

中华人民共和国国家标准

《饲料中氯羟吡啶的测定》 编制说明

（公开征求意见稿）

广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究
所

广东农科监测科技有限公司

2024年12月

《饲料中氯羟吡啶的测定》

(公开征求意见稿)

编制说明

一、工作简况

1 标准修订背景

氯羟吡啶具有广泛的抗球虫作用，在国内是使用最广泛的抗球虫药之一，对各种鸡球虫病均有效，通常在动物饲料中连续用药。氯羟吡啶对球虫的作用峰期主要在孢子发育阶段，能使孢子在上皮细胞内停止发育长达 60d。由于氯羟吡啶对球虫仅是抑制作用，停药后，孢子即能重新发育成长。

由于氯羟吡啶对球虫仅有抑制发育作用，加之对畜禽免疫力有明显抑制效应，必须连续用药，所以被饲喂动物的肌肉组织中有明显的药物残留。另外，由于长期广泛使用，目前多数球虫对氯羟吡啶已经出现明显的耐药性，由于其结构与喹诺啉抗球虫药类似，又有可能存在交叉耐药性。

目前现行标准为 GB/T 22262-2008《饲料中氯羟吡啶的测定 高效液相色谱法》，但该方法灵敏度较低，并且无法准确定性，为了适应生产实际需要，加强监管，亟需增加建立省时高效、灵敏度高、定性准确的液相色谱-串联质谱检测方法。对该检测标准方法进行修订，旨在为加强饲料安全监管提供标准检测方法，为打击在饲料中精神类药物的违法使用提供强有力的技术支持，对于保障我国养殖畜禽和水产品的质量安全具有重要意义。

2 任务来源

2023年12月28日，国家标准化管理委员会关于下达2023年国家标准复审修订计划的通知（国标委发[2023]64号），项目编号：20233429-T-469，计划名称：饲料中氯羟吡啶的测定。承担单位为广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所，参与单位为广东农科监测科技有限公司。本标准修订项目由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。本次修订除了对现有液相色谱法修订的基础上，增加了液相色谱-串联质谱法。

3 主要工作过程

3.1 成立标准编制小组

2024年1月，广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所、广东农科监测科技有限公司接到修订项目任务后，对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案，组建了标准编制小组，制定工作计划，落实人员与分工，详见表1。

表1 标准主要起草人员和任务分工

人员	工作单位	承担任务
王威利	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	项目主持人，负责项目的全面工作
林雪贤	广东农科监测科技有限公司	标准研究方案设计、方法研究、标准文本和编制说明编写和完善
万凯	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	统筹协调
季天荣	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法研究
丁晨红	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法研究
林奕云	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法研究
陈惠婷	广东省农业科学院农业质	标准文本编写

	量标准与监测技术研究所	
刘振妮	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法精密度考察
崔泽锋	广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所	方法精密度考察

3.2 项目方案的制定

2024年1月-2月，标准编制小组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定指导思想，制定了标准制定技术路线和试验方案。

3.3 开展方法学研究

2024年3月-6月，建立确定高效液相色谱仪检测方法、液相色谱-串联质谱仪检测方法，确定样品提取试剂，标液稳定性试验。

2024年7月-10月，进行前处理方法研究，对提取剂，提取体积、提取方式，净化方式进行研究。

2024年11月，完成液相方法和液质方法方法变异系数研究。

2024年12月，完成征求意见稿。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

1 标准编制原则

本标准的结构、技术要素和表达方法按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编制规则第4部分：试验方法标准》的规定和要求进行编写。结合氯羟吡啶可能使用对象和我国饲料行业发展现状，畜、禽、水产配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料，力求修订后的标准方法简单、快速、灵敏、成本低、实用性强。

2 修订内容的说明

本次修订除按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 对标准进行编辑性修改外，主要针对 GB/T 2262—2008 存在的问题，结合饲料行业实际样品检测情况，文件名称改为《饲料中氯羟吡啶的测定》；增加了液相色谱-串联质谱测定方法；更改了高效液相色谱法的检出限，增加了定量限；更改了高效液相色谱法的提取和净化方法；更改了高效液相色谱法的实验数据处理，详见表 2。

表 2 标准主要技术内容修订说明

序号	章节编号	原标准	修订后	修订原因
1	首页	标准名称《饲料中氯羟吡啶的测定 高效液相色谱法》	《饲料中氯羟吡啶的测定》	原标准名称已不符合现标准内容。
2	前言	“本标准……”	<p>“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。</p> <p>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：</p> <p>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）；</p> <p>b) 增加了液相色谱-串联质谱方法（见第4章）；</p> <p>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）；</p> <p>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）。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>本文件起草单位：。</p> <p>本文件主要起草人：。</p>	按照GB/T1.1-2020要求重新整理。

No.	章节编号	原标准	修订后	修订原因
			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。”	
3	1 范围	本标准规定了高效液相色谱仪测定饲料中氯羟吡啶的方法。	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。	标准适用范围增加了精料补充料、混合型饲料添加剂，并重新进行描述。
4	1 范围	本标准适用于配合饲料、预混合饲料及浓缩饲料中氯羟吡啶的测定。方法最低定量限为 1 mg/kg。	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	增加了精料补充料、混合型饲料添加剂，并重新进行描述。
5	2 规范性引用文件	下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。 GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法 GB/T 14699.1 饲料 采用 GB/T 20195 动物饲料 试样的制备	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	按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 规定要求。增加试样制备的标准。
6	3 术语和定义	无	本文件没有需要界定的术语和定义。	按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的

No.	章节编号	原标准	修订后	修订原因
				结构和起草规则》的规定补充。
7	4 液相色谱-串联质谱法	无	4 液相色谱-串联质谱法	增加了液相色谱-串联质谱法。
8	5.4 样品	按 GB/T 14699.1 采样。 选取有代表性的饲料样品至少 500g, 按 GB/T 20195 制备样品。	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。	按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4 -2015 规定要求。
9	5.5 试验步骤	<p>7.1.1 提取 准确称取配合饲料 5g~10g 或浓缩饲料 1g~5g、复合预混合饲料 1g~5g (精确至 0.001g), 于 50 mL 离心管中, 加入甲醇 25mL, 涡旋混合, 于振荡器振荡 30min, 3000r/min 离心 5min, 取上清液备用。</p> <p>7.1.2 净化 准确吸取上清液 10mL, 移入氧化铝净化柱中, 用 10mL 甲醇洗柱内壁, 将过柱溶液及洗脱液全部接收于蒸发瓶中, 用 50℃水浴的旋转蒸发器将溶剂蒸干。用 1mL 甲醇溶解残渣, 过 0.45 μm 的滤膜, 滤液进液相色谱仪</p>	<p>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。</p> <p>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 水, 溶解, 涡旋混匀后, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 待测。</p>	/

序号	章条编号	原标准	修订后	修订原因
		检测。		
0	5.5.3.1	<p>7.4.1 高效液相色谱条件</p> <p>色谱柱:具有 C18 填料的柱子 (粒度为 5 μm),柱长 150mm,内径 4.6mm。</p> <p>流动相:乙腈+水=10+90 (体积比),以 1.0 mL/min 流速洗脱。</p> <p>检测器:二极管矩阵检测器或紫外检测器,检测波长为 270 nm。</p>	<p>液相色谱参考条件如下:</p> <p>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;</p> <p>b)流速: 1.0 mL/min;</p> <p>c)柱温: 35 °C;</p> <p>d)进样量: 20 μL;</p> <p>e)检测波长: 270 nm;</p> <p>f)流动相: 水 (5.2.1) + 甲醇 (5.2.2) =10+90 (体积比)。</p>	
1	5.6	<p>8 结果的计算</p> <p>试样中氯羟吡啶的含量 X 以质量分数(mg/kg)表示,按式(1)计算:</p> $X = \frac{P_i \times V \times c_i \times V_{st}}{P_{st} \times m \times V_i} \dots\dots\dots (1)$	<p>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:</p> $w_i = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (3)$ <p>式中:</p> <p>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);</p> <p>V_1——试样提取溶液的总体积,单位为毫升 (mL);</p> <p>V_3——试样定容的体积,单位为毫升 (mL);</p> <p>m——试样的质量,单位为克 (g);</p>	增加了多点校正公式

o.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
		<p>式中： P_i——试样溶液峰面积值； V——样品的总稀释体积，单位为毫升(mL)； c_i——标准溶液浓度，单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)； V_{st}——标准溶液进样体积，单位为微升(μL)； P_{st}——标准溶液峰面积平均值； m——试样质量，单位为克(g)； V_i——试样溶液进样体积，单位为微升(μL)。 平行测定结果用算术平均值表示，保留三位有效数字。</p>	<p>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。</p> $w_i = \frac{A_i \times V_1 \times V_3 \times \rho_i \times 1000}{A_{si} \times V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots (4)$ <p>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($\mu\text{g}/\text{mL}$)； 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。</p>	

3 主要技术内容确定的依据

3.1 液相色谱-串联质谱法

3.1.1 质谱参考条件的确定

采用 LC-MS/MS 对氯羟吡啶标准溶液进行母离子扫描，其在正离子模式下响应值远远高于负离子模式。根据分子量和文献，确定母离子大小，然后对分子离子进行 MRM 优化，对优化出的产物产物离子分析丰度比，作为定量离子和定性离子，以及优化电压等参数，见表 3。在对其他质谱参数进行优化后，氯羟吡啶标准品的 MRM 总离子流色谱图见图 1。同时起草组对比了氯羟吡啶质谱检测已发表文献，与本标准一致。

表 3 选择离子参数设定表

被测物名称	监测离子对 (m/z)	Q1 电 压 (V)	碰撞能 量 (eV)	Q3 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。				

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）。

毛细管电压：4.5 kV。

离子源温度：400 °C。

脱溶剂温度：526 °C。

干燥气流量：氮气 600 L/Hr。

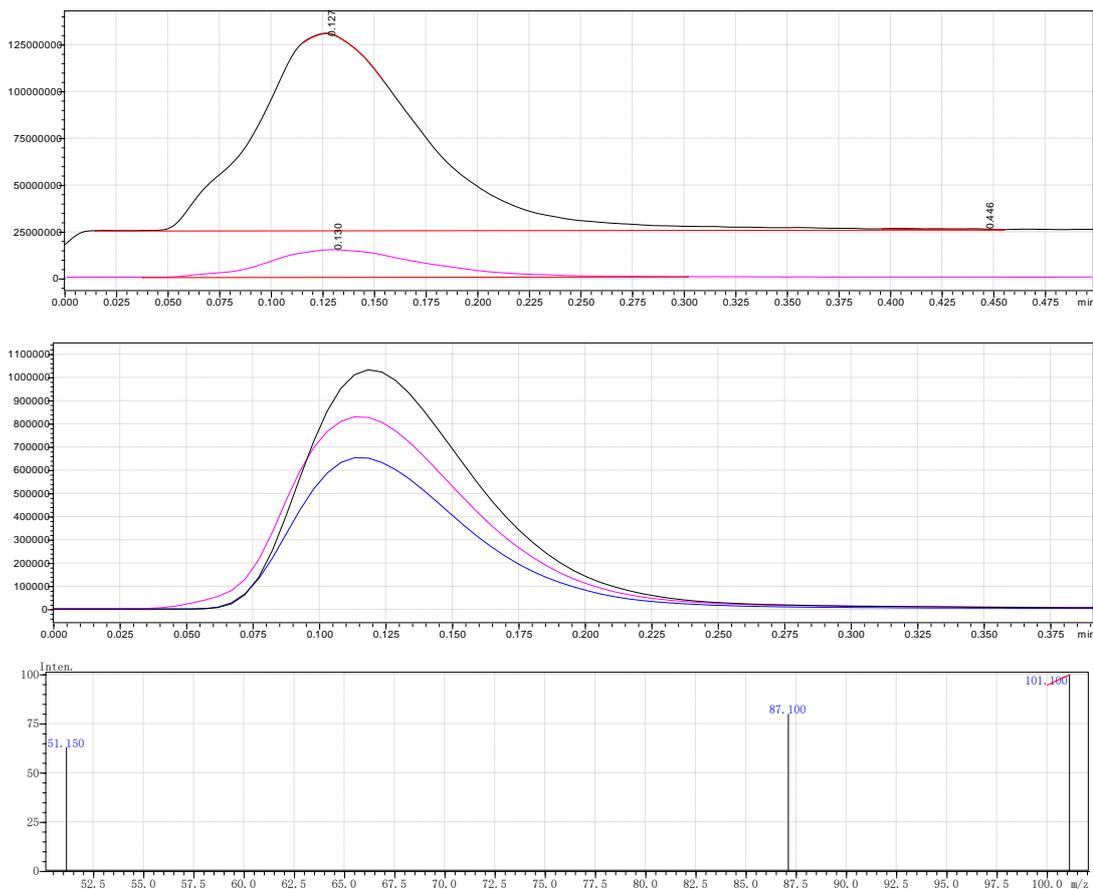


图 1 氯羟吡啶母离子扫描及 MRM 质谱图

3.1.2 流动相选择及梯度的确定

本实验对比了有机相甲醇和乙腈作为有机相，超纯水、甲酸水、甲酸铵和甲酸水/甲酸铵作为水相时对目标物分析的影响。甲醇和乙腈作为有机相均具有较好的峰型和响应值，由于甲醇毒性小，因此选择甲醇作为有机相。甲酸水作为水相时对氯羟吡啶检测有明显的抑制作用，乙酸铵和甲酸水/甲酸铵作为水相时，峰型和响应值无明显差别。因此最终选择乙酸铵和甲醇作为本标准流动相。不同流动相色谱图分离效果及响应值见图 2-3。流动相梯度具体如表 4：

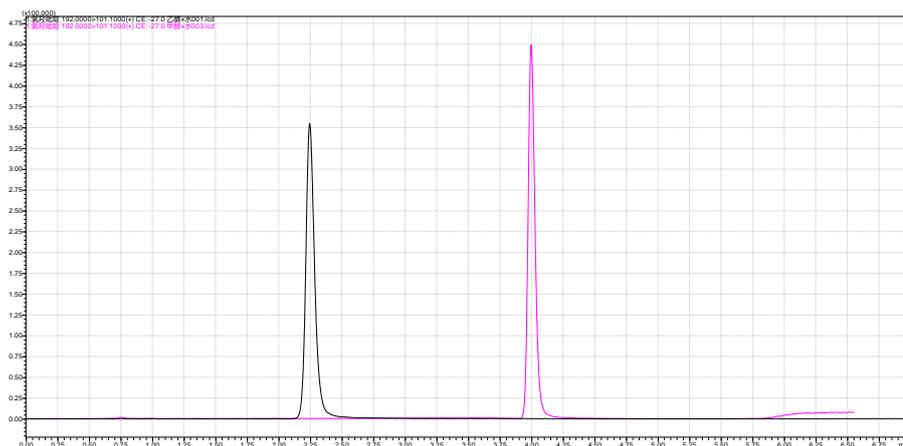


图2 甲醇和乙腈作为有机相时峰型及响应值对比

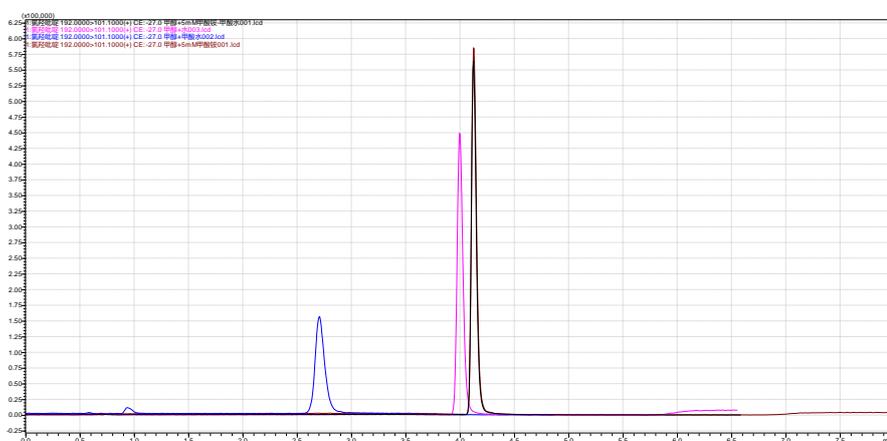


图3 不同流动相色谱图分离效果及响应值

表4 流动相梯度

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
1.5	90	10
3.0	20	80
5.0	20	80
5.1	90	10
8.0	90	10

3.1.3 液相色谱柱的适用性考察

实验对比 Phenomenex Kinetex XB-C18 (100×2.1mm, 2.6 μm)、ACE UltraCore Super C18(100×2.1mm, 2.5 μm)、WATERS ACQUITY UPLCTM BEH C18(100×2.1mm, 1.7 μm)和 SHIMADZU Shim-pack GIST C18 (100×2.1mm, 2.0 μm) 不同厂家不同规格色谱柱的分离效果, 对比峰型和响应值。结果表明, 不同厂家 C18 柱, 除了保留时间稍微有些差异, 其峰型和峰面积没有明显差异, 无须规定具体厂家信息, 可采用性能相当者。

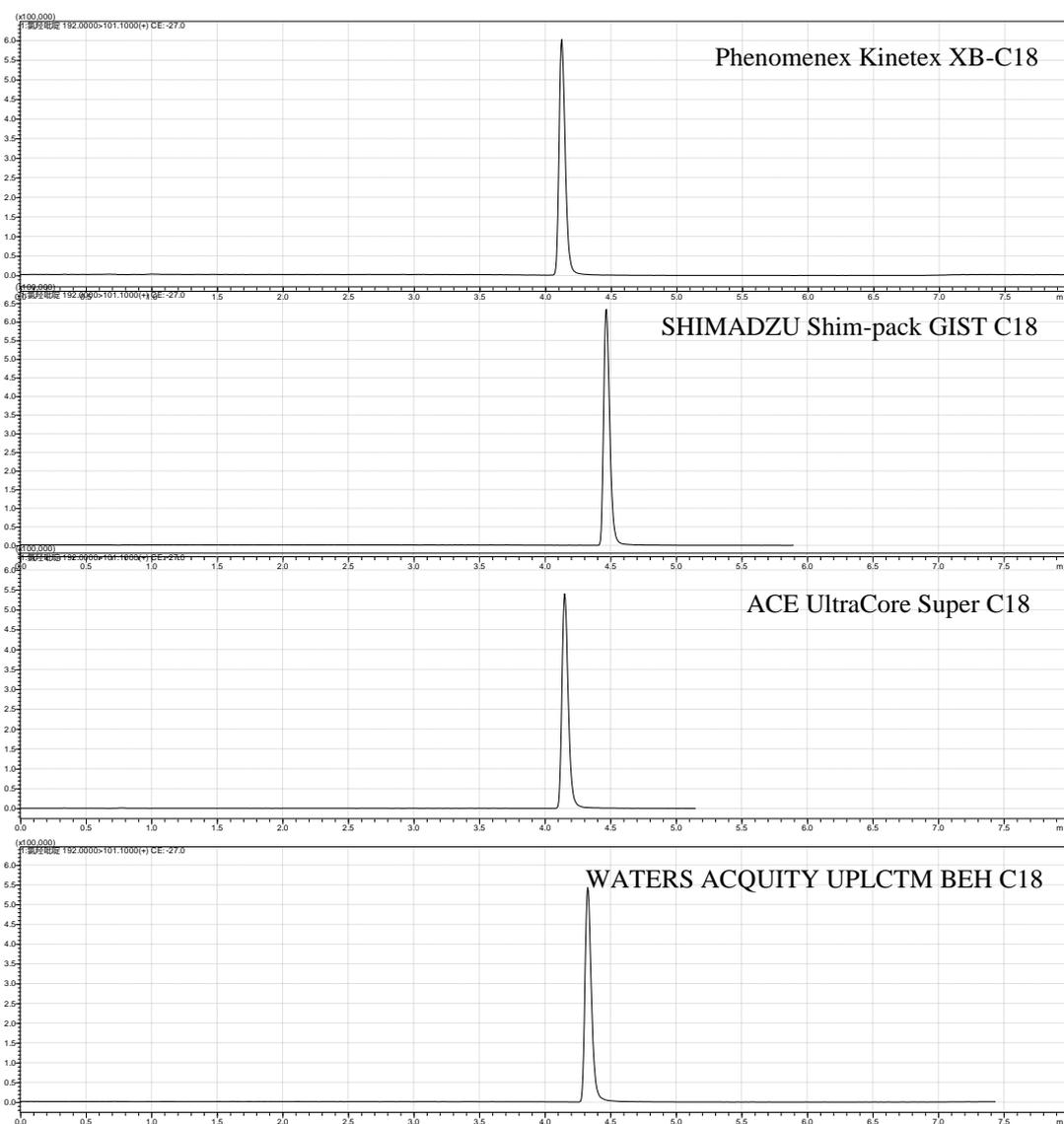


图 4 不同色谱柱对氯羟吡啶的分析效果

3.1.4 前处理条件优化

3.1.4.1 提取剂选择

由于不同种类饲料差异较大，分别对配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料提取剂进行研究。根据已报道文献和化合物性质，实验对比了 1% 甲酸乙腈、1% 甲酸甲醇、乙腈、甲醇、乙酸乙酯等 5 种溶液为提取剂提取配合饲料样品中的氯羟吡啶。结果发现，甲醇具有良好的回收率效果。随后考察甲醇在浓缩饲料和精料补充料中提取效率，在浓缩饲料和精料补充料中，甲醇同样具有较好的提取效果。与原标准保持一致。

3.1.4.2 提取方式选择

分别取配合饲料和预混合饲料各 3 组，每组包括 2 份添加和 1 份空白，添加 6 种镇定剂浓度为配合饲料 10mg/kg，预混合饲料 20mg/kg；第一份直接用 50mL 超声提取 10 分钟，8000rpm 离心 5 分钟，上清液定容至 50mL，稀释 10 倍后，过膜上机测定，基质匹配标准溶液校准；第二份用 25mL 超声提取 10 分钟，8000rpm 离心 5 分钟，再用 25mL 重提一次，合并上清液定容至 50mL，稀释 10 倍后，过膜上机测定，基质匹配标准溶液校准；第三份用 25mL 振荡提取 30 分钟，8000rpm 离心 5 分钟，上清液定容至 50mL，稀释 10 倍后，过膜上机测定，基质匹配标准溶液校准。从结果来看，超声和振荡均具有较好的提取效果，提取 2 次和提取 1 次差异不明显。因此选择用 25mL 振荡提取 1 次，作为本方法的提取方式。

3.1.4.3 净化方式选择

饲料属于复杂基质样品。由于饲料样品中含有大量的蛋白质、脂肪等杂质，加之无机盐、色素的影响，这些杂质不仅会对实验的回收率有影响，还会降低色谱柱和仪器的使用寿命，因此为了尽力维护色谱柱和液相质谱串联色谱仪器，也为了避免使用 ESI 源质谱仪容易出现的基质抑制效应，需对样品提取液进行进一步净化处理。试验比较了 HLB、MCX、MAX、C18 和碱性氧化铝净化小柱，从回收率的高低、淋洗步骤与洗脱液的繁简、操作的方便与否等考虑，氯羟吡啶在碱性氧化铝小柱上回收率达到 $\geq 90\%$ ；并在碱性氧化铝小柱上氯羟吡啶时能够很好地保留在小柱上如遇到高含量的饲料样品时，只要适当减少过柱的样品提取液即可。因此，选择碱性氧化铝小柱为净化方式。

3.1.5 标准溶液有效期考察

将 2024 年 2 月 1 日配制的浓度为 1 mg/mL 的储备液，置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存。与新配制的浓度为 1 mg/mL 的储备液，分别稀释成 10 $\mu\text{g/mL}$ 进行测试，各重复测试 6 次，放置 6 个月平均响应的相对偏差均小于 5%。因此，将标准物质的储备液（1 mg/mL）在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存的有效期定为 6 个月。

表 5 储备液（1 mg/mL）保存有效期实验

	20240201 0 天	20240303 1 个月	20240401 2 个月	20240801 6 个月
氯羟吡啶	10.00 $\mu\text{g/mL}$	9.95 $\mu\text{g/mL}$	9.98 $\mu\text{g/mL}$	9.89 $\mu\text{g/mL}$

3.1.6 分析步骤的确定

3.1.6.1 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，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。

3.1.6.2 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°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。

3.1.7 技术指标

3.1.7.1 线性范围

精确量取适量的氯羟吡啶标准工作液与基质空白溶液，配制成浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 的基质匹配标准溶液。用液相色谱-串联质谱测定。在上述确定参数条件下，从低浓度到高浓度进样，按其所得峰面积的平均值与对应的溶液浓度做基质标准曲线，得出回归方程和相应系数，相关系数均在 0.99 以上，线性良好。

表 6 氯羟吡啶饲料中的基质匹配标准曲线

饲料	线性范围 (ng/mL)	回归方程	相关系数 r^2
溶剂	1-50 μg/L	$Y = 946154X - 245843$	0.99

猪配合饲料	1-50 µg/L	$Y = 785610X - 514889$	0.99
猪浓缩饲料	1-50 µg/L	$Y = 658152X + 39673$	0.99
添加剂预混合饲料	1-50 µg/L	$Y = 524208X + 28872$	0.99
精料补充料	1-50 µg/L	$Y = 563882X + 21808$	0.99
水产配合饲料	1-50 µg/L	$Y = 736558X + 18858$	0.99

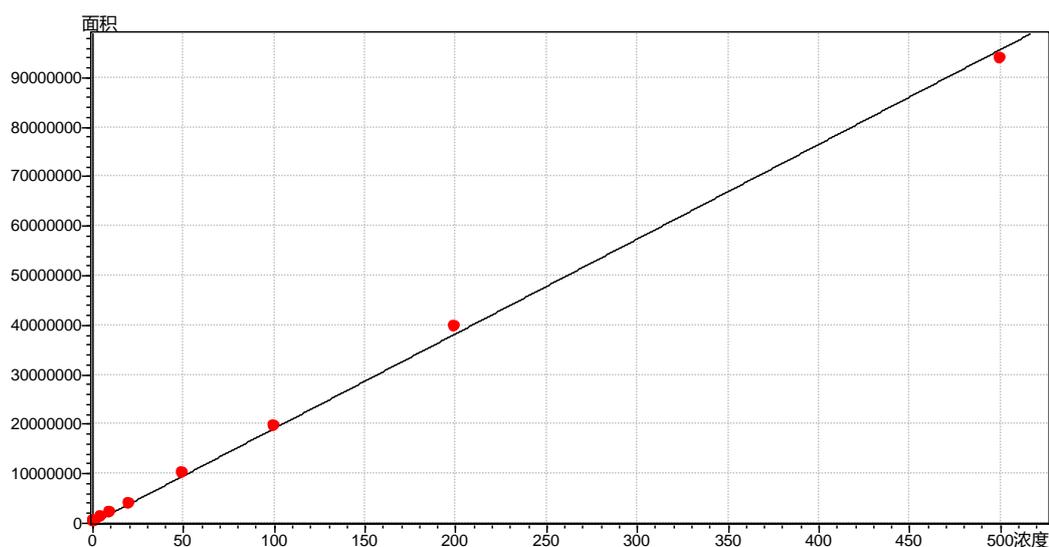


图 5 氯羟吡啶溶剂标准曲线

3.1.7.2 基质效应

基质效应 MEs 是在利用 ESI 离子源分析复杂样品时相当重要的影响因素。共流出或共提取的其他杂质在 ESI 离子源竞相离子化，从而导致目标检测物离子化效果的抑制或者增强，从而表现出基质抑制或者基质增强的现象。MEs 是根据纯标准溶液与基质标准溶液的响应强度进行评估，考察某水平下，溶剂标准溶液的响应强度 S_{solvent} 和同条件下基质标准溶液的响应强度 S_{matrix} 的关系，具体公式如下： $ME\% = (S_{\text{matrix}} - S_{\text{blank}}) / S_{\text{solvent}}$ ，其中， S_{blank} 为空白基质提取液的响应强度。MEs 值介于 0.85 和 1.15 之间认为无明显的基质效应，

大于 1.15 表明是基质增强，小于 0.85 表明是基质抑制。本实验通过测定 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 标准品溶液和饲料 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 基质匹配标准溶液比较有无基质效应。结果表明：5 种饲料的基质匹配标准溶液中，氯羟吡啶基质效应显著抑制，为了结果准确性选用基质匹配标准曲线校准，结果如表 7 所示：

表 7 基质效应

基质种类	基质效应
溶剂	1.000
猪配合饲料	0.830
猪浓缩饲料	0.696
添加剂预混合饲料	0.554
精料补充料	0.596
水产配合饲料	0.778

3.1.7.3 检出限与定量限

空白试料按相同的步骤处理后，在相应的保留时间，空白试料对所测分析物无干扰。检测限（LOD）与定量限（LOQ）：添加适量标准溶液于 2 g 空白样品（预混合饲料 1g），经提取净化后测定，根据所测药物的 $S/N \geq 3$ 为方法检测限， $S/N \geq 10$ 为方法定量限的原则，测得 6 种镇定剂在配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料、精料补充料中的检测限为 0.005 mg/kg，定量限为 0.01 mg/kg。

3.1.7.4 方法准确度与精密度实验

分别取饲料各 2.0 g，分别添加适量氯羟吡啶标准工作溶液使配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料添加浓度为 0.01

mg/kg、0.5mg/kg、1 mg/kg、10mg/kg 和 100 mg/kg，经提取净化后进行液相色谱-串联质谱法测定，每个梯度平行测定五次，以考察方法的准确度和精密度。结果见表 8。

表 8 氯羟吡啶饲料回收率及精密度结果

	加标浓度 (mg/kg)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
									平均值	相对平均偏差	平均值	相对平均偏差
配合饲料	0.01	1	0.00903	0.00984	0.00938	0.00982	0.00912	0.00933	94.2	3.6	94.4	0.8
		2	0.00924	0.00973	0.00908	0.00991	0.00928	0.00901	93.8	3.9		
		3	0.00921	0.00969	0.00932	0.00983	0.00953	0.00953	95.2	2.4		
	0.5	1	0.5	0.483	0.456	0.458	0.455	0.479	94.4	3.9	95.8	1.4
		2	0.485	0.469	0.459	0.5	0.5	0.469	96.1	3.6		
		3	0.472	0.473	0.456	0.495	0.508	0.505	97.0	4.3		
	1	1	0.929	0.918	0.931	0.939	0.937	0.919	92.9	0.9	93.6	2.0
		2	0.942	0.995	0.979	0.915	0.987	0.922	95.7	3.6		
		3	0.91	0.962	0.917	0.901	0.905	0.933	92.1	2.5		
	10	1	10	9.31	9.13	9.85	9.52	9.5	95.5	3.4	96.1	1.0
		2	9.17	9	9.91	9.72	9.94	9.53	95.5	4.1		
		3	9.58	9.96	9.09	9.87	10	9.79	97.2	3.5		
100	1	99.9	95.7	97.5	96.4	95.2	95.8	96.8	1.8	97.8	0.9	
	2	97.6	96.1	99	97.3	98.3	100	98.1	1.4			
	3	99.2	99.5	98.4	98.6	97.7	98.2	98.6	0.7			
浓缩饲料	0.01	1	0.0098	0.00955	0.00955	0.00902	0.00985	0.00901	94.6	3.9	94.7	1.1
		2	0.00951	0.00953	0.00959	0.00933	0.00994	0.0095	95.7	2.1		
		3	0.00942	0.00912	0.00941	0.00973	0.00926	0.0093	93.7	2.2		
	0.5	1	0.492	0.476	0.509	0.47	0.452	0.477	95.9	4.1	96.0	1.8
		2	0.507	0.454	0.488	0.496	0.497	0.488	97.7	3.7		
		3	0.475	0.457	0.48	0.489	0.458	0.47	94.3	2.7		
	1	1	0.938	0.922	0.985	0.978	0.998	0.906	95.5	3.9	95.0	1.4
		2	0.91	0.948	0.907	0.918	0.974	0.951	93.5	2.9		
		3	0.988	0.955	0.964	0.908	0.966	0.979	96.0	2.9		
	10	1	9.33	9.44	10	9.26	9.73	9	94.6	3.8	94.8	0.3
		2	9.13	9.54	9.87	9.51	9.66	9.42	95.2	2.6		
		3	9.39	9.54	9.03	9.82	9.72	9.32	94.7	3.0		
	100	1	97	98.8	99.7	99.3	98.3	99.4	98.8	1.0	97.9	0.8
		2	95.3	97	99.6	97	96.6	98.9	97.4	1.6		
		3	98.1	97.2	95.2	98.4	99.5	96.1	97.4	1.6		

精料补充料	0.01	1	0.00932	0.0096	0.00955	0.00922	0.00986	0.00901	94.3	3.2	95.0	0.8
		2	0.00954	0.00903	0.00987	0.00964	0.00949	0.00988	95.8	3.3		
		3	0.00971	0.00964	0.00905	0.00985	0.00962	0.00904	94.9	3.7		
	0.5	1	0.504	0.481	0.463	0.508	0.477	0.488	97.4	3.5	96.5	1.7
		2	0.49	0.475	0.495	0.507	0.489	0.473	97.6	2.6		
		3	0.495	0.469	0.452	0.475	0.476	0.47	94.6	2.9		
	1	1	0.944	0.947	0.985	0.924	0.931	0.997	95.5	3.1	95.8	0.4
		2	0.974	0.974	0.965	0.901	0.946	0.978	95.6	3.1		
		3	0.978	0.97	0.939	0.913	0.99	0.982	96.2	3.1		
	10	1	9.7	9.97	9.78	9.55	9.48	9.67	96.9	1.8	94.7	2.0
		2	9.31	9.31	9.18	9.42	9.98	9.1	93.8	3.3		
		3	9.02	9.6	9.43	9.41	9.61	9.03	93.5	2.8		
100	1	95.8	95.5	95	98.2	99.6	96.4	96.8	1.8	97.7	0.9	
	2	98	96.7	99	99.1	98.7	100	98.6	1.1			
	3	96.7	95.6	99.3	97.3	98.6	97.8	97.6	1.4			
添加剂预混合饲料	0.01	1	0.00916	0.0099	0.00966	0.00927	0.00922	0.00926	94.1	3.2	94.5	0.4
		2	0.00936	0.00912	0.0093	0.00995	0.00953	0.0096	94.8	3.0		
		3	0.00909	0.0099	0.00973	0.00926	0.00911	0.00969	94.6	3.7		
	0.5	1	0.505	0.495	0.465	0.472	0.461	0.459	95.2	4.0	94.7	0.5
		2	0.467	0.468	0.484	0.468	0.457	0.483	94.2	2.2		
		3	0.485	0.474	0.486	0.456	0.478	0.466	94.8	2.4		
	1	1	0.932	0.993	0.95	0.992	0.945	0.976	96.5	2.7	95.3	1.4
		2	0.965	0.908	0.955	0.909	0.961	0.937	93.9	2.7		
		3	0.994	0.965	0.909	0.992	0.956	0.921	95.6	3.7		
	10	1	9.6	9.73	9.05	9.34	9.36	9.56	94.4	2.6	95.3	2.0
		2	9.74	9.91	9.94	9.94	9.78	9.11	97.4	3.3		
		3	9.33	9.3	9.64	9.02	9.17	9.96	94.0	3.6		
100	1	97.3	99.1	98.2	99.6	98.6	96.5	98.2	1.2	97.6	0.8	
	2	98	95.4	97.2	95.1	97.5	97.2	96.7	1.2			
	3	98.8	95.8	99.9	100	96.8	95.2	97.8	2.1			
混合型饲料添加剂	0.01	1	0.00956	0.00949	0.00954	0.00976	0.00969	0.00983	96.5	1.4	95.4	1.4
		2	0.00979	0.00915	0.00955	0.00943	0.0092	0.00929	94.0	2.6		
		3	0.00966	0.00993	0.00928	0.00953	0.00932	0.00978	95.8	2.7		
	0.5	1	0.465	0.455	0.481	0.503	0.507	0.503	97.1	4.6	96.9	0.9
		2	0.486	0.455	0.505	0.458	0.475	0.497	95.9	4.3		
		3	0.508	0.509	0.465	0.451	0.494	0.504	97.7	5.0		
	1	1	0.987	0.956	0.939	0.995	0.973	0.915	96.1	3.2	95.2	0.8
		2	0.986	0.929	0.973	0.934	0.911	0.967	95.0	3.1		
		3	0.984	0.931	0.949	0.949	0.924	0.941	94.6	2.2		
	10	1	9.38	9.23	9.28	9.44	9.09	9.42	93.1	1.4	93.7	1.4
		2	9.84	9.21	9.15	9.03	9.15	9.29	92.8	3.1		

	3	9.33	9.3	9.52	9.71	9.69	9.54	95.2	1.8		
100	1	98.3	97.6	95.4	95	96.7	99.1	97.0	1.7	97.0	0.1
	2	97.1	96.2	98.9	96.3	96.8	97.1	97.1	1.0		
	3	98.3	95.1	96.7	98.2	97.5	96.2	97.0	1.3		

由上表可以看出，不同的饲料样品，添加回收率均在 90% 以上，批内变异系数均在 15% 范围内，批间变异系数在 20% 内，方法满足饲料中氯羟吡啶的测定的方法学要求。

通过样品的添加回收试验，证明本方法可适用于包括配合饲料、浓缩饲料、预混饲料及牛精料补充料等饲料样品中氯羟吡啶的检测。

3.2 高效液相色谱法

3.2.1 流动相选择

本实验考察了甲醇和乙腈作为有机相的对比，结果发现，甲醇作为有机相时，峰型和分离度较好。随后对比了超纯水、0.1% 甲酸水以及 0.2% 甲酸铵(含 0.1% 甲酸水)作为水相时对氯羟吡啶的分离效果，结果显示，水作为流动相时，稳定性较好可以满足分析要求，因此选择，水和甲醇作为氯羟吡啶分析流动

3.2.2 色谱柱选择

实验对比不同厂家色谱柱的分离效果，对比峰型和响应值。结果表明，不同厂家 C18 柱，除了保留时间稍微有些差异，其峰型和峰面积没有明显差异，本实验采用 C18 柱对目标物进行分离。

3.2.3 前处理条件优化

同液质法。

3.2.4 分析步骤的确定

3.2.4.1 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，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。

3.2.4.2 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℃ 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。

3.2.5 技术指标

3.2.5.1 线性范围

以 0.1 μg /mL、0.2 μg /mL、1 μg /mL、2 μg /mL、5 μg /mL、10 μg /mL浓度为纵坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，氯羟吡啶标准工作溶液在浓度0.1~10 μg/mL范围内线性良好。

表 9 氯羟吡啶剂线性范围、线性方程和相关系数

药物	线性范围	线性方程	相关系数 r^2
氯羟吡啶	0.1~10 μg/mL	$Y = 245621X + 128.25$	0.9998

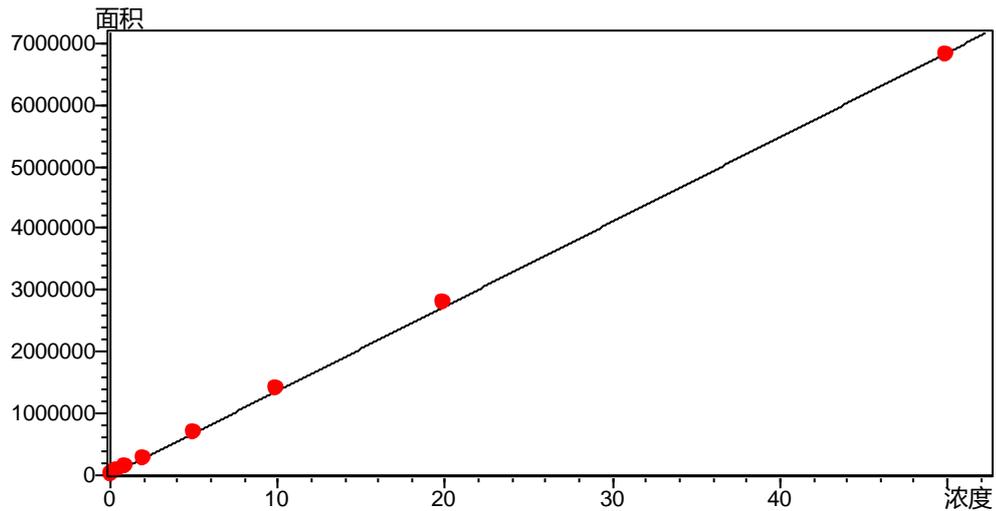


图 6 氯羟吡啶液相标准曲线

3.2.5.2 检出限与定量限

空白试料按相同的步骤处理后，在相应的保留时间，空白试料对所测分析物无干扰。检测限（LOD）与定量限（LOQ）：添加适量标准溶液于 2 g 空白样品，经提取净化后测定，根据所测药物的 $S/N \geq 3$ 为方法检测限， $S/N \geq 10$ 为方法定量限的原则，测得氯羟吡啶在饲料中的检测限为 0.25 mg/kg，定量限为 0.5 mg/kg。

3.2.5.3 干扰实验

以磺胺类（磺胺二甲异恶唑、磺胺二甲异嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺甲恶唑、磺胺甲噻二唑、磺胺二甲基嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺胍、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺喹恶啉）、氨基糖苷类（新霉素、卡那霉素、庆大霉素、链霉素）、大环内酯类（阿奇霉素、红霉素、克拉霉素、螺旋霉素、交沙霉素、竹桃霉素、泰乐菌素、吉他霉素、替米考星）等检测的干扰物质，考察方法

的专属性。结果表明，干扰物质均能与氯羟吡啶有效分离，表明该检测方法专属性较好。

3.2.5.4 方法准确度与精密度实验

分别取饲料各 2.0 g，添加适量氯羟吡啶标准溶液使配合饲料、浓缩饲料、精料补充料添加浓度为 0.5 mg/kg、10mg/kg 和 100 mg/kg，经标准方法提取净化后进行高效液相色谱仪测定，每个梯度平行测定 6 次，以考察方法的准确度和精密度。

表 10 饲料中氯羟吡啶回收率及精密度结果

	加标浓度 (mg/kg)	批次	实测值 (mg/kg)						批内/%		批间/%	
									平均值	相对平均偏差	平均值	相对平均偏差
配合饲料	0.5	1	0.468	0.465	0.461	0.474	0.48	0.487	94.5	2.1	95.1	1.1
		2	0.463	0.487	0.477	0.476	0.456	0.474	94.4	2.3		
		3	0.473	0.451	0.486	0.507	0.465	0.508	96.3	4.8		
	10	1	9.75	9.75	9.94	9.91	9.57	9.77	97.8	1.4	95.1	2.5
		2	9.24	9.31	10	9.28	9.68	9.01	94.2	3.8		
		3	9.12	9.11	9.09	9.57	9.86	9.19	93.2	3.4		
	100	1	98.4	95	97.9	95.3	98.5	96.5	96.9	1.6	96.8	0.5
		2	98	96.4	97.5	95	97.1	98.9	97.2	1.4		
		3	96.2	95.1	95.1	96.1	95	99.8	96.2	1.9		
浓缩饲料	0.5	1	0.485	0.48	0.487	0.466	0.458	0.489	95.5	2.6	94.8	1.7
		2	0.483	0.477	0.455	0.465	0.499	0.5	96.0	3.8		
		3	0.456	0.462	0.457	0.451	0.498	0.465	93.0	3.6		
	10	1	9.82	9.32	9.41	9.5	9.17	9.01	93.7	3.0	95.1	1.3
		2	9.64	9.86	9.31	9.67	9.01	9.85	95.6	3.5		
		3	9.78	9.31	9.63	9.09	9.86	9.93	96.0	3.5		
	100	1	97	95.7	97.1	98.1	95.8	96.3	96.7	0.9	97.4	0.7
		2	97.8	99.8	97.6	98.9	96.2	97.6	98.0	1.3		
		3	98.8	99.2	96.7	96.9	97.2	95.9	97.5	1.3		
精料补充料	0.5	1	0.487	0.495	0.468	0.473	0.48	0.461	95.5	2.6	94.7	0.7
		2	0.484	0.454	0.471	0.483	0.461	0.478	94.4	2.6		
		3	0.487	0.451	0.461	0.457	0.491	0.485	94.4	3.7		
	10	1	9.95	9.33	9.42	9.35	9.15	9.24	94.1	3.0	94.6	1.0

		2	9.56	9.3	9.25	9.98	9.32	9.98	95.7	3.5		
		3	9.92	9.41	9.34	9.47	9.07	9.26	94.1	3.0		
	100	1	96	97.6	96.4	97.4	97.8	98.2	97.2	0.9	97.2	0.1
		2	98.1	95.6	96.9	95.4	99	98.8	97.3	1.6		
		3	98.4	98.1	96	95.6	98.5	95.6	97.0	1.5		
	添加剂 预混合 饲料	0.5	1	0.507	0.49	0.465	0.497	0.481	0.505	98.2	3.2	97.2
2			0.506	0.476	0.488	0.463	0.49	0.464	96.2	3.5		
3			0.477	0.478	0.507	0.499	0.487	0.47	97.3	2.9		
10		1	9.36	9.73	9.65	9.5	9.66	9.04	94.9	2.7	94.5	0.7
		2	9.29	9.43	9.57	9.18	9.53	9.28	93.8	1.6		
		3	9.77	9.2	9.78	9.14	9.48	9.59	94.9	2.9		
100		1	98.4	96.1	98.7	97.8	95.1	96	97.0	1.5	97.7	0.6
		2	95.6	99.4	97.7	99.4	99.9	95.8	98.0	1.9		
		3	97.8	97.7	98.7	97.5	97.8	99.4	98.2	0.8		
混合型 饲料添 加剂	0.5	1	0.475	0.471	0.506	0.468	0.477	0.481	95.9	2.9	95.4	0.5
		2	0.46	0.507	0.461	0.462	0.478	0.489	95.2	4.0		
		3	0.487	0.485	0.461	0.488	0.469	0.463	95.1	2.6		
	10	1	9.1	9.97	9.22	9.83	9.79	9.19	95.2	4.1	95.3	0.9
		2	9.16	9.75	9.92	9.93	9.87	9.08	96.2	4.1		
		3	9.19	9.26	9.73	9.1	9.52	9.88	94.5	3.3		
	100	1	96.5	98.8	98	96	96.6	95.7	96.9	1.2	97.3	0.4
		2	96.4	98	98.7	96	97.6	99	97.6	1.2		
		3	95.6	99.2	100	96.8	95	97.5	97.4	2.0		

由上表可以看出，不同的饲料样品，添加回收率均在 90% 以上，批内变异系数均在 10% 范围内，方法满足饲料中氯羟吡啶的测定的方法学要求。

通过样品的添加回收试验，证明本方法可适用于包括配合饲料、浓缩饲料、预混饲料及牛精料补充料等饲料样品中氯羟吡啶的检测。

三、 试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

本标准在制定过程中，起草组委托广州汇标检测技术中心、中国热带农业科学院农产品加工研究所、广东省农产品质量安全中心进行方法验证，验证结果良好，满足对应饲料样品的检验检测需要，能够

有效检测饲料氯羟吡啶的添加量，确保产品的安全性。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

无

五、采用情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准未采用任何国际标准和国外标准。

六、与有关法律、法规的关系

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准修订过程中，标准编制小组查阅了国内外相关文献资料，向国家和省部级饲料检测试验室、主要大中型饲料企业试验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的科研院所、高校、检测机构、企业等单位有关专家充分征求意见，并按照征求的意见、预审和终审专家意见进行修改、完善，无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本文件未涉及专利。

九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会秘书处及时组织标准宣贯、培训。建议本标准自发布6个月后实施。该标准发布、实施后，建议废除 GB/T

22262-2008 《饲料中氯羟吡啶测定 高效液相色谱法》。

十、其他应予说明的事项

无。