

# 采用 Captiva EMR 前处理方法结合 LC/QQQ 测定水产品中的孔雀石绿和结晶紫

## 作者

安娟, 吴翠玲, 杨霞  
安捷伦科技(中国)有限公司

## 前言

孔雀石绿 (MG) 和结晶紫 (CV) 属于人工合成的染料, 因其价格低廉、使用方便, 常用于鱼类水霉病等寄生虫病的防治, 或作为消毒剂用于鲜活鱼类运输过程中以延长鱼类的存活时间。实验研究表明, 孔雀石绿或结晶紫进入人或动物机体后, 可还原代谢为脂溶性隐色孔雀石绿 (LMG) 或隐色结晶紫 (LCV)。LMG 和 LCV 具有高毒性、高残留和致癌、致突变等副作用, 严重威胁消费者的身体健康。我国农业部在 2002 年 5 月将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》中, 禁止将其用于所有食品动物。

本文建立了一种采用 Captiva EMR 前处理方法结合 LC/QQQ 分析草鱼中孔雀石绿和结晶紫的方法。该方法使用 5% 甲酸乙腈提取鱼肉样品, 使用 Agilent Captiva EMR 小柱净化, 并通过 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱快速分离。

## 孔雀石绿 (MG)、隐色孔雀石绿 (LMG) 和结晶紫 (CV)、隐色结晶紫 (LCV) 分析

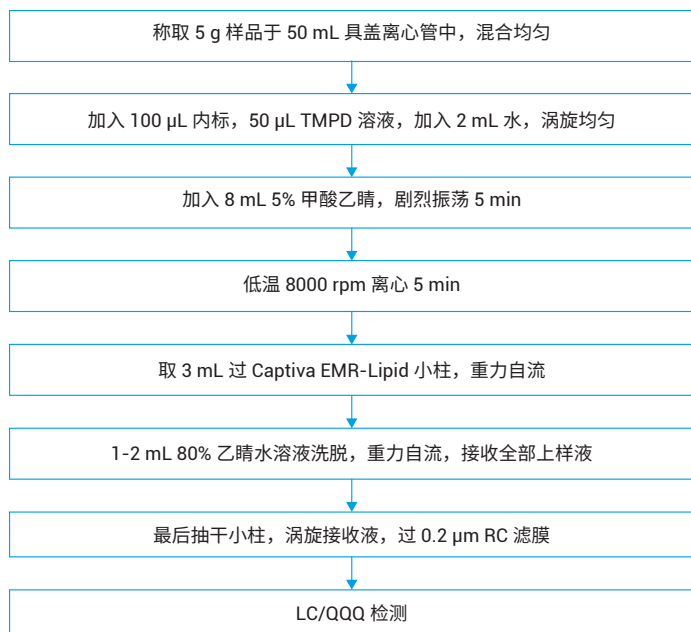


图 1. 样品前处理流程图

内标和 TMPD 溶液的配制：取适量同位素标记的孔雀石绿 (MG-D5) 和同位素标记的隐色孔雀石绿 (LMG-D6) 配成 100 μg/L 的内标溶液。用甲醇溶解 50 mg N,N,N,N-四甲基-1,4-对苯二胺二盐酸盐，并定容至 50 mL，配置成 TMPD 溶液。

表 1. 色谱条件

色谱柱:	Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm	
流动相:	A) 水 (0.1% 甲酸溶液, 5 mmol/L 醋酸铵) B) 乙腈 (0.1% 甲酸溶液)	
进样量:	2 μL	
流速:	0.4 mL/min	
柱温:	30 °C	
梯度程序:	时间 (min)	B (%)
	0	20
	4	50
	5	90
	7	90
	7.1	20
	9	20

表 2. 质谱条件

监测模式:	ESI+
干燥气温度:	250 °C
干燥气流速:	8 L/min
雾化器压力:	40 psi
鞘气温度:	350 °C
鞘气流速:	12 L/min
毛细管电压:	3000 V

表 3. 多反应监测模式监测的离子对

目标物	母离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)
MG	329.2	314.2	160	38
		285.1	160	42
CV	372.2	356.2	180	42
		340.2	180	55
LCV	374.3	358.2	170	30
		238.1	170	26
LMG	331.2	239.1	150	30
		223.1	150	55
MG-D <sub>5</sub>	334.3	318.3	175	38
LMG-D <sub>6</sub>	337.3	240.2	175	30

### 提取溶液的选择

由于孔雀石绿 (MG) 和结晶紫 (CV) 的回收率偏低，我们采用不同浓度的酸化乙腈作为提取溶剂，通过回收率的计算来考察提取效率。随着甲酸浓度的提高，回收率也有所增加。酸度的提高增加了孔雀石绿 (MG) 的稳定性，使其不易在操作过程中降解。除结晶紫 (CV) 外，其他组分的回收率均有一定程度的提高。因此暂时选择 5% 甲酸乙腈作为提取溶剂，在后续步骤中继续优化条件。

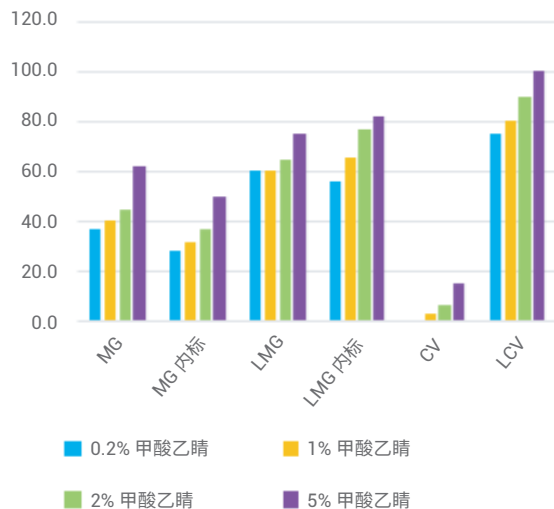


图 2. 不同浓度酸化乙腈洗脱回收率比较

## 洗脱体积的优化

为提高显色结晶紫 (CV) 的回收率, 本方法在常规 EMR 前处理方法的基础上增加了一步洗脱。随着洗脱体积的增加, 回收率有所提高。但是使用过多的洗脱溶剂时, 可能增加稀释体积和杂质。通过优化洗脱曲线, 发现采用 2 mL 80% 乙腈水溶液得到的洗脱回收率最高。

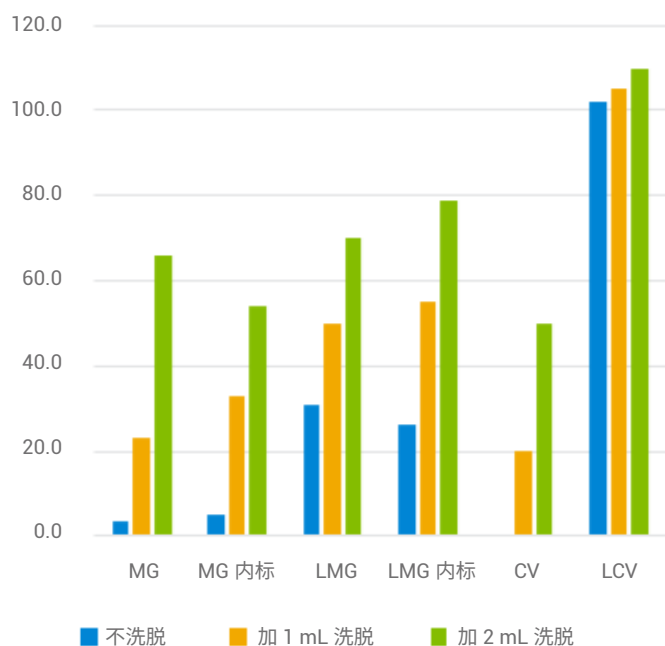


图 3. 洗脱溶剂采用不同洗脱体积回收率比较

## 线性和回收率

如表 4、表 5 和图 4 所示, 本文所述方法适合对草鱼中的孔雀石绿 (MG) 和结晶紫 (CV) 进行检测。该方法的线性相关范围为 0.5–10  $\mu\text{g/L}$  (内标浓度为 1.0  $\mu\text{g/L}$ ) ; 在 0.5  $\mu\text{g/kg}$ 、1.0  $\mu\text{g/kg}$ 、2.0  $\mu\text{g/kg}$  加标浓度下的回收率为 81.8%–97.5%, 且  $\text{RSD} \leq 3.53\%$ 。MG 和 LMG 的回收率用内标法进行校正, CV 和 LCV 的回收率用基质外标法进行校正。

表 4. 孔雀石绿和结晶紫的线性

化合物	内标	回归方程	$\text{R}^2$
MG	MG-D <sub>5</sub>	$Y = 0.25X - 0.46$	0.991
CV	无	$Y = 3.53X - 0.29$	0.999
LMG	LMG-D <sub>6</sub>	$Y = 1.04X - 0.28$	0.999
LCV	无	$Y = 10400.25X - 17290.64$	0.995

表 5. 鱼肉中孔雀石绿和结晶紫的回收率与重现性 (n = 6)

化合物	加标浓度 (ng/g)	平均回收率 (%)	RSD (%)
MG	0.5	81.8	1.45
	1	84.1	2.24
	2	86.6	3.26
CV	0.5	85.1	2.05
	1	85.8	2.12
	2	90.2	2.78
LMG	0.5	91.6	3.48
	1	96.4	2.64
	2	97.5	2.64
LCV	0.5	89.2	2.77
	1	93.5	3.53
	2	95.3	2.21

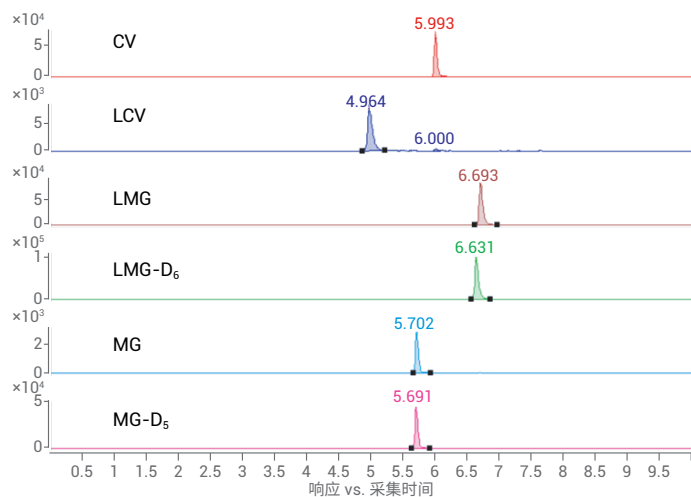


图 4. 总离子流图

本文将 Captiva EMR 前处理方法与 LC/QQQ 结合使用, 建立了一种同时测定孔雀石绿 (MG)、结晶紫 (CV) 及其代谢物隐色孔雀石绿 (LMG) 和隐色结晶紫 (LCV) 的分析方法。该方法具有快速、操作简单等优点。其中采用过滤式小柱可有效去除水产品中的脂质, 同时简化样品前处理步骤, 且回收率在 81.8% 以上。

## 消耗品订购信息

消耗品	部件号
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm	693975-302
陶瓷均质子	5982-9313
Agilent Captiva EMR 小柱, 300 mg, 3 mL	5190-1003
Agilent RC 0.2 μm 15 mm 针头过滤器	5190-5088

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)



微信搜一搜

安捷伦视界

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2020  
2020年3月20日, 中国出版  
5994-1641ZHCN