

ICS 67.120.30
B 50



中华人民共和国国家标准

GB/T 19857—2005

水产品中孔雀石绿和结晶紫 残留量的测定

Determination of malachite green and crystal violet residues
in aquatic product

2005-09-05 发布

2005-09-05 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 为资料性附录。

本标准由全国水产标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、厦门出入境检验检疫局、广东出入境检验检疫局、福建出入境检验检疫局、江苏出入境检验检疫局、北京出入境检验检疫局、宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：郭德华、施冰、杨惠琴、林峰、李波、张志刚、林海丹、王传现、陈鹭平、盛永刚、李耀平、杨芳、陈惠兰、张朝晖、殷居易、林立毅、袁辰刚。

本标准系首次发布的国家标准。

水产品中孔雀石绿和结晶紫 残留量的测定

1 范围

本标准规定了水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿(leucomalachite green)、结晶紫及其代谢物隐色结晶紫(leucocrystal violet)残留量的液相色谱-串联质谱和高效液相色谱的测定方法。

本标准适用于鲜活水产品及其制品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿、结晶紫及其代谢物隐色结晶紫残留量的检验。

2 液相色谱-串联质谱法

2.1 原理

试样中的残留物用乙腈-乙酸铵缓冲溶液提取,乙腈再次提取后,液液分配到二氯甲烷层,经中性氧化铝和阳离子固相柱净化后用液相色谱-串联质谱法测定,内标法定量。

2.2 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2.2.1 乙腈:液相色谱纯。

2.2.2 甲醇:液相色谱纯。

2.2.3 二氯甲烷。

2.2.4 无水乙酸铵。

2.2.5 5 mol/L 乙酸铵缓冲溶液:称取 38.5 g 无水乙酸铵溶解于 90 mL 水中,冰乙酸调 pH 到 7.0,用水定容至 100 mL。

2.2.6 0.1 mol/L 乙酸铵缓冲溶液:称取 7.71 g 无水乙酸铵溶解于 1 000 mL 水中,冰乙酸调 pH 到 4.5。

2.2.7 5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液:称取 0.385 g 无水乙酸铵溶解于 1 000 mL 水中,冰乙酸调 pH 到 4.5,过 0.2 μm 滤膜。

2.2.8 冰乙酸。

2.2.9 0.25 g/mL 盐酸羟胺溶液。

2.2.10 1.0 mol/L 对-甲苯磺酸溶液:称取 17.2 g 对-甲苯磺酸,用水溶解并定容至 100 mL。

2.2.11 体积分数为 2% 的甲酸溶液。

2.2.12 体积分数为 5% 的乙酸铵甲醇溶液:量取 5 mL 乙酸铵缓冲溶液(2.2.5)用甲醇定容至 100 mL。

2.2.13 阳离子交换柱:MCX,60 mg/3 mL,使用前依次用 3 mL 乙腈、3 mL 甲酸溶液(2.2.11)活化。

2.2.14 中性氧化铝柱:1 g/3 mL,使用前用 5 mL 乙腈活化。

2.2.15 标准品:孔雀石绿(MG)、隐色孔雀石绿(LMG)、结晶紫(CV)、隐色结晶紫(LCV)、同位素内标氘代孔雀石绿(D_5 -MG)、同位素内标氘代隐色孔雀石绿(D_5 -LMG),纯度大于 98%。

2.2.16 标准储备溶液:准确称取适量的孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫、氘代孔雀石绿、氘代隐色孔雀石绿标准品,用乙腈分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液。

2.2.17 混合标准储备溶液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):分别准确吸取 1.00 mL 孔雀石绿、结晶紫、隐色孔雀石绿和隐色结晶紫的标准储备溶液(2.2.16)至 100 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,1 mL 该溶液分别含 1 μg 的孔雀石绿、结晶紫、隐色孔雀石绿和隐色结晶紫。-18 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

2.2.18 混合标准储备溶液(100 ng/mL):用乙腈稀释混合标准储备溶液(2.2.17),配制成每毫升含孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫均为 100 ng 的混合标准储备溶液。-18℃避光保存。

2.2.19 混合内标标准溶液:用乙腈稀释标准溶液(2.2.16),配制成每毫升含氘代孔雀石绿和氘代隐色孔雀石绿各 100 ng 的内标混合溶液。-18℃避光保存。

2.2.20 混合标准工作溶液:根据需要,临用时吸取一定量的混合标准储备溶液(2.2.18)和混合内标标准溶液(2.2.19),用乙腈+5 mmol/L 乙酸铵溶液(1+1)稀释配制适当浓度的混合标准工作液,每毫升该混合标准工作溶液含有氘代孔雀石绿和氘代隐色孔雀石绿各 2 ng。

2.3 仪器和设备

2.3.1 高效液相色谱-串联质谱联用仪:配有电喷雾(ESI)离子源。

2.3.2 匀浆机。

2.3.3 离心机:4 000 r/min。

2.3.4 超声波水浴。

2.3.5 旋涡振荡器。

2.3.6 KD 浓缩瓶:25 mL。

2.3.7 固相萃取装置。

2.3.8 旋转蒸发仪。

2.4 样品制备

2.4.1 鲜活水产品

2.4.1.1 提取

称取 5.00 g 已捣碎样品于 50 mL 离心管中,加入 200 μ L 混合内标标准溶液(2.2.19),加入 11 mL 乙腈,超声波振荡提取 2 min,8 000 r/min 匀浆提取 30 s,4 000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 25 mL 比色管中;另取一 50 mL 离心管加入 11 mL 乙腈,洗涤匀浆刀头 10 s,洗涤液移入前一离心管中,用玻棒捣碎离心管中的沉淀,旋涡混匀器上振荡 30 s,超声波振荡 5 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液合并至 25 mL 比色管中,用乙腈定容至 25.0 mL,摇匀备用。

2.4.1.2 净化

移取 5.00 mL 样品溶液加至已活化的中性氧化铝柱(2.2.14)上,用 KD 浓缩瓶接收流出液,4 mL 乙腈洗涤中性氧化铝柱,收集全部流出液,45℃旋转蒸发至约 1 mL,残液用乙腈定容至 1.00 mL,超声波振荡 5 min,加入 1.0 mL 5 mmol/L 乙酸铵,超声波振荡 1 min,样液经 0.2 μ m 滤膜过滤后供液相色谱-串联质谱测定。

2.4.2 加工水产品

2.4.2.1 提取

称取 5.00 g 已捣碎样品于 100 mL 离心管中,加入 200 μ L 混合内标标准溶液(2.2.19),依次加入 1 mL 盐酸羟胺(2.2.9)、2 mL 对-甲苯磺酸(2.2.10)、2 mL 乙酸铵缓冲溶液(2.2.6)和 40 mL 乙腈,匀浆 2 min(10 000 r/min),离心 3 min(3 000 r/min),将上清液转移到 250 mL 分液漏斗中,用 20 mL 乙腈重复提取残渣一次,合并上清液。于分液漏斗中加入 30 mL 二氯甲烷、35 mL 水,振摇 2 min,静置分层,收集下层有机层于 150 mL 梨形瓶中,再用 20 mL 二氯甲烷萃取一次,合并二氯甲烷层,45℃旋转蒸发近干。

2.4.2.2 净化

将中性氧化铝柱(2.2.14)串接在阳离子交换柱(2.2.13)上方。用 6 mL 乙腈分三次(每次 2 mL),用旋涡振荡器涡旋溶解上述提取物,并依次过柱,控制阳离子交换柱流速不超过 0.6 mL/min,再用 2 mL 乙腈淋洗中性氧化铝柱后,弃去中性氧化铝柱。依次用 3 mL 体积分数为 2% 的甲酸溶液、3 mL 乙腈淋洗阳离子交换柱,弃去流出液。用 4 mL 体积分数为 5% 的乙酸铵甲醇溶液(2.2.12)洗脱,洗脱流速为 1 mL/min,用 10 mL 刻度试管收集洗脱液,用水定容至 10.0 mL,样液经 0.2 μ m 滤膜过滤后供液

相色谱-串联质谱测定。

2.5 测定

2.5.1 液相色谱-串联质谱条件

- a) 色谱柱: C₁₈柱, 50 mm×2.1 mm(内径), 粒度 3 μm;
- b) 流动相: 乙腈+5 mmol/L 乙酸铵=75+25(体积比);
- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 柱温: 35℃;
- e) 进样量: 10 μL;
- f) 离子源: 电喷雾 ESI, 正离子;
- g) 扫描方式: 多反应监测 MRM;
- h) 雾化气、帘幕气、辅助加热气、碰撞气均为高纯氮气, 使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
- i) 喷雾电压、去集簇电压、碰撞能等电压值应优化至最优灵敏度;
- j) 监测离子对: 孔雀石绿 m/z 329/313(定量离子)、329/208; 隐色孔雀石绿 m/z 331/316(定量离子)、331/239; 结晶紫 m/z 372/356(定量离子)、372/251; 隐色结晶紫 m/z 374/359(定量离子)、374/238; 氘代孔雀石绿 m/z 334/318(定量离子); 氘代隐色孔雀石绿 m/z 337/322(定量离子)。

2.5.2 液相色谱-串联质谱测定

按照 2.5.1 液相色谱-串联质谱条件测定样品和混合标准工作溶液(2.2.20), 以色谱峰面积按内标法定量, 孔雀石绿和结晶紫以氘代孔雀石绿为内标物计算, 隐色孔雀石绿和隐色结晶紫以氘代隐色孔雀石绿为内标物计算。在上述色谱条件下孔雀石绿、氘代孔雀石绿、结晶紫、氘代隐色孔雀石绿、隐色孔雀石绿和隐色结晶紫的参考保留时间分别为 2.27 min、2.30 min、2.88 min、5.21 min、5.31 min、5.61 min, 标准溶液的离子流图参见附录 A 中图 A.1。

2.5.3 液相色谱-串联质谱确证

按照 2.5.1 液相色谱-串联质谱条件测定样品和标准工作溶液, 分别计算样品和标准工作溶液中非定量离子对与定量离子对色谱峰面积的比值, 仅当两者数值的相对偏差小于 25% 时方可确定两者为同一物质。

2.6 空白试验

除不加试样外, 均按 2.4, 2.5 步骤进行。

2.7 结果计算和表述

按式(1)计算样品中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫和隐色结晶紫残留量。计算结果需扣除空白值。

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

式中:

X——样品中待测组分残留量, 单位为微克每千克(μg/kg);

c——孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫或隐色结晶紫标准工作溶液的浓度, 单位为微克每升(μg/L);

c_{si}——标准工作溶液中内标物的浓度, 单位为微克每升(μg/L);

c_i——样液中内标物的浓度, 单位为微克每升(μg/L);

A_s——孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫或隐色结晶紫标准工作溶液的峰面积;

A——样液中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫或隐色结晶紫的峰面积;

A_{si}——标准工作溶液中内标物的峰面积;

- A_i ——样液中内标物的峰面积；
 V ——样品定容体积，单位为毫升(mL)；
 m ——样品称样量，单位为克(g)。

本方法孔雀石绿的残留量测定结果系指孔雀石绿和它的代谢物隐色孔雀石绿残留量之和，以孔雀石绿表示。

本方法结晶紫的残留量测定结果系指结晶紫和它的代谢物隐色结晶紫残留量之和，以结晶紫表示。

2.8 方法检测限

本方法孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫的检测限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 高效液相色谱法

3.1 原理

试样中的残留物用乙腈-乙酸盐缓冲混合液提取，乙腈再次提取后，液液分配到二氯甲烷层并浓缩，经酸性氧化铝柱净化后，高效液相色谱-二氧化铅柱后衍生测定，外标法定量。

3.2 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为重蒸馏水。

3.2.1 乙腈：液相色谱纯。

3.2.2 二氯甲烷。

3.2.3 甲醇：液相色谱纯。

3.2.4 乙酸盐缓冲液：溶解 4.95 g 无水乙酸钠及 0.95 g 对-甲苯磺酸于 950 mL 水中，用冰乙酸调节溶液 pH 到 4.5，最后用水稀释到 1 L。

3.2.5 20% 盐酸羟胺溶液。

3.2.6 1.0 mol/L 对-甲苯磺酸：称取 17.2 g 对-甲苯磺酸，并用水稀释至 100 mL。

3.2.7 50 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液：称取 3.85 g 无水乙酸铵溶解于 1 000 mL 水中，冰乙酸调 pH 到 4.5。

3.2.8 二甘醇。

3.2.9 酸性氧化铝：80 目~120 目。

3.2.10 二氧化铅。

3.2.11 硅藻土 545：色谱层析级。

3.2.12 标准品：孔雀石绿(MG)、隐色孔雀石绿(LMG)、结晶紫(CV)、隐色结晶紫(LCV)，纯度大于 98%。

3.2.13 标准溶液：准确称取适量的孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫，用乙腈分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液，再用乙腈稀释配制 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

3.2.14 混合标准工作溶液：用乙腈稀释标准溶液(3.2.13)，配制成每毫升含孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫均为 20 ng 的混合标准溶液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

3.3 仪器和设备

3.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外-可见光检测器。

3.3.2 匀浆机。

3.3.3 离心机：4 000 r/min。

3.3.4 固相萃取装置。

3.3.5 25% 二氧化铅氧化柱：不锈钢预柱管[5 cm \times 4 mm(内径)]，两端附 2 μm 过滤板，抽真空下，填充含有 25% 二氧化铅的硅藻土，添加数滴甲醇压实，旋紧。临用前用甲醇冲洗。并将二氧化铅氧化柱连接在紫外-可见光检测器与液相色谱柱之间。

3.3.6 酸性氧化铝柱：1 g/3 mL，使用前用 5 mL 乙腈活化。

3.4 样品制备

3.4.1 提取

称取 5.00 g 样品于 50 mL 离心管内,加入 1.5 mL 20% 的盐酸羟胺溶液、2.5 mL 1.0 mol/L 的对-甲苯磺酸溶液、5.0 mL 乙酸盐缓冲溶液,用匀浆机以 10 000 r/min 的速度均质 30 s,加入 10 mL 乙腈剧烈震荡 30 s。加入 5 g 酸性氧化铝,再次震荡 30 s。3 000 r/min 离心 10 min。把上清液转移至装有 10 mL 水和 2 mL 二甘醇的 100 mL 离心管中。然后在 50 mL 离心管中加入 10 mL 乙腈,重复上述操作,合并乙腈层。

3.4.2 净化

在离心管中加入 15 mL 二氯甲烷,振荡 10 s, 3 000 r/min 离心 10 min, 将二氯甲烷层转移至 100 mL 的梨形瓶中,再用 5 mL 乙腈、10 mL 二氯甲烷重复上述操作一次,合并二氯甲烷层于 100 mL 梨形瓶中。45℃ 旋转蒸发至约 1 mL,用 2.5 mL 乙腈溶解残渣。

将酸性氧化铝柱(3.3.6)安装在固相萃取装置上,将梨形瓶中的溶液转移到柱上,再用乙腈洗涤瓶两次,每次 2.5 mL,把洗涤液依次通过柱,控制流速不超过 0.6 mL/min,收集全部流出液,45℃ 旋转蒸发至近干,残渣准确用 0.5 mL 乙腈溶解,过 0.45 μm 滤膜,滤液供液相色谱测定。

3.5 测定

3.5.1 液相色谱条件

- 色谱柱: C₁₈ 柱, 250 mm×4.6 mm(内径), 粒度 5 μm, 在 C₁₈ 色谱柱和检测器之间连接 25% 二氧化铅氧化柱;
- 流动相: 乙腈和乙酸盐缓冲溶液(3.2.7), 梯度洗脱参数见表 1;
- 流速: 1.0 mL/min;
- 柱温: 室温;
- 检测波长: 618 nm(孔雀石绿), 588 nm(结晶紫);
- 进样量: 50 μL。

表 1 流动相梯度表

时间/min	乙腈/(%)	乙酸盐缓冲溶液/(%)
0	60	40
4	80	20
15	80	20
15.1	95	5
17	95	5
17.1	60	40
20	60	40

3.5.2 液相色谱测定

根据样液中被测孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫或隐色结晶紫含量情况,选定峰高相近的标准工作溶液。标准工作溶液和样液中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫和隐色结晶紫响应值均应在仪器检测线性范围内。对标准工作溶液和样液等体积参插进样测定。在上述色谱条件下,孔雀石绿、结晶紫、隐色孔雀石绿和隐色结晶紫的保留时间约为 6.10 min、7.88 min、17.77 min、18.22 min,标准品色谱图参见附录 A 中图 A.2。

3.6 空白试验

除不加试样外,均按 3.4、3.5 步骤进行。

3.7 结果计算和表述

按式(2)计算样品中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫和隐色结晶紫残留量。计算结果需扣除空

白值。

$$X = \frac{c \times A \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- X——样品中待测组分残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- c——待测组分标准工作液的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- A——样品中待测组分的峰面积;
- A_s ——待测组分标准工作液的峰面积;
- V——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m——最终样液所代表的试样量,单位为克(g)。

本方法孔雀石绿的残留量测定结果系指孔雀石绿和它的代谢物隐色孔雀石绿残留量之和,以孔雀石绿表示。

本方法结晶紫的残留量测定结果系指结晶紫和它的代谢物隐色结晶紫残留量之和,以结晶紫表示。

3.8 方法检测限

本方法孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫的检测限均为 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 。

附录 A
(资料性附录)
标准离子流图及液相色谱图

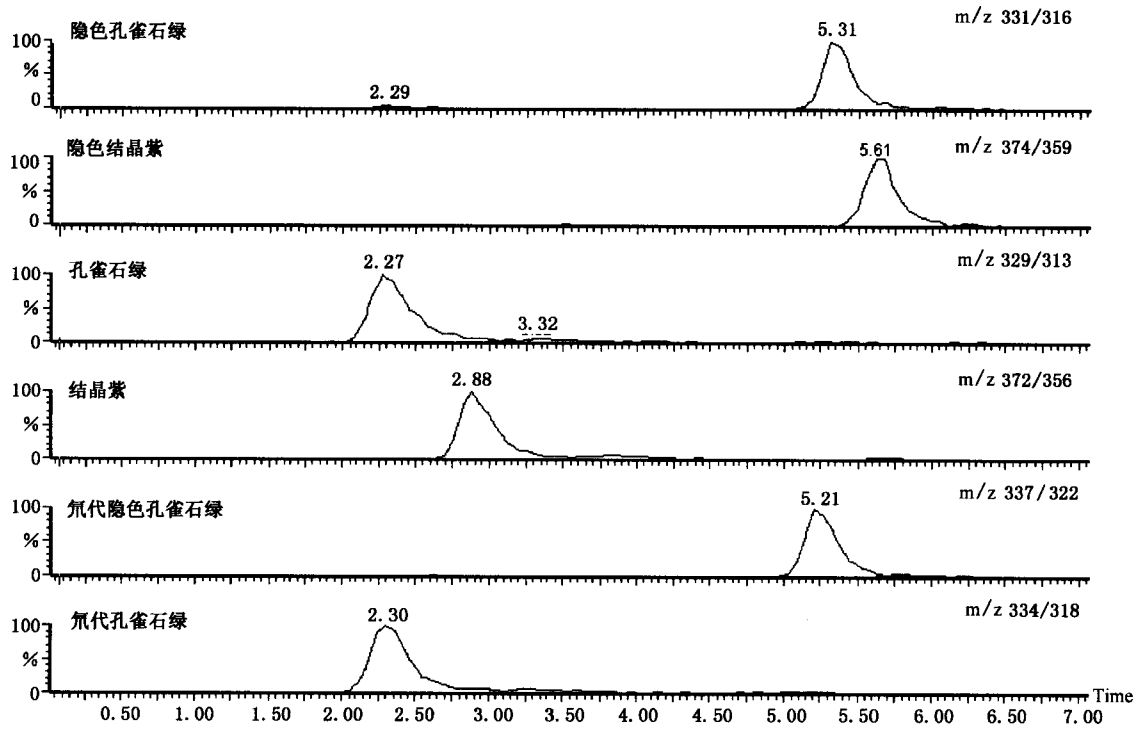


图 A.1 孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫、氘代孔雀石绿和氘代隐色孔雀石绿标准的离子流图

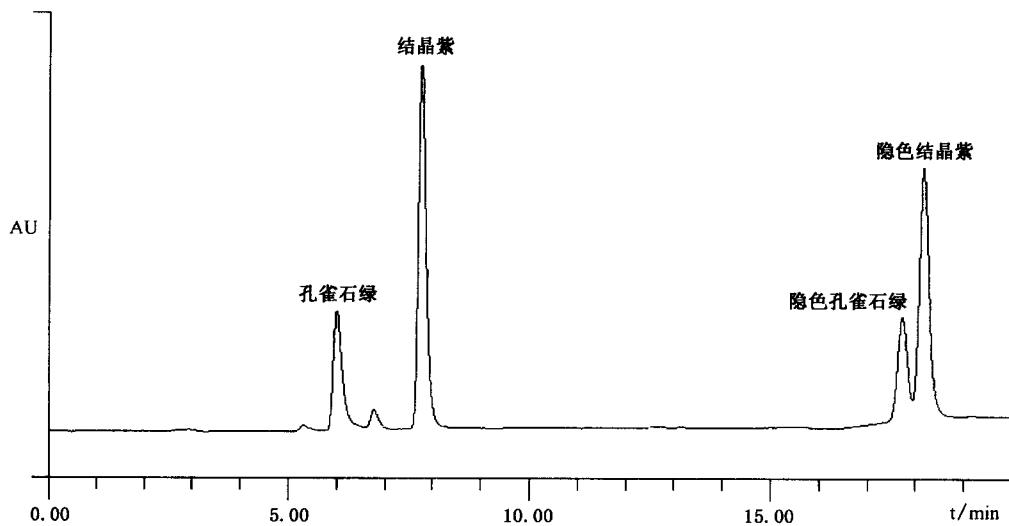


图 A.2 孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫标准的液相色谱图