

高效液相色谱法测定水产品中孔雀石绿和隐色孔雀石绿残留量

金雁* 刘宁 姚家彪 赵颖 孟祥勇

(沈阳出入境检验检疫局 沈阳 110016)

摘 要 建立高效液相色谱法测定水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿残留量的检测方法。样品用乙腈-乙酸盐缓冲混合溶液提取,溶液分配到二氯甲烷层,后过中性氧化铝柱净化,采用高效液相色谱分离,二极管阵列检测器检测,外标法定量。本法简便、快速、定量准确、精密度高,适用于水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿残留量的检测。

关键词 高效液相色谱法 孔雀石绿 隐色孔雀石绿 水产品 残留检测

引言

孔雀石绿属于三苯甲烷类染料,它可用作杀菌剂、驱虫剂,是药用染料中抗菌效力较强的一类,孔雀石绿在动物体内可迅速代谢为隐色孔雀石绿。在水产养殖过程中,它经常被用于防治鱼类等水产品的水霉病、烂鳃病以及寄生虫病等^[1]。孔雀石绿具有高毒素、高残留和致癌、致畸、致突变等副作用^[2],因此美国、日本、英国等许多国家已禁止其用于水产养殖业,我国农业部也于2002年将其列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》。由于孔雀石绿价格低廉,在我国很多地方的水产养殖和水产品贩运中还在普遍使用这种禁用药物,因此严格监控水产品中孔雀石绿的残留量具有重要意义。目前,水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿残留量的检测方法主要有:高效液相色谱法^[3,4]、液质联用法^[5]、气质联用法^[6]、薄层色谱法^[7]、普通分光光度法^[8]等。本文利用高效液相色谱法对鱼、河蟹、虾、毛蚶等水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿残留量的检测方法进行研究,该方法简便、快速、定量准确、精密度高。

1 实验部分

1.1 仪器设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配置四元泵、真空在线脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)、Agilent 化学工作站(美国 Agilent 公司);色谱柱:Kromasil ODS 150 mm×4.6 mm 5μm(中科院大连化学物理研究所);PbO₂ 氧化柱(上海安谱科学仪器有限公司);高速匀浆机;离心机;pH计等。

1.2 试剂与溶液

1.2.1 试剂 孔雀石绿(MG)和隐色孔雀石绿(LMG)(北京陆桥技术有限责任公司提供);乙腈(色谱纯);乙腈(分析纯);二氯甲烷(分析纯);二甘醇(分析纯);层析用酸性氧化铝(100~200目);层析用中性氧化铝(100~200目);超纯水(Millipore 纯水机制备);1 mol·L⁻¹对-甲苯磺酸溶液;25%盐酸羟胺水溶液;乙酸盐缓冲液:称取4.95g无水乙酸钠和0.95g水对甲苯磺酸于900mL水中,用冰乙酸调pH至4.5,最后用水稀释至1000mL。

1.2.2 孔雀石绿标准储备液 精密称取孔雀石绿标准品0.0100g,用乙腈溶解并定容至10.0mL,此溶液浓度为1000μg·mL⁻¹。

1.2.3 隐色孔雀石绿标准储备液 精密称取隐色孔雀石绿标准品0.0100g,用乙腈溶解并定容至10mL,此溶液浓度为1000μg·mL⁻¹。

1.2.4 孔雀石绿和隐色孔雀石绿混合标准溶液 取孔雀石绿和隐色孔雀石绿标准储备液各1mL,置于100mL容量瓶中,用乙腈定容至刻度,此溶液浓度为10μg·mL⁻¹。

以上标准溶液应于4℃避光保存。

1.3 测定方法

1.3.1 样品的提取与净化 从原始的水产样品中取可食部分,放入高速组织捣碎机中捣碎均匀。准确称取5.0g捣碎样品于100mL离心管中,加入1.5mL 25%盐酸羟胺水溶液、2.5mL 1 mol·L⁻¹对甲苯磺酸溶液、5.0mL 乙酸盐缓冲溶液,10000 r·min⁻¹组织匀浆1min,加入10mL乙腈涡旋混匀30s,再加入10g酸性氧化铝涡旋混匀30s,4500r·min⁻¹离心10min,上清液转移至装有10mL水和2mL二甘醇的100mL离心管中。再向样品残渣中加入10mL乙腈,重复上述操作,将上清液转移至同一100mL离心管

中。向离心管中加入 15mL 二氯甲烷,涡旋 30s 后,4500r·min⁻¹ 离心 10min,将下层溶液转移至另一离心管中,再用 10mL 二氯甲烷重复上述操作一次,合并下层溶液于同一离心管中。

向玻璃层析柱(Φ8mm×h10cm)中装入 100~200 目层析用中性氧化铝 2g,先用 10mL 二氯甲烷淋洗,备用。将上述离心管中的提取液全部过中性氧化铝柱净化,流速 1.0mL·min⁻¹,再用二氯甲烷洗涤离心管两次,每次 5mL,洗涤液依次通过柱。收集流出液于 150mL 鸡心瓶中,于 35℃ 水浴中旋转蒸发至干,用 1.0mL 乙腈溶解残渣,过 0.45μm 滤膜后上液相色谱测定。

1.3.2 色谱条件 流动相:乙腈:乙酸盐缓冲液(pH4.5)=80:20;流速:1.5mL/min;柱温:35℃;检测波长:618nm;进样量:50μL。

1.3.3 标准曲线的制作 精确吸取混合标准溶液 10μL、50μL、100μL、200μL、500μL 分别置于 10mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,孔雀石绿和隐色孔雀石绿浓度分别为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5μg·mL⁻¹,各取 50μL 进液相色谱测定,以浓度对峰面积作校正曲线,得线性回归方程。

2 结果与讨论

2.1 净化方法的选择

分别采用两种不同的净化方法对同一样品的二氯甲烷提取液进行试验。方法 1:将二氯甲烷提取液于 35℃ 水浴中旋转蒸发至干,用 1.0mL 乙腈溶解残渣,加 2mL×2 正己烷分两次萃取,弃去正己烷层,乙腈层进行液相色谱测定。方法 2:将二氯甲烷提取液全部过 100~200 目层析用中性氧化铝柱净化,收集流出液于鸡心瓶中,于 35℃ 水浴中旋转蒸发至干,用 1.0mL 乙腈溶解残渣进行液相色谱测定。结果表明:方法 2 的净化效果明显比方法 1 的净化效果好,杂质峰的干扰少,样品分离完全。故本文采用过 100~200 目层析用中性氧化铝柱进行样品的净化。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 检测波长的选择 经二极管阵列检测器分别对孔雀石绿和隐色孔雀石绿进行紫外光谱测定,孔雀石绿在 618nm 处有最大吸收峰,隐色孔雀石绿在 245nm、618nm 处有两个吸收峰。虽然隐色孔雀石绿的最大吸收波长为 245nm,但因背景干扰严重,不宜采用。故本文选定检测孔雀石绿和隐色孔雀石绿的波长为 618nm。

2.2.2 流动相的选择 分别选用不同比例的乙腈:乙酸盐缓冲液作流动相进行比较试验。结果表明当乙腈:乙酸盐缓冲液=80:20 时,孔雀石绿和隐色孔雀石绿的出峰时间、分离效果最佳,测定结果更准确。

2.2.3 流动相 pH 值的选择 采用乙腈:乙酸盐缓冲液(80:20)为流动相,试验流动相 pH 值分别为 3.0、4.5、6.0 时,对样品保留及分离的影响。结果表明:pH=4.5 时样品分离效果最佳。故本文确定流动相 pH 值为 4.5。

2.3 标准曲线及线性关系

以浓度对峰面积作校正曲线,得线性回归方程。孔雀石绿和隐色孔雀石绿在 0.01~0.5μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好(见表 1)。

表 1 孔雀石绿和隐色孔雀石绿的线性方程和相关系数

样品	线性方程	相关系数
孔雀石绿	$Y = 40.0897X - 2.2795$	0.99993
隐色孔雀石绿	$Y = 70.4638X + 4.3175$	0.99995

2.4 样品的测定

取未检测出含孔雀石绿和隐色孔雀石绿的鱼肉样品,定量添加孔雀石绿及隐色孔雀石绿标准品,充分混匀。分别准确称取未添加和已添加孔雀石绿和隐色孔雀石绿的鱼肉样品各 5.0g,置于 100 mL 离心管中,以下按 1.3 测定方法中的样品提取、净化及色谱条件进行操作。孔雀石绿和隐色孔雀石绿标准品的色谱图(见图 1),未添加孔雀石绿和隐色孔雀石绿的空白鱼肉样品色谱图(见图 2),添加孔雀石绿和隐色孔雀石绿的加标鱼肉样品色谱图(见图 3)。

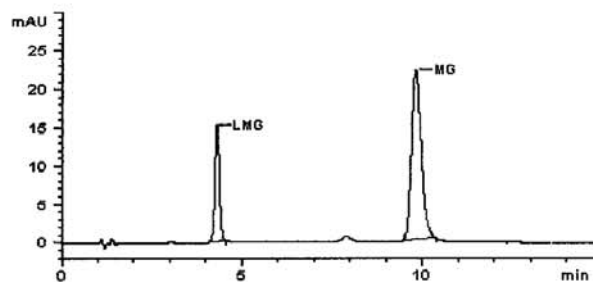


图 1 孔雀石绿(MG)、隐色孔雀石绿(LMG)标准品的高效液相色谱图

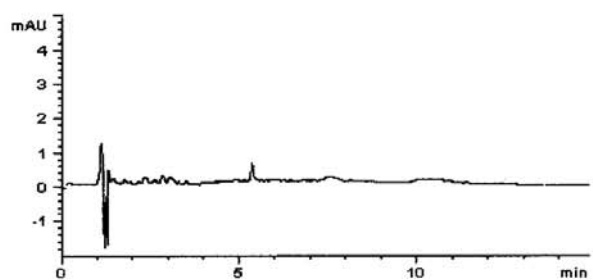


图 2 空白鱼肉样品的高效液相色谱图

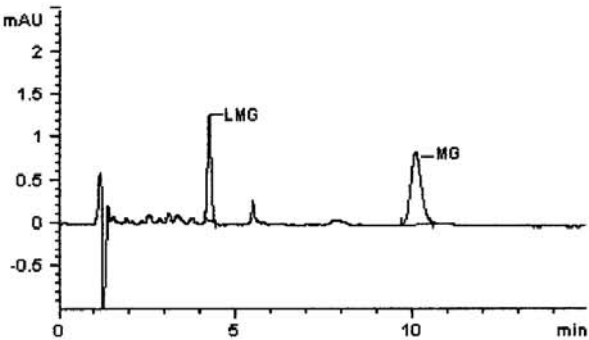


图3 空白加标鱼肉样品的高效液相色谱图

2.5 回收率及精密度试验

采用标准加入法进行试验。取未检出含孔雀石绿和隐色孔雀石绿的鱼肉样品,定量添加孔雀石绿和隐色孔雀石绿标准品后再进行检测,将检测值除以实际添加值,计算回收率。具体操作如下:精密称取空白鱼肉样品5.0g,置于100 mL离心管中,按表2中的加标浓度分别准确加入一定量的孔雀石绿和隐色孔雀石绿混合标准溶液,充分混匀,制成不同浓度的加标样品,按1.3测定方法中的提取、净化和液相色谱条件进行试验,每一浓度平行进行5次试验,计算回收率及精密度(见表2)。

表2 回收率及精密度试验结果

样品	加标浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均回收率 (%)	测定次数	RSD (%)
孔雀石绿	2	75.4	5	8.3
	20	84.5	5	5.5
	100	90.3	5	3.0
隐色孔雀石绿	2	73.6	5	8.6
	20	81.7	5	6.6
	100	88.0	5	3.4

孔雀石绿和隐色孔雀石绿在3个浓度的加标回收率均在73.6%~90.3%之间,相对标准偏差均在10%以内,本方法中孔雀石绿和隐色孔雀石绿的最

低检出限均为 $2\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

本文还分别以河蟹、虾、毛蚶等水产品为研究对象,进行孔雀石绿和隐色孔雀石绿残留量的检测研究工作,结果表明本实验方法适用于鱼、河蟹、虾、毛蚶等水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿残留量的检测。

3 结论

本文建立使用 HPLC 测定水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿的分析方法,方法简便快速、分离完全,具有良好的灵敏度和精密度,为监督监测水产品中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿的残留量提供准确的检测手段。

参考文献

1 卢迈新,黄樟翰. 美洲鳗对几种药物的敏感性研究,淡水渔业,2000,30(5):28~29
2 Doerge, D R. Mechanism for inhibition of thyroid peroxidase by leucomalachite green, Chem Res Toxicol, 1998, 11:1098~1104
3 Rushing, L. G., and Thompson, H. C. Jr. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco metabolites in catfish or trout tissue by high-performance liquid chromatography with visible detection, J Chromatography B, 1997, 688:325~330
4 郭德华,叶长淋,朱莹洁. 液相色谱法测定鳗鱼中的孔雀石绿,化学分析计量,2002,11(2):20~21
5 Bergwerff Aldert, A., and Scherpenisse, P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals, J Chromatography B, 2003, 788:351~359
6 Tumipseed S B, et al. J AOAC Int, 1995, 78(4):971
7 Edelhaeuser, M., and Klein, E. Determination of malachite green residues in food fish, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 1986, 82(12):386~389
8 Safarik, I., and kova, M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water, Water Research, 2000, 36:196~200

Determination of malachite green and leucomalachite green residues in aquatic products by HPLC

Jin Yan Liu Ning Yao Jiabiao Zhao Ying Meng Xiangyong

(Shenyang Enter-exit Inspection and Quarantine Bureau of the P. R. China Shenyang 110016)

Abstract High performance liquid chromatographic method (HPLC) have been developed for determination of malachite green and its metabolite leucomalachite green residues in aquatic products. The samples were extracted with acetonitrile-acetate buffer mixture, and partitioned into methylene chloride with final cleanup on alumina column. The analytes were separated by HPLC with diode array detector and quantified using external standard calibration curves. The method is simple, rapid and accurate for detection of malachite green and its metabolite leucomalachite green residues in aquatic products.

Key words HPLC Malachite green Leucomalachite green Aquatic products Residue detection