

ICS 65.120
CCS B 46



中华人民共和国国家标准

GB/T 22262—202×

代替 GB/T 22262—2008

饲料中氯羟吡啶的测定

Determination of clopidol in feeds

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会

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。

本文件代替GB/T 22262—2008《饲料中氯羟吡啶的测定 高效液相色谱法》，与GB/T 22262—2008相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 适用范围中增加了浓缩饲料、精料补充料和混合型饲料添加剂（见第1章，2007年版的第1章）；
- b) 增加了液相色谱-串联质谱方法（见第4章）；
- c) 更改了高效液相色谱法检出限和定量限（见第1章，2008年版的第1章）；
- d) 更改了高效液相色谱法试验步骤（见5.5，2008年版的第7章）。

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。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：。

本文件及其所代替标准历次版本发布情况为：

——GB/T 22262—2008，2008年首次发布；

——本次为第一次修订。

饲料中氯羟吡啶的测定

1 范围

本文件描述了饲料中氯羟吡啶的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中氯羟吡啶的测定。

本文件液相色谱-串联质谱法的检出限为0.005 mg/kg，定量限为0.01 mg/kg；高效液相色谱法中的检出限为0.25 mg/kg，定量限为0.5 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 液相色谱-串联质谱法（仲裁法）

4.1 原理

试样中的氯羟吡啶经甲醇提取，经碱性氧化铝固相萃取柱净化后，用液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配标准溶液校准，外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 甲醇：色谱纯。

4.2.3 乙酸铵：色谱纯。

4.2.4 5 mmol/L 乙酸铵溶液：准确称取 0.385 g 乙酸铵，用水稀释、定容 1000 mL，混匀。

4.2.5 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取氯羟吡啶（CAS: 2971-90-6，纯度≥98%）标准品 10 mg（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（4.2.2）溶解并定容，混匀，于-18 ℃以下保存，有效期为 6 个月。或购买有证标准溶液。

4.2.6 混合中间标准溶液（10 μg/mL）：准确移取标准储备溶液（4.2.5）0.1 mL，于10 mL容量瓶中，用甲醇（4.2.2）稀释、定容、混匀。于-18 ℃以下保存，有效期为3个月。

4.2.7 混合标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液(4.2.6)，用水稀释、定容、混匀，配制成质量浓度分别为：10 ng/mL、20 ng/mL、50ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL，临用现配。

4.2.8 碱性氧化铝固相萃取柱：2 g/12 mL，或性能相当者。

4.2.9 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

4.3.2 分析天平：精度 0.01 g 和 0.01 mg。

4.3.3 涡旋混合器。

4.3.4 往复式振荡器。

4.3.5 离心机：转速不低于 8000 r/min。

4.3.6 可控温氮吹仪：50 °C ± 2°C。

4.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品，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，装入密闭容器中避光保存，备用。选取与待测样品类型相同，均匀一致，且在氯羟吡啶保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品，作为空白样品。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 2 g (精确至 0.01 g)，于 50 mL 离心管中，准确加入 25 mL 甲醇(4.2.2)，涡旋混匀 1 min，于 200 r/min 振荡提取 30 min，5000 r/min 离心 5 min。取上清液，待净化。

4.5.2 净化

准确移取上清液 2 mL，加入到碱性氧化铝固相萃取小柱(4.2.8)中，用 10mL 甲醇清洗净化柱内壁，将过柱溶液剂洗脱液全部收集，于 40°C 水浴氮气吹至约 1 mL，用甲醇定容至 5 mL，溶解，涡旋混匀后，过 0.22 μm 微孔滤膜，待测。

4.5.3 基质匹配标准系列溶液的制备

称取空白试样，按照 4.5.2 处理得到空白试样溶液。取适量的混合标准系列溶液(4.2.7)于 50°C 水浴氮气吹干，准确加入 1 mL 基质空白溶液，涡旋混匀。配制成质量浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 基质匹配混合标准系列溶液。

4.5.4 测定

4.5.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 2.7 μm，或性能相当者；

b) 柱温：40 °C；

- c)流速：0.3 mL/min；
 d)进样量：5 μ L；
 e)流动相：A 相为乙酸铵溶液（4.2.4）；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, %
0.0	90	10
1.5	90	10
3.0	20	80
5.0	20	80
5.1	90	10
8.0	90	10

4.5.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a)电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI⁺）；
 b)检测方式：多反应监测（MRM）；
 c)毛细管电压：4.5 kV；
 d)离子源温度：400 °C；
 e)脱溶剂温度：526 °C；
 f)干燥气流量：氮气 600 L/Hr；
 g)氯羟吡啶定性、定量离子对及其他参考质谱条件等见表 2。

表 2 氯羟吡啶定性、定量离子对及其他参考质谱条件

待测物名称	监测离子对, m/z	Q ₁ 电压, V	碰撞能量, eV	Q ₃ 电压, V
氯羟吡啶	192.0>101.1 ^a	-10	27	-18
	192.0>87.1	-10	32	-30
^a 为定量离子。				

4.5.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配混合标准系列溶液（4.5.3）和试样溶液（4.5.2）上机测定。氯羟吡啶标准溶液定量离子色谱图见附录A。

4.5.4.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液与基质匹配混合标准系列溶液中氯羟吡啶的保留时间相对偏差应在 $\pm 2.5\%$ 之内。根据表2选择的定性离子对，比较试样谱图中氯羟吡啶定性离子的相对离子丰度与质量浓

度接近的基质匹配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3规定的范围，则可判定为样品中存在氯羟吡啶。

表3 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	≤10
最大允许偏差/(%)	±20	±25	±30	±50

4.5.4.5 定量

以基质匹配混合标准系列溶液中氯羟吡啶的质量浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数不应低于0.99。试样溶液与标准溶液中氯羟吡啶的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应减少称样量或减少分取体积后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中氯羟吡啶的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

4.6 试验数据处理

试样中氯羟吡啶含量以质量分数 w_i 计，数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示。多点校准按式 (1) 计算，单点校准按式 (2) 计算：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3}{m \times V_2 \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液中氯羟吡啶的质量浓度，单位为纳克每毫升 (ng/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)。

$$w_i = \frac{A_i \times V_1 \times V_3 \times \rho}{A_{si} \times V_2 \times m \times 1000} \dots \dots \dots (2)$$

式中：

A_i ——试样溶液中氯羟吡啶的峰面积；

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 ——标准溶液中氯羟吡啶的质量浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

A_{si} ——标准溶液中氯羟吡啶的峰面积；

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)。

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。

4.7 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20%。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的氯羟吡啶经甲醇提取，经碱性氧化铝固相萃取柱净化后，用高效液相色谱仪检测，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 甲醇：色谱纯。

5.2.3 乙酸铵：色谱纯。

5.2.4 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取氯羟吡啶（CAS: 2971-90-6，纯度 \geq 98%）标准品 10 mg（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2.2）溶解并定容，混匀，于-18 ℃以下保存，有效期为 6 个月。或购买有证标准溶液。

5.2.5 混合中间标准溶液（10 μ g/mL）：准确移取标准储备溶液（5.2.4）0.1 mL，于10 mL容量瓶中，用甲醇（5.2.2）稀释、定容、混匀。于-18 ℃以下保存，有效期为3个月。

5.2.6 混合标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液(5.2.5)，用水稀释、定容、混匀，配制成质量浓度分别为：0.1 μ g/mL、0.2 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL，临用现配。

5.2.7 碱性氧化铝固相萃取柱：2 g/12 mL，或性能相当者。

5.2.8 微孔滤膜：0.45 μ m，有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器/二极管阵列检测器。

5.3.2 分析天平：精度 0.01 g 和 0.01 mg。

5.3.3 涡旋混合器。

5.3.4 可控温氮吹仪：50 ℃ \pm 2 ℃。

5.3.5 往复式振荡器。

5.3.6 离心机：转速不低于 8000 r/min。

5.4 样品

按GB/T 20195制备试样，至少约200 g，粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中避光保存，备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 2 g（精确至 0.01 g），于 50 mL 离心管中，准确加入 25 mL 甲醇（5.2.2），涡旋混匀 1 min，于 200 r/min 振荡提取 30 min，5000 r/min 离心 5 min。取上清液，待净化。

5.5.2 净化

准确移取上清液 10 mL，加入到碱性氧化铝固相萃取小柱（5.2.7）中，用 10 mL 甲醇清洗净化柱内壁，将过柱溶液剂洗脱液全部收集，于 40℃ 水浴氮气吹至近干，准确加入 1 mL 甲醇，溶解，涡旋混匀后，过 0.45 μm 微孔滤膜，待测。

5.5.3 测定

5.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 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；
- b) 流速：1.0 mL/min；
- c) 柱温：35 ℃；
- d) 进样量：20 μL；
- e) 检测波长：270 nm；
- f) 流动相：水（5.2.1）+ 甲醇（5.2.2）= 10+90（体积比）。

5.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列溶液（5.2.6）和试样溶液（5.5.2）上机测定。氯羟吡啶标准溶液的液相色谱图见附录 B。

5.5.3.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中氯羟吡啶保留时间应与质量浓度相近的标准系列溶液中氯羟吡啶的保留时间一致，其相对偏差在 ±2.5% 之内。

5.5.3.4 定量

以混合标准系列溶液中氯羟吡啶的质量浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数不应低于 0.99。试样溶液与标准溶液中氯羟吡啶的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应将试样提取液用水（5.2.1）稀释（稀释倍数 *n*）至线性范围内，重新试验。单点校准定量时，试样溶液中氯羟吡啶的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中氯羟吡啶含量以质量分数 w_i 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按式（3）计算，单点校准按式（4）计算：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液中氯羟吡啶的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/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 ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

$$w_i = \frac{A_i \times V_1 \times V_3 \times \rho_i \times 1000}{A_{Si} \times V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (4)$$

式中：

- A_i ——试样溶液中氯羟吡啶的峰面积；

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_i ——标准溶液中氯羟吡啶的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

A_{si} ——标准溶液中氯羟吡啶的峰面积；

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 ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

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。

5.7 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)

氯羟吡啶标准溶液的定量离子色谱图

氯羟吡啶标准溶液的定量离子色谱图见图 A.1。

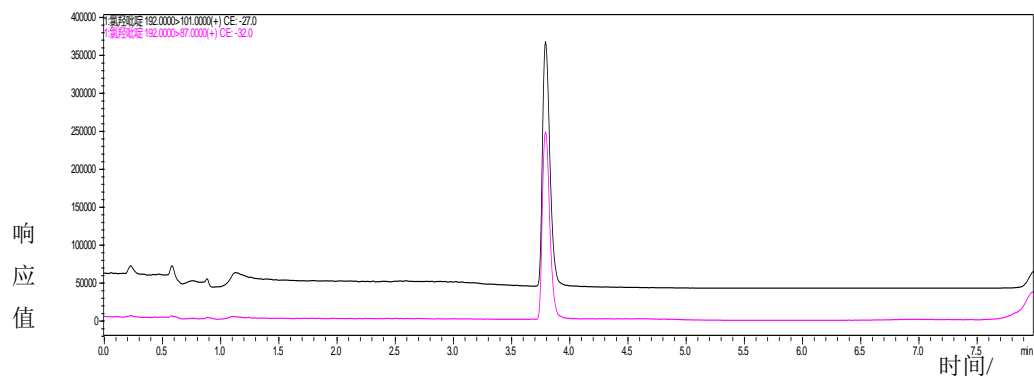


图 A.1 氯羟吡啶标准溶液（1 ng/mL）的定量离子色谱图

附录 B

(资料性)

氯羟吡啶标准溶液的高效液相色谱图

氯羟吡啶标准溶液的液相色谱图见图 B.1。

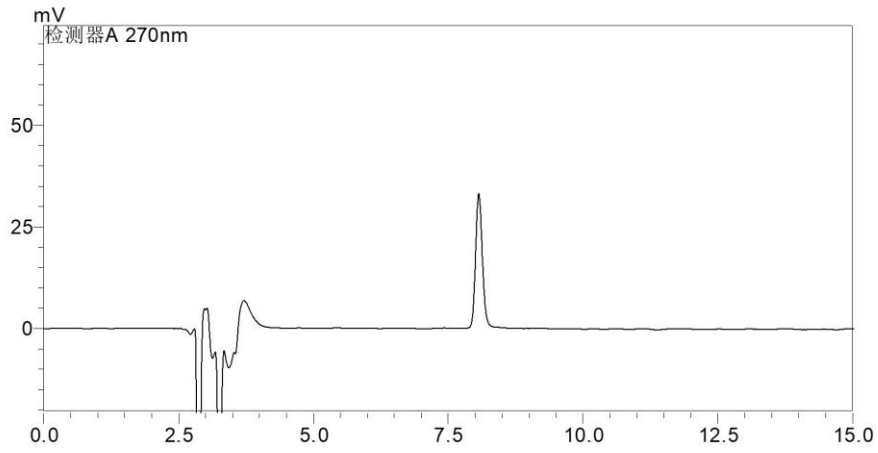


图 B.1 氯羟吡啶标准溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的高效液相色谱图