

文章编号: 1000-7032(2015)12-1464-05

基于表面增强拉曼光谱的鸭肉中螺旋霉素残留检测

洪 茜, 刘木华, 袁海超, 彭义杰, 李 耀, 赵进辉*

(江西农业大学工学院 生物光电及应用重点实验室, 江西 南昌 330045)

摘要: 利用表面增强拉曼光谱(SERS)法结合自适应迭代重加权惩罚最小二乘法(air-PLS)快速检测鸭肉中的螺旋霉素残留。首先采用 OTR202 作为 SERS 活性基底, 确定了螺旋霉素的 $1\ 622\ \text{cm}^{-1}$ 峰可以作为其在鸭肉提取液中残留检测的拉曼特征峰, 然后, 通过单因素分析法确定了实验的最佳条件, 并在该条件下建立了螺旋霉素浓度范围介于 $4.0 \sim 50.0\ \text{mg/L}$ 之间的鸭肉提取液加标样本的标准曲线, 并获得了良好的线性关系且线性回归方程为 $y = 26.681x + 1233.5$, 决定系数 $R^2 = 0.980\ 2$, 最低检测限为 $4\ \text{mg/L}$, 预测样本的平均回收率为 $73.38\% \sim 105.25\%$ 。研究表明, 采用 SERS 技术可以实现鸭肉中螺旋霉素残留的快速检测。

关键词: 螺旋霉素; SERS; air-PLS; 鸭肉

中图分类号: O657.37

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20153612.1464

Detection of Spiramycin Residue in Duck Meat Based on SERS

HONG Qian, LIU Mu-hua, YUAN Hai-chao, PENG Yi-jie, LI Yao, ZHAO Jin-hui*

(Optics-Electrics Application of Biomaterials Lab, College of Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

* Corresponding Author, E-mail: zhxiaocao@sina.com

Abstract: The surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) method combined with the adaptive iterative re-weighted penalized least squares (air-PLS) method was used for the rapid detection of spiramycin residue in duck meat. Firstly, the OTR202 was used as SERS active substrate, and the peak $1\ 622\ \text{cm}^{-1}$ was considered as the Raman characteristic peak for spiramycin residue in duck meat extract. Then the optimum experimental conditions were determined by using the single factor experiment. Under these conditions, the duck meat extract spiked samples, in which spiramycin concentration range was $4.0 \sim 50.0\ \text{mg/L}$, were analyzed, and the standard curve was established and a good linear relationship was obtained. The linear regression equation was $y = 26.681x + 1233.5$, and the coefficient of determination (R^2) was $0.980\ 2$. The detection limit was $4\ \text{mg/L}$, and the average recovery rate was $73.38\% \sim 105.25\%$. The research results show that it is feasible to realize the rapid detection of spiramycin residue in duck meat by using SERS.

Key words: spiramycin; SERS; air-PLS; duck meat

1 引 言

螺旋霉素(Spiramycin)是一种大环内酯类中

谱抗生素, 此类抗生素对革兰氏阳性菌和支原体具有较强的抗菌活性, 近年来不仅被广泛地作为治疗药物使用, 而且为了提高经济效益已被普遍

收稿日期: 2015-06-17; 修订日期: 2015-11-04

基金项目: 国家自然科学基金(31101295); 江西省科技厅对外科技合作计划(20132BDH80005); 江西省科技厅科技支撑项目(2012BBG70058); 江西省教育厅科技计划(GJJ12244)资助项目

作为饲料添加剂以促进禽畜生长及预防疾病^[1]。由于抗生素的滥用将直接危害人体的健康,因此其残留问题已经引起了国内外的广泛关注。目前常用于大环内酯类抗生素残留检测的传统方法主要有高效液相色谱法^[2-3]、液质联用法^[4-5]、微生物法^[6]、酶联免疫法^[7]等。这些方法检测精度高、灵敏度好,但是样品前处理复杂、成本高,不利于实现大规模的现场检测。

表面增强拉曼光谱(Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)技术通过采用特殊制备的表面粗糙金属或溶胶作为活性基底,将被测分子吸附到基底表面,从而使其拉曼信号大幅增强^[8]。SERS因其在痕量物质检测中有很大的优势,近年来已经引起广大研究学者的关注。袁鑫等^[9]利用SERS技术建立了辣椒粉中的苏丹红I号的快速定量检测模型;李言等^[10]应用SERS快速检测赤藓红,并通过密度泛函理论计算了赤藓红的理论拉曼光谱,结果与实验拉曼光谱具有很好的对应性;李春颖等^[11]采用SERS结合化学计量学方法对水产品中的抗生素(氯霉素和磺胺甲基嘧啶)进行了痕量残留检测。但目前还没有将SERS应用于鸭肉中螺旋霉素残留检测的报道。

本文对含有螺旋霉素的鸭肉提取液的SERS进行了分析,并且研究了样品加入量和吸附时间对其SERS信号的影响,建立了含有螺旋霉素的鸭肉提取液的标准曲线以实现鸭肉中螺旋霉素的快速检测。

2 实验

2.1 试剂与仪器

鸭肉(购于江西农业大学菜市场);螺旋霉素标准品(纯度约为96.0%,购于中国物质标准网);OTR202、OTR103(购于欧普图斯光学纳米科技有限公司);乙酸乙酯(分析纯);超纯水。

RamTracer-200-HS型便携式激光拉曼光谱仪(欧普图斯光学纳米科技有限公司);T10型实验室超纯水机(湖南科尔顿水务有限公司);JK-50B型超声波清洗器(合肥金尼克机械有限公司);FA1004B型电子天平(精度为0.1 mg,上海上平仪器有限公司);VORTEX-5型漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器有限公司);JW-1024型低速离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司);T6系列紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器责任有限公

司);石英比色皿;石英进样瓶(北京成腾器材有限公司)。

2.2 样品制备

鸭肉样品前处理:向50 mL离心管中加入5 g搅碎的鸭肉和20 mL乙酸乙酯,漩涡振荡2 min,超声提取10 min,4 500 r/min离心15 min,取上清液。按上述步骤再重复提取1次,合并上清液,4 500 r/min离心15 min,用快速滤纸过滤得实验用鸭肉提取液。

鸭肉提取液加标样本的配制:称取10 mg螺旋霉素标准品,用鸭肉提取液定容于100 mL棕色容量瓶中,得到浓度为100 mg/L的鸭肉提取液加标储备液。取不同体积的加标储备液用鸭肉提取液稀释至8个不同浓度的鸭肉提取液加标样本溶液,其浓度范围介于4.0~50.0 mg/L之间。

2.3 实验方法

拉曼光谱仪采用785 nm激光波长、200 mW激光功率,光谱分析范围为400~1 800 cm^{-1} ,分辨率为6 cm^{-1} ,积分时间为10 s,积分2次求平均。

分别改变待测样品的加入量和吸附时间来优化实验条件。在最佳实验条件下,分别采集含有螺旋霉素的鸭肉提取液、螺旋霉素的标准品溶液和鸭肉提取液空白样的SERS;在最佳实验条件下,分别采集配制的8个鸭肉提取液加标溶液样本的SERS。所有光谱采集5次。

将500 μL 的OTR202、20 μL 的待测液和100 μL 的OTR103依次加入至石英进样瓶中,均匀混合,再放至样品池中采集拉曼光谱。

3 结果与讨论

3.1 增强基底的紫外吸收光谱

金属溶胶增强基底因制备简单、增强效果及稳定性较好,已在表面增强领域中得到广泛应用。目前,金溶胶和银溶胶的研究较为普遍,虽然金的局域表面等离子体共振的能量与银相比较低,但是金本身具有银所不具备的优势,即金的良好稳定性和生物相容性^[12]。因此,本研究选用纳米金溶胶OTR202作为增强基底。图1中曲线(a)所示为纳米金溶胶的紫外-可见吸收光谱,其最大吸收峰的位置约位于544 nm处,半峰宽约为56 nm。曲线(b)为增强基底OTR202和活化剂OTR103与螺旋霉素水溶液混合后的紫外-可见吸

收光谱,其最大吸收峰的位置约处于 552 nm 处,相比于 OTR202 的最大吸收峰位置红移了 8 nm,并且半峰宽变大。这可能是由于螺旋霉素分子吸附在纳米金颗粒表面之后,其表面等离子体共振性质发生变化,从而影响了纳米金颗粒的尺寸大小或者聚集程度等因素^[13]。

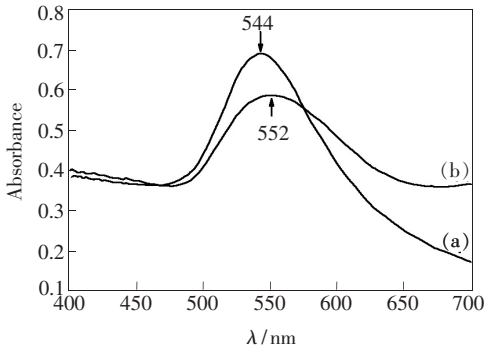


图 1 OTR202 (a) 和 OTR202 + 螺旋霉素 + OTR103 (b) 的紫外-可见吸收光谱

Fig. 1 UV-Vis absorption spectra of OTR202 (a) and OTR202 + spiramycin + OTR103 (b)

3.2 鸭肉中螺旋霉素的 SERS 分析

图 2 为鸭肉提取液、螺旋霉素水溶液和含有螺旋霉素的鸭肉提取液的 SERS 对比图。由图中曲线 (a) 可知,鸭肉提取液的主要 SERS 特征峰位于 1 208, 1 248, 1 372, 1 556 cm^{-1} 处。由曲线 (b) 可知,螺旋霉素水溶液的主要 SERS 特征峰位于 1 234, 1 372, 1 556, 1 622 cm^{-1} 处。而由曲线 (c) 可知,含有螺旋霉素的鸭肉提取液主要在 1 208, 1 248, 1 372, 1 556, 1 622 cm^{-1} 处出现了 SERS 特征峰。经对比不难发现,在含有螺旋霉素的鸭肉提取液的 SERS 特征峰中,1 208 cm^{-1} 和 1 248 cm^{-1} 两者为鸭肉提取液的 SERS 峰,而 1 372 cm^{-1}

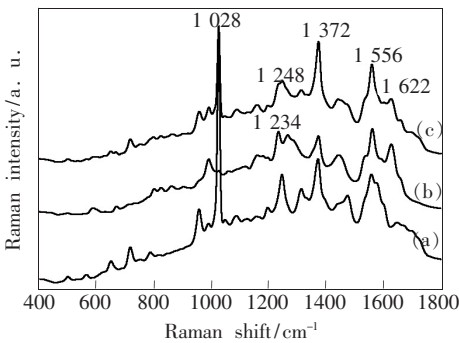


图 2 鸭肉提取液 (a)、螺旋霉素水溶液 (b) 与含有螺旋霉素的鸭肉提取液 (c) 的 SERS

Fig. 2 SERS of duck meat extract (a), spiramycin solution (b), and duck meat extract containing spiramycin (c).

和 1 556 cm^{-1} 两个 SERS 特征峰在鸭肉提取液和螺旋霉素水溶液中均有体现,仅有位于 1 622 cm^{-1} 处的 SERS 特征峰是螺旋霉素本身的 SERS 特征峰且未体现在鸭肉提取液中。因此,本研究将这个峰作为后续检测螺旋霉素的主要 SERS 特征峰,这为实现鸭肉中螺旋霉素残留的 SERS 分析提供了良好的依据。

3.3 基于 air-PLS 的荧光背景扣除

为了更加直观地对样本的 SERS 信号进行对比与研究,本文采用自适应迭代惩罚最小二乘法 (air-PLS) 来实现拉曼光谱中的荧光背景扣除。近年来,air-PLS 被提出用于校正拉曼光谱的基线漂移,它可全自动地进行光谱处理,不需要任何初始信息和人为干预,即能有效扣除原始光谱中的荧光背景^[14-15]。图 3 中曲线 (a) 为含有螺旋霉素浓度为 15.0 mg/L 的鸭肉提取液的原始拉曼光谱,曲线 (b) 为通过 air-PLS 拟合的荧光背景,曲线 (c) 为对曲线 (a) 进行荧光背景扣除后所得光谱。由图 3 可知,该算法能在保留拉曼有用峰形的前提下有效扣除其中的荧光背景,减少荧光背景对光谱信息的影响。

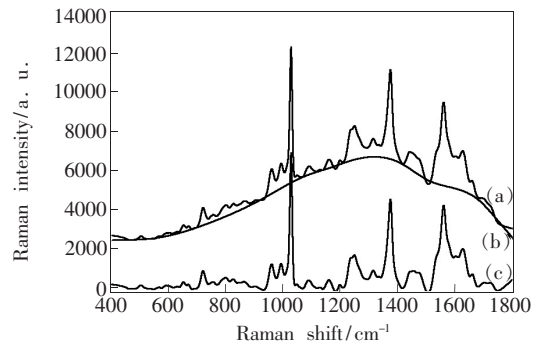


图 3 air-PLS 对荧光背景的扣除。(a) 原光谱;(b) 拟合荧光背景;(c) 背景扣除后光谱。

Fig. 3 Fluorescence background subtraction by air-PLS. (a) Origin spectrum. (b) Fluorescence background fitted. (c) Spectrum after background subtraction.

3.4 样品加入量对 SERS 信号的影响

研究发现,待测样品的加入体积不同会对 SERS 信号的强度产生一定的影响。将 OTR202 和 OTR103 的加入量固定为 500 μL 和 100 μL ,图 4 为含螺旋霉素浓度为 15.0 mg/L 的鸭肉提取液的加入量为 15, 20, 25, 30 μL 时的 SERS 信号的变化情况。通过对比发现,当样品加入量由 15 μL 增加至 30 μL 时,混合物溶液的 SERS 信号的

1 622 cm^{-1} 峰呈现先增强后减弱的趋势, 并且当加入量为 20 μL 时, 该峰强度值最大。此过程中该峰值增强可能是由于样品加入量越大, 待测分子的数目就越多; 而减弱则可能是因样品量的增加导致溶剂乙酸乙酯的量也在增加, 从而影响了待测分子与纳米金颗粒的吸附^[16]。因此, 本研究确定了待测样品的最佳加入体积为 20 μL 。

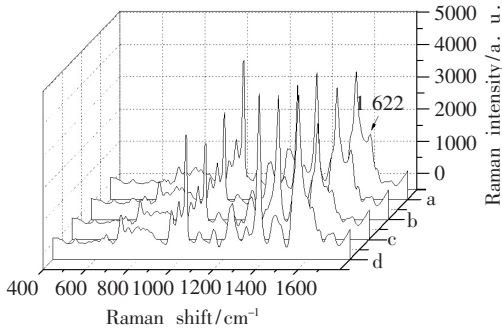


图 4 样品加入量对 SERS 信号的影响。(a) 15 μL ; (b) 20 μL ; (c) 25 μL ; (d) 30 μL 。

Fig. 4 Effect of the addition amount on SERS intensity. (a) 15 μL . (b) 20 μL . (c) 25 μL . (d) 30 μL .

3.5 吸附时间对 SERS 信号的影响

实验采集了同一浓度的待测样品与基底的吸附时间分别为 1, 5, 10, 15, 20 min 时的 SERS。由图 5 可知, 当吸附时间为 1 min 时, 混合物溶液的 SERS 信号在特征峰 1 622 cm^{-1} 处强度最大, 随后逐渐减弱。这可能是由于当纳米金胶与待测样品混合后会产生一定程度的聚集, 从而产生决定 SERS 增强效果的活性热点^[14]。在本研究中, 当金纳米颗粒聚集 1 min 时产生的活性热点能与待测样品结合产生最佳的增强效果。因此, 实验确定最佳吸附等待时间为 1 min。

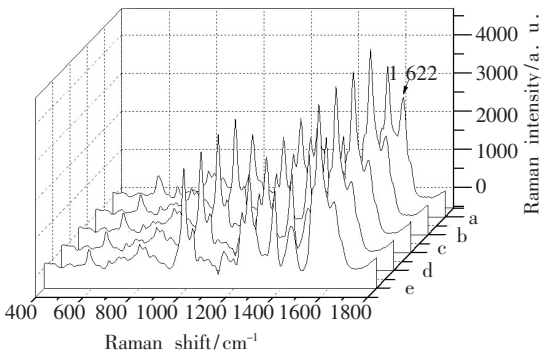


图 5 吸附时间对 SERS 信号的影响。(a) 1 min; (b) 5 min; (c) 10 min; (d) 15 min; (e) 20 min。

Fig. 5 Effect of adsorption time on SERS intensity. (a) 1 min. (b) 5 min. (c) 10 min. (d) 15 min. (e) 20 min.

3.6 标准曲线及预测结果

实验采集了含螺旋霉素浓度分别为 4.0, 10.0, 22.0, 35.0, 50.0 mg/L 的鸭肉提取液加标样本的 SERS, 我们以这 5 个浓度作为横坐标, 以其 SERS 的 1 622 cm^{-1} 处的特征峰强度作为纵坐标, 绘制成如图 6 所示的标准曲线。由图可知, 在含螺旋霉素的鸭肉提取液加标样本的 4.0 ~ 50.0 mg/L 浓度范围内, 其浓度与 SERS 的 1 622 cm^{-1} 峰强度呈现出良好的线性关系, 其线性回归方程和决定系数 (R^2) 分别为 $y = 26.681x + 1233.5$ 和 0.980 2, 并得到最低检测限为 4 mg/L 。应用得到的标准曲线对螺旋霉素浓度分别为 20.0, 30.0, 45.0 mg/L 的鸭肉提取液加标样本进行预测, 结果如表 1 所示, 其平均回收率的范围为 73.38% ~ 105.25%。结果表明, 利用 SERS 技术建立鸭肉中螺旋霉素残留的快速检测研究是可行的。

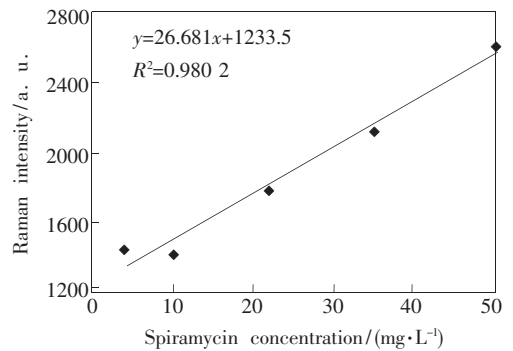


图 6 SERS 信号 (1 622 cm^{-1} 峰) 强度与鸭肉中螺旋霉素浓度的标准曲线

Fig. 6 Standard curve between SERS (peak of 1 622 cm^{-1}) intensity and spiramycin concentration in duck meat

表 1 预测结果分析 ($n = 5$)

Table 1 Analysis of prediction results

| Actual values/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | Predicted values/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) | Average recoveries/ % |
|---|--|--------------------------|
| 20.0 | 21.049 4 | 105.25 |
| 30.0 | 24.785 1 | 82.62 |
| 45.0 | 33.020 2 | 73.38 |

4 结 论

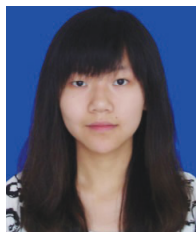
运用 SERS 光谱法可以快速检测鸭肉中螺旋霉素的残留含量。实验以 OTR202 作为表面增强活性基底, 确定了 1 622 cm^{-1} 峰可以作为鸭肉中螺旋霉素

残留检测的 SERS 特征峰。采用 air-PLS 方法进行光谱数据预处理,通过单因素实验分析法确定了当样品加入量和吸附时间分别为 20 μL 和 1 min 时采集的 SERS 信号最佳。最后在该条件下建立了鸭肉提

取液中螺旋霉素残留检测的标准曲线,得到了在 4.0 ~ 50.0 mg/L 浓度范围内,其 SERS 的 $1\ 622\ \text{cm}^{-1}$ 峰强度与螺旋霉素的浓度具有良好的线性关系,并且结果具有一定的可靠性。

参 考 文 献:

- [1] Liu Y. HPLC Analysis of Macrolide Antibiotic Residues in Animal Derived Food [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008 (in Chinese).
- [2] Prakash S, Ajit K S, Merilyn M H, *et al.* Development of an HPLC method to analyze four veterinary antibiotics in soils and aqueous media and validation through fate studies [J]. *J. Environ. Sci. Health*, 2012, 47(13):2120-2132.
- [3] Tian M, Lin W X, Dong W F, *et al.* determination of macrolides antibiotics residues in pig casing by high performance liquid chromatography [J]. *Food Res. Dev.* (食品研究与开发), 2011, 32(7):117-119 (in Chinese).
- [4] Xiong C L, Guo P, Zhan C R, *et al.* Simultaneous determination of 8 kinds of 38 veterinary drug residues in aquatic products by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J. Instrum. Anal.* (分析测试学报), 2013, 32(2):193-198 (in Chinese).
- [5] Zhu S C. The Study of Detection Methods of Macrolides Residual in Aquatic Products [D]. Xiamen: Jimei University, 2013 (in Chinese).
- [6] Guo L Z. The Difference of Evaluation of Bioequivalence of Dirithromycin by LC-MS/MS and Microbiological Assay [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2009 (in Chinese).
- [7] Burkin M, Galvidis I. Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay [J]. *Food Chem.*, 2012, 132(2):1080-1086.
- [8] Igor C, Franck H L, Pierre D, *et al.* Intracellular applications of analytical SERS spectroscopy and multispectral imaging [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37:993-1000.
- [9] Yuan X, Xie F, Chen B B, *et al.* Rapid determination method for tonyred I in chilli powder by surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Jiangsu Agri. Sci.* (江苏农业科学), 2013, 41(4):269-270 (in Chinese).
- [10] Li Y, Xie Y F, Qian H, *et al.* Rapid detection method for erythrosine by surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Sci. Technol. Food Ind.* (食品工业科技), 2013, 34(11):307-310 (in Chinese).
- [11] Li C Y, Lai K Q, Zhang Y Y, *et al.* Use of surface-enhanced Raman spectroscopy for the test of residuals of prohibited and restricted drugs in fish muscle [J]. *Acta Chim. Sinica* (化学学报), 2013, 71(1):221-226 (in Chinese).
- [12] Xu T. Preparation and Surface Enhanced-Raman Scattering Effect of Three-dimensional Metal/Grapheme Composite Structure [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-tech University, 2013 (in Chinese).
- [13] Zhang Q, Weng Y X. A possible mechanism for the reduced fluorescence quantum efficiency of bacteriochlorophyll a molecules adsorbed on the gold nanoparticles [J]. *J. Light Scatter* (光散射学报), 2015, 27(1):1-8 (in Chinese).
- [14] Fang C X, Li J H, Liang Y Z. Determination of MTBE in gasoline by Raman spectroscopy combined with baseline correction method [J]. *J. Instrum. Anal.* (分析测试学报), 2012, 31(5):541-545 (in Chinese).
- [15] Li X, Lv Y. Background subtraction in Raman measurement of ethanol concentration [J]. *J. Beijing Info. Sci. Technol. Univ.* (北京信息科技大学学报), 2013, 28(2):27-30 (in Chinese).
- [16] Sun Y Y. Studies on The Detection of Antioxidants of BHA and BHT by Surface-enhanced Raman Scattering [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012 (in Chinese).



洪茜(1991 -),女,江西九江人,硕士研究生,2012年于江西农业大学获得学士学位,主要从事荧光与拉曼光谱分析与检测方面的研究。
E-mail: hongqian1028@163.com



赵进辉(1978 -),男,湖南华容人,博士,副教授,2008年于华南农业大学获得博士学位,主要从事光谱分析与检测方面的研究。
E-mail: zjhxiaocao@sina.com