



LC-5500 高效液相色谱仪测定水产品中孔雀石绿

前言

孔雀石绿（MG）为三苯甲烷类工业染料，在水产养殖上可以有效的预防与治疗各类水产动物的水霉病、鳃霉病和小虫病。并常用于鱼苗的消毒。但一些水产品贩运商为保持水产品新鲜度普遍用 MG 消毒车厢和活鱼池；酒店为了延长鱼的存活时间也在鱼池中投放 MG 进行消毒。使用 MG 消毒后的鱼即使死亡后颜色也较为鲜亮，消费者很难从外表进行辨认。MG 在水生生物体中的主要代谢产物为无色孔雀石绿（LMG）。MG 具有毒性强、高残留和致畸、致癌、致突变等副作用。LMG 由于不溶于水，其残留毒性比 MG 更强。所以，目前世界上诸如美国、日本、加拿大和欧盟等许多国家已将 MG 列为水产养殖禁用药物，我国也于 2002 年 5 月将其列入“食品动物禁用的兽药及其化合物清单”（1）。虽然 MG 已被列为水产养殖禁用药物，但因为其价格低廉，同时目前在水霉病防治上尚无其它有效药品，因此仍有一些水产养殖户在普遍使用。

各类水产品中 MG 和 LMG 的检测是我国食品卫生学面临的新课题。为此，我国农业部 2004 年颁布了水产品中 MG 残留量测定的行业标准检验法 - 液相色谱法（SC/T3021-2004）（2）；国家质量监督检验检疫总局和国家标准化委员会于 2005 年亦发布了“液相色谱 - 串联质谱法”和“高效液相色谱法”（（GB/T19857-2005）（3）的标准检验法。Chang-Jun Cha 等报道了（2001）采用氰基柱的反相高效液相色谱法和液质联机检测 MG（4）。

在上述分析方法中，SC/T3021-2004 采用 C18 柱，等梯度洗脱方式，但需要较大流速（2ml/min）；而 GB/T19857-2005 法采用 C18 柱，梯度洗脱方式。文献（4）采用氰基柱分离的梯度洗脱方式。我们在研究这些分析方法的基础上，采用氰基柱分离、流速为 1.0ml/min 的等梯度洗脱方式，具有保留时间短、分离效果好、分析速度快、节省试剂；最低检测浓度无 LMG 为 0.02 μg/mL，MG 为 0.05 μg/mL。精密度高；特别是线性范围达 0.1 μg/mL ~ 160.0 μg/mL，远远大于 SC/T3021-2004 线性范围（MG 0.01 μg/mL ~ 0.4 μg/mL；LMG 0.02 μg/mL ~ 0.40 μg/mL）。而且，等梯度洗脱方式又扩大了液相色谱的应用范围。现将结果报告如下：

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试剂

- 乙睛 色谱纯，fisher；
- 乙酸铵，hplc 纯，DIKMA；
- 孔雀石绿（MG）sigma 试剂；
- 无色孔雀石绿（LMG）sigma 试剂。

0.125mol/L 乙酸铵溶液 称取乙酸铵 9.64 g ，用纯水溶解并定容至 1000mL 。用 0.45 μm 滤膜过滤。

MG 标准储备液 准确称取孔雀石绿 0.100 0g ，用乙腈溶解并定容至 100 mL 。该标准溶液浓度为 1mg/mL 。避光、冰箱冷冻层保存。

MG 标准应用液 吸取 1mg/mL 孔雀石绿标准储备液用乙腈稀释至 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

LMG 标准储备液 准确称取孔雀石绿 0.100 0g ，用乙腈溶解并定容至 100mL 。该标准溶液浓度为 1mg/mL 。

LMG 标准应用液 吸取 1mg/mL 无色孔雀石绿标准储备液用乙腈稀释至 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

MG 和 LMG 标准混合溶液 分别吸取 MG 和 LMG 标准储备液，用乙腈稀释成不同浓度的标准混合溶液。

1.1.2 仪器

LC5500 高效液相色谱仪（北京东西电子技术研究所）。具 UV-VIS 、在线脱气机、高压泵、柱恒温箱、色谱工作站。

1.2 步骤

1.2.1 色谱条件

检测器 紫外 - 可见光检测器，波长 618nm ；

色谱柱 氰基柱， 4.6mm \times 250mm ， 5 μm ；

流动相 乙腈 -0.125mol/L 乙酸铵（ pH4.5 ） = （ 47+53 ）；

柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ；

进样量 20 μL 。

1.2.2 测定步骤

吸取 MG 和 LMG 标准混合溶液（ 5.0 $\mu\text{g/mL}$ ）注入色谱仪，在上述色谱条件下，绘制色谱图。见图 1 。

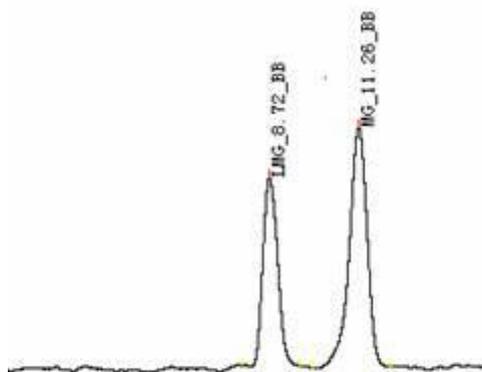


图 1. 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 孔雀石绿和无色孔雀石绿标准混合溶液色谱图

2. 结果与讨论

2.1 流动相的选择

MG 和 LMG 的 HPLC 法分离, 无论是 C18 柱还是氰基柱, 多采用 乙睛和乙酸铵作流动相的反相体系 (1 ~ 4)。其中乙酸铵浓度对 MG 和 LMG 的分离有很大影响。对于梯度洗脱方式多采用 50mmol/L 乙酸铵溶液 (2 、 3) , 而等梯度洗脱方式乙酸铵溶液浓度较大 (0.125mol/L) (1) 。

2.2 流动相溶剂比例的影响

在上述色谱条件下, 用 1.0 $\mu\text{g/mL}$ MG 和 LMG 标准混合溶液在不同比例 (V/V) 乙睛 -0.125mol/L 乙酸铵溶液中观察分离效果, 结果表明, 在乙睛 - 乙酸铵溶液(pH4.5) =47+53 时分离效果好, 灵敏度最高, 所以选择该溶剂比为流动相为。见表 1 。

表 1 流动相溶剂比例对 LMG/MG 分离的影响

ACN/0.125 mol/L 乙酸铵	LMG		MG		ΔTR (min)	
	(V/V)	TR (min)	A	TR (min)		A
40/60		10.56	65364	15.06	94433	7.1
45/55		9.06	66962	13.14	111812	4.1
47/53		8.70	67011	11.21	115076	2.5
50/50		7.25	56335	8.51	99594	1.3
55/45		6.62	—	7.08	—	0.4

2.3 最低检测浓度

在上述色谱条件下, 以 3S/N 的响应信号为最低检测浓度, LMG 的最低检测浓度为 0.02 $\mu\text{g/mL}$, MG 的最低检测浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。均能满足试验要求。见图 2 。由图可见, 以取样量 10.0g 计, 最低检测浓度 LMG 为 2 $\mu\text{g/kg}$, MG 为 5 $\mu\text{g/kg}$ 。

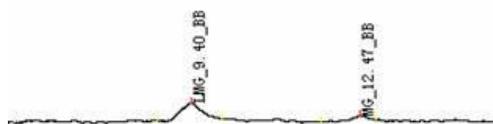


图 2 LMG 和 MG 最低检测浓度

2.4 线性范围试验

在上述色谱条件下， LMG 和 MG 线性关系均良好。 LMG 和 MG 线性范围为 $2 \mu\text{g/mL} \sim 160.0 \mu\text{g/mL}$ ， $r > 0.999$ 。其中 LMG 和 MG 在 $0.2 \mu\text{g/mL} \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$ 范围的校正曲线见图 3； $1.0 \mu\text{g/mL} \sim 160.0 \mu\text{g/mL}$ 范围的校正曲线见图 4。

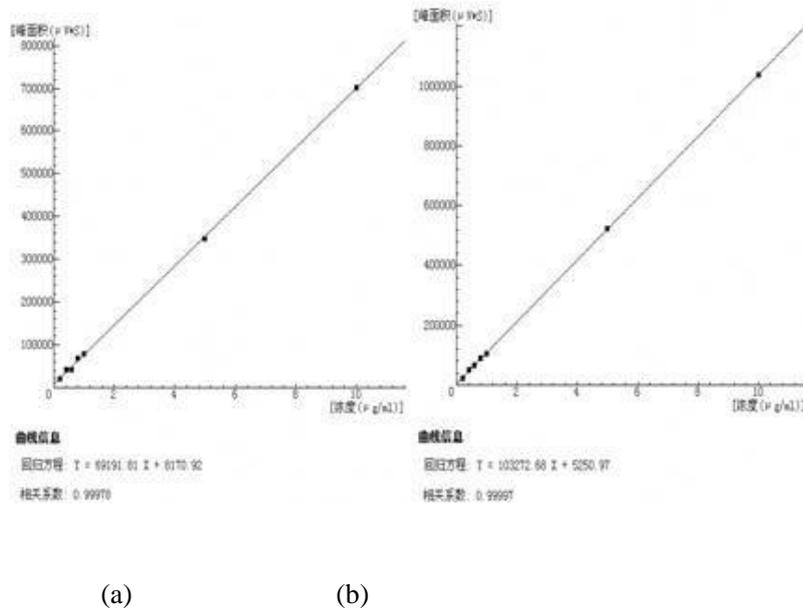


图 3 LMG (a) 和 MG (b) 校正曲线 1 ($0.2 \mu\text{g/mL} \sim 10.0 \mu\text{g/mL}$)

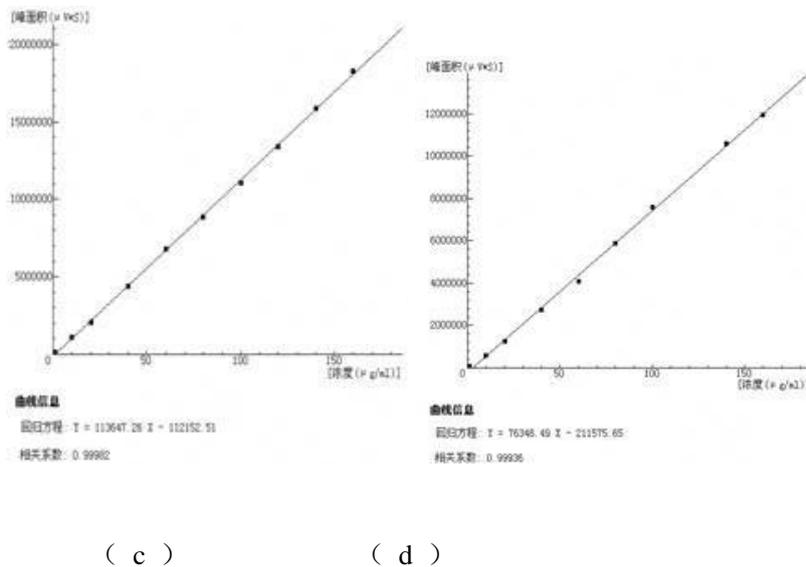


图 4 LMG (c) 和 MG (d) 校正曲线 2 ($1.0 \mu\text{g/mL} \sim 160.0 \mu\text{g/mL}$)

2.5 精密度试验



在上述色谱条件下，分别用 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 10.0 $\mu\text{g/mL}$ LMG/MG 混合标准溶液进行平行性测定。保留时间相对标准偏差 (RSD) 一般小于 0.4%，峰面积相对标准偏差小于 5%。见表 2。

表 2 不同浓度 LMG/MG 混合标准溶液测定精密度试验

LMG/MG $\mu\text{g/mL}$	LMG		MG		
	TR	A	TR	A	
1.0	9.13	94326	11.84	121590	
	9.11	91624	11.82	124395	
	9.15	86984	11.82	126714	
	9.10	94254	11.77	115168	
	9.07	90030	11.73	115915	
	9.12	88426	11.75	118041	
	X	9.11	90940	11.78	120303
S	0.02730	3023.7	0.04450	4695.3	
RSD (%)	0.3	3.3	0.4	3.9	
5.0	9.01	346190	11.75	586155	
	8.91	334347	11.60	554314	
	8.89	350486	11.57	566958	
	9.07	337691	11.78	586993	
	9.06	333978	11.80	569882	
	9.01	328756	11.66	577275	
	X	8.99	338575	11.69	573596
S	0.07196	8198.3	0.09709	12493.2	
RSD (%)	0.8	2.4	0.8	2.2	
10.0	8.97	653769	11.63	1117447	
	9.03	689863	11.70	1147167	
	9.04	693111	11.71	1140571	
	9.00	681749	11.65	1264160	
	9.01	678101	11.67	1123467	
	X	9.01	679318.6	11.68	1158562
	S	0.0270	15504.7	0.02750	60263
RSD(%)	0.3	2.3	0.2	5.0	

3 样品测定

3.1 样品处理

3.2 样品测定

3.2.1 校正曲线的绘制



3.2.2 样品测定

3.3 加标回收率测定

4 结论

LMG 和 MG 毒性强、具有很高的三致作用，其对水产品的人为污染应受到严重关切。

LC5500 高效液相色谱仪测定水产品中 LMG 和 MG ，具有方法简便、分离效果好、分析速度快、节省试剂、精密度高、灵敏准确、线性范围宽等优点，适用于水产品中 LMG 和 MG 含量检测。

参考文献

1. 中国农业信息网 .htm 2005-11-02 ，农业部。
2. 中华人民共和国农业行业标准 . 水产品中孔雀石绿残留量的测定——液相色谱法（ SC/T3021-2004 ）。
3. 中华人民共和国国家标准 . 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定，GB/T19857-2004 。
4. Chang-Jun Cha ， Daniel R ， Doerge ， and Carl E. Cerniglia. Biotransformation of Malachite green by the Fungus *Cunninghamella elegans* ， Applied and Environmental Microbiology ， September 2001 ， p.4358-4360 ， Vol.67 ， No.9 。