



# 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管理委员会于 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  $\mu\text{g/mL}$ ，MG 为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ 。精密度高；特别是线性范围达 0.1  $\mu\text{g/mL}$   $\sim$  160.0  $\mu\text{g/mL}$ ，远远大于 SC/T3021-2004 线性范围（MG 0.01  $\mu\text{g/mL}$   $\sim$  0.4  $\mu\text{g/mL}$ ；LMG 0.02  $\mu\text{g/mL}$   $\sim$  0.40  $\mu\text{g/mL}$ ）。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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ ；

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  $\mu\text{L}$ 。

### 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。

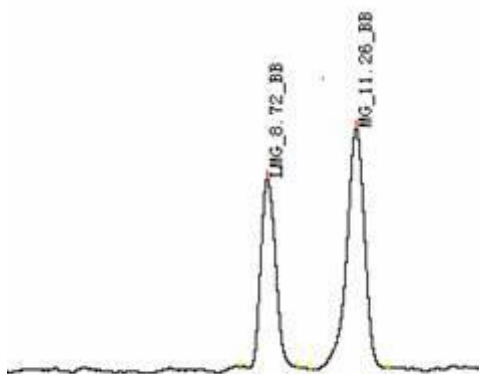


图 1. 5.0  $\mu\text{g/mL}$  孔雀石绿和无色孔雀石绿标准混合溶液色谱图

## 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 乙腈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）乙腈 - 0.125mol/L 乙酸铵溶液中观察分离效果，结果表明，在乙腈 - 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		
(V/V)	TR (min)	A	TR (min)	A	$\Delta\text{TR}$ (min)
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  $2\text{ }\mu\text{g/mL} \sim 160.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ ， $r > 0.999$ 。其中 LMG 和 MG 在  $0.2\text{ }\mu\text{g/mL} \sim 10.0\text{ }\mu\text{g/mL}$  范围的校正曲线见图 3； $1.0\text{ }\mu\text{g/mL} \sim 160.0\text{ }\mu\text{g/mL}$  范围的校正曲线见图 4。

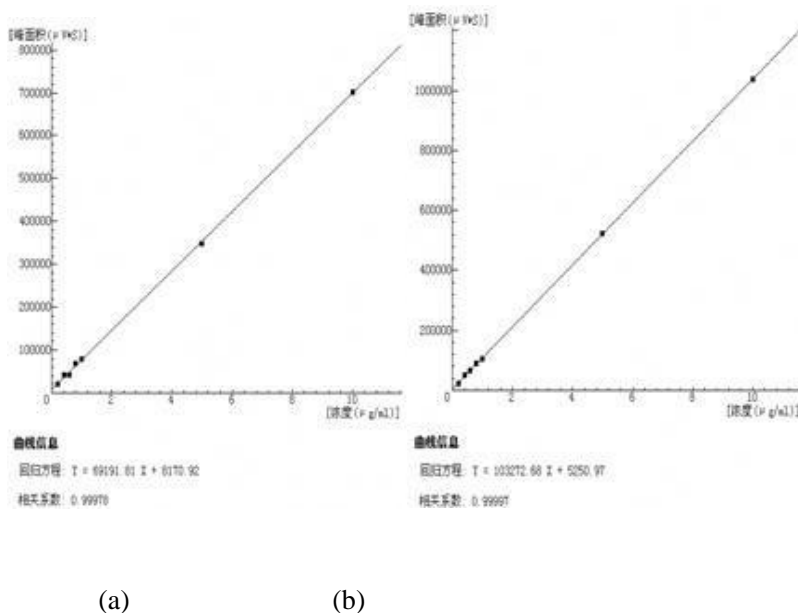


图 3 LMG (a) 和 MG (b) 校正曲线 1 ( $0.2\text{ }\mu\text{g/mL} \sim 10.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ )

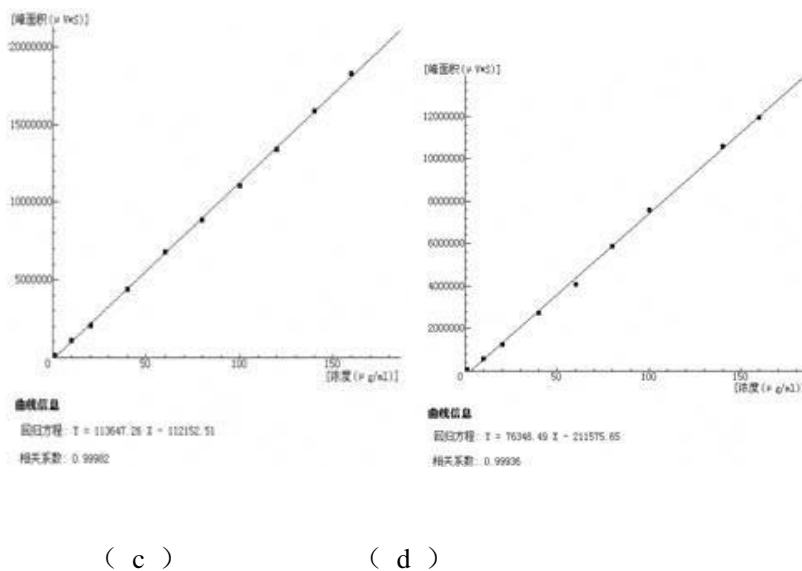


图 4 LMG (c) 和 MG (d) 校正曲线 2 ( $1.0\text{ }\mu\text{g/mL} \sim 160.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ )

## 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	LMG		MG	
$\mu\text{g/mL}$	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。