标准系列工作溶液（浓度相当）中孟布酮的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%以内。

8.4.3 定量

以孟布酮标准系列工作溶液中的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液中孟布酮的浓度应在标准曲线的线性范围内，如超出范围，应将试样溶液用甲醇（5.3）稀释至线性范围内，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中孟布酮的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中孟布酮的含量以质量分数 w 计，单位为毫克每千克（mg/kg）。单点校准按公式（1）计算：

$$w = n \times \frac{A \times V_1 \times V_3 \times \rho \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A ——试样溶液中孟布酮的峰面积；

V_1 ——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——试样定容的体积，单位为毫升（mL）；

ρ ——标准工作液中孟布酮的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

A_s ——标准工作液中孟布酮的峰面积；

V_2 ——用于净化的试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

n ——稀释倍数。

多点校准按公式（2）计算：

$$w = n \times \frac{\rho_1 \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

ρ_1 ——从标准曲线查得试样溶液中孟布酮的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V_1 ——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——试样定容的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

V_2 ——用于净化的试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；

n ——稀释倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

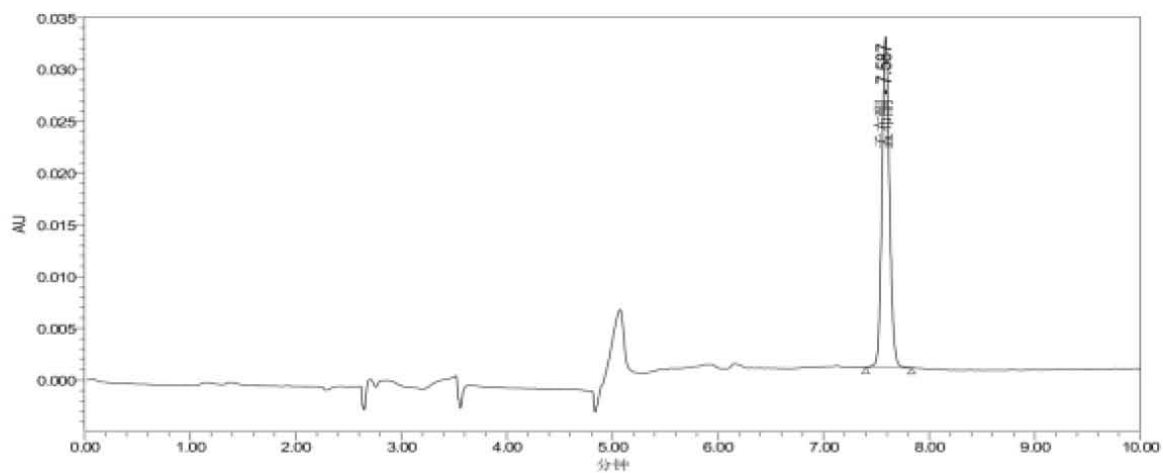
10 精密度

在重复性条件下，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
(资料性)
孟布酮标准溶液液相色谱图

孟布酮标准溶液液相色谱图见图A.1。



图A.1 孟布酮标准溶液 (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 液相色谱图

