

中华人民共和国国家标准

GB/T 22984—2008

牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of the residues of metabolites of carbadox and
olaquinox in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：林黎、谢丽琪、欧阳姗、梁宏、叶刚、廖菁菁、庞国芳。

牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物 残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛奶和奶粉中卡巴氧代谢物喹噁啉-2-羧酸(quinoxaline-2-carboxylic acid)和喹乙醇代谢物 3-甲基喹噁啉-2-羧酸(3-methyl quinoxaline-2-carboxylic acid)残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中卡巴氧代谢物喹噁啉-2-羧酸(quinoxaline-2-carboxylic acid)和喹乙醇代谢物 3-甲基喹噁啉-2-羧酸(3-methyl quinoxaline-2-carboxylic acid)残留量的测定。

本标准的方法检出限:喹噁啉-2-羧酸和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸的方法检出限牛奶为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,奶粉为 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第 1 部分:总则与定义(GB/T 6379.1—2004,ISO 5725-1:1994,IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第 2 部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004,ISO 5725-2:1994,IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 原理

用甲酸溶液消化试样,使牛奶和奶粉中天然存在的酶失活,然后加入蛋白酶水解,盐酸酸化,离心过滤后,固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱仪测定,内标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 甲醇:色谱纯。
- 4.2 甲酸:色谱纯。
- 4.3 乙酸钠。
- 4.4 乙酸乙酯。
- 4.5 2%甲酸-乙酸乙酯溶液:向 400 mL 乙酸乙酯中加入 10 mL 甲酸,用乙酸乙酯定容至 500 mL。
- 4.6 0.6%甲酸溶液:量取 6.0 mL 甲酸,用水溶解、定容至 1 L。
- 4.7 0.1%甲酸溶液:量取 1.0 mL 甲酸,用水溶解、定容至 1 L。
- 4.8 甲酸-甲醇溶液(19+1):用 190 mL 甲酸溶液(4.2)与 10 mL 甲醇(4.1)混合。
- 4.9 0.1 mol/L 盐酸溶液:量取 8.3 mL 浓盐酸,用水溶解、定容至 1 L。
- 4.10 0.3 mol/L 盐酸溶液:量取 25 mL 浓盐酸,用水溶解、定容至 1 L。

- 4.11 Protease 蛋白酶:SigmaP5147 或相当者,−18 ℃以下保存。
- 4.12 0.01 g/mL 蛋白酶水溶液:称取 1.00 g Protease 蛋白酶(4.11),用水溶解、定容至 100 mL,4 ℃保存。
- 4.13 10%乙酸溶液:量取 100 mL 乙酸,用水溶解、定容至 1 L。
- 4.14 0.05 mol/L 乙酸钠溶液:称取 6.8 g 乙酸钠用 800 mL 水溶解,再滴加 10%乙酸溶液以调节溶液 pH=7,用水定容至 1 L。
- 4.15 乙酸钠-甲醇溶液(19+1):用 190 mL 乙酸钠溶液(4.14)与 10 mL 甲醇(4.1)混合。
- 4.16 甲醇-水溶液(1+4)。
- 4.17 Tris 碱:SigmaT1503 或相当者。
- 4.18 1.0 mol/L Tris 溶液:称取 121 g Tris 碱(4.17),用水溶解、定容至 1 L,4 ℃保存。
- 4.19 喹噁啉-2-羧酸、3-甲基喹噁啉-2-羧酸、喹噁啉-2-羧酸-d4 标准物质:纯度≥99%。
- 4.20 标准储备液:100 mg/L。准确称取适量标准物质,分别用甲醇溶解定容,配成 100 mg/L 的标准储备液,在−18 ℃以下保存。
- 4.21 基质混合标准工作溶液:根据灵敏度和使用需要,用空白样品提取液配成不同浓度(μg/L)的混合标准工作溶液,在 4 ℃保存。
- 4.22 内标工作溶液:准确称取适量喹噁啉-2-羧酸-d4 标准物质,用甲醇溶解定容,配成 100 μg/L 的标准工作溶液,在 4 ℃保存。
- 4.23 Oasis MAX 固相萃取柱¹⁾或相当者:60 mg,3 mL。用前分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化,保持柱体湿润。
- 4.24 滤膜:0.2 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。
- 5.2 固相萃取真空装置。
- 5.3 吹氮浓缩仪。
- 5.4 旋涡振荡器。
- 5.5 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.6 真空泵。
- 5.7 低温离心机:可制冷到 4 ℃,转速大于 5 000 r/min。
- 5.8 移液器量程:10 μL~100 μL 和 100 μL~1 000 μL。
- 5.9 聚丙烯离心管:15 mL 和 50 mL,具塞。
- 5.10 pH 计:精度±0.02pH 单位。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

取不少于 500 g 有代表性的牛奶或奶粉,充分混匀,分为两份,置于样品瓶中,密封,并作上标记。

6.2 试样的保存

牛奶置于 4 ℃冰柜中避光保存,奶粉则于室温下置于干燥器保存。

1) Oasis MAX 固相萃取柱是 Waters 公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不是表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

7 测定步骤

7.1 提取

7.1.1 牛奶

准确称取 5 g 牛奶样品(精确到 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入一定量的内标溶液(4.22),使其浓度为 2.0 ng/g,再加入 10 mL 0.6%甲酸溶液(4.6),混匀后,置于(47±3)℃振荡水浴中振摇 1 h;然后先加入 3 mL 1.0 mol/L Tris 溶液(4.18),再加入 0.3 mL 蛋白酶水溶液(4.12),充分混匀后,置于(47±3)℃振荡水浴中酶解 16 h~18 h。加入 20 mL 0.3 mol/L 盐酸(4.10),振荡 5 min,在 10℃以 5 000 r/min 离心 15 min,上清液过滤。

7.1.2 奶粉

取 12.5 g 奶粉于烧杯中,加适量 35℃~50℃水将其溶解,待冷却至室温后,加水至总质量为 100 g,充分混匀后准确称取 5 g 样品(精确到 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,按 7.1.1 步骤进行处理。

7.2 净化

将 7.1 所得溶液以约 1 mL/min 的流速全部通过 Oasis MAX 固相萃取柱(4.23),分别用 15 mL 乙酸钠-甲醇溶液(4.15)淋洗固相萃取柱,真空抽干 15 min。再用 5 mL 甲醇、3 mL 水、5 mL 0.1 mol/L 盐酸(4.9)和 3 mL 甲醇-水溶液(4.16)分别淋洗,真空抽干 15 min,然后用 2 mL 乙酸乙酯淋洗固相萃取柱,弃去全部淋出液,最后用 3 mL 甲酸-乙酸乙酯溶液(4.5)洗脱喹喏啉-2-羧酸和 3-甲基喹喏啉-2-羧酸,置于 15 mL 聚丙烯离心管中,在 45℃用氮气浓缩仪吹干。准确加入 1.0 mL 甲酸-甲醇溶液(4.8)溶解残渣,过 0.2 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 空白基质溶液的制备

称取阴性样品 5 g(精确到 0.01 g),按 7.1 和 7.2 步骤操作。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: ODS, 3 μm, 100 mm×2.1 mm(内径)或相当者;
- b) 流动相: 甲醇、乙腈以及 0.1%甲酸溶液(时间梯度见表 1);

表 1 流动相时间梯度

时间/min	甲醇/%	乙腈/%	0.1%甲酸/%
0.0	13	7	80
10.0	45	15	40
10.1	64	16	20
13.1	13	7	80
20.0	13	7	80

- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 柱温: 30℃;
- e) 进样量: 30 μL。

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 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: 多反应检测;

- d) 分辨率:单位质量分辨率;
- e) 电喷雾电压:5 000 V;
- f) 雾化气流速:8.0 L/min;
- g) 气帘气流速:7.0 L/min;
- h) 辅助气流速:5.0 L/min;
- i) 离子源温度:450 ℃;
- j) 定性离子对、定量离子对及其他质谱参数见表 2。

表 2 各种化合物的定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞电压、碰撞池出口电压

化合物名称	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	定量内标离子对 (<i>m/z</i>)	去簇电压/ V	聚焦电压/ V	碰撞电压/ V	碰撞池出口电压/ V
喹唞啉-2-羧酸	175.0/129.2	175.0/131.2	179.2/133.2	26	120	23	12
	175.0/131.2			26	120	21	12
3-甲基喹唞啉-2-羧酸	189.2/143.1	189.2/145.1	179.2/133.2	26	120	23	12
	189.2/145.1			26	120	21	12

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同实验条件下,样品中待测物质的保留时间,与混合标准工作溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,各分析化合物的参考保留时间见表 3,样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的混合标准工作溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 4 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 3 分析化合物参考保留时间

化合物名称	保留时间/min
喹唞啉-2-羧酸	10.10
3-甲基喹唞啉-2-羧酸	11.11

表 4 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差 %

相对离子丰度 <i>K</i>	<i>K</i> >50	20< <i>K</i> <50	10< <i>K</i> <20	<i>K</i> ≤10
允许最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

用混合标准工作溶液(4.21)分别进样,以分析化合物和内标化合物的峰面积比为纵坐标,以分析化合物和内标化合物的浓度比为横坐标作标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中喹唞啉-2-羧酸和 3-甲基喹唞啉-2-羧酸的响应值均应在仪器测定的线性范围内。喹唞啉-2-羧酸和 3-甲基喹唞啉-2-羧酸标准物质提取离子流图参见附录 A 中的图 A.1 和图 A.2。

7.5 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.6 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液,按步骤 7.1.1~7.1.3 操作,测定后计算样品添加的回收率。本方法中喹唞啉-2-羧酸和 3-甲基喹唞啉-2-羧酸在两种基质中的添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B 中的表 B.1。

8 结果计算

试样中每种化合物残留量按式(1)计算:

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{s_i}} \times \frac{A_{s_i}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中被测物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c_s ——基质标准工作溶液中被测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A ——试样溶液中被测物的色谱峰面积;

A_s ——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;

c_i ——试样溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

c_{s_i} ——基质标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_{s_i} ——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;

A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

本方法的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性实验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,样品中两种分析化合物的添加浓度范围及重复性方程见表 5。

表 5 添加浓度范围及重复性和再现性方程

单位为毫克每千克

化合物名称	样品基质	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
喹噁啉-2-羧酸	牛奶	0.5~5.0	$\lg r=0.879\ 7\ \lg m-1.017\ 9$	$\lg R=0.844\ 5\ \lg m-0.648\ 9$
	奶粉	4.0~40.0	$\lg r=0.956\ 1\ \lg m-1.055\ 4$	$\lg R=0.757\ 8\ \lg m-0.616\ 3$
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	牛奶	0.5~5.0	$\lg r=0.869\ 7\ \lg m-1.077\ 2$	$\lg R=0.724\ 0\ \lg m-0.649\ 2$
	奶粉	4.0~40.0	$\lg r=0.982\ 1\ \lg m-0.985\ 1$	$\lg R=0.860\ 0\ \lg m-0.599\ 7$

注: m 为两次测定结果的算术平均值。

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性实验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,样品中两种分析化合物的添加浓度范围及再现性方程见表 5。

附录 A
(资料性附录)

标准物质提取离子流图

喹噁啉-2-羧酸(QCA)和同位素内标(QCA-d4)标准物质提取离子流图,见图 A. 1;3-甲基喹噁啉-2-羧酸(MQCA)和同位素内标(QCA-d4)标准物质提取离子流图,见图 A. 2。

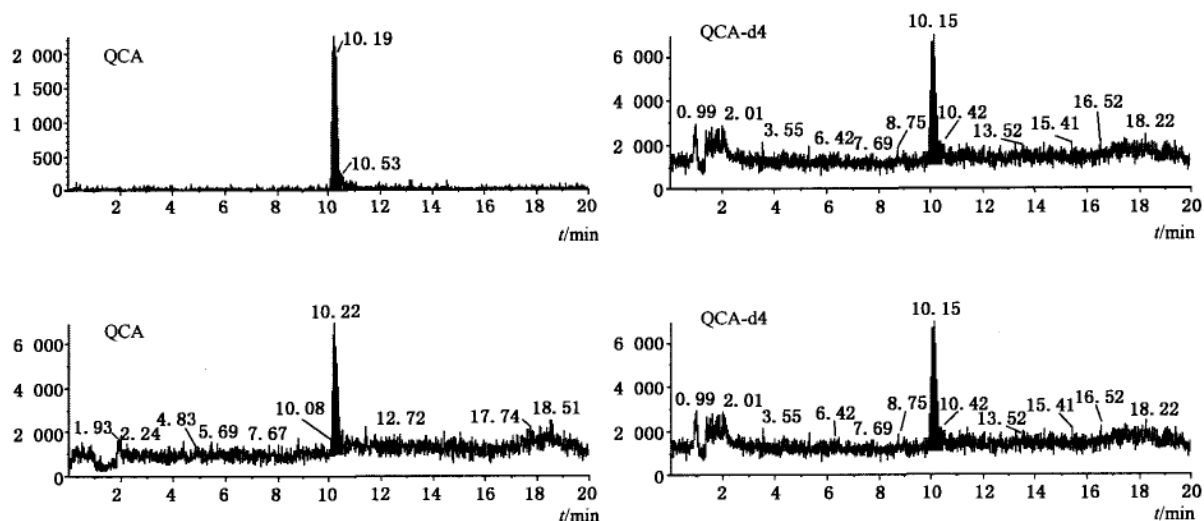


图 A. 1 喹噁啉-2-羧酸(QCA)和同位素内标(QCA-d4)标准物质提取离子流图

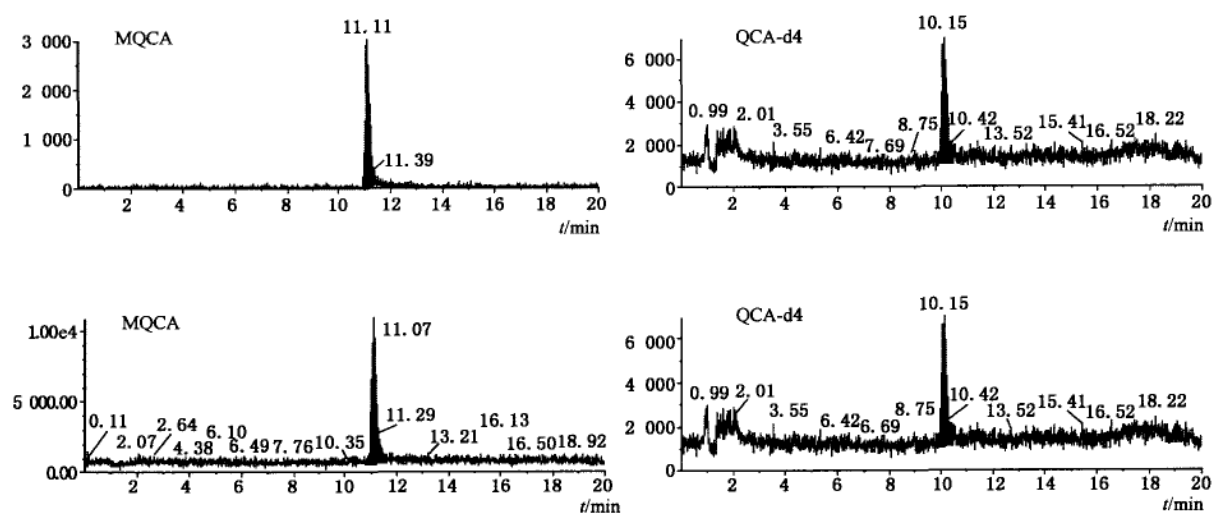


图 A. 2 3-甲基喹噁啉-2-羧酸(MQCA)和同位素内标(QCA-d4)标准物质提取离子流图

附录 B
(资料性附录)
回收率

本方法中喹噁啉-2-羧酸和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸在牛奶和奶粉中添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 喹噁啉-2-羧酸和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸在牛奶和奶粉中添加浓度及其平均回收率的试验数据

化合物名称	样品基质	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%
喹噁啉-2-羧酸	牛奶	0.5	83.1
		1.0	75.7
		2.0	80.5
		5.0	89.9
	奶粉	4.0	79.1
		8.0	85.6
		16.0	87.7
		40.0	88.7
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	牛奶	0.5	77.4
		1.0	85.3
		2.0	72.1
		5.0	79.1
	奶粉	4.0	75.0
		8.0	85.3
		16.0	88.4
		40.0	77.0