

ICS 65.120

CCSB46

团 体 标 准

T/SXSL XXX-2023

反刍动物用饲料中氯酸盐和高氯酸盐 的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of Chlorate and Perchlorate in Ruminant Feed and Grass

Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

陕西省饲料协会 发布

前言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》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专利的责任。

本标准由陕西饲料协会提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

本标准为首次发布。

反刍动物用饲料中氯酸盐和高氯酸盐的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了反刍动物用饲料中氯酸盐和高氯酸盐的液相色谱-质谱法测定方法。

本文件适用于反刍动物用青贮饲料、精料补充料、浓缩饲料和预混合饲料中氯酸盐和高氯酸盐含量的测定。

本文件氯酸盐的检出限为 2.0 ug/kg，定量限为 5.0 ug/kg；高氯酸盐的检出限为 1.0 ug/kg，定量限为 2.5 ug/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

试样中的氯酸盐和高氯酸盐用 0.1%甲酸甲醇溶液提取，青贮饲料经 HLB 固相萃取柱和 GCB 固相萃取柱净化，精料补充料、浓缩饲料和预混合饲料经 HLB 固相萃取柱净化后，用液相色谱-串联质谱仪测定，标准工作曲线校准，内标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用色谱纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 乙腈。

5.3 甲醇。

5.4 甲酸。

5.5 甲酸铵。

5.6 0.1%甲酸甲醇溶液：移取 1 mL 甲酸于 1000mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀。

5.7 20 mmol/L 甲酸铵溶液：准确称取 1.26 g 甲酸铵于 1000mL 容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀，过 0.22 μm 滤膜后备用。

5.8 氯酸盐标准贮备液（1 mg/mL）：以氯酸根（ ClO_3^- ）计，CAS:7775-09-9。

5.9 高氯酸盐标准贮备液（1 mg/mL）：以高氯酸根（ ClO_4^- ）计，CAS:7601-89-0。

5.10 氯酸盐同位素内标贮备液（1 mg/mL）：以氯酸根- $^{18}\text{O}_3$ （ $\text{ClO}_3\text{-}^{18}\text{O}_3$ ）计，CAS:14866-68-3。

5.11 高氯酸盐同位素内标贮备液（1 mg/mL）：以高氯酸根- $^{18}\text{O}_4$ （ $\text{ClO}_4\text{-}^{18}\text{O}_4$ ）计，CAS:871943-52-1。

5.12 混合标准中间溶液：分别准确移取氯酸盐标准贮备液（5.8）2 mL、高氯酸盐标准贮备液（5.9）1 mL 于同一 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，制成氯酸盐、高氯酸盐浓度分别为 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间溶液，4 $^\circ\text{C}$ 保存，有效期为 3 个月。

5.13 混合标准工作溶液：准确移取混合标准中间溶液（5.12）0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，制成氯酸盐、高氯酸盐浓度分别为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作溶液，4 $^\circ\text{C}$ 保存，有效期为 1 个月。

5.14 混合同位素内标中间溶液：分别准确移取氯酸盐同位素内标贮备液（5.10）2 mL、高氯酸盐同位素内标贮备液（5.11）1 mL 于同一 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，制成氯酸盐同位素内标、高氯酸盐同位素内标浓度分别为 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合同位素内标中间溶液，4 $^\circ\text{C}$ 保存，有效期为 3 个月。

5.15 混合同位素内标工作溶液：准确移取混合同位素内标中间溶液（5.14）0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，制成氯酸盐同位素内标、高氯酸盐同位素内标浓度分别为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合同位素内标工作溶液，4 $^\circ\text{C}$ 保存，有效期为 1 个月。

5.16 混合标准系列工作溶液：分别准确移取混合标准工作溶液（5.13）5 μL 、10 μL 、50 μL 、100 μL 、200 μL 及混合同位素内标工作溶液（5.15）50 μL 于 10mL 容量瓶中，用甲醇稀释定容，配制成氯酸盐浓度为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、40.0 ng/mL，高氯酸盐浓度为 0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL，氯酸根- $^{18}\text{O}_3$ 浓度为 10.0 ng/mL，高氯酸根- $^{18}\text{O}_4$ 浓度为 5.0 ng/mL 的混合标准系列工作液，临用现配。

5.17 HLB 固相萃取小柱：规格为 200 mg/6 mL，或者性能相当者，临用前用 5 mL 甲醇活化。

5.18 GCB 固相萃取小柱：规格为 200 mg/6 mL，或者性能相当者，临用前用 5 mL 甲醇活化。

5.19 微孔滤膜：0.22 μm ，有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-质谱仪（配有电喷雾电离源）。

6.2 分析天平：感量 0.0001 g 和 0.000 01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 振荡器。

6.5 离心机：转速 ≥ 6000 r/min。

6.6 固相萃取装置。

7 样品

按照GB/T20195的规定制备样品，粉碎后过0.42mm孔径分析筛，混匀，装入大磨口瓶中备用。选取与待测样品类型相同，均匀一致，且在待测物保留时间处仪器响应面积小于方法定量限30%的饲料样品，作为空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

称取试样 2g（精确至 0.0001g）于 50mL 离心管中，准确加入 50 μ L 混合同位素内标工作溶液（5.15），混匀；再准确加入 0.1%甲酸甲醇溶液 10mL（5.6），涡旋 1min，振荡提取 20min，于 6000r/min 离心 3 min，上清液转入另一支洁净的离心管中，待净化。

8.2 净化

8.2.1 青贮饲料

取 GCB 固相萃取小柱和 HLB 固相萃取小柱，将 5 mL 待净化液注入 GCB 固相萃取小柱中，使用注射器活塞加压，弃去约 1 mL 流出液，续滤液流入 HLB 固相萃取小柱中，使用注射器活塞加压，弃去约 1 mL 流出液，收集续滤液，过膜（5.20）后待测。

8.2.1 精料补充料、浓缩饲料和预混合饲料

取 HLB 固相萃取小柱，将 5 mL 待净化液注入 HLB 固相萃取小柱中，使用注射器活塞加压，弃去约 1 mL 流出液，收集续滤液，过膜（5.20）后待测。

8.3 测定

8.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱：Acclaim™ Trinity™ P1 复合离子交换柱（100 $\times$ 2.1 mm，3 μ m），或性能相当者。

流动相：A相：20 mmol/L 甲酸铵溶液（5.7）；B相：乙腈，洗脱条件见表1。

流速：0.5 mL/min。

柱温：35 $^{\circ}$ C。

进样量：10 μ L。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A 相(%)	B 相(%)
0.0	30	70
3.0	10	90
7.0	10	90
7.1	30	70
10	30	70

8.3.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾离子源（ESI）；
检测方式：多反应监测（MRM）；
扫描方式：负离子扫描；
毛细管电压：2.5kV；
离子源温度：150℃；
脱溶剂气温度：350℃；
多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 硝基咪唑类药物的定性离子对、定量离子对及质谱条件

被测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
氯酸盐	83.0>67.0	83.0>67.0	22.0	94
	85.0>69.0		22.1	95
高氯酸盐	99.0>83.0	99.0>83.0	27.2	98
	101.0>85.0		27.0	93
氯酸盐-18O ₃	89.0>71.0	/	23.4	91
高氯酸盐-18O ₄	107.0>89.0	/	28.1	104

8.3.3 混合标准系列工作溶液和试样溶液的测定

在仪器最佳工作条件下，分别取混合标准系列工作溶液（5.16）和试样溶液（8.2）上机测定。
混合标准系列工作溶液中各被测物的选择离子色谱图参见附录 A。

8.4.4 定性测定

通过试样色谱图的保留时间与相应标准品的保留时间、各色谱峰的特征离子与相应浓度标准溶液各色谱峰的特征离子相对照定性。试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 5%；试样特征离子的相对丰度与浓度相当标准溶液的相对丰度一致，相对丰度偏差不超过表 3 的规定，则可判定样品中存在对应的化合物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为 %				
相对离子丰度	>50	20~50	10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

取试样溶液、混合标准系列工作溶液，作单点或多点校准，按内标法以峰面积比定量，标准溶液及试样溶液中氯酸盐、高氯酸盐与其内标峰面积比均应在仪器检测的线性范围内。

9 试验数据处理

试样中氯酸盐、高氯酸盐的含量 w 以质量分数计，单位为毫克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ），按公式（1）计算。

$$w_i = \frac{C_s \times C_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V}{C'_{is} \times A_s \times A_{is} \times m} \times n \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C_{is} ——试样溶液中各内标物浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

C_s ——标准溶液中各待测物浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

C'_{is} ——标准溶液中各内标物浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

A_i ——试样溶液中各待测物峰面积；

A_{is} ——试样溶液中各内标物峰面积；

A_s ——标准溶液中各待测物峰面积；

A'_{is} ——标准溶液中各内标物峰面积；

V ——提取溶液的体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样质量，单位为克（ g ）；

n ——稀释倍数。

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

(资料性附录)

A.1 特征离子质量色谱图

