

中华人民共和国国家标准

GB ×××××.×—××××

食品安全国家标准

禽蛋中卡巴氧和啞乙醇的代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standards-

Determination of metabolite residues of carbadox and olaquinox in poultry
eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国农业农村部

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

国家市场监督管理总局

前 言

本标准系首次发布。

征求意见稿

食品安全国家标准

禽蛋中卡巴氧和喹乙醇的代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了禽蛋中卡巴氧代谢物喹噁啉-2-羧酸(QCA)和喹乙醇代谢物 3-甲基喹噁啉-2-羧酸(MQCA)残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑蛋等禽蛋中 QCA 和 MQCA 残留量的测定。

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，仅所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 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试料中QCA和MQCA残留经偏磷酸溶液水解提取，叔丁基甲醚萃取后，用磷酸盐缓冲液反萃取，混合型强阴离子交换柱净化，酸性甲醇洗脱，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

4 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

4.1.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

4.1.3 甲酸(HCOOH)：色谱纯。

4.1.4 偏磷酸（HPO₃）。

4.1.5 叔丁基甲醚（（CH₃）₃COCH₃）。

4.1.6 十二水合磷酸氢二钠（Na₂HPO₄·12H₂O）。

4.1.7 氢氧化钠（NaOH）。

4.2 溶液配制

4.2.1 10%偏磷酸—20%乙腈溶液：称取 100 g 偏磷酸，放入 1000 mL 烧杯中，加入 600 mL 水，加热沸腾至溶解，冷却至室温后，加入 200 mL 乙腈，然后再加水稀释至 1000 mL。

4.2.2 磷酸盐缓冲液：称取磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 3.58 g，加入 900 mL 水溶解，磷酸调节 pH 至 7.0，加水稀释至 1000 mL。

4.2.3 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液：称取 0.5g 氢氧化钠，加水溶解，冷却至室温后，加水稀释至 250mL。

4.2.4 2%甲酸甲醇：取 2 mL 甲酸，加甲醇稀释至 100 mL。

4.2.5 0.1%甲酸-甲醇溶液：取 10mL 甲醇和 100 μ L 甲酸，加水稀释至 100 mL。

4.2.6 0.1%甲酸水溶液：取 1.0 mL 甲酸，加水稀释至 1000 mL。

4.3 标准品

4.3.1 喹噁啉-2-羧酸 (quinoxaline-2-carboxylic acid, QCA, $\text{C}_9\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_2$, CAS: 879-65-2) 含量 $\geq 97.0\%$ 。

4.3.2 3-甲基喹噁啉-2-羧酸 (methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid, MQCA, $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$, CAS: 74003-63-7) 含量 $\geq 97.0\%$ 。

4.3.3 内标：氘代喹噁啉-2-羧酸 (quinoxaline-2-carboxylic acid- D_4 , QCA- D_4 , $\text{C}_9\text{HD}_4\text{N}_2\text{O}_2$) 含量 $\geq 98.0\%$

4.3.4 内标：氘代 3-甲基喹噁啉-2-羧酸 (methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid- D_4 , MQCA- D_4 , $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{D}_4\text{N}_2\text{O}_2$) 含量 $\geq 98.0\%$ 。

4.4 标准溶液的制备

4.4.1 标准储备液：取 QCA 和 MQCA 标准品各适量 (相当于各活性成分约 10 mg) 于 100 mL 棕色容量瓶，用甲醇溶解并定容至刻度，配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液， $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光保存，有效期 6 个月。

4.4.2 内标储备液：取 QCA- D_4 和 MQCA- D_4 标准品各适量 (相当于各活性成分约 10 mg) 于 100 mL 棕色容量瓶，用甲醇溶解并定容至刻度，配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标储备液， $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光保存，有效期 6 个月。

4.4.3 混合标准工作液：准确移取 QCA 和 MQCA 标准储备液各 0.2 mL，于 100 mL 棕色容量瓶，用甲醇溶解并定容至刻度，配制成浓度为 200 ng/mL 的混合标准工作液， $4\text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光保存，有效期 1 个月。

4.4.4 混合内标工作液：准确移取 QCA-D₄ 和 MQCA-D₄ 内标储备液各 0.2 mL，于 100 mL 棕色容量瓶，用甲醇溶解并定容至刻度，配制成浓度为 200 ng/mL 的混合内标工作液，4 °C 以下避光保存，有效期 1 个月。

4.5 材料

4.5.1 混合型强阴离子交换柱：60 mg/3 mL，或相当者。

4.5.2 微孔滤膜：有机相，0.22 μm。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱—串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

5.2 电子天平：感量 0.01 g。

5.3 分析天平：感量 0.00001 g。

5.4 氮吹仪。

5.5 超声波清洗仪。

5.6 酸度计。

5.7 旋涡混合器。

5.8 高速离心机：不低于 8 000 r/min。

5.9 组织匀浆机。

5.10 固相萃取装置。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

取适量新鲜或冷藏的空白或供试禽蛋，去壳并使均质。

——取均质后的供试样品，作为供试试料。

——取均质后的空白样品，作为空白试料。

——取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

6.2 试料的保存

-18°C 以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取试料5g（精确至±0.05 g）置于50 mL聚丙烯离心管中，加入50 μL混合内标工作液和6 mL 10 %偏磷酸-20 %乙腈溶液，涡旋混合1 min，超声10 min，8 000 r/min离心5 min，转移上清液至另一个50 mL离心管，残渣再用6 mL 10 %偏磷酸-20 %乙腈溶液重新提取一次，合并上清液。在上清液中加入10 mL叔丁基甲醚，涡旋混合1 min，4500 r/min离心5 min，转移上层有机相至另一个50 mL离心管，用10 mL叔丁基甲醚重复提取一次，合并上层有机相。加入10 mL磷酸盐缓冲液，涡旋2 min，4500 r/min离心5 min，弃去上层有机相，下层磷酸缓冲液备用。

7.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇、水各3 mL活化，取备用液过柱，依次用0.05 mol/L NaOH溶液、甲醇溶液各3 mL淋洗，抽干。用6 mL 2%甲酸-甲醇溶液洗脱，洗脱液于40℃下氮气吹干。用1.0 mL 0.1%甲酸-甲醇溶液溶解残余物，涡旋混匀，过0.22 μm滤膜，滤液供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 标准曲线的制备

精密量取适量混合标准工作液及混合内标标准工作液，用初始流动相稀释配制成浓度为1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL的系列标准溶液（内标均为10 ng/mL）。以定量离子质量色谱峰面积与对应内标峰面积比为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，临用现配。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈色谱柱（100×2.1 mm，1.8 μm），或性能相当者；
- b) 流动相：A为0.1%甲酸水溶液，B为甲醇，梯度洗脱程序见表1；
- c) 流速：0.4 mL/min；
- d) 柱温：30℃；
- e) 进样量：5.0 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	0.1%甲酸水溶液, %	甲醇, %
0.00	90	10
4.00	30	70
4.10	0	100
5.00	0	100
5.10	90	10
6.00	90	10

7.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源;
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 检测方式: 多反应监测;
- d) 毛细管电压: 3000V;
- e) 离子源温度: 150 °C;
- f) 脱溶剂流速: 15 L/min;
- g) 鞘气温度: 300 °C;
- h) 鞘气流速: 12L/min;
- i) 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表2。

表2 定性离子对、定量离子对、碰撞能量和碎片电压

化合物名称	定性离子对及碰撞能量 (eV)	定量离子对及碰撞能量 (eV)	碎片电压 (V)
QCA	175>129 (18)	175>129 (18)	380
	175>101.9 (35)		
MQCA	189.1>145.1 (10)	189.1>145.1 (10)	380
	189.1>143.1 (15)		
QCA-D4	179>133 (20)	179>106 (35)	380
	179>106 (35)		
MQCA-D4	192.9>149 (12)	192.9>149 (12)	380
	192.9>146.9 (15)		

7.4.3 测定法

a) 定性测定

在同样测试条件下, 试料溶液中 QCA 和 MQCA 的保留时间与标准工作液中 QCA 和 MQCA 的保留时间相比, 偏差在±2.5%以内, 且检测到的离子的相对丰度, 应当与浓度相

当的校正标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表 3 要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

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

b) 定量测定

按7.4.1和7.4.2设定仪器条件,以标准工作溶液浓度为横坐标,以待测药物和内标的峰面积比值为纵坐标,作单点或多点校准,按内标法计算。试料溶液及标准溶液中待测药物的特征离子质量色谱峰峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。标准溶液特征离子质量色谱图参见附录A。

7.5. 空白试验

取空白试料,除不加药物外,均按上述测定步骤进行。

8 结果计算和表述

试料中待测药物的残留量以质量分数(X)计,单位以微克每千克(μg/kg)表示,按式(1)计算:

单点校准:

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

式中:

X ——供试试料中被测物残留量,单位为微克每千克(μg/kg);

C_{is} ——试料溶液中同位素内标物浓度,单位为微克每升(μg/L);

C_s ——标准溶液中被测物浓度,单位为微克每升(μg/L);

C'_{is} ——标准溶液中同位素内标物浓度,单位为微克每升(μg/L);

A_i ——试料溶液中被测物峰面积;

A_{is} ——试料溶液中同位素内标峰面积;

A_s ——标准溶液中被测物峰面积；

A'_{is} ——标准溶液中同位素内标物峰面积；

V ——试料定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——供试试料的质量，单位为克（g）。

计算结果需扣除空白值。测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法中 QCA 和 MQCA 的检出限均为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法中 QCA 和 MQCA 在 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率为 70%~120%。

9.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
标准溶液特征离子质量色谱图

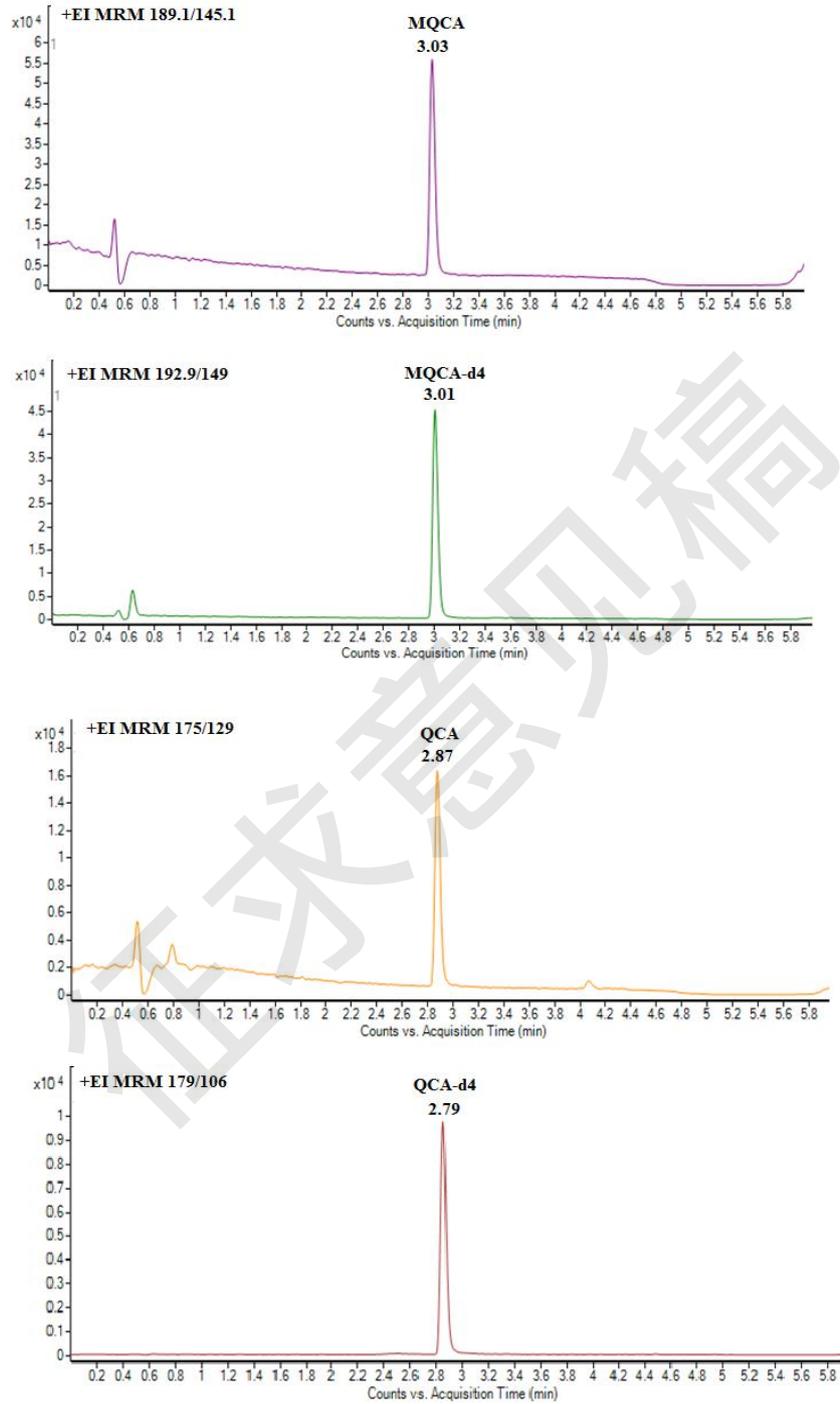


图 A.1 混合标准溶液定量离子对质量色谱图
(QCA 和 MQCA 浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$, QCA-D₄ 和 MQCA-D₄ 浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$)