

基于三维荧光光谱检测水产品中隐性孔雀石绿残留量

李宁驰¹, 任诺钰¹, 刘春宇^{1,2*}, 姚治海^{1,2}, 蔡红星¹

1. 长春理工大学理学院光谱探测科学与技术省重点实验室, 吉林 长春 130012
2. 吉林省求是光谱数据科技有限公司, 吉林 长春 130012

摘要 孔雀石绿作为一种化学制剂, 因其杀菌性较好、价格便宜以及少量添加不易察觉等特点, 一些商家将其作为杀菌剂在水产品中使用。然而, 因孔雀石绿代谢产物隐性孔雀石绿具有稳定性以及高毒性的化学性质, 其已被我国列为禁用药物。该研究深入讨论了如何使用三维荧光光谱法检测水产品中的隐性孔雀石绿, 利用三维荧光光谱技术, 探究隐性孔雀石绿的三维特征, 并进一步分析其荧光强度与 pH 变化关系, 以研究其最佳检测环境。最后针对鱼肉样品进行荧光光谱检测, 以讨论三维荧光光谱技术的可行性。为三维荧光光谱法检测水产品中隐性孔雀石绿进行积累数据和奠定基础。经初步实验可以得出: 隐性孔雀石绿乙醇溶液荧光强度最高峰值在激发波长 324 nm/发射波长 355 nm 处, 隐性孔雀石绿甲醇溶液荧光强度最高峰值在激发波长 320 nm/发射波长 355 nm 处; 且在 pH 7 的环境中检测效果最为明显。针对鱼肉样品的检测结果表明: 隐性孔雀石绿浓度和荧光强度呈良好线性关系, 经计算得到加标回收率为 96.65%, 证明实验结果有较好的稳定性。因此水产品中的隐性孔雀石绿可以通过三维荧光光谱技术准确快速的进行检测。

关键词 三维荧光光谱; 隐性孔雀石绿; 水产品; 鱼肉检测

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)05-1478-05

引言

水产品因其营养和药用价值被人们广泛接受, 我国 2018 年的水产品年产量已超过 7 000 万吨。然而, 在如此巨大的消费量和产量下却存在着一个重大问题, 即有个别不法商家使用国家禁用药物孔雀石绿作为杀菌剂。

孔雀石绿 (Malachite green, MG; 分子式: $C_{23}H_{25}N_2Cl$) 是一种三苯甲烷类物质^[1]。作为一种工业染料^[2], 因其具有良好的杀菌能力, 被用于水产品的养殖和保鲜。^[3]但据相关研究人员表明, 孔雀石绿及隐性孔雀石绿对哺乳动物组织具有不可逆的损伤, 故而许多国家都将孔雀石绿列为水产养殖禁用药物。

孔雀石绿化学性质不稳定, 在进入动物机体后, 会快速代谢成相对稳定的具有亲脂性的无色隐性孔雀石绿 (Leucomalachite green, LMG; 分子式: $C_{23}H_{26}N_2$), LMG 可轻易地透过动物组织的间隙, 且 LMG 本身具有高毒性, 对哺乳动物有致癌、致畸等危害, 因其亲脂性和不易分解的特点,

LMG 易在人体内积蓄, 对人类健康会产生长期的威胁^[4]。因此, 研究一种针对水产品中 MG 及 LMG 残留的方便快捷的检测方法具有重要意义。

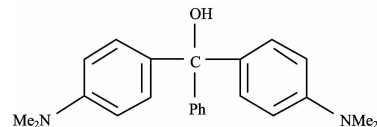


图 1 孔雀石绿分子结构图

Fig. 1 The molecular structure of MG

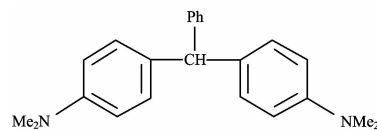


图 2 隐性孔雀石绿分子结构图

Fig. 2 The molecular structure of LMG

经过科研人员的不断研究, 国际市场上已有多种检测方案, 较为常见的有高效液相色谱法^[5]、紫外光谱法^[6], 此外

收稿日期: 2019-04-09, 修订日期: 2019-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(11505017, 61405189), 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20190553KJ), 吉林省高教科研课题(JGJX2019D61)资助

作者简介: 李宁驰, 1998 年生, 长春理工大学理学院本科生 e-mail: 1458879202@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: lcycome@sina.com

还有检测精度较高的分子印迹技术^[7]、表面增强拉曼光谱技术^[8]、传感器检测法^[9]等；然而高效液相色谱法虽然应用广，但检测周期长、操作复杂，紫外光谱法检出限较高，测定结果易受实际样品中基体干扰^[6]，分子印迹技术和表面增强拉曼光谱技术特异性强但检测成本高，前期准备复杂。相比之下，三维荧光光谱检测法有低成本、方便快捷等优势，但由于 MG 荧光性弱，该方法进展缓慢。

不过，虽然 MG 为弱荧光物质，但 MG 在动物体内代谢物 LMG 荧光性强，且易在鱼类脂肪中积累。通过三维荧光光谱检测法，可快速精准、高效简便的检测 LMG 的含量，由此分析水产品是否被非法添加 MG。其便捷性、低成本、易操作的特点可以满足我国的检测需要。本文将围绕三维荧光光谱检测技术，讨论 LMG 的最佳检测条件及其可行性，旨在提供一种针对水产品中 MG 和 LMG 残留的检测新思路。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

LMG 标准品(纯度>98%，阿拉丁试剂(上海)有限公司)；乙醇、甲醇、柠檬酸、磷酸氢二钠、甘氨酸、氢氧化钠(北京化工厂)；新鲜龙利鱼切片(长春前进广场沃尔玛超市)；去离子水。

天津拓普 WFY-28 型荧光分光光度计(光源为 150 W 氙灯，激发波长范围 220~760 nm，发射波长范围 220~760 nm)。

1.2 方法

1.2.1 LMG-乙醇和 LMG-甲醇溶液的三维荧光光谱测定

准确称取两份 0.5 g LMG 标准品，分别以乙醇、甲醇为溶剂配制成 1 mg·mL⁻¹ LMG-乙醇和 LMG-甲醇溶液各 500 mL。

取 2 mL 待测液于比色皿内，置于光谱仪中；选定发射光谱扫描，设置发射狭缝、激发狭缝、发射单色器波长范围等参数；在激发波长 295~330 nm 范围内对储备液进行三维荧光光谱测量；整合数据，制作三维荧光光谱。

1.2.2 LMG-乙醇和 LMG-甲醇溶液的最佳检测条件的测定

分别配制 pH 值为 3.8, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6, 7.0, 7.4 和 8.0 的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液，以及 8.6, 9.0, 9.4, 9.8, 10.2 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液各 50 mL，作为梯度缓冲液保存。

分别取 LMG-乙醇和 LMG-甲醇溶液 2 mL，加入 18 mL 某 pH 值缓冲液，溶液变为浑浊，摇匀，溶液成乳白色。参考此方法配制系列 pH 值 LMG-乙醇和 LMG-甲醇溶液共 34 份，密封保存。

调整光度计各项参数，设置激发波长为 320 nm，分别对系列 pH 的 LMG 溶液和缓冲液进行荧光光谱检测，得到数据并保存；以 pH 值为 x 轴，荧光峰峰值强度(intensity)为 y 轴，制作荧光峰峰值强度随 pH 变化曲线。

1.2.3 稳定性分析

将浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 LMG-乙醇标准储备液，用乙

醇稀释为浓度 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 和 0.01 mg·mL⁻¹ 的系列浓度乙醇稀释液。密封保存；用 pH7.0 的缓冲液将系列浓度的稀释液准确稀释 10 倍，配制成浓度为 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01 和 0.001 mg·mL⁻¹ 的系列浓度标准稀释液；调整光谱仪各项参数，设置激发波长为 320 nm 对系列浓度的标准稀释液进行测量，得到数据并保存，以 LMG 标准溶液的浓度(mg·mL⁻¹)为 x 轴，以平均峰值作为 y 轴，制作 LMG 的标准曲线。

1.2.4 对鱼肉样品的测定

在无菌条件下，将龙利鱼鱼肉分割成若干份长宽高约为 20 mm×10 mm×2 mm 的长方体，分别用浓度为 0.1, 0.08, 0.04, 0.02 和 0.01 mg·mL⁻¹ 的不同浓度的 LMG-乙醇稀释液浸泡十分钟，并取一份用酒精浸泡十分钟作为空白对照组。调整光谱仪各项参数，设置激发波长为 320 nm 对各组鱼肉样品进行测量，每组测量三次，并保存数据，以 LMG-乙醇稀释液的浓度为 x 轴，以荧光峰平均峰值作为 y 轴，制作鱼肉样品荧光峰平均峰值的标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 LMG 的三维荧光光谱分析

分析整理实验 1.2.1 的数据，得到 LMG-乙醇溶液三维荧光光谱图，如图 3 所示；LMG-甲醇荧光光谱图，如图 4 所示。

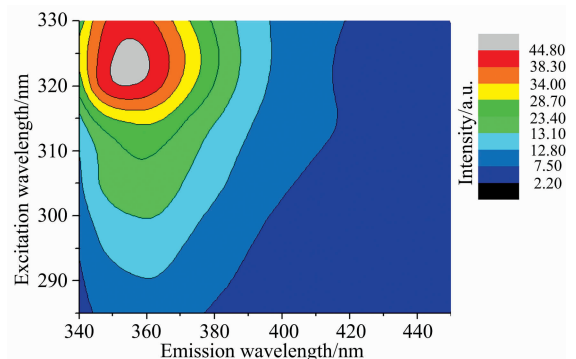


图 3 LMG-乙醇溶液三维荧光光谱图

Fig. 3 Three-dimensional fluorescence spectra of LMG-ethanol solution

由实验结果可知，在发射波长 340~440 nm、激发波长 290~330 nm 的范围内，LMG-乙醇溶液有一个明显的荧光峰 peak1(激发波长 320~326 nm/发射波长 350~362 nm)，最高峰值 max 1 在激发波长 324 nm/发射波长 355 nm 处。

LMG-甲醇溶液同样有且只有一个荧光峰 peak2(激发波长 317~323 nm/发射波长 342~362 nm)，最高峰值 max 2 在激发波长 320 nm/发射波长 355 nm 处。

乙醇和甲醇也具有各自的荧光峰，其中乙醇荧光性弱，对本实验干扰可忽略，甲醇有两个荧光峰，分别位于 225/350 nm 和 250/375 nm 处，与 peak2 的位置没有冲突，故而可以判定 peak1 和 peak2 为 LMG 的荧光峰，可作为进一步讨论依据。

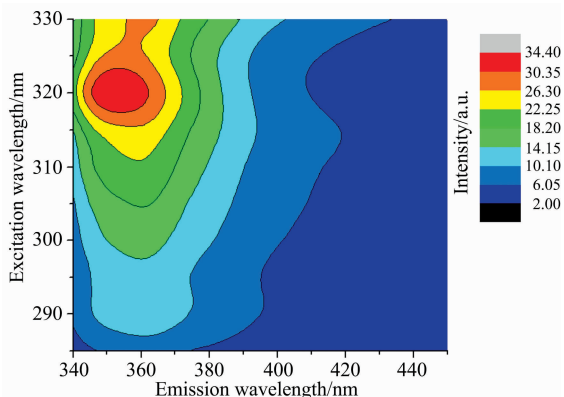


图 4 LMG-甲醇溶液三维荧光光谱图

Fig. 4 Three-dimensional fluorescence spectra of LMG-methanol solution

2.2 pH 变化对 LMG 荧光效果影响

LMG 在不同的 pH 环境中所呈现的荧光峰强度和效果不尽相同, 通过实验 1.2.2 整理得到的荧光峰峰值强度平均值随 pH 变化曲线, 来探究 LMG 的最佳检验 pH 环境。

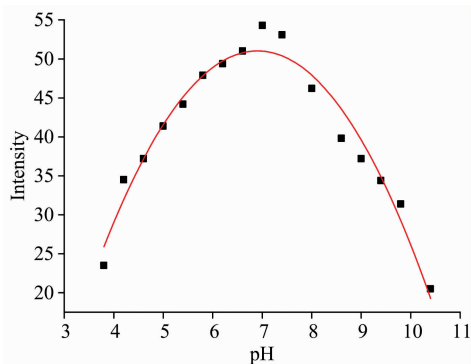


图 5 LMG-乙醇溶液荧光峰峰值强度平均值随 pH 变化曲线
Fig. 5 The curve of the average fluorescence peak intensity of LMG-ethanol solution with the change of pH value

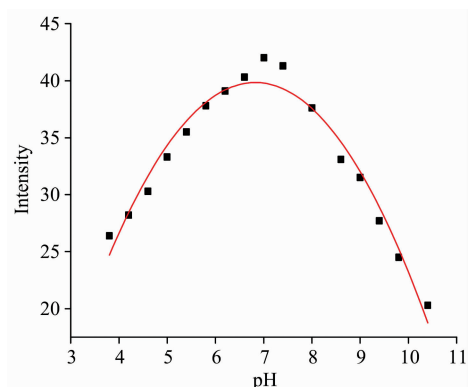


图 6 LMG-甲醇溶液荧光峰峰值强度平均值随 pH 变化曲线
Fig. 6 The curve of the average fluorescence peak intensity of LMG-methanol solution with the change of pH value

响。因此可以判定本实验所用缓冲液只能提供不同 pH 环境, 而对 LMG 的检测无影响。

由图 5 和图 6 可得, LMG-乙醇和 LMG-甲醇溶液荧光强度在 pH 值 3.4~10.4 范围内有一个峰, 且在 pH 7.0 时达到最高, 可以判定, LMG-乙醇和 LMG-甲醇溶液均在 pH 7 的环境中最适合荧光光谱检测。淡水养殖池塘的水体 pH 一般在 7~8.5 左右^[10], 该环境下 LMG 有较强的荧光效果, 故用荧光光谱检测法检测水产品中的 LMG 有良好的适应性, 无需对待测样品进行繁琐的前期处理。

2.3 稳定性分析

为进一步验证荧光峰强度和 LMG 浓度的关系, 设计实验 1.2.3, 收集数据, 以 LMG 标准溶液的浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为 x 轴, 以平均峰值作为 y 轴, 制作并得到 LMG 的标准曲线(图 7), 得到回归方程 $y = 491.78082x + 7.22466$, 相关系数 $r = 0.97087$, 根据线性拟合的相关系数 r 可知, LMG 浓度和荧光峰强度具有良好的线性关系, 因此, 可以说明 LMG 的荧光光谱检测法有较好的稳定性, 可以用于 LMG 浓度的测定, 计算得回收率为 94.546%, 这表明三维荧光光谱法检测 LMG 有较高的精度。

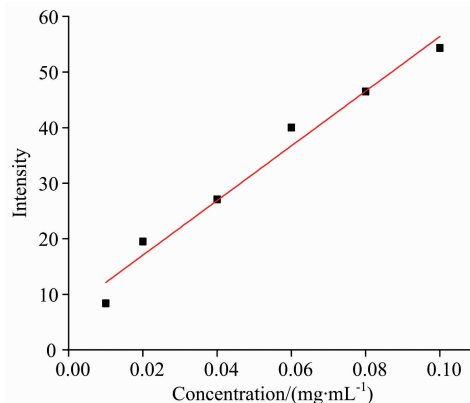


图 7 LMG 标准曲线

Fig. 7 Standard curve of LMG

2.4 鱼肉检测分析

在确定了 LMG 的荧光峰位置和荧光效果与 pH 的关系后, 设计实验 1.2.4 对鱼肉样品在中性环境中进行检测, 以进一步验证本检测方法的可行性。整理实验数据制作鱼肉样品荧光强度随隐性孔雀石绿浓度变化的标准曲线(图 8), 得到回归方程 $y = 313.19113x + 3.30154$, 相关系数 $r = 0.98977$, 由相关系数可知: 鱼肉样品中 LMG 浓度和荧光峰强度具有良好的线性关系, 因此, 三维荧光光谱检测法可以检测鱼肉样品中 LMG, 并分析其浓度。计算得鱼肉样品的回收率为 96.65%, 表明三维荧光光谱法对鱼肉样品中 LMG 的含量检测有较好的灵敏性, 更加证明了该方法的可行性。

相比于应用广泛的高效液相色谱法^[11](回收率 66.01%~76.34%)及其衍生方法, 如柱前电化学衍生法^[12]、液质联用法^[13]、液相色谱-紫外荧光法^[14]等, 三维荧光光谱检测法有较为可观的精度和操作简单的优势, 而对比与以高精度为特点的分子印迹技术^[7]、传感器检测^[9]、CdTe 量子点表面

检测得, 实验所用缓冲液基本无荧光, 可忽略其荧光影

分子印迹荧光探针技术^[15]等方法,本方案在保证良好精度的同时具有方便快捷、取样简单、测量周期短、成本低等优势,更适合广泛的应用于对水产品中 LMG 的检测和浓度分析。

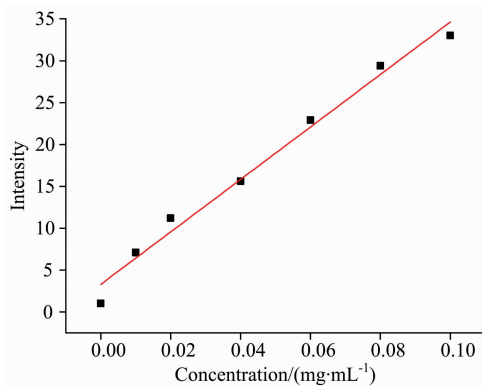


图 8 三维荧光光谱法测得不同浓度 LMG 处理后鱼肉样品的荧光强度图

Fig. 8 Standard curve of fish samples were obtained by three-dimensional fluorescence spectroscopy

3 结 论

在发射波长 340~450 nm 范围内, LMG-乙醇和 LMG-甲醇溶液的三维荧光光谱且只有一个峰, 分别位于 peak1(激发波长 320~326 nm/发射波长 350~362 nm 处)、peak2(激发波长 317~323 nm/发射波长 342~362 nm 处), 可以确定该荧光峰为 LMG 荧光, 激发波长 320 nm/发射波长 355 nm 左右为 LMG 最佳吸收波长。三维荧光光谱法检测 LMG 在 pH 7.0 的环境下荧光效果最好, 且缓冲液荧光干扰可忽略不计, 证明该方法在用于水产品的检测时无需对样品特殊处理就可得到最佳检测效果。LMG 溶液和鱼肉样品的荧光效果和 LMG 浓度有良好的线性关系, 相关系数分别为 0.970 87 和 0.989 77, 接近于 1, 回收率为 94.546% 和 96.65%, 证明该方法适于水产品中 LMG 浓度的分析检测, 且精度较高。

对比市场上已有的对于水产品中隐性孔雀石绿的检测方法, 三维荧光光谱法因其高精度、取样简单、方便快捷、低成本等特点, 更有利于解决我国水产品质量检测存在的待测样品多、检测成本高等问题, 可进一步提高质检效率, 缓解质检压力, 有望成为新一代检测方法投入使用。

References

- [1] SHENG Rui-tang, QIAO Mei-liang(盛瑞堂, 乔美靓). China Food & Drug Administration Magazine(中国食品药品监管), 2018, (12): 87.
- [2] Yang Ji, Wu Hao, Wu Minghui, et al. Dyes and Pigments, 2018, 155: 171.
- [3] Zhou Xinhui, Zhang Jiaran, Pan Zhongli, et al. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2019, 49(1): 1.
- [4] HU Hao-guang, LIU Shao-bin, LI Xu-peng, et al(胡浩光, 刘少彬, 李绪鹏, 等). Agriculture and Technology(农业与技术), 2016, 36(19): 117.
- [5] Zhao Jiao, Wei Daqiao, Yang Yaling. Journal of Separation Science, 2016, 39(12): 2347.
- [6] FENG Gang, PING Wen-hui, ZHU Xia-shi(冯刚, 平文卉, 朱霞石). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2016, 36(2): 436.
- [7] HUANG Zhi-yong(黄志勇). Chinese Patent(中国专利), 201510274020. 2[P]. 2015-08-12.
- [8] YU Wan-song(余婉松). Metallic Colloids as Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate for Analysis of Furazolidone and Malachite Green in Fish Feed and Aquatic Products(基于金属溶胶表面增强拉曼光谱技术检测饲料及水产品中呋喃唑酮和孔雀石绿的研究). Shanghai: Shanghai Ocean University(上海: 上海海洋大学), 2015.
- [9] DONG Jian-wei, YANG Jun-ting(董建伟, 杨军亭). Shaanxi Journal Agricultural Science(陕西农业科学), 2015, 61(7): 67.
- [10] JIANG Xiao-lu(姜晓露). Scientific Fish Farming(科学养鱼), 2016, (2): 91.
- [11] GAO Na, WANG Wen-lan, GUO Jun, et al(高娜, 王文兰, 郭军, 等). Journal of Food Safety & Quality(食品安全质量检测学报), 2019, 10(3): 653.
- [12] HU Jiang-tao, YU Ling-yun, YU Gang, et al(胡江涛, 俞凌云, 于刚, 等). China Measurement & Test(中国测试), 2016, 42(4): 49.
- [13] WU Jun-wei, JIANG Yu(吴俊伟, 姜宇). China Food Safety Magazine(食品安全导刊), 2017, (27): 109.
- [14] SUN Xie-jun, XIE Tian-yu, GUO Yong-jian, et al(孙协军, 谢田雨, 郭永健, 等). Packaging and Food Machinery(包装与食品机械), 2016, 34(2): 52.
- [15] YANG Ji(杨吉). Preparation of Fluorescent Probes Based on CdTe Quantum Dots Coated with Molecularly Imprinted Polymers and Their Applications in the Detection of Malachite Green and Icuomalachite Green in Aquatic Products(CdTe 量子点表面分子印迹荧光探针的制备及其在水产品孔雀石绿与隐色孔雀石绿检测中的应用). Fujian: Jimei University(福建: 集美大学), 2018.

Determination of Malachite Green Residue in Aquatic Products Based on Three-Dimensional Fluorescence Spectrum

LI Ning-chi¹, REN Nuo-yu¹, LIU Chun-yu^{1,2*}, YAO Zhi-hai^{1,2}, CAI Hong-xing¹

1. Provincial Key Laboratory of Spectral Detection Science and Technology, College of Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130012, China

2. Jilin Qiushi Spectral Data Technology Co., Ltd., Changchun 130012, China

Abstract As a chemical agent, malachite green is used as a fungicide in aquatic products because of its good bactericidal properties, low price and a small amount are imperceptible. However, because its metabolite in the body—the recessive malachite green has stability and highly toxic chemical properties. Malachite green has been classified as a banned drug in China. This experiment discusses how to use three-dimensional fluorescence spectroscopy to detect recessive malachite green in aquatic products, and use three-dimensional fluorescence spectroscopy to explore the three-dimensional characteristics of recessive malachite green, and further analyze the relationship between fluorescence intensity and pH change. Finally, fluorescence spectroscopy is carried out for fish samples to discuss the feasibility of three-dimensional fluorescence spectroscopy. The accumulation data and foundation of recessive malachite green in aquatic products are detected by three-dimensional fluorescence spectrometry. The experimental results show that the highest peak of the recessive malachite green ethanol solution was obtained at the excitation wavelength of 324 nm/the emission wavelength of 355 nm. The highest peak of recessive malachite green methanol solution was obtained at the excitation wavelength of 320 nm/the emission wavelength of 355 nm. The experimental results show that the fluorescence peak strength is strongest in the pH 7.0 environment. According to the experience of fish sample, we can find that the relationship between the concentration of recessive malachite green and the fluorescence intensity showed a good linear relationship. The recovery rate was 96.65%, which proved that the experimental results have good stability. Therefore, the recessive malachite green in aquatic products can be accurately and quickly detected by three-dimensional fluorescence spectroscopy technology.

Keywords Three-dimensional fluorescence spectrum; Recessive malachite green; Aquatic products; Fish detection

(Received Apr. 9, 2019; accepted Sep. 10, 2019)

* Corresponding author