

高效液相色谱法同时测定海水中孔雀石绿和无色孔雀石绿

桂英爱,王洪军,马琳,刘春林,王丹

(大连市海洋与渔业环境监测中心,辽宁 大连 116023)

摘要:建立了高效液相色谱同时测定海水中孔雀石绿和无色孔雀石绿的方法。方法在 0 mg/L ~ 4.0 mg/L 范围内线性良好,孔雀石绿和无色孔雀石绿的最低检出限为 0.02 μg/L,平均加标回收率为 88.2% ~ 104%,RSD 为 3.2% ~ 8.7%。

关键词:孔雀石绿;无色孔雀石绿;高效液相色谱法;海水

中图分类号:O657.7⁺2

文献标识码:B

文章编号:1006-2009(2008)02-0044-02

孔雀石绿为翠绿色有光泽的结晶体,属三苯甲烷类染料。由于其在控制真菌侵袭和寄生虫感染等方面的显著效果,在水产养殖中得到了广泛应用,生物体浸染这种染料后会迅速吸收并在体内代谢成无色孔雀石绿。孔雀石绿和无色孔雀石绿具有高毒性、高残留和致畸、致癌、致突变等作用,已被许多国家列为不得检出的禁用药物。水产品中孔雀石绿最常用的检测方法是高效液相色谱法^[1-2]和液质联用法^[3-4],样品处理过程繁琐,检测周期长。目前,除了国外淡水中孔雀石绿的检测方法外^[5],还未见海水中孔雀石绿的检测方法报道。今建立了海水中孔雀石绿和无色孔雀石绿的高效液相色谱检测法,应用该方法测定典型养殖场工厂化养殖水体,结果令人满意。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪,配紫外检测器,美国 Agilent公司;RE-2000B型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂。

孔雀石绿和无色孔雀石绿标准品,纯度分别为 97.2%和 97.0%,德国 Dr公司;0.1 g/L孔雀石绿和无色孔雀石绿标准溶液:分别准确称取孔雀石绿和无色孔雀石绿标准品 0.010 0 g,用乙腈溶解,定容至 100 mL,避光保存;二甘醇,分析纯,天津福晨化学试剂厂;二氯甲烷,分析纯,天津科密欧试剂公司;乙腈,色谱纯,德国 Merck公司;超纯水,用赛多利斯超纯水装置制备。

1.2 色谱条件

ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm);配有二氧化铅的柱后氧化柱(35 mm ×

4.6 mm),北京振翔公司。检测器波长 588 nm;流动相:V(0.1 mol/L乙酸铵):V(乙腈)=1:4;柱温 25 °C;流量 1.5 mL/min;进样体积 20 μL。

1.3 水样处理

取 500 mL 海水样于分液漏斗中,加入 50.0 mL乙腈与二氯甲烷混合溶液(体积比为 1:1)、2 mL二甘醇,剧烈振荡 2 min,静置 1 h,分层后取下层有机相至蒸发瓶中。再往分液漏斗中加入 50.0 mL乙腈与二氯甲烷混合溶液(体积比为 1:1),振摇,静置约 10 min,待其分层后收集下层液体于同一蒸发瓶中。

将收集液装到旋转蒸发装置上,于 35 ~ 40 °C水浴中减压浓缩至近干,用乙腈定容至 1.0 mL,用 0.45 μm有机滤膜过滤。

准确吸取 20 μL样品提取液和混合标准使用液测定,同时取 500 mL干净海水按同样步骤操作,作为样品空白。

2 结果与讨论

2.1 线性关系

配制 0 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、4.0 mg/L孔雀石绿和无色孔雀石绿混合标准溶液系列,按上述方法测定,以峰面积对质量浓度作标准曲线,线性关系良好。孔雀石绿回归方程为 $y = 40.2543851x + 1.9860028$,相关系数 $r = 0.99972$;无色孔雀石绿回归方程为 $y = 59.7691371x + 7.6181614$,相关系数 $r = 0.99991$ 。

收稿日期:2007-03-09;修订日期:2007-11-29

作者简介:桂英爱(1967—),女,黑龙江佳木斯人,高级工程师,硕士,从事海洋与环境监测工作。

2.2 最低检出限

按照方法规定的取样体积和定容体积, 根据 3 倍信噪比, 得孔雀石绿和无色孔雀石绿的检出限均为 $0.01 \mu\text{g}$ 。试验海水量为 500 mL, 故该方法检测海水中孔雀石绿和无色孔雀石绿的最低检出限为

$0.02 \mu\text{g/L}$ 。

2.3 精密度与加标回收试验

向海水样品中添加不同质量浓度的孔雀石绿和无色孔雀石绿混合标准溶液, 作精密度与加标回收试验, 结果见表 1。

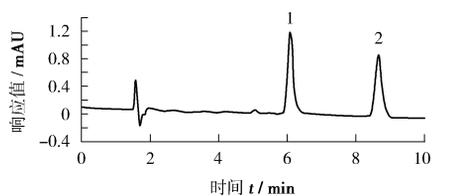
表 1 精密度与加标回收试验结果 ($n=6$)

加标量 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	化合物	回收率 / %						平均回收率 / %	RSD / %
		1	2	3	4	5	6		
0.2	孔雀石绿	106	104	115	96.3	96.3	101	103	7.0
	无色孔雀石绿	108	108	114	96.4	100	100	104	6.3
2.0	孔雀石绿	87.2	83.5	89.6	88.0	92.8	88.1	88.2	3.4
	无色孔雀石绿	90.1	80.2	80.5	92.5	99.5	94.8	89.6	8.7
10.0	孔雀石绿	97.8	102	105	99.4	94.2	94.4	98.8	4.3
	无色孔雀石绿	90.3	92.5	95.6	89.8	86.9	91.6	91.1	3.2

试验中曾用乙腈提取加标水样中的孔雀石绿, 结果浓缩物颜色几乎透明无色, 回收率极低。添加二氯甲烷后, 浓缩物颜色变成浅绿色, 回收率也大大提高。加入二甘醇有助于水体分层。

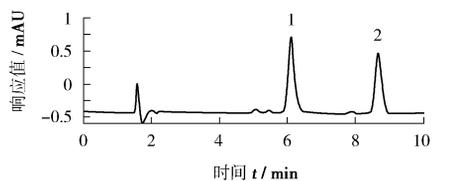
2.4 色谱图

0.1 mg/L 孔雀石绿和无色孔雀石绿混合标准溶液和加标海水样的色谱峰见图 1、图 2。在 588 nm 处, 孔雀石绿约 6.0 min 出峰。无色孔雀石绿的最大吸收波长为 267 nm, 由于背景干扰严重, 须在色谱柱中洗脱, 再经柱后氧化柱, 发生氧化还原反应后生成孔雀石绿, 在约 8.6 min 处出峰。两者保留时间一致, 峰形尖锐、对称, 附近无干扰峰。



1——孔雀石绿(6.083 min); 2——无色孔雀石绿(8.652 min)。

图 1 孔雀石绿和无色孔雀石绿标准色谱峰



1——孔雀石绿(6.098 min); 2——无色孔雀石绿(8.679 min)。

图 2 加标海水样色谱峰

2.5 样品测定

采用该方法测定大连市南部海域、普兰店市和瓦房店市室内工厂化养殖水体中的孔雀石绿和无色孔雀石绿, 8 份海水样均未检出。

3 结论

采用高效液相色谱法测定海水中的孔雀石绿和无色孔雀石绿, 样品前处理简单易行, 精密度与准确度均符合要求, 可应用于水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿的检测, 以及养殖过程中其使用情况的全面监控。

[参考文献]

[1] MIROWSKA K, POSYNAK A. Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in fish muscle by liquid chromatography[J]. Bull Vet Inst Pulawy, 2004, 48: 173 - 176

[2] MIROWSKA K, POSYNAK A, ZMUDZKI J. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005 (1089): 187 - 192

[3] SCHERPENISSE P, ALDERT A, BERGWERFF. Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2005 (529): 173 - 177.

[4] VALLEA L, D YAZA C, ANTON D L, et al Determination of the sum of malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2005 (1067): 101 - 105.

[5] ŠAFARĀK I, ŠAFARĀKOVÁ M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water[J]. Water Research, 2002, 36: 196 - 200.

本栏目责任编辑 姚朝英