DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2020.24.034

超高效液相色谱串联质谱法检测水产品中结晶紫残留干扰因素分析

刘国红[1],张惠南[2],张敏[1],刘娟[1],李淑静[1,*]
(1. 天津海关动植物与食品检测中心,天津 300461;2. 天津天狮学院,天津 301700)

摘　要:采用超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry,UPLC-MS/MS)分析办公用品和包装材料中染料的析出对水产品中结晶紫残留量检测的干扰。样品(黑色签字笔划线纸、黑色马克笔划线纸、蓝色圆珠笔划线纸、送样样品标签纸、激光打印标签纸、留样用塑料袋)用乙腈提取,采用 UPLC-MS/MS 测定。结果表明待测样品除黑色签字笔划线纸以外,均检出结晶紫残留,显性结晶紫和隐性结晶紫含量随时间的延长,均有不同程度的增加。蓝色圆珠笔划线纸、送样样品标签纸和激光打印标签纸中结晶紫检出值较高;黑色马克笔划线纸、留样用塑料袋中检出显性结晶紫。

关键词:超高效液相色谱串联质谱法;结晶紫;办公用品;包装材料;时间

Analysis of Interference Factors in the Gentian Violet Residual of Aquatic Products by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LIU Guo-hong[1], ZHANG Hui-nan[2], ZHANG Min[1], LIU Juan[1], LI Shu-jing[1,*]
(1. Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center of Tianjin Custom, Tianjin 300461, China;
2. Tianjin Tianshi College, Tianjin 301700, China)

Abstract: Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)was used to analyze the interference of dye precipitation in stationery and packing materials on aquatic products gentian violet detection. Samples like black pen marking paper, black mark pen marking paper, blue ballpoint pen marking paper, labell paper, thermal labels and sample plastic bag were extracted with acetonitrile and analyzed by UPLC-MS/MS. The results showed that the residue of gentian violet was detected in all the samples except for the black marking paper. The contents of gentian violet and leuco gentian violet were increased in different degrees along with the extension of time. The gentian violet was higher in blue ballpoint pen marking paper, label paper and thermal labels. Gentian violet was detected in black marker pen marking paper and sample plastic bag.

Key words: ultra performance liquid chromatography -tandem mass spectrometry; gentian violet; stationery; packing materials; time

引文格式:
刘国红,张惠南,张敏,等.超高效液相色谱串联质谱法检测水产品中结晶紫残留干扰因素分析[J].食品研究与开发,2020,41(24):207-211
LIU Guohong, ZHANG Huinan, ZHANG Min, et al. Analysis of Interference Factors in the Gentian Violet Residual of Aquatic Products by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Food Research and Development, 2020,41(24):207-211

作者简介:刘国红(1967—),女(汉),工程师,本科,研究方向:食品分析。
* 通信作者:李淑静,高级工程师,博士研究生。

结晶紫,以 N,N-二甲基苯胺为原料,经过加工得到成品,是一种三苯基甲烷染料[1]。结晶紫用途广泛,多用于消毒、杀菌、生物染色剂、兽药、饲料等。结晶紫以其杀菌效果好,保鲜效果佳的特点,多年来广泛用于水产养殖业和水产品长途运输。然而,研究发现结晶紫易被生物组织吸收,在生物体内代谢后生成具有致癌、致畸、高毒、高残留特性的隐性结晶紫[2-4]。目前很多国家地区都将结晶紫列为水产养殖的禁用药物,我国目前也将结晶紫列为可食用动物禁用兽药。

近年来,可食用动物中违规使用结晶紫等药品的情况备受关注。欧盟要求水产品中结晶紫不得检出。2005 年,我国发布实施的 GB/T 19857-2005《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定》[5]规定结晶紫的检测限为 2.0 μg/kg。

然而,检测过程中时常遇到试剂空白检出结晶紫,以及分析结果稳定性差的现象。国内有学者对结晶紫检测做了相关研究。吴淑秀等[6]应用高效液相色谱串联质谱法测定了实验室检测过程中常用的笔、纸、标签、样品袋等用品中结晶紫的含量。结果表明,大部分供试物品均含有一定量的结晶紫,其中 A4 打印纸、标签纸和圆珠笔中含量很高。高华鹏等[7]采用超高效液相串联质谱法测定了结晶紫和隐性结晶紫的含量,结果显示出实验室用品均能检出结晶紫。许荣富等[8]用反相柱成功地分离出了结晶紫、甲基紫、碱性品蓝、碱性艳蓝 B、铜酞菁和罗丹明 B 等几种有色染料成分,检测出圆珠笔的结晶紫含量。

本文针对水产品检测过程中结晶紫检测干扰因素进行分析,在不同的时间条件下,对试验可能接触的办公用品如纸、笔、标签纸,以及包装材料如留样用塑料袋中的结晶紫含量进行检测,从而得出随时间变化的干扰因素对检测结果的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

A4 打印纸、送样样品标签纸、激光打印标签纸、黑色签字笔、黑色马克笔、蓝色圆珠笔:得力集团有限公司;实验室滤纸:塘玻(天津)实验仪器销售有限公司;留样用塑料袋:河源市华丰塑胶有限公司。

乙腈(色谱纯):德国默克公司;乙酸铵(优级纯):天津科密欧化学试剂公司;结晶紫、隐性结晶紫:德国 Dr.Ehrensorfer 公司。

1290/6460 超高效液质联用仪、Eclipse Plus 色谱柱 C18(5 μm×100 mm×2.1 mm):德国 Agilent 公司;AL204-IC电子天平:上海梅特勒-托利多仪器;WAT200609 固相萃取装置:沃特世 Waters 公司;HS501 振荡器:IKA 公司;1 mL/cc 一次性使用无菌注射器:浙江华福医用器材有限公司;尼龙膜过滤器(0.22 μm,13 mm):博纳艾杰尔科技有限公司;1 mL 进样瓶:浙江爱吉仁科技有限公司;2 mL 塑料滴管:上海晶安生物信息有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制

0.1 μg/mL 的结晶紫工作液的配制:精确移取 0.01 mL 0.1 mg/mL 的结晶紫中间液,置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度线于 4 ℃以下避光储存摇匀备用。

1.2.2 样品前处理

将待测的 A4 纸、实验室滤纸、送样样品标签纸、激光打印标签纸和留样用塑料袋分别裁剪成 2 cm×2 cm 同样大小的纸片,如图 1 所示。把待测所用黑色签字笔、黑色马克笔、蓝色圆珠笔分别在 2 cm×2 cm 的空白实验室滤纸上用力均匀[9]地分别书写一条、两条、四条长度为两厘米的印记并晾干,如图 2 所示。加入 2 mL 乙腈浸提 5 min,涡旋振荡 5 min。浸提液经 0.22 μm 滤膜过滤。

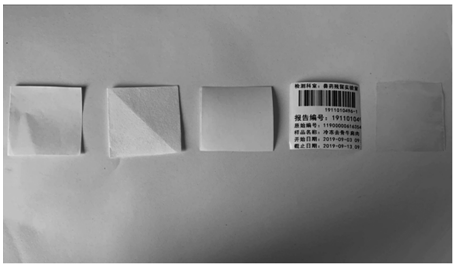

图 1 纸样品前处理

Fig.1 Pre-processing of paper sample

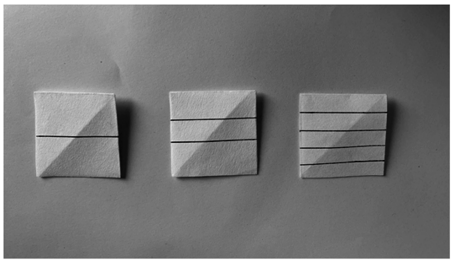

图 2 笔样品前处理

Fig.2 Pre-processing of pen sample

1.2.3 不同提取时间对污染物含量影响

将裁剪好的相同滤纸中画相同两条黑色签字笔印记的纸、画有相同黑色马克笔印记的滤纸、画有相同蓝色圆珠笔印记的滤纸、相同送样样品标签纸、相同激光打印标签纸、相同留样用塑料袋分别放入 50 mL 离心管中,加入 2 mL 乙腈分别浸提 5、10、

30、60、120、240、360 min 和 720 min,浸提液经 0.22 μm 滤膜过滤后用高效液相色谱-质谱联用仪检测污染物(显性结晶紫和隐性结晶紫)含量。重复 5 次作为平行试验,从而减小误差。

1.2.4　仪器条件

1.2.4.1　液相色谱条件

色谱柱:Eclipse Plus C18,1.8 μm×100 mm×2.1 mm(内径);流动相:A 为 500 mL 乙腈+500 μL 甲酸+0.385 g 乙酸铵,B 为乙腈;流速:300 μL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

流动相梯度洗脱条件见表 1。

表 1　流动相梯度洗脱条件

Table 1　Gradient condition of mobile phase

序号	保留时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A(500 mL 乙腈+500 μL 甲酸+0.385 g 乙酸铵)/%	流动相 B(乙腈)/%
1	0.0	0.3	90.0	10.0
2	5.0	0.3	15.0	85.0
3	6.0	0.3	10.0	90.0
4	7.0	0.3	5.0	95.0
5	7.5	0.3	90.0	10.0
6	10.0	0.3	90.0	10.0

1.2.4.2　质谱条件

离子源:电喷雾离子源;扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM);电喷雾电压:4 000 V;壳气温度:350 ℃;离子源温度:300 ℃。

显性结晶紫和隐性结晶紫检测的质谱条件见表2。

表 2　显性结晶紫和隐性结晶紫的质谱条件

Table 2　Mass spectrometer conditions for gentian violet and leuco gentian violet

化合物	母离子	子离子	驻留时间/ms	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
隐性结晶紫	374	359	50	155	21
		238	50	155	29
显性结晶紫	372	356	50	170	45
		251	50	170	37

1.2.5　标准曲线的绘制

准确分别吸取结晶紫的标准工作液 0、1、5、10、20、50、100 μL 至进样瓶内,依次分别加入乙腈 1 000、999、995、990、980、950、900 μL 至每个进样瓶内,配制成浓度为 0、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μg/L 的结晶紫标准液。将不同浓度的标准液置于超高效液相色谱串联质谱仪,在最佳色谱条件下进行色谱分析,以保留时间定性,测定峰面积定量。以结晶紫及其代谢物浓度为横坐标,以结晶紫及其代谢物的液相峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程及其相关系数。

2　结果与分析

2.1　显性结晶紫和隐性结晶紫的检出限

图 3 和图 4 分别为 0.05 μg/L 显性结晶紫和隐性结晶紫的选择离子色谱图。

在 0.5 μg/L 浓度下,显性结晶紫的信噪比 S/N=17.5,隐性结晶紫的信噪比 S/N=71.9,均大于 3,按照

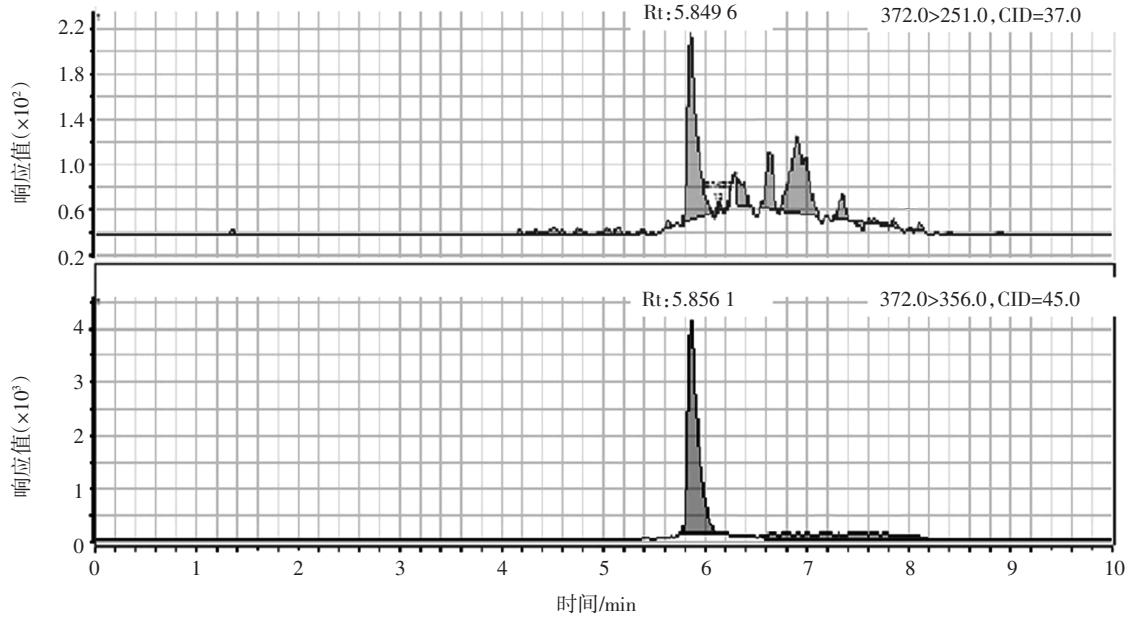

图 3　0.05 μg/L 显性结晶紫选择离子色谱图

Fig.3　MRM chromatography for 0.05 μg/L gentian violet

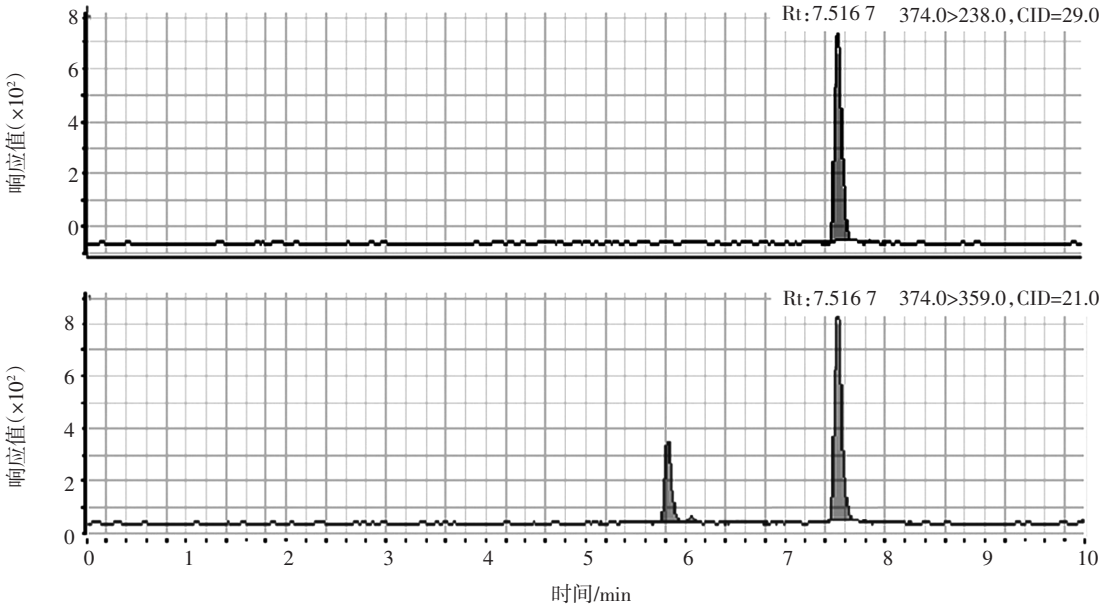

图 4 0.05 μg/L 隐性结晶紫选择离子色谱图

Fig.4 MRM chromatography for 0.05 μg/L leuco gentian violet

GB/T 27404 –2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》规定,S/N>3 可以定义为检出限。因此本方法中显性结晶紫、隐性结晶紫的检出限定为 0.5 μg/L。由图 3 和图 4 可得, 该试验条件测得的显性结晶紫的保留时间为 5.81 min,隐性结晶紫的保留时间为 7.52 min。

2.2 标准曲线

按照 1.2.5 的方法制作标准曲线,以结晶紫的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线,结晶紫标准品的标准曲线为 Y=150 049.37X+12 345.95,相关系数 R^2=0.995 7,线性范围为 0~5 μg/L,线性关系良好。

以隐性结晶紫的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线,隐性结晶紫标准品的标准曲线为 Y=56 370.42X–2 861.45,相关系数 R^2=0.999 5,线性范围为 0~5 μg/L,线性关系良好。

2.3 结晶紫随时间变化的含量分析

6 种待分析样品结晶紫残留含量结果见表 3。

表 3 结晶紫随时间变化的含量分析

Tab.3 Analysis on the content of gentian violet changed over time

时间/min	结晶紫含量/(μg/L)											
	黑色签字笔划线纸		黑色马克笔划线纸		蓝色圆珠笔划线纸		送样样品标签纸		激光打印标签纸		留样用塑料袋	
	显性结晶紫	隐性结晶紫	显性结晶紫	隐性结晶紫	显性结晶紫	隐性结晶紫	显性结晶紫	隐性结晶紫	显性结晶紫	隐性结晶紫	显性结晶紫	隐性结晶紫
5	0	0	0.17	0	167.04	8.18	19.70	0.20	17.72	0.16	0.12	0
10	0	0	0.19	0	214.19	9.88	21.90	0.22	22.72	0.17	0.17	0
30	0	0	0.20	0	235.58	11.86	24.40	0.21	33.60	0.24	0.23	0
60	0	0	0.20	0	286.24	13.88	26.40	0.20	35.13	0.29	0.30	0
120	0	0	0.20	0	325.64	13.76	27.10	0.25	35.60	0.29	0.30	0
240	0	0	0.20	0	373.96	15.10	31.60	0.23	46.90	0.30	0.35	0
360	0	0	0.23	0	387.96	14.90	45.80	0.27	47.20	0.29	0.48	0
720	0	0	0.30	0	392.96	15.90	51.30	0.31	54.70	0.32	0.55	0

由表 3 可得出在对 6 种待分析样品分别浸提 5、10、30、60、120、240、360 min 和 720 min 后检测结晶紫含量,黑色签字笔划线纸没有检出显性结晶紫和隐性结晶紫含量,黑色马克笔划线纸和留样用塑料袋中没有检出隐性结晶紫含量。在 5 min~720 min 内黑色马克笔划线纸中的显性结晶紫含量随时间的延长而增加。在 720 min 时达到顶峰,其浓度为0.30 μg/L。其原因可能是由于随时间的增加马克笔油墨中的染料含有的污染物不断析出[10]。在 5 min~720 min 内蓝色圆珠笔划线纸中显性结晶紫含量非常高且随时间的加长而增加,在 720 min 时达到顶峰,其浓度为 392.96 μg/L。其隐性结晶紫含量也随时间的延长而

增加。蓝色圆珠笔划线纸中含有的显性结晶紫和隐性结晶紫含量非常高,原因可能是由于圆珠笔油墨中的染料含有结晶紫所以对试验造成了极大的污染,并且随时间增加污染物在不断的析出[9]。送样样品标签纸中显性结晶紫随时间的延长而增加,其浓度在 720 min 时达到顶峰浓度为 51.30 μg/L。其隐性结晶紫含量也随时间的加长而增加。其原因可能是由于实验室标签纸在生产运输时受到结晶紫的污染。激光打印标签纸中显性结晶紫随时间的加长而增加,其隐性结晶紫含量也基本随时间的加长而增加,其原因可能是由于激光打印的墨汁中含有结晶紫。留样用塑料袋中显性结晶紫含量整体随时间的加长而增加。存在显性结晶紫的原因可能是由于在塑料袋的保存和运输过程中受到含有结晶紫物质的污染。

3　结论与讨论

本文研究超高效液相色谱串联质谱法检测水产品测定过程中可能存在的干扰因素,包括水产品的样品采集、流通,以及实验室检测过程中可能被污染的包装材料样本中结晶紫含量随时间变化的情况。除了黑色签字笔划线纸没有测定出显性及隐性结晶紫以外,在黑色马克笔划线纸、蓝色圆珠笔划线纸、送样样品标签纸、激光打印标签纸、留样用塑料袋中显性结晶紫的含量变化趋势一致,都随时间的延长有增长趋势。蓝色圆珠笔划线纸中的隐性结晶紫含量也很高,5 min~720 min 时隐性结晶紫从 8.18 μg/L 升高到 15.90 μg/L,随时间延长含量出现了增长。送样样品标签纸、激光打印标签纸中隐性结晶紫含量也有了不同程度的检出,同样随时间延长出现了增长。黑色马克笔划线纸、留样用塑料袋中没有检出隐性结晶紫。

综上所述,结晶紫(含显性结晶紫和隐性结晶紫)检测结果在样品采集、传递及实验室检测过程中会受包装材料的影响,原因是马克笔、圆珠笔,激光打印的墨粉中的结晶紫染料可能析出,染料中析出的结晶紫检出值随时间延长而升高。该研究为探索水产品中结晶紫检测受包装材料的影响情况提供了依据,为结晶紫检测假阳性研究提供了参考。

参考文献:

[1] 赵永云,杜凤,董娟.孔雀石绿和结晶紫在荧光检测中的比较[J].应用与环境生物学报,2013,19(2):365-369

[2] 华正罡,冯静,伊萍,等.超高效液相色谱串联质谱法测定淡水鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(22):3238-3240

[3] MEYERFPJORGENSENTA.Teratological and otheref-fect sof malachite green on the development of rain bowtrout and rabbits [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1983,112(6): 818-824

[4] Thompson H C,Rushing L G,Gehring T,Lochmann R. Persistence of gentian violet and leucogentian violet in channel catfish (ictalurus punctatus) muscle after water-borne exposure[J]. Journal of chromatography Biomedical sciences and applications,1999(723):1-2

[5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定:GB/T 19857-2005[S].北京:中国标准出版社,2005

[6] 吴淑秀,崔淑华,郝建光,等.水产品中结晶紫检测污染原因分析及应对措施[J].检验检疫学刊,2011,21(2):35-39

[7] 高华鹏,李永夫,刘海山,等. 孔雀石绿等染料物质残留检测过程中实验室污染的来源分析[J].中国兽药杂志,2008,42(8):21-25

[8] 许荣富,卢青,邹洪,等.反相高效液相色谱法对蓝色圆珠笔分类的研究[C].武汉:中国化学会,2007:187-190

[9] 李心倩,王彦吉,史晓凡,等.圆珠笔油墨字迹色痕的高效液相色谱分析方法[J].分析化学,2004(5):657-660

[10] 李轩,曾丽珠,张昊.市售油性记号笔对水产品中结晶紫检测污染研究[J].现代食品,2016(24):91-92

收稿日期:2020-10-09