

实验技术与方法

改良分光光度法测定鸡蛋中四环素

刘月英,郎杰,李琨

(河北经贸大学生物科学与工程学院,河北 石家庄 050061)

摘要:目的 对鸡蛋中的四环素进行测定,以保证食品安全。方法 本试验对分光光度法做了改良,用合适的提取剂提取6个样品中四环素后进行富集,再用分光光度法测定,可提高鸡蛋四环素的检测效果。结果 6个样品的四环素平均含量分别为237.2、183.1、148.0、231.8、219.4、252.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率均在98%以上。结论 本方法操作简便,设备简单,较适合基层检测部门、养殖企业及没有高效液相色谱设备的单位检测鸡蛋中的四环素。

关键词:鸡蛋;四环素残留;分光光度法;改良;抗生素;兽药残留

中图分类号:R155;TS201.6 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)06-0639-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.06.008

Determination of tetracycline in eggs by improved spectrophotometry

LIU Yue-ying, LANG Jie, LI Kun

(College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Hebei Shijiazhuang 050061, China)

Abstract: Objective Tetracycline in eggs need to be detected to ensure food safety. **Methods** Spectrophotometry was improved in the experiment. Tetracycline from 6 different samples was extracted respectively with suitable extraction reagent and enriched, and then determined by spectrophotometry. **Results** The average contents of tetracycline in the 6 samples were 237.2, 183.1, 148.0, 231.8, 219.4 and 252.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively and the recovery was above 98%. **Conclusion** The method was easy to operate and the equipment was simple. It is suitable for detection of tetracycline in eggs in local inspection departments, poultry farms and units without high performance liquid chromatography.

Key words: Eggs; tetracycline residues; spectrophotometry; improvement; antibiotic; veterinary drug residues

鸡蛋药物残留主要包含合成抗菌药物、抗生素、抗球虫药物、激素及农药等问题^[1]。家禽养殖中四环素是广泛使用的兽药及饲料添加剂,如果残留量过多会通过食品对人体造成伤害。测定四环素残留的方法有微生物抑制法、分光光度法、色谱法、免疫法、化学发光法、毛细管电泳法,以及不同方法的联用技术,如液相色谱-质谱联用(LC-MS)等^[2-4]。目前应用较多的是高效液相色谱法,特点是灵敏度较高、测定速度快,能同时测定几种残留物。

高效液相色谱法虽有优越性但设备比较昂贵。而生物法、免疫法、化学发光法、毛细管电泳法测定过程较为繁琐,目前应用不多。本试验对分光光度法进行一些改良,以提高其测定鸡蛋中四环素残留的检测水平,为一些不具备高效液相设备的养殖企

业或基层检测单位检测四环素残留提供新的方案。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

1份鸡蛋样品为市售,5份鸡蛋样品采自石家庄市周县某养鸡场。

1.1.2 主要仪器与试剂

754型紫外可见分光光度计(上海光学仪器厂)、TG16-WS离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)。

盐酸四环素标准品(优级纯,美国Sigma),甲醇等其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 四环素的提取与富集

禽产品(鸡蛋)样品中四环素残留量一般低于直接用普通分光光度法的检测水平,需对样品中四环素进行富集。选择对蛋白质沉淀作用较强,同时对四环素溶解性较好的溶剂对样品中蛋白沉淀后,浓缩提取液达到能够测定的含量水平后可用分光光度法测定。

收稿日期:2015-08-08

作者简介:刘月英 女 副教授 研究方向为食品科学教学

E-mail:liuyueying07@126.com

通讯作者:郎杰 男 副教授 研究方向为食品科学教学

E-mail:langjie@aliyun.com

取蛋清 5 ml 和四环素标准品 5 mg, 分别加入甲醇、丙酮、乙二醇、甲醇与丙酮等量混合液 10 ml。观察蛋白沉淀效果并将蛋白沉淀干燥称重比较沉淀效果; 同时观察四环素的溶解情况。根据蛋白沉淀效果及对四环素溶解情况选择提取试剂。

取蛋清 500 ml 加入 1 000 ml 所筛选的提取试剂, 匀质后于冰箱中静置 3 h, 过滤除去沉淀后, 在通风橱中减压蒸发浓缩至 50 ml, 用于测定四环素残留量。

1.2.2 四环素的测定

四环素的测定采用分光光度法^[5]。将盐酸四环素用 0.01 mol/L HCl 配成 100 μg/ml 的标准液, 再稀释成 50、100、150、200、250、300、350、400 μg/L 的不同浓度溶液, 分别取 2.0 ml 于 25 ml 比色管中, 加入 1.0 ml 0.2% TritonX-100 溶液, 2.0 ml 0.05% CuCl₂ 溶液, 2.0 ml 0.25 mol/L NaOH, 用重蒸水稀释至刻度, 摇匀。静置 5 min 后于 400 nm 波长处检测, 以试剂空白液作参比, 测量吸光度制作标准曲线, 样品溶液按此色法进行测定。

1.2.3 四环素回收率的测定

在每次对样品溶液测定时, 同时向该样品的另外 3 组溶液中分别加入 10、20、40 μg/ml 的盐酸四环素标准溶液各 0.25 ml, 按 1.2.2 部分比色测定四环素含量, 然后与 1.2.2 所测得的样品四环素含量相比较计算回收率, 以判断测定方法的可靠性。回收率的计算参照公式(1)。

回收率(%) = [样品加标后测得的四环素含量

(μg/kg)]/[样品四环素含量(μg/kg) + 样品中加入的四环素含量(μg/kg)] (1)

1.2.4 蛋清蛋白沉淀量的测定

取蛋清 5 ml 于已准确称取质量的离心管中, 加入 10 ml 不同的提取试剂, 匀质后冰箱中静置 3 h, 4 317 × g 离心 20 min, 弃去上清液, 并用滤纸吸干离心管壁的液滴, 称量离心管和沉淀的质量。

$$10 \text{ g 蛋清蛋白沉淀量(g)} = \frac{m_1 - m_0}{5 \times 1.05} \times 10 \quad (2)$$

式中: m_0 : 离心管的质量, g; m_1 : 离心管和沉淀的质量, g。

1.3 数据处理

每次测定均重复 6 次, 并对测定数据用 Excel 进行统计分析, 各组均数以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。同时测量蛋清的质量密度为 1.05 g/ml, 四环素测定结果转换为 μg/kg 蛋清。

2 结果与分析

2.1 四环素测定的标准曲线

四环素在 0 ~ 400 μg/L 有较好的线性关系, 方程为 $y = 0.00002x + 0.0001$, 相关系数为 0.986 8。

2.2 不同试剂对鸡蛋可溶性蛋白的沉淀及溶解四环素效果对比^[6]

盐酸四环素易溶于水, 在不同有机溶剂中溶解性差别较大。选择甲醇、乙二醇及对蛋白沉淀作用较强的丙酮沉淀蛋清蛋白及比较溶解四环素效果, 结果见表 1 ~ 6。

表 1 不同试剂对样品 1 蛋清蛋白的沉淀及对四环素的溶解效果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects on protein precipitation of eggs white and tetracycline dissolution of sample 1 with different reagents

沉淀试剂	沉淀蛋白效果 (蛋清 5 ml; 沉淀剂 10 ml)	蛋白沉淀量 /g	有机溶剂溶解度 ^[6] /(mg/ml)	四环素溶解效果 (0.5 mg/ml)
甲醇	++	1.122 ± 0.024	20.0	---
丙酮	+++	1.704 ± 0.021	0.75	--
乙二醇	+	0.904 ± 0.023	17.75	---
甲醇-丙酮(1:1, V/V)	++	1.401 ± 0.021	—	---
甲醇-丙酮(2:1, V/V)	++	1.369 ± 0.023	—	---
甲醇-丙酮(3:1, V/V)	++	1.198 ± 0.023	—	---

注: +、++、+++ 分别表示蛋白凝聚但沉淀不明显、凝聚并沉淀明显、凝聚并全部沉淀; --、--- 分别表示四环素溶解后有沉淀析出、完全溶解无沉淀析出; —表示无数值

表 2 不同试剂对样品 2 蛋清蛋白的沉淀及对四环素的溶解效果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects on protein precipitation of eggs white and tetracycline dissolution of sample 2 with different reagents

沉淀试剂	沉淀蛋白效果 (蛋清 5 ml; 沉淀剂 10 ml)	蛋白沉淀量 /g	有机溶剂溶解度 ^[6] /(mg/ml)	四环素溶解效果 (0.5 mg/ml)
甲醇	++	1.124 ± 0.020	20.0	---
丙酮	+++	1.342 ± 0.024	0.75	--
乙二醇	+	0.889 ± 0.021	17.75	---
甲醇-丙酮(1:1, V/V)	++	1.404 ± 0.023	—	---
甲醇-丙酮(2:1, V/V)	++	1.351 ± 0.022	—	---
甲醇-丙酮(3:1, V/V)	++	1.161 ± 0.020	—	---

注: +、++、+++ 分别表示蛋白凝聚但沉淀不明显、凝聚并沉淀明显、凝聚并全部沉淀; --、--- 分别表示四环素溶解后有沉淀析出、完全溶解无沉淀析出; —表示无数值

表3 不同试剂对样品3蛋清蛋白的沉淀及对四环素的溶解效果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects on protein precipitation of eggs white and tetracycline dissolution of sample 3 with different reagents

沉淀试剂	沉淀蛋白效果 (蛋清 5 ml; 沉淀剂 10 ml)	蛋白沉淀量 /g	有机溶剂溶解度 ^[6] /(mg/ml)	四环素溶解效果 (0.5 mg/ml)
甲醇	++	1.111 ± 0.020	20.0	---
丙酮	+++	1.349 ± 0.026	0.75	--
乙二醇	+	0.898 ± 0.022	17.75	---
甲醇-丙酮(1:1, V/V)	++	1.395 ± 0.026	—	---
甲醇-丙酮(2:1, V/V)	++	1.361 ± 0.023	—	---
甲醇-丙酮(3:1, V/V)	++	1.102 ± 0.022	—	---

注: +、++、+++ 分别表示蛋白凝聚但沉淀不明显、凝聚并沉淀明显、凝聚并全部沉淀; --、--- 分别表示四环素溶解后有沉淀析出、完全溶解无沉淀析出; —表示无数值

表4 不同试剂对样品4蛋清蛋白的沉淀及对四环素的溶解效果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects on protein precipitation of eggs white and tetracycline dissolution of sample 4 with different reagents

沉淀试剂	沉淀蛋白效果 (蛋清 5 ml; 沉淀剂 10 ml)	蛋白沉淀量 /g	有机溶剂溶解度 ^[6] /(mg/ml)	四环素溶解效果 (0.5 mg/ml)
甲醇	++	1.112 ± 0.024	20.0	---
丙酮	+++	1.305 ± 0.023	0.75	--
乙二醇	+	0.901 ± 0.021	17.75	---
甲醇-丙酮(1:1, V/V)	++	1.428 ± 0.021	—	---
甲醇-丙酮(2:1, V/V)	++	1.411 ± 0.020	—	---
甲醇-丙酮(3:1, V/V)	++	1.200 ± 0.021	—	---

注: +、++、+++ 分别表示蛋白凝聚但沉淀不明显、凝聚并沉淀明显、凝聚并全部沉淀; --、--- 分别表示四环素溶解后有沉淀析出、完全溶解无沉淀析出; —表示无数值

表5 不同试剂对样品5蛋清蛋白的沉淀及对四环素的溶解效果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effects on protein precipitation of eggs white and tetracycline dissolution of sample 5 with different reagents

沉淀试剂	沉淀蛋白效果 (蛋清 5 ml; 沉淀剂 10 ml)	蛋白沉淀量 /g	有机溶剂溶解度 ^[6] /(mg/ml)	四环素溶解效果 (0.5 mg/ml)
甲醇	++	1.139 ± 0.020	20.0	---
丙酮	+++	1.341 ± 0.021	0.75	--
乙二醇	+	0.913 ± 0.026	17.75	---
甲醇-丙酮(1:1, V/V)	++	1.410 ± 0.020	—	---
甲醇-丙酮(2:1, V/V)	++	1.389 ± 0.024	—	---
甲醇-丙酮(3:1, V/V)	++	1.182 ± 0.024	—	---

注: +、++、+++ 分别表示蛋白凝聚但沉淀不明显、凝聚并沉淀明显、凝聚并全部沉淀; --、--- 分别表示四环素溶解后有沉淀析出、完全溶解无沉淀析出; —表示无数值

表6 不同试剂对样品6蛋清蛋白的沉淀及对四环素的溶解效果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effects on protein precipitation of eggs white and tetracycline dissolution of sample 6 with different reagents

沉淀试剂	沉淀蛋白效果 (蛋清 5 ml; 沉淀剂 10 ml)	蛋白沉淀量 /g	有机溶剂溶解度 ^[6] /(mg/ml)	四环素溶解效果 (0.5 mg/ml)
甲醇	++	1.105 ± 0.020	20.0	---
丙酮	+++	1.336 ± 0.022	0.75	--
乙二醇	+	0.906 ± 0.026	17.75	---
甲醇-丙酮(1:1, V/V)	++	1.387 ± 0.026	—	---
甲醇-丙酮(2:1, V/V)	++	1.382 ± 0.026	—	---
甲醇-丙酮(3:1, V/V)	++	1.168 ± 0.024	—	---

注: +、++、+++ 分别表示蛋白凝聚但沉淀不明显、凝聚并沉淀明显、凝聚并全部沉淀; --、--- 分别表示四环素溶解后有沉淀析出、完全溶解无沉淀析出; —表示无数值

从表1~6看出, 甲醇、乙二醇对四环素的溶解度较大, 溶解四环素效果较好, 但沉淀蛋白效果较丙酮差。甲醇与丙酮混液对四环素溶解性与甲醇没有明显差别, 但沉淀蛋白效果好于甲醇, 其中甲醇-丙酮(1:1, V/V)和甲醇-丙酮(2:1, V/V)的沉淀蛋白质的效果差异不明显, 所以选用甲醇-丙酮(1:1, V/V)作为后续的提取液。

2.3 鸡蛋残留四环素测定及四环素回收率检验

鸡蛋残留四环素含量测定结果及数据处理见

表7。由表7看出, 测定的6个蛋清样品中四环素的平均残留量分别为237.2、183.1、148.0、231.8、219.4、252.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 与国家标准200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相比, 本次试验的6个样品中样品1、样品4、样品5和样品6的四环素含量略高于国家标准^[7]。

在通过向测定样品中加入不同量的标准四环素, 表8的测定结果表明回收率达到平均98%以上, 基本符合测定要求。

表7 鸡蛋四环素含量测定结果($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 7 Results of tetracycline content in eggs

样品编号	首次	重复1	重复2	重复3	重复4	重复5	平均含量
1	236.2	241.0	246.7	220.0	225.7	253.3	237.2 ± 12.6
2	185.4	187.8	195.0	170.7	173.6	198.0	183.1 ± 9.5
3	148.6	153.1	157.5	133.3	135.1	160.4	148.0 ± 11.4
4	232.2	236.8	241.1	217.0	219.3	244.6	231.8 ± 11.4
5	220.2	223.7	227.5	205.6	207.3	232.1	219.4 ± 10.8
6	253.7	255.2	260.5	239.7	241.6	263.3	252.3 ± 9.7

表8 鸡蛋四环素回收率测定结果($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 8 Results of tetracycline recovery rates of eggs

样品编号	加标量 ¹	首次	重复1	重复2	重复3	重复4	重复5	平均含量
1	100	98.1	99.5	98.3	98.2	98.5	98.3	98.5 ± 0.5
	200	98.6	98.1	100.1	98.8	99.3	98.6	98.9 ± 0.7
	400	98.6	98.8	100.3	98.3	98.1	98.8	98.8 ± 0.8
2	100	98.7	98.8	99.6	98.1	98.3	99.3	98.8 ± 0.6
	200	98.6	98.3	99.5	99.2	99.5	98.5	98.9 ± 0.5
	400	98.2	98.6	99.3	98.5	98.6	99.2	98.7 ± 0.4
3	100	99.7	99.2	99.6	98.5	98.0	99.3	99.1 ± 0.7
	200	99.6	99.3	98.8	100.1	99.2	98.7	99.3 ± 0.5
	400	99.2	99.6	99.0	98.7	98.6	99.8	99.2 ± 0.5
4	100	99.5	99.4	99.1	98.8	98.5	97.8	98.9 ± 0.6
	200	99.3	99.5	98.8	101.3	98.8	99.1	99.5 ± 0.9
	400	99.7	99.3	98.9	100.8	98.3	98.2	99.2 ± 1.0
5	100	98.5	99.6	99.3	99.0	98.8	97.5	98.8 ± 0.7
	200	99.6	99.3	98.6	100.7	98.5	99.6	99.4 ± 0.8
	400	98.4	99.6	99.2	101.5	99.3	98.7	99.5 ± 1.1
6	100	97.9	98.5	99.7	99.9	99.8	99.5	99.2 ± 0.8
	200	98.6	97.8	98.8	100.2	99.5	98.9	99.0 ± 0.8
	400	98.2	98.6	99.8	102.0	99.7	98.8	99.5 ± 1.4

注:加标量的单位为 $\mu\text{g}/\text{L}$

3 小结

丙酮的介电常数仅为甲醇的64.8%,在对鸡蛋蛋白的沉淀试剂加入丙酮效果明显好于单用甲醇,虽丙酮对四环素的溶解度小于甲醇,但二者合用对提取四环素基本没有影响。同时丙酮对人体毒性小,用作试验试剂更安全。

甲醇和丙酮(1:1, V/V)混合液可作为鸡蛋蛋清中较好的蛋白质沉淀剂和四环素提取剂,改良后的分光光度法对四环素残留的检测,回收率可达到98%以上,设备常见,操作简便,特别是对基层检测部门和养殖企业具有较高的使用价值^[8]。

参考文献

- [1] 李海燕,侯亚莉,郭平,等. 鸡蛋药物残留研究进展[J]. 动物医学进展,2008,29(7):92-96.
- [2] 翟云忠,吴建敏,徐俊,等. 鸡蛋中抗生素残留微生物法快速检测的研究[J]. 现代食品科技,2008,24(8):839-841.
- [3] 邢晓平. 毛细管电泳-电化学检测法测定鸡蛋中残留四环素类抗生素[J]. 食品科学,2007,28(10):470-473.
- [4] 宓晓黎. 动物源性食品中四环素残留的检测技术研究进展[J]. 食品研究与开发,2004,25(5):137-140.
- [5] 章鹏飞,朱庆仁,张玉洲,等. 新分光光度法测定盐酸四环素的研究[J]. 淮北煤师院学报,1994,15(1):33-38.
- [6] 顾觉奋. 抗生素[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001:224-225.
- [7] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量(农业部第235号公告)[Z]. 2002-12-24.
- [8] 刘涛,黄保华,雷秋霞,等. 影响禽蛋蛋黄着色的影响因素[J]. 家禽科学,2010(9):44-46.