

解决方案

鲈鱼中孔雀石绿和结晶紫的测定

关键字

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；孔雀石绿；结晶紫

介绍

孔雀石绿是人工合成的有机化合物。其生产是由1摩尔分子的苯甲醛（Benzaldehyde）和2摩尔分子的二甲苯胺在浓盐酸混和下，加热缩合成隐色素碱（Leuco base），在酸性条件下加过氧化铅使其氧化，并在碱性液中沉淀出色素碱。它属于三苯甲烷型的绿色染料。孔雀石绿是有毒的三苯甲烷类化学物，既是染料，也是杀真菌、杀细菌、杀寄生虫的药物，长期超量使用可致癌，无公害水产养殖领域国家明令禁止添加。

对于孔雀石绿的检测现有两个国标，分别是GB 19857-2005水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的检测和GB 20361-2006水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定高效液相色谱荧光检测法。其中GB 19857-2005采用液质方法对孔雀石绿和结晶紫含量分别进行测定，加入内标进行内标校正。GB 20361-2006法中加入硼氢化钾将孔雀石绿和结晶紫的活泼双键还原，分别形成隐形孔雀石绿和隐性结晶紫，最后再以荧光检测二者的总量。孔雀石绿结构中的双键属于活泼的反应位点，常常容易发生氧化或者去甲基化，导致测试孔雀石绿比较困难。

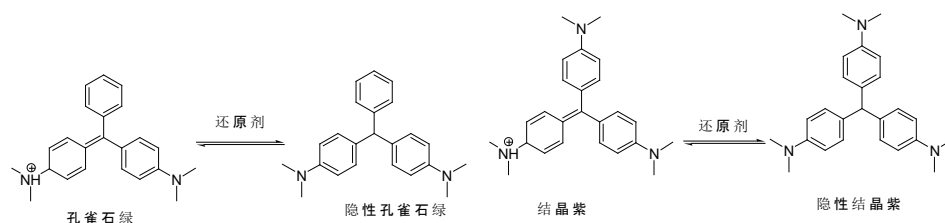


图-1.孔雀石绿和结晶紫的结构式及相互转化

本方法参考了上述方案的两种国标的前处理过程，采用不加入还原剂对样品进行前处理，加入内标物质后采用中性氧化铝固相萃取柱净化目标物，洗脱目标物后浓缩经液相色谱-质谱/质谱联用检测4种目标化合物。

1. 仪器和耗材

仪器

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol AH-30 全自动均质器

Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

高效液相色谱 (HPLC) Agilent 1260, 质谱检测器 (MS) Agilent 6410 或相当

耗材

中性氧化铝固相萃取柱 (RayCure AL-N, 1g/6mL, 货号: RC-204-16905)

试剂

甲醇 (HPLC); 乙腈 (HPLC); 水; 5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液: 称取 0.385 g 无水乙酸铵溶解于 1000 mL 水中, 冰乙酸调 pH 到 4.5; 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 (5 mmol/L) 用甲醇定容至 100 mL。

2. 标准曲线配制

将 1.0 µg/mL 的混合标准储备液和 0.1 µg/mL 的混合内标储备液取出, 于室温平衡后用 Auto Prep

200 全自动液体样品处理工作站配成浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 µg/L 的标准工作曲线。



3. 样品制备

称取 5.0g 已捣碎的鲈鱼样品于 50 mL 离心管中, 加入 200 µL 混合内标标准溶液 (100 ppb), 加入 11 mL 乙腈, 用 AH-30 全自动均质器以 10000 r/min 的速度匀浆提取 30 s 并洗涤刀头, 4000 r/min

离心 5 min, 上清液转移至 25 mL 试管中; 残渣加入乙腈后再提取一次, 合并上清液至 25 mL 试管中, 用乙腈定容至 25.0 mL, 摇匀备用。

净化

移取 5.0 mL 上述的样品溶液加至已活化的中性氧化铝柱, 5 mL 乙腈洗涤样品瓶, 收集全部流出液, 用 Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪在 40 °C 条件下浓缩至约 1 mL, 用乙腈准确定容至 1.0 mL,

再加入 1 mL 乙酸铵溶液 (5 mmol/L) 震荡混匀, 经滤膜过滤后供液相色谱-质谱/质谱测定。具体的固相萃取方法见图-3。

固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	Raykol Fotector Plus
固相萃取柱	中性氧化铝柱 (RayCure, 1g/6mL)

活化	乙腈
洗脱	乙腈



序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	Acetonitrile		10	5	2.8
2	活化	Acetonitrile	废液1	10	5	0.9
3	活化	Acetonitrile	废液1	10	5	0.9
4	上样		收集	2	25	14.1
5	清洗样品瓶	Acetonitrile	收集	40	5	3.5
6	气推		收集	10	5	1.1
7	结束					

图-2. Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

图-3. Fotector Plus固相萃取方法

4. 液质检测条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μm×21 mm×50mm
流速	0.300 mL/min
流动相	A: H ₂ O, B: Acetonitrile
柱温	35 °C
进样体积	10 μL
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350° C
簇电压	4000
雾化压力	35psi
梯度洗脱	0.0 min 乙腈 40%, 0-1.0 min 乙腈 80%, 1.0-4.0 min 乙腈 80%, 4.0 min-4.5 min 乙腈 40%, 4.5-7.0 min 乙腈 40%。

5. MRM 参数

表-1. 4 种化合物串联质谱检测参数

Compound Name	ISTD	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
隐性结晶紫	FALSE	374	358.2	40	160	33	7	Positive
	FALSE	374	253.1	40	160	37	7	Positive
	FALSE	374	238.1	40	160	29	7	Positive
结晶紫	FALSE	372	356.1	40	160	41	7	Positive
	FALSE	372	340.1	40	160	50	7	Positive
D6-LMG	TRUE	337.2	322.2	40	135	22	7	Positive
D5-MG	TRUE	334.2	318.2	40	135	40	7	Positive
隐性孔雀石绿	FALSE	331.2	316.2	40	135	22	7	Positive
	FALSE	331.2	239.2	40	135	35	7	Positive
孔雀石绿	FALSE	329.2	313.2	40	135	35	7	Positive

	FALSE	329.2	208.2	40	135	35	7	Positive
--	-------	-------	-------	----	-----	----	---	----------

Ps: 孔雀石绿和结晶紫采用 D5-MG 内标, 隐性结晶紫和隐性孔雀石绿采用 D5-LMG 内标。

6. 结果与讨论

为了验证该方法的回收率, 本实验向鲈鱼样品 (5 g) 中加入上述 4 种化合物标准品 (20 μ L, 1 mg/L) 和 2 种氘代孔雀石绿和氘代隐性孔雀石绿 (200 μ L, 0.1 mg/L) 作为内标进行加标回收验

证 (n=3)。数据如表-2 所示: 四种目标化合物的加标回收率均在 90-110%之间, RSD 值控制在 6%以内。说明该方法能够很好地运用于水产品样品中孔雀石绿和结晶紫的检测。

表-2. 鲈鱼样品的加标回收率及 RSD 值 (2 μ g/kg)

化合物 (Compound)	回收率 (%) 样品-1 Sample-1	回收率 (%) 样品-2 Sample-2	回收率 (%) 样品-3 Sample-3	平均回收率 Average Recoveries (%)	RSD (%)
孔雀石绿	102.36	106.15	108.05	105.52	2.75
结晶紫	97.98	98.60	94.09	96.89	2.52
隐性孔雀石绿	106.43	98.57	109.97	104.99	5.56
隐性结晶紫	107.64	103.46	109.87	106.99	3.04

7. 总结

本方法参考了 GB19857-2005、GB20361-2006 两种国标的前处理过程, 采用不加入还原剂对样品进行前处理, 加入内标物质后采用中性氧化铝固相萃取柱净化目标物, 洗脱目标物后浓缩经液相色谱-质谱/质谱联用检测 4 种目标化合物。

其中 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作, 可以排除人员操作带来的误差, 从活化到上样、洗脱一步到位, 六通道同时进行; 同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理, 最多一天能够处理 180 个样品, 省时省力, 真正为批量检测提供帮助。

使用 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站能够实现混标制备、标准曲线制备、样品添加和

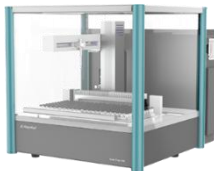
分液等液体样品处理功能, 全程无需人员值守, 极大减轻工作量并且保护实验人员的身体健康; 同时仪器程序化运行可以有效避免人为误差, 保证曲线的精密性和准确性。

AH-30 全自动均质器可以自动完成 16 个样品均质, 均质后能够自动清洗刀头, 清洗刀头时可以采用水洗、超声洗和溶剂洗等多级清洗组合, 有效防止交叉污染, 且全程无需人工干预。

Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪通过独特的针自动追随液面技术可以极大地减少氮气使用量, 同时避免手动氮吹需要经常去调节氮吹针高度带来的麻烦。



高通量全自动固相萃取仪
净化



全自动液体样品处理工作站
标液配制



全自动均质器
均质



全自动平行浓缩仪
浓缩



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

智能化、自动化实验室整体解决方案

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020 年 10 月版