

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4437—2023

畜肉中龙胆紫的测定
液相色谱-串联质谱法

Determination of crystal violet in livestock meat—
Liquid chromatography with tandem-mass spectrometry method

2023-12-22 发布

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畜牧兽医局提出。

本文件由全国屠宰加工标准化技术委员会(SAC/TC 516)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农产品加工研究所、北京市农产品质量安全中心、赤峰市动物疫病预防控制中心、安徽省兽药饲料监察所、食药环检验研究院(山东)集团有限公司、日照高新区河山镇农业综合服务中心、海南省动物疫病预防控制中心、北京市畜牧总站、苏州市动物疫病预防控制中心、山东百脉泉酒业股份有限公司、北京英太格瑞检测技术有限公司、济南市历城区综合检验检测中心。

本文件主要起草人：单吉浩、温雅君、斯琴图雅、吴昊、刘莹莹、刘伟、刘发全、胡明霞、李庆霞、杨信、徐迪、李建勋、李复煌、顾津僮、毕言锋、卢培培、叶丰、何月新、周晓倩、徐宏、汪慧慧、马少红。



畜肉中龙胆紫的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了畜肉中龙胆紫及其分解物隐性龙胆紫的液相色谱-串联质谱测定方法。
本文件适用于猪肉、牛肉、羊肉、驴肉和马肉中龙胆紫及其分解物隐性龙胆紫的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的龙胆紫及其分解物隐性龙胆紫用乙腈提取,经混合阳离子固相柱净化,液相色谱-串联质谱仪测定,内标法定量。

5 试剂和材料

除非另有规定,在分析中仅使用分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 5.1.2 甲酸(HCOOH):色谱纯。
- 5.1.3 甲醇(CH_3OH)。
- 5.1.4 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$):色谱纯。
- 5.1.5 乙酸(CH_3COOH)。

5.2 溶液的配制

- 5.2.1 2%甲酸溶液:取 2 mL 甲酸(5.1.2),用水稀释至 100 mL。
- 5.2.2 2%甲酸-乙腈溶液:取 2 mL 甲酸(5.1.2),用乙腈(5.1.1)稀释至 100 mL。
- 5.2.3 乙酸铵溶液(5 mmol/L, pH 7.0):取 0.38 g 乙酸铵,用水溶解并稀释至 900 mL,用乙酸(5.1.5)调 pH 至 7.0,用水稀释至 1 000 mL。
- 5.2.4 5%乙酸铵-甲醇溶液:取 5 mL 乙酸铵溶液(5.2.3),用甲醇(5.1.3)稀释至 100 mL。
- 5.2.5 乙酸铵-乙腈溶液:取 100 mL 乙酸铵溶液(5.2.3),加 100 mL 乙腈(5.1.1)。
- 5.2.6 0.1%甲酸-乙酸铵溶液:取 1 mL 甲酸(5.1.2),用乙酸铵溶液(5.2.3)稀释至 1 000 mL。
- 5.2.7 0.1%甲酸-乙腈溶液:取 1 mL 甲酸(5.1.2),用乙腈溶液(5.1.1)稀释至 1 000 mL。

5.3 标准品

龙胆紫和隐性龙胆紫及 2 种同位素内标物标准品:纯度 $\geq 97\%$,中英文名称、CAS 号、分子式见附录 A。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 混合标准储备溶液(1 mg/mL):分别称取各 10 mg(精确至 0.1 mg)龙胆紫标准品和隐性龙胆紫标准品,用乙腈(5.1.1)溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度为 1 mg/mL 的混合标准储备溶液,于-18 ℃以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准中间溶液(10 μg/mL):准确移取 0.1 mL 混合标准储备溶液(5.4.1),用乙腈(5.1.1)稀释并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度为 10 μg/mL 的混合标准中间溶液,于-18 ℃以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.3 混合标准工作溶液(100 ng/mL):准确移取 0.1 mL 混合标准中间溶液(5.4.2),用乙腈(5.1.1)稀释并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,于 0 ℃~4 ℃避光保存,有效期 1 个月。

5.4.4 混合同位素内标标准储备溶液(1 mg/mL):分别称取各 10 mg(精确至 0.1 mg)龙胆紫-D₆标准品和隐性龙胆紫-D₆标准品(5.3),用乙腈(5.1.1)溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度为 1 mg/mL 的混合同位素内标标准储备溶液,于-18 ℃以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.5 混合同位素内标标准中间溶液(10 μg/mL):准确移取 0.1 mL 混合同位素内标标准储备溶液(5.4.4),用乙腈(5.1.1)稀释并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度为 10 μg/mL 的混合同位素内标标准中间溶液,于-18 ℃以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.6 混合同位素内标标准工作溶液(100 ng/mL):准确移取 0.1 mL 混合同位素内标标准中间溶液(5.4.5),用乙腈(5.1.1)稀释并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度为 100 ng/mL 的混合同位素内标标准工作溶液,于 0 ℃~4 ℃避光保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 陶瓷均质子。

5.5.2 混合阳离子固相萃取小柱:60 mg/3 mL,或相当者。

5.5.3 微孔滤膜:0.22 μm,有机系。

6 仪器设备

6.1 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 和 0.000 01 g。

6.3 pH 计。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 超声波仪。

6.6 离心机:转速≥8 000 r/min,温度可调范围 0 ℃~4 ℃。

6.7 固相萃取装置。

6.8 氮吹仪。

7 试样的制备与保存

7.1 试样制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的混合标准工作溶液,作为空白添加试样。

7.2 试样保存

-18 ℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取 5 g 试样(精确至±0.05 g)于 50 mL 具塞离心管内,加入 2 粒陶瓷均质子,加 10 mL 乙腈(5.1.1)和 200 μ L 混合同位素内标标准工作溶液(5.4.6),加盖涡旋振荡 5 min,用超声波仪超声 10 min,5 000 r/min 低温(0 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C)离心 5 min,上清液转移至 25 mL 的比色管中;再向离心管中加入 10 mL 乙腈(5.1.1),涡旋振荡 5 min,重复上述超声提取和离心,将上清液合并至同一比色管中,用乙腈(5.1.1)定容至 25.0 mL,摇匀,作为备用液。

8.2 净化

取混合阳离子固相萃取小柱,依次用 3 mL 乙腈(5.1.1)和 3 mL 2%的甲酸溶液(5.2.1)活化。移取 5.00 mL 上述备用液过混合阳离子固相萃取小柱,依次用 2 mL 2%甲酸-乙腈溶液(5.2.2)和 6 mL 乙腈(5.1.1)淋洗混合阳离子固相萃取小柱,弃去流出液,抽干,用 4 mL 5%乙酸铵-甲醇溶液(5.2.4)洗脱。过柱流速控制为 1 mL/min,收集洗脱液,45 $^{\circ}$ C 下氮气吹至干后,加 2.0 mL 乙酸铵-乙腈溶液(5.2.5)溶解,涡旋混匀,过 0.22 μ m 滤膜后供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 标准曲线的制备

准确移取混合标准工作溶液(5.4.3)和混合同位素内标标准工作溶液(5.4.6)适量,用乙酸铵-乙腈溶液(5.2.5)稀释,配制成龙胆紫和隐性龙胆紫浓度分别为 0.5 μ g/L、1.0 μ g/L、2.0 μ g/L、10 μ g/L 和 50 μ g/L(2 种同位素内标物浓度均为 2 μ g/L)的系列标准溶液,临用现配,供液相色谱-串联质谱仪测定。以标准物特征离子色谱峰的峰面积与同位素内标物特征离子色谱峰的峰面积比值为纵坐标、相应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准工作曲线,求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C_{18} 柱(100 mm \times 2.1 mm,粒径 2.7 μ m),或相当者;
- 流动相 A 为 0.1%甲酸-乙腈溶液(5.2.7),流动相 B 为 0.1%甲酸-乙酸铵溶液(5.2.6),梯度洗脱条件见表 1;
- 流速:0.4 mL/min;
- 柱温:40 $^{\circ}$ C;
- 进样量:2 μ L。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间, min	0.1%甲酸-乙腈, %	0.1%甲酸-乙酸铵溶液, %
0	10	90
2.0	80	20
3.0	90	10
5.0	90	10
5.1	10	90
7.0	10	90

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- 扫描方式:正离子扫描;
- 毛细管电压:3 500 V;
- 离子源温度:150 $^{\circ}$ C;
- 雾化器压力:40 psi;
- 脱溶剂气温度:325 $^{\circ}$ C;
- 脱溶剂气:氮气 15 L/min;
- 监测方式:多反应监测(MRM);

i) 监测离子对、裂解电压和碰撞能量见表 2。

表 2 龙胆紫和隐性龙胆紫及 2 种同位素内标物的监测离子对、裂解电压和碰撞能量

化合物	定性离子对, m/z	定量离子对, m/z	裂解电压, V	碰撞能量, eV
龙胆紫	372.1>356.0	372.1>356.0	380	50
	372.1>340.0		380	65
龙胆紫-D ₆	378.1>362.3	378.1>362.3	380	38
隐性龙胆紫	374.2>358.0	374.2>358.0	380	35
	374.2>238.0		380	30
隐性龙胆紫-D ₆	380.1>364.4	380.1>364.4	380	50

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试样溶液中龙胆紫和隐性龙胆紫的保留时间与标准溶液中龙胆紫和隐性龙胆紫的保留时间相比,偏差在±2.5%以内。试样溶液中的相对离子丰度应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致,允许偏差应符合表 3 的规定。

表 3 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	允许偏差
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

8.4.3.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,按内标法以色谱峰面积定量,定量离子采用丰度最大的二级特征离子碎片。标准溶液及试样溶液中龙胆紫和隐性龙胆紫与其相应同位素内标峰面积比均应在仪器检测的线性范围内。对于残留量超出仪器线性范围的,在提取时根据目标物浓度相应增加同位素内标工作溶液的添加量,使试样溶液稀释后龙胆紫和隐性龙胆紫的浓度在曲线范围之内,对应同位素内标浓度与标准工作溶液一致。标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。

8.5 空白试验

取空白试样,除不添加龙胆紫和隐性龙胆紫外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

多点校准按公式(1)计算,单点校准按公式(2)计算。

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中龙胆紫或隐性龙胆紫含量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- ρ —— 从标准曲线查得的试样溶液中龙胆紫或隐性龙胆紫质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);
- V_1 —— 备用液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V —— 上机前定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 过固相小柱备用液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)。

$$X = \frac{C_s \times C_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V_1 \times V \times 1000}{C'_{is} \times A_s \times A_{is} \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X ——试样中龙胆紫或隐性龙胆紫含量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- C_s ——标准溶液中龙胆紫或隐性龙胆紫浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);
- C_{is} ——试样溶液中龙胆紫或隐性龙胆紫同位素内标浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);
- C'_{is} ——标准溶液中龙胆紫或隐性龙胆紫同位素内标浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);
- A_i ——试样溶液中龙胆紫或隐性龙胆紫的峰面积;
- A_{is} ——试样溶液中龙胆紫或隐性龙胆紫同位素内标的峰面积;
- A_s ——标准溶液中龙胆紫或隐性龙胆紫的峰面积;
- A'_{is} ——标准溶液中龙胆紫或隐性龙胆紫同位素内标的峰面积;
- V_1 ——备用液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V ——上机前定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 ——过固相小柱备用液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量的数值,单位为克(g)。

计算结果扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留3位有效数字。

10 灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法检出限为 $0.50 \mu\text{g}/\text{kg}$,方法定量限为 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法在 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加浓度范围内,回收率为 $80\% \sim 110\%$ 。

10.3 精密度

在重复性条件下获得的2次独立的测试结果的绝对差值不大于算术平均值的 15% 。

附录 A

(资料性)

龙胆紫和隐性龙胆紫及 2 种同位素内标物的中英文名称、CAS 号和分子式

龙胆紫和隐性龙胆紫及 2 种同位素内标物的中英文名称、CAS 号和分子式见表 A. 1。

表 A. 1 龙胆紫和隐性龙胆紫及 2 种同位素内标物的中英文名称、CAS 号和分子式

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式
1	龙胆紫	Crystal violet	548-62-9	$C_{25}H_{30}ClN_3$
2	隐性龙胆紫	Leucocrystal violet	603-48-5	$C_{25}H_{31}N_3$
3	龙胆紫- D_6	Crystal violet- D_6	1266676-01-0	$C_{25}H_{24}ClD_6N_3$
4	隐性龙胆紫- D_6	Leucocrystal violet- D_6	1173023-92-1	$C_{25}H_{25}D_6N_3$

附录 B

(资料性)

龙胆紫和隐性龙胆紫及 2 种同位素内标物标准溶液特征离子质量色谱图

龙胆紫和隐性龙胆紫标准溶液(1.0 $\mu\text{g/L}$)及 2 种同位素内标物标准溶液(2.0 $\mu\text{g/L}$)特征离子质量色谱图见图 B.1。

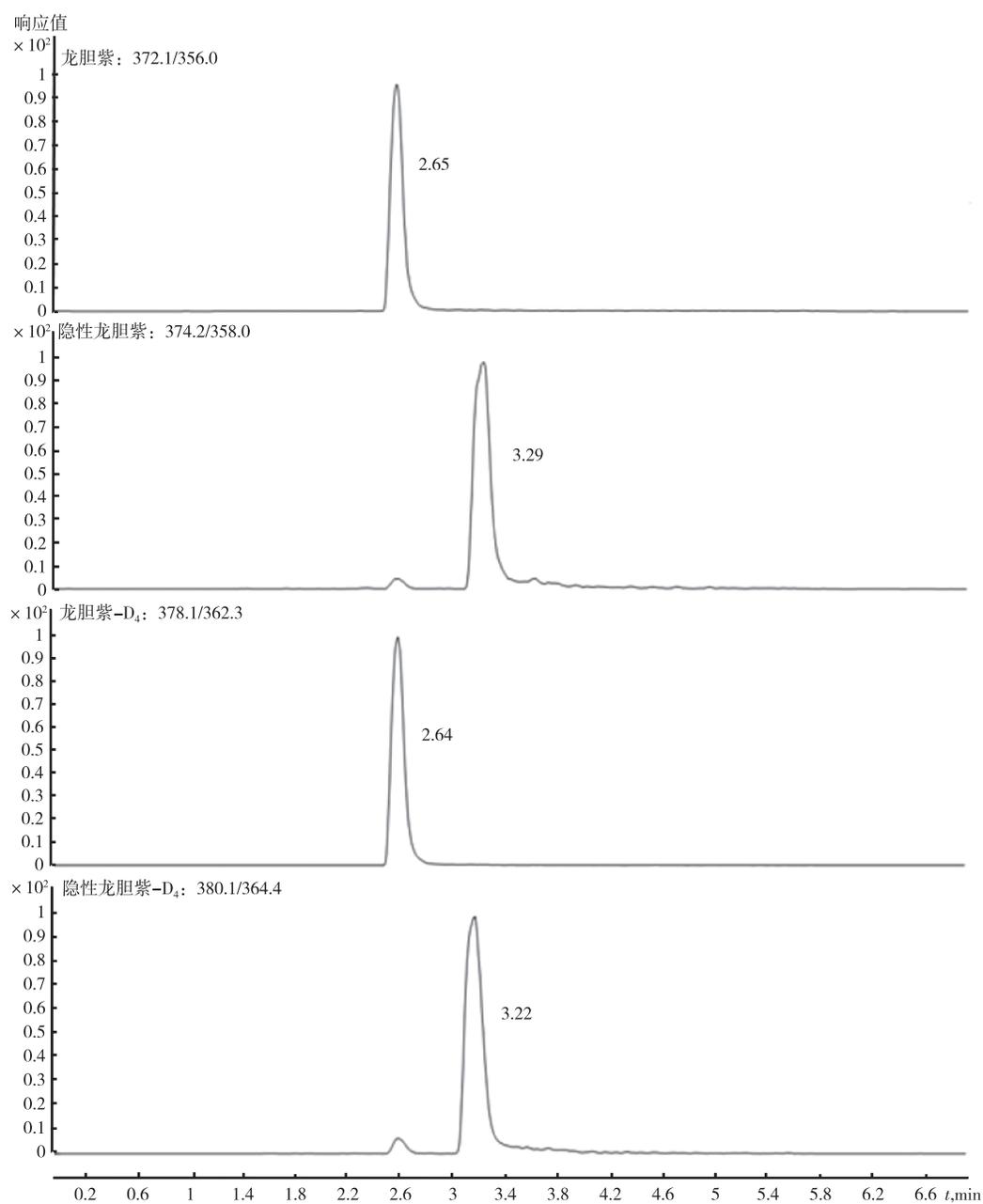


图 B.1 龙胆紫和隐性龙胆紫标准溶液(1.0 $\mu\text{g/L}$)及 2 种同位素内标物标准溶液(2.0 $\mu\text{g/L}$)特征离子质量色谱图