

鸭肉中环丙沙星残留的表面增强拉曼光谱测定

赵进辉, 李耀, 袁海超, 刘木华*

(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:为实现鸭肉中环丙沙星(CIP)残留的快速检测,建立了一种鸭肉中CIP残留的表面增强拉曼光谱(SERS)快速检测方法。进行了增强基底的紫外-可见吸收光谱分析和鸭肉中CIP残留检测的SERS可行性分析。通过单因素实验,确定了金胶加入量、含CIP的鸭肉提取液加入量、氯化钠溶液加入量和吸附时间。在最佳实验条件下,建立了鸭肉中CIP残留的SERS检测的标准工作曲线,决定系数(R^2)为0.9879,预测样本中CIP的平均回收率为97.0%~111.7%。实验结果表明,鸭肉中CIP残留的SERS快速检测方法是可行的。

关键词:环丙沙星;表面增强拉曼光谱;鸭肉;检测

中图分类号: O657.3; TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2017)05-0701-04

Detection of Ciprofloxacin Residues in Duck Meat Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy

ZHAO Jin-hui, LI Yao, YUAN Hai-chao, LIU Mu-hua*

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

Abstract: A rapid detection method of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) was established for the detection of ciprofloxacin (CIP) residues in duck meat. UV - visible absorption spectrum of SERS enhanced substrate and the feasibility of SERS detection of CIP residues in duck meat were analyzed. The addition amount of gold colloid, addition amount of duck meat extract containing CIP, addition amount of sodium chloride solution and the adsorption time were optimized by the single factor analysis. The calibration curve for the method was obtained in the optimum experiment condition. The determination coefficient was 0.9879. The average recoveries of CIP in the prediction samples were between 97.0% and 111.7%. The experiment results indicated that the SERS method was feasible for the detection of CIP residues in duck meat.

Key words: ciprofloxacin(CIP); surface enhanced Raman spectroscopy(SERS); duck meat; detection

环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)是一种第三代喹诺酮类广谱抗生素,因具有较好的杀菌效果,在禽养殖业中被广泛使用。但由于对其的不合理使用,常造成禽肉中CIP残留超标,可能会对人体产生一定的毒副作用(如胸闷、头晕、肾脏损伤等)。目前用于CIP残留的检测方法主要有分光光度法、高效液相色谱法、电化学法和液相色谱-质谱联用法等^[1-5],但是这些方法不能满足鸭肉中CIP残留的快速检测要求。因此,寻找一种鸭肉中CIP残留的快速检测方法是当前亟待解决的问题。

近年来,表面增强拉曼光谱(Surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)作为一种具有高灵敏性的快速检测方法已用于兽药残留检测^[6]。马海宽等^[7-8]对鱼肉中的磺胺甲基嘧啶与磺胺二甲嘧啶进行了SERS检测与分析。Zhao等分别对鸭肉中的螺旋霉素^[9]和四环素^[10]残留进行了SERS检测分析。Ji等^[11]应用SERS技术检测了猪肉、牛肉、鸡等食品中的氯霉素残留。Han等^[12]对自来水、湖水和土壤等样本中甲硝唑和罗硝唑进行了SERS检测分析。但尚未见基于SERS技术的鸭肉中CIP的残留检测报道。本研究以金纳米颗粒作为增强试剂,建立了一种鸭肉中CIP残留的SERS快速检测方法。

收稿日期: 2016-12-11; 修回日期: 2017-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660485); 江西省科技厅对外科技合作计划项目(20132BDH80005); 江西省科技厅科技支撑项目(20121BBG70058); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ12244)

* 通讯作者: 刘木华, 博士, 教授, 研究方向: 光谱分析与检测, Tel: 0791-83813260, E-mail: suikelmh@sohu.com

1 实验部分

1.1 材料与试剂

实验用麻鸭购于江西农业大学菜市场; CIP 标准品(纯度约为 99.0%)购于南昌精科科学仪器有限公司; 氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $M = 393.83$, 其中金含量为 $\geq 49.0\%$, Sigma - Aldrich 公司); 乙酸乙酯、柠檬酸三钠(分析纯, 汕头西陇化工股份有限公司); 氯化钠、无水硫酸钠为分析纯(天津市永大化学试剂有限公司); 实验用水为自制超纯水。

1.2 仪器设备

QE65000 便携式拉曼光谱仪(海洋光学有限公司); T10 型实验室超纯水机(湖南科尔顿水务有限公司); DL-1 电子万用炉(北京市永光明医疗仪器有限公司); JJ-2B 型组织捣碎匀浆机(江苏省金坛市金南仪器厂); 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); HSC-24B 型氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司); VORTEX-5 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器有限公司); JW-1024 低速离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司); T6 新世纪紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器责任有限公司); 石英进样瓶(北京成腾器材有限公司); 石英比色皿(1 cm 光程)。

1.3 实验方法

采用柠檬酸三钠还原法制备金胶纳米粒子^[13]。将 2 mL 1% 的氯金酸加至 500 mL 烧杯中, 用水定容至 200 mL, 用电子万用炉将其加热至沸腾, 加 1 mL 1% 的柠檬酸三钠。继续加热约 8 min 直至溶液颜色变紫红色后, 冷却至室温, 4 °C 保存。

将 5 g 捣碎的鸭肉和 6.5 g 无水硫酸钠加至 50 mL 离心管中, 然后加入 15 mL 乙酸乙酯并涡旋 1 min, 超声振荡 10 min, 离心(3 000 r/min) 5 min, 取上清液。重复提取 1 次, 合并 2 次提取液, 将其用氮气吹干后加入与氮吹前等量的水, 再用快速滤纸过滤得到鸭肉提取液。称取 5 mg 的 CIP 标准品溶于一定体积的鸭肉提取液中, 超声溶解定容后得到含 100 mg/L CIP 的鸭肉提取液加标样本, 然后用鸭肉提取液将其稀释, 得到含不同浓度 CIP 的鸭肉提取液加标样本。

将 10 mg CIP 标准品超声溶解于 100 mL 水中, 得到 100 mg/L 的 CIP 标准储备液, 然后将其用水稀释得不同浓度的 CIP 标准品溶液。

称取 0.528 g 的氯化钠溶于 100 mL 水中, 得到 0.1 mol/L 的氯化钠溶液。

向 2 mL 的石英进样瓶中依次加入金胶 500 μL 、含不同浓度 CIP 的鸭肉提取液加标样本 15 μL 和氯化钠溶液 120 μL , 混合均匀后放入样品池中进行 SERS 光谱采集。其中, 拉曼光谱仪的参数设置为: 光谱仪激光功率 500 mW, 激光波长 785 nm, 积分时间 10 s, 积分平均 2 次, 并选择波段为 400 ~ 1 800 cm^{-1} 的 SERS 光谱进行研究。

通过单因素分析, 优化如下 4 个实验条件: 金胶加入量, 含 CIP 的鸭肉提取液加入量, 氯化钠溶液加入量和吸附时间。于最佳实验条件下, 分别采集不同浓度的 CIP 标准品溶液和含不同浓度 CIP 的鸭肉提取液加标溶液的 SERS 光谱。上述所有样本的光谱均采集 3 次, 取 3 次测量的平均值进行数据分析。在鸭肉中 CIP 残留的标准工作曲线建立与预测前, 先用自适应迭代重加权惩罚最小二乘算法扣除荧光等背景信号。

2 结果与讨论

2.1 增强基底的紫外 - 可见吸收光谱

将 500 μL 自制金胶加 1 mL 水稀释, 得到如图 1a 所示的紫外 - 可见吸收光谱, 从曲线 a 可知, 本研究自制金胶的最大吸收峰约在 542 nm 处, 半峰宽约为 84 nm。将 500 μL 金胶、15 μL 鸭肉提取液加标样本与 120 μL 氯化钠溶液混合, 再加入 1 mL 超纯水稀释, 采集得到的紫外 - 可见吸收光谱如图 1b 所示, 由图可见, 金胶和 CIP 分子吸附后, 引起了金纳米溶胶的粒径发生变化, 相比曲线 a, 其最大吸收峰发生 8 nm 红移, 峰形变得更宽。这可能是因为 CIP 分子吸附金胶粒子后, 改变了金胶纳米粒子表面的等离子共振而引起的^[14]。

2.2 鸭肉中 CIP 残留检测的 SERS 可行性分析

分别采集鸭肉提取液样本、水、CIP 标准品溶液和含 CIP 的鸭肉提取液样本的 SERS, 以及含 CIP 的鸭肉提取液样本的普通拉曼光谱, 并将所得数据绘制成如图 2 所示的曲线。由曲线 b 可知, 水的 SERS 光谱基本未呈现明显的峰强; 对比 CIP 标准品溶液的 SERS 数据(曲线 d), 可以看出 CIP 标准品溶液在位于 $1\ 142, 1\ 195, 1\ 262, 1\ 331, 1\ 390\ \text{cm}^{-1}$ 处均出现较明显且突出的 SERS 峰, 且 $1\ 262\ \text{cm}^{-1}$ 处的 SERS 峰强度最大, 可考虑将此处 SERS 峰作为检测 CIP 的参考特征峰。比较光谱曲线 d 和 e 可知, 在含 CIP 的鸭肉提取液样本的 SERS 曲线中, $1\ 142, 1\ 195, 1\ 262, 1\ 331, 1\ 390\ \text{cm}^{-1}$ 处得到与曲线 d 类似的谱峰, 而对比鸭肉提取液样本的 SERS 数据, 曲线 a 在这些位置未出现 SERS 峰, 进一步验证了以 $1\ 262\ \text{cm}^{-1}$ 处所得拉曼峰作为检测鸭肉中 CIP 的特征峰是可靠的。考察自制金胶的增强效果, 比较曲线 c 和 e 可以看出, 未加基底所得含 CIP 的鸭肉提取液样本的拉曼光谱基本为一条平滑曲线; 在加入金胶和氯化钠后测得的拉曼光谱曲线 e 上所得峰值明显增多, 且特征峰的峰强也有较大增强, 说明了金胶基底对拉曼光谱的增强作用。

2.3 金胶加入量对 SERS 信号的影响

以金胶作为 SERS 光谱的增强基底, 金胶的加入量直接影响鸭肉中 CIP 的 SERS 增强效果。本研究分别以不同加入量的金胶 ($200, 300, 500, 700, 900\ \mu\text{L}$) 与 $15\ \mu\text{L}$ 鸭肉提取液加标样本 ($5\ \text{mg/L}$) 和 $120\ \mu\text{L}$ 氯化钠溶液混合, 采集这些样本的 SERS 光谱数据, 考察不同的金胶加入量对特征峰 $1\ 262\ \text{cm}^{-1}$ 处 SERS 信号强度的影响。结果显示, $1\ 262\ \text{cm}^{-1}$ 处 SERS 信号强度随金胶加入量的增加呈先增强后减弱的趋势, 在金胶加入量为 $500\ \mu\text{L}$ 时 SERS 特征峰的峰强最强, 获得较佳的 SERS 信号强度。因此, 确定金胶的加入量为 $500\ \mu\text{L}$ 。

2.4 含 CIP 的鸭肉提取液加入量对 SERS 信号的影响

含 CIP 的鸭肉提取液的加入量会影响鸭肉提取液中 CIP 的 SERS 特征峰强度。本研究在 $500\ \mu\text{L}$ 金胶中, 分别加入 $5, 10, 15, 20, 30\ \mu\text{L}$ 含 CIP 的鸭肉提取液 (CIP 浓度 $5\ \text{mg/L}$) 和 $120\ \mu\text{L}$ 氯化钠溶液, 混合后采集 SERS 光谱。结果显示, $1\ 262\ \text{cm}^{-1}$ 处 SERS 信号强度随含 CIP 的鸭肉提取液加入量的增加呈先增强后减弱的趋势, 其加入量为 $15\ \mu\text{L}$ 时特征峰的峰强最大。此外, 含 CIP 的鸭肉提取液加入量不同时, 所得特征峰的峰强最大差值超过 $10\ 000\ \text{a. u.}$, 很好地说明特征峰峰值受到含 CIP 的鸭肉提取液加入量的影响很大。因此确定实验中含 CIP 的鸭肉提取液最佳加入量为 $15\ \mu\text{L}$ 。

2.5 氯化钠溶液加入量对 SERS 信号的影响

氯化钠的加入量会影响金胶纳米粒子的凝聚程度, 在 SERS 光谱中起活化和诱导作用, 会对 SERS 信号的增强产生一定的影响。本实验以 $500\ \mu\text{L}$ 自制金胶作为增强基底, 选取 $15\ \mu\text{L}$ 含 $5\ \text{mg/L}$ CIP 的鸭肉提取液加标样本, 再分别加入 $50, 70, 100, 120, 150\ \mu\text{L}$ 的氯化钠溶液, 采集其各自的 SERS 光谱。实验结果显示, 氯化钠溶液加入量为 $120\ \mu\text{L}$ 时, $1\ 262\ \text{cm}^{-1}$ 处特征峰的峰强达到最高。继续增大氯化钠

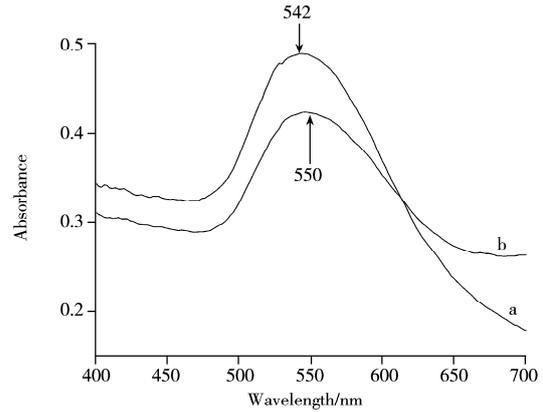


图 1 紫外-可见吸收光谱图

Fig. 1 UV-visible absorption spectra

a. gold colloid; b. gold colloid + duck meat extract containing CIP(5 mg/L) + NaCl

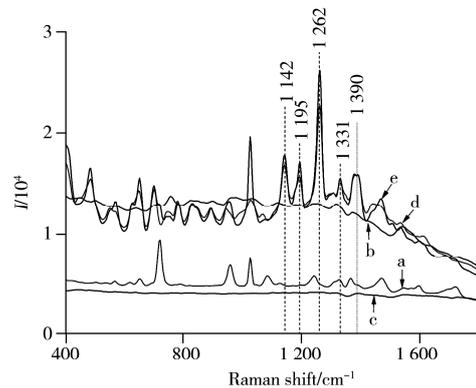


图 2 不同溶液的 SERS 光谱

Fig. 2 SERS spectra of different solutions

a. duck meat extract; b. ultrapure water; c. conventional Raman spectrum of duck meat extract containing CIP (5 mg/L); d. CIP solution (5 mg/L); e. duck meat extract containing CIP (5 mg/L)

溶液加入量时,过量的氯化钠分子可能会引发金胶纳米粒子的团聚,使得特征峰峰强降低。由此确定氯化钠溶液的加入量为120 μL 。

2.6 吸附时间对 SERS 信号的影响

吸附时间的长短直接影响到鸭肉提取液中 CIP 分子在金纳米颗粒活性表面的数量,进而影响到鸭肉提取液中 CIP 的 SERS 特征峰强度^[9-10]。本研究在金胶、待测液和氯化钠最佳加入量条件下考察了吸附时间的影响。结果显示,在1 min 反应时间后,随着时间的增长,1 262 cm^{-1} 处的拉曼峰强度逐步变小。表明在1 min 时1 262 cm^{-1} 处的拉曼峰强度最强,由此说明鸭肉提取液中 CIP 分子在与金胶反应1 min 时可达到较佳的活性热点,此时的光谱增强效果较佳。在1 min 后,金胶纳米粒子与待测液的分子可能出现了聚沉现象,使得1 262 cm^{-1} 处拉曼峰强度降低。由此确定最佳吸附时间为1 min。

2.7 鸭肉中 CIP 检测的 SERS 定量分析

采集 CIP 浓度在0.2~7.0 mg/L 范围内的鸭肉提取液加标样本的 SERS 信号,根据特征峰1 262 cm^{-1} 处测得的峰强,分析了鸭肉提取液中 CIP 浓度与1 262 cm^{-1} 处特征峰强度之间的关系,并以鸭肉提取液中 CIP 的浓度(x , mg/L)为横坐标,特征峰处测得的 SERS 强度(y)为纵坐标绘制工作曲线,得回归方程为 $y = 2\,589.3x - 894.39$,决定系数(R^2)为0.987 9。表明鸭肉提取液中的 CIP 浓度在0.2~7.0 mg/L 范围内与1 262 cm^{-1} 处峰强呈良好的线性关系。

为了考察 SERS 技术检测鸭肉提取液中 CIP 残留量的可靠性,利用所得标准工作曲线方程,对 CIP 浓度为1.5,3.0,4.0,4.5,6.0 mg/L 的样本进行预测。根据回收率实验结果,得到预测样本中 CIP 的平均回收率分别为99.1%,111.7%,97.0%,97.8%,98.6%,说明采用该方法检测鸭肉中 CIP 残留量准确有效,有利于实现鸭肉中 CIP 残留的快速检测。

3 结 论

本研究进行了增强基底的紫外-可见吸收光谱分析以及鸭肉中 CIP 残留检测的 SERS 可行性分析,为鸭肉中 CIP 残留的 SERS 检测提供了依据。通过单因素分析,确定了金胶加入量、含 CIP 的鸭肉提取液加入量、氯化钠溶液加入量及最佳吸附时间。在最佳实验条件下建立了鸭肉中 CIP 残留的 SERS 检测的标准工作曲线,得到 R^2 为0.987 9,预测样本中 CIP 的平均回收率为97.0%~111.7%。

参考文献:

- [1] Cai Z, Gan B B, Li S G, Zhao J. *Technol. Dev. Chem. Ind.* (蔡卓,甘宾宾,李斯光,赵静. 化工技术与开发), **2007**, 12: 24-27, 7.
- [2] Cao Y, Jiang Y. *Chin. J. Veter. Drug* (曹莹,蒋音. 中国兽药杂志), **2012**, 6: 27-29.
- [3] Li X L, Huang X R, Wan Y W, Chen X Y. *Chinese Fishery Quality and Standards* (李小玲,黄向荣,万译文,陈湘艺. 中国渔业质量与标准), **2013**, 4: 25-30.
- [4] Gao B. *Preparation and Computational Simulation of Molecularly Imprinted Polymers with Optical and Electrochemical Properties*. Changchun: Jilin University (高波. 分子印迹光学与电化学传感材料的制备与计算机模拟. 长春: 吉林大学), **2015**.
- [5] Ju L Y, Song X H, Gu J, Xu C G, Yang L J. *J. Instrum. Anal.* (鞠玲燕,宋晓华,谷婕,徐成钢,杨丽君. 分析测试学报), **2016**, 35(6): 714-718.
- [6] Wang X T, Shi W S, She G W, Mu L X, Lee S T. *Appl. Phys. Lett.*, **2010**, 96(5): 053104.
- [7] Ma H K, Han X H, Zhang C H, Zhang X, Shi X F, Ma J. *Acta Laser Biol. Sin.* (马海宽,韩晓红,张财华,张旭,史晓凤,马君. 激光生物学报), **2014**, 23(6): 560-565.
- [8] Li C Y, Huang Y Q, Lai K Q, Rasco Barbara A, Fan Y X. *Food Control*, **2016**, 65: 99-105.
- [9] Hong Q, Liu M H, Yuan H C, Peng Y J, Li Y, Zhao J H. *Chin. J. Lumin.* (洪茜,刘木华,袁海超,彭义杰,李耀,赵进辉. 发光学报), **2015**, 36(12): 1464-1468.
- [10] Zhao J H, Liu P, Yuan H C, Peng Y J, Hong Q, Liu M H. *J. Spectrosc.*, **2016**, 2016: 1845237.
- [11] Ji W, Yao W R. *Spectrochim. Acta A*, **2015**, 144: 125-130.
- [12] Han C Q, Chen J, Wu X M, Huang X W, Zhao Y P. *Talanta*, **2014**, 128: 293-298.
- [13] Liu P, He B X, Huang Y F. China Patent (刘平,何宝祥,黄云飞. 中国专利), 201310674116.9. 2013-12-11.
- [14] Zhang Q, Weng Y X. *J. Light Scatter* (张权,翁羽翔. 光散射学报), **2015**, 27(1): 1-8.