

ICS 65.120

B 46

团 体 标 准

T/CFIAS 001—2019

饲料中地西洋的测定 高效液相色谱法

Determination of diazepam in feeds—
High performance liquid chromatography (HPLC)

(报批稿)

20××-××-××发布

20××-××-××实施

中 国 饲 料 工 业 协 会 发 布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

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。

本标准起草单位：山东省饲料质量检验所。

本标准主要起草人：孙延军、张芸、李俊玲、李桂华、刘华阳、门晓冬、杨志国、王英英。

饲料中地西洋的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中地西洋含量测定的高效液相色谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中地西洋的测定。

本标准的检出限为0.2 mg/kg，定量限为0.5 mg/kg。

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 分析实验室用水规则和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的地西洋，经乙腈提取，固相萃取柱（MCX）净化、浓缩后，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 甲醇：色谱纯。

4.4 甲酸：色谱纯。

4.5 2%甲酸水溶液：量取 2 mL 甲酸，用水定容至 100 mL。

4.6 5%氨水甲醇溶液：准确量取 5 mL 氨水，用甲醇(4.3)稀释并定容至 100 mL。

4.7 地西洋标准储备溶液（1 mg/mL）：称取地西洋标准品（CAS：439-14-5，纯度不低于 99.8%）10 mg（精确至 0.01 mg），用甲醇(4.3)溶解并定容至 10 mL，2℃~8℃保存，有效期 6 个月。

4.8 地西洋标准中间溶液（100 µg/mL）：准确量取适量的地西洋标准储备溶液(4.7)，用甲醇(4.3)稀释至 100.0 µg/mL，2℃~8℃保存，有效期 1 个月。

4.9 地西洋标准系列溶液：准确量取适量地西洋标准中间溶液(4.8)，用甲醇(4.3)分别稀释为 0.2 µg/mL、0.5 µg/mL、1.0 µg/mL、5.0 µg/mL、10.0 µg/mL、20.0 µg/mL、50.0 µg/mL、100.0 µg/mL 标准工作溶液，临用现配。

4.10 混合型强阳离子交换固相萃取柱（MCX）：60 mg/3 mL。

4.11 微孔滤膜：孔径 0.45 µm，有机系。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪，配有紫外检测器或二极管矩阵检测器。

5.2 电子天平：感量 0.0001 g 和 0.01 mg。

5.3 涡旋混合器。

5.4 离心机：转速不低于 10000 r/min。

5.5 固相萃取仪装置。

5.6 氮吹仪。

6 样品

按GB/T 20195制备样品，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。选取类型相同，在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限30%的饲料作为空白样品。

7 试验步骤

7.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g (精确到 0.0001 g) 于 50 mL 离心管中，准确加入 20 mL 乙腈 (4.2)，涡旋混匀后，振荡提取 5 min，超声 10 min，10000 r/min 离心 5 min 后上清液备用。

7.2 净化

依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 2%甲酸水溶液 (4.5) 活化固相萃取柱 (4.10)，准确移取 5 mL 提取液 (7.1) 过柱。再依次用 3 mL 2%甲酸水溶液 (4.5) 和 3 mL 甲醇 (4.3) 淋洗，抽干淋洗液，最后用 3 mL 氨水甲醇 (4.6) 洗脱。收集洗脱液于 40 °C 氮气吹干，准确加入 1 mL 甲醇 (4.3) 溶解残渣，过 0.45 μm 滤膜，待测。

7.3 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈柱，长 100 mm，内径 4.6 mm，粒径 3.5 μm，或性能相当者；

流速：1.0 mL/min；

检测波长：254 nm；

柱温：35 °C；

进样量：20 μL；

流动相：流动相 A: 甲醇 (4.3)，流动相 B: 水 (4.1)，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	20	80
1.0	40	60
8.0	70	30
10.0	70	30
11.0	90	10
12.0	90	10
14.0	20	80

7.4 测定

7.4.1 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 (4.9) 和试样溶液 (7.2) 上机测定。地西洋标准溶液的液相色谱图参见附录A。

7.4.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中地西洋保留时间应与标准系列工作溶液中地西洋的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

7.4.3 定量

以地西洋的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中待测物的响应值应在标准系列工作溶液测定的线性范围内（相差不超过 30%）。如超出线性范围，应将试样溶液用 20% 甲醇溶液进一步稀释后，重新测定。

8 试验数据处理

试样中地西洋的含量以质量分数 w 计，数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示，单点校准按公式 (1) 计算；多点校准按公式 (2) 计算：

$$w = \frac{A \times C_S \times V \times V_2 \times 1000}{A_S \times V_1 \times m \times 1000} \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- A —— 试样中地西洋的峰面积；
- A_S —— 标准溶液中地西洋峰面积；
- C_S —— 标准溶液地西洋浓度，单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$)；
- V —— 试样提取液的体积，单位为毫升 (mL)；
- V_1 —— 净化时所用试样提取液的体积，单位为毫升 (mL)；
- V_2 —— 氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升 (mL)；
- m —— 试样质量，单位为克 (g)；
- n —— 上机测定超出线性范围时，试样溶液的再次稀释倍数。

$$w = \frac{C \times V \times V_2 \times 1000}{m \times V_1 \times 1000} \times n \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- C —— 从标准曲线查得的试样溶液中地西洋的浓度，单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$)；
- V —— 试样提取液的体积，单位为毫升 (mL)；
- V_1 —— 净化时所用试样提取液的体积，单位为毫升 (mL)；
- V_2 —— 氮气吹干后复溶液的体积，单位为毫升 (mL)；
- m —— 试样的质量，单位为克 (g)；
- n —— 上机测定超出线性范围时，试样溶液的再次稀释倍数。

平行测定结果用算术平均值表示，结果保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下，两次独立测试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

(资料性附录)

地西洋标准溶液液相色谱图

地西洋标准溶液液相色谱图见图 A.1。

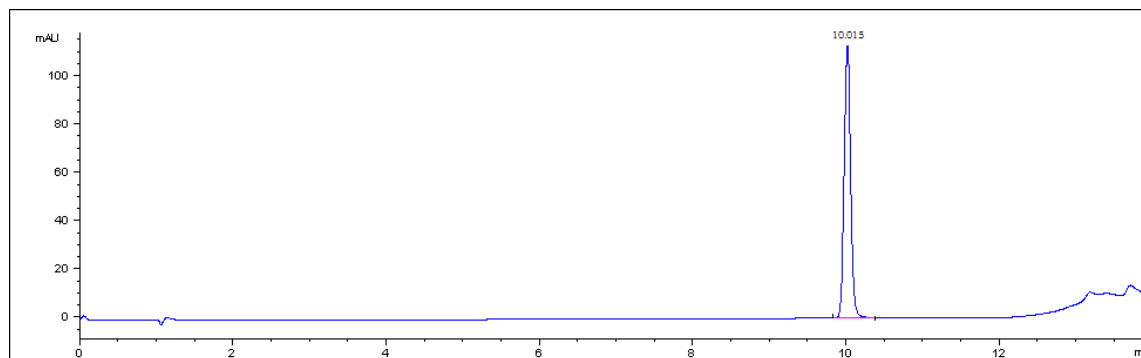


图 A.1 地西洋标准溶液 (10 μ g/mL) 液相色谱图