

SZTT

深圳市分析测试协会团体标准

T/SATA XX—XXXX

几种常见水产品及其养殖或暂养用水中
孔雀石绿的检测
拉曼光谱法

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

深圳市分析测试协会 发布

目 次

目 次	I
前 言	II
1.范围	1
2.规范性引用文件	1
3.原理	1
4.试剂与材料	1
5.仪器和设备	2
6.试样制备	2
7.分析步骤	2
8.结果判定	3
9.测定低限	3
附录A	4

前 言

本标准依据GB/T1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》和GB/T20001.4-2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》的编写规则起草。

本标准由深圳市分析测试协会归口。

本标准起草单位：深圳市农产品质量安全检验检测中心，中国科学院深圳先进技术研究院。

本标准主要起草人：但琨、胡祥娜、张玲、禹绍周、李鹏辉、喻学锋。

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

1 范围

本标准规定了使用拉曼光谱仪快速检测几种常见水产品及其养殖或暂养用水中孔雀石绿的方法。

本标准适用于草鱼、罗非鱼、鳙鱼、鲫鱼、鳊鱼等几种常见水产品及其养殖或暂养用水中孔雀石绿检测的拉曼光谱法。

本标准可以同时检测孔雀石绿和隐性孔雀石绿。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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实验方法

GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定

3 原理

不同物质具有与其分子结构相对应的特征拉曼（Raman）光谱。水产品中的孔雀石绿（含隐性孔雀石绿）经提取、氧化反应、净化后检测，水产品养殖或暂养用水过滤后直接检测。用表面增强剂进行拉曼信号增强后，进行拉曼光谱扫描。在孔雀石绿特征拉曼位移峰比对下，可进行孔雀石绿的定性判定，通过样品中孔雀石绿含量与拉曼光谱特征峰 1615cm^{-1} 强度的对应关系，实现定量检测。

4 试剂与材料

除非另有说明，在分析中仅使用分析纯的试剂，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

4.1 孔雀石绿和隐色孔雀石绿标准品：纯度 $\geq 99.0\%$ 。

4.2 标准储备溶液：准确称取适量的孔雀石绿标准品和隐色孔雀石绿标准品（纯度 $\geq 99.0\%$ ），用乙醇配置成 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的混合标准贮备液。-18℃避光保存。

表 1 孔雀石绿、隐色孔雀石绿参考物质中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量

序号	中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子质量
1	孔雀石绿	MalachiteGreen	569-64-2	$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{C}_1\text{N}_2$	364.91

2	隐色孔雀石绿	LeucomalachiteGreen	129-73-7	$C_{23}H_{26}N_2$	330.47
---	--------	---------------------	----------	-------------------	--------

4.3 标准工作溶液：临时用现配。

4.4 拉曼增强剂：银溶胶水溶液（SSN-5）。

4.5 孔雀石绿快速检测试剂盒。检测试剂盒中包含试剂及耗材：S-MG 试剂 A、S-MG 试剂 B1、S-MG 试剂 B2、S-MG 试剂 C、S-MG 试剂 D、S-MG 试剂 E、P-1 试剂、P-2 试剂、MG-Speedy prep 固相萃取柱。

5 仪器和设备

5.1 便携式拉曼光谱仪。稳频激发光源：发射波长为 785nm；光谱频率范围：200 cm^{-1} ~2800 cm^{-1} ，或大于该频率范围。

5.2 天平：感量为 0.01 g，0.0001 g。

5.3 涡旋振荡器。

5.4 离心机：4000 rpm/min 以上。

5.5 移液枪：100 μ L、200 μ L、1 mL、5 mL，或其它可定量移取器具。

6 样品前处理

3.1 水产品待测样品制备：鱼去鳞、去骨，取可食部分，样品切为不大于 0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 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 秒。（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 秒或上下摇晃约 10 秒，室温，4000 rpm/min 离心 2 分钟。取 2 mL 上层清液至 15 mL 离心管，加入 40 μ 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 秒。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 μ L S-MG 试剂 E，洗脱固相萃取柱，洗脱液收集至离心管中。

3.2 养殖水或暂养水样品制备：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。

7 分析步骤

7.1 拉曼光谱条件

拉曼光谱条件如下：

- a) 激光功率：300 mW ~500 mW
- b) 数据采集时间：10 s；
- c) 拉曼光谱连续扫描次数：3；

7.2 拉曼光谱测定

在透明玻璃上样瓶中依次加入 SSN-5 试剂 100 μL 、P-1 试剂 40 μL 、待测液 100 μL 以及 P-2 试剂 40 μL ，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。）

7.3 平行试验

按样品制备步骤 6 对同一试样进行平行试验测定。

7.4 空白试验

用经确证的阴性样品，按样品制备步骤 6 进行操作。

8 结果判定

8.1 定性判定：当拉曼谱图中出现孔雀石绿的特征峰（730 cm^{-1} 、916 cm^{-1} 、1170 cm^{-1} 、1215 cm^{-1} 、1293 cm^{-1} 、1365 cm^{-1} 、1393 cm^{-1} 、1615 cm^{-1} ）且谱峰比例与标准品谱图一致时，可定性判断样品中含有孔雀石绿。

8.2 结果计算：根据拉曼谱图中的 1615 cm^{-1} 处特征峰的强度，按式（1）计算样品中孔雀石绿的浓度：

$$X = I \times \frac{\Delta X}{\Delta I} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X 一试样中被测组分含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

I 一特征频率（1615 cm^{-1} ）处测得的被测组分拉曼光谱信号相对强度（峰面积）；

ΔX 一标准工作曲线中两点对应的被测组分含量差值，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

ΔI 一标准工作曲线中两点对应的被测组分拉曼光谱信号相对强度（峰面积）差值；

注：I 值应扣除空白值。

9 测定低限

本方法几种常见水产品中孔雀石绿的检测低限为10~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，水产品养殖或暂养用水中孔雀石绿的检测低限为5~20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

10 允许差

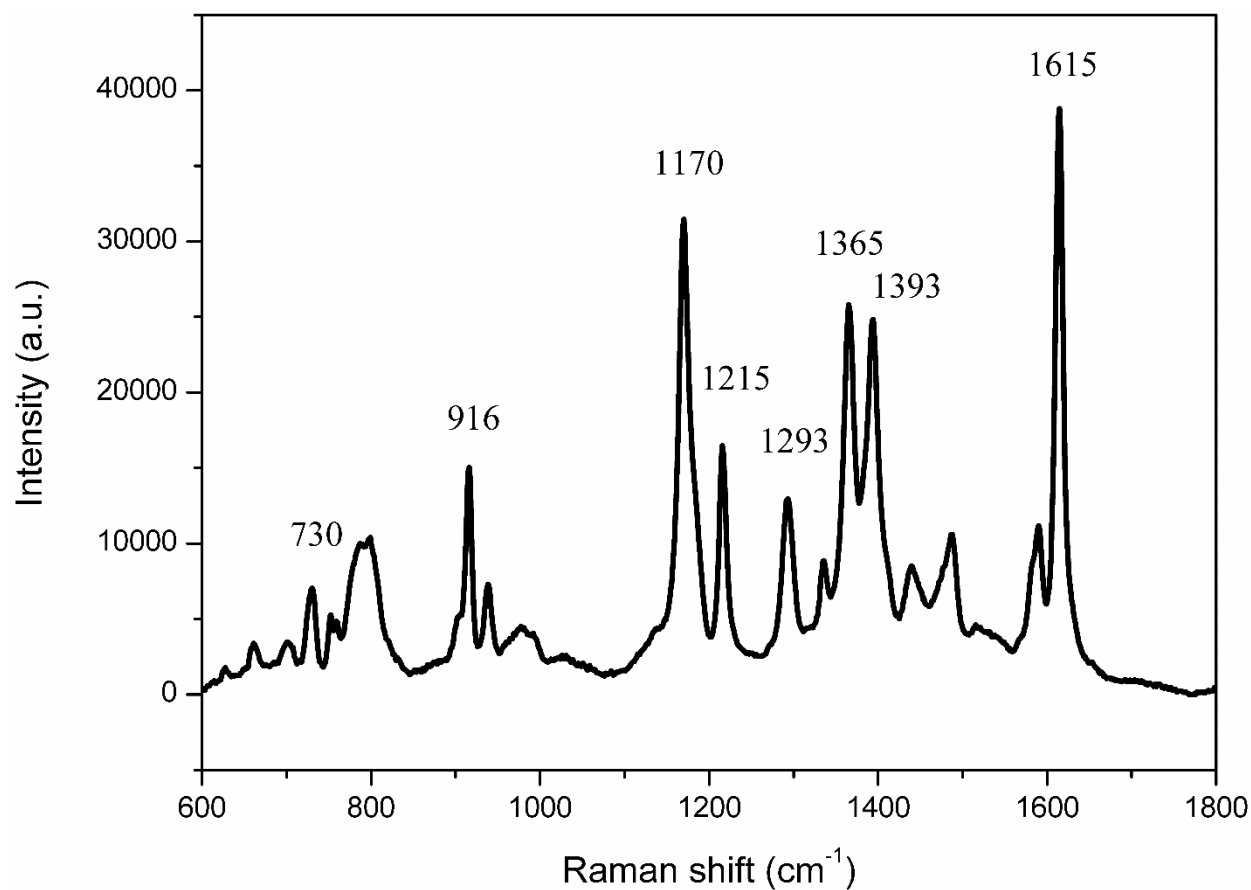
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均数的 10%。

附录 A

(资料性附录)

孔雀石绿标准品水溶液的表面增强光谱图

孔雀石绿标准品水溶液的表面增强光谱图见图 A.1。

图 A.1 孔雀石绿标准品水溶液的表面增强光谱图 (100 μ g/kg)