

自组装成环荧光显微成像技术在抗生素 残留量检测中的应用

刘颖^{1,2}, 冯金朝¹, 李丹¹, 崔箭³, 徐斯凡³, 申刚义³

1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

2. 内蒙古师范大学化学与环境科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010022

3. 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081

摘要 提出了一种基于溶剂毛细流效应的微波加热自组装成环荧光显微成像技术, 并应用于内蒙古乳都乳中抗生素残留量检测。在六氢吡啶反应介质和聚乙烯醇124(PVA-124)存在下, 将米诺环素液滴滴在疏水性玻璃表面上, 当液滴受热挥发时, 形成直径约为1.54 mm, 环带宽为22.6 μm的自组装环。当点样体积为0.30 μL时, 线性范围为 $4.2 \times 10^{-12} \sim 1.8 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($1.4 \times 10^{-6} \sim 0.60 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 方法的检测限(3σ)为 $4.2 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($1.4 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。应用于内蒙古乳都乳中残留米诺环素和米诺环素胶囊中米诺环素含量的检测, 回收率分别为97.2%~103%和99.4%~102%, 相对标准偏差(RSD)小于1.2%。该方法建立了高灵敏、高选择性的痕量药物污染物分析新方法, 为内蒙古地方优势资源产品——乳品中抗生素类药物残留量的定量检测提供理论依据, 同时对不同地区乳品中抗生素的来源、残留情况的系统动态研究及对乳品行业的管理、监督等具有重要的现实意义和更广泛的应用前景。

关键词 米诺环素; 内蒙古乳都乳; 自组装成环(SOR)技术; 荧光显微分析

中图分类号: X832 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)082217-05

引言

近年来, 在禽畜产业领域应用抗生素对动物进行诊断、以亚治疗剂量添加于动物饲料中预防和治疗疾病^[1,2]。另一方面, 随着畜牧业迅速发展, 乳牛患乳房炎等疾病的概率也随之增加, 抗生素作为通用药剂被广泛添加到乳牛饲料和用于乳牛机体注射^[3]。长期暴露于低剂量抗生素环境中的微生物、生物、动物和人, 将产生大量耐药细菌^[2], 对机体健康存在潜在威胁, 同时也造成研制一种新抗生素的速度远远赶不上细菌产生耐药性速度的局面。因此, 牛奶中抗生素类药物残留量问题逐渐成为公众关注的焦点。我国目前国内市场消毒牛奶、奶粉、婴幼儿奶粉和生牛奶中抗生素超标现象十分严重^[3,4], 以至引起了人们对牛奶安全问题的担忧。同时, 我国乳和乳制品在外贸出口中常常成为外国“绿色技术壁垒”的受害者, 造成巨大的经济损失^[5]。

开发高灵敏度的抗生素检测技术以解决我国当前乳和乳制品行业面临的难题已成为当务之急^[6]。目前抗生素残留检

测的方法大致分为微生物测定法(如戴尔沃检测法, 国标TTC法)^[7]、化学分析法^[8,9]及生物和化学的酶联免疫测定法^[10]等, 各种方法均有不同特点。寻找一种耗样量少、灵敏度高的检测新方法, 仍是一项非常重要和迫切的工作。

米诺环素(Minocycline, MC)是高效、速效、长效的半合成四环素新制剂, 抗菌作用在该属中最强。近几年对牛奶中四环素类药物残留检测方法的相关报道主要有高效液相色谱等方法^[11,12]。黄承志先生开发、利用的毛细流定向组装成环技术(self ordered ring, SOR), 已用于环境中污染无机物、核酸和蛋白质等分析, 并得到满意结果^[13-17]。本文通过对实验条件的优化, 成功地将此法应用于内蒙古乳都乳和国内行业乳品中残留米诺环素及米诺环素胶囊中米诺环素含量的检测, 回收率分别为97.2%~103%和99.4%~102%, 本实验样品前处理简单, 只需将样品稀释200倍即可, 且需用量少, 微升级点样。当0.30 μL点样时, 检测限为 $4.2 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($1.4 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

本文建立了操作简单、高灵敏、高选择性的痕量药物污染物分析新方法, 为内蒙古地方优势资源产品——乳品中抗

收稿日期: 2008-05-22; 修订日期: 2008-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(20767004), 中央民族大学“985工程”项目(CUN 985-33), 中央民族大学“211工程”项目(MUC 021211306), 内蒙古自治区自然科学基金重点项目(200711020202), 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJ06108)资助

作者简介: 刘颖, 1963年生, 中央民族大学生命与环境科学学院教授, e-mail: liuying430@yahoo.com.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生素类药物残留量的定量检测提供理论依据,同时对研究不同地区乳品中抗生素的来源、残留情况的系统动态研究及对乳品行业的管理、监督等具有重要的现实意义和更广泛的应用前景。

1 实验

1.1 仪器与试剂

IX-81 倒置荧光显微镜(Olympus 公司,日本),选用 U 激发单元(激发滤光片波长范围 330~385 nm, 阻尼滤光片波长为 420 nm, 二色镜波长为 400 nm); 图像由 DP70 高分辨率高敏感度冷却 CCD 自带采图软件 DP controller(Olympus 公司,日本)通过 Image Pro Plus 中文版 6.0(Media Cybernetics 公司,美国)图像处理软件获取; GL-88B 型旋涡混合器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限责任公司); PB-10 酸度计(德国赛多利斯公司); Origin7.5 软件包用于线性和高斯拟合; 二氯二甲基硅烷(DMCS)疏水性载玻片的预处理见文献[13]。

米诺环素储备液: 称取 0.045 7 g 米诺环素(MC, 中国药品生物制品检定所),用少量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液溶解后,稀释到 100 mL,配成 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,并保存于 0~4 °C 冰箱中,用时稀释成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 工作液; $0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 六氢吡啶水溶液($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}$, 天津市福辰化学试剂厂); 1.0% 聚乙烯醇 124(PVA-124, 北京化学试剂公司)。实验所用试剂均为分析纯,水为 3 次蒸馏水。

1.2 样品预处理

分别移取伊利早餐奶(呼和浩特,内蒙古伊利实业集团股份有限公司,批号: 20080417H6NA5)、伊利纯牛奶(呼和浩特,内蒙古伊利实业集团股份有限公司,批号: 20080412H2EA5)、蒙牛纯牛奶(呼和浩特,内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司,批号: 20080405H2JA)、三元纯牛奶(北京,北京三元食品股份有限公司,批号: 080412 61/6)、光明纯牛奶(北京,北京光明健能乳业有限公司(B),批号: B2008/04/17A)各 1.00 mL 于 200 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,冷藏备用。

按照文献[18],取市售米诺环素胶囊(江苏,惠氏制药有限公司,产品批号: 0803249,规格: $50 \text{ mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)装量差异项下的内容物适量(约相当于米诺环素 50 mg),精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加水 80 mL,超声处理 5 min 后,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为米诺环素试样溶液。

1.3 实验方法

在 1.50 mL 微量试管中依次加入一定体积 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 米诺环素工作液, 100 μL $0.40 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 六氢吡啶溶液,然后加入 200 μL 1%(w/v)的 PVA 溶液,加水至 0.50 mL,摇匀。用微量注射器移取 0.30~1.00 μL 混合液小心点在二氯二甲基硅烷疏水性载玻片表面上,将其置于微波炉中高火烘干 1.6 min,于倒置荧光显微镜下对 SOR 进行图像分析,测定其荧光强度 $I_{\max}$,同时测定试剂空白荧光强度 $I_{\max}^0$,作荧光强度变化值($\Delta I_{\max} = I_{\max} - I_{\max}^0$)~米诺环素浓度(c)的线性拟合方程。

2 结果与讨论

2.1 自组装成环特征

图 1 是米诺环素在六氢吡啶介质中 SOR 荧光强度的 3D 图(a)和荧光强度剖面图(b)。当液滴体积为 0.50 μL , 环直径约为 1.54 mm, 环线宽约为 22.6 μm 。由图 1 的(a)和(b)可见,环内外几乎没有荧光物质分布;将图 1(b)中荧光强度(I)对径向距离(pixels)进行高斯拟合(图 2),得拟合方程

$$I_a = 40.02 + \frac{563.03}{\sqrt{\pi/2}} e^{-2(x-107.23)^2/7.56^2} \quad (x_a^2 = 2.15)$$

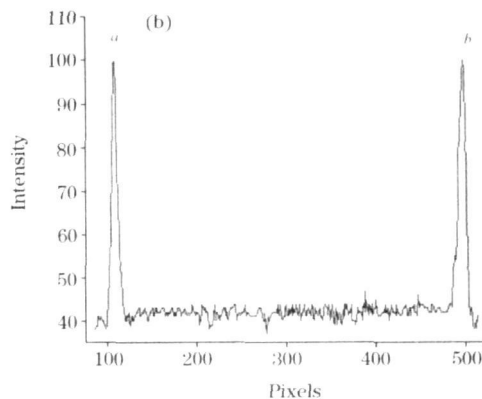
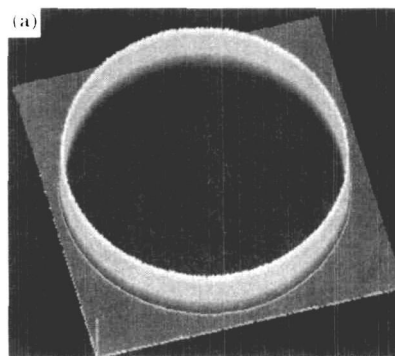


Fig. 1 3D-SOR image of MC(a) and fluorescence intensity(b)
MC: $4.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Hexahydropyridine: $0.080 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PVA-124: 0.40%; Droplet volume: 0.50 μL ; A4 $\times$ objective was used

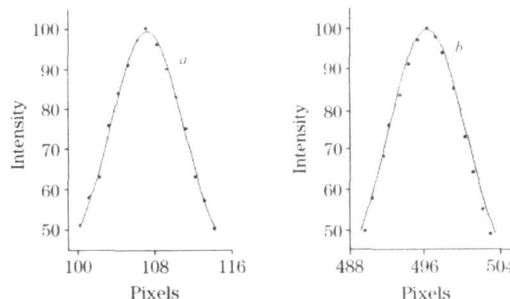


Fig. 2 Gaussian fitting of peak a and b

和

$$I_b = 34.04 + \frac{679.77}{\sqrt{\pi/2}} e^{-2(x-496.24)^2/8.24^2} \quad (x_b^2 = 1.93)$$

拟合方程说明, 环线上米诺环素的分布符合高斯分布。

2.2 实验条件的优化

2.2.1 反应介质的影响

米诺环素碱性溶液荧光强度非常弱, 但将其成环后却具有很强的荧光, 且其荧光强度依赖于反应介质。本文试验了 Tris HCl, Britton Robinson, NH₃·NH₄Cl, NaOH 和六氢吡啶等反应介质, 结果表明, 选用六氢吡啶时, 荧光强度最大; 且当六氢吡啶的浓度增大到 0.080 mol·L⁻¹时, SOR 环的荧光强度达到最大值(图 3), 故实验选用 0.080 mol·L⁻¹的六氢吡啶溶液作为成环介质。

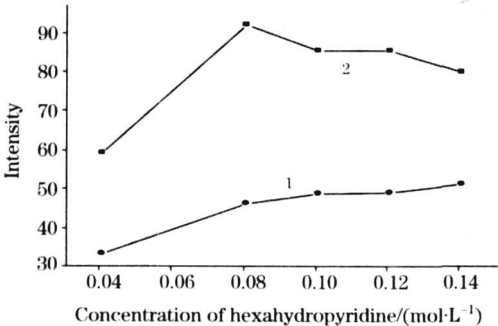


Fig 3 Effect of the concentration of hexahydropyridine

Spotted solution: MC: $4.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PVA-124: 0.40%;
Droplet volume: 0.50 μL ; A $4\times$ objective was used
1: SOR fluorescence intensity of blank solution;
2: SOR fluorescence intensity of MC

2.2.2 PVA-124 用量的影响

PVA-124 在分析化学中的应用很广泛, 它能够改变疏水性固载表面的性质, 是决定荧光物质成环好坏的一个重要因素。由图 4 可知, 当 PVA-124 的用量较小或较大时, 成环荧光强度都不是最大值, 但当 PVA-124 浓度为 0.40% 时, 荧光强度最大, 故实验选用 PVA-124 浓度为 0.40%。

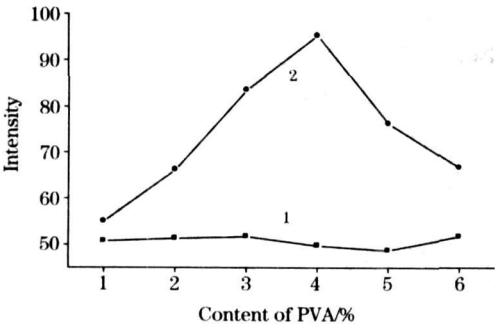


Fig 4 Effect of PVA-124 content

Spotted solution: MC: $4.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Hexahydropyridine: 0.080 mol·L⁻¹; Droplet volume: 0.50 μL ; A $4\times$ objective was used
1: SOR fluorescence intensity of blank solution; 2: SOR fluorescence intensity of MC

2.2.3 微波功率的影响

实验采用微波加热烘干液滴, 微波炉功率对成环有影响, 它决定液滴中溶剂的蒸发速率, 从而影响溶质向环线的迁移。试验选用微波高火档(100% 功率)烘干液滴, 加热 1.5 min。

2.3 共存物质的影响

当液滴体积为 0.50 μL , 米诺环素浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 试验了生化样本中通常存在的一些物质的影响(表 1)。从表 1 看出, 常见离子如 Na⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Ba²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺ 及淀粉、甘氨酸、尿素、CTMAB、SDS 和维生素 B₅ 等的允许量在 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上; 其他物质包括 K⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Bi³⁺, Cr³⁺、麦芽糖、蔗糖、硫脲、SDBS、钼酸铵的允许量在 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上; BSA 和 HSA 的最大允许浓度分别为 1.0 和 0.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Table 1 Influence of coexistent foreign substances

共存物质	浓度/(mol·L ⁻¹)	ΔI 变化/%
K ⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-5}	+ 7.6
Na ⁺ , Cl ⁻	1.9×10^{-4}	- 12
Mg ²⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-5}	+ 6.0
Cu ²⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-6}	+ 8.2
Ca ²⁺ , Cl ⁻	1.9×10^{-3}	- 7.9
Zn ²⁺ , Cl ⁻	1.1×10^{-5}	+ 9.7
Al ³⁺ , Cl ⁻	0.99×10^{-5}	+ 9.4
Co ²⁺ , NO ₃ ⁻	1.0×10^{-3}	- 10
Cd ²⁺ , NO ₃ ⁻	1.9×10^{-4}	- 9.2
Bi ³⁺ , NO ₃ ⁻	1.0×10^{-5}	+ 5.9
Ba ²⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-3}	+ 7.8
Cr ³⁺ , Cl ⁻	1.0×10^{-5}	+ 7.8
Fe ³⁺ , Cl ⁻	1.1×10^{-3}	- 8.5
Mn ²⁺ , SO ₄ ²⁻	1.0×10^{-4}	+ 9.7
麦芽糖	1.1×10^{-5}	+ 6.2
蔗糖	1.1×10^{-5}	+ 8.9
淀粉	$1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	+ 7.0
赖氨酸	1.0×10^{-6}	+ 7.0
甘氨酸	1.1×10^{-4}	+ 9.5
硫脲	1.0×10^{-5}	+ 8.3
CTMAB	1.0×10^{-3}	- 9.4
SDBS	1.0×10^{-5}	+ 7.0
SDS	1.1×10^{-4}	- 9.1
NH ₄ ⁺ , MOO ₄ ²⁻	1.0×10^{-5}	+ 6.2
BSA	$1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	+ 10
HSA	$1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	+ 7.7
尿素	1.2×10^{-3}	- 10
维生素 B ₅	0.99×10^{-4}	+ 6.3

1) CTMAB: 十六烷基三甲基溴化铵; SDBS: 十二烷基苯磺酸钠; SLS: 十二烷基硫酸钠; 2) Spotted solution: MC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Hexahydropyridine: 0.080 mol·L⁻¹; PVA-124, 0.40%; Droplet volume: 0.50 μL ; A $10\times$ objective was used

在伊利早餐奶的配方中, 每 100 g 牛奶中含有 Fe 1.0~2.0 mg, Zn 0.50~1.0 mg, 相当于牛奶中 Fe 和 Zn 的浓度分

别为 $1.8 \times 10^{-4} \sim 3.6 \times 10^{-4}$ 和 $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 当牛奶稀释 200 倍后, 其浓度分别为 $9.0 \times 10^{-7} \sim 1.8 \times 10^{-6}$ 和 $4.5 \times 10^{-7} \sim 9.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明牛奶中共存的 Fe 和 Zn 不干扰样品中米诺环素的检测。

2.4 线性范围、灵敏度及样品测定

根据 SOR 的最大荧光强度 $I_{\max}$ 与荧光物质的量 m 之间的定量关系^[17]

$$I_{\max} = \frac{K_2}{4\pi K_1(KV^{1/3} - \delta)} m = 8n$$

在实验确定的最佳成环条件下, 以不同的液滴体积按实验方法操作, 得到了 SOR 荧光强度与环上荧光物质的量的线性关系(表 2)。从表 2 数据可以看出, 方法的检测限与液滴体

积有关, 液滴体积越小, 检测限越低, 且线性范围也受液滴体积的影响。当液滴体积为 $0.30 \mu\text{L}$ 时, 线性范围为 $4.2 \times 10^{-12} \sim 1.8 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($1.4 \times 10^{-6} \sim 0.60 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 检测限为 $4.2 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($1.4 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

样品测定: 分别选用牛奶和胶囊样品, 按试验方法进行测定。结果表明(见表 3), 内蒙古乳都乳及其他品牌的牛奶中均未检出残留的米诺环素, 其加标回收率在 97.2% ~ 103%, RSD 小于 1.2。米诺环素胶囊中米诺环素含量的加标回收率为 99.4% ~ 102%, RSD 为 0.37%。以上分析表明, SOR 方法具有良好的可靠性和实用性。

Table 2 Analytical parameters of SOR method

液滴体积 / μL	线性范围 / $(\text{mol} \cdot \text{ring}^{-1})$	线性回归方程 / mol	相关系数 r	检测限 / $(\text{mol} \cdot \text{ring}^{-1})$
0.30	$4.2 \times 10^{-12} \sim 1.8 \times 10^{-11}$	$\Delta I_{\max} = 7.375 + 1.625 \times 10^{12} m$	0.999 4 ($n=6$)	4.2×10^{-13}
0.50	$6.9 \times 10^{-12} \sim 2.1 \times 10^{-11}$	$\Delta I_{\max} = 13.445 + 1.519 \times 10^{12} m$	0.993 0 ($n=5$)	6.9×10^{-13}
1.00	$7.5 \times 10^{-12} \sim 2.1 \times 10^{-11}$	$\Delta I_{\max} = 6.796 + 1.973 \times 10^{12} m$	0.994 2 ($n=7$)	7.5×10^{-13}

Spotted solution: Hexahydropyridine: $0.080 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PVA-124: 0.40%; A $10\times$ objective was used for $0.30 \mu\text{L}$ droplet volume and $4\times$ objective was used for the others). ($\Delta I_{\max} = I_{\max} - I_{\max}^0$, 其中 $I_{\max}$ 为样品的荧光强度, $I_{\max}^0$ 为空白溶液的荧光强度。

Table 3 Analysis results of the samples ($n=5$)

样品	测定值 / $(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	加标量 / $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收量 / $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 / $\%$	RSD / $\%$
伊利早餐奶	0	0.93, 1.85, 2.78, 3.70, 4.63	0.90, 1.80, 2.85, 3.67, 4.64	97.2~103	0.60
伊利纯牛奶	0	0.93, 1.85, 2.78, 3.70, 4.63	0.93, 1.87, 2.86, 3.74, 4.62	99.77~103	0.80
蒙牛纯牛奶	0	0.93, 1.85, 2.78, 3.70, 4.63	0.94, 1.89, 2.84, 3.79, 4.63	99.9~102	1.2
三元纯牛奶	0	0.93, 1.85, 2.78, 3.70, 4.63	0.93, 1.88, 2.77, 3.76, 4.69	99.8~101	0.31
光明纯牛奶	0	0.93, 1.85, 2.78, 3.70, 4.63	0.92, 1.91, 2.82, 3.70, 4.71	99.2~103	1.1
米诺环素胶囊	$49.97 \text{ mg} \cdot \text{粒}^{-1}$	0.93, 1.85, 2.78, 3.70, 4.63	0.93, 1.88, 2.79, 3.70, 4.61	99.4~102	0.37

Samples: $10 \mu\text{L}$; Hexahydropyridine: $0.080 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PVA-124: 0.40%; Droplet volume: $0.50 \mu\text{L}$; A $4\times$ objective was used

3 结 语

通过实验条件的优化, 建立了自组装环荧光显微成像技术测定米诺环素的新方法, 并实测了内蒙古乳都乳及其他品牌牛奶中残留米诺环素及米诺环素胶囊中米诺环素含量, 回收率分别在 97.2% ~ 103% 和 99.4% ~ 102%。方法可信, 为食品中残留抗生素的检测和药物污染物分析提供一种新方

法。它具有背景干扰小、耗样量少、简单、快速及对环境无污染等优点。对于名牌企业系统动态研究不同地区乳品中抗生素的来源、残留情况、乳品行业的管理、监督及规范牛奶市场、保障饮用牛奶的安全等具有重要的现实意义和更广泛的应用前景。可以预见, 该技术将为内蒙古地方优势资源产品——乳品中抗生素类药物残留量的定量检测提供可信的实验数据和理论依据。

参 考 文 献

- [1] LU Zhaoyun(卢兆芸). China Dairy Industry(中国乳品工业), 2006, 34(11): 43.
- [2] WANG Ran, LIU Tie zheng, WANG Tian(王冉, 刘铁铮, 王恬). Acta Ecologica Sinica(生态学报), 2006, 26(1): 265.
- [3] NING Peng(宁鹏). Livestock and Poultry Industry(畜禽业), 2004, (3): 53.
- [4] DU Yunnan, SUN Guoqing, MIAO Li, et al(杜雅楠, 孙国庆, 苗丽, 等). China Dairy Cattle(中国奶牛), 2005, (2): 52.
- [5] Okeeffe M, Kennedy O. Journal of Food Safety, 1998, 18(4): 297.
- [6] Furusawa N. Talanta, 2003, 59: 155.
- [7] Ouderkirk L A J. Assoc. off Anal. Chem., 1977, 60: 1116.
- [8] Marchetti M, Schwaiger I, Schmid E R, Fresenius J. Anal. Chem., 2001, 371(1): 64.

- [9] ZHOU Jing, DU Li ming, CHEN Cai ping(周 静, 杜黎明, 陈彩萍), Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(6): 717.
- [10] ZHAO Gui zhi, LI Hua kan(赵桂芝, 李华侃). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(1): 157.
- [11] LE Tao, SHE Yong xin, LIU Jiang ying, et al(乐 涛, 余永新, 柳江英, 等). Food Science(食品科学), 2008, 29(1): 270.
- [12] YING Yong fei, CHEN Hui hua, WU Ping gu(应永飞, 陈慧华, 吴平谷). Journal of Analytical Science(分析科学学报), 2008, 24(3): 359.
- [13] Fan Mei kun, Huang Chen zhi, Li Yuan fang. Anal. Chim. Acta, 2002, 453: 97.
- [14] Liu Ying, Huang Cheng zhi, Li Yuan fang. Anal. Chem., 2002, 74: 5564.
- [15] Chen Yu chun, Huang Cheng zhi. Talanta, 2003, 59: 681.
- [16] Huang Cheng zhi, Liu Ying, Li Yuan fang. J. Pharm. Biomed. Anal., 2004, 34: 103.
- [17] Liu Ying, Li Yuan fang, Chen Yu chun, et al. Rev. Anal. Chem., 2004, 23: 75.
- [18] Pharmacopoeia Committee of Ministry of Health, The People's Republic of China(中华人民共和国药典编委会), The Pharmacopoeia of People's Republic of China(Part II)(中华人民共和国药典二部). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005. 508.

Application of Fluorescence Microscopic Imaging Technique with Self Ordered Ring to Residues Detection of Antibiotics

LIU Ying^{1,2}, FENG Jir chao¹, LI Dan¹, CUI Jian³, XU Si fan³, SHEN Gang yi³

1. College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. College of Chemistry and Environmental Science, Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022, China

3. Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract Fluorescence microscopic self ordered ring (SOR) technique with microwave heating is proposed for minocycline based on the capillary flow of solvent on the surface of hydrophobic glass slide and applied to residues detection of the antibiotics in milks of Inner Mongolia. In the reaction medium of hexahydropyridine containing polyvinyl alcohol 124 (PVA-124), a SOR of minocycline with the outer diameter of 1.54 mm and the ring belt width of 22.6 μm can be formed. When a 0.30 μL droplet of minocycline mixture was spotted on the solid surface, minocycline in the range of 4.2×10^{-12} – $1.8 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ (1.4×10^{-6} – $0.60 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) can be detected, the maximum fluorescence intensity was found to be proportional to the minocycline concentration, and the limit of detection can reach $4.2 \times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{ring}^{-1}$ ($1.4 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) with three times of signal to noise ratio. With the present method, the contents of minocycline in milk samples of Inner Mongolia and minocycline hydrochloride capsule sample were satisfactorily determined with recoveries of 97.2%–103% and 99.4%–102%, respectively, and RSD lower than 1.2%, correspondingly. Therefore, a highly sensitive and selective analysis method for detecting content of trace drug contaminations was established. The method provided theory basis to quantificational analysis of the residues of the antibiotics in milks which was Inner Mongolia's preponderant resource products. It has important realistic meaning and broad application prospect.

Keywords Minocycline; Milks of Inner Mongolia; Self ordered ring(SOR) technique; Fluorescence microscopic analysis

(Received May 22, 2008; accepted Aug. 26, 2008)