

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中的孔雀石绿和结晶紫

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定水产品中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫和隐色结晶紫的方法。样品经提取后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行内标法定量分析。样品在 2 分钟内得到快速分离和检测。孔雀石绿和隐色孔雀石绿在 0.5~200 $\mu\text{g/L}$ ，结晶紫在 0.5~500 $\mu\text{g/L}$ ，隐色结晶紫在 0.1~200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.999 以上；对 1 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 2.925% 和 0.160% 之下，系统精密度良好；方法定量限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ ，优于国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》中 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 的要求。

关键词：孔雀石绿 结晶紫 水产品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

孔雀石绿是一种带有金属光泽的绿色晶体，又名碱性绿、严基块绿、孔雀绿，其既是杀真菌剂，又是染料，易溶于水，溶液呈蓝绿色；溶于甲醇、乙醇和戊醇。长期以来，渔民都用它来预防鱼的水霉病、鳃霉病、小瓜虫病等，而且为了使鳞受损的鱼延长生命，在运输过程中和存放池内，也常使用孔雀石绿。科研结果表明，孔雀石绿在鱼内残留时间很长，且其具有高毒素、高残留和致癌、致畸、致突变等副作用，鉴于此，许多国家均将孔雀石绿列为水产养殖禁用

药物。我国于 2002 年 5 月也将孔雀石绿列入《动物食品禁用的兽药及其化合物清单》中。但是，因为其价格便宜，而且其治疗水霉病等的功效是其他药物所“不能替代”的，所以利益的驱动使得孔雀石绿并没有退出渔业市场。本文依据国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定了水产品中孔雀石绿和结晶紫。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪和 LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm

流动相：A—5 mmol/L 醋酸铵加 0.05% 甲酸水溶液；B—乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式： 梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	95
1.80	Pumps	Pump B Conc.	95
1.81	Pumps	Pump B Conc.	50
3.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器： LCMS-8030
 离子源： ESI(+)
 离子源接口电压： 4.5 kV
 雾化气： 氮气 3.0 L/min
 干燥气： 氮气 15 L/min
 碰撞气： 氩气
 脱溶剂管温度： 250℃
 加热模块温度： 400℃
 扫描模式： 多反应监测（MRM）
 驻留时间： 10 ms
 延迟时间： 3 ms
 MRM 参数： 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	孔雀石绿	329.20	313.15*	-20	-40	-23
			208.10	-30	-35	-16
2	隐色孔雀石绿	331.20	316.20*	-10	-20	-24
			239.15	-16	-30	-29
3	结晶紫	372.25	356.20*	-19	-40	-27
			251.20	-11	-35	-19
4	隐色结晶紫	374.25	359.20*	-11	-25	-28
			238.15	-11	-30	-18
5	D ₅ -孔雀石绿	334.25	318.20	-30	-40	-23
6	D ₆ -隐色孔雀石绿	337.25	322.25	-10	-20	-25

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：

用乙腈配制 100 µg/L 的混合标准中间溶液，用乙腈-5 mmol/L 乙酸铵水溶液（1/1，v/v）稀释成浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50、100、200 和 500 µg/L 的混合标准工作，每毫升该混合标准工作溶液中含有氘代孔雀石绿和氘代隐色孔雀石绿各 2 ng。

样品前处理方法：

同国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

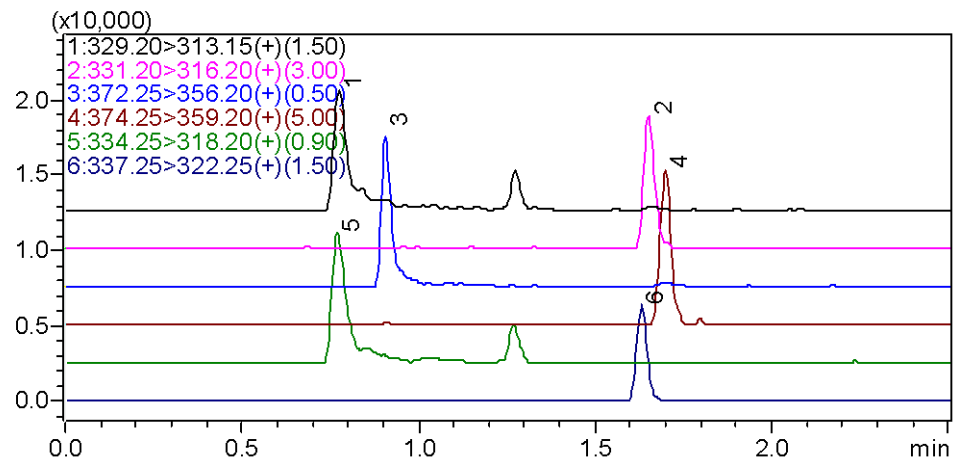


图 1 1 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱图

(1: 孔雀石绿; 2: 隐色孔雀石绿; 3: 结晶紫; 4: 隐色结晶紫; 5: D₅-孔雀石绿; 6: D₆-隐色孔雀石绿)

2.2 线性关系

将浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50、100、200 和 500 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，孔雀石绿和结晶紫以氘代孔雀石绿为内标物质计算，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质计算；以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线如图 2~5 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

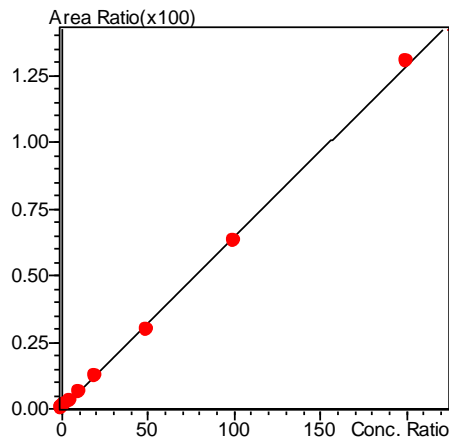


图 2 孔雀石绿的标准工作曲线

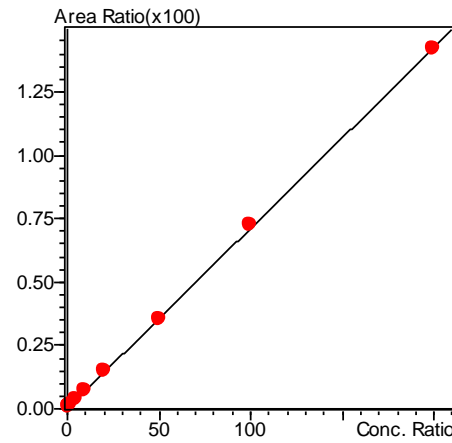


图 3 隐色孔雀石绿的标准工作曲线

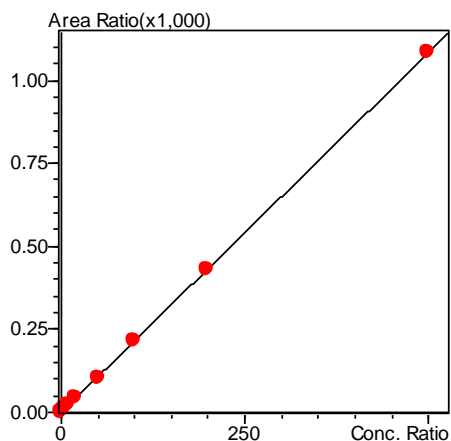


图 4 结晶紫的标准工作曲线

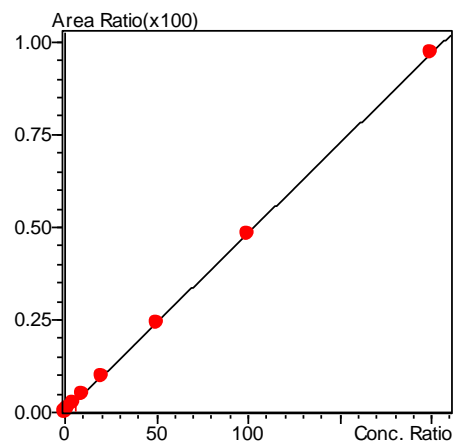


图 5 隐色结晶紫的标准工作曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	相关系数 r
1	孔雀石绿	$Y = (0.659584)X$	0.5~200	0.9997
2	隐色孔雀石绿	$Y = (0.71228)X$	0.5~200	0.9996
3	结晶紫	$Y = (2.16652)X$	0.5~500	0.9999
4	隐色结晶紫	$Y = (0.484806)X$	0.1~200	0.9999

2.3 精密度实验

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (1 μg/L)		RSD% (50 μg/L)		RSD% (200 μg/L)	
	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.
孔雀石绿	1.709	0.177	0.747	0.083	2.373	0.160
隐色孔雀石绿	2.925	0.088	1.293	0.095	1.504	0.097
结晶紫	1.385	0.055	0.680	0.039	0.825	0.084
隐色结晶紫	2.113	0.153	1.832	0.096	1.351	0.071

对 1、50、200 μg/L 混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.680%~2.925% 和 0.039%~0.160% 之间，仪器精密度良好。

2.4 灵敏度实验

为了考察方法的灵敏度，在虾基质空白样品中添加 0.1 μg/kg 的混合标样，得到色谱图如图 6 和图 7 所示，样品的方法定量限为 0.1 μg/kg，优于国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》中 0.5 μg/kg 的要求。

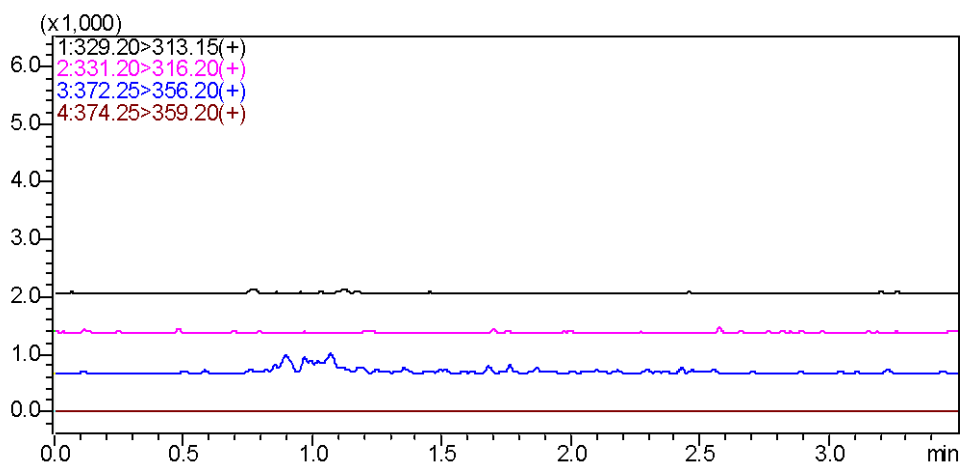


图 6 虾样品的 MRM 色谱图

(1: 孔雀石绿; 2: 隐色孔雀石绿; 3: 结晶紫; 4: 隐色结晶紫)

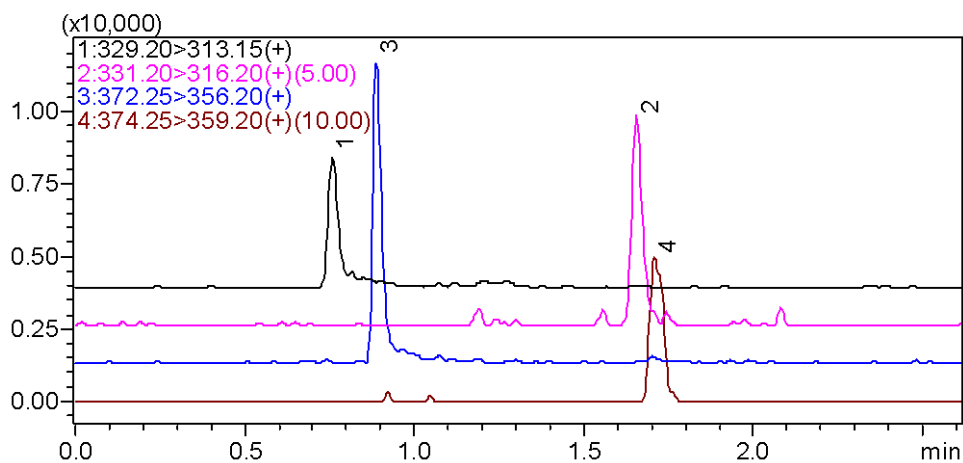


图 7 0.1 µg/kg 加标虾样品的 MRM 色谱图

(1: 孔雀石绿; 2: 隐色孔雀石绿; 3: 结晶紫; 4: 隐色结晶紫)

3. 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中孔雀石绿和结晶紫的方法。该方法分析速度快，精密度良好；校准曲线相关系数均在 0.999 以上；方法定量限为 0.1 µg/kg，优于国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》中 0.5 µg/kg 的要求。