

## 水产品中孔雀石绿和结晶紫的测定

SGLC-LC/MS-016

**摘要:** 建立了水产品中孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫、隐色孔雀石绿的测定方法。采用岛津的 InertSep Al-N 固相萃取小柱对鳕鱼样品进行净化, Shim-pack GIST C18 色谱柱进行分离, 岛津 LCMS-8050 串联质谱检测分析, 内标法定量。对空白样品 0.5 µg/kg 浓度加标后, 按照上述前处理方法处理后上机, 平行 3 份样品考察回收率和 RSD, 结果显示, 0.5 µg/kg 加标浓度的加标回收率为 84.41%-113.25%, RSD 为 0.93-6.24%, 回收率高, 重现性好。该方法适用于水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物的测定。

**关键词:** 水产品 孔雀石绿 结晶紫 InertSep Al-N LC-MSMS

### 1. 实验部分

#### 1.1 实验仪器及耗材

仪器配置: Shimadzu LC-30A 与 LCMS-8050 联用系统;

色谱柱: Shim-pack GIST C18, 50×2.1 mm, 2 µm (P/N: 227-30001-02);

固相萃取小柱: InertSep Al-N 1g/6mL (P/N: 5010-61405);

SHIMSEN Arc Disc HPTFE 针式过滤器 (P/N: 380-00341-05);

LC/MS 认证样品瓶 LabTotal Vial (P/N: 227-34001-01);

SHIMSEN Pipet 移液枪: SHIMSEN Pipet PMII-10 (P/N: 380-00751-02);

SHIMSEN Pipet PMII-100 (P/N: 380-00751-04);

SHIMSEN Pipet PMII-1000 (P/N: 380-00751-06)。

#### 1.2 分析条件

##### UHPLC 条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18, 50×2.1 mm, 2 µm (P/N: 227-30001-02)

流速: 0.4 mL/min

进样量: 5 µL

柱温: 40 °C

流动相: A: 5 mM 乙酸铵+0.1%甲酸水 B: 0.1%甲酸乙腈

梯度洗脱程序如下:

时间 (Min)	0	2.5	3.2	3.21	4.5
A (%)	60	0	0	60	60
B (%)	40	100	100	40	40

## 质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子扫描

扫描模式: 多反应监测(MRM)

碰撞气: 氩气

加热气: 氮气 10 L/min

雾化气: 氮气 3 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

接口温度: 300℃

DL 温度: 250 ℃

加热模块温度: 400 ℃

化合物参数见下表

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
孔雀石绿	329.00	313.10*	-10.0	-37.0	-30.0
		208.10	-12.0	-39.0	-20.0
隐色孔雀石绿	331.10	239.15*	-12.0	-35.0	-23.0
		316.15	-12.0	-23.0	-19.0
结晶紫	372.10	356.15*	-11.0	-42.0	-23.0
		340.15	-11.0	-55.0	-22.0
隐色结晶紫	374.00	238.20*	-11.0	-29.0	-23.0
		359.15	-11.0	-24.0	-23.0
隐色孔雀石绿-D6	337.00	240.20*	-10.0	-33.0	-23.0
孔雀石绿-D5	334.10	318.20*	-12.0	-39.0	-30.0

\*定量离子对

## 1.3 样品前处理

### 1.3.1 样品提取

称取 5.0 g 鳕鱼样品于 50 mL 离心管中, 加入 50  $\mu$ L 100 ng/mL 内标和 11 mL 乙腈, 超声提取 2 min, 8000 r/min 匀浆 30 s, 8000 r/min 离心 2 min, 上清液转移至 25mL 比管中; 另取一 50mL 离心管加入 11mL 乙腈, 洗涤匀浆刀头 10 s, 洗涤液移至前一离心管中, 用玻璃棒搅碎离心管中的沉淀, 涡旋混合 30 s, 超声提取 5 min, 8000 r/min 离心 2 min, 上清液合并于 25mL 比色管中, 乙腈定容至 25mL, 混匀, 取 5 mL 待净化。流程图见下图 1。

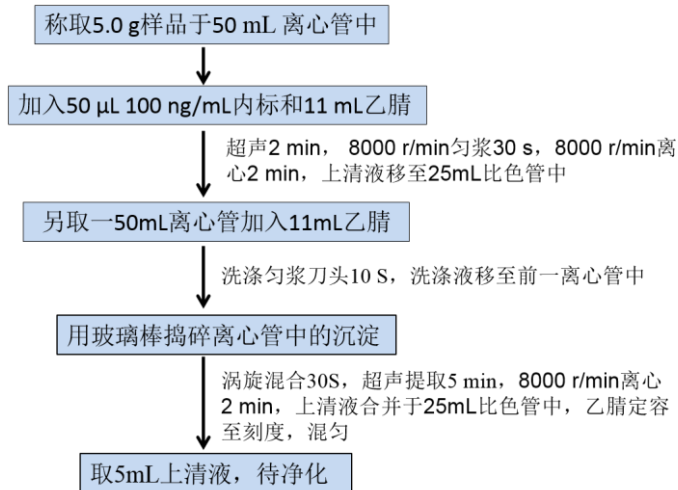


图 1 样品提取流程图

### 1.3.2 样品净化

#### InertSep Al-N 1g/6 mL

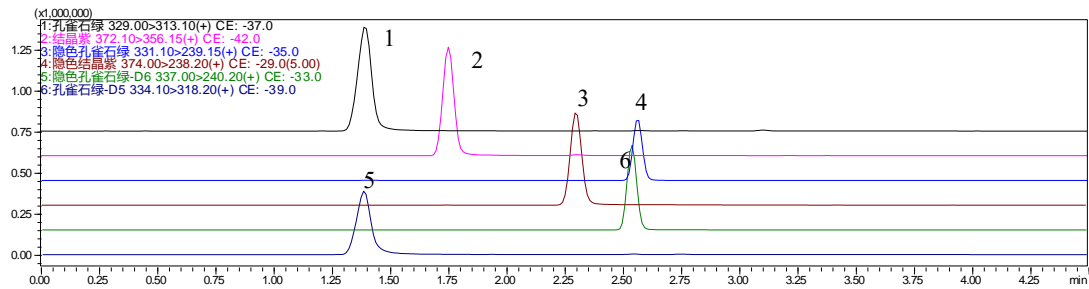
5 mL 乙腈活化，弃去流出液；5 mL 待净化液上样，收集流出液；4 mL 乙腈洗脱，收集流出液；45℃氮吹至 1 mL 左右，加乙腈定容至 2 mL，混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，供 LC-MS/MS 分析。流程图见下图 2。



图 2 样品净化流程图

## 2. 结果及讨论

### 2.1 标准品的 MRM 色谱图



1.0 µg/L 标准溶液的 MRM 色谱图

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

### 2.2 孔雀石绿、结晶紫及其代谢物的 LC-MS/MS 检测添加回收结果

将鳕鱼空白样品进行 0.5 µg/kg 浓度加标后, 按照上述前处理方法处理后上机, 平行 3 份样品考察回收率和 RSD, 具体结果如下: 加标回收率为 84.41%-113.25%, RSD 为 0.93-6.24%。

目标物	平均回收率 (%)	RSD (%)
孔雀石绿	84.41	5.58
结晶紫	94.44	4.65
隐色孔雀石绿	108.20	0.93
隐色结晶紫	113.25	6.24

## 3. 结论

参照国标 GB/T19857-2005, 建立了水产品中孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫、隐色孔雀石绿的测定方法。采用岛津的 InertSep AI-N 固相萃取小柱对鳕鱼样品进行净化, Shim-pack GIST C18 色谱柱进行分离, 岛津 LCMS-8050 串联质谱检测分析, 内标法定量。对空白样品 0.5 µg/kg 浓度加标后, 按照上述前处理方法处理后上机, 平行 3 份样品考察回收率和 RSD, 结果显示, 0.5 µg/kg 加标浓度的加标回收率为 84.41%-113.25%, RSD 为 0.93-6.24%, 回收率高, 重现性好。该方法适用于水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物的测定。