

不同水产品中有色和无色孔雀石绿的降解动力学研究

陈永平*, 张素青, 李春青, 李连庆, 马丹, 高丽娜, 张萍

(农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心, 天津 300221)

摘要: **目的** 研究不同水产品基质中有色和无色孔雀石绿的降解规律。**方法** 样品经提取净化后, 用 HPLC 进行检测, 结果用 SPSS 软件、降解动力学软件进行分析。**结果** 三种基质中有色和无色孔雀石绿降解反应均符合准一级反应动力学。在 10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个添加水平下, 三种基质中有色孔雀石绿平均降解率分别为 57.9%、48.0%、23.0%, 无色孔雀石绿平均降解率分别为 46.6%、43.4%、19.8%。添加浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的鲤鱼基质, 采用自然解冻时有色和无色孔雀石绿降解速率常数分别为 $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg})}=0.00338 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg})}=0.00268 \text{ d}^{-1}$, 采用微波解冻方式时有色和无色孔雀石绿降解速率常数分别为 $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg})}=0.00359 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg})}=0.00321 \text{ d}^{-1}$ 。实际样品中无色孔雀石绿降解速率常数 $K_{(111.2 \mu\text{g}/\text{kg} \text{ 无色, 鲤鱼})}=0.000614 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg} \text{ 无色, 鲤鱼})}=0.00125 \text{ d}^{-1}$ 。**结论** 有色孔雀石绿较无色孔雀石绿降解快, 低浓度比高浓度降解快; 两种解冻方式对有色和无色孔雀石绿降解影响较小; 实际样品中无色孔雀石绿降解速率常数均比空白基质中添加无色孔雀石绿降解慢。

关键词: 有色孔雀石绿; 无色孔雀石绿; 水产品; 降解动力学

Studies on degradation kinetics of malachite green and leucomalachite green in different aquatic products

CHEN Yong-Ping*, ZHANG Su-Qing, LI Chun-Qing, LI Lian-Qing, MA Dan, GAO Li-Na, ZHANG Ping

(*Supervision and Test Center for Fisheries Environment and Quality of Fishery Products of Ministry Agriculture, Tianjin 300221, China*)

ABSTRACT: Objective To study degradation kinetics of malachite green and leucomalachite green in different aquatic products. **Methods** After extracted and purified, samples were detected by high pressure liquid chromatography, and the results were analyzed with SPSS software and degradation kinetics software. **Results** Degradation of malachite green and leucomalachite green in different aquatic products' matrix was fit to pseudo-first order kinetics equations. The degradation rates of malachite green were 57.9%, 48.0%, 23.0%, and the degradation rates of leucomalachite green were 46.6%, 43.4%, 19.8% in three aquatic products' matrixes, respectively. For carp matrix added concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, malachite green and leucomalachite green degradation rate constants were $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg})}=0.00338 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg})}=0.00268 \text{ d}^{-1}$ in natural thawing and $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg})}=0.00359 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg})}=0.00321 \text{ d}^{-1}$ in microwave thawing, respectively. The leucomalachite green degradation rate constants in practical samples were $K_{(111.2 \mu\text{g}/\text{kg} \text{ carp})}=0.000614 \text{ d}^{-1}$, and $K_{(50 \mu\text{g}/\text{kg} \text{ carp})}=0.00125 \text{ d}^{-1}$. **Conclusion** Degradation rates of malachite green was faster than that of leucomalachite green. Compared with higher

*通讯作者: 陈永平, 工程师, 主要研究方向为水生生物及生境。E-mail: yongping008@yahoo.com.cn

*Corresponding author: CHEN Yong-Ping, Engineer, Supervision and Test Center for Fisheries Environment and Quality of Fishery Products of Ministry Agriculture, NO. 442, Jiefangnan Road, Hexi District, Tianjin 300221, China. E-mail: yongping008@yahoo.com.cn

concentration, the degradation in low concentration was faster. Two kinds of ways of thawing had no effects on the degradation of malachite green and leucomalachite green. The leucomalachite green degradation rate in practical samples was slower than that in the blank matrix added of leucomalachite.

KEY WORDS: malachite green; leucomalachite green; aquatic products; degradation kinetics

1 引言

随着国内水产养殖规模的扩大、水质污染的日趋严重,水产疾病出现复杂化,表现出疾病多样性、变化快等特点,导致一些抗菌、抗病毒等药物的滥用,加上没有科学的用药指导,兽药残留成为水产品安全的首要问题,直接影响到我国水产品的出口。孔雀石绿虽然被列为国家禁用药物^[1-2],但因孔雀石绿杀灭鱼体寄生虫和鱼卵中霉菌等的效果非常显著,因而在水产养殖上被广泛应用^[3-6]。研究发现孔雀石绿的化学官能团三苯甲烷是一种致癌物质,并能在鱼体内长时间残留,可通过食物链对哺乳动物和人类产生致畸、致癌、致突变等作用^[7]。目前国内外对孔雀石绿在鲜活的水生生物体内的药物代谢研究较多^[8],但对孔雀石绿在水产品基质中的降解规律研究较少。针对目前实际需求,开展有色和无色孔雀石绿在三种代表型基质鲤鱼、鳊鱼、鳙鱼的降解动力学研究,探索孔雀石绿在不同基质中的降解规律,通过评价解冻次数、解冻方式、时间、基质等分别对孔雀石绿药物降解的影响及相关性,确定影响两种药物降解的关键因子。本研究对丰富有色和无色孔雀石绿药物在水产品基质中降解基础理论研究,指导渔业主管监管部门实施水产品质量监督监测方案和农业部技术考核等都有着重要的借鉴意义。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

实验用鱼:鲤鱼、鳊鱼、鳙鱼购自天津市水产研究所增殖站;试剂:孔雀石绿试剂,试剂购自北京六角体科技有限公司;孔雀石绿标准品购自美国Sigma公司。

仪器:高压液相色谱仪Agilent 1200(配荧光检测器与可见检测器);分析天平(0.0001 g)、称样天平(0.001 g)购自瑞士梅特勒-托利多公司;高速组织匀浆机(荷兰飞利浦公司,转速10000 r/min);离心机转速(美国Sigma公司,10000 r/min);漩涡振荡器(上海康华仪器制造厂);固相萃取装置。

标准储备溶液:分别准确称取1.0 mg(精确到0.01 mg)的有(无)色孔雀石绿标准品,用乙腈溶解并定容于10.0 mL容量瓶中,配制成浓度为100 μg/mL的标准储备溶液。

混合标准中间液(1.0 μg/mL):分别准确吸取有(无)色孔雀石绿的标准储备1.0 mL,用乙腈稀释定容至100 mL, -18 °C避光保存3个月。

2.2 实验样品的制备及分组

称取鲤鱼、鳊鱼、鳙鱼的组织匀浆(5±0.02)g分别置于50 mL离心管内(鲤鱼150个,鳊鱼、鳙鱼均为90个)。向鲤鱼、鳊鱼、鳙鱼空白样中分别添加有和无色混合孔雀石绿标准溶液,添加量为10.0、50.0、100.0 μg/kg,考察有和无色混合孔雀石绿在自然解冻、不同储藏时间(1、2、4、10、20、40、60、90、120、150、180、210 d)下的降解情况,比较了50 μg/kg鲤鱼组织采用自然解冻和微波解冻方式的降解差异。

2.3 分析方法

称取均质组织5.00 g,先加入孔雀石绿试剂1,匀浆,再加入试剂2,匀浆,6000 r/min离心,上清液转移至另一塑料离心管中,加入40 mL蒸馏水,混匀,转移至安装在固相萃取柱上的50 mL注射器内,抽滤至干,加入3 mL蒸馏水淋洗,1 mL洗脱液洗脱,上机。结果用SPSS软件、降解动力学软件分析。

2.4 测定

色谱柱:Agilent XDB-C₁₈, 5 μm, 4.6 mm×150 mm;后氧化柱;进样量:50 μL;流速:1.2 mL/min;VWD检测波长:588 nm。流动相:乙酸铵溶液(冰乙酸调pH至4.5):乙腈=20 80(v/v)。

3 结果与分析

在2.4节的色谱条件下对100 ng/mL有色和无色孔雀石绿标准溶液和50 μg/kg样品加标提取液中的有色和无色孔雀石绿进行色谱分析,记录峰面积,响

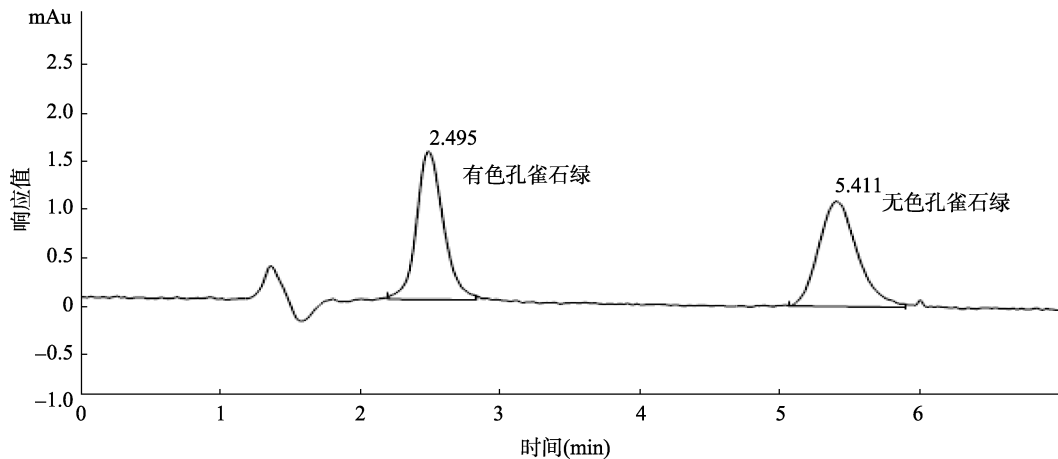


图 1 100 ng/mL 有色和无色孔雀石绿标准图(100 ng/mL)
Fig. 1 Chromatogram of MG and LMG (100 ng/mL)

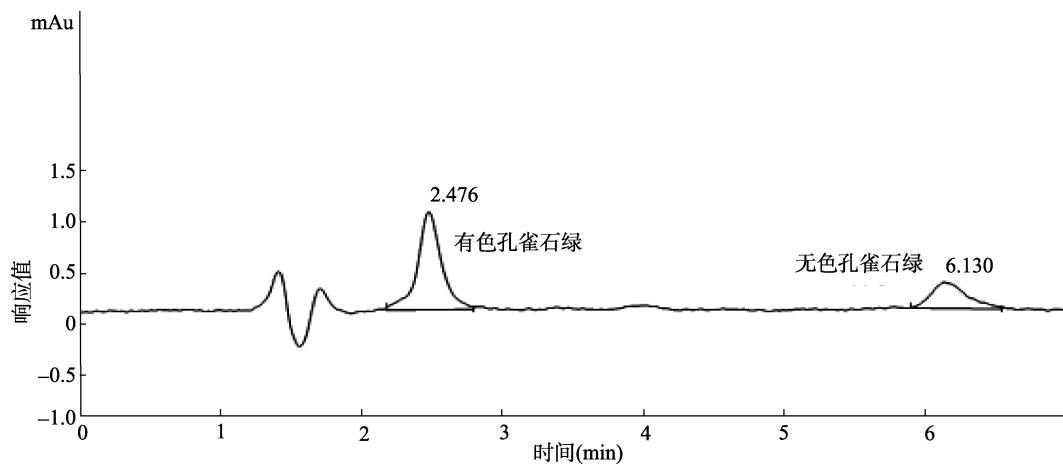


图 2 鲤鱼组织中 50 μg/kg 有色和无色孔雀石绿样品加标色谱图
Fig. 2 Chromatogram of MG in carp sample (50 μg/kg)

应值均在仪器检测的线性范围之内。根据标准样品的保留时间定性, 外标法定量, 100 ng/mL 的有色和无色孔雀石绿标准色谱图及加标图见图 1、2。

表 1、2、3 为鲤鱼、鳊鱼、鳙鱼、组织中均添加 10、50、100 μg/kg 有色和无色孔雀石绿在 1、2、4、10、20、40、60、90、120、150、180、210 d 时降解浓度, 数据显示鲤鱼组织中有色和无色孔雀石绿降解最快, 鳙鱼次之、鳊鱼最慢, 三种组织中 10 μg/kg 有色和无色孔雀石绿加标浓度降解最快, 50 μg/kg 有色和无色孔雀石绿加标浓度降解次之, 100 μg/kg 有色和无色孔雀石绿加标浓度降解最慢, 结果表明含脂肪较多的基质降解较慢, 孔雀石绿浓度越高降解越慢。

数据采用 SPSS 和降解动力学软件分析, 三种基质鲤鱼、鳊鱼、鳙鱼组织中有色和无色孔雀石绿降解

反应均符合准一级反应动力学。且经 F 检验, 在 $\alpha < 0.01$ 的水平下显著。X 表示降解时间 t/d , Y 表示 t 时间的残留浓度 C_t , K 为降解速率常数。三种基质中添加 10、50、100 μg/kg 有色孔雀石绿, 测定结果数据经降解动力学软件分析, 有色孔雀石绿准一级反应速率常数按由大到小的顺序依次为: $K_{(10 \mu\text{g/kg 有色, 鲤鱼})} = 0.005770 \text{ d}^{-1}$, $K_{(10 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})} = 0.00315 \text{ d}^{-1}$, $K_{(10 \mu\text{g/kg 有色, 鳙鱼})} = 0.004076 \text{ d}^{-1}$; $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鲤鱼})} = 0.00338 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})} = 0.00264 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鳙鱼})} = 0.00334 \text{ d}^{-1}$; $K_{(100 \mu\text{g/kg 有色, 鲤鱼})} = 0.00145 \text{ d}^{-1}$, $K_{(100 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})} = 0.00127 \text{ d}^{-1}$, $K_{(100 \mu\text{g/kg 有色, 鳙鱼})} = 0.00128 \text{ d}^{-1}$; 无色孔雀石绿准一级反应速率常数按由大到小的顺序依次为: $K_{(10 \mu\text{g/kg 有色, 无色})} = 0.00425 \text{ d}^{-1}$, $K_{(10 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})} = 0.00338 \text{ d}^{-1}$,

表1 鲤鱼组织中有(无)色孔雀石绿降解浓度-时间表
Table 1 Concentration-time of MG and LMG in carp matrix

时间/d	加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
	10		50		100	
	MG/LMG	LMG	MG/LMG	LMG	MG/LMG	LMG
1	9.4	9.6	42.4	45.1	93.3	94.5
2	9.1	9.4	41.6	44.5	92.6	94.0
4	8.8	9.2	39.8	43.3	91.2	93.1
10	8.4	8.9	38.5	41.2	89.4	92.3
20	7.7	8.6	36.2	39.1	88.5	90.4
40	6.9	8.2	34.4	37.2	86.7	88.6
60	6.1	7.6	31.3	35.5	84.1	87.2
90	5.3	7.0	29.1	33.6	81.5	84.7
120	4.5	6.5	27.3	31.4	78.1	81.3
150	3.8	5.9	24.5	29.6	76.4	78.5
180	3.3	5.3	22.8	27.6	72.2	76.6
210	3.0	4.8	20.5	24.5	70.7	74.3

表2 鳗鲡组织中有(无)色孔雀石绿在降解浓度-时间表
Table 2 Concentration-time relationship of MG and LMG in eel matrix

时间/d	加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
	10		50		100	
	MG/LMG	LMG	MG/LMG	LMG	MG/LMG	LMG
1	9.2	9.4	41.1	43.4	92.6	93.7
2	9.1	9.3	40.5	42.6	91.8	93.5
4	8.9	9.1	39.4	41.4	90.4	93.1
10	8.6	8.9	38.2	40.1	88.7	92.4
20	8.2	8.6	36.8	38.5	87.7	91.5
40	7.7	8.3	35.1	37.5	86.1	89.7
60	7.2	7.9	33.3	35.3	84.4	87.9
90	6.6	7.4	32.6	33.4	82.5	85.6
120	6.2	6.8	30.4	31.1	80.2	83.4
150	5.8	6.4	28.4	29.7	77.7	82.1
180	5.5	5.9	26.5	28.1	74.5	80.4
210	4.9	5.4	24.2	26.5	73.8	78.5

表3 鳊鱼组织中有(无)色孔雀石绿降解浓度-时间表
Table 3 Concentration-time of MG and LMG in mandarinfish matrix

时间/d	加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
	10		50		100	
	MG/LMG	LMG	MG/LMG	LMG	MG/LMG	LMG
1	9.3	8.9	42.3	45.2	94.3	94.4
2	9.1	8.8	41.2	44.3	93.6	93.7
4	8.7	8.6	40.3	43.6	92.2	92.8
10	8.2	8.3	38.4	41.9	90.9	91.1
20	7.8	7.9	36.1	40.5	88.8	89.5
40	7.3	7.7	34.5	38.2	86.4	87.3
60	6.5	7.3	32.6	36.1	84.8	85.6
90	5.7	6.8	29.7	33.9	81.7	83.5
120	5.1	6.5	27.2	31.5	78.1	81.2
150	4.7	5.9	24.4	29.4	76.7	79.6
180	4.4	5.3	22.8	27.3	74.4	76.5
210	3.8	4.7	20.7	24.6	71.3	73.7

$K_{(10 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})}=0.00387 \text{ d}^{-1}$; $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鲤鱼})}=0.00268 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})}=0.00145 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})}=0.00275 \text{ d}^{-1}$; $K_{(100 \mu\text{g/kg 有色, 鲤鱼})}=0.00127 \text{ d}^{-1}$, $K_{(100 \mu\text{g/kg$

$\text{有色, 鲤鱼})}=0.00085 \text{ d}^{-1}$, $K_{(100 \mu\text{g/kg 有色, 鲤鱼})}=0.00110 \text{ d}^{-1}$ 。数据表明高浓度有无色孔雀石绿较低浓度降解慢, 分析原因可能和反应体积有关, 降解产物抑制降解放

表 4 鲤鱼组织不同解冻方式及阳性样品中有(无)色孔雀石绿降解浓度-时间表

Table 4 Concentration-time of MG(LMG) by different thawing mode and positive samples in carp matrix

t/d	自然解冻		微波解冻		实际样品分析	
	MG/LMG	LMG	鲤鱼(50 μg/kg)		Sample 1	Sample 2
			MG/LMG	LMG	LMG	LMG
1	42.4	45.1	41.0	44.4	111.2	54.6
2	41.6	44.5	40.2	43.5	110.5	54.3
4	39.8	43.3	39.3	42.7	109.6	53.9
10	38.5	41.2	38.5	41.8	108.8	53.2
20	36.2	39.1	37.2	40.4	107.7	51.6
40	34.4	37.2	35.6	38.9	106.5	50.3
60	31.3	35.5	32.8	36.2	104.8	48.8
90	29.1	33.6	29.5	33.1	103.3	47.2
120	27.3	31.4	26.4	30.5	102.2	45.6
150	24.5	29.6	23.6	27.3	101.3	44.4
180	22.8	27.6	21.3	24.6	99.6	43.2
210	20.5	24.5	18.5	21.2	95.4	42.4

表 5 鲤鱼、鳊鱼、鳊鱼组织中不同浓度有无色孔雀石绿 210 d 后降解率表

Table 5 Degradation rate of different MG(LMG) spiked concentration in carp, eel and mandarinfish matrix after 210 d

μg/kg	鲤鱼		鳊鱼		鳊鱼		鲤鱼	鳊鱼
	MG/LMG 降解率 %	LMG 降解率 %	MG/LMG 降解率 %	LMG 降解率 %	MG/LMG 降解率 %	LMG 降解率 %	样 1/LMG 降解率 %	样 2/LMG 降解率 %
10	68	50	46.7	42.5	59.1	47.2	---	---
50	51.7	45.7	41.1	38.9	51.1	45.6	---	---
100	24.2	21.4	20.3	16.2	24.4	21.9	---	---
114.2	---	---	---	---	---	---	14.2	---
54.6	---	---	---	---	---	---	---	12.2

应的速率。

由表 4 看出微波解冻方式有无色孔雀石绿降解较自然解冻方式快, 但效果不明显, 阳性样品中无色孔雀石绿降解比上述添加约同等浓度孔雀石绿降解慢, 分析原因可能是孔雀石绿与基质结合方式不同有关。

根据降解率公式 $y=C_t/C_0$, 由表 5 得知, 在三种基质中添加 10、50、100 μg/kg 有色孔雀石绿平均降解率分别为 57.9%、48.0%、23.0%, 无色孔雀石绿平均降解率分别为 46.6%、43.4%、19.8%, 有色孔雀石绿较无色孔雀石绿降解快, 低浓度较高浓度降解快。鲤鱼基质中添加浓度为 50 μg/kg 采用自然解冻时有

色和无色孔雀石绿降解速率常数 $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})}=0.00338 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鲤鱼})}=0.00268 \text{ d}^{-1}$, 采用微波解冻方式时有色无色孔雀石绿降解速率常数 $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})}=0.00359 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g/kg 有色, 鳊鱼})}=0.00321 \text{ d}^{-1}$, 数据表明采用微波解冻方式有色和无色孔雀石绿降解较快, 分析原因可能是微波对有色和无色孔雀石绿降解反应起了一定的催化作用, 具体原因需进一步研究。实际阳性样品中无色孔雀石绿降解特性。 $K_{(111.2 \mu\text{g/kg 无色, 鳊鱼})}=0.000614 \text{ d}^{-1}$, $K_{(50 \mu\text{g/kg 无色, 鳊鱼})}=0.00125 \text{ d}^{-1}$, 均比空白基质中添加无色孔雀石绿降解慢, 分析原因这可能与无色孔雀石绿在活的生物体基质结合的方式不同, 影响了无色孔雀石绿的降解。

4 结 论

本研究选取实际检出率最高的鲤鱼、鳊鱼、鳊鱼为实验基质,对有色和无色孔雀石绿降解特性进行研究,比较了三个添加浓度梯度:10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 降解规律,鲤鱼基质中添加浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 有色和无色孔雀石绿采用自然解冻和微波解冻的方式对其降解的影响,最后分析测定实际阳性样品中的无色孔雀石绿降解特性,最后用 spss 软件、降解动力学软件分析了降解规律及影响有色和无色孔雀石绿降解的关键因子。

鳊鱼中无色孔雀石绿降解最慢、鳊鱼次之、鲤鱼最快,分析原因可能是有无孔雀石绿和基质组织中脂肪含量和结合方式有关,影响了有色和无色孔雀石绿的降解。高浓度时有色和无色孔雀石绿较低浓度时降解慢,分析原因可能和反应体积有关,降解产物抑制降解放应的速率。微波解冻方式孔雀石绿降解比自然解冻方式较快,但效果不明显。实际阳性样品中无色孔雀石绿均比空白基质中添加无色孔雀石绿降解慢,分析原因这可能与无色孔雀石绿在活的生物体基质结合的方式不同,影响了无色孔雀石绿的降解。

参考文献

- [1] 桂英爱,王洪军,刘春林.孔雀石绿及其代谢产物在水产动物体内的残留、危害及检测研究进展[J].大连水产学院学报,2007,22(4):294-298.
Gui YA, Wang HJ, Liu CL. Potential hazards of malachite green residues and its metabolites and detection in aquatic animals [J]. J Dalian Fish Univ, 2007, 22(4): 294-298.
- [2] 曲志娜,李存金,赵思俊.孔雀石绿及其代谢物在大菱鲆肌肉中的消除规律[J].水产渔业科学,2008,24(6):491-496.
Qu ZN, Li CJ, Zhao SJ. Study on Eliminate of Malachite Green and its Metabolite in Turbot Muscle [J]. Chin Agr Sci Bull, 2008, 24(6): 491-496.
- [3] 李红霞,那广水,贺伟.孔雀石绿及其代谢物研究概况[J].水产科学,2008,27(8):430-432.
Li HX, Na GS, He W. Advances in Studies on Malachite Green and Leucomalachite Green [J]. Fish Sci, 2008, 27(8): 430-432.
- [4] 邱绪建,林洪,王联珠.孔雀石绿及其代谢物无色孔雀石绿在鲫鱼肌肉中的代谢规律[J].中国海洋大学学报,2006,36(5):745-748.
Qiu XJ, Lin H, Wang LZ. Study on Metabolism of Malachite Green in Crucian (*Carassius auratus*) Muscle [J]. Period Ocean Univ China, 2006, 36(5): 745-748.
- [5] Liewes E, Haenen O. The veterinary approach to eels [M]. BROWN L. Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine. Pergamon, New York, 1993: 311-326.
- [6] Scott P. Therapy in aquaculture [M]. ROWN L. Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine. Pergamon, New York, 1993: 131-152.
- [7] 余培建.降解水体中孔雀石绿的药物的初步研究[J].水生态学杂志,2009,2(1):21-24.
Yu PJ. Degradation of Malachite Green in the Fishery Water by Medicine [J]. J Hydroecol, 2009, 2(1): 21-24.
- [8] 高露姣,蔡友琼,姜朝军.孔雀石绿及其主要代谢产物在欧洲鳊鱼肌肉中的蓄积及消除规律[J].水产学报,2007,31卷增刊:104-108.
Gao LJ, Cai YQ, Jiang CJ. Accumulation and elimination of malachite green and its primary metabolite in juvenile European eels (*Anguilla anguilla*) muscle [J]. J Fish of China, 2007, 31(suppl): 104-108.

(责任编辑:张宏梁)

作者简介



陈永平,工程师,主要研究方向为水生生物学及生境。

E-mail: yongping008@yahoo.com.cn