

文章编号:2095-0411(2015)01-0071-05

在线净化/LC-MS-MS 测定淡水鱼中孔雀石绿及 隐性孔雀石绿^{*}

堵燕钰,罗漪涟,吴冬梅,王博超,王洁琼
(常州市农畜水产品质量监督检验测试中心,江苏 常州 213002)

摘要:研究了一种在线净化/LC-MS-MS 联用技术测定淡水鱼中孔雀石绿(MG)及隐性孔雀石绿(LMG)残留的方法。样品加内标,经乙腈涡旋提取、离心,提取液经在线净化柱(Cyclone P)净化,以 10mmol/L 乙酸铵-乙腈溶液将目标物洗脱至 C18 柱上,用 LC-MS-MS 检测。方法在 0.1~10 μ g/kg 质量浓度范围内有良好的线性关系,MG、LMG 的检出限为:0.1 μ g/kg,3 个浓度加标回收率为 84.5%~99.6%,相对标准偏差为 2.7%~5.3%。该方法前处理简便快速、试剂用量少、回收率高、灵敏度和重现性好,适用于水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量分析。

关键词:在线净化;LC-MS-MS;孔雀石绿;测定

中图分类号:O 657.6

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2015.01.014

Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Freshwater Fish by Online Purification and LC-MS-MS

DU Yan-yu, LUO Yi-lian, WU Dong-mei, WANG Bo-chao, WANG Jie-qiong

(Agriculture Beast and Fishing Product Quality Supervision Inspection and Test Center of Changzhou,
Changzhou 213002, China)

Abstract: A method was established for determination of malachite green(MG) and leucomalachite green(LMG) residues in freshwater fish by online purification and LC-MS-MS technology. The samples were vortex extracted and centrifuged with acetonitrile after adding internal standard. The extract was purified by online column(Cyclone P), and then the target compound was eluted to C18 column with 10mmol/L ammonium acetate-acetonitrile solution for further detection by LC-MS-MS. The method has a good linearity concentration range from 0.1 to 10 μ g/kg, and the detection limit of MG/LMG is 0.1 μ g/kg. The recoveries are 84.5%—99.6% by adding 3 levels of internal standard and the relative standard deviation values are 2.7%—5.3%. The method is simple and rapid, reagent-saving and with high recoveries, sensitivity and good reproducibility, therefore it is suitable for malachite green(MG) and leucomalachite green(LMG) residues analysis.

Key words: online purification; LC-MS-MS; malachite green; determination

孔雀石绿(malachite green, MG)属于碱性三苯 甲烷类染料,可以用作羊毛、丝绸、皮革等的染色;同

^{*} 收稿日期:2014-10-23。

作者简介:堵燕钰(1982—),女,江苏常州人,农艺师,主要从事农畜水产品质量安全检测方面研究。

时作为杀菌剂可以控制鱼类或鱼卵的寄生虫、真菌和细菌感染,在水产养殖上用来预防和治疗水产动物的鳃霉病、水霉病和水体环境消毒。但是 MG 在水产动物体内很快代谢成毒性更强、残留时间更长的隐性孔雀石绿(leucomalachite green, LMG),且两者都具有致癌、致畸、致突变等副作用^[1-3]。目前欧美及日本等许多国家都禁止在水产养殖中使用孔雀石绿,我国在农业行业标准《NY5071-2002 无公害食品鱼药使用准则》中也将孔雀石绿列为禁用药物,但由于其价格低廉、效果显著,且尚无更好的替代品,所以在水产养殖中的使用屡禁不止。

目前国内外孔雀石绿及其代谢产物隐性孔雀石绿的残留检测主要有高效液相色谱法(HPLC)^[4-5]、高效液相色谱-质谱法(LC-MS)^[6]、高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS-MS)^[7-10]等。HPLC 方法前处理步骤复杂,LC-MS 方法需要进行柱后衍生处理,且鱼肉样品基质复杂,容易产生基质效应。Turboflow 在线净化技术是针对质谱分析的高级在线复杂基质样品萃取技术,结合了扩散、化学和体积排除的原理,在捕获目标化合物的同时能够快速净化样品^[11-15]。本研究采用 Turboflow 在线净化技术与 LC-MS-MS 联用技术检测水产品中孔雀石绿及隐性孔雀石绿的残留。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

孔雀石绿、隐性孔雀石绿标准品(纯度大于 98.0%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);孔雀石绿内标

(MG-D5)、隐性孔雀石绿内标(LMG-D6)(德国 WITEGA 公司);乙腈、甲醇、乙酸、乙酸铵(HPLC 级);实验用水为 milli-Q 超纯水。

TSQ Quantum Ultra 质谱仪,Turboflow 在线样品前处理设备(美国 ThermoFisher 公司);5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);电子分析天平(德国 Sartorius 公司);涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

从市场购买不同种类的淡水鱼,剖杀后去头、骨、内脏,取肌肉部分切块、绞碎,混合均匀,-18℃ 冷冻保存,待测。准确称取 5.0g 制备好的样品,置于 50mL 离心管中,添加 100μL 混合内标工作液,涡旋 1min,再加入 10mL 乙腈,继续涡旋混匀 1min,5 000r/min 离心 10min,取上清液过 0.22μm 滤膜,上机测定。

1.2.2 Turboflow 条件

Aria OS 在线进化柱:Cyclone-P (0.5mm×50mm);上样溶剂(A):10mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.02%乙酸);洗脱溶剂(B):乙腈;清洗溶剂(C):V(异丙醇):V(乙腈):V(丙酮)=4:4:2;洗脱流速:0.1mL/min;进样体积:50μL。

1.2.3 HPLC 条件

色谱柱:Hypersil GOLD (50mm×2.0mm, 1.9μm),流动相 A 相:10mmol/L 乙酸铵+0.02% 乙酸溶液,流动相 B 相:乙腈。在线净化程序见表 1。

表 1 Turboflow 在线净化和梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution ptocedure of Turboflow on-line cleanup

步骤	时间/s	上样泵						洗脱泵			
		目的	流速/(mL/min)	比例/%			目的	转变模式	流速/(mL/min)	比例/%	
				A	B	C				A	B
1	60	上样	0.2	100	—	—	条件化	Step	0.5	95	5
2	90	转移	0.1	50	50	—	洗脱	Step	0.4	95	5
3	120	淋洗	2.0	—	—	100	洗脱	Ramp	0.5	75	25
4	120	淋洗	2.0	—	—	100	洗脱	Ramp	0.5	10	90
5	30	淋洗	2.0	—	100	—	洗脱	Step	0.5	10	90
6	90	充满洗脱环	2.0	50	50	—	洗脱	Step	0.5	10	90
7	90	条件化	2.0	100	—	—	条件化	Step	0.5	95	5

1.2.4 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式,多反应监测(MRM),电喷雾电压:3 500V,离子源温度:

400℃,鞘气压力:40psi,辅助气压力:15psi,源内诱导解离电压:10V,毛细管温度:350℃,Q1,Q3 单位分辨率:0.7,SRM 优化参数见表 2。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

用蠕动注射泵注射 1.0 μ g/mL 混标溶液,流速 5 μ L/min,调节喷雾电压、鞘气、辅助气等质谱条件,在正离子扫描模式下分别进行一级全扫描,获得各化合物准分子离子峰,以其作为母离子进行二级质谱扫描,选取响应信号较强的两个特征碎片离子,与母离子组成多反应监测离子对,并优化子离子碰撞能量。

表 2 质谱参数
Table 2 MS parameters

化合物	质荷比	碰撞能量/(E/eV)	透镜电压/V
MG	329.1/208.1	30	95
	329.1/313.2 ¹⁾	23	
LMG	331.1/239.0 ¹⁾	12	86
	331.1/316.0	5	
MG-D5	334.2/213.2	33	99
	334.2/318.2 ¹⁾	29	
LMG-D6	337.1/240.1 ¹⁾	40	106
	337.1/322.2	4	

注:1)为定量离子。

2.2 TurboFlow 净化条件的优化

TurboFlow 技术通过扩散溶解、尺寸排阻、柱层析技术将蛋白等一些大分子物质滤掉,将小分子保留。TurboFlow 在线净化过程主要包括上样、洗脱转移和淋洗条件化。上样是在流动相推动下,样液中的目标化合物被在线净化柱吸附,而大分子杂质流出净化柱而进入废液,实验选用反相混合基质的 Cyclone-P 柱,10mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液为上样溶液,使实验 4 种化合物均能有效保留,且在洗脱转移时能被完全洗脱。洗脱转移是将洗脱环中的洗脱液将在线净化柱上吸附的目标化合物洗脱下来进入分析柱,方法验证了 10mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液与乙腈不同比例来洗脱分析物,发现 V(10mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液):V(乙腈)=50:50,既保证化合物洗脱效率,又能达到不错的峰型和分离度。淋洗条件化是目标化合物在分析柱分离和质谱检测过程中,由洗脱能力较强的溶剂通过上样泵对在线净化柱进行淋洗,选择 V(异丙醇):V(乙腈):V(丙酮)=4:4:2,作为强洗脱溶剂淋洗 Cyclone-P 柱。洗脱溶液充满洗脱环,为下个样品分析做准备,用上样溶液初始化平衡在线

净化柱。

2.3 HPLC 条件的优化

HPLC 条件主要是洗脱泵的流路组成和配比,在线净化柱流出的目标化合物由 TurboFlow 洗脱液和 HPLC 流动相带入液相分析柱,进行分离检测,TurboFlow 洗脱液和 HPLC 流动相的初始比例对目标化合物的峰型和分离影响较大,洗脱液为 V(10mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液):V(乙腈)=50:50,为了减小有机溶剂效应,实验的 Step2 转移洗脱采用低 TurboFlow 流速(0.1mL/min)和高 HPLC 流速(0.4mL/min),HPLC 流动相起始比例为 95%A,进一步稀释了进入液相柱的 TurboFlow 洗脱液有机相乙腈。HPLC 流动相选择上,考察了 0.1%甲酸溶液、0.5%甲酸溶液、5mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液、10mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液为水相(A),乙腈或甲醇为有机相(B)。结果表明加甲酸的流动相导致 MG 和 LMG 峰出现拖尾现象,加 5mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液和 10mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液的流动相, MG、LMG 峰型较好,且响应无明显差异。为了简化实验程序,采用 10mmol/L 乙酸铵+0.02%乙酸溶液,与 TurboFlow 上样溶剂一致。有机相使用乙腈使得化合物分离效果较好。

2.4 标准曲线线性和方法检出限

用 5.0g 空白鲤鱼样品做基质,分别加入 100ng/mL MG 和 LMG 混标溶液 0、20、50、100、200 μ L 和 500 μ L;加入 100ng/mL MG-D5 和 LMG-D6 混标溶液 100 μ L 前处理上机测定,以浓度为横坐标, MG 和 LMG 与其内标峰面积比值为纵坐标绘制标准曲线,在 0~5ng/mL 质量浓度范围内 MG、LMG 均呈良好的线性。MG:Y=0.078 7X-0.008 4(R²=0.999 6), LMG:Y=0.542 3X+0.043 1(R²=0.999 9)。以目标物在空白样品中 3 倍信噪比计算检出限:MG 和 LMG 均为 0.1 μ g/kg。MG 和 LMG 空白样品及添加样品的质谱多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)图见图 1、图 2。图 1 中 MG 和 LMG 均未出现明显的峰,加入的内标 MG-D5、LMG-D6 均有很好的响应,且峰型明显、对称,表明样品为阴性样品;图 2 中 MG 和 LMG 内外标 4 种物质均出现了明显的峰,峰型对称分离良好,保留时间稳定,与混合标样图谱一致。

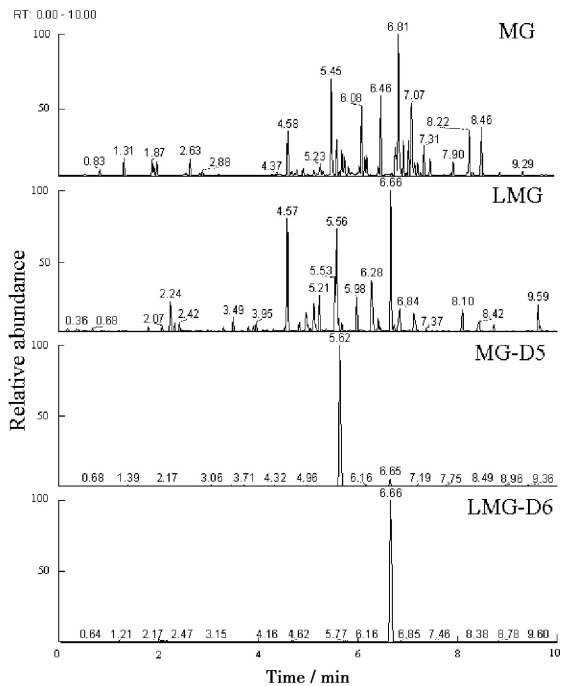


图 1 空白样品 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM mass chromatograms of blank sample

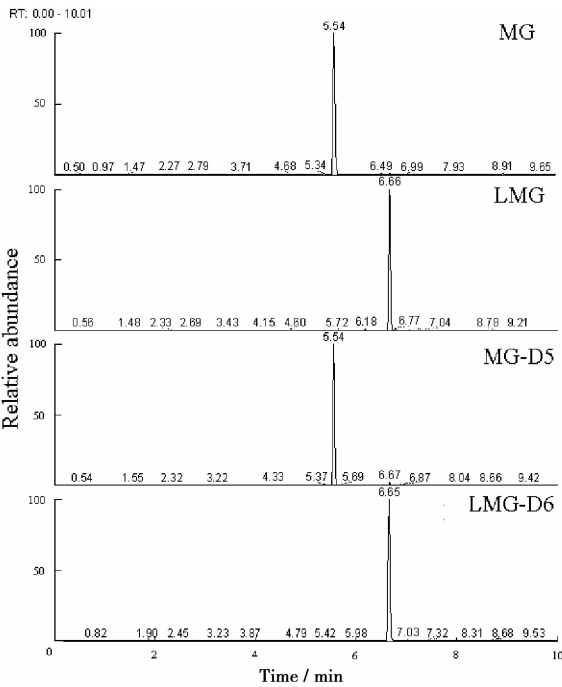


图 2 添加 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 样品 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM mass chromatograms of fortified sample

2.5 添加回收率和精密度

在空白鱼肉样品中分别进行 0.2、1.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平的加标回收试验,按本方法提取,结果表明 MG,LMG 回收率为 84.5%~99.6%,相对标准偏差 $<6.0\%$ 。回收率及精密度见表 3。

表 3 添加回收率及精密度($n=6$)

Table 3 Precision and recovery($n=6$)

化合物	添加值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	检测值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	RSD/%
MG	0.2	0.18	91.0	3.5
	1.0	0.96	96.1	2.9
	5.0	4.98	99.6	4.1
LMG	0.2	0.17	84.5	2.7
	1.0	0.97	97.3	5.3
	5.0	4.86	97.2	4.8

2.6 实际样品的测定

采用本方法检测市售 45 份鱼肉样品,其中 1 份样品检出 LMG 残留,其 MRM 色谱图及质谱图见图 3、图 4。从图 3 看出 MG 没有明显响应,LMG 响应明显,保留时间为 6.67,与标样保留时间匹配, MG-D5 和 LMG-D6 峰型明显,保留时间也与标样一致,图 4 中 LMG 两特征子离子均出现,且丰度比与质谱方法一致,所以样品定性为阳性,样品 LMG 和 LMG-D6 峰面积比值对应标准曲线上的浓度,经过换算(样品浓度 \times 提取体积/样品质量)得到样品中 LMG 含量为 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,说明在水产养殖中添加孔雀石绿的现象依然存在。

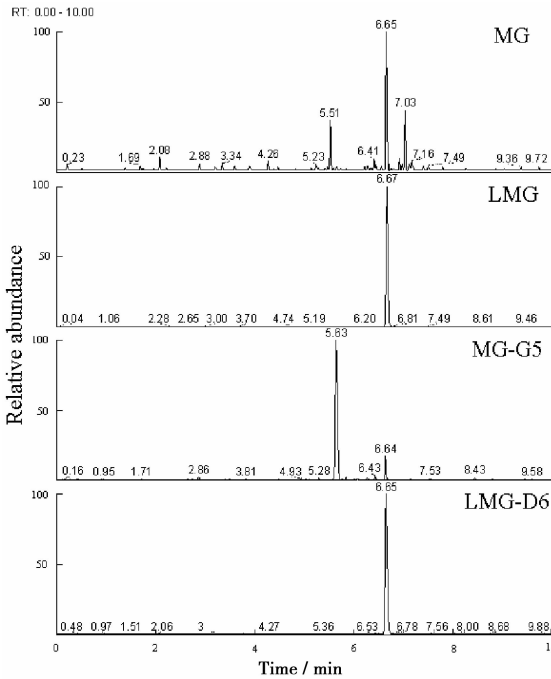


图 3 阳性样品 MRM 色谱图

Fig. 3 MRM chromatogram of positive sample

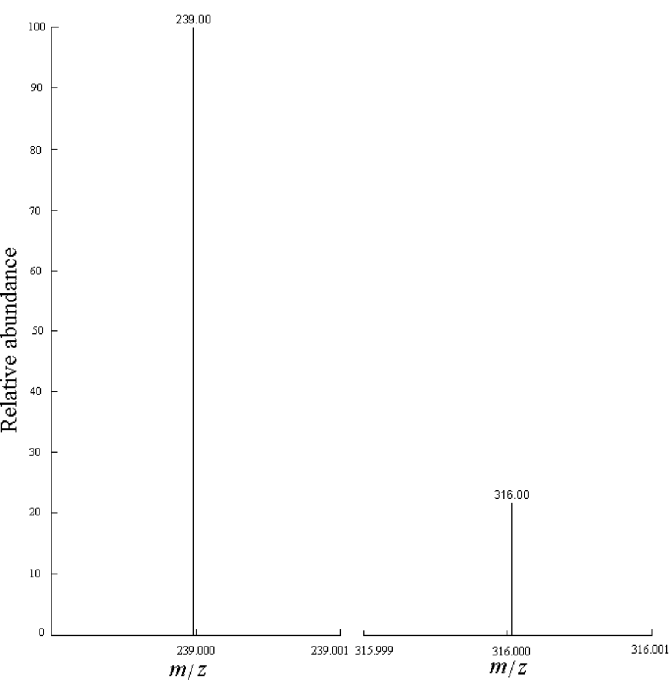


图4 阳性样品质谱图

Fig. 4 Mass spectrum of positive sample

3 结 论

本文建立了在线净化/LC-MS-MS 联用技术测定淡水鱼中孔雀石绿及其代谢产物隐性孔雀石绿的方法。该方法采用先进的 Turboflow 在线净化技术,前处理简单,试剂用量减少,可快速全自动处理分析样品,并且可以降低基质干扰的影响。采用乙腈提取目标物,提取液直接在线净化,串联质谱测定,同位素内标法定量,方法检出限为 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法回收率稳定,重现性良好,适用于淡水鱼中孔雀石绿及隐性孔雀石绿残留量的检测。

参考文献:

- [1]刘军,胡华军,张明渊,等. 鱼药孔雀石绿的毒性、危害和检测现状[J]. 浙江农业学报,2006,18(5):337-340.
- [2]李永生,刘艳辉. 禁用药物孔雀石绿的毒性、危害及控制措施[J]. 吉林水利,2010,30(5):100-102.
- [3]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.
- [4]郭德华,叶长淋,朱莹洁. 液相色谱法测定鳊鱼中孔雀石绿[J]. 化

学分析计量,2002,11(2):20-21.

- [5]张彤晴,杨洪生,林海,等. 高效液相色谱法测定养殖水体中孔雀石绿和无色孔雀石绿[J]. 水产学报,2007,5(31):609-703.
- [6]Valle L, Diaz C, Zanocco A L, et al. Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067:101-105.
- [7]赵东豪,黎智广,林钦,等. 高效液相色谱串联质谱测定沉积物中的孔雀石绿、结晶紫及其隐色代谢物[J]. 广东农业科学,2011,38(2):171-173.
- [8]高华鹏,李永夫,沈维军,等. 高效液相色谱——串联质谱联用测定鳊鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量[J]. 理化检验:化学分册,2008,44(2):103-106.
- [9]周贻兵,吴坤,刘利亚,等. 超高效液相色谱——串联质谱法测定鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量[J]. 质谱学报,2013,34(5):294-299.
- [10]冯富,孙文通,李波,等. 水产品中残留孔雀石绿和无色孔雀石绿液质联用分析方法研究[J]. 食品科学,2009,30(4):193-196.
- [11]赵孔祥,葛宝坤,陈旭艳,等. 在线免疫亲和净化——液相色谱——串联质谱快速测定中草药及中成药中10种真菌毒素[J]. 分析化学,2011,39(9):1341-1346.
- [12]Bousova K, Senyuva H, Mittendorf K. Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1274:19-27.
- [13]艾连峰,马育松,陈瑞春,等. 在线净化液相色谱串联质谱法测定动物源食品中金刚烷胺的残留[J]. 分析化学,2013,41(8):1194-1198.
- [14]Yan W, Li Y, Zhao L X, et al. Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C30 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216:7539-7545.
- [15]Garcia-Ac A, Segura P A, Viglino L, et al. On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216:8518-8527.

(责任编辑:殷丽莉)