

贺江,杨恋,杨品红.基于镧离子增敏效应的四环素残留检测方法[J].江苏农业科学,2014,42(7):299-301.

基于镧离子增敏效应的四环素残留检测方法

贺江,杨恋,杨品红

(湖南文理学院生命科学学院/湖南省水产健康养殖与加工重点实验室,湖南常德 415000)

摘要:依据稀土离子 La^{3+} 能够增强四环素紫外吸收强度的原理,建立一种四环素残留快速检测方法。水产品中的四环素残留用 EDTA-McIlvaine 缓冲液提取,提取液用 HLB 固相萃取小柱净化;甲醇洗脱液氮吹浓缩至干后的残渣用 1 mL 混合溶液($V_{\text{La}^{3+}\text{溶液}}:V_{\text{Tris-HCl 缓冲溶液}}:V_{\text{水}}=1:1:8$)溶解,摇匀,于室温下静止反应 30 min,最后将样液置于微量比色皿中在 390 nm 处测定吸光度,并换算出抗生素残留浓度。结果表明,所建立的方法具有较好的灵敏度、准确度和精密性,可在水产养殖地或超市等现场推广应用。

关键词:稀土元素;紫外吸收;四环素;抗生素残留;快速测定;水产品

中图分类号: TS201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0299-02

水产养殖业近年来在我国发展迅速,但抗生素残留问题是影响水产养殖业健康发展的瓶颈因素之一^[1]。建立有效的残留检测技术体系是对抗生素残留问题进行有效控制的前提与基础。现有的抗生素残留检测方法主要有 2 类:一类是基于 HPLC 等精密仪器的标准检测方法^[2-3],但这类方法所用的仪器设备价格昂贵,也不便于现场操作;另一类是基于微生物抑制^[4-5]或酶联免疫反应^[6]的简便方法,但是微生物抑制法耗时较长,酶联免疫检测法的关键试剂(抗体)制备较困难。因此,建立简便有效的抗生素残留检测方法成为一项被广泛关注且具有较大现实意义和应用价值的研究工作^[7]。因此,本研究选取水产养殖中较常用的四环素为对象,依据稀土元素能够增强四环素紫外吸收强度的原理^[8],结合对鱼肉组织样品前处理方案的探讨,建立一种简便有效、可在现场进行操作的四环素残留检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜的鲫鱼(经标准检测方法测定无四环素残留),购自湖南省常德市某农贸市场;四环素标准品,购自德国 Dr 公司;99% La_2O_3 ,购自江西省赣州市科明锐有色金属材料有限公司;色谱甲醇,购自默克公司;其他试剂均为分析纯;试验用水均为超纯水。

1.2 仪器与设备

UV-1750 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),TDL-40B 低速离心机,MTN-2800D 氮吹仪,匀浆机,HLB 固相萃取小柱,微型比色皿,其他常规玻璃器皿。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂的配制

1.3.1.1 四环素标准母液 精确称取 2 mg 四环素,加水完全溶解,定容至 100 mL,配制成 20 $\mu\text{g/mL}$ 四环素母液,置于冰箱保存备用。

1.3.1.2 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液 称取一定量的 Na_2EDTA 、 Na_2HPO_4 和柠檬酸,分别配制成 0.1、0.2、0.4 mol/L 的溶液。按照 3:2 的体积比混合 Na_2HPO_4 和柠檬酸,配制成 McIlvaine 缓冲液。将 0.1 mol/L EDTA 溶液与 McIlvaine 缓冲液按照 1:1 的体积比混合,配制成 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(混合后 pH 值约为 4)。

1.3.1.3 La^{3+} 溶液 称取 0.163 g La_2O_3 ,溶于少量浓 HCl 中,小心蒸发近干,加水定容至 100 mL,配制成 10 mmol/L 储备液,保存于冰箱,使用时稀释至 1 mmol/L。

1.3.1.4 Tris-HCl 缓冲溶液 将 50 mL 0.1 mol/L Tris 溶液和 38.5 mL 0.1 mol/L HCl 溶液混合,定容至 100 mL,此时 pH 值约为 7.6。

1.3.2 稀土离子 La^{3+} 对四环素紫外吸收特性的影响 取 2 份 1 mL 四环素母液分别加入到 25 mL 容量瓶中,其中一份依次加入 2.5 mL 1 mmol/L La^{3+} 溶液和 2.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液,再加水定容;另一份则加入 2.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液,再加水定容;室温静置 30 min 后,在 200~450 nm 波长范围内进行光谱扫描。

1.3.3 四环素浓度与紫外吸收强度的线性相关性 取不同量的四环素母液于 25 mL 容量瓶中,再依次加入 2.5 mL 1 mmol/L La^{3+} 溶液和 2.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液,最后加水定容,使体系中四环素浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。室温静置 30 min 后测定紫外吸光度,并分析四环素浓度与紫外吸光度的相关性。

1.3.4 鱼肉组织中四环素残留检测过程

1.3.4.1 称样提取 将新鲜的鲫鱼洗净,去鳞去皮,除去内脏,剔除鱼骨,将鱼肉置于匀浆机内打碎、拌匀,除去绞不碎的物质。称取 5.00 g 鱼肉组织于 15 mL 塑料离心管中,加入 4 mL EDTA-McIlvaine 缓冲液均质提取,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液;鱼肉组织继续用缓冲液提取 2 次,每次提取 3 mL,并将 3 次提取液合并。

1.3.4.2 净化浓缩 将提取液以 1 滴/s 的速度通过预先经

收稿日期:2013-10-25

基金项目:湖南省教育厅科研项目(编号:12JC0828);湖南文理学院博士启动项目(2011);湖南文理学院生命科学学院省级平台开放项目(编号:SKYPT201202)。

作者简介:贺江(1983—),男,江西萍乡人,博士,讲师,主要从事食品安全与食品生物技术研究。E-mail:hejiang1119@163.com。

5 mL 甲醇和 5 mL 水活化的 HLB 固相萃取小柱,待上清液完全流出后,依次用 5 mL 水和 5 mL 甲醇与水的混合液(体积比为 5:95)淋洗;弃去全部流出液,用 10 mL 甲醇洗脱,并收集洗脱液于洁净干燥的离心管中;最后将洗脱液在 40 °C 下用氮吹仪浓缩至干。

1.3.4.3 溶解测定 于上述离心管中加入 1 mL 混合液($V_{\text{La}^{3+}\text{溶液}}:V_{\text{Tris-HCl 缓冲溶液}}:V_{\text{水}}=1:1:8$)溶解,摇匀,于室温下静置反应 30 min,测定其吸光度。

1.3.5 检测方法的灵敏度、准确度和精密度评价

1.3.5.1 灵敏度评价 将 5 份空白鱼肉组织(5 g/份)按照“1.3.4”所述方法进行处理和吸光度测定,并计算相对标准差,以吸光度为 3 倍标准差时所对应的四环素残留浓度为方法的检出限。

1.3.5.2 准确度评价 取 3 份鱼肉组织(5 g/份),通过添加四环素标准液制备成浓度分别为 0.4、0.8、1.2 $\mu\text{g/g}$ 模拟样品,静置 2 h 后,按“1.3.4”节进行处理和测定,并计算加标回收率。

1.3.5.3 精确度评价 取 3 份鱼肉组织(5 g/份),通过添加四环素标准液制备成浓度为 0.8 $\mu\text{g/g}$ 模拟样品,静置 2 h 后,按“1.3.4”进行处理和计算,并计算变异系数。

2 结果与分析

2.1 稀土离子 La^{3+} 对四环素紫外吸收特性的影响

通过对照试验分析了 La^{3+} 对四环素紫外吸收特性的影响,结果如图 1 所示。由图 1 可知,四环素与稀土离子 La^{3+} 作用后,其紫外吸收特性发生明显改变。一方面最大吸收峰的位置由 350 nm 移至 390 ~ 392 nm,并且峰型呈“平台”状;另一方面最大吸收峰处的吸光度明显增大。其原因在于,四环素分子具有一定的共轭体系,其本身在 350 nm 附近的紫外区有 1 个弱的吸收带,当它与稀土离子反应形成络合物后,在配位场的作用下,在吸光度增加的同时,其电子跃迁的激发能减弱,吸收带红移到 390 nm 处。 La^{3+} 对四环素紫外吸收特性的改变有利于四环素残留定量检测方法的建立,“平台”状峰型有利于提高检测的稳定性;而吸光度的增加则有利于提高检测灵敏度。

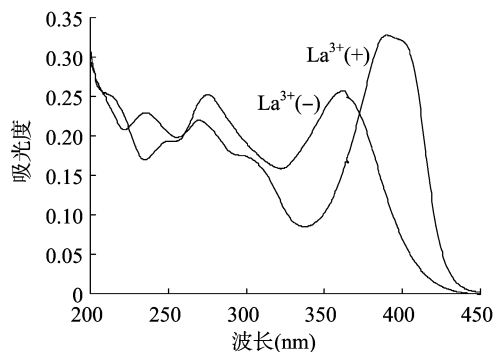


图1 La^{3+} 对四环素紫外吸收特性的影响

2.2 四环素浓度与紫外吸收强度的线性相关性

在确定了 La^{3+} 对四环素紫外吸收特性影响的基础上,试验进一步分析了四环素浓度在 0.2 ~ 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内变化时,待测物浓度与吸光度之间的相关性,结果如图 2 所示。由图 2 可知,随着检测体系中四环素浓度的增大,其最大吸收

峰处的吸光度逐渐增大,对数据作进一步回归分析后发现,二者呈良好的线性关系。说明四环素浓度与紫外吸光度的关系符合“朗伯比尔定律”,该体系可用于四环素残留的定量检测;经计算,最大吸收峰处(390 nm)的摩尔吸光系数(ϵ)为 14 400 $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

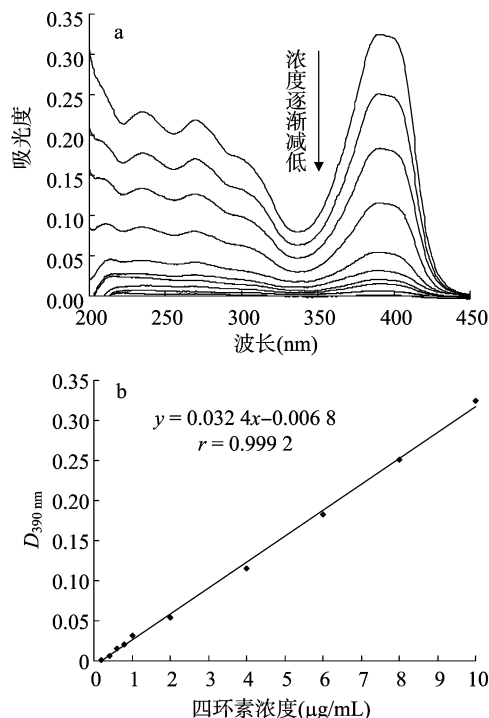


图2 四环素浓度与紫外吸光度的相关性

2.3 鱼肉组织中四环素残留浓度的测定效果

实际样品中的残留检测效果除了与最终的测定方法相关外,还与样品的前处理方法密切相关。本研究制备了不同四环素残留浓度的模拟样品,按“1.3.4”所述的样品处理方案处理后进行吸光度测定,将四环素残留浓度与相应吸光度进行回归分析,结果如图 3 所示。由图 3 可知,鱼肉组织中四环素残留浓度与样品吸光度也呈良好的相关性,说明可以利用该方法进行四环素残留检测。

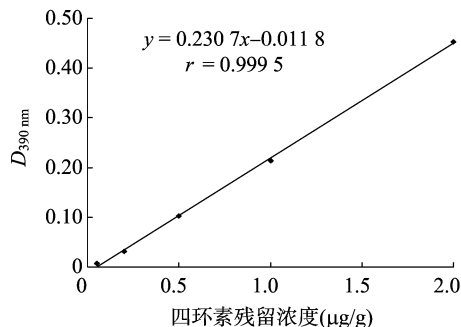


图3 鱼肉组织中四环素残留浓度与紫外吸光度的相关性

2.4 检测方法的灵敏度、准确度和精密性评价

按照上述方法,对 5 份空白鱼肉组织进行测定,其吸光度为 0.0078 ± 0.0034 ,以 3 倍标准差(即 0.0102)带入“2.3”中的回归方程,求得该检测方法的最低检测限为 0.095 $\mu\text{g/g}$ 。对 3 份添加浓度分别为 0.4、0.8、1.2 $\mu\text{g/g}$ 模拟样品进行测

丁莹,梁颖,刘贤金.鲜切果蔬安全管理体系探究[J].江苏农业科学,2014,42(7):301-303.

鲜切果蔬安全管理体系探究

丁莹¹,梁颖^{1,2},刘贤金^{1,2}

(1.江苏省食品质量安全重点实验室,江苏南京 210014; 2.农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:鲜切果蔬以新鲜、营养、方便等特点日益受到消费者的青睐,但是,高品质必然伴随着安全性的考量,鲜切果蔬极易出现质量问题如微生物污染、酶促褐变等。根据鲜切果蔬的特性,对其从原辅料采购到成品销售全过程中可能存在的潜在危害进行分析,确立关键控制点,并制订了相关的监控程序和纠偏措施。

关键词:鲜切果蔬;HACCP;食品安全

中图分类号: TS201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0301-03

鲜切果蔬(fresh-cut fruits and vegetables)作为一种新兴的食品工业产品,20世纪50年代起源于美国,20世纪80年代后,在加拿大、欧洲和日本等国家相继得到了迅速发展。鲜切果蔬又名半加工果蔬(partially processed)、轻加工果蔬(lightly processed),国际鲜切产业协会(IFPA)把鲜切产品定义为:新鲜水果或蔬菜经过修整、去皮并切割成100%可利用的产品,这些产品采用袋装或预先包装,为消费者提供高营养、方便和良好风味的新鲜产品^[1]。近年来,随着我国现代

生活节奏的加快和生活水平的提高,以及人们对自身健康的关注,传统的果蔬加工食品如罐头、蜜饯等,因缺乏果蔬加工原有的新鲜度开始被消费者冷落,而自然、新鲜、营养、方便的鲜切果蔬日益受到消费者的青睐。

高品质必然伴随着高风险,为了更好地保障鲜切果蔬的安全性,在鲜切果蔬加工工艺中越来越广泛应用 HACCP 管理体系(hazard analysis and critical control point),其作用也越来越显著。HACCP 称为“危害分析与关键控制点”,是国际食品法典委员会在 1997 年公布的食品安全卫生管理规则。HACCP 体系是一种以科学为依据,旨在防止食物中毒或其他食源性疾病的发生,确保食品安全的系统性加工过程控制系统^[2],它对食品原料的种植、养殖到最终消费的整个过程中可能造成污染的各种危害因素进行系统、全面的分析,并在此基础上,确定可以有效预防、减轻或消除各种造成食品污染的“关键控制点”,进而对这些“关键控制点”进行控制,同时监测效果以随时校正控制方法。HACCP 体系是一种对食品安全危害予以鉴别、评价和控制的系统方法,是一个保证食品安

收稿日期:2013-10-11

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(13)3087];江苏省自然科学基金(编号: BK20130701);公益性行业科研专项(编号: 201303088)。

作者简介:丁莹(1988—),女,安徽合肥人,硕士,研究方向为农产品安全。E-mail: mygirldd@163.com。

通信作者:刘贤金(1963—),男,江苏扬中人,博士,研究员,研究方向为农产品安全。Tel: (025) 84390396; E-mail: jaasliu@jaas.ac.cn。

定,测得回收率在 80%~110% 之间,说明该检测方法的准确性良好。对添加浓度为 0.8 μg/g 的 3 份模拟样品进行测定,其添加回收率稳定,相对标准差为 3.09%,说明该方法精密度较高。

3 结论与讨论

利用紫外-可见分光光度法进行定量分析具有操作简便的特点,但是其检测灵敏度通常难以满足药物残留检测的要求。本研究从检测方法本身和配套前处理方案 2 个方面考虑,以提高检测效果。在检测方法上,通过在检测体系中引入稀土离子 La³⁺,使四环素的紫外吸光度增大,进而提高检测灵敏度。在样品前处理方案方面,通过对提取液进行净化以消除基质干扰,提高检测稳定性;利用空白基质液配置标准物质进而制作标准曲线,以提高检测的准确性;对提取液进行浓缩(配合使用微量比色皿)进一步提高检测的灵敏度。本研究所建立方法的最低检出限为 0.095 μg/g,虽然与 HPLC、GC 等方法的灵敏度仍有较大差距,但低于我国相关法规规定的水产品中四环素最大残留限量(0.1 μg/g)^[9],说明该方法能够满足作为现场初筛(阴性/阳性判别)手段的要求。

参考文献:

- [1]朱岗,高会平.介绍一种新型水产环保型抗菌素——中鱼尼考[J].中国水产,2002(10):85.
- [2]袁冬梅,李一婧.养殖水产品中四环素类抗生素残留的高效液相色谱测定法[J].食品工业科技,2008(1):281,285.
- [3]朱世超,钱卓真,吴成业.水产品中 7 种大环内酯类抗生素残留量的 HPLC-MS/MS 测定法[J].南方水产科学,2012,8(1):54-60.
- [4]黄晓蓉,郑晶,吴谦,等.食品中多种抗生素残留的微生物筛选方法研究[J].食品科学,2007,28(8):418-421.
- [5]陈树桥,周国勤,陈桂芳,等.水产品中抗生素药物残留检测平板的制备研究[J].江苏农业科学,2006(3):177-179.
- [6]刘智宏,叶妮,郭文林,等.四环素类药物多残留酶联免疫检测方法[J].中国农业科学,2009,42(1):318-323.
- [7]叶兴乾,刘东红,陈健初.牛奶抗生素残留快速检测技术进展及应用现状[J].农业工程学报,2005,21(4):181-185.
- [8]江虹,刘绍璞,胡小莉,等.稀土与四环素类抗生素络合物的光度法研究[J].分析化学,2003,31(10):1207-1211.
- [9]动物性食品中兽药最高残留限量[J].中国猪业,2010(8):10-12.