

ICS 65.150

B 50

# DB43

## 湖 南 省 地 方 标 准

DB43/T 1422—2018

---

### 渔业水体中孔雀石绿的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of malachite green in fisheries water

Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method

2018-04-04 发布

2018-07-04 实施

---

湖南省质量技术监督局 发布

## 目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 方法原理	1
4 试剂与材料	1
5 仪器与设备	2
6 采样	2
7 测定步骤	2
8 结果计算	3
9 方法的灵敏度、准确度、精密度	4
附录 A（资料性附录） 孔雀石绿、隐色孔雀石绿选择反应监测（SRM）色谱图	5

## 前 言

本标准按 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本标准某些内容可能涉及专利，本标准发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由湖南省畜牧水产局提出并归口。

本标准起草单位：湖南省水产科学研究所、农业部渔业产品质量监督检验测试中心（长沙）、水产健康生产湖南省协同创新中心。

本标准主要起草人：黄向荣、万译文、杨霄、何咏、陈湘艺、伍远安、肖维、索纹纹、洪波、刘伶俐、黄华伟、曾春芳、李小玲、范叶。

# 渔业水体中孔雀石绿的测定 液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本标准规定了渔业水体中孔雀石绿的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于我省渔业水体中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿的测定。

## 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，仅所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

SL 187 水质采样技术规程

## 3 方法原理

水样中的目标物经中性氧化铝固相萃取柱富集和净化后，用带有电喷雾离子源的液相色谱-串联质谱仪正离子模式测定，内标法定量。

## 4 试剂与材料

本方法所用试剂除另有说明外，均为分析纯；实验用水应符合 GB/T 6682 一级水的规定。

4.1 乙腈：色谱纯。

4.2 甲酸：色谱纯。

4.3 乙酸铵：色谱纯。

4.4 乙酸铵溶液（2 mmol/L）：称取 0.075 g 乙酸铵，置于 500 mL 容量瓶中，用水溶解定容至刻度。

4.5 标准品：孔雀石绿（MG）、隐色孔雀石绿（LMG）、同位素内标氘代孔雀石绿（D5-MG）、同位素内标氘代隐色孔雀石绿（D6-LMG），纯度应大于 99.0%。

4.6 标准储备溶液（100 μg/mL）：准确称取适量的孔雀石绿、隐色孔雀石绿、氘代孔雀石绿、氘代隐色孔雀石绿标准品，用乙腈配制成浓度为 100 μg/mL 的标准储备溶液，-18℃避光保存。

4.7 混合标准溶液（100 ng/mL）：准确移取适量孔雀石绿和隐色孔雀石绿标准储备溶液（4.6），用乙腈配制成 100 ng/mL 混合标准溶液，-18℃避光保存。

4.8 混合内标标准溶液（100 ng/mL）：准确移取适量氘代孔雀石绿和氘代隐色孔雀石绿标准储备溶液（4.6），用乙腈配制成 100 ng/mL 混合内标标准溶液，-18℃避光保存。

4.9 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溶液（4.7）和混合内标标准溶液（4.8），用乙腈+2 mmol/L 乙酸铵溶液（1+1）稀释配制成氘代孔雀石绿和氘代隐色孔雀石绿浓度为 2.00 ng/mL 以及孔雀石绿和隐色孔雀石绿浓度为 0.05 ng/mL、0.10 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、5.00 ng/mL 的混合标准工作溶液。

4.10 微孔有机过滤膜：0.22 μm。

4.11 中性氧化铝柱：2 g/6 mL，使用前用 5 mL 乙腈、5 mL 纯水活化。

## 5 仪器与设备

5.1 液相色谱-串联质谱联用仪，配有电喷雾（ESI）离子源。

5.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.001 g。

5.3 旋转蒸发仪。

5.4 涡旋混匀器。

5.5 固相萃取装置。

5.6 茄形瓶：50 mL。

## 6 采样

采样按 SL 187 的规定执行。

## 7 测定步骤

### 7.1 样品提取和净化

准确量取 20 mL 水样，置于 50 mL 离心管中，用甲酸调节 pH 至 3.0 左右，加入混合内标标准溶液（4.8）40  $\mu$ L，涡旋混合 30 s。将预处理的水样在不抽真空的条件下全部转移至已活化的中性氧化铝固相萃取柱中，待水样全部过完后，加入 5 mL 纯水进行淋洗并吹干，加入 8 mL 乙腈进行洗脱，收集全部洗脱液，于 45 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至近干，加入 1 mL 乙腈和 1 mL 乙酸铵溶液（4.4）后，漩涡混匀，过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜后，供液相色谱-串联质谱测定。

### 7.2 测定

#### 7.2.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C18（100 $\times$ 2.1 mm，粒径 3  $\mu$ m），或其它等效柱。

流动相：A 相：乙腈；B 相：2 mmol/L 乙酸铵溶液（含体积分数为 0.1% 甲酸）。流动相梯度洗脱条件参见表 1。

进样量：10  $\mu$ L。

流速：0.30 mL/min。

柱温：35  $^{\circ}$ C。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
1.0	10	90
5.0	90	10
8.0	90	10
10.0	10	90
12.0	10	90

### 7.2.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源。

扫描方式：正离子扫描。

检测方式：选择反应监测（SRM）。

喷雾电压：3.5 kV。

离子传输毛细管温度：350 ℃。

定性、定量离子对和碰撞能量见表 2。

表 2 定性、定量离子对和碰撞能量

目标化合物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碰撞能量 / eV
孔雀石绿	329>208	329>313	37
	329>313		32
隐色孔雀石绿	331>239	331>239	31
	331>316		22
氘代孔雀石绿	334>318	334>318	37
氘代隐色孔雀石绿	337>240	337>240	32

### 7.2.3 定性

样品中待测化合物色谱峰的保留时间与相应浓度标准校准溶液的色谱峰的保留时间应一致，偏差在±5%之内。在相同实验条件下，样品中待测化合物定性离子的相对丰度与浓度接近的标准物对应的定性离子的相对丰度比较，相对离子丰度的最大允许偏差参见表 3。

表 3 相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 K	K>50%	20%≤K≤50%	10%<K<20%	K≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

### 7.2.4 定量

按 7.2.1 和 7.2.2 设置仪器条件，将混合标准工作溶液、样品溶液、空白溶液、空白添加试样等体积进样测定，内标法定量，孔雀石绿和隐色孔雀石绿的选择反应监测（SRM）色谱图参见附录 A，孔雀石绿、隐色孔雀石绿混合标准溶液的选择反应监测（SRM）色谱图参见附录 A 中图 A.1，空白水样的选择反应监测（SRM）色谱图参见附录 A 中图 A.2，空白水样中添加孔雀石绿、隐色孔雀石绿标准溶液的选择反应监测（SRM）色谱图参见附录 A 中图 A.3。

### 7.2.5 空白试验

用实验用水替代样品，按上述测定条件和步骤进行。

## 8 结果计算

样品溶液中待测物的浓度由仪器工作站按内标法自动计算。

样品中待测物含量按（1）计算，计算结果需扣除空白值，保留 2 位有效数字。

$$X_i = \frac{C_i \cdot V_1}{V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$X_i$ ——样品中待测物的含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

$C_i$ ——样品溶液中待测物的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

$V_1$ ——最终定容体积，单位为（mL）；

$V_2$ ——试样体积，单位为（mL）。

## 9 方法的灵敏度、准确度、精密度

### 9.1 灵敏度

本方法孔雀石绿和隐色孔雀石绿的定量限均为 0.05 ng/mL。

### 9.2 准确度

本方法添加浓度为（0.05~0.5）ng/mL 时回收率为（70~120）%。

### 9.3 精密度

本方法的批内变异系数≤10%，批间变异系数≤15%。

附录 A

(资料性附录)

孔雀石绿、隐色孔雀石绿选择反应监测 (SRM) 色谱图

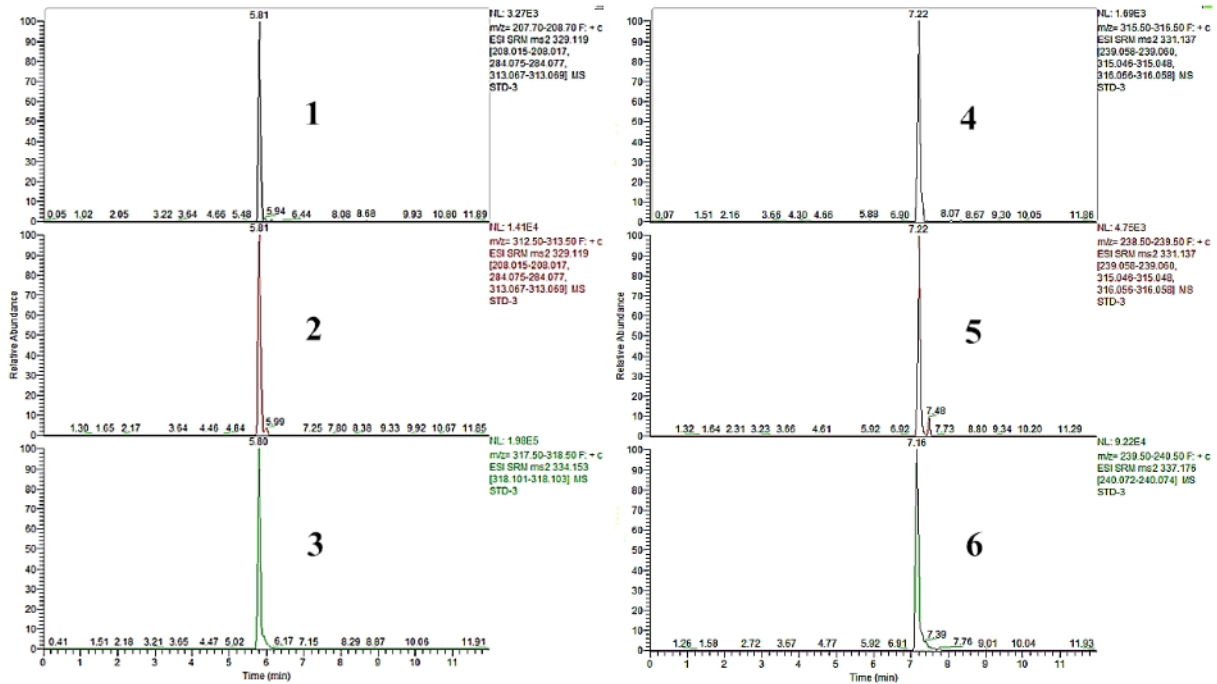


图 A.1 孔雀石绿、隐色孔雀石绿混合标准溶液 (0.10 ng/mL) 的选择反应监测 (SRM) 色谱图

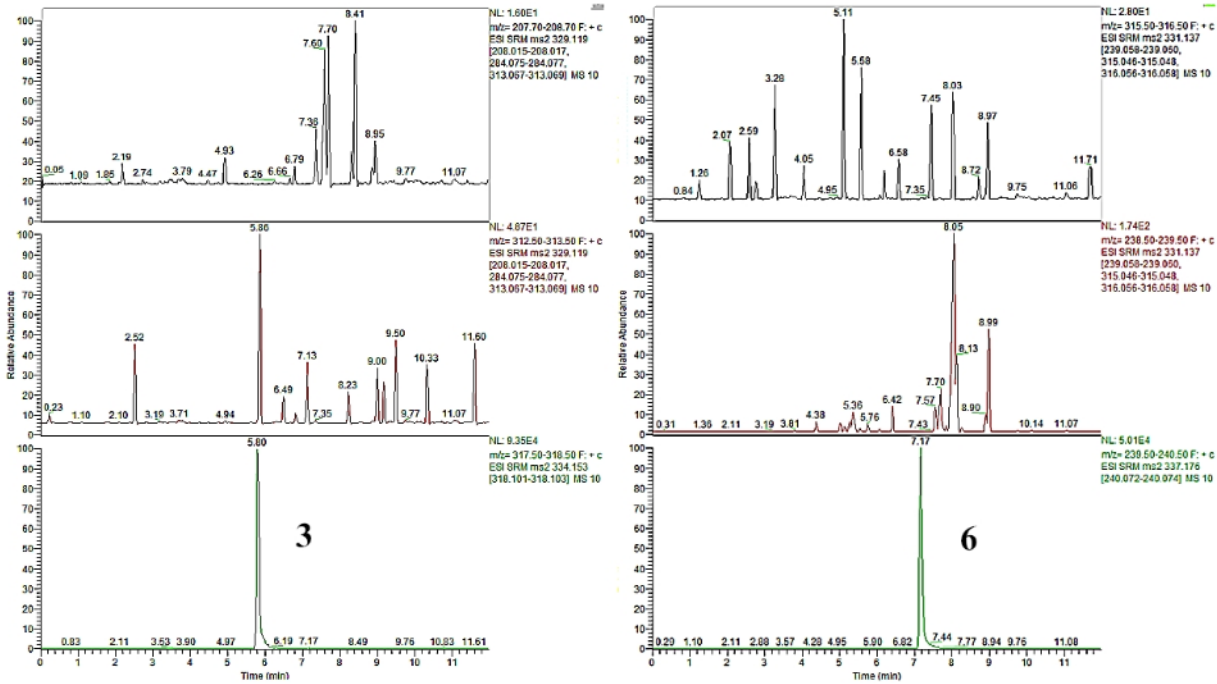


图 A.2 空白水样的选择反应监测 (SRM) 色谱图



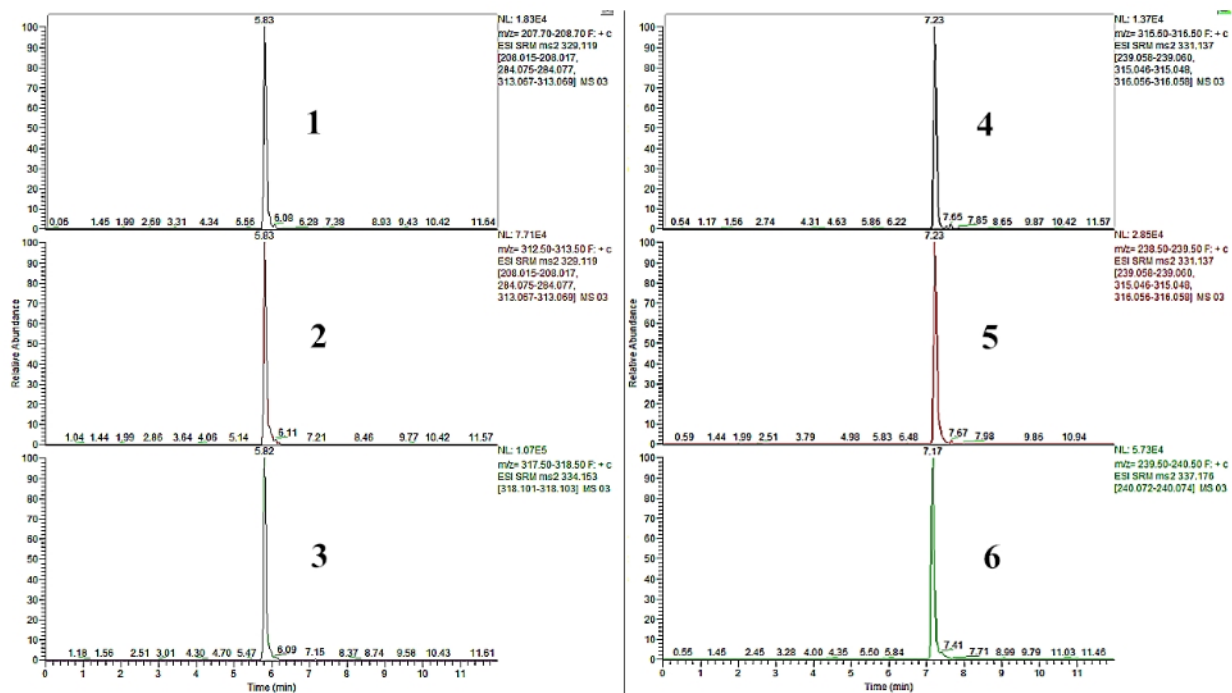


图 A.3 空白水样中添加样品 (0.10 ng/mL) 的选择反应监测 (SRM) 色谱图

- 1—孔雀石绿特征离子 (m/z 329>208)
- 2—孔雀石绿特征离子 (m/z 329>313)
- 3—氘代孔雀石绿特征离子 (m/z 334>318)
- 4—隐色孔雀石绿特征离子 (m/z 331>316)
- 5—隐色孔雀石绿特征离子 (m/z 331>239)
- 6—氘代隐色孔雀石绿特征离子 (m/z 337>240)