

孔雀石绿等染料物质残留检测过程中 实验室污染的来源分析

高华鹏¹,李永夫²,刘海山³,宋熾青⁴,沈维军¹

(1. 徐龙食品集团有限公司,浙江宁波 315300; 2. 浙江林学院环境科技学院,浙江临安 311300;

3. 浙江出入境检验检疫局,浙江杭州 310012; 4. 广东省鳊鱼商会检测中心,广东佛山 528311)

[收稿日期] 2008-04-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2008)08-0021-05 [中图分类号] O657.7

[摘要] 为了分析孔雀石绿等残留检测过程中实验室污染的来源,本研究应用超高效液相-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定了常用实验室用品中孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫、亚甲基蓝的含量。纸样品用乙腈直接提取;笔样品采用书写痕迹后再用乙腈提取,UPLC-MS/MS定量测定。结果表明:在纸样品中,除了实验滤纸外,其它纸样品(如A4打印纸、报纸、标签纸等)均含有一定水平的目标物;笔样品中,除了铅笔2H、中性笔135012蓝、中性笔2180蓝色外,其它笔样品(如圆珠笔、记号笔、签字笔、水笔等)含有一定水平的目标物。为了降低实验室目标物污染风险,本文还对样品处理前和处理中的各个环节需要注意的问题做了较为详细的分析。本研究结果将有利于建立有效预防体系从而尽量避免样品在该类物质残留检测中的实验室本底污染和假阳性结果。

[关键词] 超高效液相色谱-串联质谱法;孔雀石绿;结晶紫;亚甲基蓝;残留检测

Analysis of Pollution Sources in Laboratory During the Determination of Residual Dyes such as Malachite Green

GAO Hua - peng¹, LI Yong - fu², LIU Hai - shan³, SONG Yan - qing⁴, SHEN Wei - jun¹

(1 Xulong Food Group Corporation, Ningbo, Zhejiang 315300; 2 School of Environmental Science and Technology, Zhejiang Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300; 3 Zhejiang Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou, Zhejiang 310012; 4 Guangdong Commerce Chamber of Ell, Fushan, Guangdong 528311; China)

Abstract: In order to analyze the pollution sources in laboratory during the residues determination, the content of malachite green (MG), leucomalachite green (LMG), crystal violet (CV), leucocrystal violet (LCV), and methylene blue (MB) in common laboratory paraphernalias was determined by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC - MS/MS) method. The paper samples were extracted by acetonitrile, and for pen samples the marks written by pen was extracted by acetonitrile. Results showed that as to paper samples, certain contents of the above objects were found in A4 printing paper, newspaper, and labeled paper, but not in experimental filter paper. For pen sample, certain contents of the above five objectives were found for ball - point pen, marker pen, signing pen and bosh, but not for pencil (2H), neutral pen (135012 blue), neutral pen (2180 blue). Furthermore, the problems that should be paid attention to in the each procedure prior to and in the sample treatment were discussed in detail to reduce the risk of objects pollution in laboratory. The

作者简介:高华鹏(1977年-),男,浙江宁波人,工程师,主要从事食品残留检测工作。E-mail: gaopp@tom.com

results of the present study would be beneficial to develop effective guard system for the prevention of background pollution in lab and false positive results as much as possible during the detection of the residual above objects

Key words: UPLC - MS/MS; malachite green; crystal violet; methylene blue; residual detection

孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫、亚甲基蓝是一类致癌、致畸药物,可对人类造成潜在的危害,在水产养殖和食品加工中禁止使用^[1-2]。该类物质在水产品中的残留检测目前已有的主要检测方法为高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用法^[3-7]。然而,在检测过程中,经常会碰到以下几个问题:样品本底高、分析结果稳定性差等。究其原因可能是在实验室处理分析样品的过程中存在不同程度的目标物污染。因此,研究和弄清在分析测定过程中实验室污染的来源对于提高该类物质痕量分析的技术水平具有非常重要的意义。本研究利用 UPLC - MS/MS法测定常用实验室用品中该类物质的含量,并对在实验分析流程中可能的污染过程进行了分析,提出了一些改进的方法。希望从事孔雀石绿等物质残留分析的同行在该类物质的检测前对实验环境做一个评估,从而提高在实际样品中该类物质痕量分析的技术水平。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 UPLC - PREMIER XE液质联用仪, Waters公司生产;高速离心机,上海安亭;均质器, IKA;氮吹装置,OA - SYS;固相萃取装置, SUPELCO;旋转蒸发仪,上海亚荣;旋涡混合器、超声波清洗器,天津奥特塞恩斯。

1.1.2 试剂和标准品 孔雀石绿 (MG)、无色孔雀石绿 (LMG)、结晶紫 (CV)、无色结晶紫 (LCV)、亚甲基蓝,德国 Dr Ehrenstorfer公司;甲醇、乙腈、正己烷、乙酸乙酯、甲酸、醋酸铵均为色谱纯,Merck公司;冰醋酸、二甘醇、异丙醇、无水乙酸钠、对甲苯磺酸、盐酸羟胺、均为分析纯,上海生工;去离子水, Millipore超纯水器自制。

1.2 标准溶液的配制 分别将 MG LMG CV、LCV、亚甲基蓝用乙腈溶解制成浓度为 1 μg/mL 的标准储备液,-16 避光保存;标准品工作液按照需要逐级稀释,低浓度标准品工作液必须临用现配。

1.3 样品处理 笔、纸样品均从市场采购。样品处理分为纸和笔两部分,纸取 1 cm × 0.5 cm 大

小,用 1 mL 乙腈浸泡、震荡 1 min,浸提液经 0.22 μm 膜过滤用于仪器测定 (有色标签纸中的颜色线条保留为约宽 1 mm、长 1 cm 的一条);笔的取样方式为在 1 cm × 0.5 cm 的无本底含量实验滤纸均匀书写一条长约 1 cm 的笔迹,晾 2 min 将该纸用 1 mL 乙腈浸泡、震荡 1 min,浸提液经 0.22 μm 膜过滤用于仪器测定。

1.4 色谱分析条件 色谱柱:BEH C₁₈柱 (2.1 mm × 50 mm,粒径 1.7 μm);柱温:40 ;样品室温度:10 ;进样体积:5 μL;流动相:缓冲盐溶液 (乙酸铵 5 mmol/L、甲酸 0.1%)和乙腈;流速:0.3 mL/min,梯度洗脱 (见表 1)。

表 1 梯度洗脱

| 序号 | 时间 /min | 流动相 | |
|----|---------|--------|-------|
| | | 缓冲液 /% | 乙腈 /% |
| 1 | 0 | 80 | 20 |
| 2* | 0.5 | 80 | 20 |
| 3* | 1.0 | 40 | 60 |
| 4* | 1.5 | 10 | 90 |
| 5 | 2.5 | 10 | 90 |
| 6 | 3.0 | 80 | 20 |

注:序号后标有“*”表示待梯度前一时间结束后直接改变比例。

1.5 质谱分析条件 电喷雾离子源,正离子电离 (ESI⁺);毛细管电压:2.5 kV;离子源温度:100 ;二级锥孔电压:3 V;锥孔反吹气:100 L/h;去溶剂气温度:400 ;去溶剂气流量:800 L/h。低质量分辨 LM1 13.5;高质量分辨 HM1 13.5;离子能量 1:0.8 V;碰撞室入口电压:0.0 V;碰撞室出口电压:1.0 V;反应气体 (氩气)流量:0.2 mL/min;碰撞室压力:4.80 × 10⁻³ Pa;低质量分辨 LM2 13.5;高质量分辨 HM2 13.5;离子能量 2:0.8 V;光电倍增器电压:650 V。在分析过程中,以保留时间和离子对 (母离子和两个子离子)信息比较进行定性分析;以母离子和响应值高的子离子进行定量。孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫在多反应监测模式下的质谱参数如表 2;1 μg/kg 标准溶液特征离子质量色谱图见图 1。

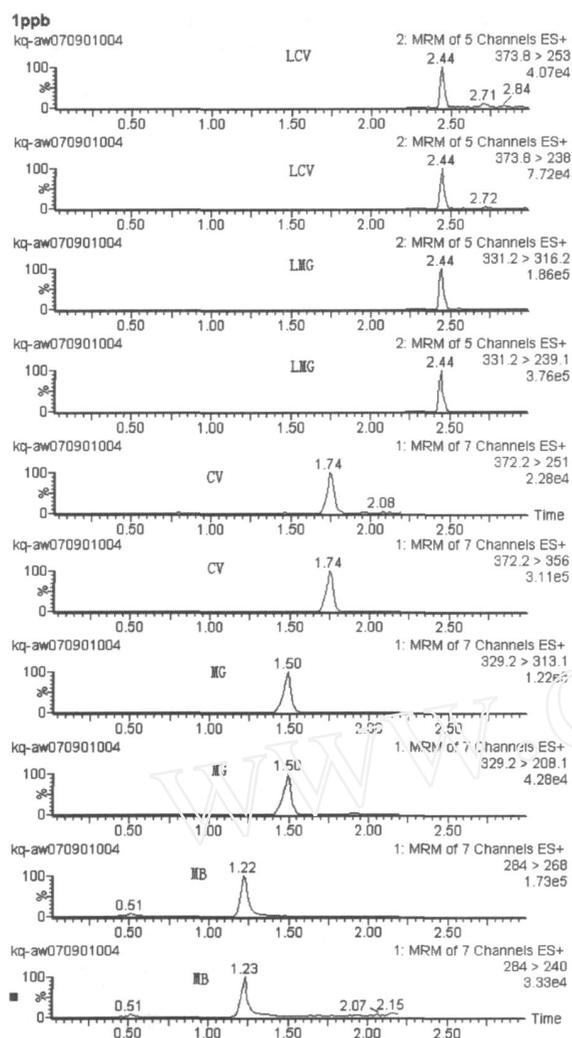


图 1 混合标样的色谱图 (1 µg/kg)

表 2 孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫、亚甲基蓝测定的质谱参数

| 被测物 | 母离子 | 子离子 | 锥孔电压 /V | 碰撞能量 /eV |
|--------|-------|----------------------|---------|----------|
| 孔雀石绿 | 329.2 | <u>313.1</u> , 208.1 | 65 | 32, 30 |
| 无色孔雀石绿 | 331.2 | <u>239.1</u> , 316.2 | 42 | 28, 20 |
| 结晶紫 | 372.2 | <u>356</u> , 251 | 50 | 33, 35 |
| 无色结晶紫 | 373.8 | <u>238</u> , 253 | 52 | 35, 27 |
| 亚甲基蓝 | 284.0 | <u>268</u> , 240 | 50 | 35, 40 |

注:带下划线的子离子用来作定量分析。

分别配置 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10.0 µg/L 的混合标准溶液,并加入与所用处理样品相同浓度的内标物,用 UPLC-MS/MS 联用法进行测定。试验结果以标样浓度 (µg/L) 为横坐标,以响应值为纵坐标,求标准曲线线性回归方程。亚甲基蓝、孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫标准曲线的线性方程和相关系数见表 3。本试验确定亚甲基蓝、孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、无

色结晶紫定量检测限分别为 0.1、0.1、0.1、0.5 和 0.5 µg/L。

表 3 标准曲线的线性方程和相关系数

| 标样 | 线性方程 | 相关系数 |
|--------|------------------------|----------|
| 亚甲基蓝 | $y = 25507x - 146.388$ | 0.999 02 |
| 孔雀石绿 | $y = 12207x - 46.388$ | 0.999 88 |
| 无色孔雀石绿 | $y = 33667x + 166.73$ | 0.999 64 |
| 结晶紫 | $y = 22191x + 91.812$ | 0.999 55 |
| 无色结晶紫 | $y = 4480.4x + 138.29$ | 0.999 51 |

2 结果

本文的目的在于提高孔雀石绿等残留分析的水平,并不是深入研究纸张、笔迹油墨的成分分析,所以对于其他染料的成分并没有多作关心,而是有针对性的分析了孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫、亚甲基蓝等 5 个物质。而且对于样品中上述五类物质的确切含量也不作更多关心,我们的主要目的是确定是否存在污染物以及污染物含量高低和污染可能性大小等问题。由于样品处理的方法所致,我们实验测试得到的含量数据大概是原样品真实含量的万分之一到百万分之一,样品处理的方法已经将含量稀释了好几个数量级,具体数据无法计算。但是我们可以明确一点,很多测试样品含量很高,而且极易对我们的水产、食品样品分析构成污染。具体测定汇总数据见表 4。

3 讨论

3.1 样品处理 由于纸张、笔迹油墨中的含量分析相对痕量的残留分析来说是非常容易的,首先其含量要高几个数量级,而且样品处理也显得很简便,参考笔迹分析等相关文献^[8],用乙腈进行直接提取,经膜过滤,直接用于仪器测定;结果显示含量在可测范围之内,或者高于常规痕量分析,较高含量的样品经适当稀释后定量测定。

3.2 提取条件的统一及含量的估算 纸、笔样品的提取测试条件尽可能一致,尽管我们无法准确测定笔中的成分含量水平,但是我们尽量使每个样品的处理过程一致,使各个样品的含量水平有一个横向的比较。样品提取处理的方法实际上是将纸、笔中油墨稀释了很多倍测定,由实验数据可以设想有些笔中油墨的孔雀石绿的含量水平相对残留分析是非常高的,其含量估计在百分之几。

3.3 检测过程需注意的问题

3.3.1 水产、食品样品的采样、标记和保存 实验

表 4 常用实验用品中的孔雀石绿、无色孔雀石绿、结晶紫、无色结晶紫、亚甲基蓝含量

| 序号 | 样品名称 | 浓度 / (ng · mL ⁻¹) | | | | |
|----|------------|-------------------------------|-------|-------|-------|--------|
| | | 亚甲基蓝 | 结晶紫 | 无色结晶紫 | 孔雀石绿 | 无色孔雀石绿 |
| 1 | 实验滤纸 | - | - | - | - | - |
| 2 | A4打印纸 | - | 10.5 | 0.7 | 1.2 | - |
| 3 | 报纸 | 0.5 | - | - | 0.1 | - |
| 4 | 无印刷标签纸 | 10.9 | 0.3 | 0.7 | - | - |
| 5 | 红匡标签纸 | 20.5 | 0.3 | 0.3 | - | - |
| 6 | 蓝匡标签纸 | 151.4 | 11.1 | 1.1 | - | - |
| 7 | HP激光打印字迹 | - | 1.3 | 0.2 | 0.1 | - |
| 8 | 圆珠笔 220 | - | 38.9 | 21.6 | - | - |
| 9 | 圆珠笔 SF201 | 0.6 | 121.9 | 39.2 | - | - |
| 10 | 圆珠笔 164 | - | 93.9 | 41.8 | - | - |
| 11 | 圆珠笔 2001 蓝 | - | 149.5 | 169.8 | - | - |
| 12 | 圆珠笔 2001 黑 | - | 117 | - | - | - |
| 13 | 圆珠笔 851 | - | 117.2 | 53.9 | - | - |
| 14 | 圆珠笔 BL367 | - | 131.9 | 43.7 | - | - |
| 15 | 中性笔 150 红 | 1.5 | - | - | - | - |
| 16 | 中性笔 1350 蓝 | - | - | - | - | - |
| 17 | 中性笔 2180 蓝 | - | - | - | - | - |
| 18 | 中性笔 009 黑 | 0.7 | - | - | - | - |
| 19 | 签字笔 | 1.1 | - | - | 88.6 | - |
| 20 | 双头水笔蓝 | - | - | - | 201.2 | - |
| 21 | 双头水笔黑 | - | - | - | 0.1 | - |
| 22 | 记号笔 700 | 3.6 | - | - | 0.1 | - |
| 23 | 铅笔 2H | - | - | - | - | - |

注：“-”表示未检出。

中样品的提取和保存不可避免的要涉及到包装、标记和保存。包装一般采用塑料膜包裹、塑料袋盛装、塑料袋真空包装等；标记一般采用大标签纸水笔、圆珠笔书写或者打印机打印后粘贴，或者纸签绳系、订书机订合；保存一般冷藏或者冷冻。由于标签纸以及书写笔类都有较高含量的目标分析物，我们很难做到分析样品和纸、笔等物品的绝对隔离；尽管实验流程中严格杜绝了污染，但是非专业的送样人员或许已经在采样、封样的过程中用笔、纸等污染了样品。或许样品本身是阴性的，但是实验数据显示样品已经超标，高性能的仪器定性定量的分析使我们更加确信无疑，重复的留样检测使实验结果得到反复验证，但是最为关键的是样品已经没有代表性，重新抽样才是最为必要的。

3.3.2 样品分析过程中的标记 样品在实验流程中必须明确标记，避免样品的混淆，样品在整个实验流程中都需要标记，大致会涉及以下几种实验用品的标记：离心管、分液漏斗、旋转蒸发瓶、SPE小柱、仪器进样瓶等；标记方法有粘标签纸、记号笔直接书写，而标签纸的书写大部分是使用中性水笔或者圆珠笔的，无意间高浓度的目标物可能已经在

们实验环境中存在并构成污染。专业技术人员会非常小心的处理样品，避免差错和污染，但是手、笔、标签纸、样品、瓶瓶罐罐等轮流接触是时刻发生的，而且很难完全避免交叉污染的发生。

3.3.3 样品分析后实验用品的清洗 如果所有实验用品瓶都是一次性使用的，那么样品污染的就可以大大降低。但是很多情况下我们会彻底清洗后重复使用，这就把实验用品外壁的污染源进行了清洗、稀释；污染范围存在扩大的可能。过程如下：将离心管、旋转蒸发瓶等浸泡于清洗液中；浸泡一段时间后用水反复清洗；不对物品以及实验方法影响的有机溶剂清洗；超纯水清洗。污染发生过程如下：不去除标签纸、油性笔墨迹的清洗液浸泡使外壁的污染物扩散到了实验用品的每个角落；清洗工作的彻底程度我们很难保证，极微量的残存物就构成了下次做实验时实验用品对样品的污染，而且我们一般在残留分析中对一些高浓度样品、高浓度标准品使用的实验用品是作丢弃处理的，因为清洗的不彻底是很容易构成污染的，但是笔迹等污染来源不可预见，导致我们本该丢弃的实验用品没有丢弃，而且清洗可能也不是那么彻底。

3.3.4 其他环节 由于孔雀石绿、结晶紫在日常用品中的广泛使用对食品安全残留检测工作构成多元化的污染,我们也无法保证对所有污染来源逐一分析,但是可以明确的一个问题就是我们有必要重新改进实验方法,而且有必要对实验室作一个污染评估,有效避免样品处理和仪器分析的各种污染。另外,值得我们思考的问题就是,或许孔雀石绿类物质在平时我们非食物来源的摄入量已经远远超过食品中的来源,因此是否有必要出台食品接触物中该类物质的法规限量标准是值得相关部门考虑的一个问题。

参考文献:

- [1] 刘军,胡华军,张明洲,等. 渔药孔雀石绿的毒性、危害和检测现状[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 397 - 340.
- [2] 朱华平,黄樟翰,谢刚,等. 翘嘴红鲌对水产药物的敏感性试验[J]. 淡水渔业, 2003, 33(2): 18 - 20.
- [3] 任秀莲,魏琦峰,曲径,徐成刚. 反相高校液相色谱法测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物[J]. 化学分析计量, 2006, 15(4): 32 - 34.
- [4] Valle L, Diaz C, Zanocco A L, Richter P. Detemination of the Sum of Malachite Green and Leucomalachite Green in Salmon Muscle by Liquid Chromatography - atmospheric Pressure Chemical Ionisation - mass Spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067: 101 - 105.
- [5] Bergeerff A A, Schepenisse P. Detemination of Residues of Malachite Green in Aquatic Animals[J]. J. Chromatography B, 2003, 788: 351 - 359.
- [6] 朱宽正,王鹏,林雁飞,等. 液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其它的隐色代谢物残留[J]. 色谱, 2007, 25(1): 66 - 69.
- [7] 吴学立,吴永宁,赵云峰,等. 液相色谱-线性离子阱检测草鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢产物[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 209 - 214.
- [8] 齐宝坤,刘荣福,谢明清. 液相色谱法测定字迹色痕中的黑色圆珠笔油墨[J]. 广东公安科技, 2004(4): 10 - 11.

美研制出对付多种禽流感病毒的“DNA疫苗”

新华网华盛顿 7月1日电(记者张忠霞)一种流感疫苗通常只对某一特定的流感病毒毒株发挥免疫效应,但美国研究人员开发出的新型“DNA疫苗”成功地使实验动物同时对多种禽流感病毒毒株产生免疫反应。

宾夕法尼亚大学研究者戴维·魏纳领导的科研小组在最新一期《第一公共科学图书馆》网络期刊上报告说,他们利用DNA(脱氧核糖核酸)分子作为载体,把疫苗送入动物体内。这个DNA分子经过特殊处理,可使动物获得产生抗原的遗传信息,进而引发大范围的免疫反应,抵御多种禽流感病毒的入侵。

传统流感疫苗的免疫机理是,把某一种特定的流感病毒毒株制剂注射入动物体内,使免疫系统产生针对这种病毒的免疫反应。但禽流感病毒能迅速变异形成多种新的毒株,以逃避免疫系统针对早先毒株产生的反应。因此,以传统方法开发疫苗应对可能发生的禽流感大流行难度很大。

魏纳等人合成的“DNA疫苗”的防疫原理与传统流感疫苗很不相同。这种疫苗注射后,会成为动物细胞的一部分,DNA分子使动物细胞获得产生抗原的遗传信息,进而“诱发”针对禽流感病毒的大范围免疫反应,即便是动物从未接触过的那些禽流感病毒毒株也在免疫范围之内。

为了保证疫苗顺利输送到动物细胞内,研究人员在注射疫苗时还利用“电穿孔”法,也就是使动物细胞置于很短的电脉冲之下。“电穿孔”对动物没有危害,但能使细胞“茅塞顿开”,DNA分子可更加顺畅地进入。

研究人员以灵长类动物、老鼠、白鼬为对象进行的实验显示,由“DNA疫苗”诱发产生的抗体很快就在动物体内达到了免疫保护水平。老鼠和白鼬的免疫效果尤其明显:暴露在多种禽流感病毒毒株面前时,它们的感染率和死亡率均控制在理想范围之内。

研究人员说,如果人体试验也证明上述“DNA疫苗”安全有效,该疫苗将成为人类应对禽流感流行的有力武器。此外,这种“DNA疫苗”的研制思路对于开发针对人类流感的新型疫苗也有启发。

来源:新华网 http://news.xinhuanet.com/newscenter/2008-07/02/content_8473884.htm [2008-07-08]