

基于空间夹角判据测定水产品中孔雀石绿残留量

胡祥均^{1,2}, 刘柳^{1,2}, 王捷³, 姚志湘^{1,2,*}, 李登红^{1,2}, 赵娜¹

(1. 广西科技大学生物与化学工程学院, 广西柳州 545006;

2. 广西科技大学广西糖资源绿色加工重点实验室, 广西柳州 545006; 3. 柳州市食品药品稽查支队, 广西柳州 545006)

摘要: 通过高效液相色谱-光谱联用采集数据, 应用向量-子空间夹角计算判据, 建立水产品中孔雀石绿的快速分析方法。先采用全波长紫外-可见光纤光谱仪建立孔雀石绿的标准光谱数据库, 以及市售水产品样品的紫外-可见光谱数据, 再通过高效液相色谱-光谱联用方法, 建立扣除水产品中待测组分孔雀石绿的本底光谱数据库; 运用向量-子空间夹角判据计算草鱼、罗非鱼、黄蜂鱼、海蟹、海虾、玉米螺样品中孔雀石绿的含量。结果表明, 在0.2~4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的线性范围内, 孔雀石绿标准工作曲线的线性相关系数 $r=0.999\ 7$ ($\lambda=618\ \text{nm}$), 加标回收率为99.24%~109.38%, 相对标准偏差小于5.0%。此方法可用于水产品中孔雀石绿残留量的快速检测。

关键词: 向量-子空间夹角; 多波长紫外-可见光谱; 高效液相色谱; 孔雀石绿

Determination of Malachite Green Residues in Aquatic Products Based on Vector-Subspace Angle Criterion

HU Xiangjun^{1,2}, LIU Liu^{1,2}, WANG Jie³, YAO Zhixiang^{1,2,*}, LI Denghong^{1,2}, ZHAO Na¹

(1. College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Green Processing of Sugar Resources, Guangxi University of Science and Technology,

Liuzhou 545006, China; 3. The Food and Drug Inspection Team of Liuzhou, Liuzhou 545006, China)

Abstract: Based on the data collected with a high performance liquid chromatograph (HPLC)-spectrometer, vector-subspace angle criterion was calculated. A new method was developed to rapidly analyze malachite green residues in aquatic products. Multi-wavelength UV-visible optical fiber spectrometer was applied firstly to set up a malachite green standard spectral database and a spectral database for marketed aquatic product samples. Then using HPLC-spectrometer, a background spectral database of malachite green in aquatic products was created. The vector-subspace angle criterion was applied to calculate the contents of malachite green residues in aquatic products including grass carp, tilapia, yellow catfish, sea crab, shrimp and corn snail. The results showed that within a concentration range of 0.2–4.0 $\mu\text{g/mL}$, the linear correlation coefficient for the standard curve was 0.999 7 (at 618 nm), and the recoveries of malachite green in spiked samples were 99.24%–109.38%, with a relative standard deviation of less than 5.0%. Thus, this method can be used to rapidly and accurately detect malachite green residues in aquatic products.

Key words: vector-subspace angle criterion; multi-wavelength UV-visible spectroscopy; high performance liquid chromatography (HPLC); malachite green

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612040

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 12-0222-04

引文格式:

胡祥均, 刘柳, 王捷, 等. 基于空间夹角判据测定水产品中孔雀石绿残留量[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 222-225.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612040. <http://www.spkx.net.cn>

HU Xiangjun, LIU Liu, WANG Jie, et al. Determination of malachite green residues in aquatic products based on vector-subspace angle criterion[J]. Food Science, 2016, 37(12): 222-225. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612040. <http://www.spkx.net.cn>

孔雀石绿是一种人工合成的三苯甲烷类化工染料, 对真菌、细菌、寄生虫等有致死作用, 主要用于治疗和

预防养殖鱼类的小瓜虫病、鳃霉病、水霉病等^[1-2], 如果人体长期食用含有孔雀石绿的鱼类, 则会产生致癌、致

收稿日期: 2015-10-14

基金项目: 广西科技计划项目(桂科攻1355010-15); 柳州市科技计划项目(2015J030201)

作者简介: 胡祥均(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为过程分析与检测。E-mail: xiangjun_hu@163.com

*通信作者: 姚志湘(1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为过程分析技术。E-mail: zxyao@gxut.edu.cn

突变等副作用^[3]。目前国内外检测孔雀石绿的方法主要有:分光光度法^[4-5]、高效液相色谱法^[6-7]、液相色谱-质谱联用法^[8-9]、免疫学检测法^[10]、表面增强拉曼光谱法^[11]等。其中分光光度法运用广泛但灵敏度不高,色谱类方法灵敏高但检测消耗试剂多而费时,酶联免疫检测法则需要消除蛋白质的干扰,前处理过程较复杂。近年来,相关文献^[12-13]报道了化学计量学与紫外光谱响应相结合对多组分的同时测定,由于需要大量建模,所以对复杂组分的分析结果仍然不理想。

不同物质的光谱信号均可由空间里的一个向量表示,向量的模代表不同物质的含量,向量的方向代表不同的光谱特征。多组分体系中的不同组分在空间中对不同方向的向量,那么该体系即为多个向量所构成的空间^[14-16]。通过从混合光谱信号中不断扣减待测组分的纯光谱信号,并与不含待测组分的本底光谱数据库构成新的集合-子空间,从而计算出纯组分光谱向量与子空间的夹角,当待测组分被完全扣除时夹角出现最大值,由夹角最大值所需扣减步数即可计算出待测组分在混合体系中的含量。

目前,该分析方法已运用于化妆品中对羟基苯甲酸酯的测定^[17-18]、橙汁中苯甲酸钠的分析^[19],酱油中山梨酸钾和苯甲酸的测定^[20-21]等。本实验以6种水产品为研究对象,通过建立不含被测组分孔雀石绿的本底光谱数据库以及孔雀石绿的标准光谱数据库,根据向量-子空间夹角判据的计算步骤^[22-23],实现水产品中孔雀石绿的快速分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄蜂鱼、草鱼、罗非鱼、海蟹、海虾、玉米螺 市售;孔雀石绿标准品(纯度不小于98%) 德国Dr. Ehrenstorfer公司;乙酸铵、石油醚(均为分析纯) 广东西陇化工厂;乙腈(色谱纯) 安徽时联特种溶剂股份有限公司;对甲苯磺酸(分析纯) 天津科密欧化学试剂有限公司;盐酸羟胺(分析纯) 广东光华科技股份有限公司;无水乙醇、乙酸(均为分析纯) 成都科龙化工试剂厂;二次蒸馏水 实验室自制。

1.2 仪器与设备

LC-20AT型高效液相色谱仪 日本岛津公司;Maya2000Pro型紫外-可见光纤光谱仪 美国Ocean Optics公司;AL104型电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;TGL-16G高速离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 高效液相色谱-光谱条件

高效液相色谱条件:Agilent C₁₈柱(250 mm×

4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-乙酸铵(0.125 mol/L、pH 4.5)(20:80, V/V)溶液;流速1 mL/min;进样量20 μL;柱温30 ℃。

光谱条件:流动比色皿1 cm;积分时间15 ms;积分20次;紫外-可见光纤光谱仪扫描波长190~1 100 nm。

1.3.2 孔雀石绿标准品光谱数据库的建立

准确称取0.010 2 g孔雀石绿标准品,用二次蒸馏水溶解,转移定容至100 mL容量瓶中,得到102 μg/mL孔雀石绿标准储备液,再用二次蒸馏水稀释成10 μg/mL的标准储备液。将10 μg/mL的标准储备液分别稀释成0.2~4.0 μg/mL的标准工作液,采集其在波长210~1 100 nm处紫外-可见光谱数据,经最小二乘回归得到多波长标准光谱数据库 γ 。

1.3.3 本底光谱数据库的建立

草鱼、罗非鱼、黄蜂鱼、海蟹、海虾、玉米螺6种水产品,在组织匀浆机中将样品匀浆粉碎,各称量5 g至烧杯,加入5 mL乙酸-乙酸铵(0.125 mol/L pH 4.5)溶液和5 mL体积分数80%乙醇溶液,超声5 min,85 ℃水浴加热5 min,减压抽滤,用10 mL体积分数80%乙醇溶液分3次洗涤肉糜,滤液转移至25 mL棕色容量瓶中,再加入1 mL体积分数20%盐酸羟胺溶液和2 mL 0.05 mol/L对甲苯磺酸溶液,用体积分数80%乙醇溶液定容。取2 mL样品滤液加2 mL石油醚进行振荡和离心(12 000 r/min)5 min,取下层清液经0.22 μm滤膜过滤得到样品溶液,分别记为S₁~S₆。通过高效液相色谱找出被测组分与其他组分完全分离的高效液相色谱条件,然后将高效液相色谱仪与紫外光谱联用,分别采集样本S₁~S₆经过色谱柱完全分离后的全波长紫外光谱数据,分别扣除待测组分孔雀石绿的光谱数据,然后合并各个样品的本底光谱数据,得到本底光谱数据库 N 。

1.3.4 待测样品中孔雀石绿含量的测定

将6种水产品分别按照1.3.3节进行处理后,分别采集样品S₁~S₆的多波长紫外-可见光谱数据,分别记为 a_1 ~ a_6 。根据空间夹角判据,计算待测样品S₁~S₆中孔雀石绿含量,并与高效液相色谱分析结果对比。

1.3.5 加标回收率及精密度的测定

选用草鱼、海蟹(S₁、S₄)为研究对象,分别添加1、2、4 μg/mL孔雀石绿标准溶液,依照1.3.3节进行处理,计算加标回收率。分别对样品罗非鱼、玉米螺(S₂、S₆)测定5次,计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2 结果与分析

2.1 孔雀石绿标准光谱库的建立

以水为参比,使用Maya2000Pro在全波长条件下采

集0.2~4.0 μg/mL系列孔雀石绿标准溶液的光谱数据。将不同波长对应的吸光度与对应的孔雀石绿质量浓度作最小二乘回归,得孔雀石绿的多元线性回归方程 $y_i=a_ix+b_i$,即标准光谱数据库,记为 v 。孔雀石绿在波长618 nm处的标准工作曲线为: $y=0.1428x-0.0068$,线性相关系数 $r=0.9997$,表明线性关系良好。

2.2 紫外-可见光谱波段选择

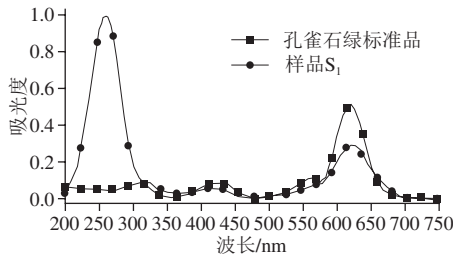


图1 孔雀石绿标准品及样本紫外-可见光谱图
Fig.1 UV-visible spectra of standard and sample S₁

本实验所用Maya2000Pro紫外-可见分光光度计的波长范围为190~1100 nm,由图1可知,孔雀石绿在波长293、425、618 nm处均有吸收。在波长580~750 nm范围内,孔雀石绿在0.2~4.0 μg/mL范围内线性关系良好($r>0.9995$),所以选取波长580~750 nm内的光谱数据进行后续计算。

2.3 建立水产品本底光谱数据库

2.3.1 建立不含孔雀石绿的本底光谱数据库

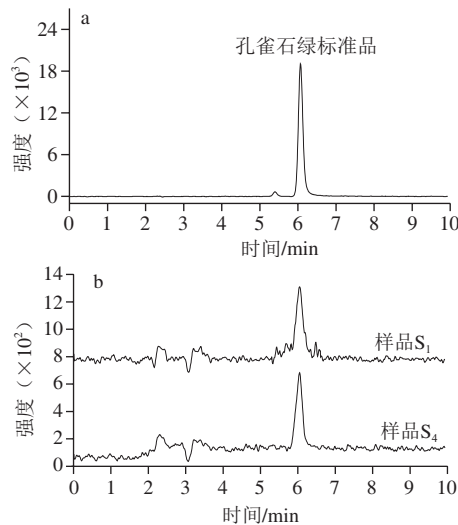


图2 孔雀石绿标准品(a)及样品S₁、S₄(b)高效液相色谱图
Fig.2 HPLC chromatograms of standard and samples S₁ and S₄

在最优色谱分离条件下,采用高效液相色谱-光谱联用法,采集扣除待测组分后的光谱数据作为样品的本底光谱数据库。由图2可知,孔雀石绿标准品的出峰时间为5.8~6.4 min,通过扣除样品中与孔雀石绿具有相同保留时间的光谱数据,剩余光谱数据则作为水产品的本底光谱数据库。

2.3.2 本底光谱数据库的降维

从高效液相色谱-光谱联用得到的样品本底多波长光谱数据阵列,由于数据量较大不利于高效运算,本实验应用奇异值分解的方式对所得本底光谱数据库进行降维。在降维之前,需先求出本底光谱数据库的主成分数,本实验以二阶差分序列的折点判断独立变量数目,即主成分数^[24-25],得到体系主成分数为20,然后应用奇异值分解 $[U, S, V]=\text{svd}(N)$ 对本底光谱数据库 N 进行分解降维,得到 m 阶行正交矩阵 U 、 n 阶列正交矩阵 V 和奇异值矩阵 S ,取 U 的前20列,作为降维后的本底光谱数据库 N 。

2.4 市售水产品中的孔雀石绿含量

将数据库 v 、 N 以及待测样本光谱数据 $a_1\sim a_6$ 导入计算平台,选取 $a_1\sim a_6$ 的波长580~750 nm范围内的数据进行运算。以样品S₂为例,设定扣减步长 $\Delta=1000$,将某质量浓度值 x_i 带入 $y_i=a_ix+b_i$ 中得 v_i ,经计算,得到样品S₂在估算质量浓度为0.44 μg/mL时对应的夹角和扣减步数的变化图。如图3所示,出现最大夹角的步数为908,根据 $y_i=x_i\times m/\Delta$,计算得样品S₂中孔雀石绿的含量为0.40 μg/mL。

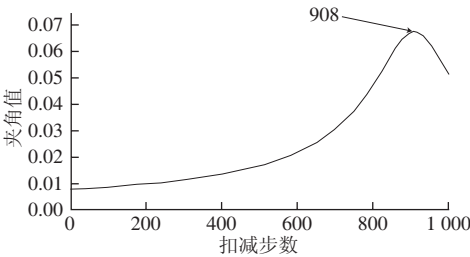


图3 样品S₂夹角与扣减步数变化图
Fig.3 Release curve (subspace vs. deduction steps) for sample S₂

通过计算得到各水产品中的孔雀石绿含量,并与高效液相色谱法测定结果进行对比,如表1所示,相对误差在±10%范围内,说明向量-子空间夹角判据的测定结果较好。

表1 向量-子空间夹角判据法与高效液相色谱法比较

Table 1 Comparison between vector-subspace angle criterion method and HPLC		S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
含量/ (μg/mL)	向量-子空间夹角判据法	0.31	0.40	0.30	0.60	0.33	0.64
	高效液相色谱法	0.29	0.41	0.33	0.55	0.30	0.61
相对误差/%		6.9	-2.4	-9.1	9.1	10	4.9

2.5 加标回收率及精密度结果

计算样品S₁、S₄加标回收率,如表2所示,回收率在99.24%~109.38%之间。分别对样品S₂、S₆平行测定

5次, 计算方法的精密度, 结果见表3。测定结果的RSD小于5.0%, 分析方法准确可靠, 精密度良好。

表2 加标回收率
Table 2 Recovery of standard added to samples

样品	本底值/ ($\mu\text{g/mL}$)	加标量/ ($\mu\text{g/mL}$)	测量值/ ($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%
S_1	0.31	1.00	1.30	99.24
		2.00	2.30	99.57
		4.00	4.32	100.23
S_4	0.60	1.00	1.75	109.38
		2.00	2.70	103.85
		4.00	4.60	100.00

表3 精密实验结果 ($n=5$)
Table 3 Precision of experimental results ($n=5$)

样品	测定值/ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD/%
S_2	0.40、0.38、0.41、0.40、0.43	4.5
S_6	0.64、0.65、0.62、0.63、0.60	3.1

3 结 论

本研究根据向量-子空间夹角判据计算方法, 快速测定水产品中孔雀石绿的含量, 实验回收率好、精密度高, 可满足水产品中孔雀石绿含量的检测要求。该方法对于同类样品进行检测时只需进行一次建模, 采集各样品的紫外-可见光谱即可进行定量分析, 数据处理高效快捷, 可实现水产品中孔雀石绿含量的快速检测分析。在建立本底数据库时, 通过不断更新累积本底数据库, 以使得本底数据库信息更加全面、方法更加完善。

参考文献:

- [1] ALDERMAN D J. Malachite green: a review[J]. Journal of Fish Diseases, 1985, 8(3): 289-298. DOI:10.1111/j.1365-2761.1985.tb00945.x.
- [2] SCHNICK R A. The impetus to register new therapeutants for aquaculture[J]. The Progressive Fish-Culturist, 1988, 50(4): 190-196. DOI:10.1577/1548-8640(1988)050<0190:TITRNT>2.3.CO;2.
- [3] CULP S J, MELLICK P W, TROTTER R W, et al. Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F 1 mice and F344 rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(8): 1204-1212. DOI:10.1016/j.fct.2006.01.016.
- [4] 莫利, 杨迎春, 韩静, 等. 分散液液微萃取-分光光度法测定环境水样中孔雀石绿[J]. 光谱实验室, 2011, 28(1): 205-209. DOI:10.3969/j.issn.1004-8138.2011.01.050.
- [5] POURREZA N, ELHAMI S. Spectrophotometric determination of malachite green in fish farming water samples after cloud point extraction using nonionic surfactant Triton X-100[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 596(1): 62-65. DOI:10.1016/j.aca.2007.05.042.
- [6] MITROWSKA K, POSYNIK A, ZMUDZKI J. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1089(1): 187-192. DOI:10.1016/j.chroma.2005.07.004.
- [7] 邓建朝, 李来好, 杨贤庆, 等. 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定水体中的孔雀石绿[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 150-153.
- [8] AHN S, KIM B, LEE Y, et al. Accurate determination of malachite green and leucomalachite green in fish using isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry (ID-LC/MS)[J]. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2010, 31(11): 3228-3232. DOI:10.5012/bkcs.2010.31.11.3228.
- [9] 田秀慧, 于召强, 陈玮, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产苗种中孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 171-177. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-201312036.
- [10] 邢玮玮, 王榕妹, 王俊卿, 等. 酶联免疫吸附分析法测定水产品中孔雀石绿和无色孔雀石绿[J]. 化学研究与应用, 2010, 22(1): 42-46. DOI:10.3969/j.issn.1004-1656.2010.01.009.
- [11] 顾振华, 赵宇翔, 吴卫平, 等. 表面增强拉曼光谱法快速检测水产品中的孔雀石绿[J]. 化学世界, 2011, 52(1): 14-16. DOI:10.3969/j.issn.0367-6358.2011.01.004.
- [12] 粟晖, 黎国梁, 姚志湘, 等. 紫外光谱法对维生素E油酸酯、维生素E与油酸的同时测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(11): 1314-1317. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2009.11.019.
- [13] 加列西·马那甫, 陈财来, 毛丽哈, 等. 多元校正-紫外光度法同时测定食品中防腐剂的含量[J]. 食品科技, 2011, 36(8): 294-296.
- [14] 姚志湘, 粟晖. 多元统计描述中随机误差与变量空间角的关系[J]. 中国科学(化学), 2010, 40(10): 1564-1570.
- [15] IPSEN I C F, MEYER C D. The angle between complementary subspaces[J]. American Mathematical Monthly, 1995, 102(10): 904-911. DOI:10.2307/2975268.
- [16] 谭涌溪, 蒋健晖, 谢洪平, 等. 基于化学子空间对线性变换稳定的秩估计方法[J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(8): 1319-1322. DOI:10.3321/j.issn:0251-0790.2001.08.010.
- [17] 方凤, 粟晖, 姚志湘, 等. 采用向量扣减方法分析化妆品中对羟基苯甲酸酯[J]. 分析测试学报, 2013, 32(6): 732-736. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2013.06.014.
- [18] 粟晖, 方凤, 姚志湘, 等. 基于HPLC-UV与空间夹角判据的化妆品中对羟基苯甲酸酯分析[J]. 计算机与应用化学, 2014, 31(5): 611-614. DOI:10.11719/com.app.chem.20140521.
- [19] 陈成, 粟晖, 姚志湘, 等. 采用向量-空间夹角判据测定橙汁中的苯甲酸钠[J]. 食品科技, 2013, 38(11): 310-313.
- [20] 陈成, 粟晖, 姚志湘, 等. 采用向量-子空间夹角判据测定酱油中的苯甲酸和山梨酸[J]. 中国食品添加剂, 2013(5): 223-227. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2013.05.030.
- [21] 粟晖, 陈成, 姚志湘, 等. 基于子空间夹角判据-UV法直接稀释测定酱油中的山梨酸钾[J]. 中国调味品, 2014, 39(7): 103-106. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2014.07.025.
- [22] 粟晖, 姚志湘, 方凤, 等. 一种化妆品中对羟基苯甲酸酯的测定方法: 中国, CN103115884A[P]. (2013-05-22) [2015-10-14].
- [23] 粟晖, 姚志湘, 方凤, 等. 化妆品中对羟基苯甲酸酯的快速测定方法: 中国, CN103308620A[P]. (2013-09-18) [2015-10-14].
- [24] 姚志湘, 蹇华丽, 刘焕彬. 多变量统计分析中独立变量数目的判定方法[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2007, 35(1): 123-128. DOI:10.3321/j.issn:1000-565X.2007.01.025.
- [25] SHLENS J. A tutorial on principal component analysis[J]. Eprint Arxiv, 2014, 58(3): 219-226.