



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 3021—2004

水产品中孔雀石绿残留量的测定 液相色谱法

Determination of malachite green residues in fishery products
High-performance of liquid chromatography

2004-01-07 发布

2004-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准起草单位：中国海洋大学、国家水产品质量监督检验中心。

本标准主要起草人：林洪、李兆新、王联珠、江洁、邱续建、李晓川。

水产品中孔雀石绿残留量的测定 液相色谱法

1 范围

本标准规定了水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿残留量的液相色谱测定方法。

本标准适用于水产品可食部分中孔雀石绿和无色孔雀石绿残留量的检测。

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

孔雀石绿 malachite green

属于三苯甲烷染料类,分子式为 $C_{23}H_{25}ClN_2$,绿色结晶体。

注:孔雀石绿的结构式见附录 A。

3.2

无色孔雀石绿 leucomalachite green

N,N-二甲基苯胺,孔雀石绿在水生生物体中的主要代谢产物,分子式为 $C_{23}H_{26}N_2$ 。

注:无色孔雀石绿的结构式见附录 A。

4 原理

以乙酸胺盐溶液和乙腈提取样品中的孔雀石绿和无色孔雀石绿后,经过液-液萃取,固相萃取,用接有氧化柱的 C_{18} 柱进行高效液相色谱分析,外标法定量。

5 试剂

5.1 所有试剂应无干扰峰,应选择优级纯或色谱纯的试剂,分析纯试剂应重蒸。

5.2 孔雀石绿及无色孔雀石绿标准品:孔雀石绿纯度 $\geq 90\%$,无色孔雀石绿纯度 $\geq 90\%$ 。

5.3 乙腈:色谱纯。

5.4 二氯甲烷:分析纯。

5.5 盐酸羟胺溶液:0.25 g/mL。

5.6 二甘醇:分析纯。

5.7 乙酸胺溶液:0.1 mol/L(pH4.5),0.125 mol/L(pH4.5)。

5.8 对甲苯磺酸溶液:0.05 mol/L。

5.9 碱性氧化铝:分析纯,粒度 0.071 mm~0.150 mm。

5.10 中性氧化铝:分析纯,粒度 0.071 mm~0.150 mm。

5.11 丙基磺酸阳离子树脂:PRS(propylsulfonic acid),40 μm 。

5.12 孔雀石绿标准溶液:准确称取孔雀石绿 0.100 0 g,用乙腈溶解,定容于 100 mL 容量瓶中,使成浓度为 1 mg/mL 的标准溶液,再用乙腈稀释成 0.1 μ g/mL 的工作溶液。该溶液应避光保存。

5.13 无色孔雀石绿标准溶液:准确称取无色孔雀石绿 0.100 0 g,用乙腈溶解,定容于 100 mL 容量瓶中,使成浓度为 1 mg/mL 的标准溶液,再用乙腈稀释成 0.1 μ g/mL 的工作溶液。该溶液应避光保存。

5.14 二氧化铅:分析纯。

5.15 硅藻土:精制工业硅藻土。

5.16 水:应符合 GB/T 6682 的要求。

6 仪器

6.1 高效液相色谱仪:配可变波长检测器。

6.2 电子天平:感量 0.0001 g。

6.3 匀浆机。

6.4 离心机。

6.5 振荡器。

6.6 旋转蒸发器。

6.7 固相萃取柱:PRS 柱,中性氧化铝柱。

6.8 色谱柱: C_{18} 柱。

6.9 柱后氧化柱:柱内填料:二氧化铅:硅藻土=1:1。

7 操作方法

7.1 样品处理

7.1.1 取样

鱼去鳞、皮,沿背脊取肌肉;虾去头、壳,取可食肌肉部分;蟹、甲鱼等取可食部分。所取样品切为不大于 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的小块后混匀。

7.1.2 称取样品 10 g~20 g(精确到 0.001 g),置于匀浆杯中,向杯中依次加 3 mL 盐酸羟胺溶液、5 mL 对甲苯磺酸溶液和 20 mL 0.1 mol/L 的乙酸铵溶液,匀浆 2min,转移到 250 mL 三角瓶中,用 60 mL 乙腈洗涤匀浆杯,洗涤液合并到三角瓶中,加入 20 g 碱性氧化铝,用振荡器振荡 5 min,转移至 4 支 50 mL 离心管内,30 mL 乙腈洗涤三角瓶后转移到离心管中,4 000 r/min 离心 15 min。

7.2 分离纯化

7.2.1 液-液萃取

7.2.1.1 将离心管上清液移入分液漏斗中,向离心管中加入乙腈,洗涤,离心(4 000 r/min,15 min),合并上清液到分液漏斗中,并加入 100 mL 水、50 mL 二氯甲烷和 2 mL 二甘醇,剧烈振摇分液漏斗,静置 1 h。

7.2.1.2 用蒸发瓶收集下层液体后,再往分液漏斗加入 50 mL 二氯甲烷,振摇,静置约 10 min,待其分层后收集下层液体于同一蒸发瓶。将收集液在 35 $^{\circ}$ C 下减压旋转蒸发(注意:开始时温度不要直接升到 35 $^{\circ}$ C,以免爆沸)至体积约 2 mL~3 mL。

7.2.2 固相柱萃取

7.2.2.1 固相柱制备

采用中性氧化铝(1 g)、PRS 填料(0.5 g)分别装填两只固相萃取柱,按中性氧化铝柱在前、PRS 柱在后的顺序将两柱串联。

7.2.2.2 上样

使用前用 5 mL 乙腈预洗两柱,然后将 7.2.1.2 浓缩液体加入 5 mL 乙腈混匀后,缓慢加入中性氧化铝柱内(注意:不要引起柱表面填料浮动。)再用 5 mL 乙腈洗涤蒸发瓶两次,两次洗涤液均加入柱内,最后用 5 mL 乙腈洗涤两柱。

7.2.2.3 洗脱收集

弃去中性氧化铝柱,用 2 mL 水洗 PRS 柱,洗脱液弃去;加入 0.5 mL 乙腈:乙酸铵溶液(0.1 mol/L, pH4.5)=1:1,洗脱液弃去;再加入 2 mL 乙腈:乙酸铵溶液(0.1 mol/L, pH4.5)=1:1,收集该洗脱组分,定容到 2 mL,经聚四氟乙烯膜(孔径 0.45 μm)过滤,待上机分析。

7.3 样品测定

7.3.1 测定条件

7.3.1.1 色谱柱: C₁₈柱, 250 mm×4.6 mm; 柱后氧化柱: 35 mm×4.6 mm。

7.3.1.2 流动相: 乙腈:乙酸铵溶液(0.125 mol/L, pH4.5)=80:20; 流速: 2 mL/min。

7.3.1.3 柱温: 35℃。

7.3.1.4 进样量: 50 μL。

7.3.1.5 检测波长: 588 nm 或 618 nm。

7.3.2 色谱分析

分别注入 50 μL 浓度为 0.1 μg/mL 的孔雀石绿溶液、无色孔雀石绿工作溶液及样品提取溶液于液相色谱仪中,按上述色谱条件进行色谱分析,记录峰面积,响应值均应在仪器检测的线性范围之内。根据标准样品的保留时间定性,外标法定量。标准品色谱图见附录 B。

8 结果

8.1 计算

样品中孔雀石绿、无色孔雀石绿的含量按公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——样品中孔雀石绿(无色孔雀石绿)含量,单位为微克每千克(μg/kg);

C_s ——标准溶液中孔雀石绿(无色孔雀石绿)含量,单位为微克每毫升(μg/mL);

A ——试样液中孔雀石绿(无色孔雀石绿)的峰面积;

V ——样品提取物溶液体积,单位为毫升(mL);

A_s ——标准溶液中孔雀石绿(无色孔雀石绿)的峰面积;

m ——样品重量,单位为克(g)。

8.2 方法回收率

本方法的回收率≥70%。

8.3 方法检测限

本方法检测限:孔雀石绿为 2 μg/kg;无色孔雀石绿为 4 μg/kg。

8.4 批间方法变异系数

本方法变异系数≤15%。

8.5 方法的线性范围

本方法的线性范围:孔雀石绿标准液 0.01 μg/mL ~ 0.40 μg/mL;无色孔雀石绿标准液 0.02 μg/mL ~ 0.40 μg/mL。

附 录 A
(资料性附录)

孔雀石绿和无色孔雀石绿的结构式

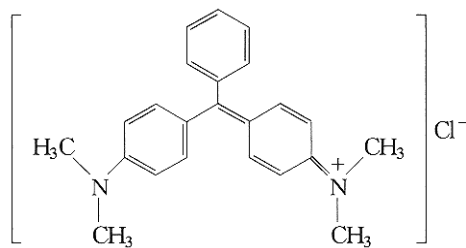


图 A.1 孔雀石绿(盐酸盐)结构式

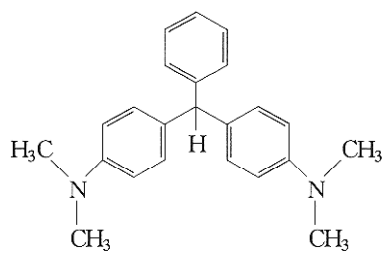
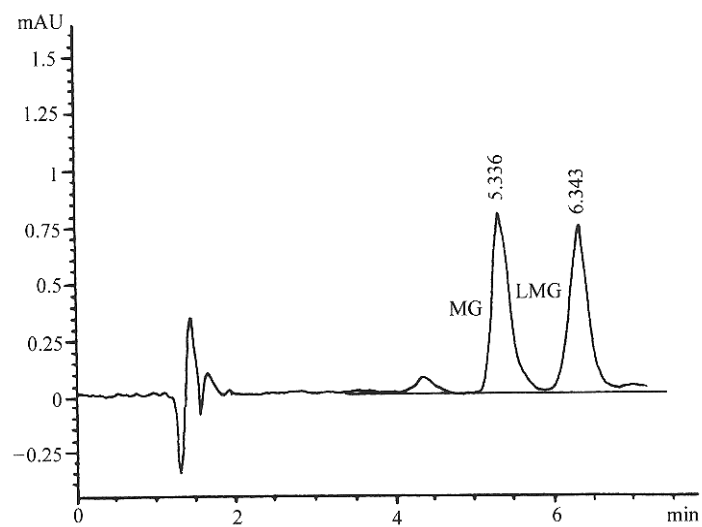


图 A.2 无色孔雀石绿结构式

附录 B
(资料性附录)

孔雀石绿和无色孔雀石绿标准品的液相色谱图



MG:孔雀石绿;LMG:无色孔雀石绿