

固相萃取-液相色谱法测定水产品中孔雀石绿 结晶紫及其代谢产物

张林田 陈小雪 梁希扬 罗惠明 苏建晖 张胜举
(汕头出入境检验检疫局,广东汕头,515031)

摘要 [目的] 建立水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物隐性孔雀石绿、隐性结晶紫的高效液相色谱分析方法。[方法] 样品以乙酸钠-乙腈为提取剂,经二氯甲烷反提取、再经 SPE 柱净化、氰基柱分离和柱后衍生化、等度洗脱、HPLC-DAD 测定、外标法定量。[结果] 各标准曲线相关系数均 ≥ 0.999 , $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度水平加标回收率为 70.0%~87.7%,RSD 为 4.9%~8.1%,检测低限均为 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 。[结论] 本法简便、快速,具有良好的重现性和准确性。

关键词 液相色谱;SPE;水产品;孔雀石绿;结晶紫

DETERMINATION OF MALACHITE GREEN, GENTIAN VIOLET AND THEIR METABOLITES IN AQUATIC PRODUCTS BY SPE-HPLC

ZHANG Lintian, CHEN Xiaoxue, LIANG Xiyang, LUO Huiming, SU Jianhui, ZHANG Shengju
(Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou, Guangdong, 515031)

Abstract: A new SPE-HPLC method for the determination of the malachite green, gentian violet and their metabolites leucomalachite green, leucogentian violet in aquatic products. Residues in sample were extracted with an acetonitrile-sodium acetate buffer mixture, further purified with methylene chloride and was cleaned up on SPE column. The compounds were separated on an LC cyano column and a PbO_2 post-column for derivation, equal-gradient eluted, then determined by HPLC-DAD, quantified by external standard method. All the calibration curve's correlation coefficients were higher than 0.996 with the average recoveries of $2\mu\text{g}/\text{kg}$, $4\mu\text{g}/\text{kg}$, spiked recoveries of 70.0%~87.7%, RSD of 4.9%~8.1%, the limit of detection of all compounds was less than $2\mu\text{g}/\text{kg}$. The method is validated with respect to its simplicity, sensitivity with good repeatability and reproducibility.

Key words: HPLC, SPE, aquatic products, malachite green, gentian violet

清楚分辨,有的厂家生产的血平板溶血试验结果难以分辨不同类型的溶血,不适宜作 β 溶血试验。另外 β 溶血试验用的血平板一定要新鲜、厚薄适中,血平板太薄易造成溶血试验假阳性,血平板太厚易造成溶血试验假阴性。由于协同溶血试验技术难度较大,我们认为能熟练准确做好溶血试验,可不作协同溶血试验。

4.3 小白鼠毒力试验

毒力试验用清洁级体重 16~20g 的健康小白鼠即可,注射菌液时操作要熟练防止对小白鼠的损伤,接种后短时间内死亡的小白鼠不能作为试验结果。单增李斯特菌和绵羊李斯特菌接种小白鼠后,多数小白鼠 24h 后出现明显发病症状,并于 48h~96h 之间死亡,少数小白鼠有发病症状但能耐过而存活,英

诺克李斯特菌和空白对照试验的小白鼠都不发病。各试验组要有隔离设施,防止交叉污染造成的小白鼠感染影响结果的准确性。试验应连续观察 7 天,每天至少观察 4 次,并把每次观察结果详细记录。鉴定菌株与对照标准菌株试验结果是否一致是判定的主要依据之一,因此准确的小白鼠毒力试验结果,对鉴别单增李斯特菌和英诺克李斯特菌甚为重要。

参考文献

- [1] 李小春,等.速冻食品中李斯特菌检测方法探讨与结果分析.中国卫生检验杂志,2004,14(1):88-89
- [2] 唐珊熙,等.微生物学及微生物学检验.北京:人民卫生出版社.2000年,第一版.244~245

1 前言

孔雀石绿、结晶紫属染料类杀菌剂,可用于防治鱼类的水霉病、烂鳃病以及寄生虫病等,也被一些不法商贩用来对运输车厢或鱼池进行消毒。由于其化学官能团三苯甲烷又是一种致癌物质,我国已将其列为禁用药物。近年来,日本等国家加大了对我国出口鱼类产品中孔雀石绿特别是隐性孔雀石绿的检验力度,给我国的水产品出口带来困难。目前其测定方法有 GB/T19857-2005、SN/T1479-2004 和 SC/T3021-2004,本方法以这3个标准为基础,结合实际,加以适当优化,建立了高效液相色谱的快速筛选方法,同时探讨测定过程中应注意的一些问题。

2 实验条件与方法

2.1 主要仪器与试剂

2.1.1 仪器设备

安捷伦 HP1100 液相色谱仪配二极管阵列检测器。

2.1.2 试剂

25% PbO_2 衍生柱;Varian 丙磺酸(PRS)小柱;中性氧化铝小柱;酸性氧化铝(80~100目)。乙酸钠缓冲液:4.95g 无水乙酸钠及 0.95g 一水对甲苯磺酸溶于 1L 水中,冰乙酸调 pH 到 4.5。乙酸铵溶液:3.85g 乙酸铵溶解在 1L 水中,用冰乙酸调 pH 到 4.5。20%盐酸羟胺水溶液;0.2%盐酸羟胺甲醇溶液;1.0mol/L 一水对甲苯磺酸。MG、CV、LMG、LCV 标准溶液:取标准品

用乙腈配成 1mg/mL 的标准储备液,临用时用流动相配成标准上机液。

2.2 样品前处理

2.2.1 提取

称取 5.00g 样品于 50mL 离心管内,加入 1.5mL 20%盐酸羟胺溶液、2.5mL 1.0mol/L 一水对甲苯磺酸溶液、5.0mL 乙酸钠缓冲溶液,高速均质 30s,加入 12mL 乙腈和 10g 酸性氧化铝,剧烈震摇 30s 后以 5000r/min 的速度离心 5min,把上清液转移至装有 10mL 水和 2mL 二甘醇的 50mL 离心管中。再用 12mL 乙腈提取一次,合并清液后加入 10mL 二氯甲烷,振摇 30s 后以 4000r/min 的速度离心 5min。将二氯甲烷层转移至蒸发瓶中,再用 15mL 二氯甲烷萃取一次,合并二氯甲烷。于 45℃ 旋转蒸干至约 1mL,用 2.5mL 乙腈溶解残渣。

2.2.2 净化

将中性氧化铝小柱及 PRS 小柱从上到下安装在固相萃取装置上,用 5mL 乙腈分两次活化小柱,再把蒸发瓶中的溶液过柱,用 2.5mL 乙腈洗涤蒸发瓶并过柱,不收集。弃中性氧化铝小柱,用 2mL 流动相洗涤蒸发瓶后洗脱 PRS 小柱,再用 1mL 盐酸羟胺甲醇溶液洗脱,收集上述洗脱液,用流动相定至 3.00mL,过 0.45 μ m 滤膜,滤液上机测定。

2.3 液相色谱条件

色谱柱:Kromasil CN 柱(250x4.6mm,粒度 10 μ m),

表 1 MG、CV 及其代谢产物回收率及重复性试验测定结果(μ g/kg)(n=8)

次数	添加值							
	孔雀石绿		隐性孔雀石绿		结晶紫		隐性结晶紫	
	2 μ g/kg	4 μ g/kg						
1	1.56	3.64	1.46	3.47	1.31	3.55	1.61	3.44
2	1.64	3.58	1.54	3.55	1.44	3.42	1.32	3.52
3	1.47	3.29	1.28	3.62	1.50	3.31	1.38	3.66
4	1.42	3.18	1.34	3.40	1.33	3.42	1.30	3.24
5	1.63	3.62	1.30	3.22	1.42	3.29	1.40	3.18
6	1.55	3.36	1.44	3.34	1.49	3.57	1.38	3.23
7	1.40	3.34	1.40	3.11	1.54	3.62	1.48	3.46
8	1.46	3.48	1.52	3.68	1.68	3.88	1.32	3.19
平均值	1.52	3.44	1.41	3.42	1.46	3.51	1.40	3.37
平均回收率(%)	76.0	86.0	70.5	85.5	73.0	87.7	70.0	84.2
相对标准偏差(%)	6.1	4.9	6.9	5.7	8.1	5.5	7.4	5.3

后接已用甲醇活化的 25% PbO_2 衍生柱;

流动相 1:乙腈:乙酸钠缓冲液=60:40;

流动相 2:乙腈:乙酸铵溶液=41:59;

流速:1.5mL/min;柱温:25℃;进样量:100 μL 。

检测波长:MG 及 LMG 为 618nm;CV 及 LCV 为 588nm。

2.4 上机测定

3 结果

3.1 流动相 1 的条件下各组分的保留时间

隐性孔雀石绿 (LMG) 和隐性结晶紫 (LCV) 6.30min, 孔雀石绿 (MG) 10.36min, 结晶紫 (CV) 12.57min。

3.2 流动相 2 的条件下各组分的保留时间

MG 23.68min, LCV 30.24min, LMG 32.38min, CV 37.62min。

3.3 测定低限

以 3 倍信噪比计算,得出测定低限均为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.4 准确性及重复性试验

取空白鳗鱼样品,以 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 进行添加,在不同的时间测定 8 次,试验数据见表 1。各成分的回收率在 70.0%~80.0%之间,RSD 为 4.9%~8.1%。

3.5 标准曲线

混标浓度分别为 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{L}$, 仪器对各点分别重复测定 2 次,取平均值,以浓度对应峰面积建立校正表得到校正曲线,各曲线相关系数均大于 0.999。

4 讨论

4.1 样品提取条件的选择

在样品前处理时酸性氧化铝的作用主要是脱脂,其目数及加入的量会影响回收率,经反复验证,对不同的样品可区别对待,高油脂含量的水产品如鳗鱼,可多加些,低油脂含量的样品如虾,则少加些,一般为 5~10g,这样能确保脱脂效果,过净化柱时比较容易。酸性氧化铝如目数较大或颗粒不均,则在反提取时易造成乳化现象,即凝胶。如出现凝胶,可加入适量无水硫酸钠,此时可能造成二氯甲烷层的密度改变。经对比,目数 80~100 最好,100~200 也可使用,而 200~300 则脱脂效果不好。

4.2 净化条件的选择

在二氯甲烷反萃取时加入一定量的水是为了去

除水溶性杂质,对于油脂含量较高的水产品,靠液液萃取这一净化步骤不够,故加入 5~10g 酸性氧化铝来减少油脂的溶出,再用中性氧化铝小柱来净化浓缩液,通过 2 次氧化铝来去除油脂,同时选择富集效果较好的丙磺酸小柱以除去干扰物质,这样即使一些基体较复杂的样品如烤鳗,经过处理,背景干扰少,对色谱柱也有较好的保护作用。但选用哪一种净化柱,必须掌握其淋洗、洗脱液的用量及过柱速度等条件。经反复验证,使用上述 SPE 柱,2mL 流动相及 1mL 0.2% 盐酸羟胺甲醇溶液能完全洗脱待测组分,回收率较高重复性也好。

4.3 液相色谱条件的选择

流动相选择上,采用流动相 1,LMG 同 LCV 的保留时间几乎一样。为了达到 4 种组分分离的目的,通过改变两者的比例,当乙腈:乙酸铵溶液=41:59,4 种组分能达到完全分离。同时又对比了乙酸铵及乙酸钠这 2 种缓冲盐,发现用乙酸铵作流动相时各组分的峰形尖而锐。虽然 4 种组分达到了分离的效果,但一个样品的分析时间却较长,于是就设计了两种流动相,先用流动相 1 筛选阴性样品;如果 LMG 或 LCV 处出峰,为了鉴别是 LMG 或是 LCV,则用流动相 2,这样既可缩短分析时间又能互相验证结果。

4.4 本法优点

相对于 GB/T19857-2005 的优点是等度洗脱,基线稳定,只需单元泵,同时样品前处理也较为简单、能快速筛选阴性样品;GB/T19857-2005 是采用梯度洗脱,容易造成基线飘移,需要稳定和平衡的时间也长,也易导致保留时间的重现性差,而且至少要求双元泵,须两次蒸干。SN/T1479-2004 及 SC/T 3021-2004 只能检测孔雀石绿而不能检测结晶紫。

4.5 实际应用结果

运用本法对进出口及普查的 1248 批次的水产品进行检测,检出隐性孔雀石绿阳性样品 22 批次,其中阳性样品以淡水鱼中金鲟鱼、黑鲟鱼、美国红鱼、鳗鱼等居多,而鱿鱼、虾、贝类、牛蛙、蟹类、牡蛎等产品则尚未发现,阳性样品经 HPLC-MS-MS 确证均为阳性,且检测结果无显著性差异。运用本法参加国家认监委组织的鳗鱼样品中孔雀石绿残留检测能力验证(CN-CA-05-09),检测结果为 9.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,Z 值为 0.00。说明该法准确、可靠。