

工作简报

固相微萃取-高效液相色谱法快速测定水中孔雀石绿

陶艳玲, 邓爱妮, 刘秋梅, 郭智勇, 王 邃*

(宁波市新型功能材料及其制备科学国家重点实验室培育基地, 宁波大学 材料科学与化学工程学院, 宁波 315211)

摘要: 提出了固相微萃取-高效液相色谱法测定水中孔雀石绿的含量。为使固相微萃取达到更高的效率, 选择 85 μm 的聚丙烯酸酯(PA)涂层萃取纤维, 萃取时间为 15 min。以 Shim-pack VP-ODS C_{18} 色谱柱为固定相分离, 用 pH 4.5 的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液与乙腈按体积比为 20 比 80 混合的溶液为流动相进行洗脱, 在波长 595 nm 处进行测定。孔雀石绿的质量浓度在 $0.05 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈线性, 检出限(3S/N)为 $0.003 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以鱼塘水为基体进行回收试验, 方法的回收率在 98.1% ~ 109.6% 之间。

关键词: 固相微萃取; 高效液相色谱法; 孔雀石绿

中图分类号: O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1001-4020(2011)09-1092-03

Rapid HPLC Determination of Malachite Green in Water with Solid Phase Micro-extraction

TAO Yan-ling, DENG Ai-ni, LIU Qiu-mei, GUO Zhi-yong, WANG Sui*

(Ningbo Municipal Key Lab. and Cultivation Base of Novel Functional Materials and Their Preparations, College of Material Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: HPLC with sample treatment by solid phase micro-extraction (SPME) was applied to the determination of malachite green in water samples. To attain a higher efficiency in SPME, the 85 μm PA coating was applied to the micro-extractor, and the extraction was carried out for 15 min. The Shim-pack VP-ODS C_{18} column was used as the stationary phase, and a mixture of $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ammonium acetate solution of pH 4.5 and acetonitrile (20+ 80) was used as the mobile phase for elution. Detection at 595 nm was adopted. Linearity range of malachite green was kept in the range of $0.05 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, with detection limit (3S/N) of $0.003 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A sample of fish pond water was analyzed by this method, and test for recovery was made on this sample as matrix by standard addition method giving results in the range of 98.1% - 109.6%.

Keywords: Solid phase micro-extraction; HPLC; Malachite green

孔雀石绿(MG)作为驱虫剂、杀菌剂和防腐剂, 常用于水产养殖业中。因其价格低廉、杀菌效果显著, 而被广泛用于预防和治疗水产动物的水霉病和

原虫病。但研究表明, 孔雀石绿具有高毒、高残留以及致癌、致畸、致突变等副作用^[1]。世界上许多国家已将孔雀石绿列为水产养殖禁用药物。但是, 由于没有更好的替代品, 孔雀石绿屡禁不止, 一些不法商贩甚至将其用于水产品的保鲜和运输过程中, 引起了社会公众的关注^[2]。因此, 建立快速测定水中孔雀石绿的方法十分必要。孔雀石绿常用的测定方法有高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱质谱法(LG-MS)^[3-6]。其中 HPLC 以其快速、简便、准确、

收稿日期: 2010-09-04

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y4090258); 宁波市自然科学基金(2010A610191); 宁波大学学科基金(xkl09071)

作者简介: 陶艳玲(1984-), 女, 湖南浏阳人, 硕士研究生, 主要从事食品安全分析研究。

* 联系人

成本低等优点而备受青睐, 成为测定孔雀石绿的首选方法^[6]。

为了实现对孔雀石绿的快速检测, 选择合适的样品前处理方法极其重要。目前水产品中孔雀石绿的提取纯化方法主要有固-液萃取、液-液萃取和固相萃取^[7]等。这些传统的萃取方法操作繁琐、耗时长、耗费试剂量大。固相微萃取是在固相萃取技术的基础上发展起来的一项新的样品预处理技术。其核心部件是涂有固定相的石英萃取纤维, 以涂渍在石英纤维上的固定相(高分子涂层或吸附剂)作为吸附介质, 对目标分析物进行萃取和浓缩。与传统的萃取方法相比, 固相微萃取操作简便、快速, 在无溶剂条件下可一步完成取样、萃取和浓缩, 大大节省样品预处理时间和避免消耗大量有机溶剂^[8,9]。目前尚未见到有关固相微萃取在孔雀石绿测定中的报道^[2,7], 本工作采用固相微萃取进行样品预处理, 用高效液相色谱法测定水中孔雀石绿的含量。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Supelco 固相微萃取装置, 包括萃取手柄、萃取操作台、5 mL 萃取瓶、微型磁转子、100 μm 聚二甲基硅氧烷(PDMS)萃取纤维、85 μm 聚丙烯酸脂(PA)萃取纤维; 自制解吸装置。

LG-10AT 型高效液相色谱, 配有紫外检测器。

孔雀石绿标准储备溶液: 称取孔雀石绿 10.0 mg, 用水溶解, 定容于 10 mL 容量瓶中, 此时孔雀石绿溶液质量浓度为 1.00 g · L⁻¹, 于 4 °C 冰箱中避光保存。

乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯; 试验用水为二次蒸馏去离子水。

1.2 色谱条件

Shim-pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温为 25 °C; 流动相为 pH 4.5 的 50 mmol · L⁻¹ 乙酸铵-乙腈(20+80)混合溶液, 流量为 1.0 mL · min⁻¹; 进样体积为 20 μL; 紫外检测器的检测波长为 595 nm; 以色谱峰峰高定量。

1.3 试验方法

新的固相微萃取纤维在使用前用流动相冲洗直至无干扰峰出现, 而使用过的萃取纤维每次使用前用流动相冲洗 20 min, 萃取前将纤维风干以避免残留有机溶剂影响萃取效率。采样时推动固相微萃取装置的手柄, 将萃取纤维浸入待测溶液中, 在室温、

搅拌速度为 600 r · min⁻¹ 条件下直接萃取 15 min。取出后, 将萃取纤维插入装有 40 μL 流动相的自制微量解吸装置中, 静态解吸 5 min 后, 在色谱条件下进行分析。

2 结果与讨论

2.1 固相微萃取操作条件的优化

2.1.1 萃取纤维

试验考察了 100 μm 聚二甲基硅氧烷(PDMS)萃取纤维和 85 μm 聚丙烯酸脂(PA)萃取纤维对孔雀石绿的萃取效率。在室温、搅拌转速为 600 r · min⁻¹ 条件下, 用两种纤维分别对 1.0 mg · L⁻¹ 孔雀石绿标准溶液萃取 15 min, 然后在流动相中静态解吸 5 min, 在色谱条件下进行分析, 结果表明: PA 萃取纤维对孔雀石绿的萃取效率较高, 而 PDMS 萃取纤维的萃取效率较低。这是由于孔雀石绿的极性较大, 易被极性较大的 PA 涂层纤维萃取; 而极性较小的 PDMS 涂层纤维对孔雀石绿的萃取能力较弱。试验选用极性大的 85 μm PA 涂层萃取纤维。

2.1.2 萃取时间

试验了在不同萃取时间对 1.0 mg · L⁻¹ 孔雀石绿标准溶液进行萃取, 萃取后均在流动相中静态解吸 5 min, 然后在色谱条件下进行分析。结果表明: 随着萃取时间的增加萃取效率不断提高, 萃取时间越长, 萃取效率越高, 即便当萃取时间达到 45 min 时仍未达到萃取平衡。根据固相微萃取的非平衡理论^[10], 在萃取条件一定时, 即便萃取未达到平衡, 目标分析物的萃取量与其在溶液中的初始含量仍呈线性关系。因此, 在保证灵敏度的前提下可以选取较短的萃取时间以提高样品测试效率。试验表明, 吸附 15 min 后的解吸量即可满足检测要求。试验选择萃取时间为 15 min。

2.1.3 解吸液组成及解吸时间

通过比较不同比例的水-甲醇、水-乙腈和乙酸铵-乙腈 3 种混合液体系的解吸效果, 发现甲醇-水体系难以洗脱孔雀石绿, 用乙腈-水体系洗脱时, 孔雀石绿部分发生分解; 用 pH 4.5 的 50 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液与乙腈以体积比为 20 比 80 的混合溶液解吸时, 效果较好, 色谱峰对称, 灵敏度较高。试验选用该体系作为孔雀石绿的解吸液及色谱的流动相。

将 85 μm PA 涂层萃取纤维浸入 1.0 mg · L⁻¹ 孔雀石绿标准溶液萃取 15 min 后, 用 pH 4.5 的 50 mmol · L⁻¹ 乙酸铵-乙腈(20+80)混合溶液进行

解吸, 在自制解吸装置内分别解吸 3, 5, 7, 9 min, 然后在色谱条件下进行分析。结果表明: 解吸 5 min 后, 色谱峰高变化不大, 表明样品在 5 min 内即可完全解吸。试验选择解吸时间为 5 min。

2.1.4 pH 值

pH 值可改变分析组分与试样介质、固定相之间的分配系数, 从而影响萃取效率。由于孔雀石绿在碱性环境中容易分解, 因此在保证样品稳定的前提下, 考察了孔雀石绿溶液的酸度对萃取效率的影响。结果表明: 当溶液的 pH 值接近中性时, 萃取效率较高且比较稳定。用水配制的孔雀石绿溶液正好在此 pH 值范围内。因此试验中可不调萃取溶液的 pH 值。

2.1.5 离子强度

在萃取溶液中加入一定量的盐, 可以提高溶液的极性, 有利于萃取纤维对待测物的吸附, 从而提高萃取效率^[11]。考察了溶液中盐对萃取效率的影响, 但发现在溶液中加入盐, 萃取效果并没有明显提高, 而且盐会附着在萃取纤维上, 从而影响试验结果的重现性并导致萃取纤维损坏甚至致使纤维脱落。因此, 试验中不加入盐调节离子强度。

2.1.6 搅拌转速

搅拌转速是影响萃取效率和萃取速度的一个重要因素。搅拌能加快溶液中物质的传质速率, 从而提高萃取效率和灵敏度^[12]。在不搅拌或搅拌不足的情况下, 分析物在固相表面附有一层静止水膜, 减慢了分析物进入固相的速度, 使得萃取时间延长。试验结果表明: 当搅拌转速在 0~ 600 r · min⁻¹ 范围时, 提高搅拌转速对于提高萃取效率作用非常明显, 再继续提高搅拌转速, 萃取效率的提高幅度明显减缓。这主要是由于此时的搅拌已达到较佳的状态, 萃取效率主要受制于分析物在固相中的扩散速度。因此, 试验选择搅拌转速为 600 r · min⁻¹。

2.2 标准曲线与检出限

分别配制 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg · L⁻¹ 孔雀石绿标准溶液, 按优化的试验条件进行萃取、解吸, 然后在色谱条件下进行分析。以色谱峰高为纵坐标, 孔雀石绿质量浓度为横坐标绘制标准曲线。结果表明: 孔雀石绿的质量浓度在 0.05~ 2 mg · L⁻¹ 范围内呈线性, 相关系数为 0.992 2。按 3 倍信噪比计算方法的检出限为 0.003 mg · L⁻¹。

2.3 样品分析

在优化的试验条件下, 取 10.00 mL 养鱼池塘水样进行分析, 没有检出孔雀石绿, 以此养鱼池塘水样为基体, 加入 50 mg · L⁻¹ 孔雀石绿标准溶液 100, 200, 400 μL 进行加标试验, 平行测定 3 次, 结果表明: 回收率在 98.1% ~ 109.6% 之间。

孔雀石绿标准溶液的色谱图见图 1(a), 加标水样经固相微萃取吸附解吸后的色谱图见图 1(b)。

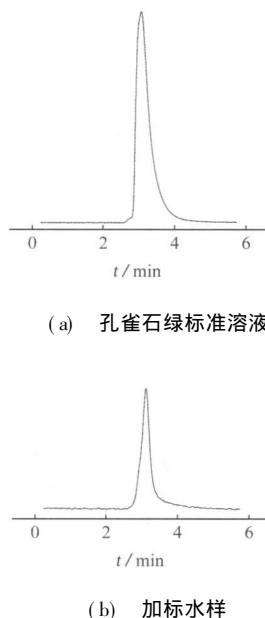


图 1 孔雀石绿的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of malachite green

参考文献:

- [1] 翟毓秀, 郭莹莹, 耿霞, 等. 孔雀石绿的代谢机理及生物毒性研究进展[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(1): 27-32.
- [2] 王邃, 陈丹峰, 郭智勇, 等. 孔雀石绿的污染治理及样品中残留物的分离检测方法[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(4): 146-150.
- [3] GB/T 19857- 2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定[S].
- [4] GB/T 20361- 2006 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定高效液相色谱荧光检测法[S].
- [5] 高华鹏, 李永夫, 沈维军, 等. 高效液相色谱-串联质谱联用测定鳊鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2008, 44(2): 103-106.
- [6] 龙洲雄, 万春花, 胡海山, 等. 高效液相色谱快速测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其无色产物的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2010, 46(4): 368-373.

(下转第 1097 页)

从图2可见:这些致香成分均存在于烟叶样品中,且其各自的选择离子也都存在于它们的总离子流色谱图中,而其所受的干扰亦较其总离子流色谱图小。

2.3 样品回流时间的选择

回流时间对提取致香成分的含量影响较大。回流时间过短,致香成分不能全部被提取;回流时间过长,又会使致香成分发生氧化和分解。按试验方法对烟叶样品分别加热回流1,2,3,5,4,5 h后,提取液经酸洗及无水硫酸钠干燥,再减压浓缩至1.50 mL,测定5种致香成分的峰面积。试验结果表明:烟叶样品的回流时间在3.5~5.0 h范围内,对5种致香成分的峰面积影响较小。试验选择回流时间为4 h。

2.4 标准曲线的绘制

取待测致香成分标准溶液,加入相同量的内标溶液,配制成标准溶液系列,按仪器工作条件分别测定标准溶液和内标物选择离子的峰面积,并以峰面积之比对质量浓度绘制标准曲线,线性范围、线性回归方程和相关系数见表1。

表1 线性范围、线性回归方程和相关系数

Tab. 1 Linearity ranges, linear regression equations and correlation coefficients

化合物	线性范围 $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	线性回归方程	相关系数
面包酮	0.15~50	$y = 0.0125\rho - 0.0017$	0.9993
β -芳樟醇	0.8~60	$y = 0.0282\rho - 0.0207$	0.9993
β -二氢大马酮	1.2~55	$y = 0.0127\rho - 0.0147$	0.9983
橙花基丙酮	1.8~75	$y = 0.0267\rho - 0.0475$	0.9994
β -紫罗兰酮	0.8~60	$y = 0.0316\rho - 0.0243$	0.9994

2.5 样品分析及回收试验

称取烟叶样品20.00 g,按试验方法进行处理,

并按仪器工作条件对样品溶液进行测定,同时进行加标回收试验,回收率及相对标准偏差见表2。

表2 样品分析及回收试验结果($n=4$)

Tab. 2 Results of analysis of sample and tests for recovery

化合物	测定值 $w / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	标准加入量 $w / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	测定总量 $w / (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	回收率 / %	RSD / %
面包酮	0.465	1.50	2.06	106.3	3.8
β -芳樟醇	0.395	1.50	1.94	103.0	4.3
β -二氢大马酮	0.370	1.50	1.80	95.3	5.7
橙花基丙酮	1.450	1.50	2.90	96.6	3.3
β -紫罗兰酮	0.750	1.50	2.35	106.6	4.4

结果表明:本方法具有较好的选择性及较高的灵敏度,可用于烟叶样品中5种致香成分的同时测定。

参考文献:

- [1] LLOYD R A, MILLER C N, NANCY H, et al. Flue-cured tobacco flavor. Essence and essential oil components[J]. Tob Sci, 1976, 20: 125-133.
- [2] KIMLAND B, AASEN A, ENZELL C R, et al. Tobacco Chemistry 10. Volatile neutral constituents of Greek tobacco[J]. Acta Chem Scand, 1972, 26(6): 2177-2184.
- [3] MATSUKURA M, TAKAHASHI K, ISHIGURO S, et al. Adsorption of volatiles from roasted tobacco on activated carbon and desorption recovery by ether extraction[J]. Agric Biol Chem, 1984, 48(4): 971-975.
- [4] FUJIMORI T, KASUGA P, MATSUSHITA H, et al. The aroma of burley tobacco, Part. Neutral aroma constituents in burley tobacco[J]. Agric Biol Chem, 1976, 40(2): 303-305.
- [5] 张悠金, 金闻博. 烟用香精香料[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1996: 206-214.

(上接第1094页)

- [7] 任秀莲, 魏琦峰, 程春萍, 等. 高效液相色谱测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(1): 173-173.
- [8] ZHANG Zhou-yao, YANG Min-jun, PAWLISZYN J. Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation[J]. Anal Chem, 1994, 66(17): 844-853.
- [9] 杨宇川, 辉永庆, 何小波, 等. 固相微萃取法的纤维涂层的研究进展[J]. 理化检验-化学分册, 2008, 44(9): 904-910.

- [10] AI J. Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations[J]. Anal Chem, 1997, 69(6): 1230-1236.
- [11] HERNANDEZ F, BELTRAN J, LOPEZ F J, et al. Use of solid-phase microextraction for the quantitative determination of herbicides in soil and water samples[J]. Anal Chem, 2000, 72(10): 2313-2322.
- [12] 杜新贞, 曹旭, 王雪梅, 等. 介孔涂层固相微萃取-高效液相色谱法测定水样中邻苯二所酸酯化合物[J]. 分析试验室, 2009, 28(8): 1-4.