

# 液质联用法对鱼类水产品中孔雀石绿的调查分析

岳亚军\*, 夏伟, 游杰, 张律, 朱波

(深圳市罗湖区疾病预防控制中心, 深圳 518020)

**摘要:** **目的** 通过对本辖区学校食堂和水产市场的鱼类水产品进行孔雀石绿的监测, 调查孔雀石绿在不同品种鱼类体内的污染状况。**方法** 选用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱, 以 10 mmol/L 甲酸铵-0.1% 甲酸:乙腈为流动相, 采用梯度洗脱进行分离。鱼肉样品中加入内标和酸性氧化铝, 用乙腈提取, 多重态反应监测 (MRM) 方式检测。**结果** 238 份涉及共 9 个品鱼肉样本中, 阳性率为 16.2%~71.4%, 其中桂花鱼、鲢鱼、鲫鱼三种阳性率相对较高。**结论** 本方法样品处理简便、检测结果准确可靠, 孔雀石绿在淡水鱼的养殖和运输中仍有滥用, 其含量与环境温度、鱼的品种有一定关系。

**关键词:** 孔雀石绿; 隐色孔雀石绿; 高效液相色谱-串联质谱法

## Investigation of malachite green in aquatic fish by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry

YUE Ya-Jun\*, XIA Wei, YOU Jie, ZHANG Lv, ZHU Bo

(Shenzhen Luohu Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the malachite green pollution in different varieties of fish by monitoring of malachite green in fish aquatic products in the area of school canteens and aquatic products market. **Methods** Malachite green was extracted from fish muscle by acetonitrile with adding internal standard compound and acidic alumina, and then separated by Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> column with 10 mmol/L ammonium formate-0.1% formic acid and acetonitrile as mobile phase by gradient elution. Detection was carried out by multiple reaction monitoring. **Results** In 238 specimens involving 9 kind of fish, the positive rate was from 16.2% to 71.4%, among which the positive rate of mandarin fish, grass carp and crucian were relatively higher. **Conclusion** The method is accurate and reliable with simple sample preparation. Malachite green is still abused in freshwater fish breeding and transportation, and its content has certain relationship between the environment temperature and the varieties of fish.

**KEY WORDS:** malachite green; leucomalachite green; liquid chromatography mass spectrometry-mass spectrometry

## 1 引言

孔雀石绿(malachite green, MG)是一种带有金属光泽的绿色结晶体,它进入人类或动物机体后,可以

通过生物转化,还原代谢成脂溶性隐色孔雀石绿(leucomalachite green, LMG),具有高毒素、高残留和致癌、致畸、致突变作用,严重危害人体健康<sup>[1]</sup>。由于孔雀石绿在水产品养殖和运输过程中,能够预防

\*通讯作者: 岳亚军, 副主任技师, 主要从事食品卫生、生物毒素检测研究工作。E-mail: yueyajun1978@126.com

\*Corresponding author: YUE Ya-Jun, Docimaster, Luohu Center for Disease Control and Prevention, No. 25, Beili South Road, Shenzhen 518020, China. E-mail: yueyajun1978@126.com

和治疗鱼类中高发的水霉病、鳃霉病和小瓜虫病,降低鱼类的死亡率,而且其价格低廉,许多国家过去曾将其作为驱虫剂、杀菌剂广泛使用<sup>[2]</sup>。目前,水产品国际商贸中,孔雀石绿成为必检且限制极严的一项指标,欧美多个国家将其列为不得检出的禁用药物<sup>[3,4]</sup>。我国农业部已于2002年5月将孔雀石绿列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》中,禁止用于所有食品动物。同时还颁布《无公害食品标准水产品中渔药残留限量》(NY 5070-2002),明确指出孔雀石绿不得检出<sup>[4]</sup>。但由于孔雀石绿价格低廉,使用方便且效果较好,目前仍被部分国家和地区非法使用。

检测孔雀石绿的方法主要有高效液相色谱法<sup>[5-10]</sup>、液相色谱质谱串联法<sup>[11-14]</sup>、酶联免疫法<sup>[15,16]</sup>等。目前国内检测孔雀石绿的标准方法主要是 GB/T 19857-2005,采用液相色谱法或液质串联方法<sup>[17]</sup>。本文参考该标准方法,采用三重四级杆液质串联(LC-MS/MS)技术,对样品前处理过程进行优化,使样品前处理操作过程更为简便和快速、结果更准确。本调查对近三年来深圳市罗湖区的学校食堂和部分水产品市场所售卖鱼类产品中孔雀石绿的污染状况进行监测,分析不同种类淡水鱼体内孔雀石绿含量状况,并向有关食品安全管理部门提供食品安全风险预警,为保障本辖区群众饮食健康做出积极贡献。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

#### 2.1.1 仪器

三重四级杆液质联用仪(6410B, 美国 Agilent 公司); 高速低温离心机(3K30, 美国 Sigma 公司); 定量浓缩仪(Turbo Vap II, 美国 Biotage 公司)。

#### 2.1.2 试剂

去离子水(Millipore Q, 美国), 乙腈色谱纯, (TEDIA), 甲酸(色谱纯, MERCK), 甲酸铵(色谱

纯, Alfa Aesar), 酸性氧化铝(200目, 分析纯), 孔雀石绿(MG)、D5-孔雀石绿(D5-MG)、隐色孔雀石绿(LMG)、D6-隐色孔雀石绿(D6-LMG)标准品均购自德国 DR 公司(纯度>99%)。

#### 2.1.3 标准溶液的配制

标准溶液储备液: 准确称取一定质量的孔雀石绿等标准品于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈:水(50:50, v:v)准确定容至刻度并于-20 °C 下保存。标准溶液使用液: 用流动相初始比例溶液稀释标准储备液得到一定浓度标准溶液使用液。

#### 2.1.4 样品

各种鱼类样品均采集自本地学校食堂以及农贸市场。

## 2.2 样品前处理

取经过匀质的试样 5.0 g 于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 5.0 g 酸性氧化铝, 加入一定量内标物 D5-孔雀石绿和 D6-隐色孔雀石绿, 然后再加入 20 mL 乙腈, 振荡提取 30 min, 离心(8000 r/min, 10 min, 4 °C), 然后准确吸取 10 mL 上清液于氮吹管中, 35 °C 水浴氮吹近干, 用初始流动相溶液准确定容至 1 mL, 高速离心(13000 r/min, 30 min)后过 0.2 μm 滤膜, 上机测定。

## 2.3 仪器条件

### 2.3.1 质谱条件

质谱条件: 电离源 ESI(+), 干燥气温度: 350 °C, 干燥气流量: 11.0 L/min, 雾化压力: 38 psi, 毛细管电压: 4000 V, 碎片电压: 100 V, 监测模式: MRM。孔雀石绿、隐色孔雀石绿及内标物的质谱参数见表 1。

### 2.3.2 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); 进样量 5.0 μL; 流动相: A 为 10 mmol/L 甲酸铵-0.1%甲酸水, B 为乙腈; 流速: 0.4 mL/min, 梯度洗脱; 柱温: 40 °C。

表 1 MG、D5-MG、LMG、D6-LMG 的质谱参数  
Table 1 MS parameters for MG, D5-MG, LMG and D6-LMG

化合物	保留时间(min)	母离子( <i>m/z</i> )	子离子( <i>m/z</i> )	碰撞能量(V)
MG	2.367	329.3	313.3/208.2	40
D5-MG	2.364	334.4	318.3	30
LMG	3.066	331.3	316.3/239.2	30
D6-LMG	3.054	337.3	322.3	20

### 3 结果与分析

#### 3.1 方法选择性

取空白鱼肉,按 2.2 方法处理后与空白基质加标样品进行分析,结果空白基质中在孔雀石绿和隐色孔雀石绿出峰位置上无响应(图 1),说明空白基质无干扰,方法选择性较好。

#### 3.2 标准溶液的线性关系结果和检出限

用初始流动相将标准储备液稀释成一系列浓度,以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回

归。以 3 倍信噪比(S/N = 3)对应浓度作为检出限(LOD)。在线性范围内分别做高、中、低浓度加标回收率测定。具体参数见表 2。

#### 3.3 样本检测结果

从 2012 年开始,连续 3 年对本辖区中小学食堂和部分水产品市场的鱼类产品进行孔雀石绿监测,涉及品种有鲢鱼、鲫鱼、桂花鱼等共 9 个品种,共采集样本 238 份,不同品种的阳性率为 16.2%~71.4%,其中桂花鱼、脆肉鲢鱼、鲫鱼、鲢鱼阳性率较高,具体检测结果见表 3。

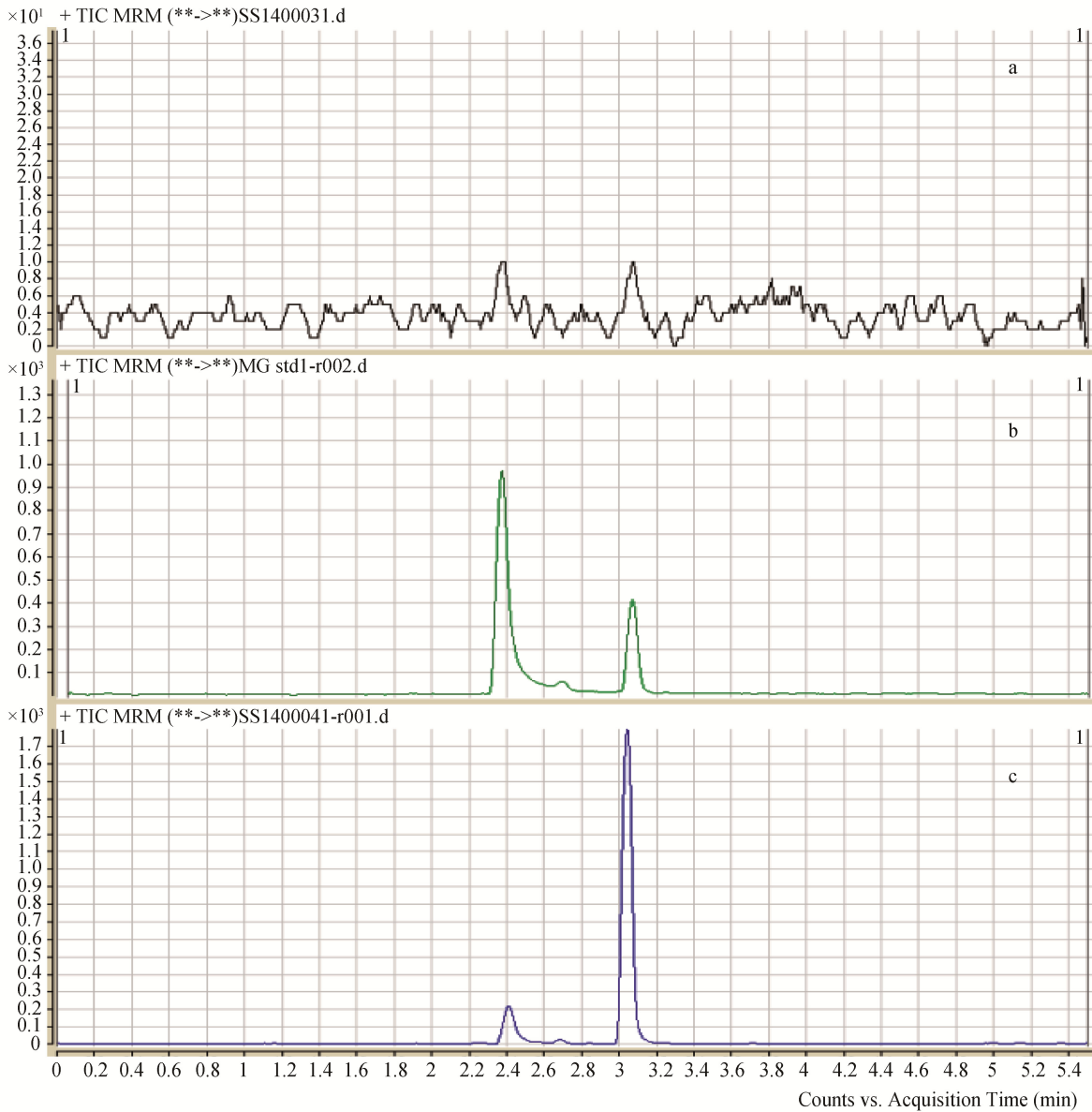


图 1 空白鱼肉

Fig. 1 MRM Chromatogram (a) MG 和 LMG(b)、空白鱼肉加标(c)的 MRM 色谱图

表2 MG和LMG的线性范围、检出限、回收率  
Table 2 Linear range, detection limit, and recoveries of MG and LMG

化合物	线性范围(ng/mL)	相关系数	检出限( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率(%)
MG	0.5~50	0.9992	0.5	91.0~98.3
LMG	0.51~51	0.9994	0.5	92.0~98.5

表3 2012~2014年本辖区不同鱼种的孔雀石绿监测状况  
Table 3 Monitoring of malachite green in different varieties of fish in 2012~2014

种类	采样数	阳性数	阳性率(%)	平均值( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
鲢鱼	124	28	22.6	17.6
鲫鱼	48	14	29.2	3.95
桂花鱼	7	5	71.4	22.0
鲈鱼	5	1	20	2.1
脆肉鲢鱼	5	3	60	33.7
大头鱼	37	6	16.2	1.9
鲤鱼	3	1	33.3	2.1
多宝鱼	4	0	0	0
鲢鱼	5	0	0	0

## 4 讨论

### 4.1 样品前处理

目前国内采用液质联用仪检测孔雀石绿的方法中,大多数样品前处理方法都是采用乙腈提取,然后用中性氧化铝或阳离子交换柱进行固相萃取,费时且成本较高。本文采用酸性氧化铝和乙腈提取后,无需过固相萃取小柱,高速离心后过 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜后直接上机测定,操作简便、成本低、回收率较高,能够满足鱼类水产品中孔雀石绿的痕量检测。

### 4.2 监测结果分析

我们通过对罗湖区部分学校食堂和水产品市场的淡水鱼类产品进行连续三年的抽样监测,涉及鲢鱼、鲫鱼、桂花鱼等共9个品种,除了多宝鱼和鲢鱼没有检出孔雀石绿外,其他鱼类不同程度均有检出,其中桂花鱼、鲢鱼、鲫鱼阳性率较高。监测表明,孔雀石绿的检出与采样的季节和水温有关,水温较低情况下鱼类抵抗力下降、更容易发病;从鱼种形态结构来看,鳞片较大的鱼种例如鲫鱼,由于运输密度大更容易刮伤而发病。因此,监管部门应该在秋冬季加大对鲫鱼等阳性率较高的淡水鱼类产品监测,保障人民群众饮食健康。

## 5 结论

本文采用三重四级杆——液质联用技术对鲢鱼、鲫鱼、桂花鱼等共9个品种的水产品中的孔雀石绿进行连续三年的监测,该方法样品前处理简单、快速,检测结果准确可靠。监测结果表明:淡水鱼中孔雀石绿检出率较高,其中桂花鱼、脆肉鲢鱼、鲫鱼、鲢鱼阳性率较高,而且在春冬季水温较低环境下,孔雀石绿含量更高。建议相关监管部门应该针对孔雀石绿高发品种和季节,加强监管以保证广大人民群众饮食健康。

### 参考文献

- [1] 郭睿, 张海云, 齐海霞, 等. 孔雀石绿检测方法探析[J]. 北京农业, 2013, 7(21): 215-216.  
Guo R, Zhang HY, Qi HX, *et al.* Analysis on determination of malachite green [J]. Beijing Agric, 2013, 7(21): 215-216.
- [2] 徐向荣, 郝青, 彭加喜, 等. 水产品中残留孔雀石绿研究进展[J]. 热带海洋学报, 2013, 32(4): 97-106.  
Xu XR, Hao Q, Peng JX, *et al.* Recent studies on residual malachite green in aquatic products [J]. J Trop Oceanogr, 2013, 32(4): 97-106.
- [3] 彭贞, 郑玉琴. 孔雀石绿与蛋白质相互作用的电化学行为的

- 研究[J]. 化学试剂, 2009, 31(1): 49-51.
- Peng Z, Zheng YQ. Electrochemical study on the interaction between malachite green and bovine serum albumin (BSA) [J]. Chem Reagents, 2009, 31(1): 49-51.
- [4] 孙满义, 杨贤庆, 岑剑伟. 水产品中孔雀石绿的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009, 30(2): 312-315.
- Sun MY, Yang XQ, Cen JW. Research progress of malachite green in fishery [J]. Sci Technol Ind, 2009, 30(2): 312-315.
- [5] 周兵, 陈璐, 李英华. 几种水产品中隐性孔雀石绿残留量的测定[J]. 广州化工, 2011, 39(21): 115-118.
- Zhou B, Chen L, Li YH. The determination of leucomalachite green Residues in several of aquatic products [J]. Guangzhou Chem Ind, 2011, 39(21): 115-118
- [6] 罗瑞峰, 罗小玲, 马小宁. 水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物检测方法的探讨[J]. 化学分析计量, 2011, 20(3): 40-42.
- Luo RF, Luo XL, Ma XN. Determination method of malachite green, crystal violet and its corresponding leuco compounds in aquatic products [J]. Chem Anal Meterage, 2011, 20(3): 40-42.
- [7] 郑斌, 赵红萍, 冷凯良, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定鳊鲮中孔雀石绿和结晶紫残留[J]. 中国水产科学, 2007, 14(6): 1038-1041.
- Zheng B, Zhao HP, Leng KL, *et al.* Determination of malachite green and gentian violet residues in *Anguilla japonica* by high performance liquid chromatography with fluorescence detector [J]. J Fish Sci China, 2007, 14(6): 1038-1041.
- [8] Rushing LG, Thompson HC. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco metabolites in catfish or trout tissue by high performance liquid chromatography with visible detection [J]. J Chromatogr B, 1997, 688(2): 325-330.
- [9] Halme K, Lindfors E, Peltonen K. Determination of malachite green residues in rainbow trout muscle with liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. Food Addit Contam, 2004, 21(7): 641-648.
- [10] Rushing LG, Hansen EB. Confirmation of malachite green, gentian violet and their leuco analogs in catfish and trout tissue by high-performance liquid chromatography utilizing electrochemistry with ultraviolet-visible diode array detection and fluorescence detection [J]. J Chromatogr B, 1997, 700(1-2): 223-231.
- [11] Bergwerff AA, Scherpenisse P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals [J]. J Chromatogr B, 2003, 788(2): 351-359.
- [12] Safarik I, Safarikova M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water [J]. Water Res, 2002, 36(1): 196-200.
- [13] Valle L, Diaz C, Zanocco A L, *et al.* Determination of the sum malachite green and leucomalachite green in salmon muscle by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2005, 1067(1-2): 101-105.
- [14] 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、结晶紫及其代谢产物残留量[J]. 质谱学报, 2013, 34(5): 294-299.
- Zhou YB, Wu K, Liu LY, *et al.* Determination of malachite green, crystal violet and their metabolites contents in fishes by UPLC-MS/MS [J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2013, 34(5): 294-299.
- [15] 何方洋, 万宇平, 罗晓琴, 等. 应用 ELISA 试剂盒检测鱼肉中孔雀石绿和结晶紫[J]. 福建水产, 2013, 35(2): 118-123.
- He FY, Wan YP, Luo XQ, *et al.* Development of enzyme-linked immune-sorbent assay for detection of malachite green and crystal violet residue in fish [J]. J Fujian Fish, 2013, 35(2): 118-123.
- [16] 邢玮玮, 王榕妹, 王俊卿, 等. 酶联免疫吸附分析法测定水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿[J]. 化学研究与应用, 2010, 22(1): 42-46.
- Xing WW, Wang RM, Wang JQ, *et al.* Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of malachite green and leucomalachite green in fish and fishpond water samples [J]. Chem Res Appl, 2010, 22(1): 42-46.
- [17] GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定[S].
- GB/T 19857-2005 Determination of malachite green and crystal violet residues in aquatic product [S].

(责任编辑: 李振飞)

## 作者简介



岳亚军, 副主任技师, 主要研究方向为食品卫生、生物毒素检测。  
E-mail: yueyajun1978@126.com