

doi: 10.3969/j.issn.1673-2227.2010.04.006

超高效液相色谱-串联质谱快速测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量

王丽敏, 杜雪莉, 赵艳, 刘耀敏

(通威股份有限公司检测中心, 四川成都 610041)

摘要: 建立了超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定水产品中孔雀石绿 (MG)、结晶紫 (CV) 及其代谢物隐色孔雀石绿 (LMG) 和隐色结晶紫 (LCV) 残留量的快速、准确检测方法。该法在 SN/T 1768-2006 快速检测方法的基础上, 采用空白样品添加不同质量浓度标准溶液的方式绘制校准曲线, 并以氘代孔雀石绿 (D_5 -MG) 和氘代隐色孔雀石绿 (D_6 -LMG) 为内标进行检测, 从而大大提高了定量的准确性。结果表明, MG、CV、LMG 和 LCV 4 种待测物在 $0 \sim 10.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好 ($R > 0.99$), 方法检出限均为 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。在加标量为 0.5 和 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 水平下 4 种待测物平均回收率在 $92.1\% \sim 111.0\%$ 之间, 测定结果的相对标准偏差为 $2.2\% \sim 9.5\%$ 。此外, 该法在 FAPAS 国际能力验证中得以证实, 改进后的方法快速且准确, 能满足水产品出口检测要求。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 孔雀石绿; 结晶紫; 代谢物; 水产品

中图分类号: S 948; R 155.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-2227-(2010)04-0032-05

Rapid residue determination of malachite green, crystal violet and their metabolites in aquatic products by UPLC-MS/MS

WANG Limin, DU Xueli, ZHAO Yan, LIU Yaomin

(Inspection Center of Tongwei Co. Ltd., Chengdu 610041, China)

Abstract: We developed a rapid and accurate method by UPLC-MS/MS to determine the residue of malachite green (MG), crystal violet (CV) and their metabolites (LMG and LCV) in aquatic products. Based on the rapid method of SN/T 1768-2006, standard curves were made by adding standard solutions of different concentrations to the blank samples, and D_5 -MG and D_6 -LMG were used as internal standards, which improved the accuracy of determination. The results show that MG, CV, LMG and LCV have a good linear correlation within the range of $0 \sim 10.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R > 0.99$), and the detection limits of the method are all $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The average recoveries at fortification of 0.5 and $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ range from 92.1% to 111.0% with relative standard deviations (RSD) varying from 2.2% to 9.5% . Furthermore, the rapid and accurate improved method is also proved by FAPAS Proficiency Test to meet the export testing requirements of aquatic products.

Key words: UPLC-MS/MS; malachite green; crystal violet; metabolite; aquatic products

孔雀石绿 (MG) 和结晶紫 (CV) 是一类三苯甲烷类染料, 最先应用在纺织工艺, 因其具有消毒和杀菌作用而被广泛应用于水产品的养殖过程

中。由于 MG 和 CV 具有高毒、高残留和致癌、致畸、致突变等特点, 当其进入生物体内, 会产生具有更强危害的隐色孔雀石绿 (LMG) 和隐色结晶

收稿日期: 2010-02-22; 修回日期: 2010-04-10

作者简介: 王丽敏 (1981-), 女, 硕士, 从事食品安全与兽药残留分析研究。E-mail: wanglimin20073225@163.com

紫 (LCV), 因此, 包括中国在内的许多国家都将 MG 和 CV 列为水产养殖中的禁用药物^[1-4]。然而, 由于 MG 和 CV 具有价格低廉、效果显著等优点, 其在水产养殖中的使用屡禁不止, 这不但对人体健康造成威胁, 而且严重影响了中国水产品的出口^[5]; 因此, 如何快速、准确地测定该类禁用药物、特别是其代谢物在水产品中的残留量, 对于水产品出口企业非常重要。

目前国内外检测 MG、CV、LMG 和 LCV 的分析方法有气相色谱质谱法^[6]、高效液相色谱法^[7-11]和液相色谱-质谱法^[12-16], 同时国内检测此类药物的标准方法有 GB/T 19857-2005^[17]、GB/T 20361-2006^[18]和 SN/T 1768-2006^[19]等。然而, 上述方法不是检出限高达不到出口要求, 就是检测方法繁琐, 特别是存在前处理操作步骤多、耗时较长、费用高及检测过程使用大量有毒试剂等缺点, 因此, 笔者在应用 SN/T 1768-2006 检测方法的基础上, 多次利用超高效液相色谱-串联质谱对水产品中 MG、CV 及其代谢物的残留量进行检测, 总结了一些经验, 并对方法中的一些环节进行了改进。改进后的方法在 FAPAS 国际能力验证中得以证实, 该法快速、准确、灵敏度高, 完全可以达到水产品出口检测的要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-串联四极杆质谱仪 (Waters 公司出品); MASSLYNX 4.1 质谱工作站软件; T10 均质器 (德国 IKA 公司出品); 旋转蒸发器 (瑞士 BUCHI 公司出品); WH-3 旋涡混合仪 (上海沪西产); 离心机 (德国 Beckman Coulter 公司出品); CP224S 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司出品); 乙腈 (Fisher 色谱纯); 试验用水为 Milli-Q 超纯水; 乙酸铵 (分析纯); 标准品结晶紫盐酸盐购自 Riedel-de 公司 (CV, 纯度 89.0%); 孔雀石绿草酸盐 (MG, 纯度 90.0%)、隐色孔雀石绿 (LMG, 纯度 92.0%)、隐色结晶紫 (LCV, 纯度 99.0%) 及内标氘代隐色孔雀石绿 (D₆-LMG, 纯度 98.5%) 均购自 Dr. Ehrenstorfer 公司; 氘代孔雀石绿购自 WITEGA 公司 (D₅-MG, 纯度 99.0%); 标准溶液: 分别准确称取适量 MG、CV、LMG、LCV、D₅-MG 和 D₆-LMG 标准品, 用乙腈分

别配制成 100 μg·mL⁻¹ 的标准贮备液, -18 °C 避光保存。使用前, 根据需要用初始流动相配制混合标准溶液, 现配现用。试验样品为斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*), 取其肌肉搅碎, 于 -18 °C 冰箱保存备用。

1.2 液相色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC™ BEH C18 柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: 溶剂 A 为乙腈, 溶剂 B 为 5 mmol 乙酸铵溶液 (pH = 4.5), 梯度洗脱条件见表 1; 样品室温度 10 °C; 进样体积 10 μL; 流速 0.3 mL·min⁻¹。

表 1 梯度洗脱条件

Tab. 1 Gradient elution conditions

t/min	φ(乙腈)/% acetonitrile	φ(乙酸铵缓冲液)/% ammonium acetate buffer	曲线 curve
0	60	40	-
8	90	10	6
10	60	40	1

1.3 质谱条件

电喷雾离子源 ESI+; 毛细管电压 0.7 kV; 离子源温度 120 °C; 锥孔反吹气 50 L·h⁻¹; 脱溶剂气温度 350 °C; 脱溶剂气流量 650 L·h⁻¹。第一重四极杆和第二重四极杆的低端分辨率及高端分辨率均为 13; 碰撞气流量 0.2 mL·min⁻¹; 锥孔电压和碰撞能量见表 2, 检测方式为多反应监测 (MRM) 扫描模式。

1.4 样品处理

准确称取已搅碎的样品 5.00 g 于 50 mL 离心管中, 加入适量 D₅-MG 和 D₆-LMG 内标混合标准溶液, 使 2 种内标最终测定质量浓度为 2 ng·mL⁻¹ (标准曲线的制作与样品处理同步, 分别在空白样品中加入最终测定质量浓度为 0、0.2、0.5、1.0、5.0 和 10 ng·mL⁻¹ 的 MG、CV、LMG 和 LCV 标准溶液), 加入孔雀石绿和结晶紫快速检测前处理试剂盒中的提取剂 1 (液体 20.0 mL), 用均质器以 8 000 r·min⁻¹ 的速度均质 30 s, 再加入提取剂 2 (固体粉末), 振荡 1 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 4.0 mL 于鸡心瓶中, 40 °C 水浴减压旋转蒸干, 加入 2 mL 初始流动相涡旋混合 1 min, 充分溶解残留物, 0.22 μm 滤膜过滤后, 供

表2 MRM 扫描模式的参数

Tab.2 MRM parameters

待测物 analyte	母离子/m/z parent ion	子离子/m/z daughter ion	锥孔电压/V cone voltage	碰撞能量/eV collision energy
孔雀石绿 MG	329.10	208.00, 313.10*	65	36, 36
隐色孔雀石绿 LMG	331.10	239.10*, 315.90	50	34, 22
结晶紫 CV	372.10	340.10, 356.10*	75	50, 38
隐色结晶紫 LCV	374.16	238.30, 358.20*	55	32, 30
氘代孔雀石绿 D ₅ -MG	334.10	318.10*	65	40
氘代隐色孔雀石绿 D ₆ -LMG	337.16	322.10*	50	22

注: *. 定量离子

Note: *. quantitative ion

上机测试。

2 结果

2.1 LC-MS/MS 分析

采用电喷雾离子源, 正离子扫描模式, 分别对 MG、CV、LMG、LCV 和 D₅-MG、D₆-LMG 监测其母离子和 2 个信号较强的子离子, 以母离子和子离子组成监测离子对, 以多反应监测模式对待测物进行定性和定量分析。该法完全满足欧盟 2002/675/EC 指令规定对于禁用药物的质谱确证方法需要 4 个确证点 (IP) 的要求 (其中 1 个母离子 1 IP 和 2 个子离子 2 × 1.5 IP), 其中样品定量离子与定性离子的离子强度比不超过其标准系列相应的离子强度比均值的 ± 20% 作为定性确证的质量控制依据^[20]。

在上述测定条件下, 选择空白鱼肉加混合标准样品 (0.5 μg·kg⁻¹) 进行测定, 谱图见图 1。试验结果表明, MG、CV、LMG、LCV、D₅-MG 和 D₆-LMG 保留时间分别为 1.43、1.99、5.74、5.88、1.41 和 5.64 min。

2.2 标准曲线线性及检出限

用空白鱼肉样品作基质, 加入最终测定质量浓度为 0、0.2、0.5、1.0、5.0 和 10 ng·mL⁻¹ 的 MG、CV、LMG 和 LCV 混合标准溶液 (相当于样品中添加 0、0.4、1.0、10.0 和 20.0 μg·kg⁻¹ 的待测物), 加入 2 ng·mL⁻¹ 的 D₅-MG 和 D₆-LMG 内标混合标准溶液, 用 HPLC-MS/MS 进行测定。试验结果以标样质量浓度 (ng·mL⁻¹) 为横坐标, 以 MG 和 CV (LMG、LCV) 的标准峰面积与内标 D₅-MG (D₆-LMG) 的峰面积之比为纵坐标制作标准曲线, 线性回归方程和相关系数见表 3。以 10 倍

信噪比计算检出限, MG、CV、LMG 和 LCV 检出限均为 0.1 μg·kg⁻¹, 满足水产品出口检测要求。

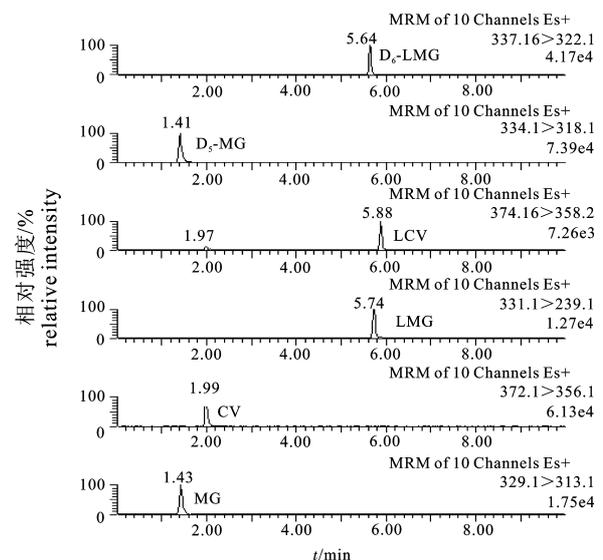


图1 空白鱼肉加混合标准样品定量离子色谱图

Fig.1 Quantitative ion chromatogram of blank samples fortified with mixed standards

表3 标准曲线线性回归方程及相关系数

Tab.3 Linear equations and correlation coefficients of standard curves

待测物 analyte	线性回归方程 linear equation	相关系数 correlation coefficient
孔雀石绿 MG	$Y = 0.7903X + 0.0209$	0.999 6
结晶紫 CV	$Y = 1.9924X + 0.1134$	0.996 0
隐色孔雀石绿 LMG	$Y = 1.0259X + 0.0939$	0.998 7
隐色结晶紫 LCV	$Y = 0.5141X - 0.0075$	0.999 7

2.3 回收率与精密度

对空白鱼肉样品在 0.5 和 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2 个水平上进行加标回收试验 (表 4)。试验结果表明, MG、CV、LMG 和 LCV 的回收率在 92.1% ~ 111.0% 之间, 测定结果的相对标准偏差为 2.2% ~ 9.5%。

表 4 样品加标回收率及精密度 ($n=4$)

Tab. 4 Recovery and RSD of fortified samples

待测物 analyte	加标量 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ fortification level	平均回 收率/% average recovery	精密度 /% RSD
孔雀石绿 MG	0.5	96.5	6.2
	1.0	101.0	6.1
结晶紫 CV	0.5	111.0	4.0
	1.0	109.1	2.6
隐色孔雀石绿 LMG	0.5	96.6	2.2
	1.0	97.9	9.5
隐色结晶紫 LCV	0.5	92.1	4.4
	1.0	98.4	2.2

3 讨论

3.1 方法选择及改进

目前, 国内同时检测 MG、CV 及其代谢物的标准方法有 GB/T 19857-2005 和 GB/T 20361-2006 和 SN/T 1768-2006 等, 但 GB/T 19857-2005 和 GB/T 20361-2006 存在检测方法繁琐, 特别是前处理操作步骤多、耗时较长、费用高及检测过程使用大量有毒试剂等缺点, 因此, 笔者采用 SN/T 1768-2006 快速检测方法进行水产品出口检测。然而, 由于待测物的不稳定性, 完全采用 SN/T 1768-2006 方法检测, 其 MG 和 CV 回收率偏低, 而 LMG 和 LCV 回收率偏高, 不能满足检测要求。该法在应用 SN/T 1768-2006 检测方法的基础上, 采用空白样品添加不同质量浓度标准溶液的方式绘制校准曲线, 以最大限度排除基体干扰。同时定量方法采用 D_5 -MG 和 D_6 -LMG 为内标进行内标法检测, 降低由于前处理过程中目标化合物的损失所带来的偏差, 从而提高定量的准确性, 加标回收率稳定、重现性好, 整个检测过程仅需 30 min 左右。

3.2 色谱条件的选择

研究采用了超高效液相色谱仪和 1.7 μm 填料的超高效液相色谱柱对样品进行分离, 与传统的高效液相色谱柱相比, 该法能更好地使待测物与抑制电离的基质分离, 降低基质对质谱检测的影响, 同时提高分离效率。对于电喷雾离子源正离子扫描模式, 流动相在弱酸性环境条件下加入适量乙酸铵可以提高待测物离子化效率, 因此, 试验中采用乙腈和 5 mmol 乙酸铵溶液 ($\text{pH}=4.5$) 作为流动相体系, 并且对流动相比例进行优化。结果显示, 当乙腈和乙酸铵溶液初始比例为 60 : 40 梯度洗脱条件下 (表 1), 待测物在 6 min 左右全部出峰, 并且灵敏度高、分离效果好, 满足检测要求。

3.3 样品溶液放置时间对检测结果的影响

由于 MG、CV 及其代谢物的不稳定性, 文章研究了样品溶液放置时间对检测结果的影响。研究比较了 4 种待测物平均添加水平为 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的鱼肉样品处理完后在 10 $^{\circ}\text{C}$ 下避光放置 0、30、60 min 及 6、12 h 检测对回收率的影响。结果显示, MG 和 CV 在研究时间内对放置时间影响较小, 而 LMG 和 LCV 回收率随着放置时间的延长而呈下降趋势。与样品处理好后及时上机相比, LMG 在放置 30、60 min 及 6、12 h 后检测的回收率分别下降了 13%、24%、30% 和 34%, 而 LCV 分别下降了 10%、19%、25% 和 30%; 因此, 为了保证检测数据准确可靠, 样品前处理时间不宜太长, 样品处理完后应及时上机检测, 可考虑对标准工作溶液和样品溶液进行穿插进样检测, 特别是检测隐色代谢物。同时为了保证检测数据准确可靠, 检测过程也应注意以下事项: 1) 整个检测过程要尽量避光, 防止待测物降解; 2) 标准储备液应在 -18°C 以下避光保存, 有效期 3 个月, 混合标准工作溶液应现配现用; 3) 待测样品应在 -18°C 以下避光保存, 尽量避免样品的反复解冻; 4) 检测过程避免交叉污染, 包括样品之间、样品与标准溶液之间等。

3.4 方法的验证

运用该法, 2009 年 6 月笔者参加了英国 FAPAS (食品分析领域全球第一的国际评价体系) 组织的鳗鱼中 MG、CV 质量分数的能力验证测试, MG、LMG、MG 总量、CV、LCV 和 CV 总量 6 项结果全部满意。结果表明, 该法能够满足美国 FDA 对水产品 MG、CV 及其代谢物残留量检测的

准确性和检出限的要求,且更加简单快速。

参考文献:

- [1] SRIVASTAVA S, SINHA R, ROY D. Toxicological effects of malachite green [J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 66 (3): 319-329.
- [2] BOSE B, MOTIWALE L, RAO K V K. DNA damage and G2/M arrest in Syrian hamster embryo cells during malachite green exposure are associated with elevated phosphorylation of ERK1 and JNK1 [J]. *Cancer Lett*, 2005, 230 (2): 260-270.
- [3] 刘军, 胡华军, 张明洲, 等. 渔药孔雀石绿的毒性、危害和检测现状 [J]. *浙江农业学报*, 2006, 18 (5): 397-340.
- [4] 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*, 2007, 37 (1): 27-32.
- [5] 卢迈新, 黄樟翰, 肖学铮, 等. 美洲鳗对几种药物的敏感性研究 [J]. *淡水渔业*, 2000, 30 (5): 28-29.
- [6] TURNIPSEED S B, ROYBAL J E, HURLBUT J A, et al. Gas chromatographic/mass spectrometric confirmation of leucomalachite green in catfish (*Ictalurus punctatus*) tissue [J]. *J AOAC Int*, 1995, 78 (4): 971-977.
- [7] RUSHING L G, HANSEN E B. Confirmation of malachite green, gentian violet and their leuco analogs in catfish and trout tissue by high-performance liquid chromatography utilizing electrochemistry with ultraviolet-visible diode array detection and fluorescence detection [J]. *J Chromatogr B*, 1997, 700 (1/2): 223-231.
- [8] ANDERSEN W C, TURNIPSEED S B, KARBIWNYK C M, et al. Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 637 (1/2): 279-289.
- [9] 杨贤庆, 孙满义, 李来好, 等. 水产品中孔雀石绿高效液相荧光检测法的改良研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29 (8): 526-529.
- [10] 张志刚, 施冰, 陈鹭平, 等. 液相色谱法同时测定水产品中孔雀石绿和结晶紫残留 [J]. *分析化学*, 2006, 34 (5): 663-667.
- [11] 吴仕辉, 朱新平, 郑光明, 等. 高效液相色谱法检测水产品中的孔雀石绿和结晶紫 [J]. *广东海洋大学学报*, 2009, 29 (1): 54-57.
- [12] DOWLING G, MULDER P P J, DUFFY C, et al. Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leuco-crystal violet in salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 586 (1/2): 411-419.
- [13] WU X, ZHANG G, WU Y, et al. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1172 (2): 121-126.
- [14] 张海琪, 何中央, 郑重莺, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中孔雀石绿的残留量 [J]. *南方水产*, 2007, 3 (6): 14-21.
- [15] 谢文, 丁慧瑛, 奚君阳, 等. 水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物残留量的检测 [J]. *色谱*, 2006, 24 (5): 529-530.
- [16] 张玉黔, 权伍英, 栾燕, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中孔雀石绿及其代谢产物隐性孔雀石绿的方法研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16 (7): 826-827.
- [17] 郭德华, 施冰, 杨惠琴, 等. GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [18] 郑斌, 赵红萍, 冷凯良, 等. 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.
- [19] 贾东芬, 张顺合, 张维, 等. SN/T 1768-2006 水产品中孔雀石绿和结晶紫及其代谢产物的快速测定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [20] Commission Decision (2002/675/EC) of 12 August (2002) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results [Z]. *O J Eur Comm L 221*, 2002: 8-36.