

质 2 min ( 10000 r/min ), 离心 3min ( 3000 r/min ), 将上清液转移到 250 mL 分液漏斗中, 用 20 mL 乙腈重复提取残渣一次, 合并上清液。于分液漏斗中加入 30 mL 二氯甲烷, 35 mL 水, 振摇 2min, 静置分层, 收集下层有机层于 150 mL 梨形瓶中, 再用 20mL 二氯甲烷萃取一次, 合并二氯甲烷层, 45℃ 减压旋转蒸发至干。

### 2. 净化

依次用 3 mL 乙腈、3 mL 2% ( v/v ) 甲酸溶液活化 MCX 萃取小柱。用 3 mL 2% ( v/v ) 甲酸乙腈溶液分三次溶解上步提取液残留物, 并依次上样, 控制上样流速为 0.2 mL/min。依次用 2 mL 2% ( v/v ) 甲酸乙腈溶液、6 mL 乙腈淋洗, 淋洗流速为 2 mL/min, 弃上述滤液。用 4 mL 5% ( v/v ) 乙酸铵 ( 5 mol/L, pH=7.0 ) 甲醇溶液洗脱, 洗脱流速为 1 mL/min, 用 KD 浓缩瓶收集洗脱液, 45℃减压旋转蒸发至 1 mL 刻度以下, 流动相定容至 1.0 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 待测。

若样品提取油脂较多, 可先用 3 mL 乙腈分三次溶解提取残留物, 过中性氧化铝小柱 ( 预先用 3mL 乙腈活化 ), 收集滤液, 再用 3 mL 乙腈淋洗柱子, 合并滤液, 加 120 μL 甲酸, 混匀。再过 MCX 小柱净化, 操作步骤同前。

### 仪器条件

#### 液相色谱条件

- 色谱柱: Hypersil Gold C18 (150 mm×2.1 mm i.d, 5μm )
- 流动相: 甲醇 ( A ) + 0.1%甲酸水溶液 ( B )
- 流速: 0.25 mL/min
- 梯度洗脱程序: 0-4 min 20-90%A; 4-8 min 90%A; 8-8.1 min 90-20%A; 8.1-9. min 20%A
- 柱温: 室温
- 进样量: 10 μL

#### 质谱条件

|                       |                 |
|-----------------------|-----------------|
| Ion Source            | ESI             |
| Ion polarity          | Positive        |
| Spray Voltage         | 4000 V          |
| Sheath gas pressure   | 30              |
| Aux gas pressure      | 5               |
| capillary temperature | 350℃            |
| Source CID            | -10             |
| Scan type             | MRM             |
| Q1 peak width         | 0.7             |
| Q3 peak width         | 0.7             |
| Collision Pressure    | Ar at 1.5 mTorr |

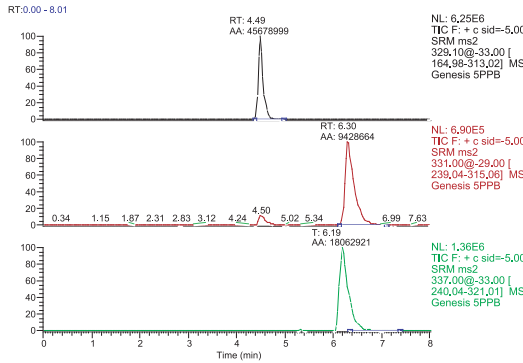
| Compound | Parent Ion | Product Ion | Collision Energy (V) |
|----------|------------|-------------|----------------------|
| MG       | 329.1      | 208         | 48                   |
|          |            | 241         | 48                   |
|          |            | 313         | 33                   |
| LMG      | 331        | 239         | 48                   |
| LMG-D5   | 337        | 315         | 29                   |
|          |            | 240         | 30                   |
|          |            | 321         | 33                   |

### 结果

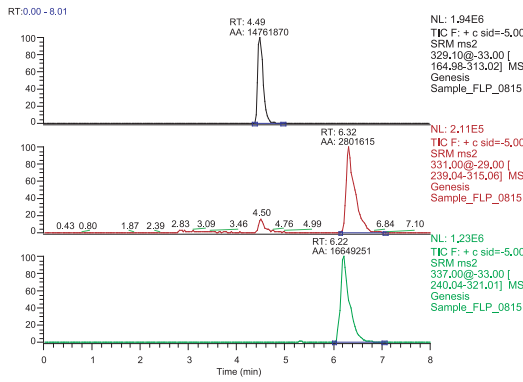
回收率与精密度 ( n = 7 )

| 添加水平 ( μg/Kg )         | 1.0  | 2.0  | 5.0  |
|------------------------|------|------|------|
| 测定值 ( 内标校正 ) ( μg/Kg ) | 1.06 | 2.10 | 5.05 |
| 平均回收率 ( % )            | 106  | 105  | 101  |
| SD ( % )               | 2.1  | 2.7  | 2.8  |
| CV ( % )               | 2.0  | 2.6  | 2.7  |

### 标准图谱与阳性样品图谱



孔雀石绿 ( MG )、隐性孔雀石绿 ( LMG ) 和  
隐性孔雀石绿内标 ( LMG-D5 ) 图谱



阳性鳊鱼样品图谱

### 结 论

实验证明, 该方法无需传统 PbO<sub>2</sub>柱后氧化过程, 可以同时快速、简便的同时测定孔雀石绿和隐性孔雀石绿, 完全可以达到出口欧盟和日本检测要求。

### 参考文献

- [1] 卢近新, 黄樟翰等 美洲蛙对几种药物的敏感性研究 淡水渔业. 2003, 30(5): 28-29
- [2] 郭德华, 叶长凌等 液相色谱法测定鳊鱼中的孔雀石绿 化学分析计量 2002, 11(2): 20
- [3] Turnpseed S.B., Rorbal J.E. J AOAC Int, 1995, 78 (4):971-977.
- [4] Roybal J. E., Peenning A. P. J AOAC Int, 1995, 78 (2):453-457.
- [5] Steven M. P., Kathleen R. E., J AOAC Int, 1995, 78 (6):1388-1393.
- [6] Tarbin J. A., Barnes K. A. J The Analyst Int, 1998, 123: 2567-2571.
- [7] 郭德华, 叶长凌等 高效液相色谱－质谱法测定水产品中孔雀石绿及其代谢物 分析测试学报 2004, 23: 206-209

## Application Note

*In addition to these offices, Thermo Electron Corporation maintains a network of representative organizations throughout the world.*

上海 (Shanghai)  
电话(TEL): 86-21-68654588  
传真(Fax): 86-21-64457830

北京 (Beijing)  
电话(TEL): 86-10-58503588  
传真(Fax): 86-21-66210847

北京西苑饭店  
(Xi Yuan Hotel Beijing)  
电话(TEL): 86-10-88370632  
传真(Fax): 86-21-88370548

广州 (Guangzhou)  
电话(TEL): 86-20-83487138  
传真(Fax): 86-20-83486621

香港 (HK)  
电话(TEL): 00852-28854613  
传真(Fax): 00852-25674447

www.thermo.com

## 关键词 KEYWORDS

高效液相色谱－串联质谱  
LC/MS/MS

电喷雾串联质谱  
ESI

孔雀石绿  
Malachite green(MG)

隐性孔雀石绿  
Leuco-malachite green (LMG)

鳊鱼  
Eel

## 高效液相色谱－串联质谱联用（Finnigan TSQ Quantum）测定鳊鱼中孔雀石绿、隐性孔雀石绿残留量

丁涛 徐锦忠 吴斌 陈惠兰 沈崇钰 ( 江苏出入境检验检疫局食品实验室 )  
刘飞 ( 热电集团示范实验室 )

### 摘 要

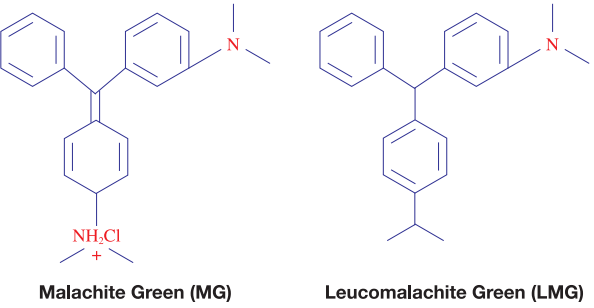
利用高效液相色谱串联质谱 ( LC/MS/MS ) 方法快速、准确的同时测定鳊鱼中孔雀石绿、隐性孔雀石绿残留量。鳊鱼样品经乙腈-乙酸铵缓冲溶液提取, 液液分配到二氯甲烷层, MCX 阳离子固相萃取小柱净化, 浓缩定容。以甲醇和甲酸缓冲溶液为流动相, 经 C18 柱分离后, 并用串联质谱在电喷雾 ( ESI+ ) — 选择反应监测离子 ( SRM ) 的模式下, 进行质谱定性和定量, 无需采用传统 PbO<sub>2</sub>氧化柱, 氘代隐性孔雀石绿为内标。该方法检测限 ( LOD ) 为 0.2 μg/Kg, 定量下限为 0.5 μg/Kg, 完全可以达到出口欧盟和日本残留限量要求。

### 前 言

在水产养殖过程中, 人们经常使用各种药物进行水体消毒和防止鱼病害, 孔雀石绿就是其中的一种染料类杀菌剂<sup>[1]</sup>, 近年来发现它特别是其代谢物在水产体内有明显的残留现象, 且代谢物的残留时间较长, 由于孔雀石绿 ( MG ) 和隐性孔雀石绿 ( LMG ) 化学官能团三苯甲烷是一种致癌物质, 所以欧盟、美国等宣布禁止其在经济鱼类 ( 观赏鱼除外 ) 养殖过程中使用。最近, 由于日本发现从中国, 特别是福建省, 出口的鳊鱼中发现孔雀石绿和隐性孔雀石绿残留, 已经禁止了所有鳊鱼成品的出口, 给很多企业造成了巨大的经济损失。因此, 如何快速、准确的测定该类药物残留, 迫在眉睫。国内虽有水产品中孔雀石绿残留量检验方法的报道<sup>[2]</sup>, 但不能同时测定孔雀石绿和隐性孔雀石绿残留量。

国外已建立的检测方法主要采用气相色谱质谱联用法测定隐性孔雀石绿<sup>[3]</sup>、高效液相－色谱法同时测定孔雀石绿和隐性孔雀石绿<sup>[4-5]</sup>, 高效液相色谱－质谱法同时测定孔雀石绿和隐性孔雀石绿<sup>[6-7]</sup>, 但是所有液相测定隐性孔雀石绿的方法都需要色谱柱后串接 PbO<sub>2</sub>氧化柱, 将隐性孔雀石绿转化为孔雀石绿。

本文在已有方法的基础上改进了仪器方法, 无需 PbO<sub>2</sub>氧化柱, 利用串联质谱同时测定孔雀石绿和隐性孔雀石绿。实验证明该方法快速、简单, 灵敏度高, 完全可以达到出口欧盟和日本的检测要求。



### 实验部分

#### 仪器

Thermo Finnigan TSQ Quantum 液相色谱 - 高分辨串联四极杆质谱联用仪, 配有 ESI, APCI 和 APPI 离子源

**试剂** ( 除特殊注明外, 所有试剂均为分析纯, 水为重蒸蒸馏水 )

1. 甲醇 ( 色谱纯 ), 乙腈 ( 分析纯 )
2. 二氯甲烷
3. 乙酸铵缓冲溶液: 0.1 mol/L 乙酸铵溶液, 冰乙酸调至 pH 4.5; 0.05 mol/L 乙酸铵溶液, 冰乙酸调至 pH4.5
4. 0.25 g/mL 盐酸羟铵溶液; 0.05 mol/L 对甲苯磺酸溶液
5. 2% ( v/v ) 甲酸溶液; 2% ( v/v ) 甲酸乙腈溶液
6. 5% ( v/v ) 乙酸铵 ( 5 mol/L, pH=7.0 ) 甲醇溶液; 阳离子交换铝萃取小柱: Waters Oasis MCX, 60 mg/3 cc; 中性氧化铝萃取小柱: Supelclean LC-alumina-N, 60 mg/3 cc
7. 硅藻土: 色谱层析级
8. 标准品: 孔雀石绿 ( MG )、无色孔雀石绿 ( LMG ), 纯度 ≥ 98%。同位素内标氘代无色孔雀石绿 D<sub>6</sub>-LMG 购自 WITEGA
9. 标准溶液: 准确称取适量的孔雀石绿、无色孔雀石绿用甲醇分别配制成 100 μg/mL 的标准贮备液, 再用流动相稀释相应的标准溶液

#### 样品前处理方法<sup>[8]</sup>

##### 1. 提取

准确称取 5.00 g 均匀样品于 100 mL 离心管中, 加入 50 μL 同位素内标 D<sub>6</sub>-LMG ( 1 μg/mL ), 依次加入 1 mL 盐酸羟铵 ( 0.25 g/mL )、1mL 对甲苯磺酸 ( 0.05 mol/L )、2 mL 乙酸铵缓冲溶液 ( 0.1 mol/L 乙酸铵, pH4.5 ) 和 40mL 乙腈, 均