



中华人民共和国国家标准

GBXXXXX—XXXX

食品安全国家标准 水产品中三卡因残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-
Determination of tricaine in aquatic products 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

水产品中三卡因残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水产品中三卡因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、蟹、贝、鳖、海参可食组织中三卡因残留量的测定。其他水产品可参照执行。

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

GB/T 30891 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

试样中残留的三卡因经乙腈提取，正己烷除脂，分散固相萃取净化，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，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 正己烷（C₆H₁₄）。

5.1.5 无水硫酸镁（MgSO₄）：使用前 200℃下烘烤 2 h 后放干燥器内待用。

5.1.6 氯化钠（NaCl）。

5.2 溶液配制

5.2.1 乙腈饱和正己烷溶液：取正己烷 400 mL，于 500 mL 试剂瓶中，加乙腈 50 mL，加盖，振荡，静置，使用时取上层溶液。

5.2.2 5%乙腈溶液：取乙腈 5 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。

5.2.3 0.3%甲酸溶液：取甲酸 1.5 mL，用水稀释至 500 mL，混匀。

5.3 标准品

5.3.1 三卡因甲基磺酸盐（英文名：Tricaine methanesulfonate；别名：间氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐、MS-222；分子式：C₉H₁₁NO₂·CH₄O₃S；CAS 号：886-86-2），含量≥95%。

5.3.2 三卡因甲基磺酸盐-D₅（英文名：Tricaine methanesulfonate-D₅；别名：间氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐-D₅；分子式：C₉H₆D₅NO₂·CH₄O₃S；CAS 号：NA），含量≥95%。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液：称取三卡因甲基磺酸盐标准品适量（相当于三卡因 10 mg），精密称定，用甲醇溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶，混匀，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-18℃以下保存，有效期 12 个月。

5.4.2 标准中间液：准确量取标准储备液适量，用甲醇稀释配制成浓度为 10 μg/mL 的三卡因标准中间液。-18℃以下保存，有效期 6 个月。

5.4.3 标准工作液：准确量取标准中间液适量，用甲醇稀释配制成浓度为 1 μg/mL 的三卡因标准工作液。-18℃以下保存，有效期 3 个月。

5.4.4 内标储备液：称取三卡因甲基磺酸盐-D₅ 标准品适量（相当于三卡因-D₅ 10 mg），精密称定，用甲醇溶解并稀释定容至 10 mL 容量瓶，混匀，配制成浓度为 1 mg/mL 的内标储备液。-18℃以下保存，有效期 12 个月。

5.4.5 内标中间液：精密量取内标储备液适量，用甲醇稀释配制成 10 μg/mL 三卡因-D₅ 内标中间液。-18℃以下保存，有效期 6 个月。

5.4.6 内标工作液：精密量取内标中间液适量，用甲醇稀释，配制成 100 μg/L 三卡因-D₅ 内标工作液。-18℃以下保存，有效期 3 个月。

5.5 材料

5.5.1 乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶（PSA）：粒径 40 μm~60 μm。

5.5.2 有机系微孔滤膜：双层，0.22 μm。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 电子天平：感量为 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 超声波提取仪。

6.6 离心机。

6.7 氮吹仪。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按GB/T 30891中附录B的要求制样。

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溶液，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

称取试料(2±0.05) g, 置于50 mL离心管中, 准确加入内标工作液100 μ L, 涡旋混匀, 加水5 mL, 涡旋混合使基质分散均匀, 再加入乙腈10 mL、氯化钠1 g、无水硫酸镁2 g, 涡旋振荡3 min, 超声10 min, 4 000 r/min离心5 min, 将上层清液转入15 mL离心管中, 于40℃氮气吹至约3 mL, 备用。

8.2 净化

取备用液, 加乙腈饱和正己烷溶液5 mL, 涡旋混合30 s, 静置分层, 弃去上层正己烷层, 用乙腈饱和正己烷溶液重复去脂一次, 对于脂肪含量高的样品可增加去脂一次。乙腈层加入500 mg PSA, 迅速涡旋混合1 min, 4 000 r/min离心5 min。将上清液转移至10 mL离心管中, 40℃氮气吹干。准确加入5%乙腈溶液1.0 mL溶解残留物, 转移至1.5 mL离心管中, 12 000 r/min离心10 min, 过0.22 μ m滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

注: 对于高速离心后不够澄清的试样溶液, 可置于-18℃以下冷冻30 min后8 000 r/min离心10 min再过膜。

8.3 标准曲线的制备

精密量取标准工作液(5.4.3)和内标工作液(5.4.6)适量, 用5%乙腈溶液稀释, 配制成三卡因浓度分别为0.5 μ g/L、1 μ g/L、2 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L, 三卡因-D₅浓度均为10 μ g/L的系列标准溶液, 临用现配, 供液相色谱-串联质谱仪测定。以定量离子峰面积比为纵坐标、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(100 mm×2.1 mm, 2.5 μ m)或相当者;
- 流速: 0.4 mL/min;
- 柱温: 35℃;
- 进样量: 5 μ L;
- 流动相: A: 0.3%甲酸溶液, B: 乙腈, 梯度洗脱条件见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间, min	A, %	B, %
0	85	15
1.0	85	15
3.0	30	70
5.0	30	70
5.1	85	15
6.0	85	15

8.4.2 质谱参考条件

- 电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式;
- 数据采集: 多反应监测(MRM), 质谱参数参见表2;
- 离子源温度: 550℃;
- 电喷雾电压: 5500 V;
- 气帘气压力(CUR): 35 psi(氮气);
- 碰撞气体(CAD): Medium(氮气);
- 雾化气(GS1): 50 psi;
- 辅助气(GS1): 55 psi。

表2 化合物的母离子及定量定性离子、碰撞能量

化合物	定性离子对 m/z	定量离子 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV
三卡因	166.1>138.1	166.1>138.1	30	20
	166.1>77.0			31
三卡因-D ₅	171.1>139.1	171.1>139.1	40	20

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下,试样溶液中待测药物与其内标的保留时间之比与标准溶液中待测药物与其内标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,按内标法以色谱峰面积比定量。标准溶液及试样溶液中待测药物响应值均应在仪器检测的线性范围内。对于试料中待测药物残留量超过仪器测定线性范围的,在提取时应根据药物浓度相应增加内标工作液的添加量,使试样溶液稀释后待测药物的响应值在仪器线性范围内,使对应内标浓度与标准曲线制备中的内标浓度一致。在上述液相色谱-串联质谱条件下,标准溶液的特征离子对质量色谱图见附录A。

8.5 空白试验

取空白试样,除不加药物外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算

试样中三卡因的残留量按标准曲线或公式(1)计算,

$$\omega = \frac{\rho_s \times \rho_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V \times 1000}{\rho'_{is} \times A_{is} \times A_s \times m \times 1000} \dots \dots (1)$$

式中:

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

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

ρ_{is} —试样溶液中内标浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

ρ'_{is} —标准溶液中内标浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

A_i —试样溶液中待测药物的峰面积;

A_{is} —试样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'_{is} —标准溶液中内标的峰面积;

V —最终定容体积,单位为毫升(mL);

m —试样质量,单位为克(g)。

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

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法三卡因的检出限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在 $1.0 \mu\text{g/kg}$ ~ $10.0 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度的回收率为70%~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 $\leq 20\%$ 。

征求意见稿

附录 A

(资料性)

标准物质选择离子质量色谱图

三卡因标准物质选择离子质量色谱图参见图A.1。

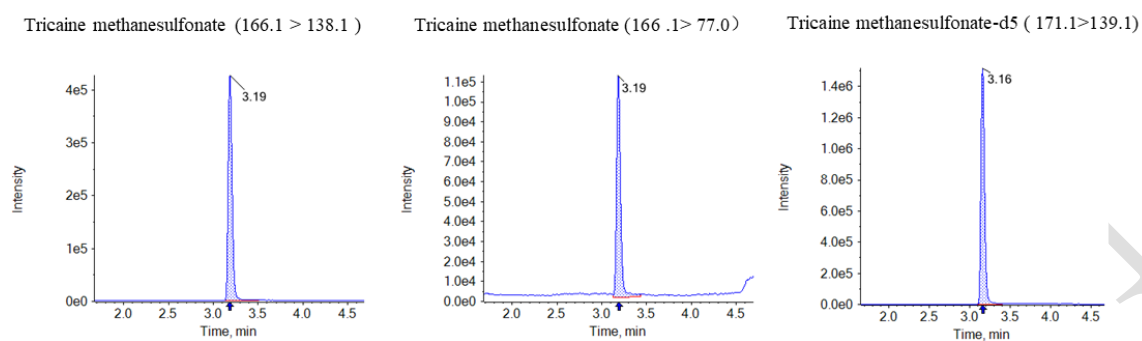


图 A.1 标准溶液特征离子质量色谱图（三卡因 1 $\mu\text{g/L}$, 三卡因-D₅ 10 $\mu\text{g/L}$ ）