

三元离子缔合物测定牛奶中的四环素残留

单展¹,范晶晶¹,马小龙¹,唐宁莉^{*}

1(桂林理工大学 化学与生物工程学院,广西 桂林,541004)

2(桂林理工大学 广西高校食品安全与检测重点实验室,广西 桂林,541004)

摘 要 在醋酸溶液中,四环素(tetracycline,Tc)与 Cu^{2+} 形成螯合阳离子,然后进一步与带负电荷的铬天青 S 通过静电引力形成三元离子缔合物,导致反应体系的共振散射信号增强,据此建立了一种测定痕量 Tc 的共振散射光谱新方法。在最佳条件下,波长 700 nm 处,Tc 浓度与体系共振散射强度的增加值(ΔI)在 0.2 ~ 22 $\mu\text{mol/L}$ 呈良好的线性关系,其线性回归方程为: $\Delta I = 1.021 \times 10^7 c + 1.437$ (c 为 Tc 的浓度, mol/L),方法的检出限为 $8.81 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$,相关系数 $r = 0.999 0$ 。将该方法应用于牛奶样品中 Tc 的测定,回收率为 100.00% ~ 101.20%。

关键词 铬天青 S;四环素;牛奶;共振散射

四环素(tetracycline,Tc)是一种具有广谱抗菌活性的抗生素,可作为预防和治疗禽畜疾病的兽药或作为饲料添加剂应用于动物饲料中。近年来,随着我国禽畜养殖业的规模化发展,残留的四环素对人类健康构成了巨大的潜在危险和威胁。因此四环素的痕量分析对于环境监管和食品监管部门是非常重要的工作。目前,测定 Tc 的主要方法有高效液相色谱法及其联用技术^[1-2]、毛细管电泳、酶联免疫分析法^[3]、紫外-可见分光光度法^[4-5]、荧光光度法^[6-7]、共振散射法^[8-9]等。

共振散射光谱法(resonance light scattering,RLS)具备简易、灵敏、快速和成本低的优点,近年来被广泛应用于检测痕量金属离子、生物大分子和药物。但目前应用共振散射光谱技术定量检测四环素的研究较少。本研究利用四环素分子中 C_{11} 、 C_{12} 位上的 β -二酮结构与金属离子 Cu^{2+} 形成二元阳离子,然后二元阳离子进一步与带负电荷的铬天青 S 通过静电引力形成三元离子缔合物,导致反应前后体系的共振散射强度发生变化,从而建立测定四环素的共振散射光谱新方法,进一步提高了方法的灵敏度和选择性,并用实验验证了反应机理。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 型荧光光度计,美国 Varian;ZS90 型

纳米粒度与 Zeta 电位分析仪,英国 Malvern 公司;pHS-3C 型精密 pH 计,上海雷磁仪器厂。

四环素标准溶液(Tc,90%,美国 Amresco 公司): $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 Tc 储备液,Tc 工作液($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)由储备液稀释得到; Cu^{2+} 溶液($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$),由 CuSO_4 (广州化学试剂厂)配制;铬天青 S 溶液(CAS, $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$),上海试剂三厂; HCl 、 H_2SO_4 、 HAc 溶液($5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$),广东汕头市西陇化工股份有限公司。

实验用水均为二次去离子水,所用试剂均为分析纯。盒装鲜牛奶样品,购于当地超市。

1.2 实验方法

在 10 mL 的比色管中,分别加入 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的 HAc 溶液 0.5 mL, $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的 Cu^{2+} 溶液 1.0 mL, $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 CAS 溶液 1.0 mL 和一定量的 Tc 工作液(以不加 Tc 的溶液为试剂空白),加水稀释至 10 mL,摇匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后,在荧光光度计上以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 方式进行同步扫描,记录波长 700 nm 处加有四环素标准溶液的 RLS 强度 I 和试剂空白的 RLS 强度 I_0 ,并计算 RLS 强度差值 $\Delta I = I - I_0$ 。

2 结果与讨论

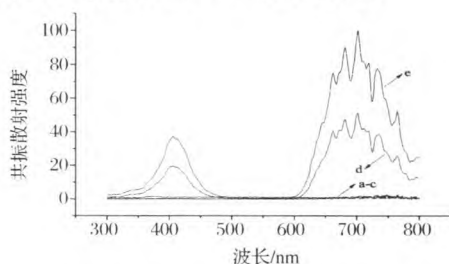
2.1 体系的共振散射光谱

按照实验方法扫描了体系不同组合的 RLS 光谱,结果如图 1 所示。在 HAc 溶液中, Cu^{2+} 、CAS、Tc 的两两反应产物(图 1 中的 a ~ c)的 RLS 强度均较弱,但当三者共存时,体系的 RLS 强度随 Tc 的加入量增大而增强(图 1 中的 d 和 e),同时在 700 nm 处

第一作者:硕士研究生(唐宁莉教授为通讯作者,E-mail: ysshianshi@163.com)。

收稿日期:2016-11-25,改回日期:2017-01-03

具有最强的 RLS 峰,由此可见三者结合生成三元离子缔合物导致体系的 RLS 强度增强。



a: 四环素与铜离子混合溶液; b: 四环素与铬天青 S 混合溶液; c: 铬天青 S 与铜离子混合溶液; d-e: 铬天青 S 与铜离子及四环素混合溶液
四环素的浓度: 1.0×10^{-5} mol/L (a, b, e); 5.0×10^{-6} mol/L (d)

图1 体系的共振散射光谱

Fig. 1 Resonance light scattering spectra of the systems

2.2 实验条件的选择

2.2.1 反应介质的选择

按实验方法分别考察了 HCl、 H_2SO_4 、HAc 三种溶液不同浓度下体系的 ΔI 值,结果表明,在 HAc 溶液中体系的 ΔI 值较大且重现性好,说明体系在弱酸介质中比较稳定。实验发现,体系在 0.5 mL 的 5.0×10^{-5} mol/L 的 HAc 溶液中 ΔI 值最大,灵敏度最高,故选择 5.0×10^{-5} mol/L 的 HAc 溶液作为最佳反应介质,用量为 0.5 mL。

2.2.2 $CuSO_4$ 用量的选择

在 0.2 ~ 1.0 mL 内,随着 $CuSO_4$ 用量的增加, Cu^{2+} 开始与 Tc 结合形成螯合物,体系的 ΔI 值不断增大。当 $CuSO_4$ 的用量为 1.0 mL 时,体系的 ΔI 值达到最大;当 $CuSO_4$ 的用量超过 1.0 mL 后,体系的 ΔI 值逐渐下降,故选择 1.0×10^{-2} mol/L $CuSO_4$ 的用量为 1.0 mL。

2.2.3 铬天青 S 用量的选择

当铬天青 S 的用量为 1.0 mL 时,体系的 ΔI 值达到最大;铬天青 S 的用量过多或过少都会使体系的 ΔI 值下降,故选择 1.2×10^{-3} mol/L 铬天青 S 的用量为 1.0 mL。

2.2.4 反应时间的选择

在室温条件下,体系反应 5 min 即可反应完全,在 3 h 内体系的 ΔI 值基本保持稳定。为了便于实验操作,实验选择在反应 10 min 后进行测定。

2.2.5 反应温度的选择

在 10 ~ 25 $^{\circ}C$ 内,随着温度升高,体系 ΔI 值逐渐增大;当温度达到 25 $^{\circ}C$ 时,体系 ΔI 值最大;25 $^{\circ}C$ 后随着温度继续上升,体系 ΔI 值下降。原因可能是温

度过高,破坏了体系之间的静电引力作用,从而导致体系的 RLS 强度减弱, ΔI 值下降。故选择 25 $^{\circ}C$ 作为反应温度。

2.2.6 试剂加入顺序的选择

当试剂加入顺序为 Tc- Cu^{2+} -HAc-CAS 时,体系的 ΔI 值较其他加入顺序的 ΔI 值大,故选择最佳的试剂加入顺序为: Tc- Cu^{2+} -HAc-CAS。

2.3 工作曲线和方法的检出限

在最优的实验条件下,按照实验方法检测 $\lambda = 700$ nm 处不同浓度四环素标准的 RLS 强度, Tc 浓度在 0.2 ~ 22 $\mu\text{mol/L}$ 内与 ΔI 呈良好的线性关系,线性回归方程为: $\Delta I = 1.021 \times 10^7 c + 1.437$, c 为 Tc 的浓度,单位为 mol/L,相关系数 $r = 0.9990$ 。按实验方法平行测定空白 13 次,标准偏差 $S = 0.03$,根据 $DL = 3S/K$ (K 为回归方程的斜率),求得检出限为 8.81×10^{-9} mol/L。

2.4 干扰物质的影响

当 Tc 浓度为 4.3 $\mu\text{g/mL}$ 时,考查了可能存在的干扰物质对测定结果的影响,当相对误差 $\leq \pm 5\%$ 时,共存物质的允许量为 ($\mu\text{g/mL}$): 蔗糖 (860); K^+ (430); Ca^{2+} (340); Na^+ (300); NH_4^+ (250); 葡萄糖、淀粉和 L-精氨酸 (210); Mg^{2+} 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 和 L-天冬氨酸 (130); L-酪氨酸 (90); DL-半胱氨酸和甘氨酸 (60)。 Fe^{2+} (2.6)、 Fe^{3+} (3.4)、 Al^{3+} (5.1) 干扰比较大,可加入 EDTA 进行掩蔽。

2.5 样品测定

在当地超市购买蒙牛、伊利纯牛奶作为样品。准确量取 5.0 mL 牛奶样品置于 100 mL 离心管中,加入 50 mL 乙酸盐缓冲液-乙腈混合溶液 (体积比 1:4),振荡摇匀 5 min, 5 000 r/min 离心 20 min 除去蛋白质。取上清液至分液漏斗中,加入 25 mL 正己烷,振荡摇匀 5 min,静置分层后弃去正己烷层。吸取下层清液,用正己烷反复脱脂至澄清,待用^[10]。取一定体积的样品待测液,按照实验方法测定其共振散射强度,未检出四环素。为考察实验方法的可行性,进行加标回收实验 (表 1)。由表中可以看出本方法的加标回收率为 100.00% ~ 101.20%,结果令人满意。

3 反应机理探讨

3.1 表面活性剂的影响

在体系中分别加入了阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵 (CTMAB)、阴离子表面活性剂十二烷基苯磺酸钠 (DBS) 和非离子表面活性剂阿拉伯胶

表 1 样品和回收率分析结果 ($n=5$)

Table 1 Analytical results of samples and recovery ($n=5$)

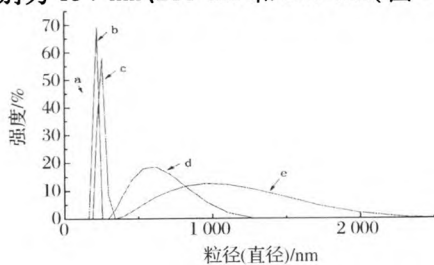
样品	样品中 Tc 含量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标测得总量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/ %
蒙牛 1	未检出	5.00	5.06	101.20
蒙牛 2	未检出	7.00	7.02	100.29
伊利 1	未检出	5.00	5.00	100.00
伊利 2	未检出	7.00	7.01	100.14

(AG),观察体系 RLS 强度的变化情况。实验结果表明,当体系中加入 CTMAB 后,空白体系的 RLS 强度 I_0 值随 CTMAB 的加入量增加而增大,同时加入 Tc 标准溶液的反应体系的 RLS 强度 I 值也随 CTMAB 的加入量增加而增大,且 CTMAB 加入量相同条件下 I 值要比 I_0 值大,说明带正电荷的 CTMAB、Tc 与 Cu^{2+} 形成的二元阳离子同时与带负电荷的 CAS 发生静电引力作用,导致体系的 I_0 、 I 值均增大。当体系中加入 DBS 后,空白体系 I_0 随 DBS 的加入量增加基本不变,表明带负电荷的 DBS 与带负电荷的 CAS 不发生反应;而当体系中加入一定量 Tc 标准溶液后, I 值随 DBS 的加入量增加而增大,且 I 值大于 I_0 值,说明带负电荷的 DBS、CAS 同时与带正电荷的 Tc 与 Cu^{2+} 形成的二元阳离子作用从而使反应体系 I 值增大。当体系中加入 AG 后,空白体系的 I_0 和加入 Tc 标准溶液的反应体系的 I 值均随 AG 的加入量增加基本不变,说明 AG 与带负电的 CAS 和带正电的 Tc 与 Cu^{2+} 形成的二元阳离子几乎都不反应。

综上所述,可得出 CAS 同 Tc 与 Cu^{2+} 形成的二元阳离子之间是通过静电引力结合形成离子缔合物的。

3.2 粒径分析

图 2 是反应物和产物的粒径分析图,由图 2 可知,CAS、CAS 与 Cu^{2+} 、Tc 与 Cu^{2+} 的平均粒径比较小,分别为 134 nm、211 nm 和 247 nm(图 2 中的 a、b



a: 铬天青 S 溶液; b: 四环素与铜离子混合溶液; c: 铬天青 S 与铜离子混合溶液; d-e: 铬天青 S 与铜离子及四环素混合溶液

四环素的浓度: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (b, d); $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (e)

图 2 反应体系的粒径分析

Fig. 2 Particle size analysis of the reaction system

和 c),当三者结合反应生成三元离子缔合物后,形成的产物的平均粒径明显增大,加入 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Tc 后,平均粒径约为 619 nm(图 2 中的 d),加入 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ Tc 后,平均粒径约为 1 012 nm(图 2 中的 e),由此可见,三者结合反应后生成更大粒径的缔合微粒,这与 RLS 光谱结果相符合。

4 结论

本文研究了 Tc- Cu^{2+} -CAS 三元离子缔合物反应的 RLS 光谱,发现三者结合导致体系 RLS 信号显著增强,且 RLS 强度增加值与 Tc 的浓度在 $0.2 \sim 22 \mu\text{mol/L}$ 内成正比,据此建立了定量测定四环素的 RLS 新方法。该方法灵敏度高、选择性好,操作简便、快速,可应用于牛奶中 Tc 含量的测定。

参 考 文 献

- [1] HUSSIEN E M. Development and validation of an HPLC method for tetracycline-related USP monographs[J]. Biomedical Chromatography, 2014, 28(9): 1 278 - 1 283.
- [2] NEBOT C, GUARDDON M, SECO F, et al. Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS[J]. Food Control, 2014, 46: 495 - 501.
- [3] CHEN Yan-ni, KONG De-zhao, LIU Li-qiang, et al. Development of an ELISA and immunochromatographic assay for tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline residues in milk and honey based on the class-specific monoclonal antibody[J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(4): 905 - 914.
- [4] 倪永年, 邓娜, 周明. 动力学分光光度法测定药物中的四环素[J]. 南昌大学学报:理科版, 2010, 34(2): 142 - 144.
- [5] TORAL M I, SABAY T, ORELLANA S L, et al. Determination of oxytetracycline from salmon muscle and skin by derivative spectrophotometry[J]. Journal of AOAC International, 2015, 98(3): 559 - 565.
- [6] NANJUNDAIAH S, KRISHNA H, BHATT P. Fluorescence based turn-on probe for the determination of caffeine using europium-tetracycline as energy transfer complex[J]. Journal of Fluorescence, 2016, 26(3): 1 115 - 1 121.
- [7] WANG Zhuo-sen, LIN Jin-tai, GAO Jin-wei, et al. Two optically active molybdenum disulfide quantum dots as tetracycline sensors[J]. Materials Chemistry and Physics, 2016, 178: 82 - 87.
- [8] LIU Xin, ZHANG Zi-long, PENG Jing-dong, et al. High-performance liquid chromatography with resonance Ray-

- leigh scattering detection for determining four tetracycline antibiotics[J]. Analytical Methods, 2014, 6(23): 9 361 - 9 366.
- [9] 陈粤华, 郝二军, 冯素玲, 等. 金纳米微粒共振瑞利散射光谱法测定四环素类抗生素[J]. 分析试验室, 2011, 30(4): 1 - 5.
- [10] 毛永强, 梁密, 李宁, 等. 基于内滤效应荧光检测牛奶中土霉素含量[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(5): 183 - 186.

Determination of tetracycline residues in milk using ternary ion-association complexes

SHAN Zhan¹, FAN Jing-jing¹, MA Xiao-long¹, TANG Ning-li^{*}

1 (College of Chemistry and Biological Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

2 (Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Food Safety and Detection, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

ABSTRACT In HAc solution, tetracycline (Tc) reacted with Cu^{2+} to form cation chelates, which further reacted with chromeazuroil S to form a ternary ion-association complexes. This enhanced resonance scattering signals. A new resonance light scattering method was established for the determination of trace Tc. Under the optimal conditions, the increase of the intensity (ΔI) at 700nm was linear to concentration of Tc in the range of 0.2 - 22 $\mu\text{mol/L}$. Its regression equation was $\Delta I = 1.021 \times 10^7 c + 1.437$, with a correlation coefficient of 0.999 0 and a detection limit of $8.81 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$. This method was applied in determination of Tc in milk samples with satisfactory results. The recovery was within the range of 100.00% - 101.20%.

Key words chromeazuroil S; tetracycline; milk; resonance light scattering