



中华人民共和国国家标准

GB 31656.1—2021

食品安全国家标准 水产品中甲苯咪唑及代谢物残留量的测定 高效液相色谱法

National food safety standard—
Determination of mebendazole and its metabolites residue in fishery
products by high performance liquid chromatography

2021-09-16 发布

2022-02-01 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。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

水产品中甲苯咪唑及代谢物残留量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了水产品中甲苯咪唑及其代谢物氨基甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑残留检测的制样和液相色谱测定方法。

本文件适用于鱼、虾和蟹可食组织中甲苯咪唑及其代谢物氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑残留量的检测。

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 分析实验室用水规则和试验方法

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的甲苯咪唑及其代谢物,用乙酸乙酯提取,正己烷除脂,阳离子固相萃取柱净化,高效液相色谱-紫外检测器测定,外标法定量。

5 试剂和材料

以下所用试剂,除另有注明外均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.1.3 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。

5.1.4 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COO CH}_2\text{CH}_3$):色谱纯。

5.1.5 N,N-二甲基甲酰胺($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$):色谱纯。

5.1.6 磷酸(H_3PO_4)。

5.1.7 磷酸二氢铵($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)。

5.1.8 三乙胺 $[(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}]$ 。

5.1.9 甲酸(HCOOH)。

5.1.10 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。

5.2 标准品

甲苯咪唑(mebendazole, $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$, CAS 号:31431-39-7)、羟基甲苯咪唑(5-hydroxymebendazole, $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$, CAS 号:60254-95-7)和氨基甲苯咪唑(amino-mebendazole, $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$, CAS 号:52329-60-9):含量 $\geqslant 98\%$ 。

5.3 溶液配制

5.3.1 80%甲醇溶液:取甲醇 80 mL,加水至 100 mL,混匀。

5.3.2 1%甲酸溶液:取甲酸 1 mL,加水至 100 mL,混匀。

5.3.3 0.05 mol/L 磷酸二氢铵-三乙胺溶液:取磷酸二氢铵 5.8 g,加水溶解并稀释至 1 000 mL,加三乙胺 1 mL,混匀。

5.3.4 0.05 mol/L 磷酸二氢铵缓冲液:取磷酸二氢铵 2.9 g,加水 450 mL 使溶解,用磷酸调 pH 至 2.0,用水稀释至 500 mL。

5.3.5 5%氯化甲醇溶液:取氨水 5 mL、甲醇 95 mL,混匀;临用前配制。

5.3.6 溶解液:取 N,N-二甲基甲酰胺 150 mL,用 0.05 mol/L 磷酸二氢铵缓冲液稀释至 500 mL。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):分别取甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑各 10 mg,精密称定,加甲酸 5 mL 使其溶解,并用甲醇稀释定容至 100 mL 容量瓶,摇匀,配制成浓度各为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。-18 ℃以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准中间液:分别准确量取甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑标准储备液适量,用甲醇稀释配制成含氨基甲苯咪唑 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、羟基甲苯咪唑 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和甲苯咪唑 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液。-18 ℃以下避光保存,有效期 3 个月。

5.5 材料

5.5.1 混合型阳离子固相萃取柱:60 mg/3 mL,或相当者。

5.5.2 水相聚砜醚针式滤器:0.45 μm 。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪,配紫外检测器。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 离心机:6 000 r/min。

6.4 旋转蒸发仪。

6.5 固相萃取装置。

6.6 超声波清洗仪。

6.7 氮吹仪。

6.8 鸡心瓶:100 mL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 中附录 B 的要求制样。

- 取均质后的供试样品,作为供试试样;
- 取均质后的空白样品,作为空白试样;
- 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的混合标准溶液,作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18 ℃以下保存,有效期 3 个月。

8 测定步骤

8.1 提取

取试样 3 g(准确至±0.03 g)于 50 mL 离心管中,加水 2 mL,涡旋 30 s,使其分散;加乙酸乙酯

10 mL, 振荡 2 min, 超声 5 min, 4 500 r/min 离心 10 min, 乙酸乙酯转入 100 mL 鸡心瓶。残渣加乙酸乙酯 10 mL, 按上述方法重复提取 2 次。合并乙酸乙酯至 100 mL 鸡心瓶中, 40 ℃ 旋转蒸发至干。加 80% 甲醇溶液 3 mL, 涡旋混合 1 min, 加正己烷 3 mL, 混合 1 min, 将溶液转入 10 mL 离心管中, 6 000 r/min 离心 5 min, 去除正己烷层; 下层再加正己烷 3 mL, 重复去脂一次。向下层溶液中加 1% 甲酸水溶液 3 mL, 混匀, 6 000 r/min 离心 5 min, 上清液备用。

8.2 净化

固相萃取柱依次用甲醇、水各 3 mL 活化, 将上清液过柱; 依次用水、甲醇各 4 mL 淋洗, 弃去流出液, 抽干。用 5% 氨化甲醇溶液 5 mL 洗脱, 洗脱液接收至 10 mL 离心管中, 40 ℃ 氮气吹干。加溶解液 1.0 mL 溶解残余物, 涡旋混合 1 min, 用水相针式滤器过滤至进样小瓶中, 供高效液相色谱测定。

8.3 标准工作曲线的制备

精密量取混合标准中间液适量,用溶解液稀释配制成甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑浓度分别为 $0.02\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$,氨基甲苯咪唑浓度为 $0.04\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作液,供高效液相色谱测定。分别以甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑的峰面积为纵坐标,相应浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。此标准工作液现用现配。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 或相当者;
 b) 流动相: A 为乙腈, B 为 0.05 mol/L 磷酸二氢铵-三乙胺溶液, 梯度洗脱条件见表 1;

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	乙腈 %	0.05 mol/L 磷酸二氢铵-三乙胺溶液 %
0.0	20	80
18.0	40	60
20.0	40	60
20.1	20	80
25.0	20	80

- c) 流速: 0.9 mL/min;
d) 柱温: 40 °C;
e) 进样量: 30 μL;
f) 检测波长: 289 nm。

8.4.2 测定法

取系列标准工作液和试样溶液,作单点或多点校准,按外标法以色谱峰面积定量。标准溶液和试样液中甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱条件下,标准溶液液相色谱图见附录 A。

8.5 空白试验

取空白试剂，除不加标准溶液外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑的残留量按公式(1)计算。

式中：

X_i ——试样中甲苯咪唑或代谢物残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

- C_i ——从标准工作曲线计算得到的试样溶液中甲苯咪唑或代谢物浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
 V ——溶解残余物体积的数值,单位为毫升(mL);
 f ——稀释倍数;
1 000——换算系数;
 m ——供试试样质量的数值,单位为克(g)。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑检测限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法氨基甲苯咪唑检测限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑在 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 200 \mu\text{g}/\text{kg}$, 氨基甲苯咪唑在 $20 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 400 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加浓度范围内, 回收率为 $70\% \sim 100\%$ 。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$, 批间相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

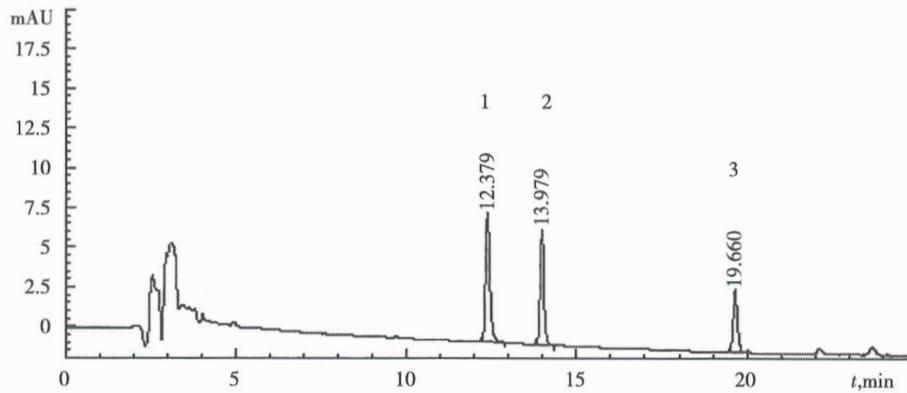


附录 A

(资料性)

甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑液相色谱图

甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑混合标准溶液液相色谱图见图 A. 1。



标引序号说明：

1——氨基甲苯咪唑($1.0 \mu\text{g/mL}$)；

2——羟基甲苯咪唑($0.5 \mu\text{g/mL}$)；

3——甲苯咪唑($0.5 \mu\text{g/mL}$)。

图 A. 1 甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑混合标准溶液液相色谱图

中华人民共和国

国家标准

食品安全国家标准
水产品中甲苯咪唑及代谢物残留量的测定

高效液相色谱法

GB 31656.1—2021

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 8737

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31656.1—2021