

高效液相色谱法测定养殖水体中的亚甲基蓝

龙 举, 李子孟, 喻 亮, 李佩佩, 严忠雍, 张小军* (浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江舟山 316021)

摘要 [目的]探讨一种高效液相色谱法测定水产养殖水体环境中亚甲基蓝含量的分析方法, 为亚甲基蓝测定方法的建立提供参考。[方法]将水样经预处理后利用二氯甲烷萃取, 经旋转蒸发仪抽真空浓缩净化后高效液相色谱-紫外检测器检测, 采用外标法定量分析。[结果]亚甲基蓝在 0.05~1.00 mg/L 质量浓度范围内线性相关系数均大于 0.999; 在 0.06~0.80 mg/L 添加范围内的平均回收率为 75.2%~86.0%, 相对标准偏差均小于 12.0%; 方法定量限为 0.05 mg/L。[结论]该方法的重现性较好, 操作方便, 定性准确且回收率较高, 能够用于快速分析水产养殖水体环境中亚甲基蓝含量。

关键词 高效液相色谱; 养殖水体; 环境; 亚甲基蓝

中图分类号 S949 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)24-005-02

Determination of Methylene Blue in Aquaculture Water by HPLC

LONG Ju, LI Zi-meng, YU Liang, ZHANG Xiao-jun* et al (Key Lab of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Province, Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan, Zhejiang 316021)

Abstract [Objective] A high performance liquid chromatography analysis method for methylene blue in aquaculture water content was explored to provide reference for the establishment of methylene blue analysis method. [Method] The water sample was extracted with dichloromethane after the pretreatment, and concentrated and purified by a rotary evaporator pump vacuum and high performance liquid chromatography-UV detector. Quantitative analysis was carried out with external standard method. [Result] In the range of 0.05-1.00 mg/L, linear correlation coefficients were all above 0.999. And In the ranges of 0.06-0.80 mg/L, the mean fortification recoveries were 75.2%-86.0%. RSDs were all less than 12.0%, and quantitation limit was 0.05 mg/L. [Conclusion] The proposed method has the advantages of good reproducibility, simplicity, qualitative accuracy and high recovery. And it can be successfully applied in the determination of methylene blue in aquaculture aquatic environment.

Key words HPLC; Aquaculture water; Environment; Methylene blue

亚甲基蓝(methylene blue, MB)是一种人工合成的噻嗪类染料, 被广泛应用于化学指示剂、染料、生物染色剂和药物等方面^[1]。基于亚甲基蓝的氧化还原性, 它作为药物使用时主要用作解毒剂, 可用于亚硝酸盐、氰化物、硝基苯、乙酰苯胺等药物中毒以及氨基比林、磺胺类等药物引起的高铁血红蛋白症。作为消毒剂使用的亚甲基蓝基于在水溶液中离子型的亚甲基蓝与微生物酶系统竞争氢离子, 使酶处于无活性的氧化状态, 微生物因缺乏酶而失去生存能力^[2]。亚甲基蓝对防治淡水鱼的水霉病、红嘴病、小瓜虫病等有很好的疗效。由于亚甲基蓝毒性比孔雀石绿低, 近年来作为孔雀石绿、硝基呋喃等禁药的替代品在水产养殖中得到广泛应用^[3]。亚甲基蓝也被用作抗真菌剂用来降低鱼类运输途中的死亡率^[4]。由于亚甲基蓝及其代谢物被认为对动物体有毒性且有致突变作用^[5], 在 20 世纪 90 年代美国、日本等国家禁止将其用于水产养殖^[6]。

亚甲基蓝的大量使用或滥用对养殖水生物会产生一定的毒副作用, 通过生物富集作用在水生生物体中积累一定量的残留, 对食品安全和人类健康构成新的隐患。目前, 有关亚甲基蓝残留的检测方法主要为水产品中亚甲基蓝残留的检测, 其方法有分光光度法^[7]、高效液相色谱法^[8]、高效液相色谱-串联质谱法^[9]、毛细管电泳法^[10]等。控制养殖水体环境中的亚甲基蓝可以直接减少水生生物体对亚甲基蓝的生物累积量, 有效控制养殖水产品体内亚甲基蓝的摄入量。

检测水产养殖水体环境中亚甲基蓝含量对了解养殖环境安全状况、控制养殖水生物过多积累亚甲基蓝和水产品质量安全监管工作具有积极意义。而对于水产养殖水体环境中亚甲基蓝含量的检测, 目前还没有相关的检测方法。根据亚甲基蓝的化学性质, 选择适合的前处理方法, 优化仪器分析条件, 建立了一种检测养殖水体中亚甲基蓝的高效液相色谱法。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 高效液相色谱仪: 美国 Waters 2695-2489 紫外/可见光检测器; 色谱柱: Xbridge™ C₁₈ 柱; 旋转蒸发仪, 瑞士 BUCHI 公司; 分液漏斗振荡器, 北京国环高科自动化技术研究院; 二氯甲烷(农残级)、甲醇、甲酸、乙腈(均为色谱纯), 德国 Merck 公司; 亚甲基蓝, 美国 Sigma 公司; 盐酸(优级纯), 中国上海试剂总厂; 试验用蒸馏水为重蒸水, 自动电热纯水蒸馏器制备。

1.2 液相色谱条件 色谱条件: Xbridge™ C₁₈ 柱, 5.0 μm, 4.6×250 mm; 柱温: 30℃; 流动相: 浓度 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(62:38, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 进样量: 50 μl; 紫外检测波长: 655 nm。

1.3 试验方法

1.3.1 样品处理。 采集水样, 立即用 0.01 mol/L 盐酸浸泡过半小时的 0.45 μm 滤膜进行抽滤处理, 将抽滤所得水样转移至样品瓶中, 4~8℃ 保存。待水样至室温, 准确量取经过滤后的水样 250 ml, 转移到 500 ml 分液漏斗中, 加入 50 ml 二氯甲烷萃取, 振荡 1 min 后静置 20 min, 待分液漏斗中液体稳定且出现明显分层后, 把下层二氯甲烷转移到 100 ml 旋蒸瓶中, 在 40~45℃ 下旋转蒸发仪浓缩至蒸干。取下旋蒸瓶之后, 往旋蒸瓶中准确加入 1.0 ml 甲醇溶解残留物, 并将胶头

基金项目 浙江省公益性技术研究项目(2014C32087); 浙江科技计划项目(2013F10065)。

作者简介 龙举(1987-), 男, 贵州毕节人, 助理工程师, 从事渔业环境及水产品质量安全方面的研究。* 通讯作者, 高级工程师, 博士, 从事水产品质量安全方面的研究。

收稿日期 2015-06-24

吸管伸入瓶中,利用加入的甲醇清洗旋蒸瓶内壁。静置旋蒸瓶,待内壁上的液体完全流下,吸取瓶中提取液,过 0.22 μm 有机相微孔滤膜待测。

1.3.2 标准曲线绘制 用色谱甲醇配制浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/L 的亚甲基蓝标准溶液,进行高效液相色谱紫外检测。根据样品目标峰的保留时间定性,以峰面积为纵坐标,以亚甲基蓝的质量浓度为横坐标,绘制标准工作曲线,以外标法定量计算亚甲基蓝的含量。

2 结果与分析

2.1 提取方法的确定 亚甲基蓝易溶于乙腈、甲醇、二氯甲烷等有机溶剂。对于水产品中亚甲基蓝的提取,杨方等^[2]用离子对试剂(对甲苯磺酸的乙酸铵缓冲液-乙腈)提取;宫向红等^[3]选择用乙酸铵缓冲液和乙腈提取;王媛等^[11]直接用乙腈提取。他们的一个共同点是都使用二氯甲烷反萃。由于乙腈与水不能明显分层,该试验选择二氯甲烷作为提取试剂。在分液漏斗的样品中加入一定量的二氯甲烷,剧烈振荡后静置,待分液漏斗中液体稳定且出现明显分层后,把下层二氯甲烷转移到旋蒸瓶中,在 40~45 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发仪浓缩至蒸干。向旋蒸瓶中准确加入 1.0 ml 甲醇溶解残留物,并且将胶头吸管伸入瓶中,利用加入的甲醇清洗旋蒸瓶内壁。试验表明,该提取方法基质影响较小,可以直接供液相色谱上机分析。

2.2 色谱条件及色谱图 关于流动相的配制,选择较多的有乙腈和 0.125 mol/L 乙酸铵溶液、甲醇和浓度 0.1% 甲酸水溶液等。结合实验室仪器性能和试剂选择性,选择浓度 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(60:40, V/V)、乙腈-0.125 mol/L 乙酸铵溶液水(70:30, V/V)、甲醇浓度-0.1% 甲酸水溶液(45:55, V/V)等。经过试验优化比较,在紫外波长 655 nm 处,以浓度 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(62:38, V/V)作为流动相的效果最好,可以有效地将亚甲基蓝完全分离,不受杂峰干扰,且色谱峰峰形尖锐,对称性好,能满足亚甲基蓝的检测分离要求。所以,选择浓度 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(62:38, V/V)作为流动相。以该试验方法和色谱条件,亚甲基蓝在色谱图上保留时间约为 3.50 min。亚甲基蓝标准溶液的高效液相色谱图如图 1 所示,空白样品加标色谱图如图 2 所示。

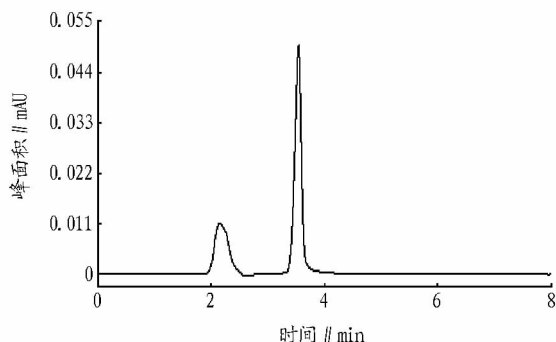


图 1 1.00 mg/L 亚甲基蓝标准溶液色谱图

2.3 标准曲线及线性方程 采用高效液相色谱-紫外/可见光检测器进行色谱分析,以峰面积为纵坐标(Y),以亚甲

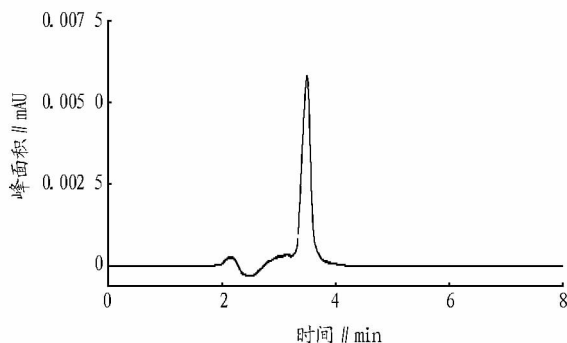


图 2 空白水样加标色谱图

基蓝的质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线。由图 3 可知,线性方程为 $Y = 3.88 \times 10^5 X - 5.83 \times 10^3$,线性相关系数(R^2) = 0.999 287,说明亚甲基蓝在 0.05~1.00 mg/L 质量浓度范围内呈线性关系,能够进行准确定量。

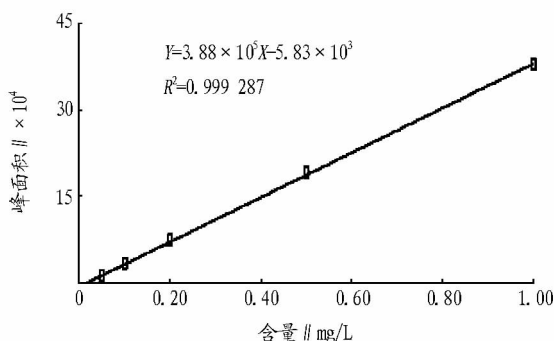


图 3 亚甲基蓝测定标准曲线图

2.4 方法回收率和精密度 分别取养殖水样空白样品各 250 ml 于 500 ml 分液漏斗中,加入相当于水样含量为 0.06、0.10、0.20、0.40、0.80 mg/L 亚甲基蓝,每个添加水平做 6 个平行,测定亚甲基蓝含量,计算回收率和相对标准偏差。由表 1 可知,方法回收率为 75.2%~86.0%,相对标准偏差均小于 12%。可见,该试验方法有较高的回收率和精密度。

表 1 加标回收率及方法精密度试验($n=6$)

添加量 mg/L	平均测定值 mg/L	回收率 %	RSD %
0.06	0.046	76.7	5.35
0.10	0.083	83.0	4.58
0.20	0.172	86.0	7.06
0.40	0.301	75.2	12.00
0.80	0.662	82.8	5.14

2.5 检出限 参考 Waters 2695 液相色谱仪灵敏度的要求,通过空白养殖水样加标液逐级稀释,以信噪比 $S/N = 3$ 的样品质量浓度为方法检出限,取信噪比 $S/N = 10$ 的样品质量浓度为方法定量限,计算出方法中亚甲基蓝的检出限为 0.05 mg/L。

2.6 实际水样的测定 采用建立的高效液相色谱法测定养殖水体环境中亚甲基蓝含量的方法,分别对 A、B 两地乌鳢
(下转第 16 页)

使用合成的汞柱对来自大肠杆菌 K12 的 tRNA 中的含硫、含硒化合物分离,通过 HR-MS 鉴定得到鸟嘌呤-2-硫代尿嘧啶核苷酸、腺嘌呤-3-硫代尿嘧啶核苷酸和鸟嘌呤-5-甲酰-2-尿嘧啶核苷酸 3 个化合物。消化时使用 RNA 酶 A,存在如下原因:核糖核酸酶 A 是一个内源性的核糖核酸酶,将最终水解得到 3'-嘧啶-3'-磷酸根^[9-10]。分离、富集后在 326 nm 处的吸收峰是类似合成的 4-硫尿嘧啶核苷酸(峰值在 330 nm 处)。根据这一特点,进一步通过 ESI-MS 和 HR-MS 确定大肠杆菌核苷酸的 RNA 的 G-4-硫代尿嘧啶核苷酸、A-3-硫代尿嘧啶核苷酸及 G-5-甲酰-4-硫代尿嘧啶核苷酸。然而,没有发现硒修饰核苷酸。可能的原因是已知的自然发生的硫和硒核苷在所有类型的 RNA 修饰中非常低,因此下一步将扩大培养。

总之,已合成新的 Hg-DADPA 色谱,可用于分离硫和硒修饰的 RNA。这是一个经济和安全的纯化方法,具有重复性和选择性。2005 年,上海交通大学的科学家已发现一种新的 DNA 修饰,即 DNA 修饰中含有硫。这在核酸的研究上属于里程碑的科学文件^[11-12]。这表明含有硒的 DNA 或 RNA 的修饰也可能存在于其他生物体中,或存在于更特殊的自然条件下生存的生物(如陨石坑的植物和微生物)。合成汞柱将有助于富集含硫含硒 DNA 或 RNA 修饰,使得检测简化,同时避免同位素对人体的伤害。今后,将使用这种新合成的 Hg-DADPA 色谱从天然植物中富集硫和硒衍生物。

(上接第 6 页)

养殖塘中的水样进行 20 批次检测,未发现阳性样品。据实地了解,得知这两处养殖均未使用过亚甲基蓝。

3 结论

该试验研究了高效液相色谱法测定养殖水体环境中亚甲基蓝残留量的提取、浓缩和分析条件,建立了可以成功用于养殖水体环境中亚甲基蓝残留量的分析方法。该试验方法的测定结果能够真实反映养殖水体环境情况,可以作为一个衡量养殖水体环境质量的指标。管理者可以根据需要对养殖水体中亚甲基蓝进行长期监测。这对于控制水体环境有着重要意义。适时监测数据则对了解养殖的经济类水生生物体内亚甲基蓝残留情况有一定的指导作用。在试验过程中,该方法有试剂干扰少、方法回收率高、重现性好、操作简单、精密度高等优点,能够满足养殖水体环境中亚甲基蓝含量的测定要求。

参考文献

- [1] 周公度. 化学辞典[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社,2010:323-324.
- [2] 杨方,范克伟,刘正才,等. 液相色谱法检测水产品中亚甲基蓝及其代谢物残留[J]. 分析化学,2009,37(4):517-521.

参考文献

- [1] LIMBACH P A, CRAIN P F, MCCLOSKEY J A. Summary: The modified nucleosides of RNA[J]. Nucleic Acids Res,1994,22(12):2183-2196.
- [2] CZERWONIEC A, DUNIN-HORKAWICZ S, PURTA E, et al. MODOMICS: A database of RNA modification pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2013,41:262-267.
- [3] YU B, YANG Z, LI J, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis[J]. Science,2005,307:932-935.
- [4] MCCLOSKEY J A, ROZENSKI J. The small subunit rRNA modification database[J]. Nucleic Acids Res,2005,33:135-138.
- [5] ROZENSKI J, CRAIN P F, MCCLOSKEY J A. The RNA modification database,1999 update[J]. Nucleic Acids Res,1999,27:196-197.
- [6] DUNIN-HORKAWICZ S, CZERWONIEC A, GAJDA M J, et al. MODOMICS: A database of RNA modification pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2006,34:145-149.
- [7] CANTARA W A, CRAIN P F, ROZENSKI J, et al. The RNA modification database, RNAMDB:2011 update[J]. Nucleic Acids Research,2010,39:195-201.
- [8] ONO M, KAWAKAMI M. Separation of newly-synthesized RNA by organomercurial agarose affinity chromatography[J]. J Biochem,1977,81(5):1247-1252.
- [9] VAN DEN WYMELENBERG A, GASKELL J, MOZUCH M, et al. Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi postia placenta and phanerochaete chrysosporium[J]. Appl Environ Microbiol, 2010,76(11):3599-3610.
- [10] ZHAO K, LIU M, BURGESS R R. Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor, sigma⁵⁴, reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis[J]. Nucleic Acids Res,2010,38(4):1273-1283.
- [11] ZHOU X, HE X, LIANG J, et al. A novel DNA modification by sulphur[J]. Mol Microbiol,2005,57(5):1428-1438.
- [12] WANG L, CHEN S, XU T, et al. Phosphorothioation of DNA in bacteria by dnd genes[J]. Nat Chem Biol,2007,3(11):709-710.
- [3] 宫向红,徐英江,任传博,等. HPLC 测定水产品中孔雀石绿、亚甲基蓝、结晶紫及其代谢物的残留量[J]. 食品科学,2012,33(4):144-147.
- [4] 杨方,范克伟,刘正才,等. 超高效液相色谱-串联质谱联用法对水产品中亚甲基蓝及其代谢物残留的检测[J]. 分析测试学报,2009,28(1):32-36.
- [5] TURN IPSEED S B, ROYBAL J E, PLAKAS S M, et al. Determination of methylene blue in channel catfish (*IC talurus punctatus*) tissue by liquid chromatography with visible detection[J]. JAOAC Int,1997,80:31-35.
- [6] CODDINGTON C C, ANDERSON T L, ACCETTA C R, et al. Adverse effects of methylene blue on human sperm motility, components of human reproductive tract fluids, and mouse embryo cleavage[J]. Fertil Steril, 1989,51:480-485.
- [7] BELAZ-DAVID N, DECOSTERD L A, APPENZELLER M, et al. Spectrophotometric determination of methylene blue in biological fluids after ion-pair extraction and evidence of its adsorption on plastic polymers[J]. Eur J Pharm Sci,1997,5(6):335-345.
- [8] BORWITZKY H, HAEFELI W E, BURHENNE J. Analysis of methylene blue in human urine by capillary electrophoresis[J]. Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci,2005,826(1/2):244-251.
- [9] 吴艳兵,王建华,李广领. 高效液相色谱法检测水产品中亚甲基蓝的残留[J]. 湖南农业科学,2008(3):165-167.
- [10] 崔瑾,杨洪生,章建浩,等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定水产品中亚甲基蓝及代谢物[J]. 南方水产科学,2013,9(3):68-73.
- [11] 王媛,于慧娟,钱蓓蕾,等. 液相色谱法测定水产品中亚甲基蓝残留量[J]. 分析实验室,2013,32(1):90-94.