



中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 动物性食品中卡拉洛尔残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-
Determination of Carazolol residue in animal derived food
by liquid chromatography- tandem mass spectrometric method

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 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
国家市场监督管理总局

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：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

征求意见稿

食品安全国家标准

动物性食品中卡拉洛尔残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了动物性食品中卡拉洛尔残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。
本文件适用于猪、鸡和牛的肌肉、肝脏、肾脏、脂肪及鸡蛋、牛奶中卡拉洛尔残留量的检测。

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。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的卡拉洛尔用0.1%甲酸乙腈溶液提取，混合型阳离子交换柱净化，液相色谱-串联质谱正离子模式测定，内标法定量。

5 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。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.4 氨水（NH₄OH）。

5.1.5 正己烷（C₆H₁₄）。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1%甲酸乙腈溶液：取甲酸1 mL，用乙腈稀释至1000 mL，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸溶液：取1 mL甲酸，用水稀释至1000 mL，混匀。

5.2.3 50%乙腈溶液：取50 mL乙腈，用水稀释至100 mL，混匀。

5.2.4 5%氨化甲醇溶液：取5 mL氨水，用甲醇稀释至100 mL，混匀。

5.2.5 乙腈饱和正己烷：取一定量正己烷，加入过量的乙腈，混合，静止分层，取上层正己烷。

5.3 标准品

5.3.1 卡拉洛尔（Carazolol，C₁₈H₂₂N₂O₂，CAS:57775-29-8），含量≥99.0%。

5.3.2 卡拉洛尔-D₇（Carazolol-D₇，C₁₈H₁₅D₇N₂O₂，CAS:1173021-02-7），含量≥99.0%。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 卡拉洛尔标准储备液：取卡拉洛尔标准品（相当于活性成分 10 mg），精密称定，加乙腈适量使溶解并稀释定容至 10 mL，配制成浓度为 1 mg/mL 的卡拉洛尔标准储备液。-18℃以下避光保存，有效期为 3 个月。

5.4.2 卡拉洛尔标准工作液：准确量取卡拉洛尔标准储备液 0.1 mL，于 10 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 10 μg/mL 的标准工作液。4℃以下避光保存，有效期为 1 个月。

5.4.3 卡拉洛尔-D₇内标储备液：取卡拉洛尔-D₇标准品（相当于活性成分约10 mg），精密称定，加乙腈适量使溶解并稀释定容至10 mL，配制成浓度为1 mg/mL的卡拉洛尔-D₇内标储备液。-18℃以下避光保存，有效期为3个月。

5.4.4 卡拉洛尔-D₇内标中间液：准确量取卡拉洛尔-D₇内标储备液 0.1 mL，于 10 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成卡拉洛尔-D₇浓度为 10 μg/mL 的内标中间液。4℃以下避光保存，有效期为 1 个月。

5.4.5 卡拉洛尔-D₇内标工作液：准确量取卡拉洛尔-D₇内标中间液 0.1 mL，于 10 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成卡拉洛尔-D₇浓度为 100 ng/mL 的内标工作液。临用现配。

5.5 材料

5.5.1 混合型阳离子交换固相萃取柱：60 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 有机微孔尼龙滤膜：0.22 μm。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量0.01 g和 0.000 01 g。

6.3 组织匀浆器。

6.4 涡旋混合器。

6.5 涡旋震荡器。

6.6 高速冷冻离心机：转速可达10 000 r/min。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

取适量新鲜或解冻的空白或供试奶样品，混合均匀。

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳后混合均匀。

a) 取匀浆后的供试样品，作为供试试样。

b) 取匀浆后的空白样品，作为空白试样。

c) 取匀浆后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

肝脏、肾脏、脂肪、鸡蛋、牛奶：准确称取试料（2±0.05）g，于 50 mL 离心管中，加卡拉洛尔-D₇内标工作液 100 μL，准确加入 0.1% 甲酸乙腈溶液 10.0 mL，涡旋 10 s，振荡 10 min，10000 r/min 离心 5 min，移取上清液，用水稀释至 25 mL，混匀备用。

肌肉：准确移取试料（ 2 ± 0.05 ）g于50 mL离心管中，加卡拉洛尔- D_7 内标工作液100 μ L，准确加入1.0 mL 0.1%甲酸溶液，涡旋混匀，再加入9.0 mL 0.1%甲酸乙腈溶液，涡旋10 s，振荡10 min，10000 r/min离心5 min，移取上清液，用水稀释至25 mL，混匀备用。

8.2 净化

固相萃取小柱经3 mL 甲醇、3 mL 水活化，准确移取5 mL 备用液过柱，3 mL 水淋洗，抽干30 s，3 mL 5% 氨化甲醇溶液洗脱，收集洗脱液，于40℃水浴氮气吹干，准确移取1.0 mL 50%乙腈溶液复溶，加入2 mL 乙腈饱和正己烷，涡旋10 s后静置10 min，取下层溶液，过滤膜上机测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取卡拉洛尔标准工作液和卡拉洛尔- D_7 内标工作液适量，用50%乙腈溶液稀释成卡拉洛尔浓度为0.5 μ g/L、1 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、50 μ g/L（鸡蛋和牛奶为0.1 μ g/L、0.5 μ g/L、1 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L），卡拉洛尔- D_7 内标浓度均为2 μ g/L的系列标准工作溶液，现配现用，供液相色谱-串联质谱仪测定。以卡拉洛尔和卡拉洛尔- D_7 的特征离子质量色谱峰面积比为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C18柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒径1.7 μ m，或相当者；
- 柱温：35℃；
- 进样量：2 μ L；
- 流速：0.4 mL/min；
- 流动相：A：0.1%甲酸溶液；B：0.1%甲酸溶液乙腈溶液，流动相梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间, min	A, %	B, %	曲线
0	90	10	/
1	90	10	6
3	20	80	6
5	20	80	6
6	90	10	6
7	90	10	6

8.4.2 串联质谱参考条件

- 离子源：电喷雾（ESI）离子源；
- 扫描方式：正离子扫描；
- 检测方式：多反应监测；
- 电离电压：0.5 kV；
- 源温：150℃；
- 脱溶剂气温度：500℃；
- 锥孔气流速：150 L/h；
- 脱溶剂气流速：1000 L/h
- 定性离子对、定量离子对及锥孔电压和碰撞能量见表2。

表 2 卡拉洛尔和卡拉洛尔-D₇ 特征离子参考质谱条件

化合物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
卡拉洛尔	299.1>116.0	299.1>116.0	34	18
	299.1>222.0			18
卡拉洛尔-D ₇	306.1>123.0	306.1>123.0	34	18

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液中卡拉洛尔与其同位素内标（卡拉洛尔-D₇）的保留时间之比与标准溶液中卡拉洛尔与其同位素内标（卡拉洛尔-D₇）的保留时间之比偏差在1%以内；且检测到的相对离子丰度，应当与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液，作单点或多点校准，按内标法定量，试样溶液及标准溶液中卡拉洛尔与卡拉洛尔-D₇的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。对于试样中卡拉洛尔残留量超过仪器测定线性范围的，在提取时根据药物浓度相应增加内标工作液的添加量，使试样溶液稀释后卡拉洛尔的响应在仪器线性范围内，对应卡拉洛尔-D₇浓度与标准曲线制备中的卡拉洛尔-D₇浓度一致。在上述色谱-质谱条件下，卡拉洛尔-D₇及卡拉洛尔标准溶液的特征离子质量色谱图见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加标准溶液外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中测药物的残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho_s \times A \times A_{is} \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times A_i \times V_2 \times m \times 1000} \dots \dots (1)$$

式中：

ω —试样中待测药物残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

ρ_s —标准溶液中待测药物浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

A —试样溶液中待测药物的峰面积；

A_{is} —标准溶液中内标的峰面积；

A_s —标准溶液中待测药物的峰面积；

A_i —试样溶液中内标的峰面积；

V_1 —试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；

V_2 —吸取出用于净化的提取溶液体积值，单位为毫升（mL）；

V_3 —最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m —试样的质量，单位为克（g）。

注：计算结果不小于1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的保留3位有效数字，1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下保留至小数点后2位。

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的鸡蛋和牛奶检出限为 $0.3\ \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $0.5\ \mu\text{g/kg}$ ，猪、鸡和牛的可食性组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）检出限为 $0.5\ \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $1\ \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在鸡蛋和牛奶中 $0.5\ \mu\text{g/kg}$ ~ $5\ \mu\text{g/kg}$ 的添加浓度水平，卡拉洛尔的回收率为70%~120%。

在鸡和牛的可食性组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）中 $1\ \mu\text{g/kg}$ ~ $5\ \mu\text{g/kg}$ 的添加浓度水平，卡拉洛尔的回收率为70%~120%。

在猪可食性组织（肌肉、肝脏、肾脏、脂肪）中 $1\ \mu\text{g/kg}$ ~ $50\ \mu\text{g/kg}$ 的添加浓度水平，卡拉洛尔的回收率为70%~120%。

10.3 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)

特征离子质量色谱图

卡拉洛尔及卡拉洛尔-D₇标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1。

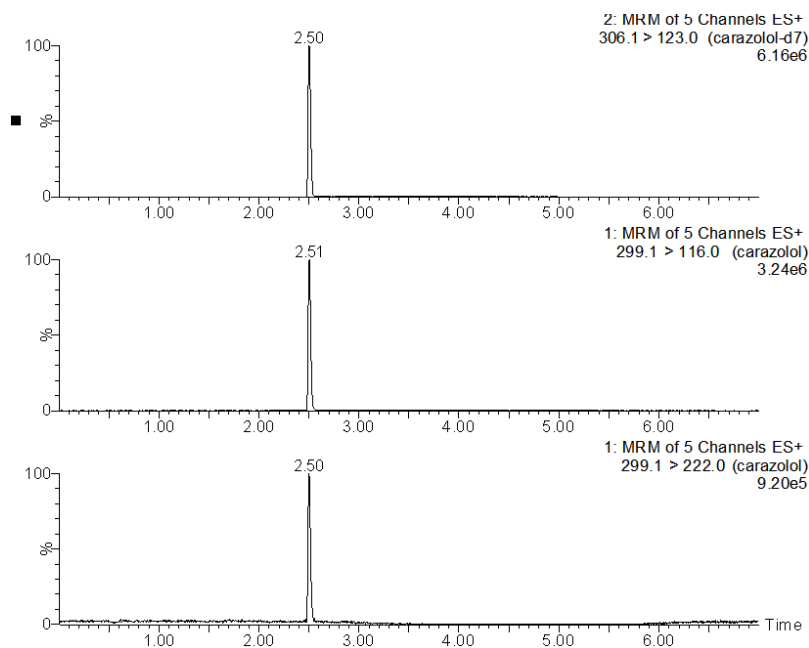


图 A.1 卡拉洛尔及卡拉洛尔-D₇ 标准溶液特征离子质量色谱图 (卡拉洛尔 1 $\mu\text{g/L}$, 卡拉洛尔-D₇ 2 $\mu\text{g/L}$, 从上到下离子对依次为 306.1>123.0、299.1>116.0、299.1>222.0)