

高效液相色谱-荧光检测法测定鳗鲡中孔雀石绿和结晶紫残留

郑斌¹, 赵红萍², 冷凯良³, 于慧娟⁴, 汪云泉⁵, 陈雪昌¹, 钟志¹

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100; 2. 中国水产科学研究院, 北京 100039; 3. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 4. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090; 5. 舟山市出入境检验检疫局, 浙江 舟山 316000)

摘要:本研究建立了高效液相色谱-荧光检测法测定鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 中孔雀石绿和结晶紫残留量的新方法。样品中残留的孔雀石绿或结晶紫用硼氢化钾还原为其相应的代谢产物隐色孔雀石绿或隐色结晶紫, 用乙腈、乙酸铵缓冲溶液提取, 二氯甲烷液液萃取, PRS 固相萃取柱净化, 反相色谱柱分离, 荧光检测器检测, 外标法定量。孔雀石绿和结晶紫混合标准工作溶液质量浓度范围为 1~600 $\mu\text{g/L}$ 时, 该方法的线性关系极好, 相关系数均为 0.9999。该方法定量检出限为 0.4 $\mu\text{g/kg}$ 。当空白样品中孔雀石绿和结晶紫添加水平为 0.4~100 $\mu\text{g/kg}$ 时, 孔雀石绿回收率为 70.0%~90.6%, 结晶紫回收率为 73.0%~87.2%, 相对标准偏差均小于 10%。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 1 038-1 041]

关键词: 荧光检测; 孔雀石绿; 结晶紫; 鳗鲡

中图分类号: S912

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)06-1038-04

孔雀石绿 (Malachite Green, MG) 是一种合成的三苯基甲烷类工业染料, 在水产养殖过程中常被用作杀虫剂和预防水霉剂, 在生物体内代谢还原成隐色孔雀石绿 (Leucomalachite Green, LMG)。由于孔雀石绿和隐色孔雀石绿具有潜在的致突变、致畸和致癌性, 严重危害人类健康, 美国、日本以及英国等国家已禁止孔雀石绿用于水产养殖业^[1]。根据中国农业部农牧发 [2002]1 号文关于发布《食品动物禁用的兽药及其他化合物清单》的通知, 孔雀石绿在中国已被列为禁用药物。美国 FDA 认为结晶紫 (Gentian Violet, GV) 也是一种合成的三苯基甲烷类工业染料与孔雀石绿的结构和危害相似, 极有可能被误用。结晶紫在生物体内代谢还原成隐色结晶紫 (Leucogentian Violet, LGV)^[2]。

孔雀石绿和结晶紫残留的检测方法有高效液相色谱法^[3-4]和液相色谱-串联质谱法^[5-6]等。目前国内现行的检测方法标准有《SC/T 3021-2004 水产品中孔雀石绿残留量的测定》、《SN/T 1479-2004 进出口水产品中孔雀石绿残留量检测方法》和《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定》。在 3 个标准中, 高效液相色谱法采

用紫外或可见光检测, 孔雀石绿和结晶紫的响应相对较低; 液相色谱-串联质谱法检测灵敏度较高, 但内标物增加了检测成本, 并且仪器价格昂贵, 技术要求相对较高。

本研究采用硼氢化钾将孔雀石绿和结晶紫还原成隐色孔雀石绿和隐色结晶紫, 然后利用隐色孔雀石绿和隐色结晶紫具有荧光响应的特点^[3], 建立了鳗鲡中孔雀石绿和结晶紫及其代谢物的高效液相色谱分离、荧光检测的方法。该方法设备相对简单、灵敏度高, 成本低廉。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备 PROSTAR230 液相色谱仪, 配荧光检测器 (美国 Varian 公司); ULTRA-TURRAX T₁₈ 均质机 (广州仪科实验室技术有限公司)、R-201 旋转蒸发仪 (上海申胜生物技术有限公司)、MSI 旋涡混合仪 (广州仪科实验室技术有限公司)、LG10-2.4A 高速离心机 (北京医用离心机厂) 等。

1.1.2 试剂 孔雀石绿和结晶紫标准品, 纯度均大于 98%; 乙腈、乙酸乙酯、甲醇均为色谱纯; 酸性氧

收稿日期: 2007-01-14; 修订日期: 2007-03-26.

基金项目: 国家标准 (20051850-T-326).

作者简介: 郑斌 (1968-), 男, 高级工程师, 主要从事食品安全研究. Tel: 0580-6369958; E-mail: zhengbin67@163.com

化铝(粒度0.071~0.150 mm)、二氯甲烷、二甘醇、硼氢化钾、无水乙酸铵、冰乙酸、氨水均为分析纯。

0.03 mol/L 硼氢化钾溶液,现配现用;0.2 mol/L 硼氢化钾溶液,现配现用;20% 盐酸羟胺溶液;0.05 mol/L 对-甲苯磺酸溶液;0.125 mol/L 乙酸铵缓冲溶液(冰乙酸调 pH 至 pH 4.5);酸性氧化铝固相萃取柱;Varian PRS 柱;固相萃取柱洗脱液:50 mL 的乙酸乙酯中加入 5 mL 氨水,再加入 45 mL 的甲醇,混匀。

1.1.3 样品预处理 不含孔雀石绿和结晶紫及其代谢还原产物本底的人工养殖的鲜活鳊鲂,去皮后沿背脊取肌肉部分。样品切为不大于 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 的小块后混合。

1.2 检测方法

1.2.1 标准溶液配制 标准储备溶液:准确称取适量的孔雀石绿、结晶紫标准品,用乙腈分别配制成 100 μg/mL 的标准贮备液;

混合标准中间液:分别准确吸取 1.00 mL 孔雀石绿和结晶紫的标准储备溶液至 100 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制成 1 μg/mL 的混合标准中间溶液。-18℃ 避光保存;

混合标准工作溶液:临用时准确吸取一定量的混合标准中间溶液,加入 0.03 mol/L 硼氢化钾溶液 0.40 mL,用乙腈准确稀释至 2.00 mL,配制成 600 μg/L、400 μg/L、200 μg/L、100 μg/L、10 μg/L、1 μg/L 系列浓度梯度的混合标准工作溶液。

1.2.2 样品前处理 (1)萃取 称取 5.00 g 样品于 50 mL 离心管内,加入 10 mL 乙腈,10 000 r/min 匀浆提取 30 s,加入 5 g 酸性氧化铝,震荡 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液转移至 125 mL 分液漏斗中,在分液漏斗中加入 2 mL 二甘醇,3 mL 0.2 mol/L 硼氢化钾溶液,振摇 2 min。另取 50 mL 离心管加入 10 mL 乙腈,洗涤匀浆机刀头 10 s,洗涤液移入前一离心管中,加入 3 mL 0.2 mol/L 硼氢化钾溶液,用玻棒捣散离心管中的沉淀并搅匀,漩涡混匀器上振荡 1 min,静置 20 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液并入 125 mL 分液漏斗中。在 50 mL 离心管中继续加入 1.5 mL 盐酸羟胺溶液、2.5 mL 对-甲苯磺酸溶液、5.0 mL 0.125 mol/L 乙酸铵缓冲溶液,震荡 2 min,再加入 10 mL 乙腈,继续震荡 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液并入 125 mL 分液漏斗中,重复上述操作一次。在具塞分液漏斗中加入 20 mL 二氯甲烷,剧烈振摇 2 min,静置分

层,将下层溶液转移至 100 mL 茄形瓶,45℃ 旋转蒸发至近干,用 2.5 mL 乙腈溶解残渣。

(2)净化 将 PRS 柱安装在固相萃取装置上,上端连接酸性氧化铝固相萃取柱,用 5 mL 乙腈活化,转移提取液到柱上,再用乙腈洗茄形瓶两次,每次 2.5 mL,依次过柱,弃去酸性氧化铝柱,用 5 mL 乙腈清洗 PRS 柱,吹 PRS 柱至干,在不抽真空的情况下,加入 5 mL 洗脱液,收集洗脱液,65℃ 氮气流下吹干,用 1 mL 流动相定容,过 0.45 μm 滤膜,供液相色谱测定。

1.2.3 色谱条件 柱:Purospher C₁₈柱,250 mm × 4.6 mm,粒度 5 μm (德国 Merck 公司)。柱温:40℃。流动相:乙腈+乙酸铵缓冲溶液(体积比 4:1,0.125 mol/L, pH 4.5);流速:1.3 mL/min;荧光检测器激发波长:265 nm;发射波长:360 nm;进样量:20 μL。

1.2.4 回收率 取 5.0 g 鳊鲂样品,加入相当于样品含量 0.4 μg/kg、1.0 μg/kg、5.0 μg/kg、100 μg/kg 的孔雀石绿和结晶紫,每个水平设 6 个平行,测定回收率并计算方法精密度。

2 结果与分析

2.1 孔雀石绿和结晶紫的色谱分离

图 1 显示,采用高效液相色谱-荧光检测法,对于孔雀石绿和结晶紫的还原产物可以在 C₁₈柱上得到良好的分离,保留时间分别为 10.066 min (MG) 和 10.688 min (GV)。

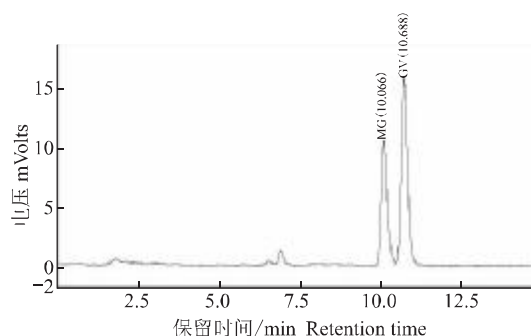


图 1 孔雀石绿和结晶紫标准谱图

Fig.1 Chromatogram of MG and GV standards

2.2 工作曲线

孔雀石绿和结晶紫混合液质量浓度范围在 1~600 μg/L 内,孔雀石绿和结晶紫的含量与峰面积线

性关系极好。孔雀石绿含量线性方程为 $y = 1.4845 \times 10^7 x$, 相关系数 0.999 9; 结晶紫含量线性方程为 $y = 2.2670 \times 10^7 x$, 结晶紫相关系数 0.999 9。

2.3 回收率和精密度

当添加水平在 $0.4 \mu\text{g/kg}$ 以上时, 孔雀石绿回收率为 70.0%~90.6%, 结晶紫回收率为 73.0%~87.2%, 相对标准偏差均小于 10%。

2.4 检出限

按照方法所规定的称样量和定容体积, 根据测定信噪比应大于 10 的原理, 计算定量检出限。本实验方法孔雀石绿和结晶紫的定量检出限均为 $0.4 \mu\text{g/kg}$ 。

3 讨论

3.1 还原剂浓度的确定

孔雀石绿和结晶紫混合标准工作溶液的线性范围为 $1 \sim 600 \mu\text{g/L}$ 。因此, 选择 $600 \mu\text{g/L}$ 孔雀石绿和结晶紫混合标准溶液进行还原剂浓度的选择试验, 结果表明, 硼氢化钾浓度为 $0.01 \sim 0.05 \text{ mol/L}$ 时, 经过 LC-MS-MS 确证, 孔雀石绿和结晶紫完全转化为隐色孔雀石绿和隐色结晶紫。因此, 确定硼氢化钾还原剂的浓度为 0.03 mol/L 。孔雀石绿和结晶紫混合标准工作溶液的线性方程和相关系数说明孔雀石绿和结晶紫被硼氢化钾还原为隐色孔雀石绿和隐色结晶紫的转化率极为稳定。

3.2 检测结果的表示

隐色孔雀石绿和隐色结晶紫没有杀虫和预防水霉病的效果, 因此, 在生物体内被检出的隐色孔雀石绿和隐色结晶紫是孔雀石绿和结晶紫代谢还原的产

物。荷兰科学家做过鳗鲡中添加孔雀石绿的试验, 12 h 后, 约一半的孔雀石绿被代谢还原为隐色孔雀石绿^[7]。本方法利用硼氢化钾将样品中残留的孔雀石绿还原成隐色孔雀石绿, 加上在样品中已代谢还原的隐色孔雀石绿, 被一起检出。因此孔雀石绿的检测结果是孔雀石绿及其代谢还原产物隐色孔雀石绿的总和, 以孔雀石绿表示。同样结晶紫的检测结果是结晶紫及其代谢还原产物隐色结晶紫的总和, 以结晶紫表示。

参考文献:

- [1] 李宁. 孔雀石绿对健康的影响 [J]. 国外医学卫生学分册, 2005, 32 (5): 262-264.
- [2] Larry G R, Sharon F W, Harold C T. Determination of leucogen-tian violet and gentian violet in catfish tissue by high-performance liquid chromatography with visible detection [J]. J Chromatogr B, 1995, 674: 125-131.
- [3] Kamila M, Andrzej P, Jan Z. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatogram-phy with visible and fluorescence detection [J]. J Chromatogr A, 2005, 1 089: 187-192.
- [4] 郭德华, 叶长琳, 朱莹洁. 液相色谱法测定鳗鱼中的孔雀石绿 [J]. 化学分析计量, 2002, 11 (2): 20-21.
- [5] Peter S, Aldert A B. Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta 2005 529: 173-177.
- [6] 郭德华, 叶长琳, 李波, 等. 高效液相色谱法-质谱法测定水产品中孔雀石绿及其代谢物 [J]. 分析测试学报, 23 (增刊): 206-208.
- [7] Bergwerff A A, Kuiper R V, Scherpenisse P. Persistence of residues of malachite green in juvenile eels (*Anguilla anguilla*) [J]. Aquaculture 2004 233: 55-63.

Determination of malachite green and gentian violet residues in *Anguilla japonica* by high performance liquid chromatography with fluorescence detector

ZHENG Bin¹, ZHAO Hong-ping², LENG Kai-liang³, YU Hui-juan⁴, WANG Yun-quan⁵, CHEN Xue-chang¹, ZHONG Zhi¹

(1. Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316100, China; 2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 4. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China; 5. Zhoushan Entry – Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan, 316000, China)

Abstract: Due to its potential carcinogenicity, mutagenity and teratogenicity to animals, malachite green (MG) has been forbidden as a veterinary medicine in the European Union. MG has also been forbidden in aquaculture industry in China. Since MG is easily available at low cost and highly effective, concern about its illegal use in fishery should still be given. In fish, MG can be easily absorbed into tissues and extensively metabolized to the reduced, colourless compound, leucomalachite green (LMG). A new method for determination of MG and gentian violet (GV) residues in *Anguilla japonica* using high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with fluorescence detector was established. The sample was extracted with acetonitrile-buffer mixture followed by partitioning with dichloromethane. Cleaning up and isolation was performed on PRS solid phase extraction (SPE) column. The extract was analyzed by using a HPLC system incorporating purospher C₁₈ column and fluorescence detector and external standard. Linearity was demonstrated with standards over the range 1 – 600 µg/L with relative coefficient of 0.999 9. The limit of quantification was 0.4 µg/kg. Recoveries of MG and GV from sample tissues fortified at 0.4 – 100 µg/kg were 70.0% – 90.6% and 73.0% – 87.2%, respectively. The RSDs were less than 10%. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 1 038 – 1 041]

Key words: fluorescence detection; malachite green; gentian violet; *Anguilla japonica*

Corresponding author: ZHENG Bin. E-mail: zhengbin67@163.com