

# 水产品中孔雀石绿检测方法的研究进展

李周敏<sup>1\*</sup>, 汤迪朋<sup>2</sup>, 陈炳丰<sup>1</sup>, 常博文<sup>1</sup>, 许丹科<sup>3</sup>

(1. 南京大学金陵学院, 南京 210089; 2. 南京祥中生物科技有限公司, 南京 210022;  
3. 南京大学化学化工学院, 南京 210023)

**摘要:** 孔雀石绿(malachite green, MG)由于其对水产品疾病防治的高效性和低廉的成本而被广泛用作水产养殖业的杀菌剂和杀寄生虫剂, 因此常见于水产品和环境用水中。但是, MG 及其主要代谢产物隐性孔雀石绿(leuco-malachite green, LMG)也是有毒的有机污染物, 对人体和其他生物的健康有害。近年来, 已经提出了用于检测 MG 和 LMG 的多种方法。用于测定各种基质中 MG 和 LMG 的分析方法包括高效液相色谱法(与紫外-可见、荧光、质谱等检测器联用)、光谱法(紫外-可见分光光度法、荧光法、表面增强拉曼光谱法等)、电化学方法、免疫学测定法(酶联免疫法、化学发光免疫法、免疫层析法等)。本文对近 10 年来孔雀石绿和隐性孔雀石绿的检测方法进行综述, 并讨论了孔雀石绿和隐性孔雀石绿的未来检测发展趋势和所面临的挑战, 为水产中孔雀石绿的检测方法提供一定参考。

**关键词:** 水产品; 孔雀石绿; 隐性孔雀石绿; 检测方法

## Research progress on the detection methods of malachite green in aquatic products

LI Zhou-Min<sup>1\*</sup>, TANG Di-Peng<sup>2</sup>, CHEN Bing-Feng<sup>1</sup>, CHANG Bo-Wen<sup>1</sup>, XU Dan-Ke<sup>3</sup>

(1. Jinling College, Nanjing University, Nanjing 210089, China; 2. Nanjing Xiangzhong Biological Technology Co., Ltd., Nanjing 210022, China; 3. Nanjing University, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT:** Malachite green (MG) is widely used as a fungicide and parasiticide in aquaculture due to its high efficiency and low cost, so it is commonly used in aquatic products and environmental water. However, MG and its major metabolite, leuco-malachite green (LMG), are also toxic inorganic contaminants that are harmful to human and other biological health. In recent years, various methods for detecting MG and LMG have been proposed. Analytical methods for the determination of MG and LMG in various matrices include high performance liquid chromatography (in combination with detectors such as uv-vis, fluorescence, and mass spectrometry), spectroscopy (uv-vis spectrophotometry, fluorescence, surface-enhanced Raman spectroscopy, etc.), electrochemical methods, and immunological assays (enzyme-linked immunosorbent assay, chemiluminescent immunoassay, and immunochromatographic assay). This paper reviewed the detection methods of malachite green and recessive

**基金项目:** 江苏省高校“青蓝工程”项目(0010392001)、南京大学金陵学院教学改革项目(0010522020)、江苏省大学生创新创业训练项目(202013646058X)

**Fund:** Supported by the Jiangsu University “Qinglan” Project (0010392001), Educational Reform Project of Jinling College Nanjing University (0010522020), and Jiangsu Province University Student Innovation and Entrepreneurship Training Project (202013646058X)

\***通信作者:** 李周敏, 博士, 主要研究方向为生物芯片检测技术在食品安全检测中的应用。E-mail: lizhoumin@126.com

\***Corresponding author:** LI Zhou-Min, Ph.D, Jinling College, Nanjing University, No.8, Xuefu Road, Pukou District, Nanjing 210089, China. E-mail: lizhoumin@126.com

malachite green in the past 10 years, and discussed the future detection development trends and challenges of malachite green and recessive malachite green, which provided some reference for the detection methods of malachite green in aquatic products.

**KEY WORDS:** aquatic products; malachite green; leuco-malachite green; detection methods

## 0 引言

孔雀石绿(malachite green, MG)又可以称做苯胺绿,为绿色带有金属光泽的晶体,是一种三苯甲烷类染料和药物。孔雀石绿作为工业性染料广泛用于丝绸、皮革、羊毛等方面,且由于 MG 具有抗菌杀虫作用,所以它又被用作驱虫剂、杀菌剂和防腐剂。孔雀石绿进入水生动物体后经过一系列的代谢变成了隐性孔雀石绿(leuco-malachite green, LMG)并在脂肪组织中蓄积,且通过食物链转化进入人体。由于 MG 的高毒性以及致畸性、致癌和致突变性,因此对人体具有许多不利影响。此外,水产养殖用水中残留的 MG 也可能对水资源造成严重污染。因此,农业农村部将孔雀石绿列为禁用药物,目前检测机构都把水产品中孔雀石绿作为监测对象,但由于其成本低,效率高,仍然在某些地区得到广泛使用,在水产品和水产养殖用水中经常发现 MG 残留<sup>[1-2]</sup>。本文对近 10 年来孔雀石绿和隐性孔雀石绿的检测方法进行综述,并讨论孔雀石绿和隐性孔雀石绿的未来检测发展趋势和所面临的挑战,为水产中孔雀石绿的检测方法提供一定参考。

## 1 水产品中孔雀石绿的检测方法

在水生动物体内孔雀石绿经过一系列生物反应很容易转为毒性更强的隐性孔雀石绿,因此常将二者的总含量作为检测水产品中孔雀石绿残留量的限量指标。MG 和 LMG 的主要检测分析方法包括高效液相色谱法[紫外-可见光检测器<sup>[3-8]</sup>、荧光检测器<sup>[9-14]</sup>、质谱检测器(四极杆质量分析仪<sup>[15-20]</sup>和离子阱质量分析仪<sup>[21-23]</sup>)、光谱法(分光光度法<sup>[24-30]</sup>、荧光法<sup>[31-32]</sup>、表面增强拉曼光谱法<sup>[33-44]</sup>等)、电化学方法<sup>[45-47]</sup>、免疫学测定法(基于生物抗体的酶联免疫法<sup>[48-50]</sup>、基于仿生抗体的酶联免疫法<sup>[51-52]</sup>、化学发光免疫法<sup>[53-59]</sup>、免疫层析法<sup>[61-67]</sup>等)。

### 1.1 高效液相色谱法

水产品中孔雀石绿的色谱法应用范围广,检测结果准确性高,还可以检测难以分离的生物体内及其他复杂基质的待测样品。但它也存在某些不足之处,例如检测时间长、仪器价格高、前处理复杂等。在检测水产品中孔雀石绿含量时,高效液相色谱法大多与其他检测器联用,如和紫外-可见、荧光、质谱等检测器分别联用,使得检测的精确度更高。

#### 1.1.1 紫外-可见光检测器

MG 和 LMG 在紫外-可见光区有最大吸收,可以将紫外-可见光检测器用于水产品中孔雀石绿及其代谢物残留的检测。但由于 MG 和 LMG 的共轭体系不同,最大吸收波长也存在着差异。MG 的最大吸收波长是 618 nm,而 LMG 是 267 nm。由于在 267 nm 波长处除了 LMG 的吸收峰,还有许多干扰的有机小分子吸收峰,会对 LMG 的检测造成一定的干扰。因此,大多时候是将 LMG 氧化成 MG 再进行检测。通常使用氧化前柱或填充有氧化铅的后柱<sup>[3-4]</sup>。由于氧化铅具有适当的氧化能力,因此它是检测 MG 和 LMG 的最传统氧化剂之一。然而,已经发现使用氧化铅作为氧化剂的几个缺点。例如, PbO<sub>2</sub> 可以将 MG 进一步氧化成多种衍生物,而这些衍生物是用紫外检测器不容易检测到的<sup>[5]</sup>。重要的是,二氧化铅对人体有毒副作用。近年来,已经发现了几种新颖的氧化试剂用于总 MG 的检测。例如使用 2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌(2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, DDQ)的原位氧化技术<sup>[6-8]</sup>。因为这种化学试剂可以快速有效地将无色类似物氧化为有色形式,再使用紫外检测器进行分析。当前, DDQ 是最常用的氧化剂,它已完全取代了二氧化铅。

#### 1.1.2 荧光检测器

为了进一步提高分析方法的灵敏度, ZHAO 等、LU 等<sup>[9-10]</sup>提出了与荧光检测器联用,此检测器的特点是灵敏度高、选择性好、干扰峰少。LMG 具有荧光特性,  $\lambda_{ex}$  为 265 nm、 $\lambda_{em}$  为 360 nm。因 MG 无荧光性质,因此在待测样品的预处理过程中加入硼氢化钾等还原剂,以使 MG 转化为 LMG,然后利用荧光检测器来定量检测。但也存在一些不足,在前处理时如产生气泡,引入新的杂质,从而产生一些杂质峰干扰检测等。

高效液相色谱与紫外-可见光检测器和荧光检测器串联使用,可以同时测定 2 种分析物,这不仅避免了氧化或还原步骤的需要,还提高了准确性。MITROWSKA 等<sup>[11-12]</sup>开发了一种同时检测 MG 和 LMG 的方案,避免了使用氧化剂。MG 是通过可见光谱在 620 nm 处测定的,而 LMG 是通过荧光法在  $\lambda_{ex}$  265 nm 和  $\lambda_{em}$  360 nm 处独立测定的。CHEN<sup>[13]</sup>和 WANG 等<sup>[14]</sup>后来也将这种方法应用于 MG 和 LMG 的测定。

#### 1.1.3 质谱检测器

高效液相色谱与质谱联用最大的优势是不仅能分别定性和定量,且检测的结果精度与准确性好、检测限低,但其也存在前处理复杂、对操作人员的技术要求和成本高

等缺点,因此很难在基层得到较大应用。四极杆质量分析仪<sup>[15-20]</sup>和离子阱质量分析仪<sup>[21-23]</sup>是检测 MG 和 LMG 的最常用分析仪。离子阱和四极杆质谱仪之间有许多相似之处。离子阱质谱仪的优点包括结构简单、性价比高、灵敏度高和较大的质量范围,但也存在缺乏高分辨率的局限性。四极杆分析仪通常用于其三重四极杆技术,可以同时监测复杂混合物中的大量化合物,并且还提供了较低的检测限<sup>[20]</sup>。QIN 等<sup>[18]</sup>采用液相色谱-质谱(liquid chromatography mass spectrometry-mass spectrometry, LC-MS/MS)方法对同一样品中的 4 种分析物进行定量,检测限范围为 0.030~0.15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。与四极杆和离子阱分析仪相比,飞行时间质量分析仪具有更高的分辨率和更大的质量范围,它可以轻松实现被测物质碎片离子的识别。这 3 种类型的质量分析仪都可以准确地检测出总量低于最低限量要求 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 MG 和 LMG,从而满足国家或地区监管机构或国际组织制定的要求。

## 1.2 光谱法

### 1.2.1 紫外-可见分光光度法 (ultraviolet-visible spectrophotometry, UV-VIS)

UV-VIS 法也是分析和鉴定中常用的一种方法,具有快速、简单、方便等优势,但此法在检测鱼、虾类较复杂的待测样品时,易受到基质干扰,检测结果容易假阳性,且灵敏度不高,不能同时定量检测 MG 和 LMG。近年来,已开发出磁性纳米颗粒用作新颖、灵敏的固相萃取剂用于 MG 的提取和预浓缩,最后用分光光度法测定。用新型材料改性的磁性氧化铁纳米粒子,例如  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ <sup>[24-25]</sup>和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ <sup>[26-27]</sup>用作磁性固相萃取吸附剂,具有许多优点,包括回收率高、分离操作简单和有机溶剂消耗低。ASFARAM 等<sup>[25]</sup>研究了经十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS)改性所得的  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  颗粒对 MG 表现出高吸附能力。SERGI 等<sup>[27]</sup>将 GO 和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  结合在磁性纳米复合材料中,利用 GO 的吸附性和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性分离的优势,极大地提高了萃取效率。NAFISEH 等<sup>[28]</sup>合成了一种新型磁性纳米吸附剂(聚丙烯腈-丙烯酸)纳米纤维,通过分散磁性纳米纤维固相萃取技术预富集水样品中的孔雀石绿残留物,使用分光光度法测定 MG,检出限为 0.03  $\text{mg}/\text{L}$ 。MASOUMEH 等<sup>[29]</sup>用金属-有机骨架架用作固相萃取,以甲醇为洗脱液在 5 min 内完成操作,分光光度法测定水产品中的孔雀石绿残留物的检出限为 1.66  $\text{ng}/\text{mL}$ 。这些研究表明,涂覆在磁性纳米颗粒上的某些新型材料由于其官能团含量的变化,能够调节载体表面性能,从而实现所需的应用。

此外,MINA 等<sup>[30]</sup>利用孔雀石绿能使金纳米颗粒在酸性介质中迅速聚集的原理。用肉眼可以直接观察到从红色到蓝色的颜色变化,金纳米颗粒的吸收率(A623/A520)与孔雀石绿浓度呈线性关系。方法的检测限和线性范围分别为 3  $\text{ng}/\text{mL}$  和 50~350  $\text{ng}/\text{mL}$ 。

### 1.2.2 荧光法

近年来,已经提出了有关将分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)与荧光材料融合的方法。基于量子点(quantum dots, QDs)的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)法,有着设备简单、灵敏度高、分析速度快等优点。由于该类方法同时具有出色的荧光特性和对模板的高亲和力,因此可以显著提高检测限和分析效率。例如, WU 等<sup>[31]</sup>开发了一种快速测定水中和鱼类中 MG 的方法。在这种方法中,通过沉淀聚合合成了涂有 MIP 的量子点。该方法将 QDs 作为荧光材料,使用 MG 作为淬灭剂。由于 QDs 涂有对 MG 具有较强吸附能力的 MIP,因此仅 5 min 荧光探针即可对 MG 表现出选择性的荧光猝灭反应,并成功用于检测水中的 MG。WU 和他的小组<sup>[32]</sup>还设计了一种使用相同方法的荧光传感器来检测鱼肉中的 MG,通过反向微乳化方法合成了涂有 MIP 的 QDs。量子点和分子印迹材料的结合具有很强的荧光强度和对 MG 的高淬灭效率。但仍然存在一些缺陷,例如与未涂覆的 QDs 相比,涂覆 MIP 对 MG 的淬灭效率降低。尽管为 MG 荧光方法提供了特定的识别位点,但与 MG 相似的吸收光谱的干扰仍处于较高水平。因此,仍然需要提高涂有 MIP 的 QDs 选择性。

### 1.2.3 表面增强拉曼光谱法

目前,拉曼光谱已广泛应用于分析领域。但是正常的拉曼散射仅占总分子散射的百万分之一,缺乏灵敏度限制了其在许多领域中的应用。近年来,表面增强拉曼光谱(surface enhanced raman spectroscopy, SERS)作为解决该问题的新型痕量检测技术已变得流行。在这种技术中,金属基质可以将吸附在表面的分子拉曼信号放大  $10^6\sim 10^{14}$  倍,甚至可以检测到单个分子。SERS 是可以用于检测吸附在粗糙金属或纳米级金属颗粒表面目标分析物的高灵敏且准确的技术<sup>[33-34]</sup>。

SERS 是一种不寻常的光学增强现象,它发生在主要包含金、银和其他过渡金属的纳米级粗糙度金属的表面上,或在粒子系统的表面上。根据近年来发表的有关 SERS 方法的报道,作为贵金属的  $\text{Au}$ <sup>[35-36]</sup>和  $\text{Ag}$ <sup>[37-44]</sup>最常用作 SERS 活性底物,用于检测各种领域的小分子,因其具有许多特殊优点,例如稳定性好、可调节的粒径和形状以及较强的等离共振共振。然而,由于缺乏敏感性、准确性和修饰能力,仅基于金或银的裸露 SERS 基底的使用受到很大限制。目前,已经开发了一些以贵金属为杂化底物合成的新型材料。在某些情况下,这些复合材料不仅克服了实际应用中单一组分的局限性,而且还提供了更高的有效表面积,出色的增强性能,更高的特异性,更低的检出限。例如 FU 等<sup>[35]</sup>制备了氧化石墨烯/金纳米颗粒(GO/AuNPs)作为用于 MG 检测的 SERS 底物。GO/AuNPs 杂化物极大地增强了拉曼散射信号,因为 GO 材料对 MG

具有很强的富集作用。该方法的检测限为 2.5 mmol/L。JIA 等<sup>[44]</sup>基于在  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  中加入  $\beta$ -环糊精( $\beta$ -Cyclodextrin,  $\beta$ -CD)诱导的银镜反应, 提出了一种胶体银纳米粒子的绿色合成方法。复合衬底 Ag/CD 用于高速, 灵敏地检测环境水中的 MG。该方法的检测限为 1 mg/L。此外, 某些材料, 例如二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )壳<sup>[37]</sup>、 $\text{TiO}_2$  纳米棒支架<sup>[38]</sup>和 ZnO 纳米穹顶阵列<sup>[39]</sup>, 也已被用来修饰高性能 SERS 基板, 其表面装饰有金属, 不仅防止了金属颗粒的聚集, 而且还促进了纳米颗粒的后续表面改性。

### 1.3 电化学方法

基于各种修饰电极的电化学方法因其高灵敏度和选择性而受到青睐。带有合适催化剂的修饰电极不仅可以提高 MG 检测的响应速度, 而且可以增加定量分析的动态范围。用于修饰高性能电极的材料通常包括金属氧化物纳米颗粒、石墨烯材料及其组合等。金属氧化物纳米颗粒, 例如纳米  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、纳米  $\text{Al}_2\text{O}_3$  和纳米  $\text{CeO}_2$ , 由于其较大的比表面积, 可以提供更高的催化效率, 因此它们可用于增强电化学活性。此外, 用金属氧化物纳米粒子修饰的电极可以表现出优异的性能, 例如良好的生物相容性、增强电子传递和高效催化的表面积。由于这些优点, 已经研究了金属氧化物纳米颗粒用于制造敏感的 MG 传感器。SACARA 等<sup>[45]</sup>基于  $\text{CeO}_2$  纳米粒子和 Nafon 修饰的玻璃碳电极, 开发了一种用于 MG 检测的电化学传感器。由于存在纳米  $\text{CeO}_2$ , 该传感器显示出良好的稳定性、灵敏度和选择性以及较低检测限。

基于其良好的导电性、高比表面积、出色的机械强度和强大的吸附能力, 石墨烯已广泛用于电化学方法。基于此, HOU 等<sup>[46]</sup>成功地构建了用石墨烯量子点(graphene quantum dots, GQD)修饰并在  $\text{HAuCl}_4$  溶液中电沉积 Au 纳米粒子的电极。由于 GQD 和 Au 纳米颗粒的协同作用, 修饰电极在 MG 检测中显示出优异的重现性和稳定性。氧化石墨烯(graphene oxide, GO)保留了所有石墨烯的优势。此外, GO 在其表面上具有多种功能, 这使 GO 成为了伏安传感器中用作复合膜的潜在材料。ZHANG 等<sup>[47]</sup>基于 GO 和乙二胺修饰的碳糊电极, 制造了一种新型的电化学传感器。该方法由于使用了 GO, 促进了 MG 的氧化还原反应, 电流强度明显增强。但是, 由于 GO 修饰电极缺乏稳定性的缺点, 因此还使用了乙二胺, 并且当它与 GO 集成在复合膜中以修饰碳糊电极时, 传感器的性能得到了显著改善, 并表现出高稳定性和长寿命。

### 1.4 免疫学方法

#### 1.4.1 基于生物抗体的酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

水产品和环境常以孔雀石绿和隐孔雀石绿 2 种形式同时存在, 且孔雀石绿和隐孔雀石绿均具有强致癌性。

但由于二者结构差异较大, 现有的单克隆抗体只能分别检测样品中单一药物的残留量, 难以客观地反映出孔雀石绿和隐孔雀石绿的总残留量。谢焕龙等<sup>[48]</sup>分别制备了针对孔雀石绿和隐孔雀石绿的高特异性单克隆抗体, 通过研究混合抗体模式建立了可以同时检测 2 种物质的酶联免疫分析方法, 该方法检测限  $\text{LOD}(IC_{10})$  为 0.24 ng/mL。WANG 等<sup>[49]</sup>提出了一种使用双特异性单克隆抗体(BsMAb)的多分析物 ELISA 方法, 可以在复杂的食品基质中同时检测多种分析物。在这种技术中, BsMAb 可以利用其 2 个抗原结合位点特异性结合 2 种不同的分析物, 因此在检测 2 种分析物方面具有优势。5-吗啉代-甲基-3-氨基-2-恶唑烷酮(AMZO)和 LMG 的检测限分别为 0.2 和 4.8 ng/mL。以天然牛血清白蛋白(nBSA)为载体蛋白测定 MG 和 LMG, 已取得令人满意的结果。然而, XU 等<sup>[50]</sup>使用羧基孔雀石绿和阳离子化牛血清白蛋白(cBSA)偶联物作为免疫原制备了单克隆抗体。与 nBSA 相比, cBSA 作为载体蛋白不仅可以显著提高偶联效率, 而且可以增强半抗原的免疫反应。在鱼类组织样品中应用直接竞争酶联免疫吸附法检测限为 0.37 ng/g。

#### 1.4.2 基于仿生抗体的酶联免疫法

与生物抗体相比, 仿生抗体表现出比普通生物抗体更好的性能, 例如高特异性、准确性和可靠性、以及对恶劣环境的良好抵抗力。由于分子印迹聚合物可以特异性识别目标分子的能力以及 MIP 的设计能力和可重复使用性, 它们还被用作仿生抗体, 用于许多领域中的小分子检测。LI 等<sup>[51]</sup>提出了一种以 MIP 膜为仿生抗体的酶联免疫法检测 MG。基于多巴胺自聚合的 MIP 膜是在 96 孔微孔板的表面上制成的, 这种仿生酶联免疫法可以检测 MG 残基, 但是, 该方法的缺点是不能轻易、快速地将 MIP 与被测体系分离。因此, 已经开发了用作仿生抗体的磁性分子印迹聚合物(magnetic molecularly imprinted polymer, MMIP)的方法。MMIP 具有作为仿生抗体检测 MG 和 LMG 的巨大潜力, 借助外部磁场, MMIP 可以轻松快速地与被测体系分离。LI 等<sup>[52]</sup>开发了一种使用 MMIPs 作为仿生抗体的方法, 用于快速检测鱼类组织中的 MG。MMIPs 具有极好的可重用性, 可用于 MG 吸附。

#### 1.4.3 化学发光免疫法

化学发光免疫法又可分为化学发光酶免疫法<sup>[53]</sup>和电化学发光免疫法<sup>[54-59]</sup>。ZHANG 等<sup>[53]</sup>建立了一种间接竞争化学发光酶免疫法来检测海鲜中的 MG 残留。该方法对 MG 的筛查具有很高的灵敏度和稳定性, 它主要基于多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗化学发光系统。电化学发光法(electro chemi luminescence, ECL)是一种通过电化学反应将电化学能转换为辐射能以发射可测量的发光信号的方法。Ru(bpy)<sub>3</sub>2C/TPA 系统是最广泛用于 ECL 方法研究的系统。例如, HUANG 等<sup>[54]</sup>、GUO 等<sup>[55]</sup>、LIU 等<sup>[57]</sup>和 SHAO 等<sup>[58]</sup>成功地将此技术应用于 MG 和 LMG 的测定,

所有研究均取得了理想的结果。但是, 由于使用抗体作为捕获探针, 这种检测方法有几个缺点, 包括费用高、稳定性低以及缺乏特异性和敏感性。相应地, 一些基于 DNA<sup>[56]</sup> 或 RNA<sup>[60]</sup> 分子的适配体, 由于其高亲和力和较高的特异性而成为分析化学领域越来越多的研究热点。

#### 1.4.4 免疫层析测定法

免疫层析法(immuno-chromatography, IC)的原理是将特异的抗原或抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带, 当该干燥的硝酸纤维素一端浸入样品后, 由于毛细管作用, 样品将沿着该膜向前移动, 当移动至固定有抗原或抗体的区域时, 样品中相应的抗体或抗原即与该抗原或抗体发生特异性结合, 若用免疫胶体金可使该区域显示一定的颜色, 从而实现特异性的免疫检测。XU 等<sup>[61]</sup>开发了一种高灵敏度的基于胶体金标记的抗 MG(MG mAb)单克隆抗体的免疫层析法, 用于测定鱼肉样品中的总 MG 残留量。王文娟等<sup>[62]</sup>建立胶体金免疫层析法快速检测水产品中孔雀石绿总量的残留, 检测限为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。山珊等<sup>[63]</sup>利用胶体金试纸条建立了以标品的不同质量浓度为横坐标, 纵坐标为  $T/(T+C)$  时的线性关系好, 灵敏度为 3  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。付林峰等<sup>[64]</sup>为了提高检测灵敏度, 使用了免疫金银染色的方式进行了信号放大。最终所制备的试纸检出限为 0.2  $\text{ng}/\text{mL}$ 。CHEN 等<sup>[65]</sup>开发了荧光猝灭免疫亲和柱的分析方法, 用于同时检测水产品中的孔雀石绿和结晶紫残留。所提出的分析方法是基于从荧光供体(量子点)到荧光受体(孔雀石绿或结晶紫)的荧光共振能量转移以及分析物及其多克隆抗体之间的特异性检测。该过程可以在 10 min 内完成, 并且可以用肉眼观察结果。在草鱼、条纹鲈鱼、鲤鱼和虾中 MG 或 CV 的检测限度为 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 2 结束语

孔雀石绿的检测方法主要包括色谱法、光谱法、电化学法及免疫学方法。色谱法前处理过程比较烦琐, 且不能直接在现场检测, 因此基层的应用普及程度不高。在快检方法中应用比较多的是免疫学方法, 包括酶联免疫吸附法、胶体金免疫层析法, 但胶体金免疫层析只能定性, 酶联免疫吸附法可以定量但只能单指标检测。蛋白芯片法相比于传统的酶联免疫分析法具有多靶标、快速、高灵敏度等优点, 但是蛋白芯片法大多采用的是荧光法和化学发光法, 这些方法存在检测仪器价格昂贵等问题, 不适合在基层检测机构和小食品生产企业推广应用。近年来发展的可视化蛋白芯片的检测方法<sup>[66-67]</sup>, 可同时检测多种药物及有害物残留、也可同时检测多种营养蛋白质的含量。与传统蛋白芯片相比, 具有可视化、直接用肉眼观察芯片结果、无需使用昂贵的荧光或化学发光检测设备等优点, 大大降低检测成本, 提高检测效率, 在农药残留的现场快速检测中有很好的发展前景。同时在样品制备过程中, 传统的萃取技术

(例如液液萃取和固相萃取)需要大量有毒的有机试剂, 并且样品预处理过程也很烦琐且耗时。迫切需要找到一种高效的样品预处理技术, 该技术要求具有高富集因子、操作简单快速、试剂使用量少等优势。迄今为止, 已经提出了分子印迹技术、磁性分子印迹技术等作为克服传统提取方法缺点的新型提取技术。尽管这些技术在一定程度上简化了样品制备过程, 提高了准确度并实现了环境友好型操作, 但仍有改进的空间。因此, 开发具有低成本、简单操作、便携性、高分辨率和低检测限优势的分析仪器仍然是一个重要的挑战。

## 参考文献

- [1] HIDAYAH N, BAKAR FA, MAHYUDIN NA, *et al.* Detection of malachite green and leuco-malachite green in fishery industry [J]. *Int Food Res J*, 2013, 20: 1511-1519.
- [2] HASHIMOTO JC, RIZZATO PJA, DE-QUEIROZ JF, *et al.* Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in fish: A review [J]. *J Aquat Food Prod T*, 2011, 20: 273-294.
- [3] 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: 641-648.
- [4] SCHERPENISSE P, BERGWERFF AA. Determination of residues of malachite green in fin fish by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529: 173-177.
- [5] LEE JB, KIM HY, JANG YM, *et al.* Determination of malachite green and crystal violet in processed fish products [J]. *Food Addit Contam Part A Chem*, 2010, 27: 953-961.
- [6] XIE J, PENG T, CHEN D, *et al.* Determination of malachite green, crystal violet and their leuco-metabolites in fish by hplc-vis detection after immunoaffinity column clean-up [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 913-914: 123-128.
- [7] MART'INEZ BMJ, HERRERA S, UCL'ES A, *et al.* Determination of malachite green residues in fish using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography linear ion trap mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 665: 47-54.
- [8] FALLAH AA, BARANI A. Determination of malachite green residues in farmed rainbow trout in iran [J]. *Food Control*, 2014, 40: 100-105.
- [9] ZHAO J, WEI D, YANG Y. Magnetic solid-phase extraction for determination of the total malachite green, gentian violet and leucomalachite green, leucogentian violet in aquaculture water by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39: 2347-2355.
- [10] LU Y, XIA Y, LIU G, *et al.* A review of methods for detecting melamine in food samples [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2016, 47: 51-66.
- [11] MITROWSKA K, POSYNIK A, ZMUDZKI J. Determination of malachite green and leucomalachite green residues in water using liquid chromatography with visible and fluorescence detection and confirmation by tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1207: 94-100.
- [12] MITROWSKA K, POSYNIK A, ZMUDZKI J. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection [J]. *J Chromatogr*

- A, 2005, 1089: 187–192.
- [13] CHEN G, MIAO S. HPLC determination and ms confirmation of malachite green, gentian violet, and their leuco metabolite residues in channel cat fish muscle [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 7109–7114.
- [14] WANG Y, LIAO K, HUANG X, *et al.* Simultaneous determination of malachite green, crystal violet and their leuco-metabolites in aquaculture water samples using monolithic fiber-based solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. *Anal Methods*, 2015, 7: 8138–8145.
- [15] TAO Y, CHEN D, CHAO X, *et al.* Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in shrimp and salmon by liquid chromatography tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and auto solid-phase clean-up [J]. *Food Control*, 2011, 22: 1246–1252.
- [16] LOPEZ-GUTIERREZ N, ROMERO-GONZALEZ R, PLAZA-BOLANOS P, *et al.* Simultaneous and fast determination of malachite green, leucomalachite green, crystal violet, and brilliant green in seafood by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Anal Method*, 2013, 6: 406–414.
- [17] XU YJ, TIAN XH, ZHANG XZ, *et al.* simultaneous determination of malachite green, crystal violet, methylene blue and the metabolite residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2012, 50: 591–597.
- [18] QIN Y, ZHANG J, LI Y, *et al.* Multiplug filtration cleanup method with multi-walled carbon nanotubes for the analysis of malachite green, diethylstilbestrol residues, and their metabolites in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408: 5801–5809.
- [19] FANG L, DENG J, YU Y, *et al.* Coupling liquid-phase microextraction with paper spray for rapid analysis of malachite green, crystal violet and their metabolites in complex samples using mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2016, 8: 6651–6656.
- [20] DI STEFANO V, AVELLONE G, BONGIORNO D, *et al.* Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1259: 74–85.
- [21] FANG X, YANG S, CHINGIN K, *et al.* Quantitative detection of trace malachite green in aquaculture water samples by extractive electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 13: 814.
- [22] ABRO K, MAHESAR SA, IQBA S, *et al.* Quantification of malachite green in fish feed utilising liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a monolithic column [J]. *Food Addit Contam Part A*, 2014, 31: 827–832.
- [23] TURNIPSEED SB, ANDERSEN WC, ROYBAL JE. Determination and confirmation of malachite green and leuco-malachite green residues in salmon using liquid chromatography/mass spectrometry with no-charge atmospheric pressure chemical ionization [J]. *J Aoac Int*, 2005, 88: 1312–1317.
- [24] AFKHAMI A, MOOSAVI R, MADRAKIAN T. Preconcentration and spectrophotometric determination of low concentrations of malachite green and leuco-malachite green in water samples by high performance solid phase extraction using maghemite nanoparticles [J]. *Talanta*, 2010, 82: 785–789.
- [25] ASFARAM A, GHAED M, GOUDARZI A, *et al.* Magnetic nanoparticle based dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of malachite green in water samples: Optimized experimental design [J]. *New J Chem*, 2015, 39: 9813–9823.
- [26] MIRZAJANI R, AHMADI S. Melamine supported magnetic iron oxide nanoparticles ( $Fe_3O_4@mel$ ) for spectrophotometric determination of malachite green in water samples and fish tissues [J]. *J Ind Eng Chem*, 2015, 23: 171–178.
- [27] SERGI A, SHEMIRANI F, ALVAND M, *et al.* Graphene oxide magnetic nanocomposites for the preconcentration of trace amounts of malachite green from fish and water samples prior to determination by fiber optic-linear array detection spectrophotometry [J]. *Anal Methods*, 2014, 6: 7744–7751.
- [28] NAFISEH S, TAHEREH RB, MAJID K, *et al.* Synthesis and characterization of magnetic poly (acrylonitrile-coacrylic acid) nanofibers for dispersive solid phase extraction and pre-concentration of malachite green from water samples [J]. *J Ind Eng Chem*, 2018, 60: 237–249.
- [29] MASOUMEH M, TARANEH H, RAZIEH R. Highly efficient determination of malachite green in aquatic product using Tb-organic framework as sorbent [J]. *J Por Mater*, 2018, 25: 1771–1781.
- [30] MINA H, SHAHLA E. Sensitive, simple and rapid colorimetric detection of malachite green in water, salmon and canned tuna samples based on gold nanoparticles [J]. *J Sci Food Agric*, 2019, 99: 1919–1925.
- [31] WU L, LIN Z, ZHONG H, *et al.* Rapid determination of malachite green in water and fish using a fluorescent probe based on cdte quantum dots coated with molecularly imprinted polymer [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2017, 239: 69–75.
- [32] WU L, LIN Z, ZHONG H, *et al.* Rapid detection of malachite green in fish based on cdte quantum dots coated with molecularly imprinted silica [J]. *Food Chem*, 2017, 229: 847–853.
- [33] ZHANG Y, LAI K, ZHOU J, *et al.* A novel approach to determine leucomalachite green and malachite green in fish fillets with surface-enhanced raman spectroscopy (sers) and multivariate analyses [J]. *J Raman Spectrosc*, 2012, 43: 1208–1213.
- [34] ZHANG Y, YU W, PEI L, *et al.* Rapid analysis of malachite green and leucomalachite green in fish muscles with surface-enhanced resonance raman scattering [J]. *Food Chem*, 2015, 169: 80–84.
- [35] FU WL, ZHEN SJ, HUANG CZ. One-pot green synthesis of graphene oxide/gold nanocomposites as sers substrates for malachite green detection [J]. *Analyst*, 2013, 138: 3075–3082.
- [36] ZHANG Y, YU W, PEI L, *et al.* Rapid analysis of malachite green and leucomalachite green in fish muscles with surface-enhanced resonance raman scattering [J]. *Food Chem*, 2015, 169: 80–84.
- [37] SONG D, YANG R, WANG C, *et al.* Reusable nanosilver coated magnetic particles for ultrasensitive sers-based detection of malachite green in water samples [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22870–22879.
- [38] TAN E, YIN P, YOU T, *et al.* Three dimensional design of large-scale tio<sub>2</sub> nanorods scaffold decorated by silver nanoparticles as sers sensor for ultrasensitive malachite green detection [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2012, 4: 3432–3437.
- [39] SIVASHANMUGAN K, LIAO J, LIU BH, *et al.* Ag nanoclusters on ZnO nanodome array as hybrid sers-active substrate for trace detection of malachite green [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2015, 207: 430–436.
- [40] XIAO G, MAN S. The effect of L-cysteine on surface-enhanced raman scattering of malachite green in silver colloids [J]. *Spectrosc Lett*, 2013, 46: 577–582.
- [41] ZHAO Y, TIAN Y, MA P, *et al.* Determination of melamine and malachite green by surface-enhanced raman scattering spectroscopy using

- starch-coated silver nano-particles as substrates [J]. *Anal Methods*, 2015, 7: 8116–8122.
- [42] SUN H, LIU H, WU Y. A flexible and highly sensitive surface enhanced raman scattering film in-situ detection of malachite green on fish skin [J]. *Materials Lett*, 2017, 207: 125–128.
- [43] KUMAR P, KHOSLA R, SONI M, *et al.* A highly sensitive, flexible sensor for malachite green detection based on Ag decorated microstructured PDMS substrate fabricated from taro leaf as template [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2017, 246: 477–486.
- [44] JIA F, YANG X, LI Z. Synthesis and application of colloidal beta-cyclodextrin-decorated silver nanoparticles for rapid determination of malachite green in environmental water using surface enhanced raman spectroscopy [J]. *RSC Adv*, 2016, 6: 92723–92728.
- [45] SACARA AM, CRISTEA C, MURESAN LM. Electrochemical detection of malachite green using glassy carbon electrodes modified with CeO<sub>2</sub> nanoparticles and nafion [J]. *J Electroanal Chem*, 2017, 792: 23–30.
- [46] HOU J, BEI F, WANG M, *et al.* Electrochemical determination of malachite green at graphene quantum dots gold nanoparticles multilayers modified glassy carbon electrode [J]. *J Appl Electrochem*, 2013, 43: 689–696.
- [47] ZHANG K, SONG G, YANG L, *et al.* A novel self-assembly voltammetric sensor for malachite green based on ethylenedi-amine and graphene oxide [J]. *Anal Methods*, 2012, 4: 4257.
- [48] 谢焕龙, 王宇, 徐振林, 等. 基于混合抗体的酶联免疫分析方法同时检测孔雀石绿和隐孔雀石绿[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(12): 325–330.  
XIE HL, WANG Y, XU ZL, *et al.* Simultaneous detection of malachite green and leucomalachite green based on hybrid antibody ELISA analysis method [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 31(12): 325–330.
- [49] WANG F, WANG H, SHEN Y, *et al.* Bispecific monoclonal antibody-based multianalyte ELISA for furaltadone metabolite, malachite green, and leucomalachite green in aquatic products [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 8054–8061.
- [50] XU H, CHEN X, GUO L, *et al.* Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total malachite green and crystal violet residues in fishery products [J]. *Int J Environ Anal Chem*. 2013, 93: 959–969.
- [51] LI L, PENG A, LIN Z, *et al.* Biomimetic ELISA detection of malachite green based on molecularly imprinted polymer film [J]. *Food Chem*, 2017, 229: 403–408.
- [52] LI L, LIN Z, PENG A, *et al.* Biomimetic ELISA detection of malachite green based on magnetic molecularly imprinted polymers [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1035: 25–30.
- [53] ZHANG Y, YANG J, LEI H, *et al.* Development of chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of malachite green in seafood [J]. *Food Agric Immunol*, 2014, 26: 204–217.
- [54] HUANG B, ZHOU X, CHEN J, *et al.* Determination of malachite green in fish based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction followed by electrochemiluminescence [J]. *Talanta*, 2015, 142: 228–234.
- [55] GUO Z, GAI P, HAO T, *et al.* Determination of malachite green residues in fish using a highly sensitive electrochemiluminescence method combined with molecularly imprinted solid phase extraction [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 5257–5262.
- [56] FENG X, GAN N, ZHANG H, *et al.* A novel “dual-potential” electrochemiluminescence aptasensor array using CdS quantum dots and luminol-gold nanoparticles as labels for simultaneous detection of malachite green and chloramphenicol [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 587–593.
- [57] LIU F, YANG X, ZHAO Y, *et al.* Detection of malachite green and leucomalachite green based on electrochemiluminescence of mono- and bimetallic ruthenium tris-bipyridyl complexes at an Au electrode [J]. *Anal Methods*, 2013, 5: 660–665.
- [58] SHAO J, ZHAO Y, LIU F, *et al.* Determination of malachite green and leucomalachite green based on electrochemiluminescence of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> at graphene oxide modified glassy carbon electrodes [J]. *RSC Adv*, 2015, 5: 14547–14552.
- [59] LAN QF, WANG WC, CHEN XH, *et al.* A novel solid-state electrochemiluminescence sensor based on poly(3-amino-4-hydroxybenzenesulfonic acid)/Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> modified electrode for determination of malachite green [J]. *Int J Electrochem Sci*, 2017, 12: 6577–6587.
- [60] STEAD SL, ASHWIN H, JOHNSTON BH, *et al.* An RNA-aptamer-based assay for the detection and analysis of malachite green and leucomalachite green residues in fish tissue [J]. *Anal Chem*, 2010, 82: 2652–2660.
- [61] XU N, LI L, SONG S, *et al.* Development of a lateral flow immunoassay for the detection of total malachite green residues in fish tissues [J]. *Food Agric Immunol*, 2015, 26: 870–879.
- [62] 王文珺, 韩承义, 聂丽, 等. 胶体金免疫层析法检测水产品中孔雀石绿总量残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(11): 3405–3409.  
WANG WJ, HAN CY, NIE L, *et al.* Determination of total malachite green residues in aquatic products by colloidal gold immunochromatographic assay [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(11): 3405–3409.
- [63] 山珊, 彭涛, 杨万春, 等. 胶体金免疫层析法定量检测孔雀石绿[J]. *食品科学*, 2013, 34(16): 161–163.  
SHAN S, PENG T, YANG WC, *et al.* Development of colloidal gold lateral flow assay for quantitative detection of malachite green [J]. *Food Sci*, 2013, 34(16): 161–163.
- [64] 付林峰, 汪丽, 姜越, 等. 免疫金银染色法快速检测水产品中孔雀石绿残留的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(6): 2147–2152.  
FU LF, WANG L, LOU Y, *et al.* Rapid detection of malachite green residues in aquatic products with immunogold-silver staining method [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(6): 2147–2152.
- [65] CHEN YY, DING ML, LI JQ, *et al.* Fluorescence quenching immunoaffinity test column with quantum dots as fluorescence donors for the quick detection of malachite green and crystal violet in aquatic products [J]. *Food Anal Methods*, 2018, 11: 3362–3370.
- [66] LI ZM, LI ZH, ZHAO DY, *et al.* Smartphone-based visualized microarray detection for multiplexed harmful substances in milk [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87(15): 874–880.
- [67] LI ZM, WEN F, LI ZH, *et al.* Simultaneous detection of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and lactoferrin in milk by visualized microarray [J]. *BMC Biotechnol*, 2017, 17(1): 72–80.

(责任编辑: 张晓寒)

## 作者简介



李周敏, 博士, 主要研究方向为生物芯片检测技术在食品安全检测中的应用。  
E-mail: lizhoumin@126.com