ICS 65.150
CCS B 50

SC

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 9441—2023

水产养殖环境(水体、底泥)中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of malachite green, crystal violet and their metabolites residues in water and sediment from aquaculture environments by LC-MS/MS method

2023-02-17 发布　　2023-06-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会渔业资源分技术委员会(SAC/TC 156/SC 10)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院、浙江省海洋水产研究所、中粮营养健康研究院、北京科德诺思技术有限公司。

本文件主要起草人：李晋成、梅光明、杨悠悠、李芹、房金岑、刘欢、韩刚、孙慧武、张小军、何雅静、谢云峰、刘琪、孙涛、闻瑞琪。

水产养殖环境(水体、底泥)中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量的测定　液相色谱-串联质谱法

1　范围

本文件描述了液相色谱-串联质谱法测定水产养殖环境中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物隐色孔雀石绿、隐色结晶紫残留量方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、样品的采集与保存、样品处理、测定、结果计算和检测方法灵敏度、准确度、精密度。

本文件适用于水产养殖环境水体、底泥中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物隐色孔雀石绿、隐色结晶紫残留量的测定。

2　规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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

GB 17378.5　海洋监测规范　第5部分：沉积物分析

SC/T 9102.1　渔业生态环境监测规范　第1部分：总则

SC/T 9102.2　渔业生态环境监测规范　第2部分：海洋

SC/T 9102.3　渔业生态环境监测规范　第3部分：淡水

3　术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4　原理

水样采用二氯甲烷提取；底泥试样经冷冻干燥后研磨均匀，用乙腈/二氯甲烷混合溶液提取，推杆式滤过型中性氧化铝净化柱净化。待检测液供液相色谱-串联质谱测定孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量，内标法定量。

5　试剂和材料

所有试剂，除另外有说明外，均为分析纯试剂；所有试剂经液相色谱-串联质谱仪测定不得检出孔雀石绿、结晶紫及其代谢物。实验用水应符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1　试剂

5.1.1　二氯甲烷(CH_2Cl_2)：色谱纯。

5.1.2　乙腈(CH_3CN)：色谱纯。

5.1.3　甲酸(HCOOH)：色谱纯。

5.1.4　乙酸铵(NH_4CH_2COOH)：分析纯。

5.2　溶液配制

5.2.1　乙腈/二氯甲烷混合液：取90 mL乙腈(5.1.2)和10 mL二氯甲烷(5.1.1)，混合均匀，现用现配。

5.2.2　乙酸铵溶液(5 mmol/L，含0.1%甲酸)：称取0.385 g乙酸铵溶解于水中，加入1 mL甲酸(5.1.3)，用水定容至1 000 mL，过0.22 μm微孔滤膜(水相)。

5.2.3　乙腈(含0.1%甲酸)溶液：精确量取1 mL甲酸(5.1.3)，用乙腈(5.1.2)定容至1 000 mL。

5.2.4　初始流动相：50 mL流动相A(5.2.1)和50 mL流动相B(5.2.2)混合均匀，现用现配。

5.3 标准品

5.3.1 孔雀石绿(MG)、隐色孔雀石绿(LMG)、结晶紫(CV)及隐色结晶紫(LCV)标准品：含量≥97.0%，标准物质详细信息见附录 A。

5.3.2 氘代孔雀石绿(MG-D_5)、氘代隐色孔雀石绿(LMG-D_6)、氘代结晶紫(CV-D_6)和氘代隐色结晶紫(LCV-D_6)标准品：含量≥97.0%，标准物质详细信息见附录 A。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液(100.0 μg/mL)：准确称取适量的孔雀石绿(MG)、隐色孔雀石绿(LMG)、结晶紫(CV)及隐色结晶紫(LCV)标准品，分别用乙腈(5.1.2)溶解并定容，配制成浓度为 100.0 μg/mL 的标准储备液，于－18 ℃避光保存，有效期 6 个月。

5.4.2 内标标准储备液(100.0 μg/mL)：准确称取适量的氘代孔雀石绿(MG-D_5)、氘代隐色孔雀石绿(LMG-D_6)、氘代结晶紫(CV-D_6)和氘代隐色结晶紫(LCV-D_6)标准品，分别用乙腈(5.1.2)溶解并定容，配制成浓度为 100.0 μg/mL 的内标储备液，于－18 ℃避光保存，有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准中间液(1.0 μg/mL)：分别准确吸取 1.0 mL 孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫和隐色结晶紫的标准储备液(5.4.1)于 100 mL 容量瓶中，用乙腈(5.1.2)稀释定容，配制成浓度为 1.0 μg/mL 的混合标准中间液，于－18 ℃避光保存，有效期 2 个月。

5.4.4 混合内标标准中间液(1.0 μg/mL)：分别准确吸取 1.0 mL 氘代孔雀石绿、氘代隐色孔雀石绿、氘代结晶紫和氘代隐色结晶紫内标储备液(5.4.2)于 100 mL 容量瓶中，用乙腈(5.1.2)稀释定容，配制成浓度为 1.0 μg/mL 的混合内标标准中间液，于－18 ℃避光保存，有效期 2 个月。

5.4.5 混合标准使用液(0.10 μg/mL)：准确吸取 1.0 mL 混合标准中间液(5.4.3)于 10 mL 容量瓶中，用乙腈(5.1.2)稀释定容，配制成浓度为 0.10 μg/mL 的混合标准使用液，于－18 ℃避光保存，有效期 1 个月。

5.4.6 混合内标标准使用液(0.10 μg/mL)：准确吸取 1.0 mL 混合内标标准中间液(5.4.4)于 10 mL 容量瓶中，用乙腈(5.1.2)稀释定容，配制成浓度为 0.10 μg/mL 的混合内标标准使用液，于－18 ℃避光保存，有效期 1 个月。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 微孔滤膜(水相)：0.45 μm、0.22 μm。

5.5.2 微孔滤膜(有机相)：0.22 μm。

5.5.3 推杆式滤过型中性氧化铝净化柱：中性氧化铝，50 mg/3 mL。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源(ESI)。

6.2 天平：感量 0.01 g。

6.3 分析天平：感量 0.000 1 g。

6.4 高速离心机：转速≥8 000 r/min。

6.5 冷冻干燥机。

6.6 氮吹仪。

6.7 旋转蒸发仪。

6.8 抽滤装置。

6.9 涡旋混合器。

6.10 网筛：100 目。

7 样品的采集与保存

7.1 按照 SC/T 9102.1、SC/T 9102.2 和 SC/T 9102.3 规定的方法采集样品。

7.2 水样通过抽滤装置过 0.45 μm 水相滤膜去除大颗粒杂质，置于玻璃瓶中，待检测。

7.3 底泥先于−20 ℃预冷冻 24 h，经冷冻干燥机（−50 ℃，真空度＜20 Pa，冷冻干燥 10 h）冷冻干燥后，剔除石块和植物体，用研钵研磨后过 100 目网筛，置于广口玻璃瓶瓶中，待检测。

8 样品处理

8.1 水体

准确量取 7.2 过膜后水样 100 mL（精确至 0.1 mL），置于 250 mL 分液漏斗中，加入 20 μL 混合内标标准使用液（5.4.6），再加入 50 mL 的二氯甲烷（5.1.1），振摇 5 min，静置 30 min，取下层二氯甲烷于 250 mL 鸡心瓶中，再往 250 mL 分液漏斗中加入 50 mL 二氯甲烷（5.1.1）重复提取 1 次，若分层不明显，取其下层液于 50 mL 离心管中，冷冻离心机 6 000 r/min 离心 3 min，再取下层液于 250 mL 鸡心瓶中，合并二氯甲烷提取液，45 ℃旋转蒸发浓缩至近干，残留物加入 2.0 mL 初始流动相（5.2.4）复溶，过 0.22 μm 微孔滤膜（有机相）后，上机测定。

8.2 底泥

8.2.1 准确称取 7.3 过筛后粉末状底泥样品 2.00 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 聚乙烯离心管中，加入 20 μL混合内标标准使用液（5.4.6），加入 2 mL 水，涡旋 30 s，浸润处理 10 min，然后加入 30 mL 乙腈/二氯甲烷混合液（5.2.1），涡旋 2 min，振荡提取 60 min，以 8 000 r/min 离心 5 min，移取上层清液转移于 100 mL 鸡心瓶中。45 ℃旋转蒸发至近干，使用 1 mL 乙腈（5.1.2）复溶，待净化。

8.2.2 拉动推杆式滤过型中性氧化铝净化柱活塞抽取复溶液，推动活塞并接收流出液，加入 5 mmoL/L 乙酸铵溶液（5.2.2）并定容至 2.0 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜（有机相）后，上机测定。

8.2.3 另取（2.00±0.05）g 底泥样品，按 GB 17378.5 中的规定测定含水率。

9 测定

9.1 标准工作曲线的制备

准确移取 100.0 ng/mL 混合标准使用液（5.4.5），初始流动相（5.2.4）稀释至 0.20 ng/mL、0.50 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL 混合标准工作液，内标液浓度均为 1.0 ng/mL，现用现配。取系列标准工作液进样，以目标物和氘代目标物峰面积比值为纵坐标、对应目标物浓度为横坐标、绘制标准工作曲线。求回归方程和相关系数。

9.2 液相色谱条件

液相色谱的条件为：

a) C_{18}色谱柱（2.1 mm ×100 mm，1.7 μm）或性能相当者；

b) 流动相：A 为乙酸铵溶液（5.2.2），B 为乙腈溶液（5.2.3），梯度条件见表 1；

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 进样量：5 μL；

e) 柱温：40 ℃。

表 1 梯度条件

时间，min	5 mmol/L 乙酸铵溶液 A 相，%	乙腈（含甲酸 0.1%） B 相，%
0	50	50
1.5	5	95
3.5	5	95
4	50	50
5	50	50

9.3 质谱测定参考条件

见附录 B。

9.4 液相色谱-串联质谱测定

9.4.1 定性测定

按照上述条件测定样品和建立标准工作曲线，如果样品中化合物质量色谱峰的保留时间与标准溶液相比在±2.5%的可允许范围之内；待测化合物的定性离子对的相对丰度与浓度相当的标准溶液相比，相对丰度偏差不超过表2的规定，则可判断样品中存在相应的目标化合物。孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物混合标准工作液的参考保留时间(见附录C中C.1)和液相色谱-串联质谱多反应监测色谱图(见图C.1)。

表2 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

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

9.4.2 量测定

按照内标法进行定量计算。

9.5 白试验

除不加试样外，均按上述测定条件和步骤进行。

10 结果计算

10.1 校正因子

按公式(1)计算目标物对内标物的相对校正因子。

$$F_i = \frac{A_s \times m_r}{A_r \times m_s} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

F_i ——目标物对内标物的相对校正因子；

A_s ——内标物的峰面积；

A_r ——标准品的峰面积；

m_s ——内标物质量的数值，单位为微克(μg)；

m_r ——标准品质量的数值，单位为微克(μg)。

10.2 残留量

水样中目标物的残留量按公式(2)计算，底泥中目标物的残留量按公式(3)计算，测试结果需扣除空白值。

$$X_i = \frac{F_i \times A_i \times m'_s}{A'_s \times V} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

X_i ——水体中目标物残留量的数值，单位为纳克每升(ng/L)；

A'_s ——标准品溶液中内标物的峰面积；

A_i ——样品中每种目标物的峰面积；

m'_s ——标准溶液中内标物质量的数值，单位为纳克(ng)；

V ——水体体积的数值，单位为升(L)。

$$X_j = \frac{F_i \times A_i \times m'_s}{A'_s \times m \times (1-w)} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

X_j ——底泥中目标物残留量的数值，单位为微克每千克(μg/kg)；

m ——底泥样品质量的数值，单位为克(g)；

w ——样品含水率的数值，单位为质量分数(%)。

11 检测方法灵敏度、准确度和精密度

11.1 灵敏度

水体中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物的定量限均为 5.0 ng/L、检出限均为 2.0 ng/L。底泥中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物的定量限均为 0.50 μg/kg、检出限均为 0.20 μg/kg。

11.2 准确度

水中添加浓度为 5.0 ng/L～100.0 ng/L 时，回收率为 80%～115%（见附录 D 中表 D.1 和表 D.2）。

底泥中添加浓度为 0.50 μg/kg～10.0 μg/kg 时，回收率为 80%～115%（见表 D.3）。

11.3 精密度

本方法批内相对标准偏差≤15%，批间相对标准偏差≤20%。

附 录 A
（资料性）
标准物质详细信息表

表 A.1 列出了目标物及内标物标准物质的中文名、英文名、缩写和 CAS 号。

表 A.1 目标物及内标物标准物质的中文名、英文名、缩写和 CAS 号

序号	中文名	英文名	缩写	CAS 号
1	孔雀石绿	Malachite green	MG	569-64-2
2	隐色孔雀石绿	Leucomalachite green	LMG	129-73-7
3	结晶紫	Crystal violet	CV	548-62-9
4	隐色结晶紫	Leucocrystal violet	LCV	603-48-5
5	孔雀石绿-D_6	Malachite green-D_6	MG-D_6	1258668-21-1
6	隐色孔雀石绿-D_6	Leucomalachite green-D_6	LMG-D_6	1173021-13-0
7	结晶紫-D_6	Crystal violet-D_6	CV-D_6	548-62-9
8	隐色结晶紫-D_6	Leucocrystal violet-D_6	LCV-D_6	1173023-92-1

AGRICULTURAL STANDARD PUBLISHING RESEARCH CENTER

附 录 B
（资料性）
质谱测定参考条件

以下所列参数是在 Waters Xevo TQS 串联质谱仪上完成的，此处列出的实验用型号仅是为了提供参考，并不涉及目的，鼓励标准使用者尝试不同厂家和型号的仪器。

a） 离子源：电喷雾离子源；
b） 扫描方式：正离子扫描；
c） 毛细管电压 1.70 kV；
d） 源补偿电压 50 V；
e） 脱溶剂温度 600 ℃；
f） 脱溶剂气流量 600 L/h；
g） 锥孔气流量 150 L/h；
h） 检测方式：多反应监测模式；
i） 保留时间、定性离子对、定量离子对和碰撞能量参考值见表 B.1。

表 B.1 保留时间、定性离子对、定量离子对和碰撞能量

目标物	保留时间 min	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量 eV
孔雀石绿	1.65	329.3	313.3*	35
			208.3	35
隐色孔雀石绿	2.78	331.3	316.3	20
			239.3*	30
结晶紫	2.01	372.3	356.3*	40
			340.3	50
隐色结晶紫	2.82	374.3	358.3*	32
			238.3	25
孔雀石绿-D_5	1.66	334.3	318.2	35
隐色孔雀石绿-D_6	2.77	337.3	322.3	20
结晶紫-D_6	2.00	378.3	362.3	38
隐色结晶紫-D_6	2.80	380.3	364.3	35
注：* 为定量离子。				

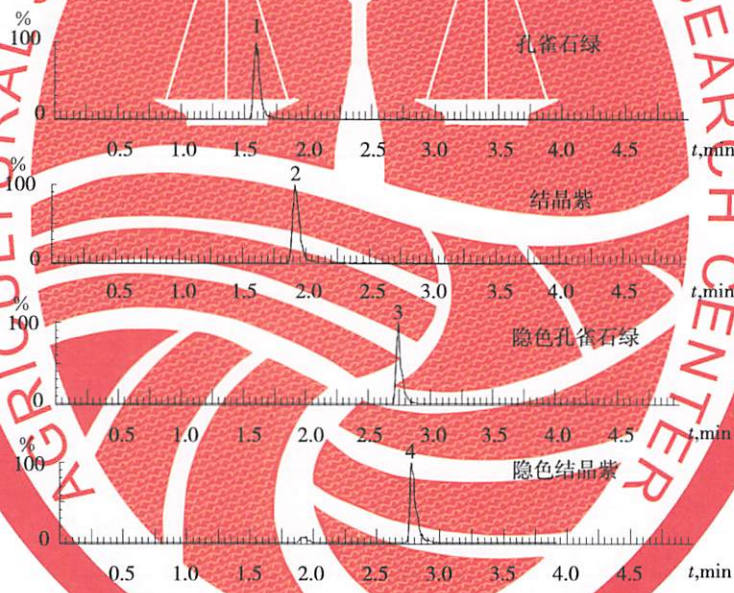
附 录 C
（资料性）
孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物标准溶液出峰顺序及参考保留时间和液相色谱-串联质谱色谱图

C.1 表C.1列出了孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物标准溶液出峰顺序及参考保留时间。

表C.1 孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物标准溶液出峰顺序及参考保留时间

出峰顺序	标准物质	保留时间 min
1	孔雀石绿	1.59
2	结晶紫	1.91
3	隐色孔雀石绿	2.74
4	隐色结晶紫	2.76

C.2 图C.1列出了孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物标准溶液液相色谱-串联质谱多反应监测色谱图。



图C.1 孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物标准溶液液相色谱-串联质谱多反应监测色谱图

AGRICULTURAL STANDARD PUBLISHING RESEARCH CENTER

附 录 D
（资料性）
添加回收率

D.1 表 D.1 列出了淡水养殖水体中测定孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物添加回收率及相对标准偏差。

表 D.1 淡水养殖水体中测定孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物添加回收率及相对标准偏差

化合物名称	添加水平 ng/L	平均测定浓度 ng/L	平均回收率 %	相对标准偏差 %
孔雀石绿	5.0	4.73	94.6	6.76
	20.0	20.10	100.5	5.02
	100.0	103.00	103.0	5.70
隐色孔雀石绿	5.0	4.38	87.6	8.34
	20.0	20.38	101.9	4.80
	100.0	102.10	102.1	4.87
结晶紫	5.0	4.78	95.7	7.98
	20.0	21.12	105.6	6.42
	100.0	104.70	104.7	5.93
隐色结晶紫	5.0	4.56	91.2	5.28
	20.0	20.96	104.8	6.30
	100.0	104.20	104.2	4.69

D.2 表 D.2 列出了海水养殖水体中测定孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物添加回收率及相对标准偏差。

表 D.2 海水养殖水体中测定孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物添加回收率及相对标准偏差

化合物名称	添加水平 ng/L	平均测定浓度 ng/L	平均回收率 %	相对标准偏差 %
孔雀石绿	5.0	4.84	96.8	5.22
	20.0	18.94	94.7	5.28
	100.0	104.30	104.3	6.69
隐色孔雀石绿	5.0	4.09	81.8	2.84
	20.0	20.96	104.8	5.76
	100.0	102.80	102.8	4.46
结晶紫	5.0	4.98	99.6	5.72
	20.0	20.40	102.0	4.49
	100.0	102.20	102.2	3.78
隐色结晶紫	5.0	4.33	86.7	4.93
	20.0	19.96	99.8	3.29
	100.0	104.50	104.5	5.88

D.3 表 D.3 列出了养殖环境底泥中测定孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物添加回收率及相对标准偏差。

表 D.3 养殖环境底泥中测定孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物添加回收率及相对标准偏差

化合物名称	添加水平 μg/kg	平均测定浓度 μg/kg	平均回收率 %	相对标准偏差 %
孔雀石绿	0.5	0.521	104.2	4.67
	2.0	1.928	96.4	5.65
	10.0	9.840	98.4	3.68

表 D.3（续）

化合物名称	添加水平 μg/kg	平均测定浓度 μg/kg	平均回收率 %	相对标准偏差 %
隐色孔雀石绿	0.5	0.510	102.0	4.87
	2.0	2.016	100.8	3.92
	10.0	10.230	102.3	6.84
结晶紫	0.5	0.523	104.7	6.57
	2.0	1.982	99.1	4.91
	10.0	10.340	103.4	4.23
隐色结晶紫	0.5	0.456	91.1	9.38
	2.0	1.928	96.4	6.58
	10.0	10.030	100.3	3.34

中华人民共和国
水产行业标准
水产养殖环境(水体、底泥)中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量的测定　液相色谱-串联质谱法
SC/T 9441—2023
*　*　*
中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125　网址:www.ccap.com.cn)
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行　各地新华书店经销
*　*　*
开本 880mm×1230mm 1/16　印张 1　字数 20千字
2023年3月第1版　2023年3月北京第1次印刷
书号:16109·9354
定价:32.00元

版权专有　侵权必究
举报电话:(010) 59194261

SC/T 9441—2023