

## 解决方案 水产品中孔雀石绿和结晶紫的测定解决方案

### 关键词

全自动固相萃取；均质器；浓缩仪；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。

本品针对鱼体水霉病和鱼卵的水霉病有特效，现市面上还暂无针对水霉病能够短时间解决水霉病的特效药物，这也是为什么这个产品在水产业禁止这么多年还禁而不止，水产业养殖户挺而走险继续违规使用孔雀石绿的根本原因，其他方面，也可以很好的用于鳃霉病、小瓜虫病、车轮虫病、指环虫病、斜管虫病、三代虫病，和其他一些细菌性疾病都有很好的效果。农业部以将孔雀石绿列为水产上的禁药，非食用鱼的观赏鱼还可以使用。

对于孔雀石绿的检测现有两个国标，分别是GB19857-2005水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的检测和GB20361-2006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GB19857-2005采用液质方法对四种孔雀石绿含量分别进行测定，加入内标进行内标校正。GB20361-2006法中加入硼氢化钾将孔雀石绿和结晶紫的活泼双键还原，分别形成隐性孔雀石绿和隐性的孔雀石绿，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。

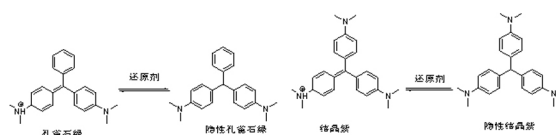


图1. 孔雀石绿和结晶紫的结构式及相互转化

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. 仪器与试剂

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol AH-30 全自动均质器

Raykol MPE 高通量真空平行浓缩仪

Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

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

中性氧化铝固相萃取柱 (RayCure AL-N, 1g/3

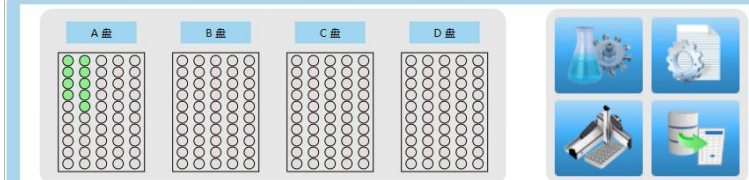
mL)

甲醇 (HPLC); 乙腈 (HPLC); 水

5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液: 称取 0.385g 无水乙酸铵溶解于 1000mL 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. 标准溶液的配制

将 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的混合标准储备液和 0.1  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/L}$  的标准工作曲线。



序号	命令	源液位	源液浓度	源液体积(mL)	目标位	目标浓度	目标体积(mL)	溶剂	洗针溶剂
1	填充管路						3.00	乙腈	
2	直接稀释	A1	1000.00	1.50	A3	100.00	1.00	乙腈	乙腈
3	直接稀释	A3	100.00	1.00	A4	10.00	1.00	乙腈	乙腈
4	内标曲线	A4	10.00	1.00	A11	0.50	1.00	乙腈	乙腈
5	内标曲线	A4	10.00	1.00	A12	1.00	1.00	乙腈	乙腈
6	内标曲线	A1	100.00	1.00	A13	2.00	1.00	乙腈	乙腈
7	内标曲线	A1	100.00	1.00	A14	5.00	1.00	乙腈	乙腈
8	内标曲线	A1	100.00	1.00	A15	10.00	1.00	乙腈	乙腈

## 3. 样品前处理

### 3.1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	睿科Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪
固相萃取柱	中性氧化铝柱(RayCure, 1 g/3 mL)
活化	乙腈
洗脱	乙腈

### 3.2 提取

称取 5.0g 已捣碎的样品于 50 mL 离心管中, 加入 200  $\mu\text{L}$  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 5min, 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。

### 3.3 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, 5mL 乙腈洗涤样品瓶, 收集全部流出液, 用 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪在 40  $^{\circ}\text{C}$  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)。



图 2.Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

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 3.Fotector Plus 固相萃取方法

## 4. 检测条件

### 4.1 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 $\mu$ m $\times$ 21 mm $\times$ 50mm
流速	0.300 mL/min
流动相	A: H <sub>2</sub> O, B: Acetonitrile
柱温	35 $^{\circ}$ C
进样体积	10 $\mu$ L
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI <sup>+</sup>
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 $^{\circ}$ C
簇电压	4000
雾化压力	35 psi
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%。

### 4.2 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

注：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。

## 5. 结果与结论

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  $\mu$ L, 1 mg/L）和 2 种氘代孔雀石绿和氘代隐性孔雀石绿（20

$\mu$ L, 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. 鲜活水产品的加标回收率及 RSD 值（40  $\mu$ 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

## 6. 解决方案的优势

睿科 AH-30 全自动均质器实现多任务的高通量均质，完全取代了手动均质的过程。一次最多处理 32 个样品，大大提高工作效率。

睿科 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。

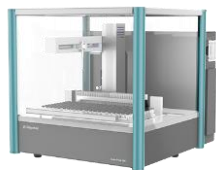
Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用

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。

MPE 真空平行浓缩仪/AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪，大大地提高了样品前处理效率，真正完全解放实验室人员劳动。



全自动均质器  
均质



全自动液体样品处理工作站  
标曲配制



高通量真空平行浓缩仪  
预浓缩



全自动固相萃取仪  
净化



全自动平行浓缩仪  
浓缩



睿科集团股份有限公司  
RayKol Group Corp., Ltd.

## 自动化样品前处理解决方案领先供应商

网址: [www.raykol.com](http://www.raykol.com)

电话: 400-885-1816

邮箱: [info@raykol.com](mailto: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 5 月版