

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×

饲料中五氯苯酚的测定
液相色谱-串联质谱法

Determination of pentachlorophenol in feeds —
Liquid chromatography - tandem mass spectrometry

(公开征求意见稿)

(本稿完成日期 2024 年 09 月 18 日)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：***、***、***、***。

本文件主要起草人：***、***、***、***、***、***、***、***、***、***。

本文件系首次发布。

饲料中五氯苯酚的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中五氯苯酚的液相色谱-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、混合型饲料添加剂和饲料原料中五氯苯酚的测定。

本文件的检出限为5 µg/kg，定量限为10 µg/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

试样中的五氯苯酚用碱性提取溶液提取，经混合型强阴离子交换固相萃取柱净化，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。

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 甲醇：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 乙酸铵：色谱纯。

5.5 5 mmol/L 乙酸铵溶液：称取 0.385 g 乙酸铵（5.4），用水溶解并稀释至 1 000 mL，混匀。

5.6 0.1 mmol/L 乙酸铵溶液：取 20 mL 5 mmol/L 乙酸铵溶液（5.5），用水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.7 乙腈-乙酸铵缓冲盐溶液：取 700 mL 乙腈（5.3）、0.1 mmol/L 乙酸铵溶液（5.6）300 mL，混匀。

5.8 10 mol/L 氢氧化钠溶液：称取 40 g 氢氧化钠，用水溶解并稀释至 100 mL，混匀，储存于聚乙烯或聚四氟乙烯瓶中。

NY/T ××××-202×

- 5.9 提取溶液：取 50 mL 三乙胺，用乙腈-乙酸铵缓冲盐溶液（5.7）稀释至 1 000 mL，混匀，用氢氧化钠溶液（5.8）调节 pH 至 12 ± 0.2 。
- 5.10 5%氨水溶液：取氨水 50 mL，用水稀释至 1 000 mL，混匀。
- 5.11 5%甲酸乙腈溶液：取 50 mL 甲酸，用乙腈（5.3）稀释至 1 000 mL，混匀。
- 5.12 50%甲醇溶液：取 50 mL 甲醇（5.2），用水稀释至 100 mL，混匀。
- 5.13 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取五氯苯酚钠（CAS：131-52-2，纯度 $\geq 98\%$ ）标准品 10 mg（以有效成分计，精确至 0.01 mg），用甲醇（5.2）适量使溶解并转移至 10 mL 容量瓶中，定容，混匀。于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 12 个月。或购买有证标准溶液。
- 5.14 标准中间溶液（10 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取 1 mL 标准储备溶液（5.13）于 100 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2）稀释定容，混匀。于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 6 个月。
- 5.15 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液（5.14）于容量瓶中，用 50%甲醇溶液（5.12）稀释，配制成质量浓度分别为 50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、800 ng/mL、1 000 ng/mL 标准系列溶液。临用现配。
- 5.16 固相萃取小柱：混合型强阴离子交换柱，150 mg/6 mL，或相当者。
- 5.17 微孔滤膜：0.22 μm ，聚醚砜，或相当者。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平：精度 0.1 mg 和 0.01 mg。
- 6.3 旋涡混合器。
- 6.4 超声波清洗器。
- 6.5 离心机：转速不低于 10 000 r/min。
- 6.6 固相萃取装置。
- 6.7 氮吹仪。
- 6.8 pH 计：精度 ± 0.01 。
- 6.9 刻度离心管：精度 0.1 mL。

7 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 孔径的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中，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值小于方法定量限 30% 的饲料样品，作为空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g（精确至 0.1 mg）于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 提取溶液（5.9）涡旋混合 1 min，超声提取 10 min，期间充分摇动 2 次，于 10 000 r/min 离心 5 min，取上清液至另一离心管，残渣重复提取 1 次，合并上清液，备用。

8.2 净化

取固相萃取小柱（5.16），依次用5 mL甲醇（5.2）和5 mL水活化。将备用液（8.1）全部过柱，每2~3秒1滴。依次用5 mL 5%氨水溶液（5.10）、5 mL甲醇（5.2）淋洗，抽干。用8 mL 5%甲酸乙腈溶液（5.11）洗脱，抽干，收集洗脱液于刻度离心管中，于35 °C低速氮气流下浓缩至约1 mL，用水稀释定容至2 mL，涡旋混匀，微孔滤膜（5.17）过滤，待测。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

称取基质空白试样，按8.1和8.2处理得到空白基质溶液，移取标准系列溶液（5.15）适量，用空白基质溶液稀释，配制成质量浓度为5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、80 ng/mL、100 ng/mL的基质匹配标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 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，粒度1.7 μm，或相当者；
- b) 柱温：40 °C；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 进样量：5 μL；
- e) 流动相：A 相为 5 mmol/L 乙酸铵溶液（5.5），B 相为甲醇（5.2），梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0.0	85	15
0.5	85	15
2.0	50	50
7.0	5	95
8.5	5	95
8.6	85	15
11.0	85	15

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）；
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 喷雾电压：-4.5 kV；
- d) 离子源温度：650 °C；
- e) 气帘气：60 psi（413 kPa）；
- f) 雾化气：60 psi（413 kPa）。

监测离子对、去簇电压及碰撞能量见表 2。

表2 多反应监测离子对、去簇电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 <i>m/z</i>	去簇电压 V	碰撞能量 eV
五氯苯酚	262.8/262.8	-55	-10
	264.8/264.8 ^a	-55	-10
	266.8/266.8	-90	-10
	268.8/268.8	-85	-10
^a 为定量离子。			

8.4.3 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，分别取基质匹配标准系列溶液（8.3）和试样溶液（8.2）上机测定。五氯苯酚基质匹配标准溶液定量离子色谱图见附录A。

8.4.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液与基质匹配标准系列溶液（质量浓度相当）中五氯苯酚的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。根据表2选择的监测离子对，比较试样谱图中五氯苯酚监测离子对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监测离子对的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在五氯苯酚。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

以基质匹配标准系列溶液中五氯苯酚的质量浓度为横坐标，定量离子对色谱峰面积（响应值）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。试样溶液与基质匹配标准溶液中五氯苯酚的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围应重新试验。单点校准定量时，试样溶液中五氯苯酚的质量浓度与基质匹配标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中五氯苯酚的含量以质量分数 w 计，数值以微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中五氯苯酚的质量浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V ——固相萃取净化后定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样质量，单位为克（ g ）；

1000——换算系数。

$$w = \frac{A \times C_s \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A ——试样溶液中五氯苯酚的色谱峰面积；

C_s ——基质匹配标准溶液中五氯苯酚的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——固相萃取净化后定容体积，单位为毫升（mL）；

A_s ——基质匹配标准溶液中五氯苯酚的色谱峰面积；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留3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20%。

附录 A

(资料性)

五氯苯酚猪配合饲料基质匹配标准溶液定量离子色谱图

五氯苯酚猪配合饲料基质匹配标准溶液定量离子色谱图见图 A.1。



图 A.1 五氯苯酚猪配合饲料基质匹配标准溶液（10 ng/mL）定量离子色谱图