

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0197—2014  
代替 SN 0197—1993

### 出口动物源性食品中喹乙醇代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Method for determination of olaquinox metabolites residues in foodstuff  
of animal origin for export—LC-MS/MS

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施



中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN 0197—1993《出口肉中喹乙醇残留量检验方法》。

本标准与 SN 0197—1993 相比,主要技术变化如下:

- 修改了标准的中文名称,标准中文名称改为《出口动物源性食品中喹乙醇代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》;
- 检测仪器由原来的高效液相色谱仪改为液相色谱-质谱/质谱仪;
- 标准适应范围由鸡肉扩展了动物源性食品猪肉、猪肝、鳗鱼、虾、牛肉;
- 检测对象由喹乙醇改为其标识代谢物 3-甲基喹啉-2-羧酸;
- 修改了部分样品前处理操作步骤和仪器测定条件;
- 略去了抽样步骤。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李立、刘正才、杨方、林永辉、王丹红、钱疆、薛芝敏。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN 0197—1993。

# 出口动物源性食品中喹乙醇代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

## 1 范围

本标准规定了出口动物源性食品中喹乙醇代谢物残留量的测定。

本标准适用于猪肉、牛肉、鸡肉、鱼、虾、猪肝等动物源性食品中喹乙醇代谢物 3-甲基喹啉-2-羧酸 (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 方法提要

样品中的 3-甲基喹啉-2-羧酸用蛋白酶水解,盐酸酸化,正己烷脱脂,离心过滤后,水相溶液用混合型阴离子交换固相萃取柱净化,液相色谱-质谱/质谱仪测定,内标法定量。

## 4 试剂和材料

除特殊注明外,所有试剂均为分析纯,水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 乙腈:色谱纯。
- 4.2 甲醇:色谱纯。
- 4.3 甲酸:色谱纯。
- 4.4 乙酸乙酯。
- 4.5 正己烷。
- 4.6 浓盐酸。
- 4.7 氨水(浓度 25%~28%)。
- 4.8 乙酸。
- 4.9 乙酸钠。
- 4.10 甲酸乙酸乙酯溶液:2%。400 mL 乙酸乙酯中加入 10 mL 甲酸,再加乙酸乙酯稀释至 500 mL。
- 4.11 甲酸溶液:0.1%。800 mL 水中加入 1.0 mL 甲酸,再加水稀释至 1 L。
- 4.12 甲酸溶液:0.2%。800 mL 水中加入 2.0 mL 甲酸,再加水稀释至 1 L。
- 4.13 盐酸溶液:0.1 mol/L。移取 8.3 mL 浓盐酸,用水溶解,定容至 1 L。
- 4.14 盐酸溶液:0.3 mol/L。移取 25 mL 浓盐酸,用水溶解,定容至 1 L。
- 4.15 Protease 蛋白酶;Sigma P5147 或相当,-18 °C 以下保存。
- 4.16 蛋白酶水溶液:0.01 g/mL。称取 1.00 g Protease 蛋白酶(4.15),用水溶解,定容至 100 mL,4 °C 保存。

- 4.17 乙酸钠溶液:50 mmol/L。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 至 7.0,用水定容至 1 L。
- 4.18 乙酸钠甲醇溶液(体积比 19 : 1)。用 190 mL 乙酸钠溶液(4.17)与 10 mL 甲醇混合。
- 4.19 1 mmol/L 氨水-甲醇(体积比 4 : 1)溶液。用 400 mL 1 mmol/L 氨水与 100 mL 甲醇混合。
- 4.20 Tris 碱:Sigma T 1503 或相当。
- 4.21 蛋白复合体消化溶液(0.2 mol/L Tris 缓冲盐溶液含 0.1 mol/L 的氯化钙,pH 9.6±0.2):在 800 mL 蒸馏水中溶解 24.2 g Tris 碱和 11.1 g 氯化钙,用盐酸(4.13)调至 pH 值至 9.6±0.2,用蒸馏水定容至 1 L,于室温保存。
- 4.22 混合型阴离子交换固相萃取柱:60 mg,3 mL,或相当。使用前需依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水预洗,保持柱体湿润。
- 4.23 标准品:3-甲基喹啉啉-2-羧酸(3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid, MQCA, CAS 编号:74003-63-7),氘代 3-甲基喹啉啉-2-羧酸甲酯(MQCA-D<sub>7</sub>),纯度大于或等于 99%。
- 4.24 标准储备溶液:分别准确称取适量标准品(精确至 0.1 mg),用甲醇溶解,配制成浓度约为 100 mg/L 的标准储备溶液,于-18℃保存,可使用 1 年。
- 4.25 标准工作溶液:根据需要逐级稀释标准储备溶液(4.24),配制成适合浓度的混合标准工作溶液,现用现配。
- 4.26 内标储备液:分别准确称取适量内标标准品(精确至 0.1 mg),用甲醇溶解,配制成浓度约为 100 mg/L 的标准储备溶液,于-18℃保存,可使用 1 年。
- 4.27 内标工作液:根据需要逐级稀释内标标准储备溶液(4.26),配制成浓度为 0.1 mg/L 的内标工作溶液,现用现配。
- 4.28 基质提取液:空白样品,除不加内标外,其他操作同(7.1)及(7.2)处理后得到的溶液。
- 4.29 基质标准工作液:分别吸取 0、25 μL、50 μL、100 μL、200 μL、500 μL 标准工作液(4.25),加入 100 μL 内标工作液,用样品空白提取液定容至 1.0 mL,配成 0、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL 浓度系列基质标准工作溶液。
- 4.30 玻璃纤维滤纸:直径为 110 mm。
- 4.31 滤膜:有机相,0.22 μm。

## 5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-质谱/质谱仪:配有电喷雾离子源。
- 5.2 分析天平:感度分别为 0.001 g 和 0.1 mg。
- 5.3 均质器:转速大于 10 000 r/min。
- 5.4 振荡器。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 pH 计:测量±0.02 pH 单位。
- 5.7 低温离心机:可制冷到 4℃(最大转速高于 10 000 r/min)。
- 5.8 氮气浓缩仪。
- 5.9 台式空气恒温摇床。
- 5.10 固相萃取装置。
- 5.11 移液器:10 μL~100 μL 和 100 μL~1 000 μL。
- 5.12 聚丙烯离心管:50 mL,具塞。
- 5.13 玻璃离心管:10 mL。

## 6 试样的制备与保存

### 6.1 制样要求

制样操作过程中应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

### 6.2 样品制备

从所取全部样品中取出有代表性样品约 500 g,用组织捣碎机充分捣碎均匀,均分成 2 份,分别装入洁净容器中,密封,并标明标记,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

## 7 测定步骤

### 7.1 酶解

称取 5 g 组织样品(精确至 0.01 g)。置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 8 mL 蛋白复合体消化溶液(4.21),混匀,再加入 0.3 mL 0.01 g/mL 蛋白酶溶液(4.16),充分混匀后,置于 $(47\pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 空气浴摇床中酶解 16 h~18 h。

### 7.2 净化

酶解后的样品溶液置室温中冷至常温,再加入 $2\times 10\text{ mL}$  0.3 mol/L 盐酸(4.14),振荡混匀,以 15 000 r/min 离心 5 min,将上清液过滤;加入 10 mL 正己烷,振荡混匀,5 000 r/min 离心 10 min,弃去正己烷,下层液过滤后全部移入混合型阴离子交换固相萃取柱中,待样液全部流出后,用 10 mL 乙酸铵甲醇溶液(4.18)淋洗离心管后过固相萃取柱,待溶液全部流出后,真空抽干 5 min。固相萃取柱依次用 $2\times 3\text{ mL}$  水、 $2\times 3\text{ mL}$  1 mmol/L 氨水-甲醇(体积比 4:1)溶液和 $2\times 3\text{ mL}$  甲醇淋洗,然后真空抽干 5 min,最后用 3 mL 2%甲酸乙酸乙酯溶液(4.10)洗脱 MQCA 至玻璃管中,加入 100  $\mu\text{L}$  内标工作液(4.27),在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 用氮气浓缩仪吹干。准确加入 1.0 mL 0.1%甲酸(4.11)-乙腈(体积比 9:1)溶液溶解残渣,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,供液相色谱—串联质谱仪测定。

### 7.3 测定

#### 7.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: $\text{C}_{18}$ 柱,2.6  $\mu\text{m}$ , $100\times 3.0\text{ mm}$ (内径),或相当;
- 流动相:甲醇、乙腈以及 0.2%甲酸溶液,梯度洗脱条件见表 1;

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	0.2%甲酸/%	甲醇/%	乙腈/%
0	90	5	5
0.2	90	5	5
4	10	30	60
7	5	70	25
8	90	5	5
12	90	5	5

- c) 流速:0.3 mL/min;
- d) 柱温:35 ℃;
- e) 进样量:10 μL。

### 7.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子化模式:电喷雾电离正离子模式(ESI<sup>+</sup>);
- b) 质谱扫描方式:多反应监测(MRM);
- c) 分辨率:单位分辨率;
- d) 其他参考质谱条件:参见附录 A。

### 7.3.3 定量测定

在仪器最佳状态下,根据样液中残留药物的含量,选定浓度相近的标准工作溶液,对标准工作溶液和样液等体积参插进样测定。试样中药物的响应值应在仪器检测的线性范围内,若其响应值超过线性范围,可调整定容体积使之满足测定要求。在上述仪器条件下,MQCA 的保留时间以及标准总离子流图参见附录 B。

### 7.3.4 定性测定

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,与基质标准溶液的保留时间偏差在±2.5%之内;且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的基质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,偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

## 7.4 空白试验

除不称取试样外,按照上述步骤进行测定。

## 7.5 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液,按步骤 7.1~7.3 操作,测定后计算样品添加的回收率。

## 8 结果计算和表达

试样中待测物残留量利用数据处理系统计算或按式(1)计算,计算结果应扣除空白值:

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

式中:

- X —— 试样中被测物残留量,单位为微克每千克(μg/kg);
- c<sub>s</sub> —— 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)；

$c_{si}$  —— 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)；

$A_{si}$  —— 基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积；

$A_i$  —— 样液中内标物的峰面积；

$V$  —— 样液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

$m$  —— 样液相当的试样质量，单位为克(g)。

计算结果需扣除空白值。

## 9 测定低限和回收率

### 9.1 测定低限

猪肉、猪肝、鸡肉、牛肉、鱼肉、虾的测定低限为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 9.2 回收率与精密度

MQCA 的回收率范围见表 3。

表 3 动物源性食品中 MQCA 的添加回收率和精密度

基体	添加水平/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率范围/%	相对标准偏差/%
猪肉	0.5	71.8~97.2	10.8
	1.0	73.3~94.7	9.2
	4.0	73.2~97.0	8.8
	10.0	75.7~103.0	8.1
	300	78.0~101.0	8.4
牛肉	0.5	73.8~103.2	11.8
	1.0	73.6~99.1	11.6
	4.0	75.2~98.2	8.0
	10.0	74.7~103.0	8.1
	300	78.3~95.3	6.3
鸡肉	0.5	69.4~96.4	8.6
	1.0	76.9~89.4	4.6
	4.0	85.5~105.2	6.9
	10.0	83.5~107.0	9.1
	300	71.0~100.3	10.1
鳗鱼	0.5	76.0~95.6	8.6
	1.0	78.5~105.0	7.8
	4.0	71.0~94.5	8.1
	10.0	73.7~106.0	11.8
	300	78.7~96.0	7.1

表 3 (续)

基体	添加水平/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率范围/%	相对标准偏差/%
虾	0.5	73.4~91.4	7.4
	1.0	70.5~95.7	10.3
	4.0	74.0~98.5	10.2
	10.0	75.3~97.2	8.8
	300	70.7~97.7	10.0
猪肝	0.5	72.4~99.4	12.5
	1.0	70.5~98.5	12.4
	4.0	71.0~91.2	9.8
	10.0	70.7~97.5	12.5
	50.0	74.6~97.4	9.3



附 录 A<sup>1)</sup>  
(资料性附录)  
参考质谱条件

### A.1 质谱条件

- a) 气帘气压力(CUR):172 kPa(25.00 psi)(氮气);
- b) 电喷雾电压(IS):4 500 V;
- c) 离子源温度(TEM):550 °C;
- d) 雾化气压力 379 kPa(55 psi)(氮气);
- e) 辅助气压力 379 kPa(55 psi)(氮气);
- f) 其他质谱参数见表 A.1。

表 A.1 主要参考质谱参数

化合物	母离子/ <i>m/z</i>	子离子/ <i>m/z</i>	驻留时间/ ms	DP	EP	CE/eV	CXP
MQCA	189.1	145.0*	100	54	10	22	10
	189.1	143.0	100	54	10	24	10
	189.1	102.1	100	54	10	30	10
MQCA_D7	196.1	133.1	100	60	10	30	10
注:带*的离子为定量离子;对于不同质谱仪器,仪器参数可能存在差异,测定前应将质谱参数优化到最佳。							

1) 非商业性声明:附录 A 所列参考质谱条件是在 API4000 Qtrap 型液质联用仪上完成的,此处列出试验用仪器型号仅为提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同厂家或型号的仪器。

附录 B  
(资料性附录)  
标准品的多反应监测(MRM)色谱图

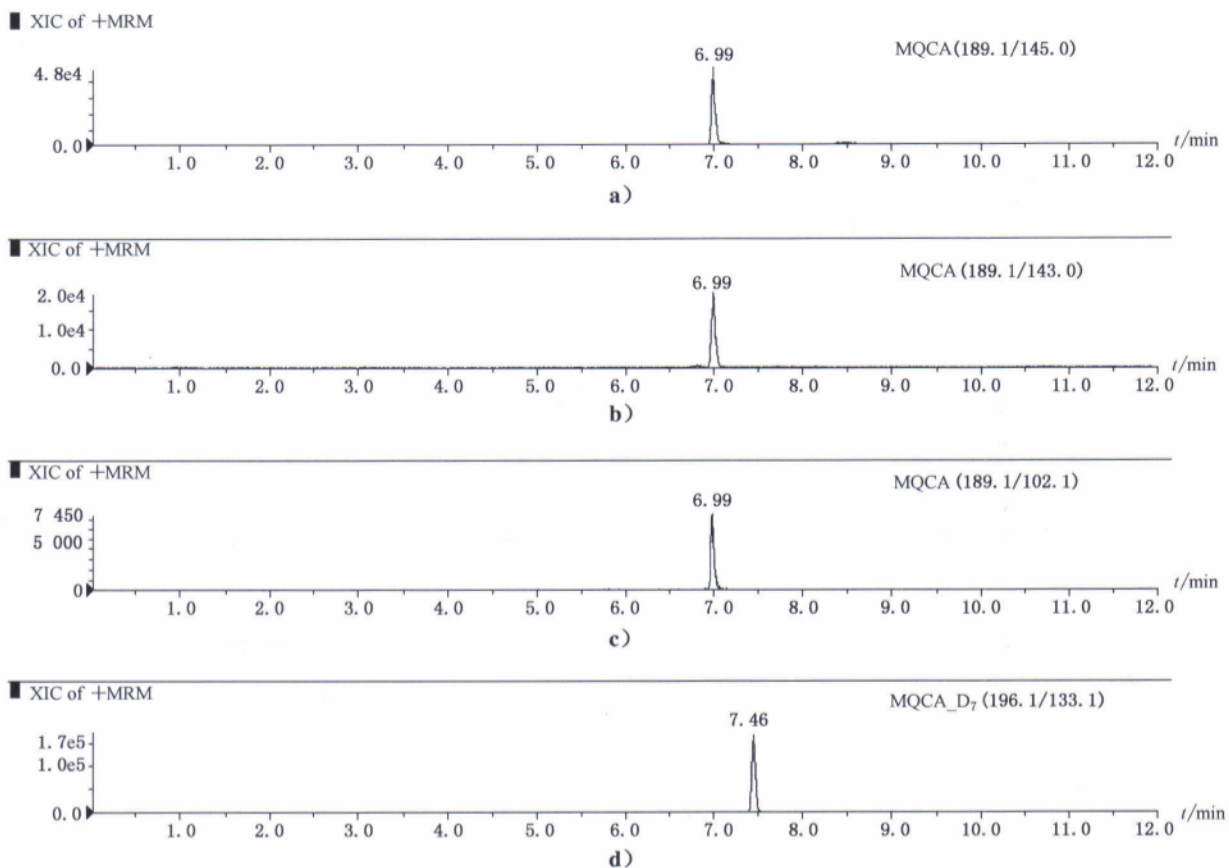


图 B.1 MQCA 标准品(10 μg/L,进样 10 μL)的多反应监测(MRM)色谱图

