

吴蓓琦,刘畅,李萍,等.水产品中孔雀石绿残留检测方法的优化[J].江苏农业科学,2016,44(7):333-335.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.098

# 水产品中孔雀石绿残留检测方法的优化

吴蓓琦,刘畅,李萍,朱晓华,杨洪生

(江苏省水产质量检测中心,江苏南京 210017)

**摘要:**通过优化提取方式、提取溶液、浓缩条件、检测条件等,建立高效液相色谱荧光法测定水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量的方法。样品经硼氢化钾溶液、乙腈提取,二氯甲烷萃取,用45℃氮气吹干,丙基磺酸阳离子(PRS)固相萃取柱净化,采用Agilent XDB C<sub>18</sub>色谱柱(1.8 μm),以乙腈-乙酸铵缓冲液(0.125 mol/L, pH值4.5, 体积比80:20)为流动相,用超高效液相色谱荧光检测器进行检测。方法的检测限为0.2 μg/kg,定量限为0.5 μg/kg,4个加标水平(1.0、2.5、5.0、10.0 μg/kg)的回收率为86.4%~95.3% (n=6),相对标准偏差为2.8%~5.6%。该方法简便快捷、准确度高,易于推广应用,能满足水产品中孔雀石绿及其代谢物残留的检测要求。

**关键词:**高效液相色谱法;水产品;孔雀石绿;残留检测;优化

**中图分类号:** TS207.3; O652.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0333-03

孔雀石绿(malachite green, MG)是一种三苯甲烷类染料,它在生物体内快速代谢为无色孔雀石绿(leuco-malachite green, LMG),具有致癌、致畸、致突变等毒性<sup>[1-2]</sup>,因此美国、欧盟等禁止将孔雀石绿用于食品用水产动物的养殖,我国也在2002年将其列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》。但是,由于孔雀石绿对鱼类水霉病等疾病具有特效,且价格低廉,目前在鱼苗繁育、长途运输等过程中非法使用的问题屡有发生<sup>[3]</sup>。

目前,水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量的检测方法主要有高效液相色谱法、液质联用法、酶联免疫法等<sup>[4-7]</sup>。目前农业部开展全国水产品产地监督抽检、城市例行监测等任务时,以GB/T 20361—2006《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法》<sup>[8]</sup>作为水产品中孔雀石绿的定量检测方法,但该方法前处理过程繁琐、操作步骤多。本试验通过对GB/T 20361—2006《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法》前处理过程进行优化与改进,主要包括提取方式、提取溶液、浓缩条件等因素,以期建立1种前处理简单快捷、结果准确度高并且稳定的孔雀石绿及其代谢物残留的测定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

收稿日期:2015-05-21

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK20141500)。

作者简介:吴蓓琦(1971—),女,江苏南京人,高级工程师,主要从事水产品质量安全研究。E-mail:1142096165@qq.com。

Agilent 1200 超高效液相色谱仪,配荧光检测器; TurboVap LV 浓缩工作站。

孔雀石绿、无色孔雀石绿,购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度>99%;乙腈、二氯甲烷,色谱纯,购自美国 TEDIA 公司;其余试剂均为分析纯。丙基磺酸阳离子固相萃取柱(PRS, 500 mg/3 mL),购自美国 Agilent 公司。

提取液:称取0.54 g 硼氢化钾,加入25 mL 水溶解,再加入75 mL 乙腈混匀。

洗脱液:称取1.54 g 无水乙酸铵,溶解于200 mL 水中,用浓氨水(25%~28%)将pH值调至10.0,再与乙腈按体积比1:1进行混合。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 样品前处理** 称取5.00 g 样品,加入15 mL 提取液,涡旋2 min, 4 000 r/min 离心10 min,将上清液转移至125 mL 分液漏斗中;在离心管中加入10 mL 乙腈,涡旋2 min, 8 000 r/min 离心10 min,合并上清液于分液漏斗中。在分液漏斗中加入30 mL 二氯甲烷,剧烈振荡2 min,静置分层1 h,将下层溶液转移至50 mL 浓缩管中。用45℃氮气吹至0.5~1.0 mL,加入5 mL 乙腈溶解残渣。PRS柱用5 mL 乙腈活化,转移提取液到柱上,再分别用3 mL 乙腈润洗浓缩管2次,依次过柱。最后将PRS柱吹至近干,加入3 mL 洗脱液,收集洗脱液并定容至3 mL,供液相色谱测定。

**1.2.2 色谱条件** 色谱柱为Agilent XDB-C<sub>18</sub>柱,4.6 mm×50 mm(内径),粒度1.8 μm;柱温为35℃,进样体积为5 μL;流动相为乙腈-乙酸铵缓冲液(0.125 mol/L, pH值4.5, 体积比80:20),流速为0.15 mL/min;检测器为荧光检测器,激发

[5]李正国,刘明春,邓伟,等.素心蜡梅和红心蜡梅鲜花挥发油成分分析[J].精细化工,2008,25(10):985-988,992.

[6]夏晶晖.微波及保鲜剂延缓狗蝇蜡梅切枝衰老的研究[J].西南大学学报:自然科学版,2012,34(6):36-40.

[7]黄风格,俞娟茹,卫世乾.菊花干制工艺研究[J].南阳师范学院学报,2012,11(6):41-46.

[8]夏晶晖.栀子花脱水干制工艺研究[J].西南大学学报:自然科学版,2014,36(12):8-11.

[9]王向阳,包嘉波,袁海娜.玫瑰干花护形研究[J].浙江农业学报,2002,14(6):351-353.

[10]王玲,朱振亚.红色康乃馨干燥保色方法研究[J].中国林副特产,2011,111(2):10-13.

波长为 265 nm,发射波长为 360 nm。

2 结果与分析

2.1 样品提取方式优化

GB/T 20361—2006《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法》的基本原理是通过乙酸铵乙腈溶液提取,用硼氢化钾将提取液中的孔雀石绿还原成无色孔雀石绿,采用荧光检测器进行检测。本方法中需要加入盐酸羟胺溶液、乙酸铵缓冲液、乙腈等多种试剂,同时需要

对样品进行 4 次提取,提取过程繁琐。本方法采用硼氢化钾-乙腈混合溶液进行提取,直接在样品涡旋过程中将孔雀石绿还原成无色孔雀石绿,避免在提取溶液中加入硼氢化钾溶液,减少操作步骤;同时,硼氢化钾作为强还原剂,能有效替代 GB/T 20361—2006《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法》中盐酸羟胺的作用,避免无色孔雀石绿被氧化。通过 2 次提取的比较发现,本方法既具有操作过程简单、节约时间等优点(表 1),又能保证结果的准确性、重复性(表 2)。

表 1 提取过程中本方法与 GB/T 20361—2006《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法》的比较

方法	提取所需试剂种类	提取次数 (次)	耗费试剂总量 (mL)	耗费时间 (以 8 个样品同时处理计)(h)
本方法	乙腈、硼氢化钾、二氯甲烷	2	55	1.5~2.0
GB/T 20361—2006	乙腈、酸性氧化铝、盐酸羟胺、对甲苯磺酸、乙酸铵、硼氢化钾、冰乙酸、二甘醇、二氯甲烷	4	111	4.0~5.0

注:提取过程是从样品称取到二氯甲烷萃取静置前为止。

表 2 空白样品中孔雀石绿的加标回收率和精密度(n=6)

样品	加标水平 (μg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
鲤鱼	1.0	92.9	2.9
	2.5	88.1	3.2
	5.0	95.3	3.3
	10.0	89.8	5.6
南美白对虾	1.0	92.3	4.4
	2.5	89.5	3.7
	5.0	93.1	3.6
	10.0	91.3	3.8
中华绒螯蟹	1.0	87.0	3.0
	2.5	89.4	2.8
	5.0	91.0	4.0
	10.0	86.4	2.7

2.2 硼氢化钾用量的确定

在实际样品前处理过程中,水相与有机相的比例影响二者的分层效果,比例不当会导致 2 相倒置、2 层界面模糊、乳化等现象。通过考察硼氢化钾溶液与乙腈不同的体积比例,结果表明:当硼氢化钾溶液与乙腈的体积比为 1:2 或更高时,对于鳊鲌、中华绒螯蟹等脂肪含量较高的样品,加入二氯甲烷并剧烈振摇后较易乳化。当硼氢化钾溶液与乙腈的体积比为 1:3 或更低时,剧烈振摇后也不会乳化,有机相与水相分层明显,有利于下一步的浓缩与净化。但是试验中水相的存在有助于去除样品中水溶性杂质,因此水相的比例也不能过低。经综合考虑,本试验选择硼氢化钾溶液与乙腈的体积比为 1:3。

硼氢化钾在本方法及 GB/T 20361—2006《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法》中的作用均是将样品中的孔雀石绿还原成无色孔雀石绿,硼氢化钾的用量直接关系到孔雀石绿的还原效果。为了确定硼氢化钾浓度对孔雀石绿的还原效果,在空白基质中添加 10 μg/kg 孔雀石绿,分别加入硼氢化钾浓度为 0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 的提取液,按“1.2”“1.3”节中相应方法进行前处理与检测。在前处理过程中样品经涡旋后,原本呈肉红色的样品颜色逐渐变浅,直至变成灰白色。同时测定结果表明,样品中孔雀石绿

的回收率无显著差异,均在 90% 左右。考虑到水产品基质的多样性以及孔雀石绿残留水平的不同,本试验选择硼氢化钾溶液浓度为 0.4 mol/L,以保证孔雀石绿的还原效果。

2.3 浓缩条件的优化

本试验应用 TurboVap LV 浓缩工作站进行浓缩,其主要原理是在一定的温度下利用氮气吹扫进行浓缩,相对于传统的旋转蒸发而言,具有溶剂挥发平稳、能同时浓缩 24 个样品、浓缩效率高等特点。本试验在 6.9×10<sup>4</sup> Pa 氮气压力下,浓缩管中溶剂不会剧烈翻腾,同时又保证了一定的溶剂挥发速度。同时,本试验对浓缩温度进行了优化,考察了 35、40、45、50、55℃ 条件下浓缩时间及结果的准确性。结果表明,在 45℃ 的浓缩温度下,浓缩时间约为 40 min,回收率约为 90%。50、55℃ 条件下浓缩时间较短,约为 30 min,但样品回收率较低,均在 80% 以下,有的甚至低于 70%,结果不稳定。这可能是由于在较高的温度下,溶剂挥发速率过快,将目标物质连同溶剂一起带出,造成回收率降低。在 35、40℃ 条件下,浓缩时间较长,均超过 1 h,但回收率与 45℃ 无显著差异。因此采用氮气压力 6.9×10<sup>4</sup> Pa、浓缩温度 45℃ 作为本方法的浓缩条件。

2.4 固相萃取小柱的选择

GB/T 20361—2006《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法》中将酸性氧化铝柱与 PRS 柱进行串联,待样液流完后,弃去酸性氧化铝柱,再进行洗脱,而本试验只采用 PRS 柱进行净化,结果显示:色谱图中杂峰干扰小,目标峰与杂峰完全分离,且峰形尖锐对称(图 1 至图 4);此外只选用 PRS 柱,有利于降低检测成本。

2.5 仪器方法的选择

笔者所在研究团队曾建立了普通高效液相色谱荧光法测定水产品中孔雀石绿残留的方法<sup>[9]</sup>,其分析时间为 15 min,而本试验建立的超高效液相色谱法分析用时为 8 min,分析时间大大缩短。同时本试验采用 1.8 μm 小颗粒填料进行超高效液相色谱分析,结果表明:孔雀石绿在 Agilent XDB C<sub>18</sub> 色谱柱拥有理想的分离效果(图 1 至图 4)。此外,本方法完成 1 次样品分析消耗的流动相仅为 1.2 mL(流速为 0.15 mL/min),而普通液相色谱方法<sup>[9]</sup>消耗的流动相为 15 mL(流速为

1 mL/min), 可见采用超高效液相色谱方法可以在很大程度上减少分析时间、节省溶剂消耗, 这既降低了分析成本, 又减少了废液的排放, 具有重要的环保意义。

## 2.6 线性范围、检出限及定量限

采用逐级稀释的方式, 并加入 0.4 mL 0.03 mol/L 硼氢化钾溶液, 配制成质量浓度分别为 1.00、2.00、5.00、10.00、50.00、100.00、500.00  $\mu\text{g/L}$  的孔雀石绿标准工作液, 按质量浓度从低到高的顺序进样。以峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标、质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标绘制标准工作曲线, 结果表明: 孔雀石绿在 1~500  $\mu\text{g/L}$  范围内具有良好的线性关系,  $r > 0.999$ 。

检出限 (LOD) 采用向空白、样品中逐级降低孔雀石绿加标浓度的方法来确定, 以  $\geq 3$  倍信噪比 ( $S/N \geq 3$ ) 对应的目标物浓度为检出限, 以  $S/N \geq 10$  对应的浓度为定量限 (LOQ)。结果表明: 该方法的检出限为 0.2  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 0.5  $\mu\text{g/kg}$ 。

## 2.7 准确度与精密度

在空白、鲤鱼、对虾、中华绒螯蟹样品中加入孔雀石绿标准溶液, 加标水平分别为 1.0、2.5、5.0、10.0  $\mu\text{g/kg}$ , 加标 30 min 后按“1.2”“1.3”节的相应方法进行测定, 每个水平测定 6 次, 计算平均回收率、相对标准偏差。结果表明: 孔雀石绿的加标回收率为 86.4%~95.3%, 在各个加标水平下加标回收率比较稳定, 相对标准偏差 ( $RSD$ ) 为 2.8%~5.6%, 能满足水产品中孔雀石绿及其代谢物残留的检测要求 (表 2、图 1 至图 4)。

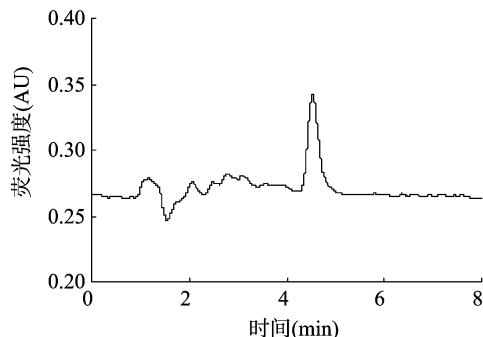


图1 标准溶液色谱结果(加标量1.00  $\mu\text{g/mL}$ )

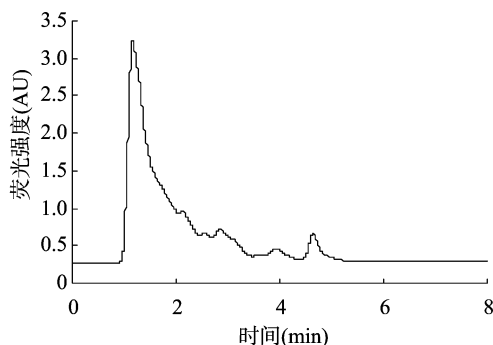


图2 鲤鱼加标样品色谱结果(加标量2.5  $\mu\text{g/kg}$ )

## 3 结论

本方法通过对 GB/T 20361—2006《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法》的提取方式、提取溶液、浓缩条件等前处理过程的优化, 建立了水产品中孔雀石绿及其代谢物的高效液相色谱-荧光检测法。试验

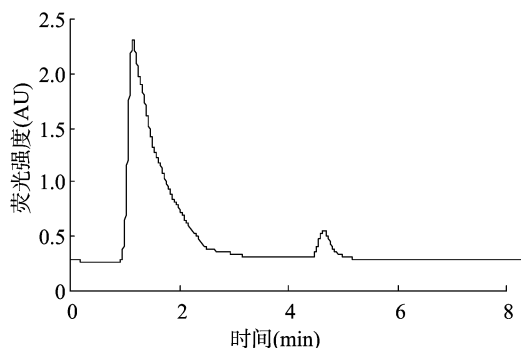


图3 南美白对虾加标样品色谱结果(加标量2.5  $\mu\text{g/kg}$ )

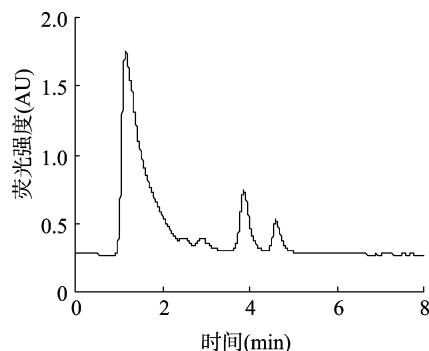


图4 中华绒螯蟹加标样品色谱结果(加标量2.5  $\mu\text{g/kg}$ )

结果表明: 该方法具有前处理步骤简单快捷, 结果准确性高、稳定性好等优点, 适用于水产品中孔雀石绿残留的检测。

## 参考文献:

- [1] 翟毓秀, 郭莹莹, 耿霞, 等. 孔雀石绿的代谢机理及生物毒性研究进展[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(1): 27-32.
- [2] 桂英爱, 王洪军, 刘春林, 等. 孔雀石绿及其代谢产物在水产动物体内的残留、危害及检测研究进展[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(4): 293-298.
- [3] 傅武胜, 郑奎城, 邱文倩, 等. 养殖鱼孔雀石绿及其代谢物残留量的调查与溯源[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 176-182.
- [4] 郑斌, 赵红萍, 冷凯良, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定鳊鲢中孔雀石绿和结晶紫残留[J]. 中国水产科学, 2007, 14(6): 1038-1041.
- [5] Mitrowska K, Posyniak A, Zmudzki J. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1089(1/2): 187-192.
- [6] 朱宽正, 王鹏, 林雁飞, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中孔雀石绿、结晶紫以及它们的隐色代谢物残留[J]. 色谱, 2007, 25(1): 66-69.
- [7] 沈丽, 张丽君, 谭攀, 等. 酶联免疫检测试剂盒检测水产品中孔雀石绿的应用研究[J]. 食品工程, 2012(2): 58-61.
- [8] 中国水产科学研究院, 农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心, 国家水产品质量监督检验测试中心. GB/T 20361—2006 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 高效液相色谱荧光检测法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [9] 王静, 杨洪生, 张美琴, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定水产品中孔雀石绿代谢物残留量[J]. 理化检验: 化学分册, 2010, 46(6): 642-647.