



中华人民共和国国家标准

GB 31656.15—2022

食品安全国家标准 水产品中甲苯咪唑及其代谢物残留量 的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard—
Determination of mebendazole and its metabolites residues in aquatic products
by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2022-09-20 发布

2023-02-01 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其代谢物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水产品中甲苯咪唑及其主要代谢物羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鱼、虾和蟹可食组织中甲苯咪唑及其主要代谢物羟基甲苯咪唑和氨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、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑，用乙酸乙酯提取，正己烷除脂，用液相色谱-串联质谱法检测，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 甲酸(HCOOH)：色谱纯。

5.1.2 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOHC}_2\text{H}_5$)：色谱纯。

5.1.3 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。

5.1.4 正己烷(C_6H_{14})：色谱纯。

5.1.5 二甲基亚砜[(CH_3)₂ SO]：色谱纯。

5.2 溶液的配制

5.2.1 50 mmol/L 磷酸氢二钠溶液：取磷酸氢二钠 8.95 g，用水溶解并稀释至 500 mL。

5.2.2 0.1% 甲酸溶液：取 0.5 mL 甲酸，加水溶解并稀释至 500 mL，混匀。

5.2.3 甲醇-0.1% 甲酸溶液(50 : 50, V/V)：取甲醇、0.1% 的甲酸溶液等体积混匀。

5.3 标准品

甲苯咪唑(MBZ)，含量≥99.0%；羟基甲苯咪唑(MBZ-OH)，含量≥99.0%；氨基甲苯咪唑(MBZ-NH₂)，含量≥99.0%；氘代甲苯咪唑(MBZ-D₃)，含量≥99.5%；氘代羟基甲苯咪唑(MBZ-OH-D₃)，含量≥99.0%。具体见附录 A。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):取甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑标准品各10 mg,精密称定,分别用10 mL二甲基亚砜溶解,加甲醇稀释定容至100 mL容量瓶,摇匀。 -18°C 以下保存,有效期3个月。

5.4.2 混合标准工作液:精密量取甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑标准储备液各1 mL,用甲醇-0.1%甲酸溶液稀释配制成浓度为1 000 ng/mL、100 ng/mL、10 ng/mL 3个浓度混合标准工作液。现用现配。

5.4.3 内标标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):取氘代甲苯咪唑和氘代羟基甲苯咪唑标准品各10 mg,精密称定,分别用10 mL二甲基亚砜溶解,用甲醇稀释定容至100 mL容量瓶,摇匀。 -18°C 以下保存,有效期3个月。

5.4.4 混合内标工作液:精密量取氘代甲苯咪唑和氘代羟基甲苯咪唑内标标准储备液各1 mL,用甲醇-0.1%甲酸溶液稀释成含氘代甲苯咪唑和氘代羟基甲苯咪唑浓度分别为50 ng/mL 和10 ng/mL 的混合内标工作液。现用现配。

5.5 材料

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(LC-MS/MS),配电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平:感量0.000 01 g 和0.01 g。

6.3 离心机:8 000 r/min。

6.4 涡旋混合器。

6.5 超声波清洗仪。

6.6 氮吹仪。

6.7 具塞聚丙烯离心管:50 mL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按GB/T 30891—2014附录B的要求制样。

- 取均质后的供试样品,作为供试试料;
- 取均质后的空白样品,作为空白试料;
- 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

7.2 试样的保存

-18°C 以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料2 g(准确至±0.05 g),于50 mL具塞离心管,准确加入混合内标工作液100 μL ,涡旋振荡2 min,加50 mmol/L的磷酸氢二钠溶液5 mL,涡旋振荡1 min,加乙酸乙酯6 mL,涡旋振荡1 min,8 000 r/min离心6 min,收集上清液(乙酸乙酯层),残渣加乙酸乙酯3 mL重复提取1次,合并上清液,备用。

8.2 净化

取备用液,40 $^\circ\text{C}$ 氮气吹干,用甲醇-0.1%甲酸溶液2.0 mL溶解残留物,加正己烷2 mL,涡旋振荡1 min,8 000 r/min离心6 min,弃去上层正己烷层,重复去脂1次,取澄清液,过0.22 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 标准曲线的制作

精密量取标准工作液和内标工作液适量,用甲醇-0.1%甲酸溶液稀释成甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑的浓度均为0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL系列标准工作液(内标氘代甲苯咪唑浓度为2.5 ng/mL、氘代羟基甲苯咪唑为0.5 ng/mL),供液相色谱-串联质谱测定。分别以各药物浓度与内标物浓度的比值为横坐标(x)、各药物的峰面积与同位素内标峰面积的比值为纵坐标(y)绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱: C_{18} (100 mm×2.1 mm,粒径3 μm),或性能相当者;
- b) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- c) 进样量:10 μL ;
- d) 流速:0.2 mL/min;
- e) 流动相:A为甲醇;B为0.1%甲酸溶液,梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相及梯度洗脱条件

时间,min	A,%	B,%
0.0	35	65
0.2	50	50
3.0	65	35
7.0	65	35
7.5	35	65
10.0	35	65

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 喷雾电压:3 500 V;
- d) 鞘气压力:30 L/min;
- e) 辅助气压力:15 L/min;
- f) 离子传输管温度:350 $^{\circ}\text{C}$;
- g) 源内碰撞诱导解离电压:12 V;
- h) 检测方式:选择反应监测(SRM),选择反应监测母离子、子离子、碰撞能量见表2;
- i) Q1半峰宽:0.4 Da;
- j) Q3半峰宽:0.7 Da;
- k) 碰撞气压力:氩气,0.2 Pa。

表2 母离子、子离子和碰撞能量

目标化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量 eV
甲苯咪唑	296.0	105.0*	24
		77.2	33
羟基甲苯咪唑	298.0	160.0*	31
		266.0	20
氨基甲苯咪唑	238.0	105.1*	29
		77.2	17
氘代羟基甲苯咪唑	301.1	266.0	20
氘代甲苯咪唑	299.0	105.1	32

注: * 为定量离子。

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试料溶液中甲苯咪唑及其代谢物的保留时间与标准工作液中的保留时间之比,偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内,且检测到的离子相对丰度,应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致,其允许偏差应符合表3的要求。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	允许偏差
>50	± 20
>20~50	± 25
>10~20	± 30
≤ 10	± 50

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和标准工作液,作单点或多点校准,甲苯咪唑以氘代甲苯咪唑为内标,羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑以氘代羟基甲苯咪唑为内标,以色谱峰面积定量,内标法计算。标准溶液及试料溶液中目标药物的特征离子质量色谱峰峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。标准溶液特征离子质量色谱图见附录B。

8.5 空白试验

取空白试料,除不加药物外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中待测物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A_i \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m} \quad (1)$$

式中:

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

C_s ——标准工作溶液中被测物质浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C_{is} ——试样溶液中内标浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

C'_{is} ——标准工作溶液中内标浓度的数值,单位为纳克每毫升(ng/mL);

A_i ——试样溶液中被测物质的峰面积;

A'_{is} ——标准工作溶液中内标的峰面积;

A_{is} ——试样溶液中内标的峰面积;

A_s ——标准工作溶液中被测物质的峰面积;

V ——试样溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——供试试样质量的数值,单位为克(g)。

10 检测方法灵敏度、准确度、精密度

10.1 灵敏度

本方法甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑和羟基甲苯咪唑的检测限均为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法添加浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 40 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率均为 $70\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

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

附录 A

(资料性)

甲苯咪唑及其代谢物、内标物的英文名称、分子式和 CAS 号

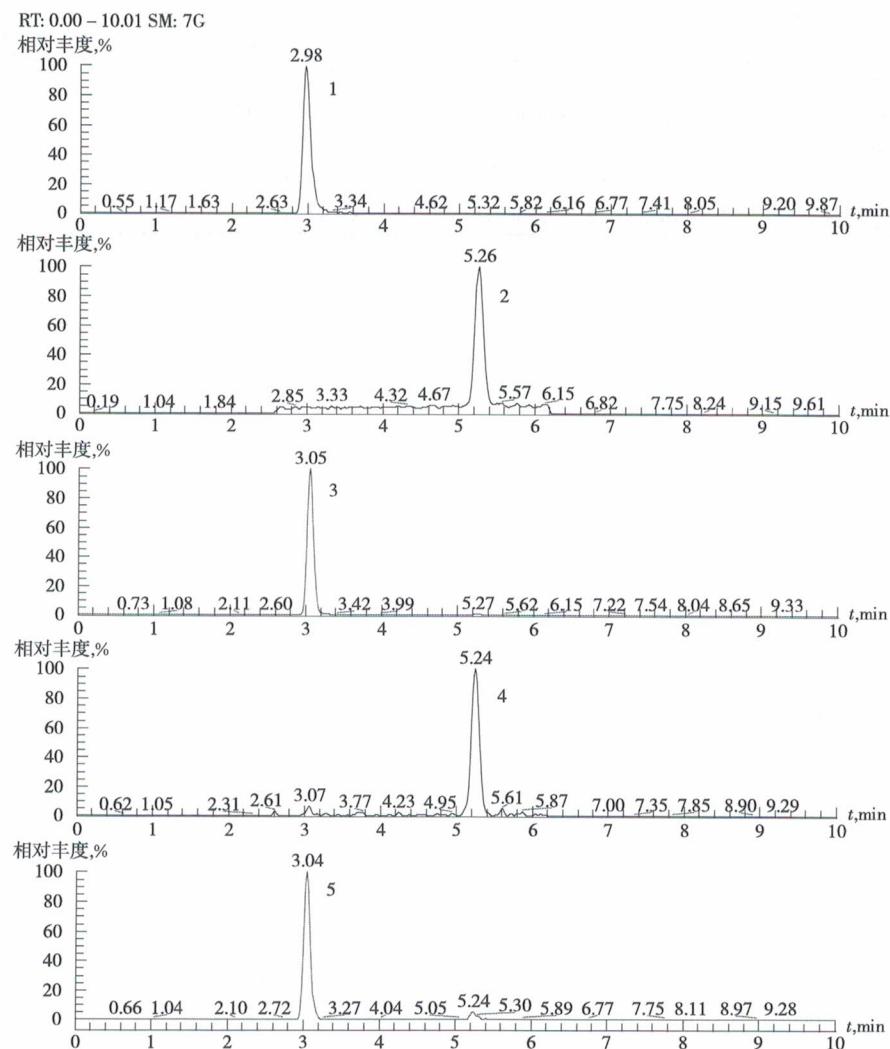
甲苯咪唑及其代谢物、内标物的英文名称、分子式和 CAS 号见表 A. 1。

表 A. 1 甲苯咪唑及其代谢物、内标物的英文名称、CAS 号

化合物	英文名	分子式	CAS 号
甲苯咪唑	Mebendazole	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	31431-39-7
羟基甲苯咪唑	5-Hydroxymebendazole	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃	60254-95-7
氨基甲苯咪唑	Aminomebendazole	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O	52329-60-9
氘代甲苯咪唑	Mebendazole-D ₃	C ₁₆ H ₁₀ D ₃ N ₃ O ₃	1173021-87-8
氘代羟基甲苯咪唑	5-Hydroxymebendazole-D ₃	C ₁₆ H ₁₂ D ₃ N ₃ O ₃	1173020-86-4

附录 B
(资料性)
标准溶液特征离子质量色谱图

标准溶液中甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑及氘代甲苯咪唑和氘代羟基甲苯咪唑特征离子质量色谱图见图 B. 1。



标引序号说明：

- 1——氨基甲苯咪唑特征离子质量色谱图($238.0 > 105.1$)；
- 2——羟基甲苯咪唑特征离子质量色谱图($298.0 > 160.0$)；
- 3——甲苯咪唑特征离子质量色谱图($296.0 > 105.0$)；
- 4——氘代羟基甲苯咪唑特征离子质量色谱图($301.1 > 266.0$)；
- 5——氘代甲苯咪唑特征离子质量色谱图($299.0 > 105.1$)。

图 B. 1 标准溶液中甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑及氘代甲苯咪唑和氘代羟基甲苯咪唑特征离子质量色谱图(5 ng/mL)

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其代谢物

残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

GB 31656.15—2022

* * *

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 12 月第 1 版 2022 年 12 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 9140

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31656.15—2022