

基于三维荧光光谱技术的牛奶中金霉素残留的检测研究

吁芳 赵进辉 刘木华*

(江西农业大学 工学院/生物光电实验室 江西 南昌 330045)

摘要: 牛奶中残留的抗生素易在人体内蓄积,进而对人体的健康产生隐患。研究表明,阳离子表面活性剂 CT-MAB 对金霉素(CTC)具有荧光增敏作用。采用一种新型的三维荧光光谱技术,对经过荧光增强后的含金霉素牛奶样品的三维荧光数据,应用三维-偏最小二乘法(3-PLS)进行其处理。结果表明:当 CTC 浓度在 0.2~5 mg/L 时,其校正组的相关系数 $R=0.9890$,校正样本的均方根误差 $RMSEC=0.2199$,预测组的相关系数 $R=0.9855$,均方根误差 $RMSEP=0.2479$ 。可见使用三维荧光光谱技术对牛奶中金霉素的残留进行快速检测是可行的。

关键词: 三维荧光; CTMAB; 牛奶; 金霉素; 3-PLS

中图分类号: S859.84 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)04-0818-05

Detection of Chlortetracycline Residues in Milk Based on Three-dimensional Fluorescence Spectroscopy

YU Fang ZHAO Jin-hui LIU Mu-hua*

(Optics-electrics Application of Biomaterials Lab, College of Engineering, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: Antibiotic residues in milk are inclined accumulate in human body, resulting a potential danger to health. According to research, CTMAB can enhance the fluorescence sensitivity of CTC. This study used a new type of three-dimensional fluorescence spectroscopy. Using the 3-PLS, the three-dimensional fluorescence data collected from the milk containing CTC were treated. The results showed that, when the concentration of CTC was 0.2-5 mg/L, the correlation coefficient in calibration set was 0.9890, $RMSEC=0.2199$, the correlation coefficient in prediction set was 0.9855, $RMSEP=0.2479$. It shows that it is feasible to use three-dimensional fluorescence spectroscopy for rapid detection of CTC in milk is feasible.

Key words: three-dimensional fluorescence; CTMAB; milk; CTC; 3-PLS

牛奶中富含多种有益人体健康的营养物质,几乎适合所有人群饮用,已成为我们日常补充营养的一种重要手段。但是由于当前奶牛养殖当中,奶牛乳腺炎的发病率非常高,尤其是在每年春季换季的时候,也是奶牛乳腺炎的高发季节^[1]。加上现在机械化的取乳方式,更增加了奶牛乳腺炎的患病风险。而治疗奶牛乳腺炎的主要药物就是抗生素^[2-3]。而当人们长期食用了含有抗生素残留的牛奶后,会造成抗生素在人体内蓄积,蓄积的抗生素会引起人体各种组织器官的病变、癌变^[4]。并且由于抗生素在

收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2012-05-25

基金项目: 江西省教育厅科技项目(2012GJJ12244)

作者简介: 吁芳(1986—),女,硕士生,主要从事农产品品质无损检测研究, E-mail: prettylp17@126.com; * 通讯作者: 刘木华,博士,教授, E-mail: suikelmh@sohu.com。

人体内的积聚作用,会破坏肠道中菌群的平衡,使敏感菌群被抑制或杀灭,造成肠道菌群失调。还将导致人体内细菌的耐药性不断增加,且耐药菌群大量繁殖。当人们再次被这种病菌感染时,抗生素的效果就大大降低,给临床治疗带来极大的困难^[5-7]。所以对于牛奶中抗生素残留的检测是必要的。

牛奶中抗生素残留的检测应用最多的是液相-质谱联用技术^[8-12],但这种技术需要复杂的前处理,且操作复杂。三维荧光光谱分析法作为近十年来发展起来的一种新的荧光光谱分析技术。它可获得待分析检测化合物完整的荧光特征,从而使得光谱信息更全面,具有高选择性,并且不需要复杂的前处理,操作简单,具有快速无损检测的特点^[13]。

本文利用三维荧光光谱技术,结合三维-偏最小二乘回归法(three way-partial least squares regression)对牛奶中的金霉素残留进行检测分析。为实现金霉素等抗生素在牛奶中残留的无损、快速检测提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 仪器设备与试剂

本实验所采用的三维荧光光谱仪为 VARIAN 公司的 Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer,三维荧光光谱仪的激发波长范围为:199 ~ 1 100 nm,扫描频率为 600 nm/min,荧光强度范围为:0 ~ 1 000 A. U.。

金霉素(CTC)标样储备液的配制:(盐酸金霉素 NIC-130489 0.2 g,含量测定,中国标准物质网),采用电子天平准确称取金霉素 CTC 标样 10 mg,使用超纯水在棕色容量瓶中定容到 100 mL,超声溶解,配制成 0.1 g/L 的储备液,密封置于 4 °C 冰箱中备用。

配制 pH 分别为 7.1、8.0、8.2、8.5、9.0、9.3 的 Tris-HCL 缓冲液, 7×10^{-4} mol/L 的阳离子表面活性剂 CTMAB。

1.2 实验条件的选择

采用三维荧光仪对已配制好的金霉素(CTC)标样进行激发波长和发射波长的扫描。由于金霉素自体荧光较弱,所以设置三维荧光仪的激发波长和发射波长狭缝均为 10 nm,且采用的是强激发光扫描,扫描结果如图 1 所示。由图 1 中可以看出金霉素的 最佳激发波长为 340.00 nm 和 392.62 nm,金霉素的发射波长为 578 nm 左右。

根据对金霉素的初步扫描结果,采集金霉素标样的三维荧光数据。三维荧光仪的参数设置为:激发和发射波长狭缝均为 10 nm,强激发光,激发波长 EX: 200 ~ 360 nm,发射波长 EM: 300 ~ 800 nm,步长为:1 nm,扫描结果如图 2 所示。

由图 2 可见浓度为 100 mg/L 的金霉素在强激发光的作用下会产生自体荧光,

为牛奶中金霉素残留的检测提供了依据。同时由图 2 可知,当激发光波长在 200 ~ 220 nm 时,由于这段波长靠近仪器的起始激发波长 199 nm,所得到的荧光曲线非常不平滑,毛刺较多,所以选择的激发波长须大于 220 nm。另外经仪器检测 100 mg/L 的金霉素只能在强激发光的作用下才产生荧光,当采用中等强度激发光激发时,基本上看不到金霉素的发射光谱。而待检测的牛奶样,在强发光照射时荧光强度会超过仪器的检测限 1 000 A. U. 这就需要增强金霉素的荧光强度使金霉素能在中等强度的激发光下产生荧光,从而实现金霉素在牛奶中的检测。

由于四环素类抗生素在碱性条件下,与阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTMAB)作用后,可显著增强荧光^[14]。故取一定量的金霉素标样储备液,加入一定量浓度的 CTMAB 及 pH=8.2 的

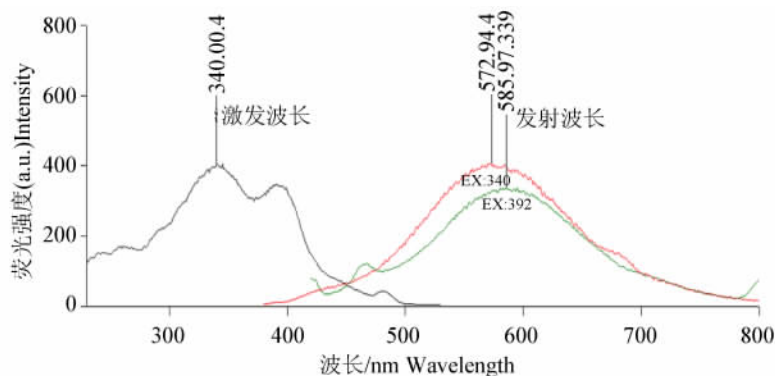


图 1 金霉素的 最佳激发和发射波长

Fig. 1 The best excitation and emission wavelength of CTC

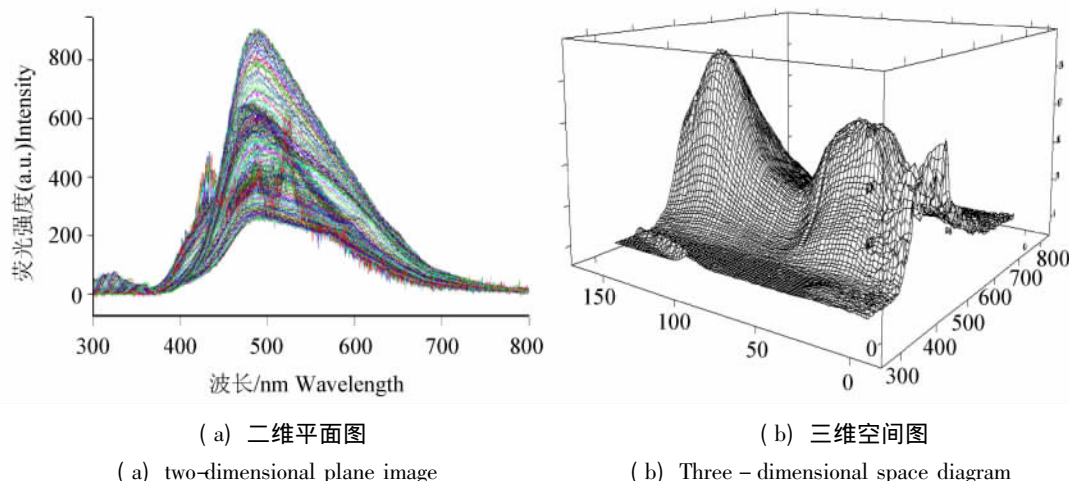


图 2 金霉素三维荧光扫描图

Fig. 2 Three-dimensional fluorescence spectrum of CTC

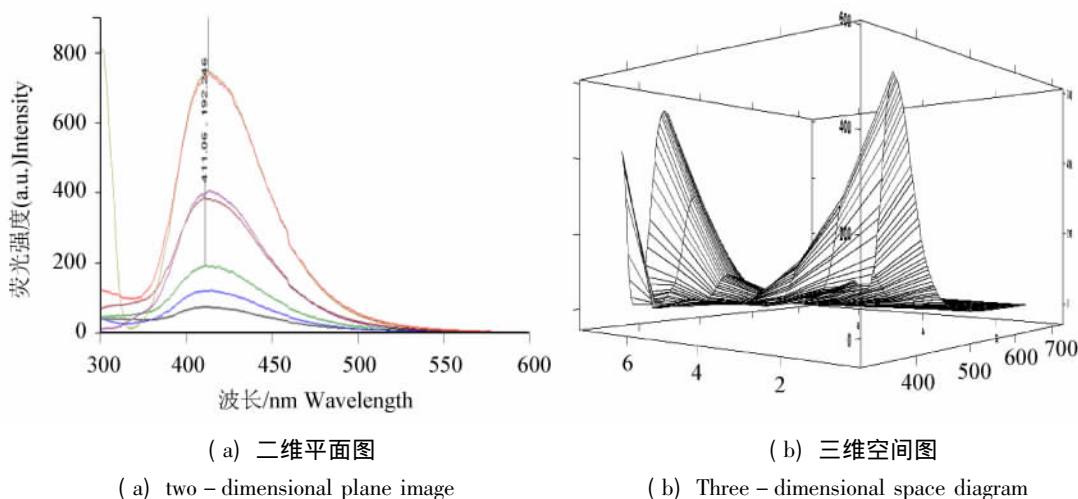


图 3 荧光增强后的金霉素三维荧光光谱图

Fig. 3 Three-dimensional fluorescence spectrum of CTC after Fluorescence enhanced

Tris-HCL 缓冲液 然后在激发和发射狭缝均为 10 nm ,中等强度激发光 ,激发波长 EX: 230 ~ 350 nm ,发射波长 EM: 350 ~ 700 nm ,步长:20 nm 的条件下采集荧光增强后的金霉素的三维荧光光谱 结果如图 3 所示。由图 3 可知 在 230 nm 和 350 nm 左右 ,所得到的荧光峰值最大 ,此时的发射波长为:411.06 nm。由于 350 nm 的激发波长易对发射峰产生影响 ,所以本实验选择 230 nm 左右作为激发波长。

1.3 CTMAB 浓度的选取及最佳 pH 的选择

阳离子表面活性剂 CTMAB 的浓度 ,以及 Tris-HCL 缓冲液 pH 值的选择 ,都会影响到金霉素的荧光强度。这就需要确定 CTMAB 的最佳浓度 ,以及 Tris-HCL 缓冲液的最佳 pH 值。取 5 mL 金霉素标样 ,分别加入 5 mL CTMAB 溶液 ,采集 Tris-HCL 缓冲液 pH 为: 7.1、8.0、8.2、8.5、9.0、9.3 时 ,激发波长为 230 nm 下的金霉素荧光强度。结果发现当 pH = 8.2 左右时 ,荧光强度最高 ,当 pH 继续增大时 ,荧光强度降低 ,所以本实验中采用 pH8.2 的 Tris-HCL 缓冲液。

同样 取 5 mL 金霉素 ,在 Tris-HCL 缓冲液 pH = 8.2 的条件下 ,分别加入不同浓度的 CTMAB 溶液 ,设置激发波长为 230 nm 进行检测。结果表明 ,当 CTMAB 浓度越高时 ,金霉素的荧光强度也越大 ,但是差距不是很明显 ,由于 CTMAB 临界胶束浓度为 $9.2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}^{[15]}$,所以本实验选择 CTMAB 的浓度为 $7 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 作为金霉素的荧光增强浓度。

1.4 实验方法

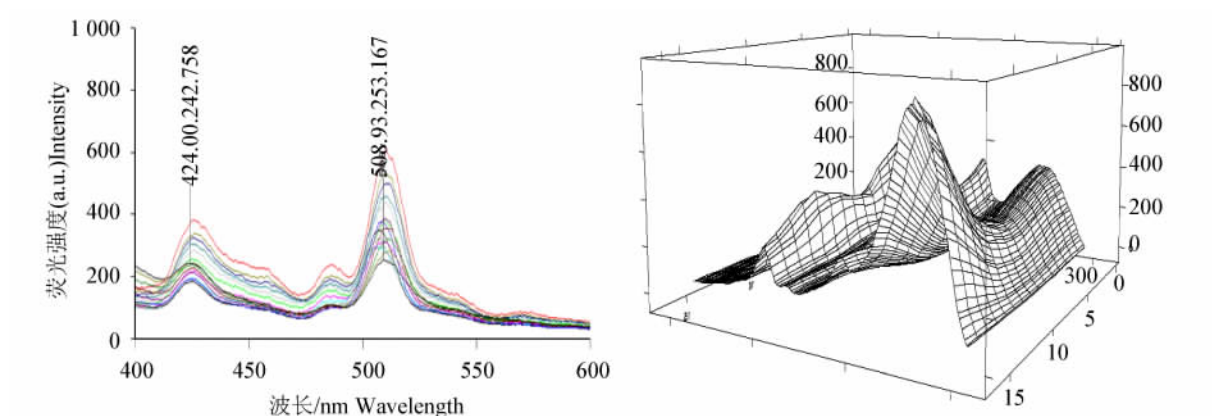
本实验所采用的样品为某知名品牌纯牛奶 ,购置于市场上大型超市 ,均属同一批次。实验前使用金霉素标样 配制好含有不同浓度金霉素的牛奶样本 60 份 ,使牛奶中金霉素的浓度在 0.2 ~ 5 mg/L。按

照上述方法对这 60 份牛奶标样进行荧光增强后置于三维荧光仪中, 分别采集它们的三维荧光光谱。三维荧光仪的参数设置为: 激发狭缝为 10 nm, 发射狭缝为 10 nm, 激发波长为: 228 ~ 258 nm, 发射波长为: 380 ~ 600 nm, 步长为 2 nm, 中等激发光强度照射。

2 结果与分析

2.1 实验结果

当牛奶中含有金霉素时, 所得的三维荧光峰如图 4 所示。经分析当牛奶中含有金霉素时会使得三维荧光峰在 400 ~ 600 nm 显著增强, 且随着含量的增加峰值变高。在后续的数据处理中, 可取 400 ~ 600 nm 这段作为处理对象, 同时也可避免 300 ~ 400 nm 氨基酸荧光峰的干扰。



(a) 二维平面图

(b) 三维空间图

(a) two - dimensional plane image

(b) Three - dimensional space diagram

图 4 含金霉素的牛奶三维荧光图

Fig. 4 Three-dimensional fluorescence spectrum of milk containing CTC

表 1 牛奶样品中金霉素含量统计

Tab.1 Statistical of content of CTC in milk

	最大值/(mg · L ⁻¹)	平均值/(mg · L ⁻¹)	最小值/(mg · L ⁻¹)	样本数
	Maximum	Mean	Minimum	Number of samples
校正集 Calibration set	5.732	2.011	0.267	40
预测集 Prediction set	4.616	1.887	0.244	20

2.2 实验结果分析

含有金霉素的牛奶样本总共为 60 个, 每隔一样品取两样品作为校正组样品, 既校正组样品为 40 个, 剩余 20 个样品作为预测组, 如表 1 所示为牛奶样品中金霉素含量的统计表。

对校正组样品的 40 个三维数据, 转化成二维形式后, 导入到分析软件 Unscrambler 9.7 中。利用三维偏最小二乘法进行建模, 所得模型如图 5 所示。由图 5 可知, 预测值和实测值之间的相关系数 R 为 0.989 0, 均方根校正误差 $RMSEC$ 为 0.219 9。

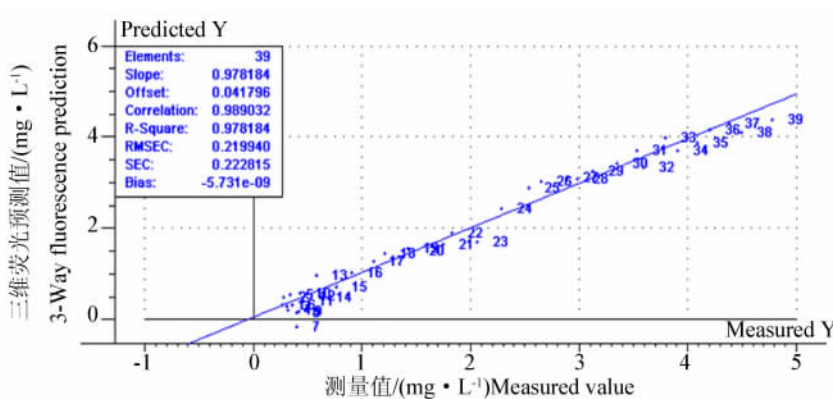


图 5 金霉素牛奶的验证模型

Fig. 5 Verification model of milk containing CTC

利用预测组样品,对所建模型的准确性进行验证,经 Unscrambler 9.7 软件进行分析得出预测值,用预测值与金霉素浓度真实值进行拟合,得到预测结果如图 6 所示。实测值和预测值之间的相关系数 R 为 0.985 5,均方根预测误差 $RMSEP$ 为 0.247 9。

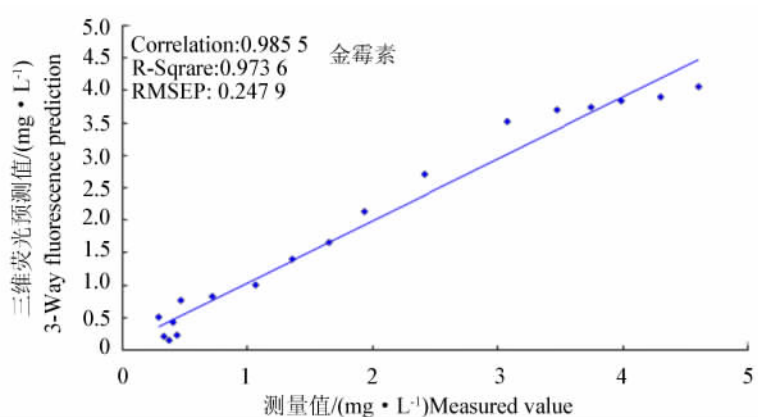


图 6 金霉素牛奶的预测模型

Fig. 6 Prediction model of milk containing CTC

3 结 论

本论文提出了一种采用三维荧光光谱技术对牛奶中的金霉素残留进行快速检测的可行性方法。本实验利用四环素类抗生素在碱性溶液中,与阳离子表面活性剂 CTMAB 作用后,荧光强度会显著增强的原理,采用三维荧光光谱技术结合 PLS 法,对校正组的 40 个数据进行建模,然后使用预测组的 20 个样本数据对所建模型进行验证。结果表明预测组中预测值与实际值的相关系数 $R = 0.985 5$,均方根误差 $RMSEP = 0.247 9$ 。本实验中金霉素的浓度范围为 0.2 ~ 5.0 mg/L,不仅接近于国家标准检测限 0.1 mg/L^[16],并且本研究还具有检测速度快,取样量少,操作简单等特点,另外由于三维荧光光谱采集的信息全面,也有利于将来发展同时检测多种抗生素的需要。

参考文献:

- [1] 郑维君,常炜,马文宏. 牛奶中抗生素残留检测的研究进展及应用现状[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(5): 187-190.
- [2] 翟宗德,曹程明,葛宇,等. 色谱技术在牛奶中抗生素残留检测方面的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 287-291.
- [3] 郑淑容. 牛奶中抗生素残留的危害及对策[J]. 中国奶牛, 2010, 28(3): 48-50.
- [4] 张素霞. 食品中抗生素残留危害及其检测方法分析[J]. 肉类工业, 2009, 30(5): 30-32.
- [5] 闫小峰. 四环素类抗生素残留检测方法研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(5): 47-50.
- [6] 王宏博,高雅琴,杜天庆. 牛奶中抗生素残留的危害及检测方法的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(4): 158-160.
- [7] 张文虎,张瑞梅. 牛奶中抗生素残留及其速测方法[J]. 新疆畜牧业, 2009, 25(4): 27-28.
- [8] Koesukwiat U, Jayanta S, Leepipatiboon N. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk[J]. Journal of Chromatography, 2007, 1140(1/2): 147-156.
- [9] Abbasi M M, Babaei H, Ansarin M, et al. Simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk samples by solid phase extraction and HPLC-FL method[J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2011, 1(1): 34-39.
- [10] Krivohlavek A, Barusic L, Smit J, et al. HPLC-MS analysis of chloramphenicol residues in milk and powdered milk products[J]. Kem Ind, 2007, 56(2): 53-56.
- [11] 杨红梅,王浩,刘艳琴,等. 高效液相色谱-质谱联用测定乳制品中 6 种四环素类抗生素[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(11): 50-52.
- [12] 岳振峰,邱月明,林秀云,等. 高效液相色谱串联质谱法测定牛奶中四环素类抗生素及其代谢产物[J]. 分析化学研究报告, 2006, 34(9): 1255-1259.
- [13] Casado T S, Segura C A, Busi S, et al. Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection[J]. Electrophoresis, 2007, 28(6): 2882-2887.
- [14] 张红漫,顾铭燕,黄金恋,等. 四环素-Ca²⁺-CTMAB 三元配合物体系荧光光谱的研究与应用[J]. 分析试验室, 2009, 28(7): 22-25.
- [15] 胡乃梁,王冬媛,赵一兵,等. 表面活性剂增敏强力霉素碱性降解荧光法研究[J]. 分析试验室, 1996, 15(1): 46-48.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 22990—2008 牛奶和奶粉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定液相色谱-紫外检测法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.