

Determination of Methylene Blue Drug Residues in Import and Export Aquatic Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*

Juyi Yin¹, Jie Chen¹, Haiqing Tang², Yanxia Mo², Xiaojun Gu¹, Meizhen Chen¹, Weier Wu¹, Weimin He¹

¹Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Technical Center, Ningbo City

²Import Food Testing Service Center of Ningbo Free Trade Zone, Ningbo City

Email: yinjy@nbciq.gov.cn, tanghaiqing@nbu.edu.cn

Received: Aug. 30th, 2013; revised: Sep. 28th, 2013; accepted: Oct. 11th, 2013

Copyright © 2013 Juyi Yin et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: In this study, a HPLC-ESI(+)-MS/MS methodology is used for the high sensitive determination of drug residue of methylene blue (MB) in import and export aquatic products. The sample was extracted by the acetonitrile and operated with a neutral alumina column solid-phase extraction column. After elution, it was evaporated to dryness. The residue was dissolved by constant volume liquid and was filtered through 0.45- μm membrane. The sample solution was for determination of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The liquid chromatography tandem mass spectrometry was operated in the positive ion mode, using multiple reaction monitoring (MRM) for qualitative and quantitative analysis according to the calibration curve and the external standard method. Samples were detected with a ESI positive mode detector at MRM: m/z 285.1/269.1 and m/z 285.1/241.0. In the line of quality assurance, the stated LOQ of methylene blue residues in the negative sample was at the level of 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The response for methylene blue was linear in the range of 0.5 - 50.0 $\mu\text{g}/\text{L}$, and the correlation coefficient is excellent 0.999. The average recovery range of this method was 87.6% - 111.2%, and the range of RSD was 4.0% - 10.2%.

Keywords: Aquatic Products; Methylene Blue (MB); LC-ESI(+)-MS/MS; Residues

液相色谱串联质谱法测定进出口水产品中亚甲基蓝药物残留*

殷居易¹, 陈杰¹, 汤海青², 莫燕霞², 顾晓俊¹, 陈梅珍¹, 吴维尔¹, 何卫敏¹

¹宁波出入境检验检疫局技术中心, 宁波

²宁波保税区进口食品检测服务中心, 宁波

Email: yinjy@nbciq.gov.cn, tanghaiqing@nbu.edu.cn

收稿日期: 2013年8月30日; 修回日期: 2013年9月28日; 录用日期: 2013年10月11日

摘要: 运用高效液相色谱-电喷雾电离源串联四极杆质谱(HPLC-ESI(+)-MS/MS)法对进出口水产品中亚甲基蓝药物残留进行高灵敏分析。样品经过乙腈溶剂提取后, 用中性氧化铝柱固相萃取柱化, 洗脱收集后蒸干, 残留用定容液溶解并过 0.45 μm 滤膜过滤, 样品溶液供液相色谱-串联质谱仪测定。用 HPLC-MS/MS 在正离子模式下进行多反应监测(MRM)测定, 根据校准曲线和外标法定量。电喷雾电离源正离子 MRM 模式检测: m/z 285.1/269.1; 285.1/241.0。方法测定低限(LOQ, S/N > 10)为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 线性范围: 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 内峰面积与浓度成良好线性($R^2 > 0.999$)。方法平均回收率范围在 87.6%~111.2%, RSD 范围在 4.0%~10.2%。

*基金项目: 浙江省科技厅项目, 项目编号: 2011C37064。

关键词: 水产品; 亚甲基蓝; 液相色谱 - 串联质谱法; 残留

1. 引言

亚甲基蓝^[1-3](Methylene Blue, 缩写 MB)属噻嗪类碱性化合物抗菌染料, 英文名称为: methylene blue; 化学名称为: 氯化-3,7-双(二甲氨基)吩噻啉-5-鎓三水化合物; 分子式: $C_{16}H_{18}C_1N_3S$ (见图 1); 分子量: 373.90。亚甲基蓝又称亚甲蓝、次甲基蓝、美蓝、品蓝、甲烯蓝、瑞士蓝(Swiss Blue)等; 国际非专利药品名称(INN)中又称为 Methylthioninium Chloride。MB 是一种芳香杂环化合物, 水溶液在氧化性环境中蓝色, 但遇锌、氨水等还原剂会被还原成无色形态。一般被用作化学指示剂、染料、生物染色剂和药物使用; 兽医治疗中被批准用作消毒剂与解毒剂。由于其对防治淡水鱼的水霉病、红嘴病、小瓜虫病等有较好疗效^[4], 自从孔雀石绿、结晶紫等三苯甲烷类染料被广泛关注并禁用于水产养殖后, 亚甲基蓝成了一种潜在替代品。国外研究发现, 该染料及代谢物有致畸作用。

近年国内外同类分析研究不多^[5-18], 综合分析国内外现有文献本方法, 现有动物产品中亚甲基蓝的残留研究基本采用色谱法或色谱 - 串联质谱法测定。吴艳兵等(2008 年)和王媛等(2013 年)建立了高效液相色谱法检测水产品中亚甲基蓝残留, 定量限分别为 0.01 mg/kg (检出限 2.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 钱疆等(2008 年)建立了液相色谱安培检测养殖用水中亚甲基蓝及其代谢物, 定量限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$; 行业而标准 SN/T 1974~2007、Jin-Zhong Xu 等(2009 年)、杨方等(2009 年)、Ying-Jiang Xu 等(2012 年)以及崔瑾等(2013 年)都建立了液相色谱 - 串联质谱检测亚甲基蓝及其代谢物残留的方法, 定量下限分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以及 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。由于在日本与美国该物质未被允许用于水产养殖, 该禁止使用药物的最低执行限量(MRPLs)要求将更加苛刻。因此, 进一步研究和监控其在国际水产品贸易中是否存在违法添加使用, 并从提高检测灵敏度和保持定性定量准确度分析的角度进行优化测定十分迫切。

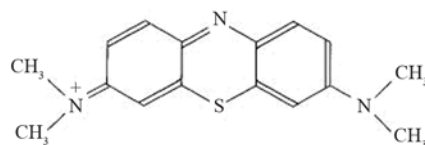


Figure 1. Chemical molecular structure of methylene blue
图 1. 亚甲基蓝化学分子结构

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

Agilent 1200RRLC 高效液相色谱仪串接 API5000 质谱仪; 电子天平(感量 0.1 mg 和 0.01 g); 冷冻离心机(Sigma 3K30, 西格马公司); 氮吹仪(Organomation Associates, 美国 Jnc.公司); 台式分散仪(PT-MR2100 型, 瑞士); 空旋转浓缩仪(BüCHI 公司, 瑞士); 纯水器 MILLI-Q (MILLI PORECO 公司, 美国); 超声波清洗器(250LH 型, KUDOS 公司); 多功能食品粉碎机(HL-2070 型); 旋涡混合仪(Votexgenie-2 型, 德国)。

乙腈(色谱纯); 5 冰醋酸(色谱纯); 甲酸(色谱纯); 正己烷(色谱纯); 乙酸乙酯(色谱纯); 中性氧化铝(分析纯); 无水硫酸钠(分析纯)。

2.2. 标准溶液和试样制备保存

准确称取 10.00 ± 0.01 mg 标准物质, 用甲醇溶解于 10 mL 棕色容量瓶中 (可放置于超声波清洗器数分钟促进溶解), 定容后配成为 1.0 mg/mL 浓度的标准储备液; 将储备液置于 -0°C 冰箱中保存备用。使用时用乙腈稀释至所需浓度, 临用临配。

水产品的肉类组织(可食肌肉组织, 去除几丁质壳及内脏等)取样约 100 g~250 g, 必要时将试样样品用四分法进行缩分; 用多功能食品粉碎机绞碎, 装入洁净容器作为试样, 密封, 并标明标记。将试样于 -20°C 冰柜保存备用。

2.3. 样品前处理

提取和称取约 5.0 g 左右(精确至 0.1 g)的水产品组织样品于 50 mL 离心管中, 依次加入无水硫酸钠 1 g、中性氧化铝 2 g, 用 20 mL 乙腈经台式分散仪打浆处理; 旋涡混合仪充分混匀 2 min, 放入高速冷冻离心机离心(时间 10 min, 转速 5000 rpm); 吸取有机层; 重复操作一次, 合并提取液, 于旋转蒸发仪浓缩至 3

mL 左右用中性氧化铝层析柱净化(先用 5 mL 乙腈活化, 上样后用 3 mL 乙腈洗脱), 收集至 15 mL 离心管中, 于氮吹仪氮吹挥干, 加入 1 mL 流动相, 充分漩涡混合, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 直接 LC-MS/MS 分析。

2.4. 色谱条件及测定

2.4.1. 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈: 20 mM 乙酸铵混合; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 50 μL ; 温度: 30 $^{\circ}\text{C}$ (表 1)。

2.4.2. 质谱仪器条件参数

- 1) 离子源: 电喷雾离子源(ESI);
- 2) 离子模式: 正离子化(+);
- 3) 离子源雾化温度(TEM) 475 $^{\circ}\text{C}$;
- 4) 流动相入源分流比 3:7(或使用辅助干燥气);
- 5) 各检测定量离子对及定性离子对及其他质谱条件参数见下表 2。

3. 结果与讨论

3.1. 色谱分离条件研究

LC-MS/MS 实验流动相一般是甲酸、乙酸水溶液以及乙酸铵(挥发性盐)或者低浓度的乙酸铵盐溶液、乙酸-乙酸铵离子对缓冲盐(需要时调节 pH)等。对于多数正离子模式下的分析, 一般需要少量的酸 $[\text{H}]^+$ 离子, 利于正离子化和 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 准分子离子峰的生成; 而即便在负离子电离模式下, 低浓度的乙酸铵盐溶液能够起到参与增强和活化离子化过程作用。因此本次试验选用了 20 mM 乙酸铵水溶液和乙腈混合洗脱。另外, 色谱柱技术的发展和功能细化, 已经远远超出前期的应用; 同样碳十八柱系列柱的键合功能团和特异保留技术已经有了很多新技术。Agilent TC-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱对多数极性化合物和非极性化合物保留都比较合适, 尤其适合碱性化合物分析。实验首选了该柱, 并对 UG120、MG-II 以及 Waters Atlantics-dC₁₈ 柱等实验室现有储备柱进行了比较。Agilent TC-C₁₈ 在相同流动相条件下, 结果的保留时

Table 1. Mobile phase conditions
表 1. 流动相条件

Step Total Time (min)	Flow Rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	B (%)	C (%)	D (%)
0	800	5.0	15.0	80.0
10	800	5.0	15.0	80.0

被测物名称	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	碰撞气能量 (CE)
亚甲基蓝	6.05	285.1/269.1	285.1/269.1	\rightarrow 47
			285.1/241.0	\rightarrow 46

Table 2. The key parameters of mass spectrometry conditions
表 2. 质谱条件关键参数

被测物名称	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	碰撞气能量 (CE)
亚甲基蓝	6.05	285.1/269.1	285.1/269.1	\rightarrow 47
			285.1/241.0	\rightarrow 46

间、响应峰的尖锐程度(信噪比 S/N)以及分离度更优异、适合。

3.2. 质谱测定条件的优化

三重四极杆质谱分析适合于极性化合物离子化测定, 通过调节仪器内部四极杆检测器(Q1)处于全扫描模式(Full Scan), 碰撞室(Q2)处于碰撞碎裂模式(碎裂能量可调), 进而通过四极杆检测器(Q3)监视由母离子打碎后的特征基团碎片(子离子)。根据离子化原理和待分析化合物分子结构等信息, 通过全扫描模式寻找符合离子化的母离子碎片, 即: 母离子扫描(Parent Ion Scan); 找到符合离子化规则(如: $[\text{M} + \text{H}]^+$, $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 等)的目标母离子后作子离子扫描(Product Ion Scan), 通过调节碰撞碎裂能量的大小找到符合目标母离子的特征子离子, 并选取较高敏度的特征子离子作为定性定量离子。根据上述原理, 首先采用 1 mg/L 的亚甲基蓝化合物的标准溶液分别以流动注射的方式在正/负离子模式下分别进行母离子全扫描。

经试验确定: 在正离子模式下亚甲基蓝的准分子离子峰响应信号更优越; 以亚甲基蓝正离子模式下的准分子离子为母离子, 对其子离子进行全扫描, 选取丰度较强、干扰较小的子离子对为定性离子; 其中响应强度最高子离子为定量离子(见图 2)。

3.3. 样品基质效应的消除

电喷雾电离离子源(ESI)易受样品基质的影响。试验中发现, 样品基质对离子化有一定抑制作用。为消除样品基质效应, 实验以阴性组织样品提取液作为标准溶液的稀释溶液, 可使标准和样品溶液具有同样的离子化条件, 从而消除或较大降低样品基质效应影响。

3.4. 样品提取和净化条件的选择

水产品肉类组织样品中脂肪含量相对不高, 质谱测定又具有较高的抗干扰能力, 所以样品提取和净化适用于简单快捷传统的方式。加入适当无水硫酸钠粉末、中性氧化铝粉末调节提取液和组织液电解平衡

后, 直接用适当乙腈打浆提取; 涡旋后离心, 取上层有机试剂提取层; 重复操作, 合并提取液, 于旋蒸仪浓缩并过中性氧化铝 SPE 柱净化, 收集淋出液再次浓

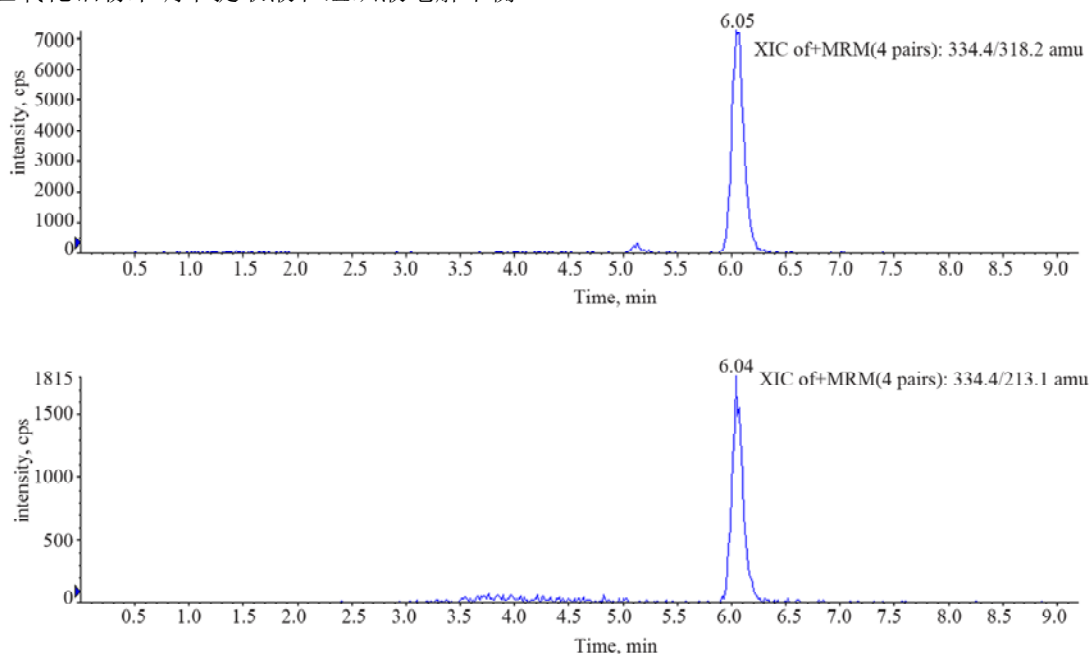


Figure 2. The characteristic ion mass spectrometry analysis chromatogram of methylene blue
图 2. 亚甲基蓝特征离子质谱分析谱图

缩定容后上样测试。分析结果显示回收效率良好。由于处理步骤简捷、经济, 比较适合基层检测部门和研究院校采用。

3.5. 方法检测低限

经测定, 本方法对亚甲基蓝的测定低限均可以达到 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (LOQ, $S/N > 10$); 线性范围: $0.5 \sim 50 \mu\text{g}/\text{L}$ 内峰面积与浓度成良好线性 ($R^2 > 0.999$) (图 3)。

3.6. 方法特异性、回收率和精密度

以不含目标物质残留的进出口水产品(鱼、蟹、虾及鱿等)的肌肉组织以及鱼籽、虾籽、鱼头软组织等可食性动物源性样品为基质, 分别进行了添加回收率试验。方法平均回收率范围在 $87.6\% \sim 111.2\%$, RSD 范围在 $4.0\% \sim 10.2\%$ 。

4. 结论

采用本方法对进出口水产品的食用部分样品为基质进行分析, 目标化合物亚甲基蓝出峰位置没有杂

质峰干扰测定, 分析技术指标均符合食品农兽药残留分析相关规定。

本次研究水产品中亚甲基蓝的测定低限优于现有公开发表文献资料所述, 分析方法满足目前国际上

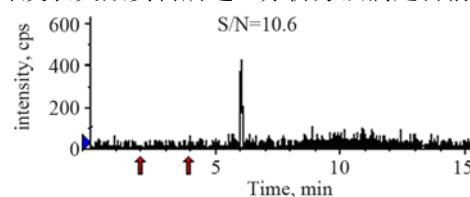


Figure 3. Characteristics ion mass spectrometry chromatograms and SNR diagram under low limit determined by adding matrix liquid ($0.25 \text{ ng}/\text{ML}$)

图 3. 添加基质液测定低限下特征离子质谱分析谱图及信噪比示意图 ($0.25 \text{ ng}/\text{ML}$)

对该禁止使用药物的 MRPLs 要求。由于分析仪器高灵敏度、特异性和稳定性极大提升, 用于色谱-串联质谱法测定时对前处理的要求降低, 也使得本方法前处理过程更加简洁, 可满足快速、准确、方便的测试需求。

参考文献 (References)

- [1] Ziv, G. and Heavner, J.E. (1984) Permeability of the blood-milk barrier to methylene blue in cows and goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **7**, 55-59.
- [2] 李悦悦, 林云萍, 林诗燕 等 (1998) 孔雀绿、福尔马林、亚甲基蓝对河蟹离体胚胎真菌病防治效果的比较. *水产科技情报*, **2**, 77-81.
- [3] 朱其太, 于维军, 颜景堂 (2003) 密切关注欧盟禁用抗生素规定 确保动物源性食品出口安全. *山东家禽*, **4**, 43-46.
- [4] 农业部《新编渔药手册》编撰委员会 (2005) 新编渔药手册. 中国农业出版社, 北京.
- [5] Rengelshausen, J., Burhenne, J., Frohlich, M., Tayrouz, Y., et al. (2004) Pharmacokinetic interaction of chloroquine and methylene blue combination against malaria. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **60**, 709-715.
- [6] Gaudette, N.F. and Lodge, J.W. (2005) Determination of methylene blue and leucomethylene blue in male and female fischer 344 rat urine and B6C3F1 mouse urine. *Journal of Analytical Toxicology*, **29**, 28-33.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 (2007) 进出口水产品中亚甲基蓝残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法和高效液相色谱法. SN/T 1974-2007.
- [8] 钱疆, 陈国南, 杨方 等 (2008) 液相色谱安培检测养殖用水中的孔雀石绿、结晶紫、亚甲基蓝及其代谢物. *分析试验室*, **3**, 69-72.
- [9] 王若燕, 周晓萍, 杜赛 (2008) 固相萃取高效液相色谱法测定血浆中亚甲基蓝含量. *中国卫生检验杂志*, **10**, 2012-2013.
- [10] 李莉, 汤磊, 黄家宇 等 (2008) 高效液相色谱法测定亚甲基蓝原料药的有关物质. *药物分析杂志*, **10**, 116-119.
- [11] 杨方, 刘正才, 胡小钟 等 (2008) 噻嗪类染料在动物体内的代谢及检测研究进展. *药物分析杂志*, **8**, 1395-1399.
- [12] 吴艳兵, 王建华, 李广领 等 (2008) 高效液相色谱法检测水产品中亚甲基蓝的残留. *湖南农业科学*, **3**, 165-167.
- [13] Xu, J.-Z., Dai, L., Wu, B., et al. (2009) Determination of methylene blue residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, **32**, 4193-4199.
- [14] 杨方, 范克伟, 刘正才 等 (2009) 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. *分析测试学报*, **1**, 32-36.
- [15] Zhang, W.J., Zhou, C.J., Zhou, W.C., et al. (2011) Fast and considerable adsorption of methylene blue dye onto graphene oxide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **87**, 86-90.
- [16] Xu, Y.-J., Tian, X.-H., Zhang, X.-Z., et al. (2012) Simultaneous determination of malachite green, crystal violet, methylene blue and the metabolite residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, **50**, 591-597.
- [17] 王媛, 于慧娟, 钱蓓蕾 等 (2013) 液相色谱法测定水产品中亚甲基蓝残留量. *分析试验室*, **1**, 90-94.
- [18] 崔瑾, 杨洪生, 章建浩 (2013) 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. *南方水产科学*, **3**, 67-73.