

水产品中红霉素残留测定过程中 衍生反应条件的优化研究

惠芸华, 于欢, 于慧娟*

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部水产品质量监督检验测试中心, 上海 200090)

摘要: **目的** 对水产品中红霉素残留量测定过程中衍生反应的条件进行探讨和研究。**方法** 为了使衍生反应达到最佳化, 对影响反应的温度、时间、FMOC-CL 的量、反应体系进行了研究。**结果** 红霉素的最佳衍生条件是反应温度 45 °C、反应时间 1 h、50 μg FMOC-CL、反应体系 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=2:1$ 。**结论** 该衍生反应条件优化得比较成功, 适用于所建立的实验方法。

关键词: 红霉素; 衍生反应; 优化

Study on optimization of derivatization reaction conditions during determination of erythromycin residues

HUI Yun-Hua, YU Huan, YU Hui-Juan*

(Ministry of Agriculture Supervision and Testing Center for Aquatic Products, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shanghai 200090, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the conditions of derivatization reaction during the process of erythromycin determination in aquatic products. **Methods** The reaction temperature, reaction time, FMOC-CL quantity and reaction system were studied to optimize the derivatization reaction. **Results** The results showed that the best derivatization reaction conditions of erythromycin were as follows: the derivatization reaction temperature was 45 °C, the reaction time was 1 h, and the amount of FMOC-CL was 50 μg under the reaction system of $V_{\text{acetonitrile}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=2:1$. **Conclusion** The derivatization reaction condition was suitable for the established experiment.

KEY WORDS: erythromycin; derivatization reaction; optimization

红霉素(erythromycin)属于大环内酯类抗生素, 对革兰氏阳性菌尤其敏感^[1-2], 在水产养殖方面主要用于防治烂鳃病、白皮病、白头白嘴病等, 鳙(*Aristichys nobilis*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)出血病症等^[3]。由于其在生物体内的代谢时间长, 很容易产生残留, 从而对人体产生毒副作用^[4-9]。因此,

建立一种有效的检测方法势在必行, 通过一系列的试验和探索, 最终建立了一种高压液相色谱法^[10]测定水产品中红霉素的残留量, 在建立该检测方法的过程中, 因为需要采用荧光检测器对红霉素进行检测, 红霉素本身不含荧光基团, 这就需要红霉素对红霉素进行衍生化, 使其具有荧光性。衍生试剂 9-芴代

*通讯作者: 于慧娟, 研究员, 主要研究方向为水产品质量安全管理、水产品中渔药残留及生物毒素检测技术的研究和渔药在生物体中富集及代谢规律。E-mail: yuhuijuan607@sohu.com

*Corresponding author: YU Hui-Juan, Researcher, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, No.300, Jungong Road, Shanghai 200090, China. E-mail:yuhuijuan607@sohu.com

甲氧苯酰氯(FMOC-CL)不仅用于氨基的衍生,而且还可用于羟基的衍生。

据资料报道^[11]FMOC-CL 同羟基反应生成荧光酯,因而具有荧光性。红霉素的衍生就是利用分子中的羟基同 FMOC-CL 反应生成荧光衍生物的性质来实现的,衍生反应如图 1 所示。

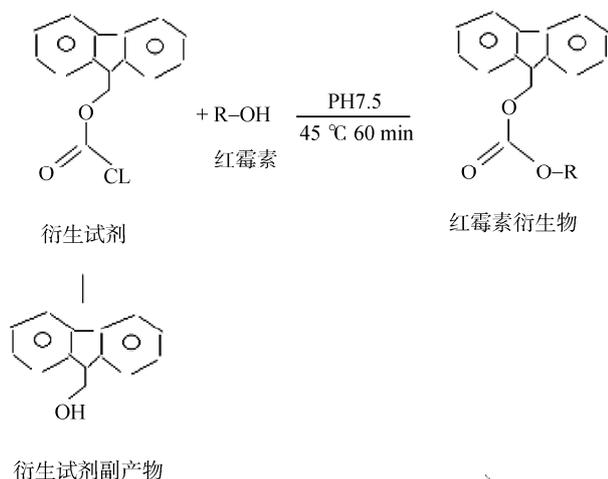


图 1 红霉素的衍生反应

Fig. 1 The derivation reaction of erythromycin

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

气吹仪(organomation), 涡流混匀器(MSI IKA), Agilent1100 高压液相色谱配荧光检测器, 烘箱(101-2B, 上海市实验仪器总厂), TSQ Quantum 液质联用仪; 甲醇(Fisher 公司, 色谱纯), 甲酸(分析纯), 氨水(分析纯), 磷酸二氢钾(分析纯), 磷酸氢二钾(分析纯), 红霉素标准品: 纯度 $\geq 99\%$ (SIGMA 公司), 罗红霉素标准品: 纯度 99%(SIGMA 公司), 9-芴代甲氧基酰氯标准品(FMOL-CL): 纯度 98%(SIGMA 公司)。

1.2 溶液配制

红霉素、罗红霉素储备液: 分别称取 0.0100 g 红霉素、罗红霉素标准品, 分别用乙腈溶解并定容到 100 mL, 配成浓度分别为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液, 临用时用乙腈稀释成所需浓度, 其中罗红霉素用乙腈稀释为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。

FMOL-CL 溶液的配制: 准确称取适量 FMOL-CL, 用乙腈溶解并定容到 100 mL。

1.3 实验方法

每个实验都是在 1 个参数变化, 3 个参数固定不变的情况下进行的。每个实验每次做 3 个平行样, 重复做 3 次。取相对峰高的平均值作为纵坐标, 待优化的参数作为横坐标。反应结束后均用流动水迅速冷却至室温并在室温下放置 15 min, 进行色谱分析。

1.3.1 不同反应温度对红霉素衍生化程度的影响

在其他三个参数固定不变的情况下, 将红霉素分别置于 30、35、40、45、50、55、60 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中进行衍生化反应。

1.3.2 不同反应时间对红霉素衍生化程度的影响

在其他三个参数固定不变的情况下, 将红霉素分别衍生反应 30、60、90、120 min。

1.3.3 不同量的衍生试剂对红霉素衍生化程度的影响

在其他三个参数固定不变的情况下, 分别添加 12.5、25、37.5、50、62.5、75 μg FMOC-CL, 进行衍生化反应。

1.3.4 不同反应体系对红霉素衍生化程度的影响

在其他三个参数固定不变的情况下, 红霉素分别置于 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=1:1$, $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=2:1$, $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=3:1$, $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=4:1$, $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=5:1$ 的反应体系中进行衍生化反应。

1.3.5 高压液相色谱分析条件

色谱条件: 色谱柱: CAPCELL PAK MG II -C₁₈ 柱 (4.6 mm \times 150 mm)。流动相: A: 乙腈; B: 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 6.3)。梯度洗脱程序见表 1。柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。流速: 2 mL/min。进样量: 50 μL 。荧光检测器: 激发波长 255 nm; 发射波长: 315 nm。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 The gradient elution procedure

时间(min)	流动相	
	A(%)	B(%)
0.00	63	37
12.0	63	37
13.0	75	25
19.0	75	25
19.1	63	37
25.0	63	37

2 结果与讨论

2.1 反应温度对红霉素衍生化程度的影响

通过图 2 可以看出, 随着温度的升高, 衍生化效率也随之提高, 在 40~50 °C 时衍生化效率达到最佳, 超过 50 °C 后衍生化效率开始下降。

2.2 反应时间对红霉素衍生化程度的影响

由图 3 可以看出, 反应时间在 60~90 min 时, 衍生化效率达到顶峰, 之后衍生化效率开始缓慢下降。

2.3 不同量的反应试剂对红霉素衍生化程度的影响

由图 4 可以看出, 随着反应试剂的量逐渐增加, 衍生化效率也随之缓慢提高, 当加入量在 50 μg 时达到顶峰, 继续增加衍生试剂的量对提高衍生化效率没有效果, 衍生化效率反而开始缓慢下降。

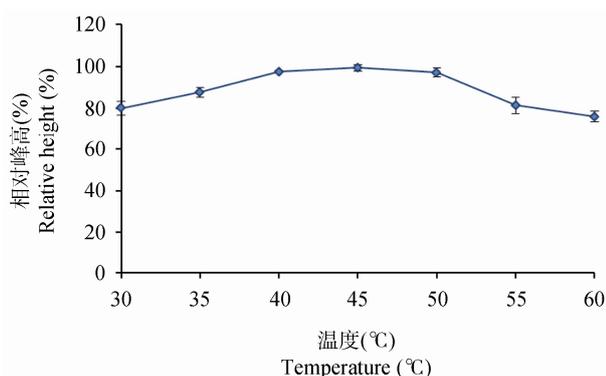


图 2 反应温度对红霉素衍生反应的影响($n=3$)

Fig. 2 The effect of reaction temperature on erythromycin derivatization ($n=3$)

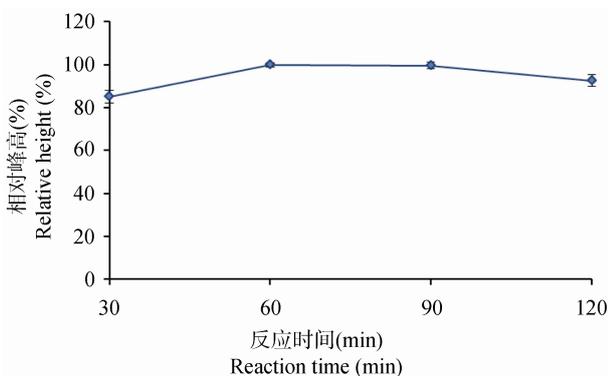


图 3 反应时间对红霉素衍生反应的影响($n=3$)

Fig. 3 The effect of reaction time on erythromycin derivatization ($n=3$)

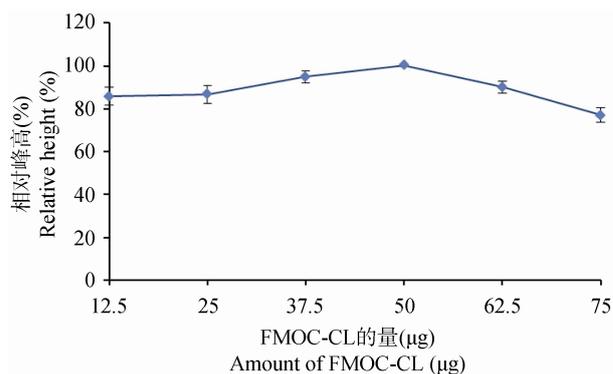


图 4 FMOC-CL 的量对红霉素衍生反应的影响($n=3$)

Fig. 4 The effect of amount of FMOC-CL on erythromycin derivatization ($n=3$)

2.4 不同反应体系对红霉素衍生化程度的影响

由图 5 可以看出, $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=2:1$ 时, 衍生化效率最高, 增加乙腈的体积衍生化效率基本没有变化。

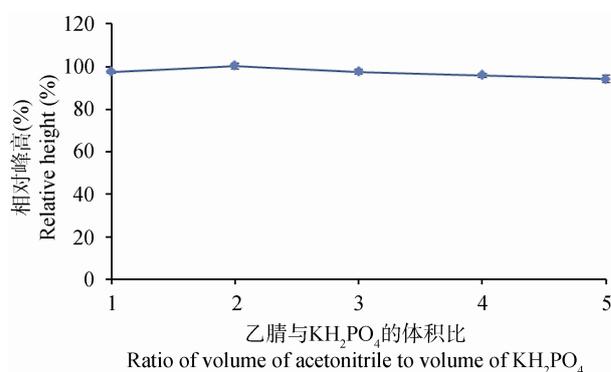


图 5 反应体系对红霉素衍生反应的影响($n=3$)

Fig. 5 The effect of ratio of acetonitrile to KH_2PO_4 on derivatization ($n=3$)

由上述试验结果可以看出: 反应温度: 40~50 °C, 反应时间: 1 h, 反应试剂的量: 50 μg , 反应体系 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}=2:1$ 时, 红霉素的衍生化效果最好。在该衍生化条件下, 红霉素的标样图谱如图 6 所示。红霉素的保留时间为 11.610 min, 红霉素的内标物罗红霉素的保留时间为 17.221 min。

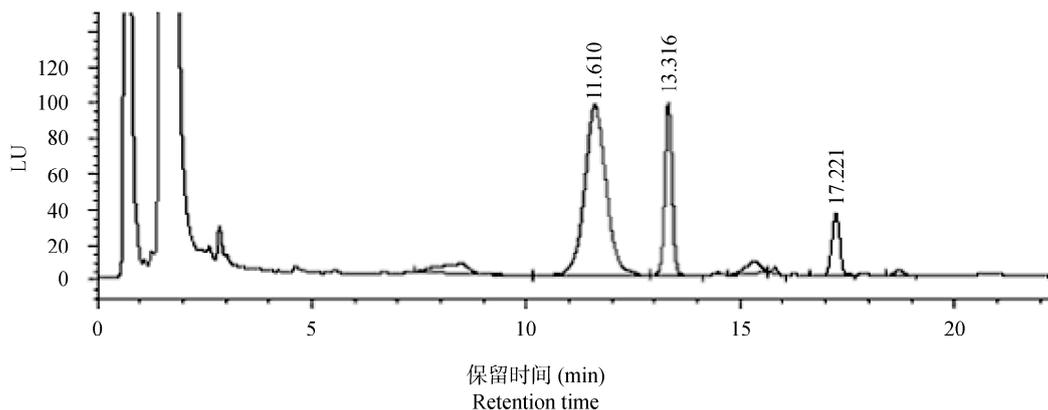


图6 红霉素和罗红霉素标准品液相色谱图

Fig. 6 HPLC chromatogram of erythromycin and roxithromycin standard

参考文献

- [1] 任撑住. 红霉素及其衍生物的构效关系[J]. 中国兽药杂志, 2000, 35(3): 58-60.
Ren CZ. The progress of structure-activity relationship study on erythromycin and its derivatives[J]. Chin J Vet Med, 2000, 35(3): 58-60.
- [2] 袁天烁. 大环内酯类抗生素的研究与应用进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(19): 2620-2621.
Yuan TS. Progress in research and application of macrolide antibiotics [J]. Mod J Integr Tradit Chin Western Med, 2005, 14(19): 2620-2621.
- [3] 曹福霞. 抗生素在养鱼生产上的应用[J]. 养殖天地, 2004, (6): 31.
Cao FX. Application of antibiotics in fish production[J]. World of Breeding, 2004: 31.
- [4] 赵惠明, 江秀明, 林贤福. 水产品体内抗生素残留分析研究现状 [J]. 水产科学, 2004, 23(8): 39-41.
Zhao HM, Jiang XM, Lin XF. Current status on residues of antibiotics in seafood [J]. Fisheries Sci, 2004, 23(8): 39-41.
- [5] Billedeau SM, Heinze TM, Siitonen PH. Liquid chromatography analysis of erythromycin in salmon tissue by electrochemical detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(6): 1534-1538.
- [6] Dreassi E, Corti P, Bezzini F. High-performance liquid chromatography assay of erythromycin from biological matrix using electrochemical or ultraviolet detection [J]. Analyst, 2000, 125: 1077-1081.
- [7] 韩南银, 周婷. 蜂蜜中红霉素残留量的检测[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 118-120.
Han NY, Zhou T. Determination of erythromycin residues in honey[J]. Food Sci, 2003, 24(2): 118-120.
- [8] Xiao WT, Chen B, Yao SZ, et al. Simultaneous determination of erythromycin propionate and base in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2005, (817): 153-158.
- [9] 周玲, 吴黎明, 周金慧. 高效液相色谱-串联质谱检测巢脾中红霉素残留[J]. 中国食品学报, 2013, (6): 198-202.
Zhou L, Wu LM, Zhou JH. Determination of Erythromycin Residues in Honeycomb by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2013, (6): 198-202.
- [10] 惠芸华, 蔡友琼, 沈晓盛, 等. 高效液相色谱法测定水产品中的红霉素残留量[J]. 分析试验室, 2009, 28(11): 33-36.
Hui YH, Cai YQ, Sheng XS, et al. A high performance liquid chromatographic method for the determination of erythromycin residues in aquatic products[J]. Chin J Anal Lab, 2009, 28(11): 33-36.
- [11] Edдер P, Coppex L, Cominoli C. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection [J]. Food Addit Contam, 2002, 19(3): 232-240.

(责任编辑: 赵静)

作者简介

惠芸华, 助理研究员, 主要研究方向为水产品质量安全管理、水产品中渔药残留及生物毒素检测技术和渔药在生物体中富集及代谢规律。

E-mail: huiyunhuamaomao@126.com

于慧娟, 教授, 主要研究方向为水产品质量安全管理、水产品中渔药残留及生物毒素检测技术和渔药在生物体中富集及代谢规律。

E-mail: yuhuijuan607@sohu.com

“转基因食品安全”专题征稿

在过去的 30 年里,科学家已经成功培育出多种转基因动植物。近年来,转基因食品的研发迅猛发展,产品品种及产量也成倍增长,有关转基因食品的问题日渐凸显,其致敏性、安全性、抗药性等问题引起了科学家和公众的广泛关注。我国于 2001 年颁布《农业转基因生物安全管理条例》,对转基因食品进行科学监管,之后又发布了一系列管理办法。

鉴于此,本刊特别策划了“**转基因食品安全**”专题,由上海交通大学**张大兵**教授担任专题主编,张大兵教授现为上海交通大学生命科学技术学院副院长,国家杰出青年基金获得者、教育部长江学者奖励计划特聘教授,担任国家农业转基因生物安全委员会委员,长期从事转基因生物分子特征等方面研究,发表 SCI 论文近百篇,获授权专利 14 项;制定国家 ISO 技术标准 4 项,制定国家标准 20 余项。本专题主要围绕**转基因食品成分检测、监测与溯源、安全性分析评价,转基因食品管理法律法规、监管现状及问题**等或您认为本领域有意义的问题进行论述,计划在 2014 年 4 月出版。

本刊编辑部特邀请您为本专题撰写稿件,以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可,请在 2014 年 2 月 15 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部