采用 Fotector-06C 全自动固相萃取仪分析鱼肉中的隐色孔雀石绿

简报编号 FD0015

摘要

依据《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定》，建立基于 Fotector-06 固相萃取分析草鱼中孔雀石绿的检测方法，试样用乙腈提取，使用 Fotector-06C 自动固相萃取系统和中性氧化铝柱进行固相萃取柱净化后，用液相色谱-质谱联用仪，内标法定量。

简介

孔雀石绿是有毒的三苯甲烷类化学物，既是染料，同时也可用作治理鱼类或鱼卵的寄生虫、真菌或细菌感染，对付真菌 Saprolegnia 特别有效，渔场的鱼卵会感染这种真菌；孔雀石绿也常用作处理受寄生虫影响的淡水水产；用作抑菌剂或杀阿米巴原虫剂。但是孔雀石绿中的化学功能团三苯甲烷可致癌，很多国家已经禁用，目前仍有渔民在防治鱼类感染真菌时使用，也有运输商用作消毒，以延长鱼类在长途贩运中的存活时间。我国农业部于 2002 年 5 月已将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》。

仪器与耗材

1 Reeko Fotector-06 自动固相萃取系统，配有浓缩装置。
2 液相色谱仪-质谱联用仪 Thermo TSQ
3 中性氧化铝固相萃取柱（Agela 1000mg/6mL），
4 乙腈（Merck 色谱纯）
5 无水乙酸铵
6 5mmol/L 乙酸铵溶液，称取 0.385g 乙酸铵，用水溶解并定容至 1000mL，冰乙酸调节 PH 至 4.5，过 0.22μ m 滤膜。
7 标准溶液：取适量隐色孔雀石绿标准品稀释成浓度为 100μ g/L 的标准溶液。
8 内标溶液：取适量的氘代隐色孔雀石绿标准品，用乙腈-乙酸铵溶液稀释成 100μ g/L 的标准溶液。

实验方法

1. 称取 5g 匀浆好的样品于 50mL 离心管中，加入适量的标准样品以及 200μ L 内标。
2. 用 11mL 乙腈，超声波萃取 2min，8000r/min 匀浆 30s；
3. 提取液于 4000r/min 离心 5min，上清液转移至 25mL 比色管中。
4. 取另一离心管，加入 11mL 乙腈，清洗刀头 10s，将乙腈转移至前一离心管中，，漩涡混匀，超声波提取 5min，4000r/min 离心 5min
5. 合并上清液于 25mL 比色管中，用乙腈定容成 25mL。
6. 将将比色管中的样品全部转移至 Reeko 上样瓶中，并将上样瓶与中性氧化铝固相萃取柱固定在 Fotector 上，按图一运行程序，洗脱液浓缩至近干，用乙腈-乙酸铵溶液定容成 1mL，供 LC/MS 分析。

No.	操作命令	溶剂	流速 (ml/min)	体积 (ml)	时间(min)	排出
1	活化	乙腈	3.0	5	2.2	废液1
2	上样		2.0	5	3.0	收集试管
3	淋洗	乙腈	2.0	4	2.4	收集试管
4	气推		20.0	10	1.0	收集试管
5	浓缩样品				30.0	
6	结束				38.6	

图 1 Fotector-06C 运行程序

色谱-质谱条件

a) 色谱柱：
Thremo HyPURITY C_{18} 150mm×2.1×5μ m
b) 进样量 10μ L
c) 流动相 A：5mmol/L 乙酸铵，PH=4.5
B：乙腈

d) 洗脱梯度

时间	A%	B%	流速（μL/min）
0	50	50	300
0.5	50	50	300
3	5	95	300
6	5	95	300
6.1	50	50	300
8	50	50	300

e) SRM 离子对：

化合物	母离子	子离子	碰撞能量
孔雀石绿	331	239	20
	331	316	14
氘代孔雀石绿	337	240	20

实验结果

表 1：加标回收率

样品编号	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
加标浓度（ng/mL）	1	1	1	2	2	2	0
回收（ng/mL）内标校正	1.02	1.04	1.06	2.01	2.13	2.07	0
RSD%	2.00			6.00			空白

结论

利用 Reeko Fotector-06 自动固相萃取系统能够很好的重现《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定》，内标校正回收在 100%~110%之间，RSD（n=3）为 2 和 6，符合 GB/T 19857-2005 中对分析结果的质量控制的要求。