

DB 12

天 津 市 地 方 标 准

DB12/T 866—2019

水和沉积物中孔雀石绿及其代谢物残留量 的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of malachite green and its metabolite residues in water and sediment
by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2019 - 01 - 14 发布

2019 - 02 - 15 实施

天津市市场监督管理委员会

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由天津市渔业发展服务中心提出并归口。

本标准起草单位：农业农村部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心（天津）。

本标准主要起草人：陈永平、李春青、时文博、高丽娜、李宝华。

水和沉积物中孔雀石绿及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了水质及沉积物中孔雀石绿和无色孔雀石绿残留量测定的试剂、仪器设备、测定步骤、计算、方法灵敏度、方法回收率、方法精密度。

本标准适用于水和沉积物中孔雀石绿和无色孔雀石绿残留量检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

沉积物中孔雀石绿 (Malachite Green MG) 及其代谢物无色孔雀石绿 (Leucomalachite Green LMG) 残留提取，利用 N, N, N', N'-四甲基对苯二胺 (2, 3, 5, 6-tetramethyl-1, 4-phenylenediamine TMPD) 解吸附后，二氯甲烷萃取。水中孔雀石绿和无色孔雀石绿二氯甲烷提取，质谱检测器检测，内标法定量。

4 试剂

- 4.1 孔雀石绿及无色孔雀石绿标准品：孔雀石绿纯度 >98%，无色孔雀石绿纯度 >98%。
- 4.2 乙腈：色谱纯。
- 4.3 甲醇：色谱纯。
- 4.4 二氯甲烷。
- 4.5 实验用水符合 GB/T 6682 一级水指标
- 4.6 2.0 mmol L⁻¹ 乙酸铵缓冲溶液：称取 0.077 g 无水乙酸铵溶解于适量水中，再加入 0.5 mL 甲酸，再加水定容至 500 mL。
- 4.7 TMPD 溶液 (1.0 mg mL⁻¹)：称取 50 mg N, N, N', N'-四甲基对苯二胺 (TMPD) 溶于 50 mL 甲醇中。
- 4.8 孔雀石绿 (MG)、无色孔雀石绿 (LMG) 标准储备液 (100 μg mL⁻¹)：准确称取适量的孔雀石绿、无色孔雀石绿标准品，分别用乙腈溶解并定容，于 -18 °C 避光保存，可使用 1 年。
- 4.9 氘代孔雀石绿 (MG-D5) 和氘代无色孔雀石绿 (LMG-D6) 内标标准储备液 (100 μg mL⁻¹)：准确称取适量的氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿标准品，分别用乙腈溶解并定容，于 -18 °C 避光保存，可使用 1 年。
- 4.10 混合外标标准中间液 (1.0 μg mL⁻¹)：分别准确吸取 1.0 mL 孔雀石绿和无色孔雀石绿的标准储备液 (4.7) 于 100 mL 容量瓶中，用乙腈稀释定容，于 -18 °C 避光保存，可使用 6 个月。

- 4.11 混合内标标准中间液 ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$)：分别准确吸取 1.0 mL 氘代孔雀石绿和氘代无色孔雀石绿标准储备液 (4.8) 于 100 mL 容量瓶中，用乙腈稀释定容，于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存，可使用 6 个月。
- 4.12 混合外标标准使用液 ($0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$)：准确吸取 1.00 mL 混合外标标准中间液 (4.9) 于 10.0 mL 容量瓶中，用乙腈稀释定容，于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存，可使用 1 个月。
- 4.13 混合内标标准使用液 ($0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$)：准确吸取 1.00 mL 混合内标标准中间液 (4.10) 于 10.0 mL 容量瓶中，用乙腈稀释定容，于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存，可使用 1 个月。
- 4.14 混合标准工作液：临用时准确吸取相应体积的混合外标标准使用液 (4.11)，再加入混合内标标准使用液 (4.12) 20 μL ，用乙腈和 2.0 mmol L^{-1} 乙酸铵缓冲溶液 (1:1, V/V) 稀释定容至 1 mL，标准曲线系列浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 ng mL^{-1} ，现用现配。

注：除特殊注明外，所有试剂均为分析纯。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾 (ESI) 离子源。
- 5.2 电子天平：感量 1.0 mg 和 0.01 mg。
- 5.3 高速冷冻离心机：可制冷到 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (最大转速高于 10 000 r/min)。
- 5.4 超声波震荡仪。
- 5.5 涡旋振荡器。
- 5.6 移液器 (10 μL , 20 μL , 50 μL , 100 μL , 1000 μL)。
- 5.7 旋转蒸发器。
- 5.8 纯水器。
- 5.9 冰箱：具有 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏箱和达到 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻箱。

6 测定步骤

6.1 样品制备

- 6.1.1 水：将采集水样过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜，收集水样体积 1 L，于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，6 d 内测定。
- 6.1.2 沉积物：将沉积物置于阴凉处风干，研磨过筛 (150 目)，收集沉积物质量 20 g，于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，6 d 内测定。

6.2 样品处理

- 6.2.1 水：量取水样 500 mL，置于分液漏斗中，加入 40 μL 混合内标标准使用液 (4.12)，再加入 30 mL 的二氯甲烷，振摇 5 min，静置 30 min，取下层二氯甲烷于锥形瓶中，再加入 30 mL 二氯甲烷重复一次，若分层不明显，取其下层液于 50 mL 离心管中，冷冻离心机 6000 r/min 离心 3 min，再取下层液，合并于锥形瓶中，旋转蒸发温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，旋转蒸发浓缩至近干，残留物加入 2.0 mL 的乙腈- 2 mmol L^{-1} 乙酸铵溶液 (1:1, V/V) (4.5)，涡旋振荡 1 min，超声波振荡 2 min，过 $0.22 \mu\text{m}$ 有机相滤膜后，上机测定。
- 6.2.2 沉积物：称取粉末状沉积物样品 (5.0 ± 0.01) g 于 50 mL 聚乙烯离心管中，先加入 200 μL TMPD 溶液 (4.6)，再加入 40 μL 混合内标标准使用液 (4.12)，加入 20 mL 二氯甲烷，涡旋 2 min，超声波震荡 25 min，6000 r/min 离心 5 min，取上层液于锥形瓶中，再向离心管中加入 20 mL 二氯甲烷，重复上述操作，合并上清液锥形瓶中，旋转蒸发温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，旋转蒸发浓缩至近干，残留物加入 2.0 mL

的乙腈-2 mmol L⁻¹乙酸铵溶液(1:1, V/V) (4.5), 涡旋振荡 1 min, 超声波振荡 2 min, 过 0.22 μm 有机相滤膜后, 上机测定。

6.3 标准工作曲线制作

分别准确移取100 ng mL⁻¹混合外标标准使用液(4.11), 乙腈稀释至0.50 ng mL⁻¹、1.0 ng mL⁻¹、2.0 ng mL⁻¹、5.0 ng mL⁻¹、10.0 ng mL⁻¹、20.0 ng mL⁻¹混合标准工作液, 内标液浓度均为2 ng mL⁻¹, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

6.4 测定

6.4.1 色谱条件

色谱柱: C₈柱, 2.2 μm, 75 mm×2.1 mm (内径), 或相当。

柱温: 35 °C。

样品室温度: 15 °C。

流动相A: 含0.1%甲酸的2.0 mmol L⁻¹的乙酸铵水溶液; 流动相B: 0.1%甲酸-乙腈溶液; 进样体积: 5.0 μL; 具体参数见表1。

流速: 0.25 mL min⁻¹。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	A/%	B/%
0.1	30	70
2	30	70
7	2	98
9	2	98
9.01	30	70
11	30	70

6.4.2 质谱条件

离子化模式: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式。

离子源温度: 600 °C。

气帘气: 25; 碰撞气: 中; 喷雾电压: 5000 v; 辅气1: 60; 辅气2: 40。

扫描模式: 多反应监测 (MRM, 反应监测母离子、子离子、锥孔电压和碰撞能量见表2)。

表2 目标化合物质谱条件

目标化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压(v)	碰撞能量(ev)
MG	329	208	120	38
		313*	120	38
LMG	331.1	316.1*	120	20
		239.1	120	30
D5-MG	334.1	318.1	120	40
D6-LMG	337.1	322.1	110	22

注: *为定量碎片离子

6.5 定性依据

在同样测试条件下，阳性样品保留时间与标准物质保留时间相对偏差在 $\pm 5\%$ 以内，且检测到的离子的相对丰度，应当与浓度相当的校正标准品相对丰度一致。次强碎片离子丰度与定量离子丰度比应符合表3要求。空白样品、标准溶液及添加样品的离子流图参见附录A~附录E。

表3 基峰与次强碎片离子丰度比要求

次强碎片离子相对丰度 (%)	允许相对偏差(%)
> 50	± 20
> 20 ~ 50	± 25
>10 ~ 20	± 30
≤ 10	± 50

6.6 定量测定

定量离子采用丰度最大的二级特征离子碎片符合表2的要求。

6.7 空白试验

除不加试样外，均按上述测定条件和步骤进行。

7 计算

7.1 用仪器自带工作站按内标法进行自动计算，以化合物上机响应的峰面积与内标物峰面积比值为纵坐标、化合物浓度与内标物浓度比值为横坐标，绘制标准曲线，再根据样品的峰面积响应值与内标物峰面积比值，利用标准曲线，得到样品制备液的实际测定浓度。

7.2 水样品中孔雀石绿及其代谢物残留量按式（1）计算。计算结果须扣除空白值。

$$X = \frac{C \times V_1}{V} \times \frac{1000}{1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X ——试样中目标物含量，单位为微克每升（ $\mu\text{g L}^{-1}$ ）；

C ——试样溶液中目标物含量，单位为纳克每毫升（ ng mL^{-1} ）；

V ——试样体积，单位为毫升（ mL ）；

V_1 ——试样定容体积，单位为毫升（ mL ）。

7.3 沉积物样品中孔雀石绿及其代谢物残留量按式（2）计算。计算结果须扣除空白值。

$$X = \frac{C \times V_1}{m} \times \frac{1000}{1000} \dots \dots \dots (2)$$

式中：

X ——试样中目标物含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ）；

C ——试样溶液中目标物含量，单位为纳克每毫升（ ng mL^{-1} ）；

m ——试样质量，单位为克（ g ）；

V_1 ——试样定容体积，单位为毫升（ mL ）。

8 方法灵敏度

- 8.1 水质中孔雀石绿及其代谢物(无色孔雀石绿)的定量限均为 4 ng L^{-1} 。
- 8.2 沉积物中孔雀石绿及其代谢物(无色孔雀石绿)的定量限均为 $0.4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ 。

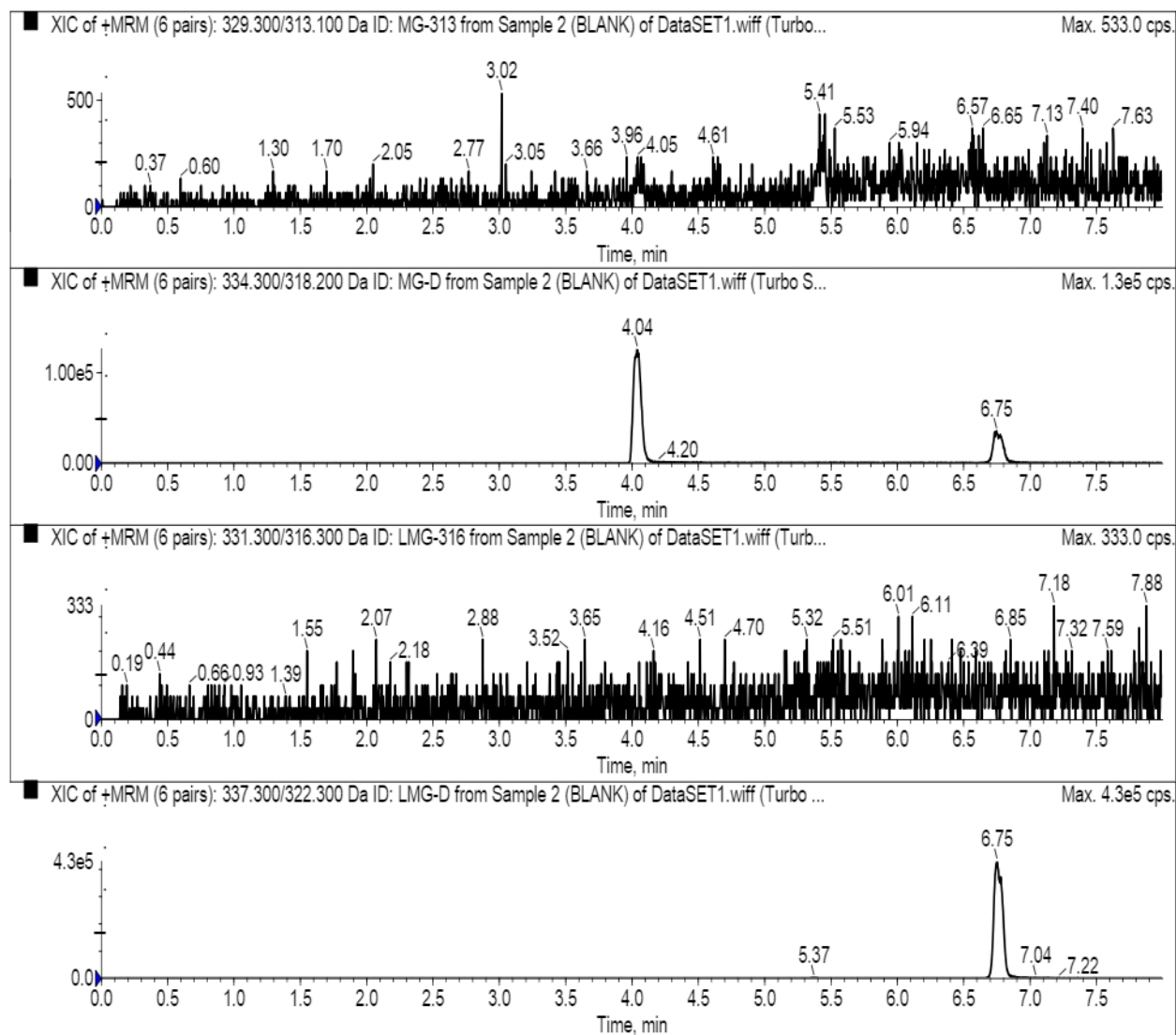
9 方法回收率

- 9.1 水质中添加浓度为 4 ng L^{-1} ~ 100 ng L^{-1} 时回收率为 70%~110%。
- 9.2 沉积物中添加浓度为 $0.4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ~ $10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ 时回收率为 70%~110%。

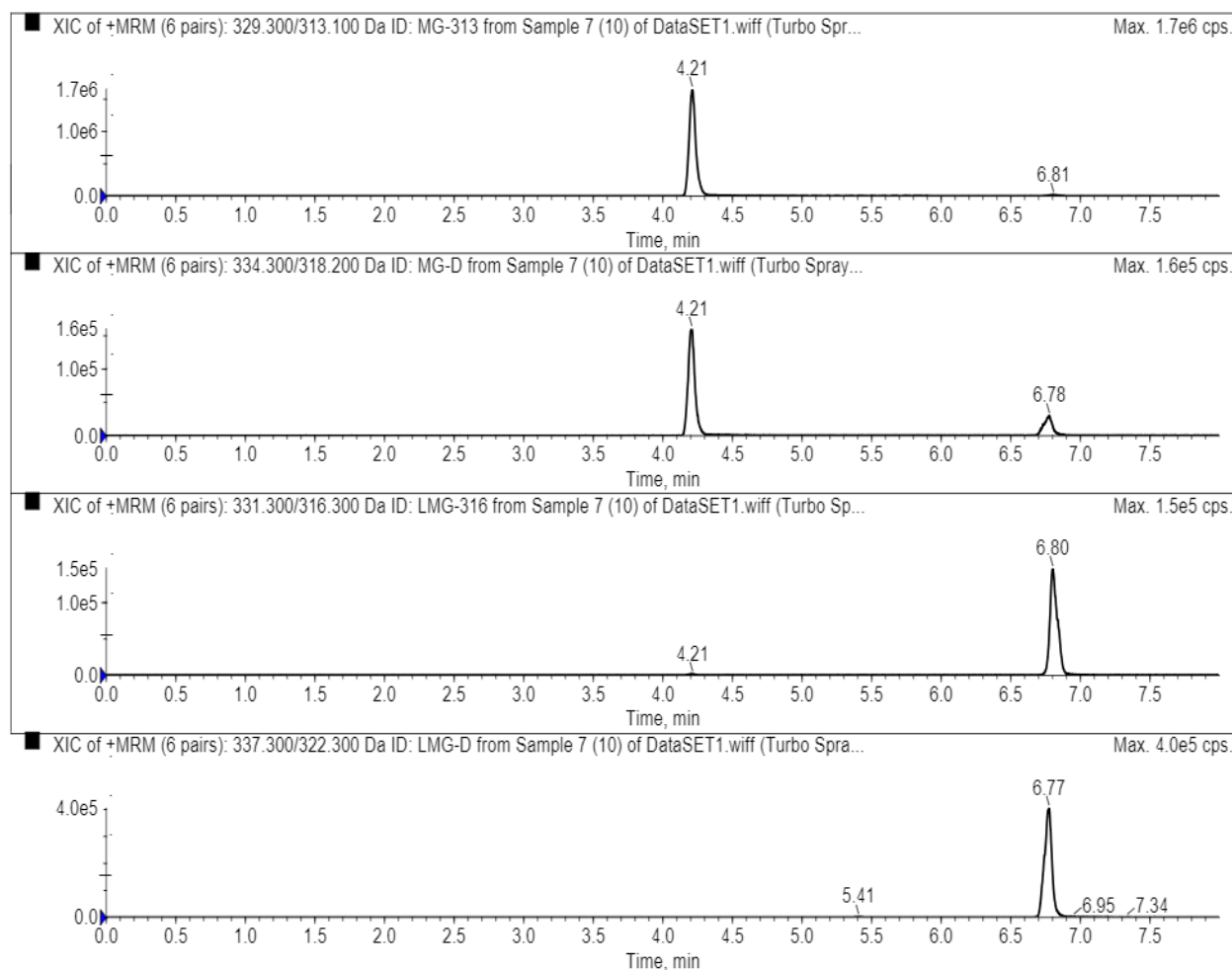
10 方法精密度

本方法的批内相对标准偏差小于10%，批间相对标准偏差小于15%。

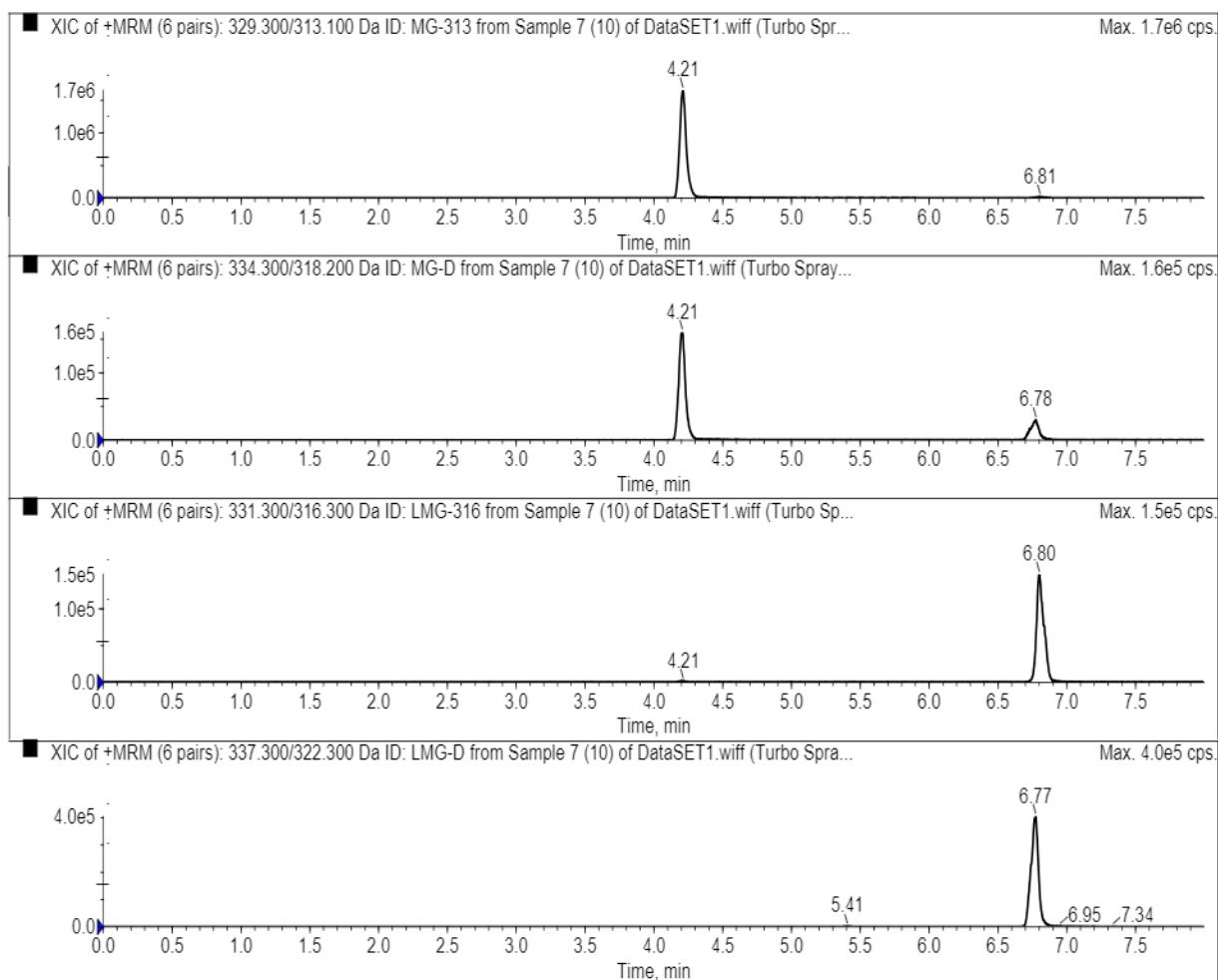
附录 A
(资料性附录)
空白沉积物特征离子色谱图



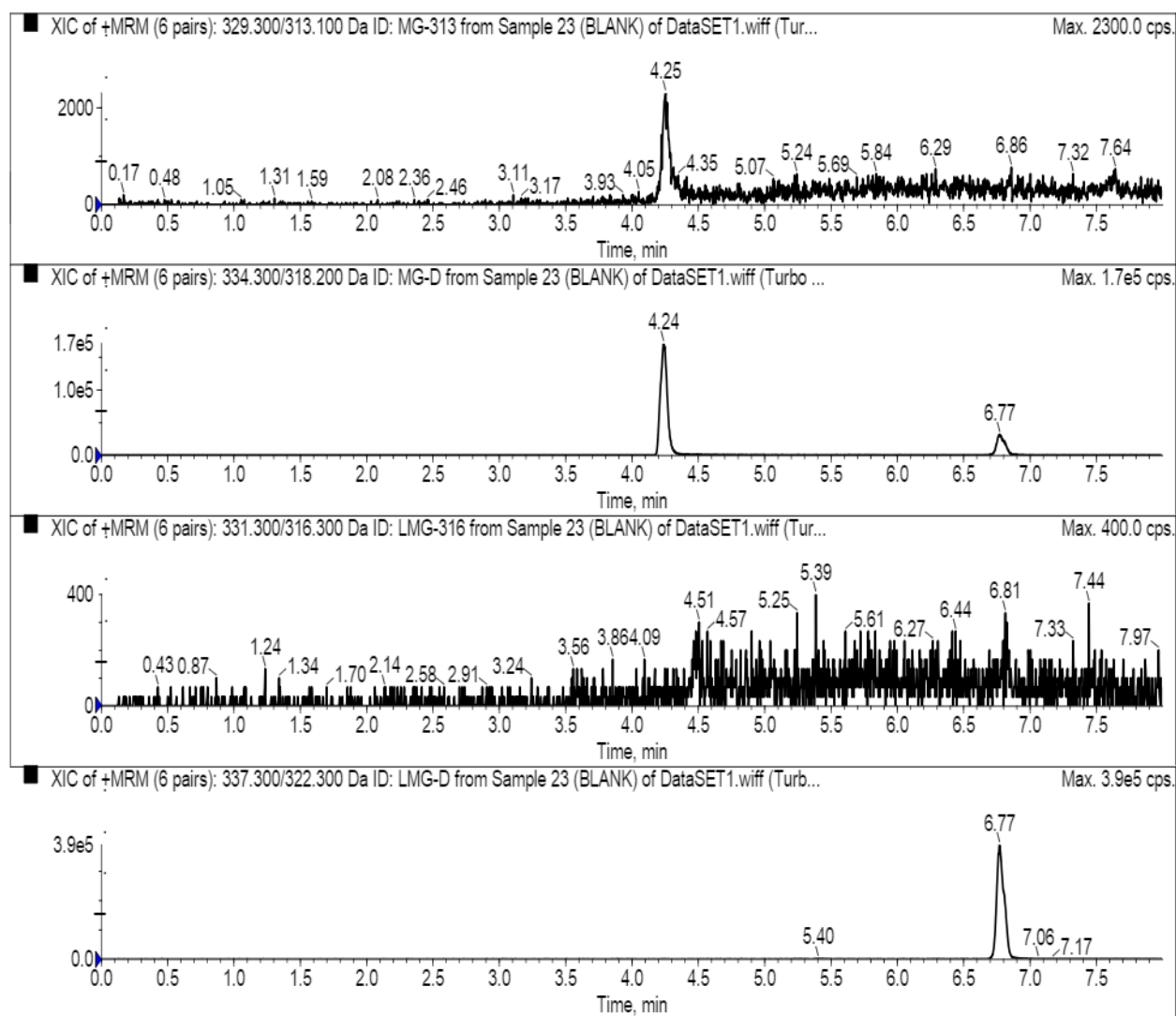
附录 B
(资料性附录)
孔雀石绿及其代谢物混合标准特征离子色谱图 (10 ng mL⁻¹)



附录 C
(资料性附录)
沉积物加标特征离子色谱图 ($2.0 \mu\text{g kg}^{-1}$)



附录 D
(资料性附录)
空白水质特征离子色谱图



附录 E
(资料性附录)
空白水质加标特征离子色谱图 (20 ng L⁻¹)

