



中华人民共和国国家标准

GB/T 20361—2006

水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法

Determination of malachite green and gentian violet residues in fishery products—
High performance liquid chromatography with fluorescence detector

2006-06-21 发布

2006-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国水产科学研究院、农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心（舟山）、国家水产品质量监督检验测试中心、农业部水产品质量监督检验测试中心（上海）。

本标准主要起草人：郑斌、赵红萍、冷凯良、刘士忠、于慧娟、耿霞、陈雪昌、蔡友琼、黄冬梅、钟志、冯敬宾。

水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定

高效液相色谱荧光检测法

1 范围

本标准规定了水产品中孔雀石绿(Malachite green, MG)及其代谢物隐色孔雀石绿(Leucomalachite green, LMG)残留总量、结晶紫(Gentian violet, GV)及其代谢物隐色结晶紫(Leucogentian violet, LGV)残留总量的高效液相色谱荧光测定方法。

本标准适用于水产品可食部分中孔雀石绿和结晶紫残留的测定。

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(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

3 原理

样品中残留的孔雀石绿或结晶紫用硼氢化钾还原为其相应的代谢产物隐色孔雀石绿或隐色结晶紫,乙腈-乙酸铵缓冲混合液提取,二氯甲烷液液萃取,固相萃取柱净化,反相色谱柱分离,荧光检测器检测,外标法定量。

4 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 一级水的标准。

- 4.1 乙腈:色谱纯。
- 4.2 二氯甲烷。
- 4.3 酸性氧化铝:分析纯,粒度 0.071 mm~0.150 mm。
- 4.4 二甘醇。
- 4.5 硼氢化钾。
- 4.6 无水乙酸铵。
- 4.7 冰乙酸。
- 4.8 氨水。
- 4.9 硼氢化钾溶液[0.03 mol/L]:称取 0.405 g 硼氢化钾于烧杯中,加 250 mL 水溶解,现配现用。
- 4.10 硼氢化钾溶液[0.2 mol/L]:称取 0.54 g 硼氢化钾于烧杯中,加 50 mL 水溶解,现配现用。
- 4.11 20%盐酸羟胺溶液:溶解 12.5 g 盐酸羟胺在 50 mL 水中。
- 4.12 对-甲苯磺酸溶液[0.05 mol/L]:称取 0.95 g 对-甲苯磺酸,用水稀释至 100 mL。
- 4.13 乙酸铵缓冲溶液[0.1 mol/L]:称取 7.71 g 无水乙酸铵溶解于 1 000 mL 水中,氨水调 pH 到 10.0。
- 4.14 乙酸铵缓冲溶液[0.125 mol/L]:称取 9.64 g 无水乙酸铵溶解于 1 000 mL 水中,冰乙酸调 pH 到 4.5。
- 4.15 酸性氧化铝固相萃取柱:500 mg, 3 mL。使用前用 5 mL 乙腈活化。
- 4.16 Varian PRS 柱或相当者:500 mg, 3 mL。使用前用 5 mL 乙腈活化。

4.17 标准品:孔雀石绿(MG)分子式为 $[(C_{23}H_{25}N_2)(C_2HO_4)]_2C_2H_2O_4$ 、结晶紫(GV)分子式为 $C_{25}H_{29}ClN_3$,纯度大于98%。

4.18 标准储备溶液:准确称取适量的孔雀石绿、结晶紫标准品,用乙腈分别配制成100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准贮备液。

4.19 混合标准中间液(1 $\mu\text{g/mL}$):分别准确吸取1.00 mL孔雀石绿和结晶紫的标准储备溶液至100 mL容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间溶液。—18℃避光保存。

4.20 混合标准工作溶液:根据需要,临用时准确吸取一定量的混合标准中间溶液,加入硼氢化钾溶液(4.9)0.40 mL,用乙腈准确稀释至2.00 mL,配制适当浓度的混合标准工作液。

5 仪器与设备

5.1 高效液相色谱仪:配荧光检测器。

5.2 匀浆机。

5.3 离心机:4 000 r/min。

5.4 旋涡振荡器。

5.5 固相萃取装置。

5.6 旋转蒸发器。

6 样品制备

6.1 取样

鱼去鳞、去皮,沿背脊取肌肉部分;虾去头、壳、肠腺,取肌肉部分;蟹、甲鱼等取可食部分。样品切为不大于0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm的小块后混合。

6.2 提取

称取5.00 g样品于50 mL离心管内,加入10 mL乙腈,10 000 r/min匀浆提取30 s,加入5 g酸性氧化铝,振荡2 min,4 000 r/min离心10 min,上清液转移至125 mL分液漏斗中,在分液漏斗中加入2 mL二甘醇,3 mL硼氢化钾溶液(4.10),振摇2 min。

另取50 mL离心管加入10 mL乙腈,洗涤匀浆机刀头10 s,洗涤液移入前一离心管中,加入3 mL硼氢化钾溶液(4.10),用玻棒捣散离心管中的沉淀并搅匀,漩涡混匀器上振荡1 min,静置20 min,4 000 r/min离心10 min,上清液并入125 mL分液漏斗中。

在50 mL离心管中继续加入1.5 mL盐酸羟胺溶液(4.11)、2.5 mL对-甲苯磺酸溶液(4.12)、5.0 mL乙酸铵缓冲溶液(4.14),振荡2 min,再加入10 mL乙腈,继续振荡2 min,4 000 r/min离心10 min,上清液并入125 mL分液漏斗中,重复上述操作一次。

在分液漏斗中加入20 mL二氯甲烷,具塞,剧烈振摇2 min,静置分层,将下层溶液转移至250 mL茄形瓶中,继续在分液漏斗中加入5 mL乙腈、10 mL二氯甲烷,振摇2 min,把全部溶液转移至50 mL离心管,4 000 r/min离心10 min,下层溶液合并至250 mL茄形瓶,45℃旋转蒸发至近干,用2.5 mL乙腈溶解残渣。

6.3 净化

将PRS柱安装在固相萃取装置上,上端连接酸性氧化铝固相萃取柱,用5 mL乙腈活化,转移提取液到柱上,再用乙腈洗茄形瓶两次,每次2.5 mL,依次过柱,弃去酸性氧化铝柱,吹PRS柱近干,在不抽真空的情况下,加入3 mL等体积混合的乙腈和乙酸铵溶液(4.13),收集洗脱液,乙腈定容至3 mL,过0.45 μm 滤膜,供液相色谱测定。

7 测定

7.1 色谱条件

7.1.1 色谱柱:ODS- C_{18} 柱,250 mm×4.6 mm(内径),粒度5 μm 。

- 7.1.2 流动相:乙腈+乙酸铵缓冲溶液(0.125 mol/L,pH4.5)=80+20。
- 7.1.3 流速:1.3 mL/min。
- 7.1.4 柱温:35℃。
- 7.1.5 激发波长:265 nm。
- 7.1.6 发射波长:360 nm。
- 7.1.7 进样量:20 μL。

7.2 色谱分析

分别注入 20 μL 孔雀石绿和结晶紫混合标准工作溶液及样品提取液于液相色谱仪中,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。根据标准品的保留时间定性,外标法定量。标准品色谱图参见附录 A。

8 结果

8.1 计算

样品中孔雀石绿和结晶紫的残留量按式(1)计算。

$$X = \frac{A \times c_s \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X——样品中待测组分残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- c_s——待测组分标准工作液的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- A——样品中待测组分的峰面积;
- A_s——待测组分标准工作液的峰面积;
- V——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m——样品质量,单位为克(g)。

8.2 线性范围

孔雀石绿和结晶紫混合标准溶液的线性范围:0.1 ng/mL~600 ng/mL。

8.3 检出限

本方法孔雀石绿、结晶紫的检出限均为 0.5 μg/kg。

8.4 回收率

- 在样品中添加 0.4 μg/kg~100 μg/kg 孔雀石绿时,回收率为 70%~110%。
- 在样品中添加 0.4 μg/kg~100 μg/kg 结晶紫时,回收率为 70%~110%。

8.5 重复性

本方法的相对标准偏差≤15%。

附录 A
(资料性附录)

孔雀石绿(MG)和结晶紫(GV)混合标准的液相色谱图

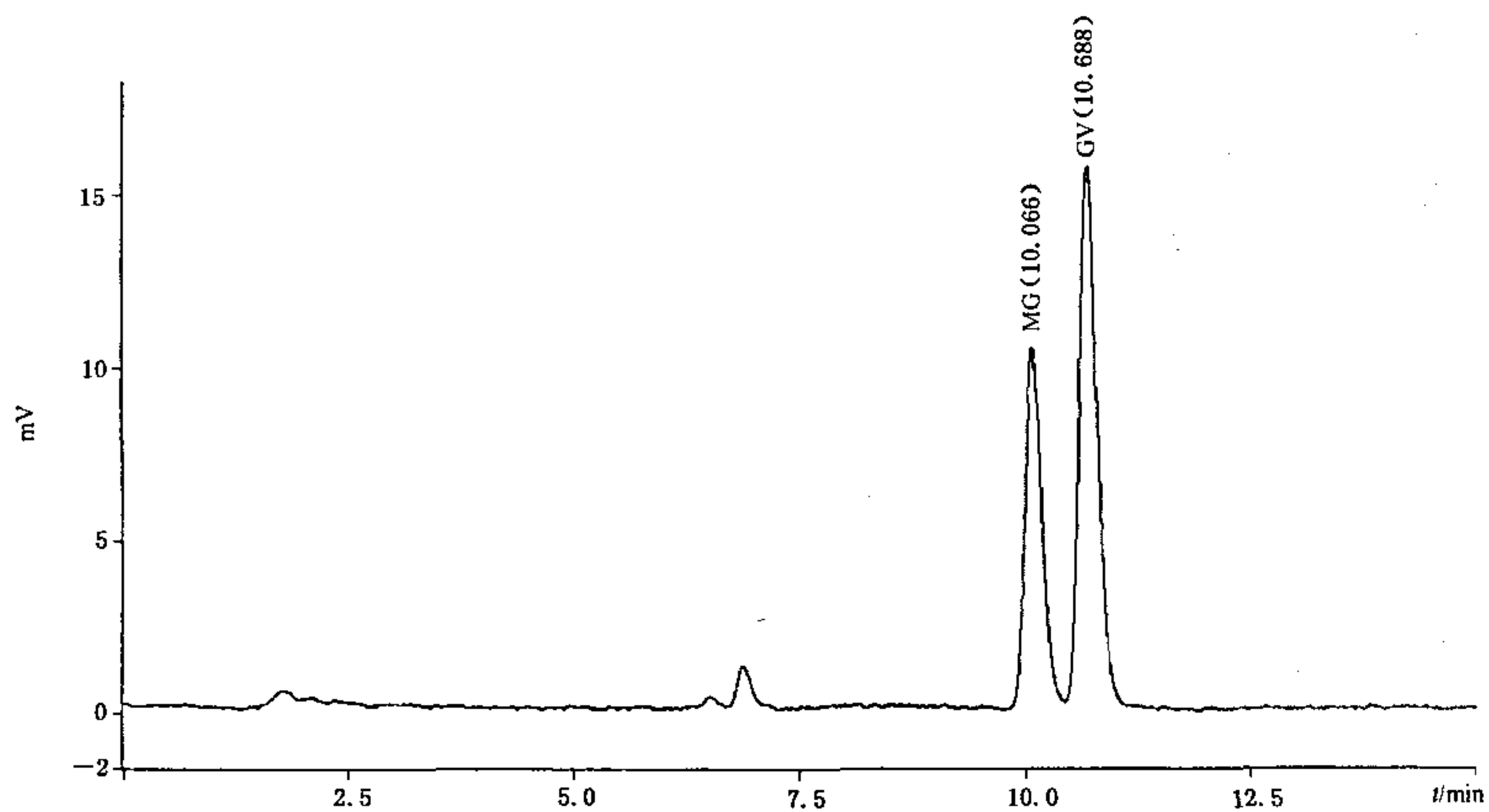


图 A.1 浓度为 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 孔雀石绿(MG)和结晶紫(GV)混合标准的液相色谱图