

=ICS 67.120.30

CCS X 20



中华人民共和国国家标准

GB×××××-××××

代替 GB/T 19857-2005

食品安全国家标准 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的 测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-
Determination of Malachite Green
and Crystal Violet residues in aquatic products liquid by
chromatography-tandem mass spectrometry method
(公开征求意见稿)

×××-××-××

××××-××-××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。

本文件替代 GB/T 19857-2005《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定》。

本文件与 GB/T 19857-2005 相比，主要变化如下：

a) 结晶紫以结晶紫- D_6 为内标、隐色结晶紫以隐色结晶紫- D_6 为内标，进行定量测定。

本文件及其所代替标准的历次版本发布情况为：

—GB/T 19857-2005

食品安全国家标准

水产品中孔雀石绿和结晶紫多残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了鲜活水产品及其加工水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物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、鱼干、虾干、鱼糜等可食组织中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫残留量的测定，其他鲜活水产品及其加工水产品可参照执行。

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

鲜活水产品采用乙腈提取，提取液经中性氧化铝固相萃取柱净化；加工水产品采用乙腈-乙酸铵缓冲液提取，二氯甲烷液液分配，提取液经中性氧化铝固相萃取柱和阳离子交换固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN)：色谱纯。

5.1.2 甲酸(HCOOH)：色谱纯。

5.1.3 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)：色谱纯。

5.1.4 二氯甲烷(CH_2Cl_2)。

5.1.5 冰醋酸(CH_3COOH)。

5.1.6 对甲苯磺酸($\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$)。

5.1.7 盐酸羟胺(NH_2CHOH)。

5.2 溶液配制

5.2.1 5 mol/L 乙酸铵缓冲液：称取 38.5 g 乙酸铵，用水溶解并稀释至 100 mL，用冰醋酸调节 pH 至 7.0 ± 0.1 。

5.2.2 1.0 mol/L 对甲苯磺酸溶液：称取 17.2 g 对甲苯磺酸，用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.3 0.25 g/mL 盐酸羟胺溶液：称取 25 g 盐酸羟胺，用水溶解并稀释至 100 mL。

5.2.4 2 % 甲酸溶液：取甲酸 2 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。

- 5.2.5 含 0.1 % 甲酸的乙酸铵溶液：称取 0.39 g 乙酸铵，加入 1 mL 甲酸，用水稀释到 1 000 mL。
- 5.2.6 含 5 % 5 mol/L 乙酸铵缓冲液的甲醇溶液：取 5 mol/L 乙酸铵缓冲液 5 mL，用甲醇稀释至 100 mL。
- 5.2.7 含 0.1 % 甲酸乙腈溶液：取甲酸 1 mL，用乙腈稀释至 1 000 mL。
- 5.2.8 5 % 乙腈溶液：移取乙腈 5 mL，用水溶解并稀释至 100 mL。

5.3 标准品

孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫，纯度均大于 97.0 %；孔雀石绿-D₅、隐色孔雀石绿-D₆、结晶紫-D₆、隐色结晶紫-D₆，纯度均大于 97.0 %。化学分子式和 CAS 号见附录 A 表 A.1。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：精密称取孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫标准品各适量(相当于各活性成分约 10mg)，分别于 100 mL 棕色容量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 100 µg/mL 的标准储备溶液，于-18 °C冰箱内避光保存，有效期为 6 个月。

5.4.2 内标标准储备液：精密称取孔雀石绿-D₅、隐色孔雀石绿-D₆、结晶紫-D₆、隐色结晶紫-D₆ 同位素内标标准品各适量(相当于各活性成分约 10mg)，分别于 100 mL 棕色容量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 100 µg/mL 的内标标准储备溶液，于-18 °C冰箱内避光保存，有效期为 6 个月。

5.4.3 混合标准工作液：分别精密量取标准储备液 100 µL，于 100 mL 棕色容量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 100 ng/mL 的标准工作溶液，于-18 °C冰箱内避光保存，有效期为 1 个月。

5.4.4 混合内标工作液的配制：分别精密量取内标标准储备液 100 µL，于 100 mL 棕色容量瓶中，用乙腈溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 100 ng/mL 的标准工作溶液，于-18 °C冰箱内避光保存，有效期为 1 个月。

5.5 材料

- 5.5.1 中性氧化铝固相萃取柱：1 g/3 mL，使用前用 5 mL 乙腈活化。
- 5.5.2 阳离子交换固相萃取柱：60 mg/3 mL，使用前用 3 mL 乙腈，3 mL 2 % 甲酸溶液活化。
- 5.5.3 尼龙微孔滤膜：0.22 µm。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 电子天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。
- 6.3 均质器。
- 6.4 漩涡混合器。
- 6.5 离心机：转速不低于 4 000 r/min。
- 6.6 超声波震荡器。
- 6.7 旋转蒸发仪。
- 6.8 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按GB/T 30891水产品抽样规范的要求制样。

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

——取均质后的供试样品，作为供试试样。

——取均质后的空白样品，作为空白试样。

——取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18 °C以下保存。

8 测定步骤

8.1 鲜活水产品

8.1.1 提取

称取 (2 ± 0.05) g 样品于 50 mL 离心管中，加入 40 μ L 混合内标工作液，加入 10 mL 乙腈，以 10 000 r/min 先匀浆 2 min，再超声提取 10 min，以 3 000 r/min 离心 3 min，取上清转移至另一离心管中，残渣用 10 mL 乙腈重复提取一次，取上清液，合并提取液。

8.1.2 净化

移取 10 mL 提取液，过中性氧化铝柱，收集流出液，用 5 mL 乙腈淋洗固相萃取柱，收集全部流出液，40℃下旋转蒸发至近干，加入 2.0 mL 5 % 乙腈溶液，涡旋 30 s，过 0.22 μ m 滤膜，上机测定。

8.2 加工水产品

8.2.1 提取

称取 (5 ± 0.05) g 样品于 50 mL 离心管中，加入 100 μ L 混合内标工作液，加入 1 mL 0.25 g/mL 盐酸羟胺溶液，2 mL 1.0 mol/L 对甲苯磺酸溶液，2 mL 5 mol/L 乙酸铵缓冲液，加入 20 mL 乙腈，10 000 r/min 匀浆 2 min，超声提取 10 min，以 3 000 r/min 离心 3 min，将上清液转移到分液漏斗中，用 10 mL 乙腈重复提取一次，合并上清液。于分液漏斗中加入 20 mL 二氯甲烷，10 mL 水，振摇 2 min，收集下层二氯甲烷于梨形瓶中，用 10 mL 二氯甲烷重复提取一次，合并二氯甲烷层，于 40℃下旋转蒸发至近干。

8.2.2 净化

将中性氧化铝柱串接在阳离子交换柱上方，用 6 mL 乙腈分三次（每次 2 mL）溶解提取物（8.2.1），涡旋 30 s，依次过柱。用 2 mL 乙腈淋洗中性氧化铝柱，弃去中性氧化铝柱，依次用 2 % 甲酸溶液、3 mL 乙腈淋洗阳离子交换柱，抽干。用 4 mL 含 5 % 5 mol/L 乙酸铵缓冲液的甲醇溶液洗脱，收集洗脱液，用水定容至 10 mL，涡旋 30 s，过 0.22 μ m 滤膜，上机测定。

8.3 溶剂标准曲线的制备

精密量取混合标准工作液以及混合内标工作溶液，用 5 % 乙腈溶液溶解稀释，配制成 0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL 的标准曲线，其中内标含量为 2.0 ng/mL，临用前现配，供液相色谱-串联质谱测定。分别以待测物特征离子色谱峰的峰面积与对应内标物特征离子色谱峰的峰面积之比为纵坐标，相应的标准溶液浓度比为横坐标，绘制标准曲线。

8.4 测定

8.4.1 色谱参考条件

- a) C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 3.5 μ m)，或相当者；
- b) 柱温：35℃；
- c) 流速：0.4 mL/min；
- d) 进样量：10 μ L；
- e) 流动相 A：含 0.1 % 甲酸的乙酸铵溶液；
- f) 流动相 B：含 0.1 % 甲酸乙腈溶液；
- g) 梯度洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.0	95	5
1.5	40	60
3.0	2	98
10.0	2	98
10.5	95	5
15.0	95	5

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子化模式: 电喷雾离子源 (ESI), 多反应监测 (MRM);
- b) 正离子模式;
- c) 电喷雾电压(IS): 5500 V;
- d) 雾化气压力(GS1): 345 kPa;
- e) 气帘气压力(CUR): 138 kPa;
- f) 辅助气流速(GS2): 345 kPa;
- g) 离子源温度(TEM): 500 °C;
- h) 孔雀石绿、结晶紫、隐色孔雀石绿、隐色结晶紫及其内标物定性、定量离子对、去簇电压以及碰撞能量参考值见表 2。

表2 孔雀石绿、结晶紫、隐色孔雀石绿、隐色结晶紫及其内标物定性、定量离子对、去簇电压以及碰撞能量参考值

化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)	内标物
孔雀石绿	329.4/313.3 329.4/208.2	329.4/313.3	96	47 49	孔雀石绿- D ₅
隐色孔雀石绿	331.2/239.2 331.2/315.3	331.2/239.2	113	39 37	隐色孔雀石 绿- D ₆
结晶紫	372.4/356.3 372.4/328.3	372.4/356.3	108	50 50	结晶紫- D ₆
隐色结晶紫	374.3/358.4 374.3/238.3	374.3/358.4	104	39 44	隐色结晶紫 - D ₆
孔雀石绿-D ₅	334.4/318.3	334.4/318.3	96	50	--
隐色孔雀石绿- D ₆	337.4/240.3	337.4/240.3	113	40	
结晶紫- D ₆	378.4/362.2	378.4/362.2	108	51	
隐色结晶紫- D ₆	380.4/365.5	380.4/365.5	104	40	

8.5 测定法

8.5.1 定性测定

在相同测试条件下, 试样溶液中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫以及隐色结晶紫与其相对应内标的保留时间之比, 与标准溶液中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫以及隐色结晶紫与其相对应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%。

8.5.2 定量测定

取试样溶液和标准工作液, 作单点或多点校准, 按内标法定量, 试样溶液及标准工作液中目标物的响应值均应在仪器定量检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下, 标准溶液中特征离子质量色谱图见附录B附图B.1。

8.6 空白试验

取空白试样, 除不加药物外, 采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$X = \frac{C \times C_i \times A \times A_{si} \times V}{C_{si} \times A_i \times A_s \times m} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X—— 试样中待测组分的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

C—— 标准工作液待测组分的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

C_i —— 测试液中内标物的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

A —— 测试液中待测组分的峰面积；

A_{si} —— 标准工作液中内标物的峰面积；

V —— 试样溶液定容体积的数值，单位为毫升（ mL ）；

C_{si} —— 标准工作液中内标物的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

A_i —— 测试液中内标物的峰面积；

A_s —— 标准工作液中待测组分的峰面积；

m —— 试样质量，单位为g。

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

10 方法灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法鱼、虾、蟹、贝、鳖、鱼干、虾干、鱼糜中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫的检出限均为 $0.1 \mu\text{g/kg}$ ；定量限均为 $0.5 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法鱼、虾、蟹、贝、鳖、鱼干、虾干、鱼糜在 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{g/kg}$ 测定浓度水平上，孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫平均回收率范围均为 $80\% \sim 120\%$ 。

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 $\leq 20\%$ 。

附 录 A

(资料性附录)

孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫及其内标物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫及其内标物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

表A.1 孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫及其内标物中英文通用名称、化学分子式和CAS号

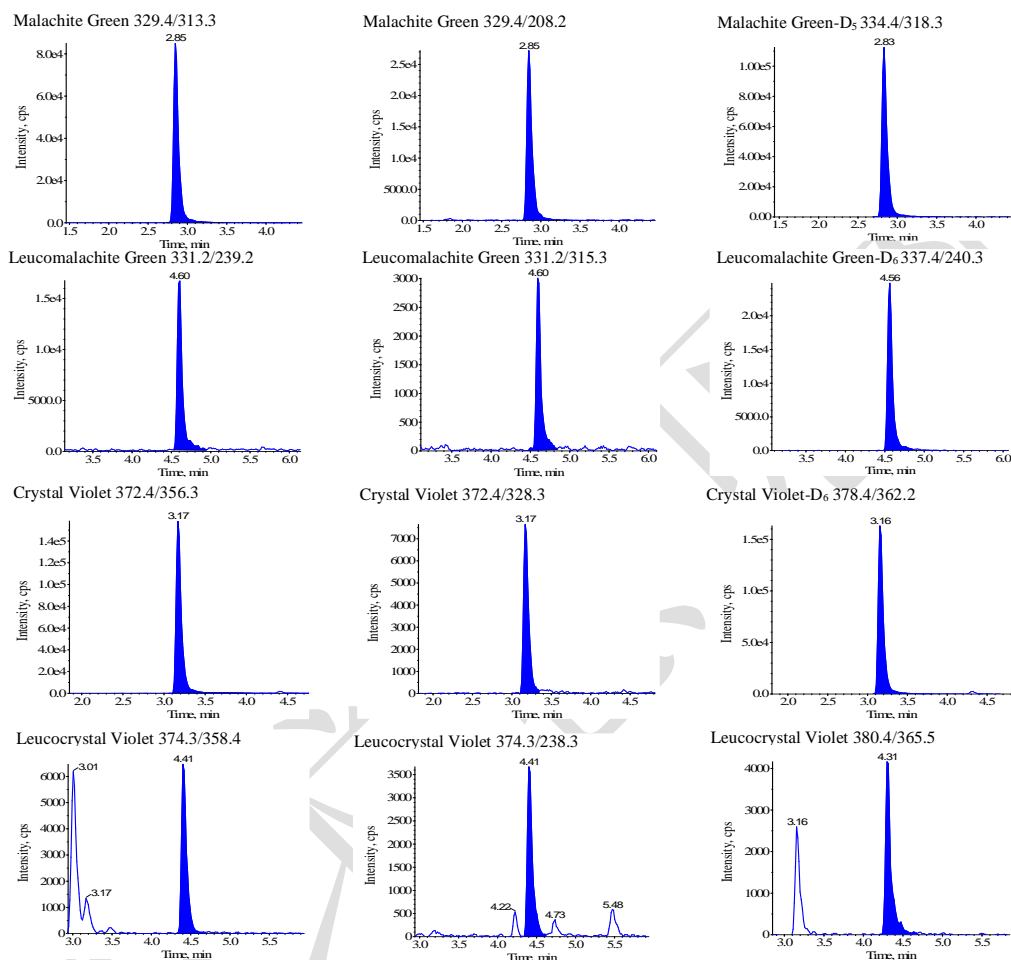
中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
孔雀石绿草酸盐	Malachite Green Oxalate	$C_{52}H_{54}N_4O_{12}$	13425-25-7
隐色孔雀石绿	Leucomalachite Green	$C_{23}H_{26}N_2$	129-73-7
结晶紫	Crystal Violet	$C_{25}H_{30}ClN_3$	548-62-9
隐色结晶紫	Leucocrystal Violet	$C_{25}H_{31}N_3$	603-48-5
孔雀石绿苦味酸盐-D ₅	Malachite Green Picrate-D ₅	$C_{29}H_{22}D_5N_5O_7$	1258668-21-1
隐色孔雀石绿-D ₆	Leucomalachite Green-D ₆	$C_{23}H_{20}D_6N_2$	1173021-13-0
结晶紫-D ₆	Crystal Violet-D ₆	$C_{25}H_{24}ClD_6N_3$	1266676-01-0
隐色结晶紫-D ₆	Leucocrystal Violet-D ₆	$C_{25}H_{25}D_6N_3$	1173023-92-1

附录 B

(资料性附录)

孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫以及隐色结晶紫的特征离子质量色谱图

标准溶液中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫的特征离子质量色谱图见图B. 1。



图B.1 标准溶液中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫及其内标特征离子质量色谱图
(1.0 ng/mL)