

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.07.011

基于表面增强拉曼光谱与二维相关光谱法 检测鸡肉中恩诺沙星残留

Detection of Enrofloxacin residues in chicken based on surface enhanced Raman spectroscopy and two-dimensional correlation spectroscopy

班晶晶 刘贵珊 何建国

BAN Jing-jing LIU Gui-shan HE Jian-guo

程丽娟 樊奈昀 袁瑞瑞

CHENG Li-juan FAN Nai-yun YUAN Rui-rui

(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

摘要:利用表面增强拉曼光谱(SERS)技术结合二维相关光谱法(2D-COS)对鸡肉中恩诺沙星的拉曼光谱进行特征变量优选,使用偏最小二乘回归法(PLSR)建立恩诺沙星特征峰分析模型,并与竞争性正自适应加权算法(CARS)进行比较。结果表明,2D-COS-PLSR模型效果最优,其 R_c 、 R_p 分别为 0.979 7、0.997 2,说明采用 2D-COS 优选鸡肉中恩诺沙星浓度相关的特征谱峰是可行的。

关键词:表面增强拉曼光谱;恩诺沙星;二维相关光谱;特征峰;鸡肉

Abstract: The surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) technology and the two-dimensional correlation spectroscopy (2D-COS) were used to optimize the characteristic variables of the Enrofloxacin in chicken meat. The partial least squares regression method (PLSR) was used to establish Enro the characteristic peak analysis model of sand star was compared with the competitive positive adaptive weighting algorithm (CARS). The results showed that the 2D-COS-PLSR model has the best effect, and its R_c and R_p were 0.979 7, 0.997 2 respectively, which shows that it is feasible to use 2D-COS to optimize the characteristic spectral peaks related to the concentration of enrofloxacin in chicken.

Keywords: surface enhanced Raman spectroscopy; Enrofloxacin; two

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31560481, 75002108A1651)

作者简介: 班晶晶,女,宁夏大学在读硕士研究生。

通信作者: 刘贵珊(1979—),男,宁夏大学副教授,博士。

E-mail: liugs@nxu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-07

dimensional correlation spectrum; characteristic peak; chicken

恩诺沙星[1-乙基-6-氟-1,4-二氢-4-氧代-7-(1-哌嗪基)-1,8-萘啶-3-喹啉羧酸,ENO]是一种广谱抗生素类,其化学结构中包含一个萘啶环代替喹啉环。由于具有良好的吸收和较低的不良反应频率^[1],恩诺沙星在家禽养殖业中被广泛用于疾病的预防和治疗,但同时也会造成兽药残留。许多国家规定恩诺沙星的残留量标准为 50~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而中国规定的最高残留量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2]。

目前,常见的药物残留量检测方法有酶联免疫检测技术^[3]、气相-质谱检测技术^[4]和液相-质谱检测技术^[5]等。但这些方法的样品处理繁琐、时间长、成本高,难以实现实时快捷的准确定量检测。而表面增强拉曼光谱(SERS)技术具有敏锐、快速、高效的特征,可用于现场实时快速检测。由于 SERS 的优点,使其在科研工程中备受关注^[6-8]。将二维相关光谱法(2D-COS)与 SERS 结合可应用于乙酸乙酯中氯吡脲的检测^[9]、茶叶中残留毒死蜱的拉曼特征波优选^[10]、大米中甲基毒死蜱等拉曼光谱的特征优选^[11]及中药、油类的参假检测^[12-13]等。2D-COS 不仅增强了光谱分辨率,还可凸显重叠峰与弱峰,反映外扰因素的变化。因此,通过设置特定的外扰因素构建 2D-COS,可确定与外扰因素最相关的特征峰^[14]。

试验拟以鸡肉为研究对象,以自制银溶胶为活性基底,采用 SERS 技术与 2D-COS 技术相结合对恩诺沙星进行检测分析,为抗生素残留的快速检测提供新的方法措施,为拉曼光谱在畜禽肉类的质量安全快速检测方面提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

鸡胸肉:市售;

恩诺沙星标准品:上海源野生物科技有限公司;

乙酸乙酯、硝酸银:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

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:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;

试验用水为自制超纯水。

1.1.2 仪器与设备

激光拉曼光谱仪:DXR 型,美国 ThermoFisher 公司;

紫外分光光度计:UV1902PC 型,上海棱光技术有限公司;

均质机:FA40 型,德国弗鲁克公司;

天平:FB224 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 银溶胶的制备 参照文献[15]的方法并修改。将 150 mL 0.02% 的 AgNO_3 溶液加入至 300 mL 烧杯中,加热至沸腾,缓慢加入 4 mL 1% 的柠檬酸三钠至溶液颜色为灰绿色,再继续加热 2 min,冷却,备用。

1.2.2 鸡肉提取液的制备

(1) 鸡肉提取液的制备:参照文献[16]的方法并修改。取 200 g 鸡肉,捣碎成肉糜,于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下密封保存。准确称取 5 g 鸡肉糜和 6.0 g 无水硫酸钠于 50 mL 离心管中,加入 15 mL 乙酸乙酯,均质 1 min,6 000 r/min 离心 10 min,过滤,滤渣重复提取一次,过滤,合并上清液,即鸡肉提取液,0~4 $^\circ\text{C}$ 贮藏备用。

(2) 鸡肉提取液加标样本的配制:称取 5 mg 恩诺沙星标准品,用鸡肉提取液溶于 50 mL 棕色容量瓶中,超声溶解后定容,得 100 mg/L 的加标鸡肉提取液样本。再用鸡肉提取液将其稀释成 15 个浓度梯度,分别用字母 B~P 表示(0.05,0.10,0.30,0.50,0.70,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00,5.10,5.30,5.50,5.70,6.00 mg/L)鸡肉提取液加标样本。

1.2.3 氯化钠溶液的制备 称取 0.528 g 氯化钠溶于 100 mL 超纯水,得 0.1 mol/L 的氯化钠溶液。

1.3 SERS 光谱采集

将 400 μL 银溶胶、20 μL 待测液及 100 μL 氯化钠溶液依次加入到 2 mL 按压式带塞离心管中,混匀后进行 SERS 光谱采集。激光光源波长 780 nm,20 倍物镜,激光光源功率 6 mW,狭缝宽度 50 μm ,光谱采集范围 400~2 800 cm^{-1} 。

1.4 二维相关分析

以恩诺沙星浓度为外扰变量进行 2D-COS 分析,得

到二维相关光谱的同步和异步相关谱图。自相关峰表示化学基团对恩诺沙星浓度微扰的敏感程度,以同步二维相关谱图中的等高线反映其相关峰的强弱,峰强度越高,表明该谱峰对外扰浓度越敏感^[17]。

1.5 光谱预处理

采用标准正态化(SNV)对原始反射光谱进行预处理,采用竞争性自适应加权算法(CARS)对预处理后的光谱进行调整提取并建立预处理后光谱的偏最小二乘(PLSR)模型。

1.6 数据处理

使用 Unscrambler X 10.4 软件进行预处理和建立模型;使用 Matlab 2014a 提取特征波长;使用 Origin 8.0 软件进行数据绘图。

2 结果与讨论

2.1 鸡肉提取液加标样本的 SERS 及 2D-COS 分析

由图 1、2 可知,恩诺沙星的拉曼峰为 732,1 320,1 437,1 531,1 624 cm^{-1} ;732,921,1 080,1 320,1 437,1 531,1 624 cm^{-1} 处有较强的拉曼峰。随着鸡肉提取液加标样本浓度的变化,732,1 437 cm^{-1} 处峰值有明显变化。732 cm^{-1} 处峰是由于亚甲基的摇摆,1 320 cm^{-1} 处峰是由于对称的 O—C—O 拉伸振动,1 437 cm^{-1} 处峰是由于苯环的振动,1 531 cm^{-1} 处峰是由于苯环的伸缩,1 624 cm^{-1} 处峰是由于 C—O 伸缩振动^[18]。

由图 3 可知,732,1 320,1 437,1 531,1 624 cm^{-1} 处存在较强的自吸收峰,与 SERS 结果相同,说明采用 2D-COS 方法筛选出的 732,1 320,1 437,1 531,1 624 cm^{-1} 处峰是恩诺沙星的特征峰。而且(732,950),(732,1 086),(732,1 320),(732,1 437),(732,1 531),(1 320,732),(1 320,1 294),(1 320,1 437),(1 320,1 490),(1 320,1 531),(1 437,732),(1 437,1 320),(1 437,1 430),(1 437,1 531),(1 531,732),(1 531,1 320),(1 531,1 437),(1 531,1 531),(1 624,732),(1 624,1 320),(1 624,1 437),(1 624,1 490)和(1 624,1 531)处的光谱值均为正值,说明这些峰之间具有一定的协同作用。由图 4 可知,交叉峰(1 624,1 320),(1 531,1 320),(1 490,1 320),(1 427,685),(950,732)均为正值,其敏感性为 1 624>1 531>1 490>1 437>1 320>950>732>685,随着鸡肉提取液加标样本浓度的不同,官能团灵敏度顺序为 C=O 伸缩振动>苯环的伸缩>苯环的振动>对称的 O—C—O 拉伸振动>C—H 的摇摆>亚甲基摇摆模式>C—C 伸缩振动。

2.2 基于二维相关光谱优选变量的 PLSR 模型建立

由表 1 可知,CARS 方法的 R_c 、 R_p 分别为 0.718 2,0.876 7;2D-COS 方法的 R_c 、 R_p 分别为 0.979 7,0.997 2。结果表明,利用 2D-COS 方法优选出的 5 个恩诺沙星特征

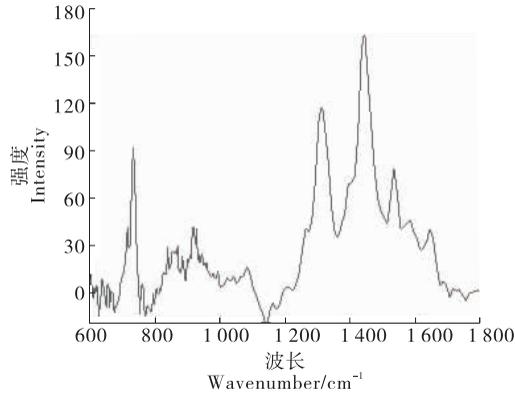


图1 恩诺沙星标准品的拉曼光谱

Figure 1 Raman spectroscopy of for Enrofloxacin

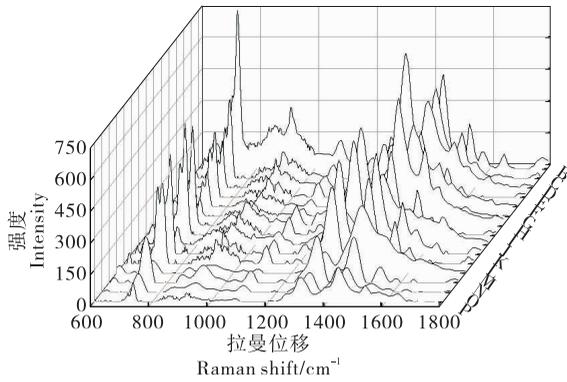


图2 鸡肉提取液加标样品的表面增强拉曼光谱图

Figure 2 Surface-enhanced Raman spectroscopy of different concentrations of Enrofloxacin chicken extract

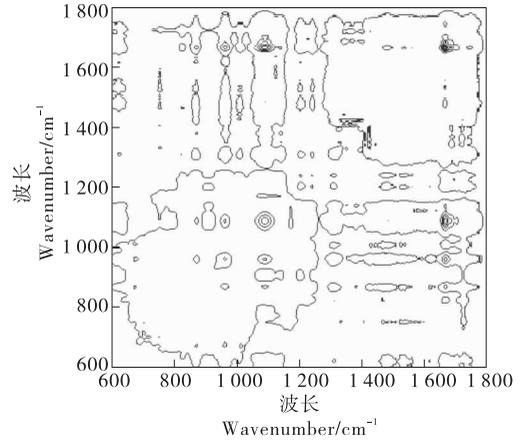


图3 拉曼二维相关同步谱图

Figure 3 2D-correlation Raman synchronous spectroscopy of Enrofloxacin

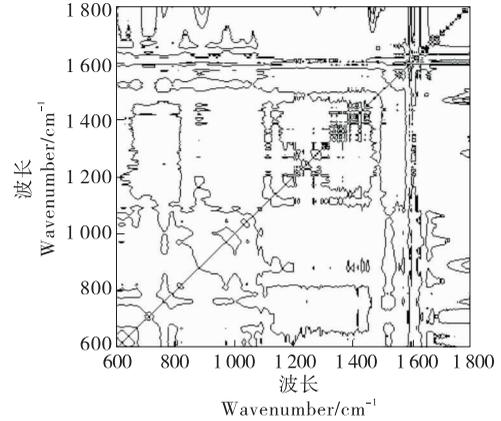


图4 拉曼二维相关异步谱图

Figure 4 2D-correlation Raman synchronous spectroscopy of Enrofloxacin

表1 基于特征波段的PLSR建模效果

Table 1 PLSR model results based on characteristic band

特征波方法	预处理方法	主成分数	校正集		交互验证		预测集	
			R_c	RMSEC	R_{cv}	RMSECV	R_p	RMSEP
CARS	SNV	6	0.718 2	0.037 2	0.624 0	0.170 1	0.876 7	0.092 7
2D-COS	SNV	4	0.979 7	0.021 7	0.837 4	0.132 2	0.997 2	0.078 9

谱峰所建立的PLSR模型性能优于CARS方法的,说明利用2D-COS方法优选的特征波建立的模型可用于鸡肉中恩诺沙星残留的实际估测。

3 结论

使用SERS技术结合2D-COS方法对鸡肉中的恩诺沙星残留进行检测。结果表明,利用2D-COS方法筛选出的5个与恩诺沙星浓度变化相关的特征峰(732,1320,1437,1531,1624 cm^{-1})与分析光谱信息得到的吸收峰吻合。相比于CARS提取特征波方法,2D-COS方法更使得大量而又复杂的光谱信息简单化且能优选出与恩诺

沙星密切相关的特征峰,使复杂的拉曼光谱分析更加简单、可靠。SERS与2D-COS结合能对恩诺沙星进行有效的特征波长优选,可应用于鸡肉中抗生素的检测。试验发现SERS信号受活性基底影响较大,自制胶体稳定性还有待提高。后续可以考虑在养殖过程中对肉鸡进行注射或饲料添加等方法,实现抗生素的均匀添加,再对鸡肉进行检测,使该检测方法得到有效的推广和普及。

参考文献

[1] LIU Yan-ming, SHI Yan-mei, LIU Zhuan-li. Determination

- of enoxacin and ofloxacin by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection in biofluids and drugs and its application to pharmacokinetics[J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(9): 941-947.
- [2] 林维宣. 各国食品中农兽药残留限量规定[M]. 大连: 大连海事大学出版社, 2002: 1 291-1 381.
- [3] KUMAR K, THOMPSON A, SINGH A K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(1): 250-256.
- [4] 陈志民, 卢军, 黄梅英, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法测定豆芽中恩诺沙星和环丙沙星[J]. *理化检验: 化学分册*, 2019, 55(8): 927-931.
- [5] 万位宁, 陈熹, 居学海, 等. 固相萃取—超高效液相色谱串联质谱法同时检测禽畜粪便中多种抗生素残留[J]. *分析化学*, 2013, 41(7): 993-999.
- [6] 陶进江, 潘桂根, 刘木华, 等. 基于表面增强拉曼光谱的鸭肉中己烯雌酚残留检测[J]. *食品与机械*, 2019, 35(2): 82-86, 195.
- [7] 徐念薇, 黄轶群, 赖克强. 基于表面增强拉曼光谱快速检测苹果汁中亚胺硫磷[J]. *食品与机械*, 2019, 35(5): 72-77.
- [8] 陈思, 郭平, 骆鹏杰, 等. 拉曼光谱法快速检测硬糖中的诱惑红[J]. *食品与机械*, 2016, 32(4): 76-79.
- [9] 卢丹, 赵武奇, 高贵田, 等. 基于二维相关技术的氯吡嘧拉曼光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(5): 1 464-1 467.
- [10] 胡潇, 吴瑞梅, 朱晓宇, 等. 表面增强拉曼光谱结合二维相关谱快速检测茶叶中的毒死蜱残留[J]. *光学学报*, 2019, 39(7): 440-449.
- [11] 胡潇, 黄俊仕, 朱晓宇, 等. 二维相关光谱在大米中甲基毒死蜱特征变量优选的应用[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(8): 946-952.
- [12] 温珍才. 基于分子光谱技术的茶树籽油掺杂检测方法研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2015: 82-89.
- [13] 陈达, 许云涛, 李奇峰, 等. 基于多尺度二维相关拉曼光谱的橄榄油掺杂检测[J]. *纳米技术与精密工程*, 2016, 14(1): 60-65.
- [14] NODA I. Advances in two-dimensional correlation spectroscopy[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2004, 36(2): 143-165.
- [15] 马君, 孔德地, 韩晓红. 应用银溶胶膜探测水中抗生素的表面增强拉曼光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2013, 33(10): 2 688-2 693.
- [16] 彭义杰. 应用表面增强拉曼光谱检测鸭肉中青霉素类抗生素残留的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016: 18-19.
- [17] 杨仁杰, 刘蓉, 徐可欣. 二维相关光谱结合最小二乘法测定牛奶中的掺杂尿素[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(6): 259-263.
- [18] ZHANG Yuan-yuan, HUANG Yi-qun, ZHAI Fu-li, et al. Analyses of enrofloxacin, furazolidone and malachite green in fish products with surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(2): 845-850.
- (上接第 16 页)
- [25] HELLSTROM A M, VAZQUES-JUAREZ R, SVANBERG U, et al. Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from Tanzanian togwa[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 136(3): 352-358.
- [26] FLORENTINA M R, ELENA B, GETUTA N, et al. Yeast biodiversity evolution over decades in Dealu Mare-Valea Calugareasca vineyard[J]. *Romanian Biotechnological Letters*, 2011, 16(1): 113-120.
- [27] MING Chun-yan, HUANG Jin, WANG Yan-yan, et al. Revision of the medically relevant species of the yeast genus *Diutina*[J]. *Medical Mycology Official Publication of the International Society for Human & Animal Mycology*, 2018, 57(2): 226-233.
- [28] 万力, 宋志霞, 杨芦荟, 等. 腹膜透析隧道阿萨希毛孢子菌感染 1 例[J]. *中国真菌学杂志*, 2018, 13(2): 93-94.
- [29] RAJU D S, SUGUNAN A, KEECHILATTU P, et al. Chemoport-related fungemia caused by *Trichosporon asahii*[J]. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 2020, 42(3): 393-400.
- [30] 冯静文. *Pichia amethionina* Y 的分离鉴定及去除豆腥味研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017: 27, 46.
- [31] 胡珺, 杜新凯, 王常高, 等. 产脂肪酶菌株的筛选鉴定及产酶条件优化[J]. *中国酿造*, 2016, 35(11): 39-43.
- [32] 贺秋红, 巩志金, 颜梅. 产脂肪酶菌株的筛选、鉴定及发酵培养基优化[J]. *中国酿造*, 2019, 38(10): 84-88.
- [33] GRÖSCH S, SCHIFFMANN S, GEISLINGER G. Chain length-specific properties of ceramides[J]. *Progress in Lipid Research*, 2012, 51(1): 50-62.
- [34] TSUJI K, MITSUTAKE S, ISHIKAWA J, et al. Dietary glucosylceramide improves skin barrier function in hairless mice[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2006, 44(2): 101-107.
- [35] RUPCIC J, MARIC V. Cerebrosides of *Candida lipolytica* yeast[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2004, 64(3): 416.
- [36] MEGYERI M, RIEZMAN H, SCHULDINER M, et al. Making sense of the yeast sphingolipid pathway[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(24): 4 765-4 775.
- [37] DICKSON R C, LESTER R L. Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1999, 1 438(3): 305-321.
- [38] KWUN K H, LEE J H, RHO K H, et al. Production of ceramide with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2006, 133(3): 203-210.