

《几种常见水产品及其养殖或暂养用水中孔雀石绿检测 拉曼光谱法》编制说明

一、工作简况

1.1 任务来源、起草单位、起草人

本标准是依据深圳市分析测试协会下达的由深圳市农产品质量安全检测中心承担的名称为《几种常见水产品及其养殖或暂养用水中孔雀石绿检测 拉曼光谱法》任务而研究制定的。

项目负责单位：深圳市农产品质量安全检测中心。

项目参加单位：中国科学院深圳先进技术研究院。

该项目由但琨负责，主要参加人员有：胡祥娜、张玲、禹绍周、李鹏辉、喻学锋。

1.2 简要起草过程

本标准起草人在充分收集、认真研究了国内外相关标准及资料的基础上，分析对比了国内外标准技术内容方面的差异及原因，在遵循先进性、科学性、实用性的原则下，建立了拉曼光谱法检测几种常见水产品及其养殖或暂养用水中孔雀石绿含量的方法。

本方法适用于几种常见水产品及其养殖或暂养用水中孔雀石绿含量的测定。经实验室论证和分析，该方法的检出限满足水产品中孔雀石绿项目快速检测方法同类标准的要求。

二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

近年来，由于水产养殖的迅猛发展，放养密度和饲料投放量大大增加，水质极易恶化，从而诱发各种水产动物疾病，在鱼病防治过程中，使用药物的现象非常普遍，而有的不按动物的营养需要盲目添加抗菌药物、促生长剂或者不遵守药物的休药期等，导致药物在水产品体内的残留。目前常见的因残留超标引起水产品质量安全事件的药物主要有氯霉素、孔雀石绿和硝基呋喃类代谢物等，当人们食用了残留超标的水产品后，会出现不同程度的中毒反应，轻者影响健康，重者危及生命。水产养殖过程中最常见的一种有害物质为孔雀石绿，它属于三苯甲烷类杀菌剂，在水产品疾病防治中具有高效和价格低廉的优势，因目前没有好的替代药物，仍被一些水产从业者非法使用。然而，孔雀石绿及其代谢产物的高残留和高毒性不仅造成了水产品的畸变、癌变，也给食用者的健康带来巨大风险。《农业农村部公告250号》中明确规定不得在水产品中检出孔雀石绿。

开展全面、系统的水产品及其养殖用水中有害物质的检测工作是解决水产品中有害物质残留问题的重要举措之一。目前国家监督检验机构通常采用高效液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）对养殖水或暂养水和养殖水产品中有害物质进行检测。这种LC-MS/MS方法具有定性能力强、灵敏度高、选择性好等优点，然而该方法检测所用设备昂贵，前处理复杂，对检测人员要求高，费时费力。这些缺点在一定程度上限制了质监部门对水产品及其养殖或暂养用水中有害物质监测的广泛性和时效性。因此，建立和开发高效、快速、准确的水产品及其养殖或暂养用水中有害物质检测新技术具有迫切的必要性。

近年来，表面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering, SERS)技术的发展为养殖水产品中有害物质分析技术的创新提供了一种新思路。SERS 技术可以将分子的固有拉曼信号放大百万倍甚至更高，同时获得样品中待检物定性和定量信息，是少有的可以将检测灵敏度达到单分子检测水平的光谱技术。这一技术极大程度的解决了传统拉曼测试时，待测物分子固有拉曼信号弱，无法检测较低含量物质的问题。SERS 技术具有无损分析、检测速度快、检测灵敏度高等优点，并且采样过程简单、不受水环境干扰，对样品不产生污染，因此在生物环境等多个领域展现出极好的应用价值。

在国内，拉曼光谱在食品药品鉴定领域早已经被列入国家标准方法，但在食品安全检测方面尚未被列入国家标准。其中一个主要的原因就是拉曼光谱技术本身的灵敏度不够。但由于近些年来纳米科学的发展，表面增强拉曼光谱方法的建立极大的解决了拉曼光谱灵敏度差的缺陷。这种表面增强拉曼光谱技术已经可以达到单分子检测级别，其检测限度除了可以和目前最成熟的光谱技术-荧光光谱媲美之外，还具备了许多荧光光谱不具备的特性，如免标记（直接读取待检测样品的指纹信息）、原位无损检测、同时检测多种物种等。在近些年表面增强拉曼光谱在食品安全检测方面发挥了重大的作用，牛奶中的三聚氰胺、食品中添加的苏丹红、地沟油，都可以通过表面增强拉曼光谱的方式实现很好的检测。河北省质量技术监督局已经建立激光拉曼光谱法用于养殖用水中孔雀石绿快速测定，并将这种方法列入地方标准。

三、 国外有关法律、法规和标准情况的说明

目前国际上也将孔雀石绿列为水产禁用品，不得在水产品中检出。1993年美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）规定在食用水产品中禁止检出孔雀石绿和隐性孔雀石绿；欧盟法案2002/675/EC的规定，动物源性食品中孔雀石绿和隐性孔雀石绿残留总量限制为2 μg/kg；日本的肯定列表明确规定在进口水产品中不得检出孔雀石绿残留。

在国际上，SERS技术在食品中有害物质检测方面取得了较好的进展，多个研究组制备出不同形貌、材料和增强性能的SERS基底，实现了对不同种类食品中有害物质的SERS检测，如Lee课题组对孔雀石绿的检测；He课题组对禁用抗生素恩诺沙辛、环丙沙辛和氯霉素的检测；Lu课题组对呋喃唑酮的检测；Lai课题组对磺胺类抗生素的检测；Zhai课题组对猪尿液中瘦肉精替代物莱克多巴胺的检测；Xie课题组对食品中硝基呋喃类抗生素的检测等。暂无用拉曼光谱法检测水产品及其养殖或暂养用水中孔雀石绿的国际标准。

四、标准的制（修）订原则

本标准是按照《深圳市分析测试协会团体标准管理办法》的要求进行编制的，遵循先进性、科学性、实用性的原则对新标准进行编制。本标准注重科学性和可操作性的结合，利于推广应用。

五、确定各项技术内容的依据

5.1 方法检出低限的依据

5.1.1 养殖水中孔雀石绿的检测低限

直接取 5 mL 养殖水或暂养水，0.45 μ m 滤膜过滤，收集滤液在 5 mL 离心管中即为待测液。在样品瓶中依次加入 SSN-5 试剂 100 μ L、P-1 试剂 40 μ L、待测液 100 μ L 以及 P-2 试剂 40 μ L，摇振混匀后进行拉曼光谱检测。（样品测试时，应迅速混匀，立即测试。）通过调节拉曼光谱仪的参数，检测养殖水中孔雀石绿的拉曼光谱强度，根据拉曼谱图中的 1615 cm^{-1} 处特征峰的强度，试验数据如表 1，试验得出的检测低限是 5 μ g/kg。

表 1 养殖水中孔雀石绿的拉曼光谱强度

化合物	样品名称	添加水平 (mg/kg)	样品拉曼光谱强度 (a.u.)					
			1	2	3	4	5	6
孔雀石绿	养殖水或暂养水	0.005	2222	1839	2563	2148	1996	2378
		0.01	8033	7954	8206	7545	7887	8210
		0.02	15058	16687	16399	17800	16116	14535

同时选择 3 家实验室进行比对，按此方法得出的检测结果如表 2，虽不同实验室因检测环境、操作人员和拉曼光谱仪的型号、功能不同，检测结果会有差异，但总体来看，该标准养殖水或暂养水中孔雀石绿的检测低限可达 5 μ g/L~20 μ g/L。

表 2 养殖水中孔雀石绿的拉曼光谱强度的三家比对结果

化合物	样品名称	验证单位	添加水平 (mg/kg)	样品拉曼光谱强度 (a.u.)					
				1	2	3	4	5	6
孔雀石绿	养殖水	市检测院	0.005	3376	3633	4101	4084	4188	4610
			0.01	4348	4168	4427	4705	4524	4488
			0.02	10489	11001	10867	10889	11154	11267
		深圳易瑞	0.005	未检出	2974	3022	未检出	未检出	3263
			0.01	5089	5207	未检出	5597	5111	5460
			0.02	10207	10668	8946	9894	9980	11253
		南京简智	0.005	3736	3252	3466	3335	3577	4183
			0.01	8033	7954	8206	7545	7887	8210
			0.02	15058	16687	16399	17800	16116	14535

5.1.2 几种常见水产品中孔雀石绿的检测低限

鱼去鳞、去骨，取可食部分，样品切为不大于 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 的小块后混合，搅拌成鱼糜状备用。称取 5 g 样品于 50 mL 离心管中，加入 5 mL S-MG 试剂 A，将漩涡混匀器调速至最大 (max) 涡动 30 s 。（如无漩涡混匀器，可上下大力摇晃约 60 s 至组织分散）。倒入 1 支 S-MG 试剂 B1 和 1 支 S-MG 试剂 B2，然后涡动 10 s 或上下摇晃约 10 s ，室温， 4000 rpm/min 离心 2 min 。取 2 mL 上层清液至 15 mL 离心管，加入 $40\text{ }\mu\text{L}$ S-MG 试剂 C，轻微振荡，加入 8 mL S-MG 试剂 D，摇匀后静置约 30 s 。将溶液全部倒入 30 mL 注射器筒中，用手缓慢推压注射器活塞，使注射器中的液体全部流过 MG-Speedy prep 固相萃取柱，将固相萃取柱中的溶液去除干净，并取下注射器。往固相萃取柱中加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ S-MG 试剂 E，洗脱固相萃取柱，洗脱液收集至离心管中。若分两层，则下层为待测液；若分三层，则中间层液体为待测液。在样品瓶中依次加入 SSN-5 试剂 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、P-1 试剂 $40\text{ }\mu\text{L}$ 、待测液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 以及 P-2 试剂 $40\text{ }\mu\text{L}$ ，摇振混匀后进行拉曼光谱检测。（样品测试时，应迅速混匀，立即测试。）通过调节拉曼光谱仪的参数，检测几种常见水产品中孔雀石绿的拉曼光谱强度，根据拉曼谱图中的 1615 cm^{-1} 处特征峰的强度，试验数据如表 3，试验得出的检测低限是 $20\text{ }\mu\text{ g/kg}$ 。同时选择 3 家实验室进行比对，按此方法得出的检测结果如表 4，虽不同实验室因检测环境、操作人员和拉曼光谱仪的型号、功能不同，检测结果会有差异，而且不同基质对于检测结果也由一定的影响，但总体来看，该标准几种常见水产品中（草鱼、鳊鱼、罗非鱼、鲫鱼）孔雀石绿的检测低限可达 $20\text{ }\mu\text{ g/kg}\sim 50\text{ }\mu\text{ g/kg}$ 。检测几种常见水产品中隐性孔雀石绿的拉曼光谱强度，根据拉曼谱图中的 1615 cm^{-1} 处特征峰的强度，试验数据如表 5，试验得出的

检测低限是 $10 \mu\text{g/kg}$ 。同时选择 3 家实验室进行比对, 按此方法得出的检测结果如表 6, 虽不同实验室因检测环境、操作人员和拉曼光谱仪的型号、功能不同, 检测结果会有差异, 而且不同基质对于检测结果也由一定的影响, 但总体来看, 该标准几种常见水产品中 (草鱼、鳙鱼、罗非鱼、鲫鱼) 孔雀石绿的检测低限可达 $10 \mu\text{g/kg}$ ~ $20 \mu\text{g/kg}$ 。

表 3 几种常见水产品中孔雀石绿的拉曼光谱强度

化合物	样品名称	添加水平 (mg/kg)	样品拉曼光谱强度 (a.u.)					
			1	2	3	4	5	6
孔雀石绿	草鱼	0.01	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
		0.02	3110	2778	2639	2968	2561	2554
		0.05	7428	8365	8061	7602	7969	8112
	鳙鱼	0.01	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
		0.02	5008	4870	4685	4817	5137	4912
		0.05	9108	8876	8674	8506	9015	8623
	罗非鱼	0.01	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
		0.02	3108	2981	3251	2887	2963	3524
		0.05	5589	6111	5977	6524	5623	7004
	鲫鱼	0.01	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
		0.02	4221	3966	4122	4009	3563	3875
		0.05	7434	7525	6978	7186	7311	7402

表 4 几种常见水产品中孔雀石绿的拉曼光谱强度的三家比对结果

化合物	验证单位	样品名称	添加水平 (mg/kg)	样品拉曼光谱强度 (a.u.)					
				1	2	3	4	5	6
孔雀石绿	市检测院	鳙鱼	0.02	6811	7251	7021	6955	6990	7290
			0.04	7266	7792	8570	8908	9388	9920
		草鱼	0.02	6436	6449	6639	6553	6685	6952
			0.04	8490	7848	8897	9001	8834	9243
		罗非鱼	0.02	6003	5248	5791	5961	5287	6237
			0.04	5106	6480	7027	7581	7675	8044
	深圳易瑞	鳙鱼	0.02	未检出	未检出	2407	未检出	2655	未检出
			0.05	5162	4975	5036	未检出	6177	5280
			0.1	9569	10121	9978	9725	9803	9240
		草鱼	0.02	3516	未检出	3700	3125	3419	3680
			0.05	7062	7455	7081	7857	6994	7235
			0.1	13335	12750	13006	12605	11940	10076
		罗非鱼	0.02	3461	未检出	未检出	未检出	3155	3280
			0.05	7464	7509	7123	7660	7235	7468

			0.1	12205	10558	11562	10194	12002	11825
	南京 简智	鳙鱼	0.02	3879	未检出	3517	3208	3794	未检出
			0.05	5023	4990	4765	4907	5111	4543
			0.1	8589	8111	8977	8707	8623	9004
		草鱼	0.02	4987	5014	5262	4874	5165	5168
			0.05	7262	7548	7566	7498	7026	7167
			0.1	10063	11254	9896	11403	12007	9958
		罗非鱼	0.02	4026	未检出	未检出	4275	4164	4097
			0.05	8165	8244	8397	8159	8107	7980
			0.1	10265	11027	10498	9961	10177	9578

表 5 几种常见水产品中隐性孔雀石绿的拉曼光谱强度

化合物	样品名称	添加水平 (mg/kg)	样品拉曼光谱强度 (a.u.)					
			1	2	3	4	5	6
隐性孔雀石绿	草鱼	0.01	2987	3201	3306	2969	2995	3512
		0.02	12414	11322	10798	11676	12150	10093
		0.05	40421	43033	42228	42977	45002	43560
	鳙鱼	0.01	3642	3897	4217	4087	4371	3550
		0.02	16416	15122	14689	13780	16547	13993
		0.05	43188	45460	41654	47152	45002	46560
	罗非鱼	0.01	3267	2638	3019	3112	2718	2855
		0.02	8666	8393	9012	9165	8544	8720
		0.05	35975	34099	35767	32800	33221	35893
	鲫鱼	0.01	3968	4218	4005	4208	3725	4339
		0.02	9112	9307	8988	9104	8827	10753
		0.05	41212	40980	42335	39808	41004	40756

表 6 几种常见水产品中隐性孔雀石绿的拉曼光谱强度的三家比对结果

化合物	验证单位	样品名称	添加水平 (mg/kg)	样品拉曼光谱强度 (a.u.)					
				1	2	3	4	5	6
隐性孔雀石绿	市检测院	鳙鱼	0.01	3633	3075	3282	2772	3081	3078
			0.02	6072	6048	6443	6314	6809	6574
		草鱼	0.01	3450	3499	3694	3657	3877	3255
			0.02	4453	4704	5049	4868	5349	5872
		罗非鱼	0.01	2265	2897	3194	2965	3170	3055
			0.02	3535	4359	4538	4237	4309	4284
	深圳易瑞	鳙鱼	0.01	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	2268
			0.02	5610	未检出	5498	6080	5339	未检出

		0.05	8110	8195	8206	8017	7863	8044
	草鱼	0.01	3122	3090	2958	未检出	未检出	2777
		0.02	6022	5998	6150	6314	6155	5497
		0.05	11233	12500	11828	10465	12906	11395
		0.01	2507	2661	未检出	未检出	未检出	未检出
	罗非鱼	0.02	5599	5603	5871	5771	5433	5509
		0.05	8970	9652	9705	9233	7480	9067
		0.01	3110	未检出	3262	2968	未检出	3154
南京简智	鳊鱼	0.02	6428	6365	7061	6602	6969	未检出
		0.05	8099	9145	8796	9012	8823	9037
		0.01	3016	2987	2876	未检出	2765	2860
	草鱼	0.02	5131	5266	5049	4980	4677	5069
		0.05	9233	9567	9812	9405	8996	9364
		0.01	2589	2427	2360	未检出	未检出	2217
	罗非鱼	0.02	5989	5827	6215	6302	6178	5795
		0.05	8805	8796	8579	9045	8666	8570

5.2 提取溶剂的选择

为了探讨不同前处理方法中提取试剂和净化方法对表面增强拉曼光谱法检测水产品中孔雀石绿的影响，研究了两种样品前处理方法。方法一主要研究了不同提取试剂对表面增强拉曼光谱法检测水产品中孔雀石绿的影响。样品前处理方法如下：1. 样品的准备：鱼去鳞、去皮，延脊背取肌肉部分。样品切为不大于 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块后混合，搅拌成鱼糜状备用；2. 样品前处理：称取 5.00 g 草鱼阴性样品（本试验前该样品已经液相色谱串联质谱法确认过未检出孔雀石绿）于 50 mL 聚乙烯离心管内，加入 10 mL 提取试剂（分别用甲醇、乙腈和水作为提取试剂），然后加入 5 g 酸性氧化铝粉，涡旋振荡 2 min 充分提取，4 000 rpm/min 离心 10 min，上清液转移至新的 50 mL 聚乙烯离心管中后待测。方法二主要研究了不同净化方法对表面增强拉曼光谱法检测水产品中孔雀石绿的影响。样品前处理方法如下：1. 样品的准备如方法一；2. 加净化粉试验组样品前处理：称取 5.00 g 草鱼阴性样品（本试验前该样品已经液相色谱串联质谱法确认过未检出孔雀石绿）于 50 mL 聚乙烯离心管内，加入 10 mL 乙腈，加入净化粉（QuEChERS 吸附剂：100 mg PSA，40 mg C₁₈，15 mL，上海安谱实验科技股份有限公司），再加入 5 g 酸性氧化铝粉，涡旋振荡 2 min 充分提取，4 000 rpm/min 离心 10 min，上清液转移至新的 50 mL 聚乙烯离心管中后待测。不加净化粉试验组样品的前处理同方法一，提取试剂为乙腈。

检测结果可以看出，不同提取试剂对表面增强拉曼光谱法检测水产品中孔雀石绿的影响较大，其中以甲醇和乙腈作为提取试剂时，均有较好的响应和明显的特征峰，可以达到的最低检出限均为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，以超纯水作为提取试剂的时候，孔雀石绿的响应强度略弱，可以达到的最低检出限均为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，这可能是一些水溶性的化学物质对拉曼光谱检测产生的干扰所致。QuEChERS 净化在农残、兽残检测中已经得到广泛利用，本次实验用 QuEChERS 吸附剂分别含有 PSA 和 C_{18} 。PSA 能去除基质中的色素和糖类物质，而 C_{18} 具有优秀的除脂功能。从本试验结果可以看出，用表面增强拉曼光谱法检测水产品中孔雀石绿时，在罗非鱼和草鱼两种样品基质中，加不加净化粉对检测结果都无影响。

综上所述，本标准样品前处理过程中，最终选择用乙腈作为提取试剂，未添加 PSA 和 C_{18} 等净化吸附剂。

六、 标准实施建议

表面增强拉曼散射技术作为快速高灵敏度光学检测手段，经过几十年的发展，已经成为化学、材料学、药学、生命科学、食品科学等学科领域和分析测试领域的一个重要检测和分析方法。本标准实现了新型信号增强对水产品及其养殖或暂养用水中孔雀石绿的快速检测，为表面增强散射技术在食品安全领域提供了新的技术力量。然而，表面增强拉曼增强技术仍然不是食品安全检测领域的普及性检测手段，在本标准研究编制过程中也发现了其走向实际应用过程中会出现的多种状况，如检测试验反应体系易受检测环境、检测设备等因素的影响，导致低浓度样品的重现性相对较差；实际检测过程中假阳性问题；农产品中结构复杂的基质对检测信号干扰和检测灵敏的影响等。而这些也都成为该领域后续研究的努力方向，通过解决和完善的这些方面问题将有望实现表面增强拉曼散射这一快速光学检测手段成为普及性检测手段之一，应用于食品安全的执法监督等应用。

标准编制组
2020 年 12 月