

氘代内标法测定药用牡蛎中的三苯甲烷类染料

甘盛¹, 施晓光^{1*}, 韩婷², 吴超权¹ (1.广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021; 2.河北联合大学基础药学院药理教研室, 河北唐山 063009)

摘要: 目的 建立用液相-质谱串联联用仪, 使用氘代内标测定药用牡蛎中三苯甲烷类染料残留的方法, 以提高牡蛎药材的安全性。方法 样品溶液加入氘代混合内标, 中性氧化铝固相萃取小柱净化后过 WAX 小柱分离, 用乙腈对 WAX 小柱进行洗脱后吹干, 残余物溶于 50% 乙腈水溶液, 用液质串联联用仪测定, 梯度洗脱, 流动相为乙腈-5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液。结果 各分子在 0.5~10 μg·kg⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率为 90.5%~102.6%, 定量限为 0.054 3~0.29 78 μg·kg⁻¹。

结论 此方法灵敏准确, 专属性强, 干扰少, 重复性佳, 对检测牡蛎药材中的三苯甲烷类染料残留极具参考价值。

关键词: 药用牡蛎; 氘代内标; 孔雀石绿; 隐色孔雀石绿; 结晶紫; 隐色结晶紫

中图分类号: R931.77

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)09-0836-05

Quantitative Determination of Triphenylmethane Dyes in Medicinal Oyster by Deuterated Internal Standard Method

GAN Sheng¹, SHI Xiaoguang^{1*}, HAN Ting², WU Chaoquan¹ (1. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China; 2. Didactic and Research Section of Pharmacology, College of Fundamental Pharmacy, Hebei United University, Tangshan 063009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To approach the determination of the residues of deuterated internal standard in medicinal oyster by LC-MS/MS with deuterated internal standard to improve the safety of medicinal oyster materials. **METHODS** A mixture of deuterated internal standard was added to the samples, purified by acidic alumina cartridges and then isolated through acidic alumina cartridges. Elute the alumina cartridges with acetonitrile, and the residue was tested by LC-MS/MS, with the gradient of mobile phase composed of acetonitrile and 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate solution. **RESULTS** All molecules in samples were in good linear of 0.5~10 μg·kg⁻¹, with a mean recovery at 90.5%~102.6%, and the instrumental limit of quantitative detection was 0.054 3~0.297 8 μg·kg⁻¹. **CONCLUSION** The method is proved to be sensitive and accurate, repeatable and specific with little interference, extremely consultable for inspection for residues of triphenylmethane dyes in medicinal oyster materials.

KEY WORDS: medicinal oyster; deuterated internal standard; Malachite green; leucomalachite green; crystal violet; leucocrystal violet

牡蛎, 又称蚝, 属牡蛎科(Ostreidae 真牡蛎)或燕蛤科(Aviculidae 珍珠牡蛎)双壳类软体动物, 既是人们餐桌上的佳品, 也是重要的药材。牡蛎味咸, 性微寒, 归肝、胆、肾经, 有收敛、镇静、解毒、镇痛之功效, 主治心神不安、惊悸失眠, 肝火上亢、头晕目眩, 痰核、瘰癧、癭瘤及滑脱诸症^[1]。作为重要的经济水产, 我国各大水域均有分布, 经济效益良好, 为广大养殖户所钟爱。孔雀石绿与结晶紫均为三苯甲烷类染料, 用于细胞及微生物染色, 并有较好的杀菌作用, 也可作为抑菌剂或杀灭阿米巴原虫剂, 对水产品的细菌与真菌感染尤为有效, 其结构式见图 1。孔雀石绿、结晶紫经过动物体或人体代谢后, 成为脂溶性的隐色孔雀石绿或者隐色结晶紫。这些化合物

不良反应严重, 具有高毒、高残留与致癌、致突变、致畸等特性^[2], 为许多国家所禁用^[3-4], 也列入我国 2002 年 5 月《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》中, 但养殖场使用孔雀石绿与结晶紫等染料现象仍屡禁不绝。对此, 2010 年版中国药典也没有作出限度规定^[1]。笔者对抽检的牡蛎样品中孔雀石绿、结晶紫等化合物残留采用液相色谱-串联质谱法进行检测^[5-7], 因检测为痕量检验, 而牡蛎基质复杂, 前处理步骤繁琐, 为了便于追踪待测目标, 本研究前处理采取了固相萃取^[2,8-9], 加入了氘代化合物作内标物, 在电喷雾质谱多离子反应监测模式(MRM)下检测^[10-13], 灵敏度与精确度都比较高, 达到的检出限低, 具有很好的现实可行性。

作者简介: 甘盛, 男, 博士, 主管药师 Tel: 15994436944
药师 Tel: 13517681047 E-mail: shixiaoguang2007@126.com

E-mail: gansheng@hotmail.com

*通信作者: 施晓光, 男, 硕士, 主管

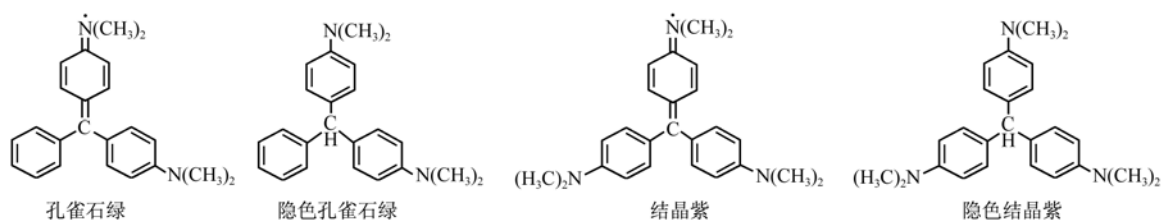


图1 孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫与隐色结晶紫分子

Fig 1 Malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet molecule

1 材料、仪器设备与方法

1.1 材料与试剂

牡蛎自广西各大城市菜市抽购。

乙醇、乙酸铵、甲酸、冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 乙腈 (Fisher scientific 公司, 色谱纯); 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液: 精密称取乙酸铵 0.385 g, 溶于 1 L 水中, 用冰醋酸调节 pH 至 4.5, 过滤即得; 去离子水。

中性氧化铝固相萃取小柱 500 mg·(3 mL)⁻¹ (美国 Agilent 公司); Oasis wax 阳离子交换小柱 60 mg·(3 mL)⁻¹ (美国 Waters 公司)。

孔雀石绿对照品(批号: 201178456, 纯度: 99.1%)、隐色孔雀石绿对照品(批号: 20110654, 纯度: 98.9%)、结晶紫对照品(批号: 20111204, 纯度: 98.6%)、隐色结晶紫对照品(批号: 20110325, 纯度: 98.8%)均由中国药品生物制品检定所提供; 内标对照品: 孔雀石绿 D5(Ehrenstorfer 公司, 批号: DMG163, 纯度: 99.4%); 隐色孔雀石绿 D6(Lancaster 公司, 批号: DMLG714, 纯度: 98.6%); 结晶紫 D6(Fluka 公司, 批号: 47831DCV, 纯度: 99.1%); 隐色结晶紫 D6(Sigma-Aldrich 公司, 批号: DLCV12167, 纯度: 99.0%)。

标准储备液: 分别称取各对照品及内标对照各约 10 mg, 精密称定, 于 50 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 各成 200 μg·mL⁻¹ 标准储备液, 于-18 °C 冰箱内避光放置备用。

混标储备液: 准确移取 1.00 mL 各标准储备液至同一 200 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 成为 1 μg·mL⁻¹ 的混合标准储备液, 于-18 °C 冰箱内避光放置备用。

混合标准工作液: 准确移取 1.00 mL 混标储备液(1 μg·mL⁻¹)至 100 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 得到 10 ng·mL⁻¹ 的混合标准液, 于-18 °C 冰箱内避光放置备用。

1.2 仪器

Agilent 1200 超高速液相仪; Agilent 6460 Triple Quad 串联质谱仪, 电喷雾电离源(ESI); FJ200-SH 均质器(上海标本模型厂); RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); XW-80A 型涡旋混匀器(上海青浦沪西仪器厂); TDL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 液相色谱条件^[14-15]

色谱柱: Phenomenex Kitnex C₁₈ 100A(100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm), 后接氧化铅衍生柱; 柱温 35 °C; 进样体积: 10 μL; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 流动相: A: 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液, B: 乙腈; 检测波长: 对孔雀石绿、隐色孔雀石绿为 618 nm, 对结晶紫、隐色结晶紫为 588 nm。色谱图见图 2。进样分析时间为 7.5 min, 流动相比比例由最初的 A 占 90% 到 7.5 min 时 A 占 10%。

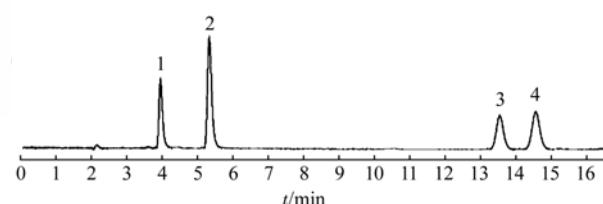


图2 HPLC 色谱图

1-孔雀石绿; 2-结晶紫; 3-隐色孔雀石绿; 4-隐色结晶紫

Fig 2 HPLC Chromatograph

1-malachite green; 2-crystal violet; 3-leucomalachite green; 4-leucocrystal violet

1.4 质谱参数^[5,16]

毛细管电压: 4 000 V; 电离电压: 4.0 kV; 喷嘴电压: 1 500 V; 雾化器压力: 40 psi; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 10 L·min⁻¹; 鞘气温度: 400 °C; 鞘气流速: 10 L·min⁻¹; 驻留时间: 40 ms; 多反应监测(MRM)正离子模式扫描。结果见表 1, 图 3 和图 4。

表 1 质谱条件

Tab 1 Mass spectrometry conditions

三苯甲烷类染料分子	母离子 m/z	碎片离子 m/z	碰撞能量	碎裂电压
孔雀石绿	329.3	定量离子 313.3	48	65
		定性离子 208.4	47	65
隐色孔雀石绿	331.3	定量离子 316.4	48	53
		定性离子 239.3	47	53
结晶紫	372.3	定量离子 356.4	51	73
		定性离子 215.3	48	73
隐色结晶紫	374.3	定量离子 359.3	51	68
		定性离子 238.4	48	68
孔雀石绿 D5	334.3	定量离子 318.3	48	53
		定性离子 218.4	47	53
隐色孔雀石绿 D6	337.3	定量离子 322.4	48	55
		定性离子 245.3	47	55
结晶紫 D6	374.3	定量离子 358.4	51	73
		定性离子 217.3	48	73
隐色结晶紫 D6	376.3	定量离子 361.3	51	68
		定性离子 240.4	48	68

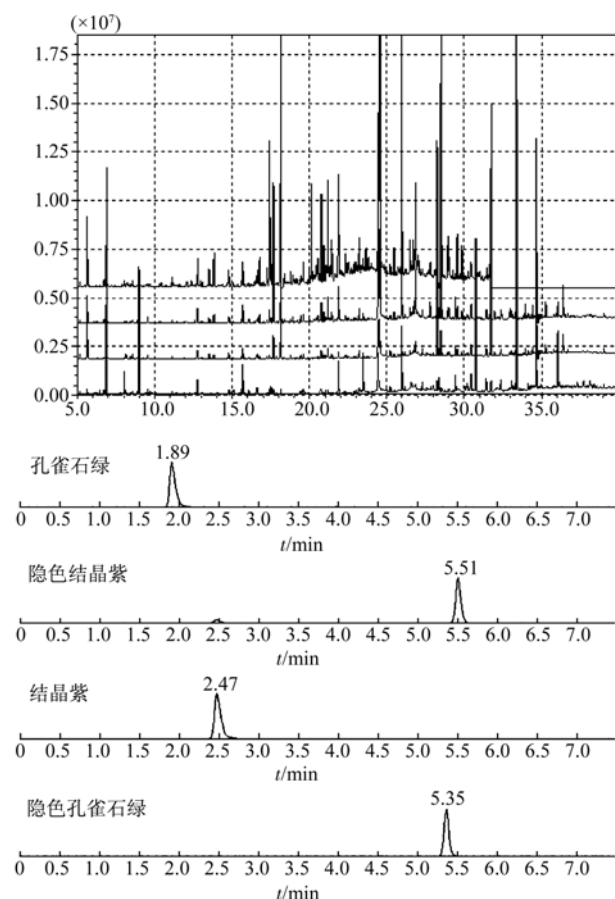


图 3 孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫与隐色结晶紫分子的总离子流图与各自的 MRM 图

Fig 3 Total ion spectra and respect MRM spectra of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet

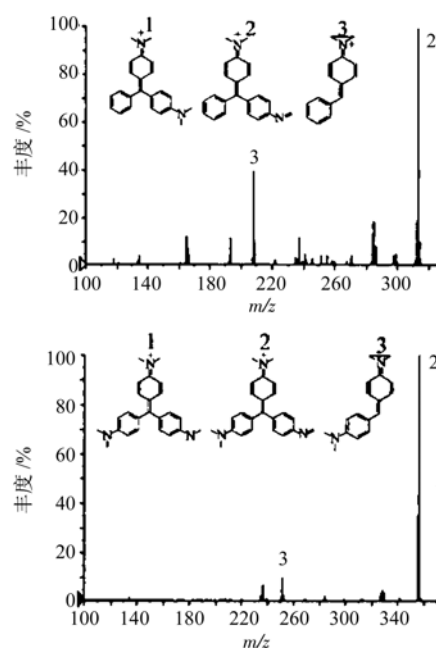


图 4 孔雀石绿与结晶紫分子的二级质谱扫描图

Fig 4 Product ion spectra of malachite green and crystal violet molecule

1.5 前处理操作^[3-7]

1.5.1 提取 牡蛎去壳，捣碎均质，称取 2.00 g 样品于 20 mL 离心管中，加入 80 μL 混标液与 4.4 mL 乙腈，超声提取 5 min，匀浆后以 6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，上清液转移至 10 mL 比色管；再以 4.4 mL 乙腈清洗匀浆刀头，洗涤液移入前一离心管中，漩涡振荡 30 s 后超声处理 5 min，再以 6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min，上清液合并至比色管内，加乙腈至刻度，摇匀放置。

1.5.2 萃取洗脱 将 WAX 小柱对准已活化的中性氧化铝小柱下方流出口接入并固定，依次用 3 mL 乙腈、3 mL 2% 的甲酸溶液活化 WAX 萃取小柱。后用 3 mL 2% 的甲酸乙腈溶液分 3 次洗涤提取液残留物后转移入中性氧化铝小柱，调节流速为 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，流尽后用 2% 甲酸溶液 2 mL 淋洗。去掉中性氧化铝小柱，依次用 2 mL 2% 甲酸乙腈溶液、6 mL 乙腈淋洗 WAX 柱，淋洗流速为 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；后以 4 mL 5% (pH 7.0) 乙酸铵甲醇溶液洗脱，流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，负压抽干，45 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发至近乎干，加乙腈 1.0 mL，0.45 μL 微孔滤膜过滤后上仪器测定。

1.6 标准曲线

将各分子对照品配制成 6 个浓度的工作液上液相-串联质谱联用仪测定，在 0.1~100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

内峰面积(A)与浓度(C)线性关系见表 2。以峰高在基线的 3 倍作检出限,以峰高在基线的 10 倍作定量限。

1.7 回收率试验

表 2 药用牡蛎样品中 4 种三苯甲烷类染料分子的线性

Tab 2 Linearity of four triphenylmethane dye molecules present in medicinal oyster samples

三苯甲烷类染料分子	线性回归方程	相关系数/r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	质谱检出限/定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
孔雀石绿	$A=0.657\ 6C-2.378\ 1$	0.999\ 2	0.1~100	0.014\ 4/0.047\ 9
隐色孔雀石绿	$A=0.767\ 3C+1.436\ 9$	0.998\ 9	0.1~100	0.018\ 3/0.062\ 1
结晶紫	$A=1.774\ 5C+2.549\ 3$	0.999\ 0	0.1~100	0.013\ 9/0.046\ 2
隐色结晶紫	$A=1.534\ 5C-0.355\ 7$	0.999\ 6	0.1~100	0.010\ 2/0.031\ 3

表 3 药用牡蛎样品中的 4 种三苯甲烷类染料分子在不同添加浓度下的回收率(n=3)

Tab 3 Recovery in different concentrations of addition of 4 kinds fo triphenylmethane dye molecules in medicinal oyster samples(n=3)

三苯甲烷类染料分子	平均回收率/%			RSD/%		
	$0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$0.75\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$1\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$0.75\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$1\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
孔雀石绿	91.3	100.7	96.3	4.4	2.8	3.1
隐色孔雀石绿	101.3	97.7	94.0	3.0	1.6	1.9
结晶紫	99.6	96.5	94.3	4.1	4.7	2.2
隐色结晶紫	98.5	102.1	92.5	2.9	3.5	4.2

2 讨论

2.1 样品的前处理^[2,5,8-9,14-16]

2.1.1 提取的简化 有文献报道,为了提高提取效率,除了使用二氯甲烷溶剂外,须加入对甲苯磺酸。然而这样做的结果是引进了新的有机杂质,对于成分已经非常复杂的牡蛎肉样品与高度敏感的液质串联仪来说,无疑引进了新的杂质,加大了检测干扰。本研究比较了乙酸铵-乙腈作为溶剂提取与单用乙腈提取的效率,二者均很高。考虑牡蛎这样的药用贝类脂肪含量极低,无需使用二氯甲烷来去除油脂,而且为了简化实验步骤而且尽量少地避免过多加入杂质的干扰,本实验决定单使用乙腈作为提取溶剂。

2.1.2 过柱萃取过程 本实验的净化处理可有效提高回收率和富集倍数,且有毒有机溶剂使用量很少,减少了环境污染。利用固相萃取柱吸附液体样品中的目标化合物,分离干扰化合物与样品基质,再洗脱加热解吸附,分离出目标化合物。笔者尝试了中性氧化铝、PCX、WAX 柱单用以及

空白加样:分别精密量取混合标准液适量(相当于 1, 1.5, 2 ng 被测物),添加到 2 g 空白试样中,按“1.5”项下方法处理,回收率结果见表 3。

中性氧化铝小柱和 PCX 小柱组合,发现中性氧化铝小柱和 WAX 小柱串联后使用效果最好。在上样后弃中性氧化铝小柱,可以去掉吸附杂质,使响应灵敏、干扰小,加标实验添加 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时回收率良好。如中性氧化铝小柱上样后没有去掉,则容易引入中性氧化铝小柱吸附的与检测无关的成分。

2.2 干扰与内标校正试验

牡蛎基质成分复杂,其基质抑制效应明显,当检测物含量较低时,测定的标准偏差过大,故只有通过加入内标定量以有效消除基质干扰。而同位素内标具有与待测物相接近的物理与化学性质,作为内标物很理想。孔雀石绿 D5、隐色孔雀石绿 D6、结晶紫 D6 与隐色结晶紫 D6 作为混合内标,可以校正萃取过程中其他基质成分以及杂质对待测离子的干扰。

2.3 方法检出限

由结果可知,各分子的仪器定量限最高者为 $0.964\ 7\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,计算比较后认为,本方法检出限

定为 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 为宜。

2.4 样品测定

对被抽各批次的牡蛎各称取 3 份样品, 每份各 2.0 g, 平行测定, 按本研究方法进行提取、萃取与 LC-MS/MS 测定, 进样量 20.0 μL , 结果见表 4。笔者发现有多批样品三苯甲烷类染料超标, 表明有不法养殖户在养殖或贮藏运输过程中使用了三苯甲烷类染料, 给牡蛎药材带来很大的安全隐患。

表 4 各菜市场牡蛎样品中 4 种三苯甲烷类染料化合物的残留浓度($n=6$)

Tab 4 Concentration of four triphenylmethane dye residues in medicinal oyster samples from several markets($n=6$)

三苯甲烷类 染料残留	残留浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$				
	菜市场甲	菜市场乙	菜市场丙	菜市场丁	菜市场戊
孔雀石绿	0.26	1.74	未检出	0.79	1.03
隐色孔雀石绿	未检出	0.12	0.05	未检出	0.67
结晶紫	1.83	未检出	未检出	2.04	0.48
隐色结晶紫	0.91	未检出	0.07	1.25	未检出

3 结论

本实验采用液相-质谱串联联用法, 使用氘代内标物进行实验校正, 以测定牡蛎药材中三苯甲烷类染料的含量^[5-7], 方法准确灵敏, 回收率高、精密度良好, 适用于牡蛎药材中三苯甲烷类染料的残留检测, 方法检出限低, 作为检测其他药用水产品内三苯甲烷类染料残留量的参考尤为适宜。同时作为重要药材, 建议以后中国药典补充对牡蛎中的孔雀石绿、结晶紫、隐色孔雀石绿与隐色结晶紫限度作出规定, 以保证群众的用药安全^[1]。

REFERENCES

[1] Ch.P(2010)Vol I(中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 161-162.
[2] LIU J, HU H J, ZHANG M Z. Review on toxicity, damage and detection of fishing drug-malachite green [J]. Acta Agricul Zhejiangensis(浙江农业学报), 2006, 18(5): 397-400.
[3] LIB4363, Quantitative and Confirmatory Analyses of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish and Shrimp: Amendment: Application of Laboratory Information Bulletins 4333 and 4334 for the Determination of

Leucomalachite Green and Malachite Green Residues in Catfish, Basa, Tilapia, Trout, and Shrimp [S]. 2005.
[4] LIB4333, Determination and Confirmation of Leucomalachite Green in Salmon: Laboratory Information Bulletin 4333. LIB4334, Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green in Salmon [S]. 2004.
[5] GB/T 19857-2005, Determination of Malachite Green and Crystal Violet Residues in Aquatic Product(水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定) [S]. 2005.
[6] SC/T 3021-2004, Determination of Malachite Green Residues in Fishery Products High Performance of Liquid Chromatography(水产品中孔雀石绿残留量的测定. 液相色谱法) [S]. 2004.
[7] SN/T 1479-2004, Inspection of Malachite Green Residues in Aquatic Products for Import and Export(进出口水产品中孔雀石绿残留量检验方法) [S]. 2004.
[8] GB/T 20361-2006, Determination of Malachite Green and Gentian Violet Residues in Fishery Products-High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector, National Standard of the People's Republic of China (中华人民共和国国家标准) [S]. 2006.
[9] REN X L, WEI Y F, CHENG C P, et al. Research progress of determination of malachite green, crystal violet and their metabolites in aquatic products by HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2007, 17(1): 173-176.
[10] BERGWERFF A A, SCHERPENSISSE P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals [J]. J Chromatography B, 2003, 788(2): 351-359.
[11] TURNIPSEED S B, ANDERSEN W C, ROYBAL J E. Determination and confirmation of malachite green and leucomalachite green residues in salmon using liquid chromatography/mass spectrometry with no-discharge atmospheric pressure chemical ionization [J]. J AOAC Int, 2005, 88(5): 1312-1317.
[12] DOERGE D R, CHURCHWELL M I, GEHRING T A, et al. Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commune Mass Spectrum, 1998, 12(21): 1625-1634.
[13] PLAKAS S M, EI SAID K R, STEHLY G R, et al. Optimization of a liquid chromatographic method for the determination of malachite green and its metabolites in fish tissues [J]. J AOAC Int, 1995, 78(6): 1388-1394.
[14] XIE W, DING H Y, Xi J Y, et al. Determination of residues of malachite green, crystal violet and their metabolites [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2006, 24(5): 529-530.
[15] REN X L, WEI Y F, QU J, et al. Determination of malachite green, crystal violet and their metabolites in aquatic products by RP-HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2006, 16(8): 939-940.
[16] DB33/T 598-2006, Determination of residues of malachite green and its metabolite in aquatic products-lc-ms/ms method, Local Standard of Zhejiang Province (浙江省地方标准) [S]. 2006.

收稿日期: 2011-12-09