

任乃林,李 红. 铽离子增敏荧光光度法测定鱼肉组织中的恩诺沙星残留[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):294-296.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.084

铽离子增敏荧光光度法测定鱼肉组织中的恩诺沙星残留

任乃林,李 红

(韩山师范学院化学系,广东潮州 521041)

摘要:为了研究建立分析测定恩诺沙星的新方法,以铽-恩诺沙星配合物的荧光特性为基础,发现在 pH 值为 6.0 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中,铽与恩诺沙星的配合物在 545 nm($\lambda_{\text{ex}} = 328 \text{ nm}$)处产生了 Tb^{3+} 的特征荧光峰,可用于恩诺沙星的分析测定,从而建立了简单、快速、灵敏测定恩诺沙星的荧光方法,并优选了反应的最佳条件。在最佳试验条件下,恩诺沙星浓度在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 范围内与其 545 nm 的荧光强度呈良好的线性关系($r^2 = 0.9923$),检出限为 $1.3 \times 10^{-9} \text{ g/mL}$;对药片中恩诺沙星的测定回收率为 97.7%,变异系数为 1.4%;对于鱼肉组织中恩诺沙星测定回收率为 79.0%~94.5%,变异系数为 2.0%~7.8%。

关键词:增敏荧光分光光度法;恩诺沙星;铽(Ⅲ);药片;鱼肉残留检测;新方法

中图分类号: S912 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0294-03

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)别称乙基环丙沙星,是第 3 代氟喹诺酮类抗菌药,为动物专用抗菌素,因具有抗菌谱广、抗菌活性强、生物利用度高、毒副作用小等优点而受到国内外临床兽医的关注,在临床上已被广泛应用。恩诺沙星为广谱抗菌药,对大肠杆菌、沙门氏杆菌、嗜血杆菌、巴氏杆菌等革兰氏阴性菌有很强的抗菌作用^[1];此外,对革兰氏阳性菌亦表现出良好的抗菌作用。恩诺沙星主要用于治疗猪、鸡、鹅、牛等的细菌性感染,同时用于治疗继发性感染和猪、鸡的霉形体病。但是长期用药所产生的不良反应、在畜禽产品中的残留、耐药性的增加以及在环境中的生态效应等已经引起广泛的关注,农业部也制定了相关残留限量标准。

国内外关于恩诺沙星的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[2-6]、高效毛细管电泳法(HPCE)^[7-8]、酶联免疫法^[9-10]、化学发光分析法^[11-12]和荧光光谱法^[13]等。

从化学结构看,恩诺沙星药物与其同类药物类似,其核心部分为喹啉,具有较大的共轭结构和刚性平面结构,因此可产生较显著的荧光,适合采用荧光光度法测定。

稀土离子 Tb^{3+} 是灵敏的荧光探针,被广泛用于药物、蛋白质、核酸等测定和研究,利用稀土 Tb^{3+} 作为荧光探针测定

喹诺酮类药物已见报道^[14-16],如周静等研究了铽-培氟沙星的荧光特性^[16]。本研究主要探讨了 ENR 与 Tb^{3+} 离子配合物体系的荧光特性,发现 ENR 与 Tb^{3+} 离子能形成稳定的配合物,能够发射铽离子的特征谱线^[16],由此建立 1 种简单、快速、可靠的检测药物中恩诺沙星含量的方法,并用于实际样品鱼肉组织中恩诺沙星残留的检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

RF-5301 型荧光分光光度计(日本岛津分析仪器公司);pHS-3D 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

主要试剂有:恩诺沙星标准储备液(1 mg/mL):准确称取恩诺沙星标准对照品,用适量蒸馏水溶解,配成浓度为 1.0 mg/mL 贮备液; 2 mol/L HAc 溶液;HAc-NaAc 缓冲溶液:取 50 mL 2 mol/L HAc 溶液用 2 mol/L NaOH 溶液调至所需 pH 值,定容至 100 mL ; Tb^{3+} 标准溶液(20 mmol/L):准确称取 Tb_4O_7 粉末 0.3738 g 于烧杯中,逐渐加入适量的浓盐酸,用电热套加热,保持微沸使其溶解,溶解后继续加热至蒸发结晶,再用 0.1 mol/L 稀盐酸溶解并转移至 100 mL 容量瓶中定容,用时稀释到所需浓度。

荧光测定均在室温进行,所有化学试剂除特别注明外均为分析纯试剂,试验用水为 2 次蒸馏水。

1.2 试验方法

在 10 mL 的比色管中,分别加入适量的恩诺沙星标准储

收稿日期:2015-01-13

基金项目:韩山师范学院科研基金(编号:511043)。

作者简介:任乃林(1962—),男,陕西宝鸡人,硕士,教授,研究方向为分析化学。E-mail:hsml@163.com。

[8] 张泽生,张建平,王 浩,等. 菊芋菊糖的超声波提取、纯化及 HPLC 法纯度检测[J]. 食品工业科技,2009,30(6):260-262.

[9] 徐 鑫,陈小辉,刘国艳,等. 微波辅助法提取牛蒡根中菊糖的研究[J]. 食品科学,2007,28(10):207-210.

[10] 陈秀枝,沈辰婷,曹未音,等. 菊芋中菊糖提取方法的比较[J]. 江苏农业科学,2013,42(11):312-313,314.

[11] 吴洪新,阿拉木斯,张存莉,等. 活性炭法用于菊苣菊粉脱色的研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(7):2626-2628.

[12] 李丹丹,金征宇. 牛蒡菊糖脱色工艺的研究[J]. 农业工程学报,2007,23(8):241-244.

[13] 牟建楼,王 颀. 响应面法优化灵芝枣饮料工艺及其抗氧化性研究[J]. 中国食品学报,2013,13(11):21-27.

[14] 陈莉华,龙进国,谭林艳,等. 红果参多糖的提取纯化及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(2):170-173.

[15] Li X X, Han L J, Chen L J. *In vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88(9):1660-1666.

备液,再依次加入一定量的 20 mmol/L Tb^{3+} 溶液、1.0 mL $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 缓冲溶液,用蒸馏水稀释至 10 mL,振荡均匀后放置 20 min。

荧光光度法的测定:在室温条件下,用 1 cm 石英比色皿装入测量溶液,置于 RF-5301 型荧光分光光度计中,分别进行荧光激发光谱和发射光谱扫描(激发狭缝为 10 nm,发射狭缝为 5 nm,发射光谱扫描范围为 350~700 nm),确定测定体系的最大荧光激发波长、最大荧光发射波长。试验中采用固定激发波长、发射波长的方法测定相应条件下测试溶液的相对荧光强度。

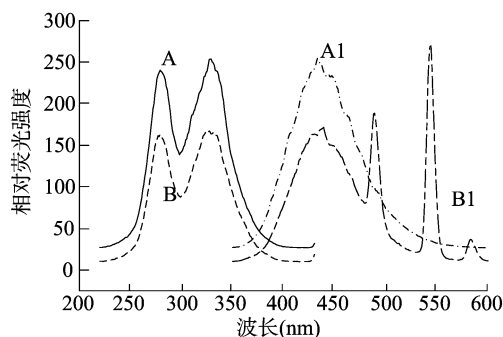
片剂中恩诺沙星的测定:取 2 片恩诺沙星片剂样品(规格为 0.1 g:5 mg),精确称量后研细,准确称取 1 片量的药粉,用蒸馏水溶解,待药物完全溶解后过滤不溶物,将滤液转移至 50 mL 容量瓶中定容。取适量在最佳试验条件下测定其相对荧光强度,计算恩诺沙星含量。

鱼肉样品中恩诺沙星的测定:随机于市场购置多宝鱼、鲫鱼、罗非鱼样品,去鳞、内脏组织,取其食用部分绞碎混匀。准确称取 5.00 g 混匀鱼肌肉组织样,加入 5.0 g 无水硫酸钠研磨均匀后置于 10 mL 离心管中,加入提取溶剂(4 mL 乙腈、0.04 mL 冰乙酸),高速匀浆 2 min,于 3 000 r/min 离心 6 min,移取上层清液;将残渣重复提取 1 次,合并上层清液,用氮气吹干,再用 2.0 mL pH 值为 6.0 的 $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 缓冲液溶解残渣,并稀释至 25.00 mL,取 6 份 2.0 mL 该样品液,加入不同浓度的标准 ENR 溶液,采用标准加入法测定其中的 ENR 含量。

2 结果与分析

2.1 激发光谱和发射光谱

准确量取 10 μL 浓度为 1 mg/mL 的恩诺沙星标准储备液于 10 mL 比色管中,加入 1 mL pH 值为 6.0 的 $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 缓冲溶液,用蒸馏水稀释至刻度,进行光谱扫描,结果见图 1。可以看出:恩诺沙星的最大激发波长为 328 nm,最大发射波长为 435 nm。



A、A1—ENR 的激发光谱、荧光光谱($C_{\text{ENR}}=1.0 \mu\text{g/mL}$, $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 的 pH 值=6.0); B、B1—ENR- Tb^{3+} 的激发光谱、荧光光谱($C_{\text{ENR}}=1.0 \mu\text{g/mL}$, Tb^{3+} 浓度 $C_{\text{Tb}^{3+}}=0.1 \text{ mmol/L}$, $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 的 pH 值=6.0); 狭缝: $\text{ex/em}=10 \text{ nm}/5 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=328 \text{ nm}/435 \text{ nm}$

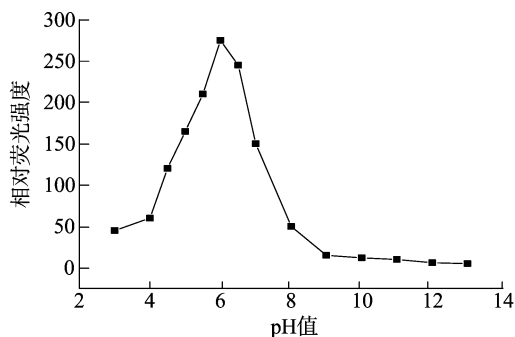
图1 激发光谱和荧光光谱

在上述体系中加入 Tb^{3+} , 恩诺沙星的激发光谱明显下降(图 1 中 B 线);同时由于配合物的形成,发生分子内能量转移,435 nm 处恩诺沙星本身的荧光发射峰降低,同时在 489、

545、582、620 nm 出现 Tb^{3+} 的特征发射峰(图 1 中 B1 线)。为了后续的研究,本试验中如果选择激发波长为 275 nm 时,在发射光谱 550 nm 附近会出现倍频峰,将对 Tb^{3+} 在 545 nm 附近的特征峰形成干扰,因此最后选择激发波长为 328 nm。

2.2 酸度对 ENR- Tb^{3+} 荧光强度的影响

在 pH 值为 3.5~13.0 的 $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 缓冲溶液中,观察 ENR- Tb^{3+} 配合物的荧光光谱变化。结果表明,在强碱性环境下(pH 值 > 10)及强酸性环境下(pH 值 < 3.5),ENR 与 Tb^{3+} 配合物不稳定,没有 Tb^{3+} 的荧光发射;pH 值为 3.5~9.0 范围内,均可观察到 Tb^{3+} 的荧光发射,545 nm 的荧光强度随 pH 值的变化情况见图 2;当 pH 值=6.0 时,能得到最为明显的铽离子的特征峰,545 nm 的荧光强度最大,试验选用的 $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 缓冲溶液 pH 值=6.0 作为配合物形成最佳酸碱度。



$C_{\text{ENR}}=1.0 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Tb}^{3+}}=0.1 \text{ mmol/L}$;
狭缝: $\text{ex/em}=10 \text{ nm}/5 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$

图2 pH 值对 ENR- Tb^{3+} 荧光强度的影响

2.3 Tb^{3+} 浓度对铽离子的特征荧光强度的影响

本试验固定 ENR 的浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, $\text{HAc}-\text{NaAc}$ 缓冲溶液的 pH 值=6.0,通过改变铽离子的浓度,观察其荧光光谱的变化。从结果看出,随着铽离子浓度增加,在 545 nm 处铽离子的特征荧光强度逐渐增大(图 3);当 Tb^{3+} 浓度为 125 mg/L 时,545 nm 铽离子的荧光强度达到最大值,说明在此条件下,能量转移最好,因此后续试验中固定 Tb^{3+} 浓度为 125 mg/L。

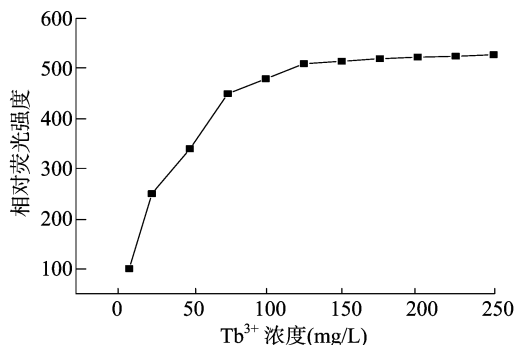


图3 Tb^{3+} 浓度对铽离子的特征荧光强度的影响

2.4 线性范围和检出限

在最佳试验条件下,配制 ENR 的系列溶液,按相应试验方法分别测定在 545 nm 处的荧光强度。ENR 浓度在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 范围内与荧光强度呈良好的线性关系,其标准曲线的回归方程为 $F = 264.29C + 27.586$, $r^2 = 0.9923$ [F 为荧光强度; C 为 ENR 浓度,mg/L]。在最佳条件

下平行测定 11 次空白溶液,按国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)(3 σ)规定的方法计算检出限为 1.3 $\times 10^{-9}$ g/mL。对于 5.0 $\times 10^{-8}$ g/mL 的 ENR 溶液进行 10 次平行测定,相对标准偏差为 2.0%。

2.5 样品测定

2.5.1 片剂中恩诺沙星的测定 取适量该样品液并用“1.2”节方法平行测定 5 次,代入线性方程,计算得每片恩诺沙星平均含量为 4.9 mg,结果与标示量基本相符(表 1)。

表 1 恩诺沙星片剂的测定结果

测定次数	荧光强度 <i>F</i>	折算成恩诺沙星含量(mg/片)
1	53.5	4.9
2	53.5	4.9
3	53.0	4.8
4	53.5	4.9
5	54.0	5.0

注:标准偏差 0.071 mg/片;相对标准偏差 1.40%。

2.5.2 恩诺沙星的回收率 在 3 支盛有样品液的 10 mL 比色管中分别加入 1.0 mg/mL 恩诺沙星标准液,然后再加入 1 mL pH 值为 6.0 的 HAc - NaAc 缓冲液,再加入 1.25 mL 1.0 mg/mL Tb³⁺ 溶液,按试验方法分别测定在 545 nm 处的荧光强度,测定结果见表 2,平均回收率为 97.7%。

表 2 3 种不同浓度的恩诺沙星样品液的测定结果

样品本底	加入量(μ g)	加标测定量(μ g)	加标回收率(%)
1.00	1.00	1.98	98.0
2.00	2.00	3.97	98.5
3.00	3.00	5.90	96.6

2.5.3 鱼肉样品的分析 按“1.2”节方法对鱼肉样品进行测定。结果表明,本次抽取的鱼肉样品均未检出 ENR 残留。试验采用标准加入法测定加标回收率,结果见表 3。方法的平均回收率在 79.0% ~ 94.5% 之间,变异系数在 10% 以内,达到了国际残留法规委员会的要求。

表 3 鱼肉组织中 ENR 的回收率和变异系数

鱼种	药物加入量(μ g/g)	实测值(μ g/g)	平均回收率(%)	<i>RSD</i> (批内)(%)	<i>RSD</i> (批间)(%)
鲫鱼	0.10	0.082	82.0	5.5	7.5
	0.50	0.452	90.4	4.5	6.0
	1.00	0.924	92.4	2.8	3.5
多宝鱼	0.10	0.079	79.0	6.0	7.8
	0.50	0.453	90.6	3.8	5.5
	1.00	0.930	93.0	2.5	3.0
罗非鱼	0.10	0.081	81.0	4.5	5.6
	0.50	0.431	86.2	3.0	4.5
	1.00	0.945	94.5	2.0	3.2

3 结论

恩诺沙星与 Tb³⁺ 能形成配合物发射铽离子的特征荧光,由此建立了 1 个测定 ENR 的新方法,本方法用于实际样品

(恩诺沙星片剂和鱼肉组织)中 ENR 的测定,方法快速,操作简便,样品回收率均在 70% 以上,变异系数在 10% 以内,达到了国际残留法规委员会的要求,可作为检测 ENR 残留的快速筛选方法。

参考文献:

[1]李明魁,侯卫东,张全勇. 恩诺沙星应用评价[J]. 河南畜牧兽医: 综合版,2003,24(12):36.

[2]Tian H Z. Determination of chloramphenicol, enrofloxacin and 29 pesticides residues in bovine milk by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Chemosphere,2011,83(3):349 - 355.

[3]Sun H W,Wang L X,Qin X L,et al. Simultaneous determination of malachite green, enrofloxacin and ciprofloxacin in fish farming water and fish feed by liquid chromatography with solid - phase extraction [J]. Environmental Monitoring & Assessment,2011,179(1/2/3/4):421 - 429.

[4]Amin A S,Dessouki H A,Agwa I A. Ion - pairing and reversed phase liquid chromatography for the determination of three different quinolones:Enrofloxacin,lomefloxacin and ofloxacin[J]. Arabian Journal of Chemistry,2011,4(3):249 - 257.

[5]Jakubowski P,Jaroszewski J J,Grabowski T,et al. Determination of enrofloxacin in chicken plasma by high performance liquid chromatography for pharmacokinetic studies[J]. Acta Veterinaria,2010,60(5/6):563 - 572.

[6]孟 勇,吴光红,朱晓华,等. RP - HPLC 同时测定中华绒螯蟹肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留[J]. 中国水产科学,2005,12(6):106 - 112.

[7]Wang L,Wu X P,Xie Z H. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin by high performance capillary electrophoresis with end - column amperometric detection[J]. Journal of Separation Science,2005,28(11):1143 - 1148.

[8]汪雪雁,檀华蓉,祁克宗,等. 分子印迹固相萃取 - 高效毛细管电泳法检测鸡肉中的恩诺沙星残留[J]. 色谱,2010,28(11):1107 - 1110.

[9]Yu F,Yu S C,Yu L L,et al. Determination of residual enrofloxacin in food samples by a sensitive method of chemiluminescence enzyme immunoassay[J]. Food Chemistry,2014,149:71 - 75.

[10]刘 红,曾振灵,杨桂香,等. 恩诺沙星 ELISA 快速检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志,2006,40(11):13 - 15.

[11]Rezaei B,Mokhtari A. Flow - injection chemiluminescence determination of enrofloxacin using the Ru(phen)₃²⁺ - Ce(IV) system and central composite design for the optimization of chemical variables [J]. Luminescence,2008,23(6):357 - 364.

[12]黄进慧,高向阳. 鲁米诺 - 铁氰化钾流动注射化学发光体系测定恩诺沙星[J]. 食品科学,2009,30(24):276 - 278.

[13]贾丽华,曾晓丹,王清滨,等. 胶束增敏荧光光谱法测定恩诺沙星的含量[J]. 分析科学学报,2007,23(1):111 - 112.

[14]何 华,王羚郦,刘旭辉,等. 环丙沙星 - 铽络合物的荧光特性及其应用研究[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(8):1516 - 1519.

[15]吴淑清,曹秋娥,赵云昆,等. 铽 - 环丙沙星体系的荧光特性及环丙沙星的测定[J]. 分析化学,2000,28(12):1462 - 1466.

[16]周 静,杜黎明,陈彩萍. 铽 - 培氟沙星的荧光特性研究及培氟沙星的测定[J]. 光谱学与光谱分析,2004,24(6):717 - 719.