

一种测定四环素类抗生素的光谱新方法

高红, 赵一兵, 郭祥群*

厦门大学化学化工学院化学系, 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005

摘要 四环素类抗生素属于弱荧光物质, 不能在荧光计上直接检测, 一般需要经过衍生反应。为了能在荧光计上实现了四环素类抗生素的直接检测, 必须采用新的光谱技术, 使荧光计达到了一机两用的功能。实验结果表明四环素类抗生素的线性范围均为 $0.10 \sim 9.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 四环素、土霉素、金霉素和多西环素的检测限分别为 0.065 , 0.067 , 0.068 和 $0.070 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词 四环素; 钙黄绿素; 分光光度法

中图分类号 O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2006)03-0488-03

引言

四环素类抗生素是由生物合成的广谱抗菌素, 被广泛应用于在预防、控制和治疗水产动、植物的病虫害等方面。由于它们的广泛使用而造成的食品中抗生素残留问题越来越受到人们的关注。因此必须建立起灵敏、快速、准确的四环素类抗生素的分析检测方法。

关于四环素类抗生素的测定方法已有许多报道, 如微生物法^[1]、分光光度法^[2]、化学发光法^[3]、电化学法^[4]和荧光法^[5]等。药典普遍采用微生物法, 该法能够反映生物效价, 但操作烦琐, 误差较大。分光光度法方法简便、分析精度高, 但灵敏度不高, 其他方法又不够简便。荧光法灵敏度高, 但四环素类抗生素属于弱荧光物质, 不能在荧光计上直接检测。作者根据一种新的光谱技术^[6]提出一种新的四环素类抗生素测定方法, 运用该技术在荧光计上实现了四环素类抗生素的直接检测。另外, 由于实验过程采用的是流动注射式的微量进样, 可以展望将该技术与毛细管电泳以及高效液相色谱等技术联用。建立起的四环素类抗生素的测定方法的主要特点就是操作简便、灵敏度高、检测限低并且具有良好的应用前景。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Shimadzu RF 5301 荧光分光光度计, Beckman DU 7400 紫外分光光度计。

四环素、土霉素、金霉素和多西环素对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 盐酸(分析纯), 钙黄绿素(分析纯), 荧光素钠(分析纯)。四环素、土霉素、金霉素和多西环素标准液: 精密称取四环素、土霉素、金霉素和多西环素对照品适量, 用适量甲醇溶解并用水稀释成 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 摇匀, 即可。放入 4°C 的冰箱中保存, 可使用一周。

1.2 实验原理和方法^[6]

根据荧光分析原理和分光光度分析的原理可以推导证明: 如果在荧光液池放置标准荧光物质, 在激发或发射光路中放置非荧光或弱荧光性的吸光物质(待测物质), 当荧光物质和待测物质均满足 $\epsilon b c \leq 0.05$ 的条件时, 测量荧光强度或扫描荧光光谱, 荧光强度的变化值与待测物质的浓度呈线性关系; 如果将激发光的强度进行归一化处理, 所得的荧光激发或发射光谱与待测物质的紫外-可见吸收光谱具有同样的光谱特征, 但其信号强度却大约是常规分光光度测量的 $10^2 \sim 10^3$ 倍。

使用本实验组自行研制的荧光分光光度计紫外-可见吸收附件, 采用激发光路, 用钙黄绿素作标准荧光物质, 于 $270/514 \text{ nm}$ 处测信号值 S 。整个实验过程的进样方式均为流动注射进样, 流通池的体积约为 $70 \mu\text{L}$ 。

2 结果和讨论

2.1 pH 的选择

四环素类抗生素的摩尔吸光系数随 pH 的不同而有所变化(见图 1)。当 pH 小于 5.5 时, 随着 pH 的减少, 四环素类抗生素的摩尔吸光系数逐渐增大, 当 pH 达到 1.2 时, 达到

收稿日期: 2005-05-08, 修订日期: 2005-08-26

基金项目: 福建省自然科学基金(D0310005)资助项目

作者简介: 高红, 女, 1981年生, 厦门大学化学化工学院化学系硕士研究生 * 通讯联系人

平台。因此实验选择 pH 1.2。

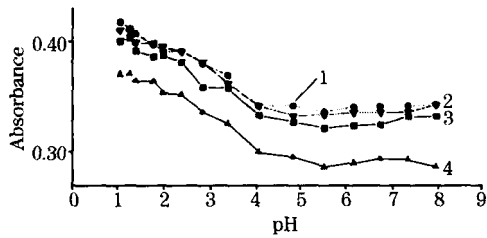


Fig 1 Effect of pH on tetracyclines absorbance

1, Oxytetracycline; 2, Doxycycline;
3, Tetracycline; 4, Chlortetracycline

2.2 激发波长和发射波长的选择

从本法的原理可看出：在测定条件相同的情况下，本法的灵敏度只与标准荧光物质的荧光强度有关，而与它们的种类无关。图 2 和图 3 分别是采用钙黄绿素和荧光素钠作标准荧光物质测定四环素时，灵敏度与荧光强度的关系曲线。从中可看出本法的灵敏度确实与标准荧光物质的种类无关，实验选用钙黄绿素作为标准荧光物质。

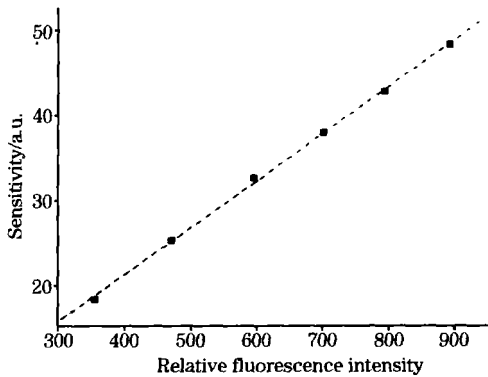


Fig 2 Effect of calcein fluorescence intensity on sensitivity

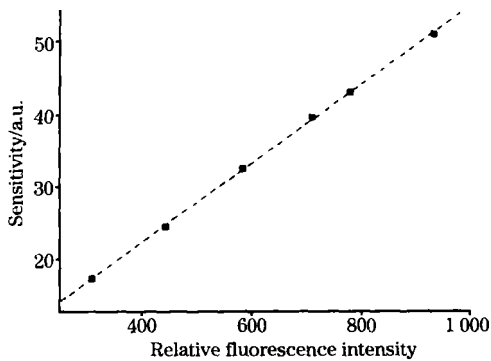


Fig 3 Effect of fluorescein sodium fluorescence intensity on sensitivity

当采用激发光路时，光先照射到待测物质，被其吸收一部分后照射到标准荧光物质，发出荧光，由检测器检测，此时标准荧光物质的激发光谱必须与待测物质的吸收光谱有重叠。实验考察了钙黄绿素的激发和发射光谱(见图 4)以及四环素等的吸收光谱(见图 5)，因此实验选择 $\lambda_{ex} = 270 \text{ nm}$, λ_{em}

$= 514 \text{ nm}$ 。

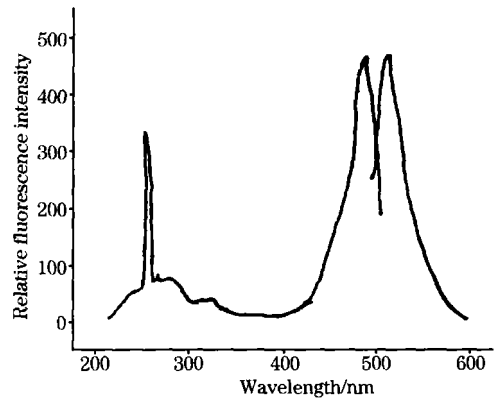


Fig 4 The excitation spectrum and emission spectrum of calcein

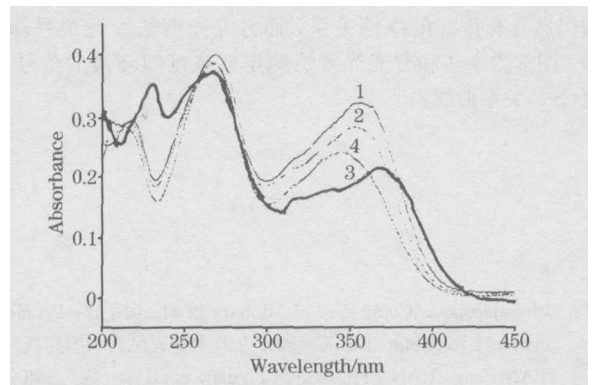


Fig 5 Absorption spectra of tetracyclines

1, Tetracycline; 2, Oxytetracycline;
3, Chlortetracycline; 4, Doxycycline

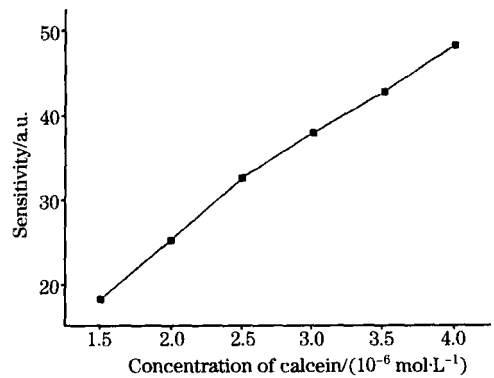


Fig 6 Effect of calcein concentration on sensitivity

2.3 钙黄绿素浓度的选择

由于本法的灵敏度与标准荧光物质的荧光强度 (F_0) 成正比，而标准荧光物质浓度与 F_0 也成正比，因此随着标准荧光物质浓度的提高，灵敏度会增大。图 6 是测定四环素时，灵敏度随钙黄绿素浓度的变化曲线。实验选择钙黄绿素浓度为 $4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 线性范围和检测限

在上述条件下进行四环素、土霉素、金霉素和多西环素的定量测定, 实验结果见表 1。

Table 1 Determination results of tetracyclines

抗生素	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性相关系数	检测限 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
四环素	0.10~9.00	0.995	0.065
土霉素	0.10~9.00	0.996	0.067
金霉素	0.10~9.00	0.996	0.068
多西环素	0.10~9.00	0.996	0.070

2.5 本法与分光光度法的比较

从本法和分光光度法的定量公式可看出: 本法的灵敏度要比分光光度法高出 2.303 F_0 倍^[6]。分别用两种方法对四环素类物质进行测定, 实验结果表明两种方法的灵敏度之比基本能与理论相符, 并且在测定低浓度四环素类物质时, 本法仍然具有良好的线性关系, 而分光光度法线性关系却不好。图 7 为本法和分光光度法测定低浓度四环素的信号浓度(S-c)关系曲线。

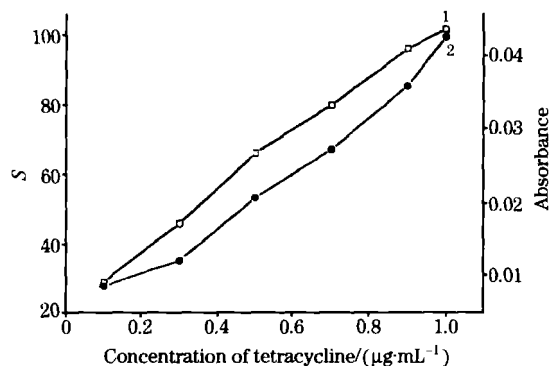


Fig 7 The working curves of this new method and spectrophotometry

1, This new method; 2, Spectrophotometry

3 结论

通过实验建立了一种测定四环素、土霉素、金霉素和多西环素的光谱新方法, 实现了四环素等弱荧光物质在荧光光度计上的直接检测, 且灵敏度可以达到传统荧光法的灵敏度, 使荧光光度计达到了一机两用的功能。

参 考 文 献

- [1] 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), 1995.
- [2] TAN Feng, LANG Huiyun, LI Yuan, et al(谭峰, 郎惠云, 李媛, 等). Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析实验室), 2000, 19(6): 33.
- [3] Lau C, Lu J Z, Kai M. Anal. Chim. Acta, 2004, 503: 235.
- [4] Cristina M C M Couto, Jose L F C Lima, et al. J. Pharm. Biomed. Anal., 1998, 18: 527.
- [5] ZHA Jiar peng, LIN Ying, YANG Xing-hui, HOU Hai ni, WEI Tie jun, CHEN Xing li(查建蓬, 林颖, 杨星惠, 侯海妮, 魏铁军, 陈兴丽). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(3): 430.
- [6] ZHAO Yirbing, WANG Dong yuan, GUO Xiang qun, et al. Science in China(Series B), 1998, 41(3): 239.

Determination of Tetracyclines by a New Spectrum Technique

GAO Hong, ZHAO Yirbing, GUO Xiang qun*

Department of Chemistry and the Key Laboratory of Analytical Sciences of the Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract Tetracyclines are light fluorescence substances, which cannot be detected directly by fluorometry. Herein a new spectrum method was proposed to detect tetracyclines directly by fluorometry. Under optimal conditions, the calibration graph is linear over the range 0.10~9.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for tetracyclines, and the detection limits of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and doxycycline are 0.065, 0.067, 0.068 and 0.070 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively.

Keywords Tetracycline; Calcein; Spectrophotometry

(Received May 8, 2005; accepted Aug. 26, 2005)

* Corresponding author