



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
国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准附录为资料性附录。

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

2.2.6 0.1mol/L 乙酸铵缓冲溶液：称取 7.71g 无水乙酸铵溶解于 1000mL 水中，冰乙酸调 pH 到 4.5。

2.2.7 5mmol/L 乙酸铵缓冲溶液：称取 0.385g 无水乙酸铵溶解于 1000mL 水中，冰乙酸调 pH 到 4.5，过 0.2 μ m 滤膜。

2.2.8 冰乙酸。

2.2.9 0.25g/mL 盐酸羟胺溶液。

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

2.2.11 2% (v/v) 甲酸溶液。

2.2.12 5% (v/v) 乙酸铵甲醇溶液：量取 5mL 乙酸铵缓冲溶液 (2.2.5) 用甲醇定容至 100mL。

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

2.2.14 中性氧化铝柱：1g/3mL，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_6 - 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 μ g/mL 的标准储备液，

2.2.17 混合标准储备溶液 (1 μ g/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，1mL 该溶液分别含 1 μ g 的孔雀石绿、结晶紫、隐色孔雀石绿和隐色结晶紫。-18 $^{\circ}$ C 避光保存。

2.2.18 混合标准储备溶液 (100ng/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 100ng 的混合标准储备溶液。-18 $^{\circ}$ C 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 100ng 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-5mmol/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 2ng。

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，25mL。

2.3.7 固相萃取装置。

2.3.8 旋转蒸发器

2.4 样品制备

2.4.1 鲜活水产品

a) 提取

称取5.00g已捣碎样品于50mL离心管中，加入200 μ L混合内标标准溶液（2.2.19），加入11mL乙腈，超声波振荡提取2min，8000r/min匀浆提取30s，4000 r/min离心5min，上清液转移至25mL比色管中；另取一50 mL离心管加入11mL乙腈，洗涤匀浆刀头10s，洗涤液移入前一离心管中，用玻棒捣碎离心管中的沉淀，漩涡混匀器上振荡30s，超声波振荡5min，4 000r/min离心5min，上清液合并至25mL比色管中，用乙腈定容至25.0mL，摇匀备用。

b) 净化

移取 5.00mL 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，4mL 乙腈洗涤中性氧化铝柱，收集全部流出液，45℃旋转蒸发至约 1mL，残液用乙腈定容至 1.00mL，超声振荡 5min，加入 1.0mL5mmol/L 乙酸铵，超声振荡 1min，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

c) 提取

称取5.00g已捣碎样品于100mL离心管中，加入200 μ L混合内标标准溶液（2.2.19），依次加入1mL 盐酸羟胺（2.2.9）、2mL 对-甲苯磺酸（2.2.10）、2mL 乙酸铵缓冲溶液（2.2.6）和40mL乙腈，匀浆 2min（10000r/min），离心3min（3000r/min），将上清液转移到250mL分液漏斗中，用20mL乙腈重复提取残渣一次，合并上清液。于分液漏斗中加入30mL 二氯甲烷、35mL水，振摇2min，静置分层，收集下层有机层于150mL梨形瓶中，再用20mL二氯甲烷萃取一次，合并二氯甲烷层，45℃旋转蒸发近干。

d) 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 6mL 乙腈分三次（每次 2mL），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 0.6mL/min，再用 2mL 乙腈淋洗中性氧化铝柱后，弃去中性氧化铝柱。依次用 3mL 2%（v/v）甲酸溶液、3mL 乙腈淋洗阳离子交换柱，弃去流出液。用 4mL 5%（v/v）乙酸铵甲醇溶液（2.2.12）洗脱，洗脱流速为 1mL/min，用 10mL 刻度试管收集洗脱液，用水定容至 10.0mL，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，50mm×2.1mm（i.d.），粒度 3 μ m；

b) 流动相：乙腈 + 5mmol/L 乙酸铵 = 75+25（v/v）；

- c) 流速: 0.2mL/min;
- d) 柱温: 35℃;
- e) 进样量: 10μL;
- 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、窗帘气、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2.27min、2.30min、2.88min、5.21min、5.31min、5.61min, 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, 均按上述测定步骤进行。

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。

$$X = \frac{C \times C_i \times A_s \times A_{si} \times V}{C_{si} \times A_i \times A_s \times W} \dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 样品中待测组分残留量, 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, μg/L;
- C_{si} —— 标准工作溶液中内标物的浓度, μg/L;
- C_i —— 样液中内标物的浓度, 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;
- 2.8 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, mL;
- W —— 样品称样量, 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。

2.9 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 μ g/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-PbO₂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 4.95g 无水乙酸钠及 0.95g 对-甲苯磺酸于 950mL 水中，用冰乙酸调节溶液 pH 到 4.5，最后用水稀释到 1L。

3.2.5 20%盐酸羟胺溶液。

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

3.2.7 50 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液：称取 3.85g 无水乙酸铵溶解于 1000mL 水中，冰乙酸调 pH 到 4.5。

3.2.8 二甘醇。

3.2.9 酸性氧化铝：80~120 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 μ g/mL 的标准贮备液，再用乙腈稀释配制 1 μ g/mL 的标准溶液。-18 $^{\circ}$ 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 20ng 的混合标准溶液。-18 $^{\circ}$ 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% PbO₂氧化柱：不锈钢预柱管 (5cm \times 4mm i. d)，两端附 2 μ m 过滤板，抽真空下，填装含有 25% PbO₂ 的硅藻土，添加数滴甲醇压实，旋紧。临用前用甲醇冲洗。并将 PbO₂ 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：1g/3mL，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 5g 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0.6mL/min, 收集全部流出液, 45℃旋转蒸发至近干, 残液准确用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

a) 色谱柱: C18柱, 250 mm×4.6mm (i. d.), 粒度5 μm, 在C18色谱柱和检测器之间连接25% PbO₂氧化柱;

b) 流动相: 乙腈和乙酸铵缓冲溶液 (3.2.7), 梯度洗脱参数见表1;

c) 流速: 1.0 mL/min;

d) 柱温: 室温;

e) 检测波长: 618 nm(孔雀石绿); 588 nm(结晶紫);

f) 进样量: 50 μL。

● 流动相梯度表

时间 (min)	乙腈, %	乙酸铵缓冲溶液, %
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、结晶紫或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6.10min、7.88min、17.77min、18.22min, 标准品色谱图参见附录A中图A.2。

3.5.3 空白试验

除不加试样外, 均按上述测定步骤进行。

3.5.4 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。

$$X = \frac{C \times A \times V}{A_s \times W} \quad \dots\dots (2)$$

式中：

- X —— 样品中待测组分残留量， mg/kg；
 C —— 待测组分标准工作液的浓度， μ 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， mL；
 W —— 最终样液所代表的试样量， g。

3.5.5 测定结果的表述

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的之和，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的之和，以结晶紫表示。

3.6 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 μ g/kg。

附录 A
(资料性附录)
标准离子流图及液相色谱图

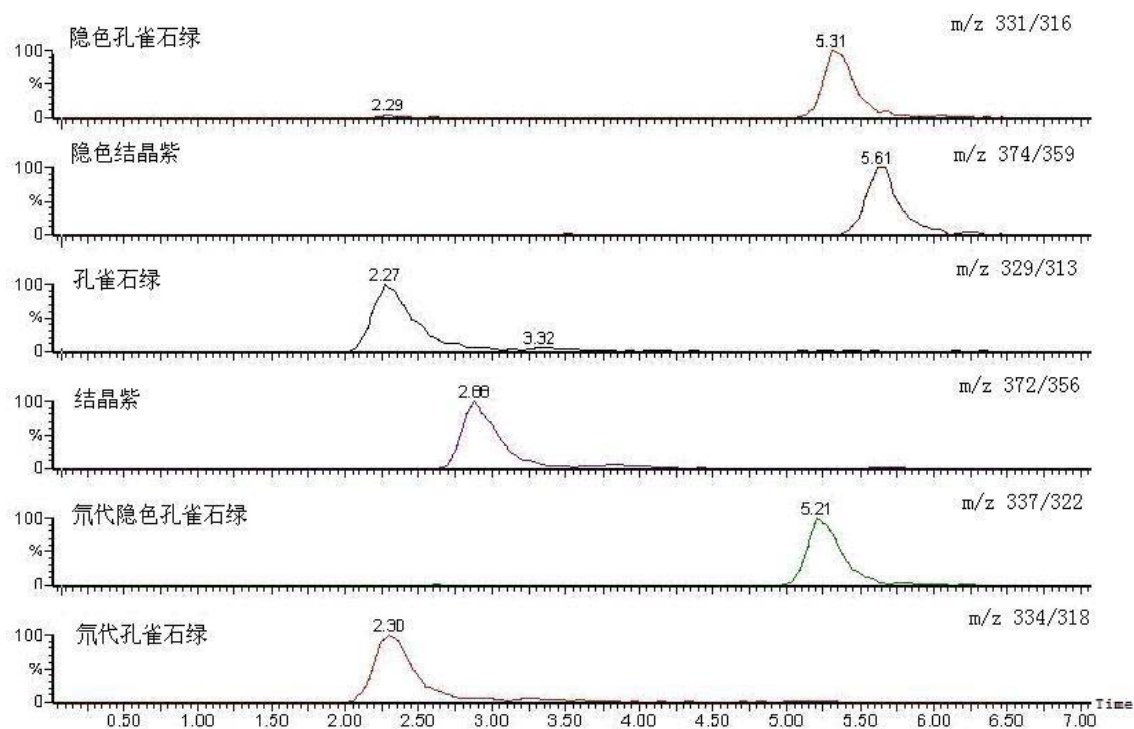


图 A.1 孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫、氘代孔雀石绿和氘代隐色孔雀石绿标准的离子流图

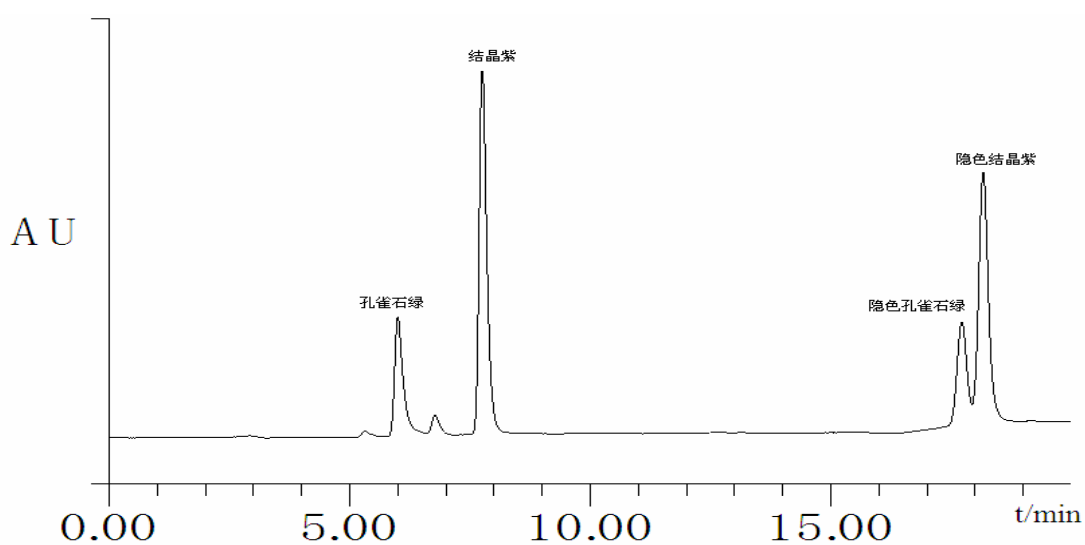


图 A.2 孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫标准的液相色谱图