

中华人民共和国国家标准

GB/T 20746—2006

牛、猪肝脏和肌肉中卡巴氧、喹乙醇 及代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Method for the determination of the residues of carbadox, olaquinox and related metabolites in bovine and porcine liver and muscle tissues—
LC-MS-MS method

2006-12-31 发布

2007-03-01 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 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

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：庞国芳、谢丽琪、欧阳姗、蓝芳、林黎、涂小珂。

本标准系首次发布的国家标准。

牛、猪肝脏和肌肉中卡巴氧、喹乙醇 及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、猪肝脏和肌肉中卡巴氧及其代谢物脱氧卡巴氧、喹噁啉-2-羧酸和喹乙醇代谢物3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛、猪肝脏和肌肉中卡巴氧及其代谢物脱氧卡巴氧、喹噁啉-2-羧酸和喹乙醇代谢物3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留量的测定。

本标准的方法检出限：卡巴氧、脱氧卡巴氧、喹噁啉-2-羧酸和3-甲基喹噁啉-2-羧酸均为0.5 μg/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—1992, neq ISO 3696:1987）

3 原理

用乙腈+乙酸乙酯（1+1）溶液提取肌肉和肝脏组织中的卡巴氧，提取液经正己烷脱脂后，旋转蒸发至干，残渣用甲酸（0.1%）+甲醇（19+1）溶液溶解。样液供液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

用甲酸溶液消化试样，使组织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，过Oasis MAX固相萃取柱或相当者净化。先用二氯甲烷洗脱脱氧卡巴氧，再用2%甲酸乙酸乙酯溶液洗脱喹噁啉-2-羧酸和3-甲基喹噁啉-2-羧酸，氮气吹干洗脱液，残渣用甲酸+甲醇（19+1）溶液溶解，样液供液相色谱-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 乙腈：色谱纯。
- 4.3 甲酸：色谱纯。
- 4.4 正己烷。
- 4.5 乙酸。
- 4.6 浓盐酸。
- 4.7 乙酸钠。

- 4.8 二甲基甲酰胺。
- 4.9 乙酸乙酯。
- 4.10 中性氧化铝:200目~300目。
- 4.11 乙腈+乙酸乙酯溶液(1+1)。
- 4.12 甲酸乙酸乙酯溶液:2%。向400 mL乙酸乙酯中加入10 mL甲酸,用乙酸乙酯定容至500 mL。
- 4.13 甲酸溶液:0.6%。量取6.0 mL甲酸,用水溶解、定容至1 L。
- 4.14 甲酸溶液:0.1%。量取1.0 mL甲酸,用水溶解、定容至1 L。
- 4.15 甲酸+甲醇溶液(19+1)。用190 mL甲酸溶液(4.14)与10 mL甲醇(4.1)混合。
- 4.16 盐酸溶液:0.1 mol/L。量取8.3 mL浓盐酸,用水溶解、定容至1 L。
- 4.17 盐酸溶液:0.3 mol/L。量取25 mL浓盐酸,用水溶解、定容至1 L。
- 4.18 Protease 蛋白酶:Sigma P5147 或相当者, -18℃以下保存。
- 4.19 蛋白酶水溶液:0.01 g/mL。称取1.00 g Protease 蛋白酶(4.18),用水溶解、定容至100 mL,4℃保存。
- 4.20 乙酸溶液:10%。量取100 mL甲酸,用水溶解、定容至1 L。
- 4.21 乙酸钠溶液:0.05 mol/L, pH=7。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。
- 4.22 乙酸钠+甲醇溶液(19+1)。用190 mL乙酸钠溶液(4.21)与10 mL甲醇(4.1)混合。
- 4.23 甲醇+水溶液(1+4)。
- 4.24 Tris 碱:Sigma T1503 或相当者。
- 4.25 Tris 溶液:1.0 mol/L。称取121 g Tris 碱,用水溶解、定容至1 L,4℃保存。
- 4.26 卡巴氧、脱氧卡巴氧、喹唞啉-2-羧酸、3-甲基喹唞啉-2-羧酸、喹唞啉-2-羧酸-d4 标准物质:纯度≥99%。
- 4.27 标准储备溶液:100 mg/L。准确称取适量标准物质,卡巴氧用二甲基甲酰胺溶解定容,其余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℃保存,可使用1年。
- 4.28 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)的基质混合标准工作溶液,在4℃保存,可使用1周。
- 4.29 内标工作溶液:准确称取适量内标标准物质,用甲醇溶解定容,配成100 μg/L的标准工作溶液,在4℃保存,可使用1周。
- 4.30 阴离子交换柱:Oasis MAX 60 mg,3 mL,或相当者。用前分别用3 mL甲醇和3 mL水活化,保持柱体湿润。
- 4.31 滤膜:0.2 μm。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。
- 5.2 固相萃取装置。
- 5.3 氮气浓缩仪。
- 5.4 液体混匀器。
- 5.5 分析天平:感量0.1 mg和0.01 g。
- 5.6 真空泵。
- 5.7 均质器。
- 5.8 移液器:10 μL~100 μL和100 μL~1 000 μL。

- 5.9 聚丙烯离心管:50 mL,具塞。
 5.10 pH计:测量精度 ± 0.02 pH单位。
 5.11 低温离心机:可制冷到 4°C 。
 5.12 玻璃离心管:15 mL。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

将牛、猪肝脏和肌肉组织样品充分搅碎,均质,分出0.5 kg作为试样,置于清洁样品容器中,密封,并做上标记。

6.2 试样的保存

将制备好的试样于 -18°C 以下保存。

7 测定步骤

7.1 卡巴氧的前处理步骤

- 7.1.1 称取5 g试样,精确至0.01 g。置于50 mL聚丙烯离心管中,加入5 g中性氧化铝(4.10)。
 7.1.2 加入25 mL乙腈+乙酸乙酯溶液(4.11),于液体混匀器上充分混合5 min,以5 000 r/min离心5 min,将上清液移取至另一干净的50 mL离心管,加入10 mL正己烷(4.4)到管内,振荡2 min,以5 000 r/min离心5 min,弃去上层正己烷,将下层清液转移至150 mL鸡心瓶中。
 7.1.3 重复7.1.2步骤一次,合并两次提取液于同一鸡心瓶中,加入一定量的喹噁啉-2-羧酸-d₄标准溶液(4.29),使其浓度为2.0 ng/g, 40°C 水浴,减压旋转蒸发至干。
 7.1.4 准确加入1.0 mL甲酸-甲醇溶液(4.15)溶解残渣,过 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜后,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.2 脱氧卡巴氧、喹噁啉-2-羧酸、3-甲基喹噁啉-2-羧酸的前处理步骤

- 7.2.1 称取5 g试样,精确至0.01 g。置于50 mL聚丙烯离心管中,加入10 mL 0.6%甲酸溶液(4.13),混匀后,置于 $(47\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 振荡水浴中振摇1 h;先加入3 mL 1.0 mol/L Tris溶液(4.25)混匀,再加入0.3 mL蛋白酶水溶液(4.19),充分混匀后,置于 $(47\pm 3)^{\circ}\text{C}$ 振荡水浴中酶解16 h~18 h。加入20 mL 0.3 mol/L盐酸溶液(4.17),振荡5 min,在 10°C 以5 000 r/min离心15 min,上清液过滤。
 7.2.2 将滤液(7.2.1)移入Oasis MAX固相萃取柱(4.30)中,待样液全部流出后,用30 mL乙酸钠-甲醇溶液(4.22)淋洗固相萃取柱,真空抽干15 min。
 7.2.3 在一支干净的玻璃管内加入一定量的喹噁啉-2-羧酸-d₄标准溶液(4.29),使其浓度为2.0 ng/g,再用 $4\times 3\ \text{mL}$ 二氯甲烷将脱氧卡巴氧洗脱至管内,在 45°C 用氮气浓缩仪吹干。
 7.2.4 固相萃取柱再用 $3\times 3\ \text{mL}$ 甲醇、3 mL水、 $3\times 3\ \text{mL}$ 0.1 mol/L盐酸溶液(4.16)和 $2\times 3\ \text{mL}$ 甲醇-水溶液(4.23)分别淋洗,真空抽干15 min,然后用2 mL乙酸乙酯再淋洗固相萃取柱,弃去全部淋出液,最后用3 mL甲酸乙酸乙酯溶液(4.12)洗脱喹噁啉-2-羧酸和3-甲基喹噁啉-2-羧酸到7.2.3所用试管中,在 45°C 用氮气浓缩仪吹干。准确加入1.0 mL 0.1%甲酸-甲醇溶液(4.15)溶解残渣,过 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

7.3 色谱测定

7.3.1 液相色谱条件

- 色谱柱:Inertsil ODS-3, $3\ \mu\text{m}$, $100\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}$ (内径)或相当者;
- 流动相:甲醇、乙腈以及0.1%甲酸溶液,梯度洗脱条件见表1;
- 流速: $0.2\ \text{mL}/\text{min}$;

- d) 柱温:30℃;
- e) 进样量:30 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	甲醇/(%)	乙腈/(%)	0.1%甲酸/(%)
0	13	7	80
10.0	45	15	40
10.1	64	16	20
13.1	13	7	80
20.0	13	7	80

7.3.2 质谱条件

- 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) 分辨率:单位分辨率;
- 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
卡巴氧	263.2/90.1	263.2/231.1	179.2/133.2	31	120	49	8
	263.2/231.1			31	120	19	18
喹咪啉-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
脱氧卡巴氧	231.2/143.2	231.2/143.2	179.2/133.2	26	140	49	8
	231.2/99.2			31	150	31	10
3-甲基喹咪啉-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 液相色谱-串联质谱测定

7.4.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同试验条件下,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 各分析化合物参考保留时间

化合物名称	卡巴氧	喹噁啉-2-羧酸	脱氧卡巴氧	3-甲基喹噁啉-2-羧酸
保留时间/min	9.11	9.95	14.43	10.97

表 4 定性确证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
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.2 定量测定

用混合标准工作溶液(4.28)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,样品溶液中卡巴氧、脱氧卡巴氧、喹噁啉-2-羧酸、3-甲基喹噁啉-2-羧酸的响应值均应在仪器测定的线性范围内。卡巴氧、脱氧卡巴氧、喹噁啉-2-羧酸、3-甲基喹噁啉-2-羧酸的标准总离子流图见图 A.1。

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 7.1~7.4 操作,测定后计算样品添加的回收率。

8 结果计算

试样中每种化合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:

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

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_{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 ——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)。

注:计算结果应扣除空白值。

9 精密度

本标准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。

9.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,组织中四种分析化合物的含量范围及重复性方程见表 5。

表 5 含量范围及重复性和再现性方程

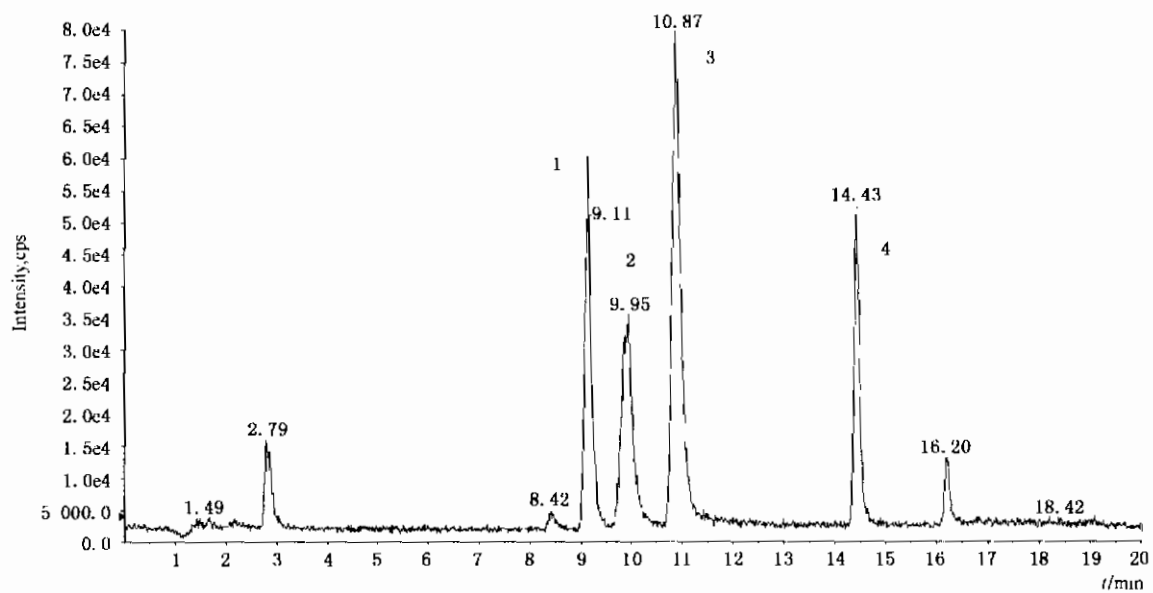
化合物名称	含量范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	基质	重复性限 r	再现性限 R
卡巴氧	0.5~5.0	猪肉	$\lg r=0.844\ 0\ \lg m-1.022\ 1$	$\lg R=0.788\ 9\ \lg m-0.8393$
		猪肝	$\lg r=0.833\ 8\ \lg m-0.883\ 6$	$\lg R=0.794\ 1\ \lg m-0.814$
脱氧卡巴氧	0.5~5.0	猪肉	$\lg r=0.914\ 6\ \lg m-0.999\ 4$	$\lg R=0.978\ 1\ \lg m-0.786\ 6$
		猪肝	$\lg r=0.783\ 1\ \lg m-0.967\ 7$	$\lg R=0.741\ 2\ \lg m-0.781\ 2$
喹噁啉-2-羧酸	0.5~5.0	猪肉	$\lg r=0.829\ 8\ \lg m-0.964\ 4$	$\lg R=0.940\ 5\ \lg m-0.826\ 3$
		猪肝	$\lg r=0.884\ 9\ \lg m-0.913$	$\lg R=0.793\ 5\ \lg m-0.778\ 2$
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	0.5~5.0	猪肉	$\lg r=0.971\ 5\ \lg m-0.976$	$\lg R=0.776\ 0\ \lg m-0.721\ 2$
		猪肝	$\lg r=0.834\ 6\ \lg m-0.919\ 8$	$\lg R=0.755\ 5\ \lg m-0.723\ 8$
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。

9.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,组织中四种分析化合物的含量范围及再现性方程见表 5。

附录 A
(资料性附录)
标准物质总离子流图



- 1— 卡巴氧, 9.11 min;
2— 喹咪啉-2-羧酸, 9.95 min;
3— 3-甲基喹咪啉-2-羧酸, 10.97 min;
4— 脱氧卡巴氧, 14.43。

图 A.1 标准样品总离子流图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中卡巴氧、脱氧卡巴氧、喹噁啉-2-羧酸、3-甲基喹噁啉-2-羧酸在四种基质中的添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 四种目标化合物添加浓度及其平均回收率的试验数据

药物名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)			
		猪肉	猪肝	牛肉	牛肝
卡巴氧	0.5	79.8	80.2	81.4	84.8
	1.0	89.1	90.1	89.7	89.0
	2.0	89.6	91.1	92.0	92.3
	5.0	87.2	89.2	85.8	86.8
脱氧卡巴氧	0.5	83.0	82.2	81.8	78.8
	1.0	87.3	87.0	92.1	91.6
	2.0	96.7	89.1	94.9	96.6
	5.0	84.6	83.1	83.0	85.0
喹噁啉-2-羧酸	0.5	81.8	80.0	80.8	80.2
	1.0	87.5	88.0	86.7	84.9
	2.0	92.9	94.9	92.7	94.9
	5.0	85.4	84.2	86.0	82.8
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	0.5	76.2	77.6	78.0	76.2
	1.0	86.4	84.8	83.2	85.2
	2.0	94.6	96.2	93.9	92.8
	5.0	82.2	82.8	81.4	84.8