

# BJS

## 食品补充检验方法

BJS 202206

---

### 苦丁茶中孔雀石绿的测定

2022-09-10 发布

---

国家市场监督管理总局 发布

# 苦丁茶中孔雀石绿的测定

## 1 范围

本方法规定了苦丁茶中孔雀石绿的液相色谱-串联质谱测定方法。  
本方法适用于苦丁茶中孔雀石绿的测定。

## 2 原理

试样用酸化乙腈提取,提取液经分散固相萃取净化,采用液相色谱-串联质谱仪检测,内标法定量。

## 3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

### 3.1 试剂

- 3.1.1 乙腈( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):色谱纯。
- 3.1.2 冰乙酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )。
- 3.1.3 乙酸铵( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ):优级纯。
- 3.1.4 甲酸( $\text{HCOOH}$ ):优级纯。
- 3.1.5 无水硫酸镁( $\text{MgSO}_4$ )。
- 3.1.6 无水乙酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )。

### 3.2 试剂配制

- 3.2.1 乙酸-乙腈溶液(1+99):量取 10 mL 冰乙酸(3.1.2)加入 990 mL 乙腈(3.1.1)中混匀。
- 3.2.2 含 0.1% (体积分数)甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液:称取 0.385 g 乙酸铵(3.1.3),加入 1 mL 甲酸(3.1.4),用水溶解稀释至 1 000 mL。

### 3.3 标准品

孔雀石绿草酸盐、隐色孔雀石绿、孔雀石绿- $\text{D}_5$  苦味酸盐、隐色孔雀石绿- $\text{D}_6$  的中文名称、英文名称、CAS 编号、分子式、相对分子质量和折算系数见附录 A 中表 A.1,纯度 $\geq 98\%$ 。

### 3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 孔雀石绿、隐色孔雀石绿标准储备液:分别准确称取孔雀石绿草酸盐标准品(3.3)14.1 mg(精确至 0.1 mg)(孔雀石绿草酸盐折算为孔雀石绿的换算系数为 0.711)和隐色孔雀石绿标准品(3.3)10 mg(精确至 0.1 mg),分别置于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,配制成质量浓度均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液。-18  $^{\circ}\text{C}$  避光保存,有效期 6 个月。
- 3.4.2 孔雀石绿- $\text{D}_5$ 、隐色孔雀石绿- $\text{D}_6$  内标储备液:分别准确称取孔雀石绿- $\text{D}_5$  苦味酸盐标准品(3.3)16.9 mg(孔雀石绿- $\text{D}_5$  苦味酸盐折算为孔雀石绿- $\text{D}_5$  的换算系数为 0.595)和隐色孔雀石绿- $\text{D}_6$  标准品(3.3)10 mg(精确至 0.1 mg),分别置于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,配制成质量

浓度均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的内标储备液。-18  $^{\circ}\text{C}$  避光保存,有效期 6 个月。

3.4.3 混合标准中间液:分别准确移取孔雀石绿、隐色孔雀石绿标准储备液(3.4.1)各 1.00 mL 置 100 mL 棕色容量瓶中,用乙酸-乙腈溶液(3.2.1)配制成质量浓度均为 1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准中间液。-18  $^{\circ}\text{C}$  避光保存,有效期 1 个月。

3.4.4 混合内标中间液:分别准确移取孔雀石绿- $\text{D}_5$ 、隐色孔雀石绿- $\text{D}_5$  内标储备液(3.4.2)各 1.00 mL,用乙酸-乙腈溶液(3.2.1)配制成质量浓度均为 1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合内标标准液。-18  $^{\circ}\text{C}$  避光保存,有效期 1 个月。

3.4.5 混合标准系列工作液:分别准确吸取混合标准中间液(3.4.3)和混合内标中间液(3.4.4)适量,用乙酸-乙腈溶液(3.2.1)稀释,摇匀,作为系列混合标准工作液,各待测组分质量浓度依次为 1.00  $\text{ng}/\text{mL}$ 、2.00  $\text{ng}/\text{mL}$ 、5.00  $\text{ng}/\text{mL}$ 、10.0  $\text{ng}/\text{mL}$ 、20.0  $\text{ng}/\text{mL}$ ,混合标准系列工作液中孔雀石绿- $\text{D}_5$  和隐色孔雀石绿- $\text{D}_5$  质量浓度均为 8.00  $\text{ng}/\text{mL}$ 。

临用新制或依仪器响应情况配制适当浓度的混合标准系列工作液。

### 3.5 材料

3.5.1 乙二胺-*N*-丙基硅烷化硅胶(PSA):40  $\mu\text{m}$ ~60  $\mu\text{m}$ 。

3.5.2 十八烷基硅烷键合硅胶( $\text{C}_{18}$ ):40  $\mu\text{m}$ ~60  $\mu\text{m}$ 。

3.5.3 微孔滤膜:0.22  $\mu\text{m}$ ,有机系。

## 4 仪器和设备

4.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

4.2 分析天平:感量分别为 1 mg 和 0.1 mg。

4.3 涡旋混合器。

4.4 离心机: $\geq 4\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

## 5 分析步骤

### 5.1 试样制备和保存

取适量样品,粉碎后充分混匀,放入洁净容器中,于室温避光保存。

### 5.2 试样前处理

称取 2 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 聚丙烯离心管中,准确加入 120  $\mu\text{L}$  混合内标中间液(3.4.4),再加入 10 mL 水,涡旋混匀 30 s,浸泡 30 min。加入 15 mL 乙酸-乙腈溶液(3.2.1),涡旋提取 1 min,再加入 5 g 无水硫酸镁(3.1.5)、7.5 g 无水乙酸钠(3.1.6),盖上离心管盖,剧烈震荡 1 min,4 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 5 min,吸取 2 mL 上清液加到内置 300 mg 无水硫酸镁(3.1.5)、100 mg PSA(3.5.1)、100 mg  $\text{C}_{18}$ (3.5.2)的 15 mL 离心管中,涡旋混匀 1 min,4 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 5 min,取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  有机相微孔滤膜,滤液供液相色谱-串联质谱仪测定。

上述处理中净化前的上清液吸取量可根据需要调整,净化材料(无水硫酸镁、PSA、 $\text{C}_{18}$ )用量按比例增减。

### 5.3 仪器参考条件

5.3.1 液相色谱参考条件如下。

a) 液相色谱柱: $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm,5.0  $\mu\text{m}$ ),或性能相当色谱柱。

b) 流动相:(A)含 0.1%甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液;(B)乙腈。洗脱梯度参考条件见表 1。

- c) 流速:0.8 mL/min。  
 d) 柱温:30 °C。  
 e) 进样量:10  $\mu$ L。

表 1 色谱洗脱梯度参考条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流速/(mL/min)
0.00	95	5	0.8
3.00	5	95	0.8
9.00	5	95	0.8
9.10	95	5	0.8
12.0	95	5	0.8

## 5.3.2 质谱参考条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);  
 b) 检测方式:多反应监测(MRM);  
 c) 扫描方式:正离子模式;  
 d) 电喷雾电压:5.5 kV;  
 e) 雾化气压力:344.7 kPa(50 psi);  
 f) 离子源温度:550 °C;  
 g) 气帘气压力:241.3 kPa(35 psi);  
 h) 辅助加热气压力:413.7 kPa(60 psi);  
 i) 碰撞气:中等;  
 j) 定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量见表 2。

表 2 各化合物的定性离子、定量离子、去簇电压和碰撞能量

化合物名称	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	去簇电压/V	碰撞能量/eV
孔雀石绿	329.2	313.1 <sup>a</sup>	40	46
		208.2	40	42
隐色孔雀石绿	331.2	316.1 <sup>a</sup>	90	35
		239.0	90	30
孔雀石绿-D <sub>5</sub>	334.2	318.3 <sup>a</sup>	100	48
隐色孔雀石绿-D <sub>6</sub>	337.1	322.1 <sup>a</sup>	95	28
<sup>a</sup> 定量离子。				

质谱条件仅供参考,当采用不同质谱仪器时,仪器参数可能存在差异,测定前应将质谱参数优化到最佳。

## 5.4 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液(3.4.5)分别注入液相色谱-串联质谱仪中,测定相应的被测组分,以被测组分浓度与对应内标浓度比值为横坐标,被测组分色谱峰面积与对应内标色谱峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程。

5.5 测定

5.5.1 定性测定

将混合标准系列工作液(3.4.5)和试样溶液(5.2)分别注入液相色谱-串联质谱仪中测定,试样中目标化合物色谱峰的保留时间与混合标准系列工作液色谱峰的保留时间相比较,变化范围应在±2.5%之内,且其定性离子与浓度相当的标准溶液中相应的定性离子相对丰度相比,偏差不得超过表3规定的范围。

表3 相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

5.5.2 定量测定

将试样溶液同混合标准系列工作液进样测定,根据标准曲线得到试样溶液中待测物的浓度,计算样品中待测物的含量。

待测物的MRM色谱图参见附录B。

5.6 空白试验

不称取试样,均按试样同法处理。应确认不含有干扰待测组分的物质。

6 结果计算

试样中目标化合物的含量按公式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X —— 试样中待测组分的含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- ρ —— 由标准曲线计算所得的试样溶液中待测组分的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 提取液体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样的称样量,单位为克(g);
- 1 000—— 换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。本方法孔雀石绿的测定结果系指孔雀石绿和它的代谢物隐色孔雀石绿之和,以孔雀石绿表示。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的15%。

8 其他

本方法孔雀石绿和隐色孔雀石绿的检出限均为3.0 μg/kg;定量限均为10 μg/kg。

## 附 录 A

(资料性)

标准品及内标的中文名称、英文名称、CAS 编号、分子式、相对分子质量和折算系数

标准品及内标的中文名称、英文名称、CAS 编号、分子式、相对分子质量和折算系数见表 A.1。

表 A.1 标准品及内标的中文名称、英文名称、CAS 编号、分子式和相对分子质量

序号	中文名称	英文名称	CAS 编号	分子式	相对分子质量	折算系数
1	孔雀石绿草酸盐	Malachite green oxalate salt	2437-29-8	$C_{52}H_{54}N_4O_{12}$	927.02	0.711
2	隐色孔雀石绿	Leucomalachite green	129-73-7	$C_{23}H_{26}N_2$	330.48	1.00
3	孔雀石绿-D <sub>5</sub> 苦味酸盐	Malachite green-D <sub>5</sub> picrate	1258668-21-1	$C_{29}H_{22}D_5N_5O_7$	562.59	0.595
4	隐色孔雀石绿-D <sub>6</sub>	Leucomalachite green-D <sub>6</sub>	1173021-13-0	$C_{23}H_{20}D_6N_2$	336.50	1.00

附录 B

(资料性)

孔雀石绿、隐色孔雀石绿标准溶液及孔雀石绿-D<sub>5</sub>、隐色孔雀石绿-D<sub>6</sub> 内标溶液 MRM 色谱图

孔雀石绿、隐色孔雀石绿标准溶液及孔雀石绿-D<sub>5</sub>、隐色孔雀石绿-D<sub>6</sub> 内标溶液 MRM 色谱图见图 B.1。

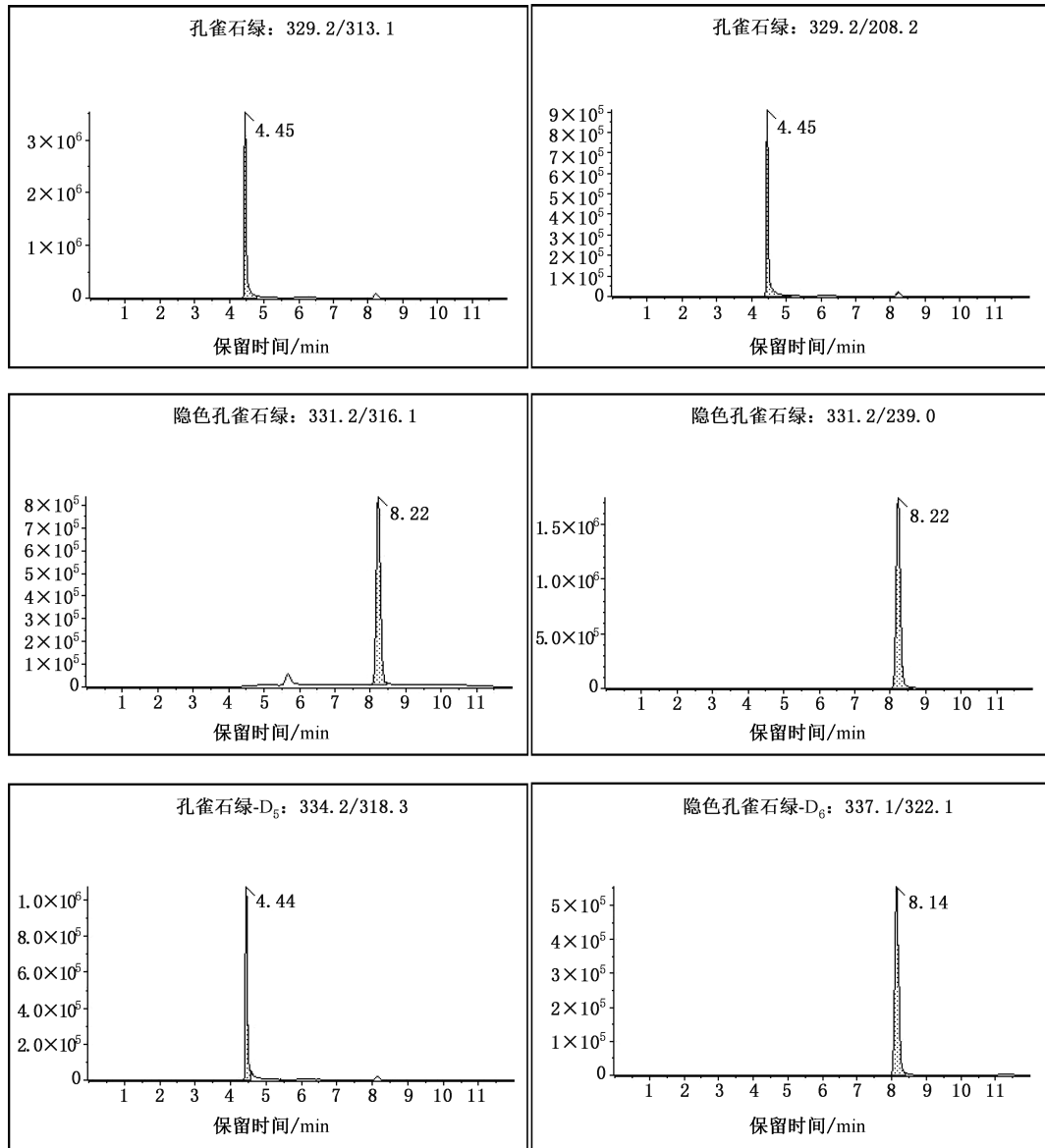


图 B.1 孔雀石绿、隐色孔雀石绿标准溶液及孔雀石绿-D<sub>5</sub>、隐色孔雀石绿-D<sub>6</sub> 内标溶液 MRM 色谱图

本方法负责起草单位:宜宾市食品药品检验检测中心。

本方法验证单位:福建省产品质量检验研究院、中国检验认证集团湖南有限公司、成都海关技术中心、乐山市食品药品检验检测中心、四川赛纳斯分析检测有限公司。

本方法主要起草人:聂立、刘燕、彭章明、陈红霞、兰瑞容、陈代宏、蒋雨、范志平、黄霞、兑靖冬、祝晓艳、王明、范子玮。