

浙 江 省 地 方 标 准

DB33/T 598—2006

水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量的测定——液相色谱-串联质谱法

Determination of residues of malachite green and its metabolite in aquatic
products——LC-MS/MS method

2006-01-05 发布

2006-02-08 实施

浙江省质量技术监督局 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由浙江省海洋与渔业局提出并归口。

本标准起草单位：浙江省水产质量检测中心。

本标准主要起草人：张海琪、何中央、郑重莺、王扬、宋琍琍。

水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量的测定

——液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿残留量的检测。

本标准的检测限为0.50 µg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

样品中的孔雀石绿和无色孔雀石绿以乙酸铵盐溶液和乙腈提取，经二氯甲烷萃取，阳离子交换柱净化，液相色谱串联质谱仪测定，内标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

4.1 水：应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2 乙腈：色谱纯。

4.3 二氯甲烷。

4.4 甲醇：色谱纯。

4.5 无水乙酸铵：优级纯。

4.6 冰乙酸。

4.7 盐酸羟胺。

4.8 对甲苯磺酸。

4.9 中性氧化铝：粒度为 100 目~200 目，层析用。

4.10 甲酸：优质纯。

4.11 无水硫酸钠。

4.12 一缩二乙二醇。

4.13 抗坏血酸。

4.14 孔雀石绿草酸盐、无色孔雀石绿、氘代孔雀石绿、氘代无色孔雀石绿标准品：纯度≥98%。

4.15 乙酸铵溶液：0.05 mol/L (pH4.5)，称取 3.85 g 无水乙酸铵（4.5）溶解于 1000 mL 水中，用冰乙酸（4.6）调 pH 到 4.5。

4.16 盐酸羟胺溶液：25% (m/v)，称取 12.5 g 盐酸羟胺（4.7）溶于 50 mL 水中。

4.17 对甲苯磺酸溶液：1.0 mol/L，称取 17.2 g 对甲苯磺酸（4.8），用水稀释至 100 mL。

4.18 抗坏血酸甲醇溶液：1.0 g/L，称取 10 mg 抗坏血酸（4.13）溶解于 10 mL 甲醇溶液中，临用前配制。

4.19 阳离子交换柱：PRS 柱，500 mg/3 mL，使用前用 5 mL 乙腈：二氯甲烷（80+20）活化。

- 4.20 洗脱液：5 mL 25% 氨水，5 mL 抗坏血酸甲醇溶液（4.17），90 mL 甲醇混合，临用前配制。
- 4.21 样品定容液：取 80 mL 乙腈，15 mL 乙酸铵溶液（4.15）和 5 mL 抗坏血酸甲醇溶液（4.18），临用前配制。
- 4.22 标准储备溶液：100 $\mu\text{g/mL}$ ，准确称取孔雀石绿草酸盐、无色孔雀石绿、氘代孔雀石绿、氘代无色孔雀石绿标准品，用乙腈分别配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液， -18°C 避光保存备用，有效期为三个月。
- 4.23 混合标准储备溶液：1 $\mu\text{g/mL}$ ，吸取孔雀石绿和无色孔雀石绿的标准储备溶液（4.22），用乙腈稀释成 1 $\mu\text{g/mL}$ ， -18°C 避光保存，有效期为一个月。
- 4.24 混合内标工作溶液：100 ng/mL ，用乙腈稀释内标储备溶液（4.22），配制成每毫升含氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿各 100 ng 的混合内标工作溶液， -18°C 避光保存，有效期为一个月。
- 4.25 混合标准工作溶液：根据需要，临用时用乙腈稀释混合标准储备溶液（4.23）和混合内标工作溶液，配制成适当浓度的混合标准工作溶液，每毫升混合标准工作溶液含有氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿各 10 ng 。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪：配有电喷雾离子源。
- 5.2 均质器。
- 5.3 台式离心机：5 000 r/min 。
- 5.4 旋转蒸发仪。
- 5.5 固相萃取装置。
- 5.6 氮吹仪。

6 操作方法

6.1.1 提取

称取已均质的样品 5 g（精确到 0.01g），置于 100 mL 具塞离心管中，加入 200 μL 混合内标工作溶液（4.24），然后依次加 1.5 mL 盐酸羟胺溶液、2.5 mL 对甲苯磺酸溶液和 5 mL 乙酸铵溶液（4.14），10 000 r/min 均质 30 s，振荡 2 min。然后取另一具塞离心管加入 20 mL 乙腈，清洗均质器刀头后合并到样品提取离心管中，再加入 10 g 中性氧化铝，涡旋混匀 30 s，振荡 15 min 后，以 4 000 r/min 离心 10 min，将上清液转移至盛有 100 mL 水和 2 mL 一缩二乙二醇（4.11）的 250 mL 分液漏斗中。向离心管的残渣中加入 20 mL 乙腈，涡旋混匀 30 s，以 4 000 r/min 离心 10 min，上清液合并于同一分液漏斗中。

6.1.2 净化

于分液漏斗中加入 25 mL 二氯甲烷，充分振摇，静置分层，下层溶液收集于 100 mL 离心管中，4 000 r/min 离心 5 min，收集有机层于 250 mL 旋转蒸发瓶中。再用 20 mL 二氯甲烷重复提取一次，合并收集液，在 40°C 水浴中旋转浓缩至体积小于 1.0 mL。转移至 10 mL 刻度离心管中，用 2 mL 乙腈洗涤旋转蒸发瓶二次，合并至刻度离心管中，然后上样于已活化的阳离子交换柱（4.19），弃滤液。先后用 5 mL 乙腈二氯甲烷混合液（80+20）和 5 mL 甲醇洗涤，弃去流出液。用 10 mL 洗脱液（4.20）洗脱，收集于刻度试管中，于 40°C 用氮气吹干。然后用 2.0 mL 样品定容液（4.21）溶解残渣，经 0.2 μm 滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱仪测定。

6.2 测定

6.2.1 色谱条件

- a) 色谱柱： C_{18} 柱（150 $\text{mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ ）或相当者；
- b) 流动相：A 相为：含 0.1% 甲酸的乙腈溶液，B 相为含 0.1% 甲酸的 50 mmol/L 乙酸铵溶液， $\text{A}+\text{B}=85+15(\text{v/v})$ ；

- c) 流速：0.25 mL/min;
- d) 柱温：35℃;
- e) 进样量：20 μL;

6.2.2 质谱条件

- a) 离子源：电喷雾ESI离子源;
- b) 扫描方式：正离子扫描;
- c) 检测方式：多反应监测MRM;
- d) 雾化气、气帘气、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;
- e) 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;
- f) 监测离子对情况

表1 孔雀石绿和无色孔雀石绿的离子对

名称	定量离子对 (m/z)	非定量离子对 (m/z)
孔雀石绿	329/313	329/208
无色孔雀石绿	331/315	331/239
氘代孔雀石绿	334/318	
氘代无色孔雀石绿	337/322	

6.2.3 液相色谱-串联质谱测定

6.2.3.1 定性测定

在相同试验条件下，样品中待测物与同时检测的标准物质具有相同的保留时间，并且非定量离子对与定量离子对色谱峰面积的比值相对偏差小于20%，则可判定为样品中存在该残留。

6.2.3.2 定量测定

按照上述液相色谱-串联质谱条件测定样品和混合标准工作溶液（6.1.2 和 4.25），以色谱峰面积按内标法定量，以氘代孔雀石绿为内标物计算孔雀石绿残留量，以氘代无色孔雀石绿为内标物计算无色孔雀石绿残留量。在上述条件下，孔雀石绿、无色孔雀石绿以及内标物氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿标准物质的提取离子流图参见附录 A 中图 A.1。

6.3 空白试验

除不称取试样外，均按上述步骤进行。

6.4 结果计算

测定结果可由计算机按内标法自动计算，也可按式（1）计算，计算结果需扣除空白值。

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

式中：

- X ——样品中待测组分残留量，单位为微克每千克（μg/kg）;
- C ——孔雀石绿或无色孔雀石绿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 ——样液中孔雀石绿或无色孔雀石绿的峰面积;
- A_s ——孔雀石绿或无色孔雀石绿标准工作溶液的峰面积;
- 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）;
- W ——样品称样量，单位为克（g）。

注：报告测定结果至小数二位。

7 方法检测限、准确度和精密度

7.1 方法检测限

本方法在水产品孔雀石绿和无色孔雀石绿的检测限均为0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

7.2 准确度

本方法在0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~4.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的回收率均大于70%。

7.3 精密度

本方法的相对标准偏差要求 $\leq 20\%$ 。

附 录 A

(资料性附录)

孔雀石绿、无色孔雀石绿、氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿标准物质的提取离子流图

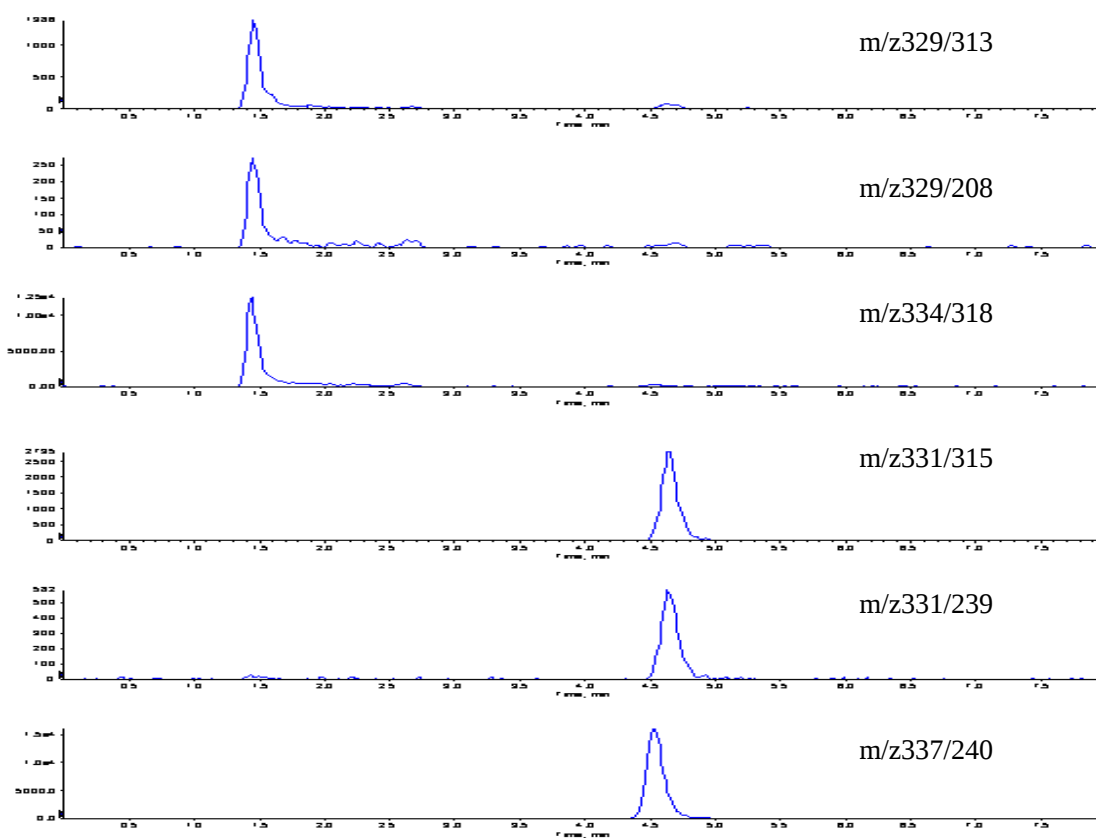


图 A.1 孔雀石绿、无色孔雀石绿、氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿标准物质的提取离子流图