

文章编号: 1674-5566(2010)01-0056-05

## $\text{Na}^+ \text{-Ti}(\text{SO}_4)_2$ 法检测草鱼中孔雀石绿残留

钱科蕾<sup>1,2</sup>, 胡 鲲<sup>1,2</sup>, 杨先乐<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306)

**摘要:**首次建立了  $\text{Na}^+ \text{-Ti}(\text{SO}_4)_2$  法检测草鱼中孔雀石绿残留的方法:孔雀石绿溶于浓硫酸显黄色,稀释后显暗黄色,  $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$  使其褪色,加入  $\text{Na}^+$  变为白色沉淀,依据沉淀量对孔雀石绿残留进行定量分析。优化实验条件,采用  $\text{pH}=7.4$ 、硫酸钛和氯化钠的浓度均为  $2.0 \text{ mol/L}$  时,可有效地检测孔雀石绿残留。方法学实验结果表明:该方法最低检测量为  $0.08 \text{ mg/kg}$  在草鱼肌肉和肝脏中的回收率分别为  $65.00\% \sim 75.63\%$ ,  $63.75\% \sim 71.35\%$ , 相对标准偏差分别为  $4.82\% \sim 1.89\%$ ,  $4.93\% \sim 1.97\%$ 。该方法快速、简单、灵敏、准确,依据白色沉淀仅凭肉眼即可进行初筛,适合于快速检测孔雀石绿在水产品中的残留。

**关键词:**  $\text{Na}^+ \text{-Ti}(\text{SO}_4)_2$  法;孔雀石绿;残留;检测

**中图分类号:** S 948 **文献标识码:** A

## Determination of malachite green residue in grass carp tissues by $\text{Na}^+ \text{-Ti}(\text{SO}_4)_2$

QIAN Ke-lei<sup>1,2</sup>, HU Kun<sup>1,2</sup>, YANG Xian-le<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. State Collection Center of Aquatic Pathogens, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In this paper  $\text{Na}^+ \text{-Ti}(\text{SO}_4)_2$  method to detect residue of malachite green in grass carp was first established. Malachite green dissolved in concentrated sulfuric acid yellow, diluted significantly dark yellow.  $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$  makes it fade, a white precipitate by adding  $\text{Na}^+$ , malachite green residues based on the amount of precipitation for the quantitative. Optimization of experimental conditions, we choose  $\text{pH}=7.4$ ,  $2.0 \text{ mol/L}$  of titanium sulfate and sodium chloride, it can be effective in detecting residues of malachite green. The methodology results show that the limit of detection is  $0.02 \text{ mg/kg}$ , the recovery of muscle and liver in grass carp were  $65.00\% \sim 75.63\%$ ,  $63.75\% \sim 71.35\%$ , the relative standard deviation were  $4.82\% \sim 1.89\%$ ,  $4.93\% \sim 1.97\%$ . The method is fast, simple, sensitive, accurate and by the naked eye, a white precipitate can be detected only by screening, suitable for rapid detection of malachite green residues in aquatic products.

**Key words:** method of  $\text{Na}^+ \text{-Ti}(\text{SO}_4)_2$ ; malachite green; residue; detection

孔雀石绿 (Malachite Green, MG) 是一种合成的三苯甲烷类工业染料,曾被广泛用作驱虫剂和

收稿日期: 2009-01-04

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytk-49-17); 公益性行业科研专项经费 (nyhyzx07-042)

作者简介: 钱科蕾 (1984-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水产品中禁用药物残留快速检测技术。E-mail: aliceqian\_522@yahoo.com.cn

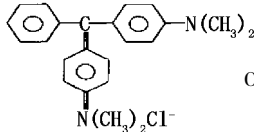
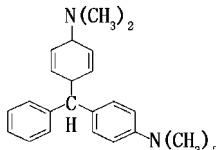
通讯作者: 杨先乐, E-mail: xlyang@shou.edu.cn

杀菌剂,以杀灭水产动物体外的寄生虫、原生动物和鱼卵中的霉菌等<sup>[1]</sup>。但由于孔雀石绿及其代谢产物无色孔雀石绿(结构如表1)具有高毒、高残留、“三致”等毒副作用<sup>[2]</sup>,被列入禁用药物清单。目前由于种种原因,由水产品中孔雀石绿残留引发的水产品安全问题引起公众媒体的广泛关注。缺乏快速、有效的检测手段是重要因素之一。目前,对于孔雀石绿的检测方法主要为依赖于实验室条件下的高效液相色谱法(HPLC)<sup>[3-4]</sup>、气相色谱-质谱法(GC/MS)<sup>[5-6]</sup>、酶联免疫法(ELISA)<sup>[7]</sup>、高效毛细管电泳分析法(HPCE)法<sup>[8]</sup>等,这些方法大都费时、成本不菲或对人员、环境等因素要求较高。不同于常规的免疫学方法,本文独辟蹊径地建立了利用Na<sup>+</sup>Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>法检测水产动物组织中孔雀石绿残留的方法,以降低孔雀石绿检测成本、提高检测方法的灵敏度和准确性为目的,为保障和完善水产品药物残留检测技术体系作出有益的探索。建立在半实验室条件下的孔雀石绿快速检测方法,面向生产、销售和流通等环节具有简便、灵敏、对条件(包括环境和人员)依赖性低等特点,是对现有实验室检测方法的有益补充,是落实孔雀石绿禁用的重要技术保障。

表1 孔雀石绿及其代谢产物无色

孔雀石绿的化学结构式

Tab. 1 Chemical structure of malachite green and leucomalachite green

药物	结构式	分子式	分子量 (g/mol)
孔雀石绿		C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> CN <sub>2</sub>	364.92
无色孔雀石绿		C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub>	330

## 1 材料与方

### 1.1 材料

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)100尾,平均体重约(250.0±5.0)g购于南通市国营养殖场

(养殖期间未用药),实验室试验前暂养,饲养水温8~12℃,24h充气,暂养7d

### 1.2 实验试剂与主要仪器

孔雀石绿(批号52520UN3077)、硫酸钛(批号074F0126)购于Sigma公司。

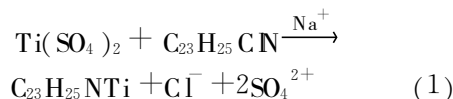
氯化钠、氢氧化钠、碳酸钠、浓盐酸、浓硫酸、乙腈、二氯甲烷、盐酸羟胺、乙酸铵、对甲苯磺酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯,购于上海国药集团。

主要仪器有WH-2型漩涡混合仪(金坛市盛蓝仪器制造有限公司)、JY2002型微量分析天平(感量0.00001g SHIMADZU)、TGL-16G台式离心机(上海金鹏分析仪器有限公司)、pH计(METTLER TOLEDO Delta 320,梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、三洋MOV-112F型干燥箱(北京鑫瑞科技发展有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 Na<sup>+</sup>Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>法检测孔雀石绿原理

在已称量过净重的离心管中,将检测样品维持在特定的pH环境下,加入定量的硫酸钛和浓硫酸,混合均匀后,再加入定量的钠盐,混合,离心去上清,将沉淀物烘干至恒重,称重,所得重量减去原离心管重量即得沉淀物恒重。据化学式(1)被检测到的孔雀石绿含量与沉淀物比值为1:1。



#### 1.3.2 实验条件的优化

**钠盐种类** 取2mL孔雀石绿母液,加入0.5mol/L硫酸钛溶液2mL再加入2mL浓硫酸,漩涡混合仪上充分混合2min,分别加入2.0mol/L氯化钠和碳酸钠溶液2mL,调节pH值分别至4.0、6.9、7.4、10.1、11.0,漩涡震荡2min后,在8000r/min条件下离心10min,去上清取沉淀,烘干至恒重,称干重。每个样品重复3次。

**硫酸钛浓度** 取2mL孔雀石绿母液,分别加入0.5mol/L、1.5mol/L、2.0mol/L的硫酸钛溶液2mL,再加入2mL浓硫酸,漩涡混合仪上充分混合2min,再加入2.0mol/L的氯化钠溶液2mL,用10%的稀盐酸或1mol/L的氢氧化钠调节pH值分别至4.0、6.9、7.4、10.1、11.0,漩涡震

荡 2 min 后, 在 8000 r/min 条件下离心 10 min 去上清取沉淀, 烘干至恒重, 称干重。每个样品重复 3 次。

### 1.3.3 孔雀石绿母液方法学实验

将孔雀石绿母液 (0.02 mol/L) 用蒸馏水依次稀释成 0.01, 0.001 和 0.0001 mol/L 的工作溶液。取 2 mL 工作液置于在 1.3.2 优化的反应体系中测定孔雀石绿的残留量。每个样品重复 3 次。测定最低检测量、回收率重现性等方法学数据。

### 1.3.4 组织样方法学实验

**样品处理** 准确称取 10.00 g 草鱼肌肉 (或 5.0 g 肝脏), 匀浆捣碎, 依次加入 0.25 g/mL 盐酸羟胺 1 mL, 0.05 mol/L 对甲苯磺酸 1 mL, 0.1 mol/L 乙酸铵缓冲溶液 2 mL 和 40 mL 乙腈, 均质 2 min (10 000 r/min), 离心 3 min (3 000 r/min), 将上清液转移到 250 mL 分液漏斗中, 用 20 mL 乙腈重复提取残渣一次, 合并上清液。于分液漏斗中加入 30 mL 二氯甲烷, 35 mL 水, 振摇 2 min 静置分层, 收集下层有机相于 150 mL 梨形瓶中, 再用 20 mL 二氯甲烷萃取一次, 合并二氯甲烷层, 45 °C 减压旋转蒸发至干。将蒸发好的提取物转移至已称量好净重的离心管中, 用 2 mL 的 PBS 缓冲液溶解组织样提取物。将提取液置于在 1.3.2 优化的反应体系中测定孔雀石绿的残留量。

**方法学数据的测定** 测定最低检测量、回收率重现性等方法学数据。

**残留的测定及代谢规律的研究** 以 8.0 mg/kg 的孔雀石绿溶液药浴草鱼 (72 尾) 1 h 后, 分别于药浴后 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 4 d, 6 d, 10 d, 20 d, 30 d 的 12 个时间点随机取 6 尾鱼为检测样本, 按照 1.3.1 的方法测定草鱼组织中孔雀石绿的残留量, 未进行药浴的鱼作为空白对照。比较孔雀石绿在草鱼组织中的代谢规律。

## 2 结果

### 2.1 检测条件的优化

#### 2.1.1 钠盐

在 0.5 mol/L 硫酸钛, 不同 pH 值和不同钠盐的条件下, 沉淀物干重见图 1。其中, 沉淀物干重随着不同钠盐的加入而明显增加; 加入氯化钠时沉淀物干重最大, 不加任何钠盐时沉淀最小。沉

淀物干重并不随 pH 值的增加而线性增加, 当 pH 值为 7.4, 在氯化钠、碳酸钠、蒸馏水的反应体系中, 沉淀物干重达到最大, 分别为 0.006 0 g, 0.004 4 g, 0.003 0 g。由此可以确定氯化钠为适合反应的钠盐。

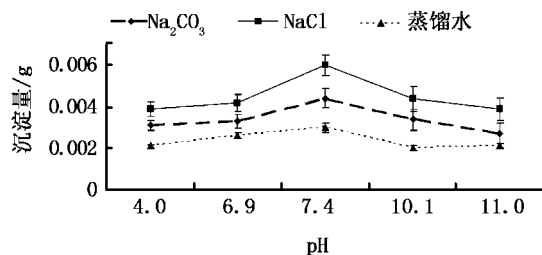


图 1 不同 Na<sup>+</sup> 物质对孔雀石绿检测方法的影 (n=3)

Fig 1 The effect of different Na<sup>+</sup> on malachite green detection (n=3)

#### 2.1.2 硫酸钛浓度

在不同 pH 值和不同浓度硫酸钛的条件下, 沉淀物干重见图 2。其中, 沉淀物干重随着硫酸钛浓度的增加而明显增加; 硫酸钛浓度为 2 mol/L 时沉淀物干重最大, 浓度为 0.5 mol/L 时最小。沉淀物干重并不随 pH 值的增加而线性增加, 当 pH 值为 7.4, 在 0.5 mol/L, 1.5 mol/L 和 2 mol/L 硫酸钛的反应体系中, 沉淀物干重达到最大, 分别为 0.006 0 g, 0.012 4 g, 0.013 1 g。由此可以确定 2 mol/L 的硫酸钛为最佳反应条件。

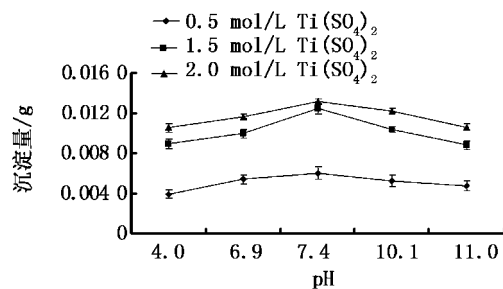


图 2 pH、硫酸钛浓度对孔雀石绿检测方法的影 (n=3)

Fig 2 The effect of pH and the concentration of titanium sulfate on malachite green solution (n=3)

### 2.2 孔雀石绿母液方法学数据的测定

在 pH=7.4, 2.0 mol/L 硫酸钛、2.0 mol/L 氯化钠的反应条件下, 沉淀物干重见表 2。沉淀物干重随着工作液浓度的减小而降低, 工作液浓度为 0.0001 mol/L 时白色沉淀物未见。本方法检测孔雀石绿残留的最低检测量为 0.25 mg/mL。

在孔雀石绿工作液浓度为 0.02 mol/L, 0.01 mol/L, 0.001 mol/L 的溶液中的回收率为 73.29% ~ 71.43%, 相对标准偏差为 2.93% ~ 1.97%。所得数据表明该方法的重现性较理想(表 3)。

表 2 母液倍比稀释检测结果 (n=3)

Tab. 2 Detection of different concentration of mother liquid (n=3)

工作液浓度 (mol/L)	0.02	0.01	0.001	0.000 1
肉眼辨别	+	+	+	-
沉淀量 (g)	0.010 7	0.005 3	0.000 5	-

表 3 母液回收率的测定 (n=3)

Tab. 3 Recovery of different concentration of mother liquid (n=3)

理论添加浓度 (mol/L)	测定值 (g)	回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
0.02	0.010 7±0.000 18	73.29	1.68
0.01	0.005 3±0.000 23	72.60	4.33
0.001	0.000 5±0.000 03	71.43	6.00

## 2.3 组织样方法学数据的测定

### 2.3.1 最低检测量

在 pH=7.4, 2.0 mol/L 的硫酸钛、2 mol/L 的氯化钠反应条件下, Na<sup>+</sup>Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 法检测孔雀石绿在草鱼肌肉中残留的最低检测量为 0.02 g/kg 在肝脏中的最低检测量为 0.000 08 g/kg。

### 2.3.2 回收率和重现性

采用 pH=7.4, 2.0 mol/L 的硫酸钛、2 mol/L 的氯化钠检测草鱼肌肉和肝脏中孔雀石绿残留的回收率和重现性(表 4)。在孔雀石绿添加浓度为 8.0 g/kg, 12.0 g/kg, 16.0 g/kg 的草鱼肌肉和肝脏中平均回收率分别为 65.00% ~ 75.63%, 63.75% ~ 71.35%, 相对标准偏差为 4.82% ~ 1.89%, 4.93% ~ 1.97%。所得数据表明此方法的重现性较理想。

## 2.4 孔雀石绿在草鱼组织中残留消除规律

以 8.0 g/kg 的孔雀石绿溶液药浴草鱼, 草鱼肌肉和肝脏组织中孔雀石绿残留见图 3 所示。在药浴后 1 h 草鱼肌肉中所能检测到的含量最高, 达到 0.005 3 g 之后有所下降, 当在 6 h 时再

次出现检测量至高点达到 0.004 2 g 在第 6 d 时所能检测到的含量仅为 0.000 2 g 在药浴后 6 h 草鱼肝脏中所能检测到的含量最高, 达到 0.002 6 g 在第 6 d 时所能检测到的含量仅为 0.000 4 g 之后随着暂养时间的延长检测量显著下降, 到第 10 d 后肌肉和肝脏中均检测不出。

表 4 草鱼组织中孔雀石绿回收率的测定 (n=3)

Tab. 4 Recovery of malachite green in main tissues of grass carp (n=3)

组织	理论添加浓度 (g/kg)	测定值 (g/kg)	回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
肝脏	8.0	5.10±0.40	63.75	4.93
	12.0	8.07±0.33	67.25	2.99
	16.0	11.42±0.29	71.35	1.97
肌肉	8.0	5.20±0.36	65.00	4.82
	12.0	8.55±0.31	71.25	2.95
	16.0	12.10±0.25	75.63	1.89

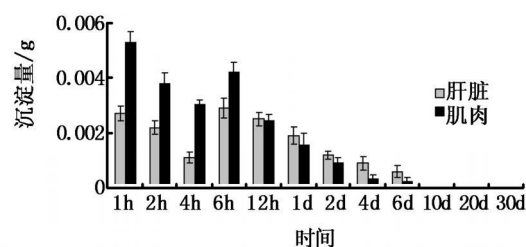


图 3 药浴后草鱼肝、肌肉组织中孔雀石绿的残留

Fig. 3 Residue of malachite green in liver and muscle of grass carp after medicine bath

## 3 讨论

### 3.1 关于孔雀石绿的检测方法

目前, 对于孔雀石绿的检测方法主要集中为依赖于实验室条件下的高效液相色谱法 (HPLC)、酶联免疫法 (ELISA) 等, 这些方法灵敏度高, 准确性高, 假阳性少, 适合作为药物残留检测的复筛方法; 而针对半实验室条件下的快速检测方法几乎是空白。本实验首次采用的是普通的化学方法, 基于孔雀石绿本身特有的化学性质来检测, 该方法主要鉴于孔雀石绿与硫酸钛在浓硫酸存在的情况下能发生特异性结合, 且其他含三苯甲烷的类似物质不能与硫酸钛结合, 在 Na<sup>+</sup>存在下能使孔雀石绿与硫酸钛的结合物发生沉淀, 从而通过 1:1 的比例间接计算得出结果。该方法在其他水产禁用药物的检测中还未被使用

过。该检测方法所需要的检测时间较少,可根据肉眼观察是否有白色沉淀物来进行初步判定;其次,该方法的重现性较理想,实验成本低,操作简单,对操作人员及实验环境要求不苛刻,具有广阔的应用前景,适用于检测水产品中孔雀石绿残留。

### 3.2 关于检测条件的优化

#### 3.2.1 关于 pH 值

在水溶液中,由于 pH 的不同,孔雀石绿分子本体可缓慢地结合水中的氢氧根,从而产生非离子状态下的无色醇碱形式的孔雀石绿分子<sup>[9]</sup>。孔雀石绿的化学电离常数为 6.9。当 pH 为 4.0 时完全电离, pH 为 6.9 时电离 50%, pH 为 7.4 时电离 25%,而当 pH 大于或等于 10.1 时则不发生电离<sup>[10-11]</sup>。而 pH 为 7.4 时,有色形式的孔雀石绿分子和无色醇碱形式存在的孔雀石绿分子以 6:1 的浓度达到平衡<sup>[12]</sup>。在本实验中, pH 为 7.4 是本实验检测的最高点,故在组织样检测时采用 pH 为 7.4。

#### 3.2.2 关于硫酸钛浓度

本实验采用了 2 mol/L 的硫酸钛来检测,而更高浓度的硫酸钛在室温条件下,自身会结晶析出,阻碍实验的进一步进行,因此,本实验未采用更高浓度的硫酸钛来做进一步的研究。

Roybal 等<sup>[13]</sup>通过对鲑鱼的孔雀石绿药浴实验证明:鱼体内同时残留孔雀石绿和无色孔雀石绿,还有少部分其它代谢产物,无色孔雀石绿的残留量一直较高,其残留量大小是由代谢时间决定的,因此检测水产品中的孔雀石绿残留通常是同时检测孔雀石绿和无色孔雀石绿。本实验采用普通的化学方法,目前仅能检测到孔雀石绿母体的存在,无法检测到无色孔雀石绿,故本技术还需要改进,深入对孔雀石绿分子结构改造的研究,从而建立一种简单、快速、灵敏的孔雀石绿及其代谢产物无色孔雀石绿的同步检测方法,进一步完善孔雀石绿的含量测定及水产品中残留检测的方法标准。

### 参考文献:

- [1] Celada J D, Carmal J M, Royuela M S et al. Effects of different antifungal treatments on artificial incubation of the astacid crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana) eggs [J]. *Aquaculture* 2004, 239: 249-259.
- [2] Srivastava S, Sinha R, Roy D. Toxicological effects of malachite green [J]. *Aquatic Toxicology* 2004, 66 (5): 319-329.
- [3] 邱绪建, 林洪, 王联珠, 等. 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.
- [4] 蔡泓, 陈伟, 岑小青, 等. 水产品中孔雀石绿及其代谢物残留量快速检测的研究 [J]. *化学试剂*, 2006, 28(7): 411-413.
- [5] Lee K in Chung, Wu Jian Lin, Cai Zongwei. Determination of malachite green and leucomalachite green in edible goldfish muscle by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B* 2006, 843: 247-251.
- [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、结晶紫以及它们的隐色代谢物残留 [J]. *色谱*, 2007, 25(1): 66-69.
- [7] 龚鹏飞, 王权, 陈永军. 孔雀石绿单克隆抗体的制备及其鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2007, 37 (04): 359-362.
- [8] 唐宁, 周梅仙, 杨平. HPLC 测定鱼体内孔雀石绿主要代谢物的残留 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(27): 35-36.
- [9] Gouanchat C. Malachite green in fish culture (state of the art and perspectives) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48: 142-145.
- [10] Goldacre R J, Philips J N. The ionization of basic triphenylmethane dyes [J]. *Physical Chemistry of Polymer Solutions* 1949: 1724-1732.
- [11] Plakas S M, El Saik K R, Stehly G R. Tissue distribution and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Fish Aquatic Science* 1996, 53: 1427-1433.
- [12] Genudo N, Akeman D J, Clifton-Hadley R S et al. Pathological effects of repeated doses of malachite green [J]. *Annual Review of Fish Diseases* 1991, 14: 521-532.
- [13] Roybal J E, Denver C O, Pfenning A P. Determination of malachite green and its metabolite leucomalachite green in catfish (*Ictalurus punctatus*) tissue by liquid chromatography with visible detection [J]. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 1995, 78: 453-457.