

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.12.017

SERS 结合 PCA-LDA 分析鉴别鸡肉中硝基呋喃类代谢物的混合残留

Identification of nitrofurantoin metabolites in chicken by using surface-enhanced Raman spectroscopy coupling with principal component analysis-linear discriminant analysis

郭红青^{1,2} 刘木华^{1,2} 袁海超^{1,2} 赵进辉^{1,2}

GUO Hong-qing^{1,2} LIU Mu-hua^{1,2} YUAN Hai-chao^{1,2} ZHAO Jin-hui^{1,2}

陶进江^{1,2} 陈健^{1,2} 徐宁^{1,2}

TAO Jin-jiang^{1,2} CHEN Jian^{1,2} XU Ning^{1,2}

(1. 江西农业大学工学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西农业大学生物光电及应用重点实验室, 江西 南昌 330045)

(1. College of Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China;

2. Optics-Electrics Application of Biomaterials Lab, College of Engineering, Jiangxi

Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

摘要:以纳米 Au 溶胶和 NaCl 溶液为活性增强基底,对鸡肉中残留的两种呋喃它酮代谢物(AMOX)和呋喃妥因代谢物(AHD)进行表面增强拉曼光谱(SERS)快速检测技术研究。采用自适应迭代惩罚最小二乘法消除原始数据中的背景干扰,应用标准归一化进行光谱预处理,并结合主成分—线性判别方法(PCA-LDA)建立识别模型,得出模型校正集的判别正确率为 90.48%,预测集的判别正确率为 94.29%。研究表明,SERS 技术与 PCA-LDA 相结合可以有效地鉴别出鸡肉样本中残留的 AMOX 和 AHD。

关键词:表面增强拉曼光谱法;主成分—线性判别分析;鸡肉;呋喃它酮代谢物;呋喃妥因代谢物

Abstract: Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) using gold (Au) nanoparticles and NaCl solution as SERS enhanced substrate was applied to rapidly identify furaltadone metabolite (AMOX) and nitrofurantoin metabolite (AHD) residues in chicken samples. The background interference was eliminated by using adaptive iterative re-weighted penalized least squares (air-PLS), and the spectra data was preprocessed by standard nor-

malization. The samples of four groups, i.e. chicken extract containing AHD, AMOX, AHD and AMOX, and control, were marked in sequence, and the identification model was established by combining the principal component analysis and linear discriminant analysis (PCA-LDA). The experimental results showed that the correct discriminant rate of the calibration set was 90.48%, and the correct discriminant rate of the prediction set was 94.29%. Consequently, AHD and AMOX residues in chicken samples could be identified effectively by using SERS and PCA-LDA.

Keywords: surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS); principle component analysis-linear discriminant analysis (PCA-LDA); chicken; AMOX; AHD

呋喃它酮 (Furaltadone, FTD) 和呋喃妥因 (Nitrofurantoin, NFT) 是一类人工合成的广谱抗菌药物,其骨架结构中都有 5-硝基呋喃环结构和 C=N 双键,相对分子质量小、无臭、无味或味微苦,难溶或微溶于水,且均为性质稳定的黄色粉末^[1-2]。硝基呋喃类药物因低价,抗菌效果好,且可作为促生长添加剂,被广泛用于畜禽动物的养殖业中,造成了抗生素药物不可避免地残留在畜禽动物食品中,且在动物源性食品中残留的抗生素药物不止一种。这类抗生素原药在动物机体中极不稳定,用药后迅速代谢为更稳定的物质。FTD 和 NFT 对应的代谢产物为 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噻烷基酮 (AMOX) 和氨基-2-内酰胺 (AHD)^[3]。研究^[4]表明,硝基呋喃类原药及其代

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31660485);江西省教育厅科技计划项目(编号:GJJ160350)

作者简介:郭红青,女,江西农业大学在读硕士研究生。

通信作者:赵进辉(1978—),男,江西农业大学副教授,博士。

E-mail: 9115328@qq.com

收稿日期:2019-05-22

谢产物均对人体健康有不利影响,是一类具有潜在致畸、致癌且会诱导有机体突变的物质。因此,寻找一种可以同时检测出两种或多种抗生素药物的方法极为重要。

1974年,Fleischmann等^[5]从吸附在粗糙银电极表面的吡啶上发现了表面增强拉曼散射(Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)效应。SERS技术是基于被测样品吸附在纳米溶胶颗粒表面,使其SERS信号强度比普通拉曼信号强度增强 $10^4 \sim 10^6$ 倍,与普通拉曼光谱相比,具有极强的拉曼散射增强效应^[6-7]。张璐涛等^[8]应用SERS光谱法实现了蜂蜜中的金霉素残留检测,实际样本中金霉素加标回收率均为80%~120%。陈阳等^[9]利用SERS光谱法结合化学计量学方法和支持向量回归(SVR)实现了苾与非溶液的定量分析。主成分分析法(Principle component analysis, PCA)是一种将可能有相关性的一些变量通过线性变换转换为相对独立的变量的方法,在保留原始数据有效信息的前提下,降低数据的维数,且变量的总方差维持不变^[10-12]。线性判别分析(Linear discriminant analysis, LDA)是通过降低不同物质类别内方差比例,扩大不同类别物质间的差异,以实现较高的判别正确率,使用线性判别分析可以得到数据的最佳分类特征^[13-14]。张芳等^[15]采用红外光谱结合化学计量学方法(PCA-LDA)实现对道地山药和非道地山药的有效判别,准确率分别为97.53%,98.88%。

试验拟通过简单的前处理方法对鸡肉样品中的AMOZ和AHD进行提取,然后利用SERS法结合PCA-LDA鉴别鸡肉中AMOZ和AHD残留类别(即无AMOZ和AHD残留、AMOZ残留、AHD残留和AMOZ+AHD残留共4类),为动物源性食品中多抗生素残留鉴别提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

三黄鸡:江西农业大学农贸市场;

四氯金酸三水合物:金含量 $\geq 49.0\%$,美国Sigma-Aldrich公司;

AHD标准品(纯度约为99.3%)、AMOZ标准品(纯度约为99.5%):购于中国标准物质网;

无水甲醇、乙腈、氢氧化钠、盐酸、柠檬酸三钠、氯化钠等:分析纯,南昌精科科学仪器有限公司。

1.2 仪器与设备

高速组织搅碎机:DS-1型,上海标本模型厂;

便携式拉曼光谱检测系统:包括计算机,海洋光学有限公司提供的QE65000型拉曼光谱仪、785 nm激光器、光纤及样品池等;

超声波清洗器:JK-50B型,合肥金尼克机械有限公司;

万能电磁炉:单联型,北京科技永兴仪器有限公司;

低速离心机:JW-1024型,安徽嘉文仪器装备有限

公司;

漩涡混合器:VORTEX-5型,海门市其林贝尔仪器有限公司;

石英进样瓶:直径11.5 mm,高30 mm,北京瑞盛博源科技发展有限公司。

1.3 样品制备

1.3.1 AMOZ或AHD标准储备液的配制 称取适量AMOZ或AHD标准品于容量瓶中,用超纯水溶解并定容,配成100 mg/L的AMOZ或AHD标准储备液, $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光存放备用。

1.3.2 AMOZ+AHD混合标准储备液的配制 称取适量AMOZ和AHD标准品于容量瓶中,用超纯水并溶解定容,配成AMOZ+AHD混合标准储备液, $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光存放备用。

1.3.3 鸡肉标准储备提取液的制备 取5.0 g搅碎的鸡肉样品,加入20 mL甲醇-水混合溶液(1:1,体积比),涡旋振动3 min,超声10 min,4 000 r/min离心10 min,弃上清液重复水洗1次,加入1 mol/L盐酸0.5 mL于残留物中涡旋1 min加入AMOZ(或AHD、AMOZ+AHD)标准储备液20 mL,并涡旋1 min或不进行此操作(鸡肉空白提取液的制备),加入乙腈10 mL和1 mol/L氢氧化钠0.5 mL,涡旋振动3 min,超声10 min,4 000 r/min离心10 min,取上清液,残留物再用10 mL乙腈重复提取1次,合并两次上清液,取10 mL提取液 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴氮吹至近干,用适量超纯水定容,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 有机相滤膜过滤,备用。通过该制备流程可分别得到含AMOZ或AHD的鸡肉标准储备提取液、鸡肉提取液混合加标储备液和鸡肉空白提取液。

1.3.4 不同浓度的AMOZ和AHD鸡肉提取液的制备

用鸡肉空白提取液将加标鸡肉提取液储备液稀释成不同浓度的混合工作溶液。

1.3.5 纳米Au溶胶的制备 根据文献^[16]修改如下:加热0.01%氯金酸溶液(100 mL)至沸腾后,迅速加入0.5%柠檬酸三钠溶液1.0 mL,并用玻璃棒搅拌加热10 min后,冷却到室温备用。

1.4 光谱测量

便携式拉曼光谱检测系统参数设置:根据文献^[17]略作修改。785 nm激光器选择激光光源功率520 mW;拉曼光谱仪分辨率 6 cm^{-1} ,平均信号强度 $0\sim 60\ 000\text{ au}$;采集光谱波段 $0\sim 3\ 000\text{ cm}^{-1}$,平滑度1,积分时间10 s,积分2次,取平均值;选取拉曼光谱波段 $400\sim 1\ 800\text{ cm}^{-1}$ 的光谱进行分析。

对鸡肉提取液进行拉曼光谱采集,根据文献^[17]修改如下:将0.9 mL纳米Au溶胶、50 μL 待测鸡肉提取液、100 μL NaCl溶液依次加入到2 mL石英进样瓶中,混合均匀后,放入样品池中采集其在吸附时间为0.5 min时的SERS光谱。

1.5 模型构建

1.5.1 样品预处理 先采用自适应迭代惩罚最小二乘法消除背景干扰,使用 Matlab 2010 软件进行操作;再对拉曼光谱强度进行最大值标准归一化预处理,将样品数据标准归一化,使用软件 The Unscrambler X 10.1 进行操作。

1.5.2 PCA 分析 采用 PCA 对预处理后的数据进行降维处理,提取特征变量,使用软件 The Unscrambler X 10.1 进行操作。

1.5.3 LDA 分析 使用 The Unscrambler X 10.1 软件进行 LDA 分析。总样本数 280 个,随机选取 3/4 的样本(210 个样本)作为校正集样本^[18],建立判别模型;其余 70 个样本作为预测集样本,用分类正确率(即模型预测正确的样本数与总样本个数之比)来验证判别模型的有效性。将含 AHD 的鸡肉提取液样品、含 AMOZ 的鸡肉提取液样品、含 AHD+AMOZ 的鸡肉提取液样品、鸡肉空白提取液样品依次标记为 1~4,进行模型识别。其中,含 AHD 的鸡肉提取液样品中 AHD 浓度为 0.5~25.0 mg/L,含 AMOZ 的鸡肉提取液样品中 AMOZ 浓度为 0.2~25.0 mg/L,含 AHD+AMOZ 的鸡肉提取液样品中 AHD 和 AMOZ 浓度分别为 1.0~25.0,0.5~25.0 mg/L,鸡肉空白提取液样品不含 AHD 和 AMOZ。

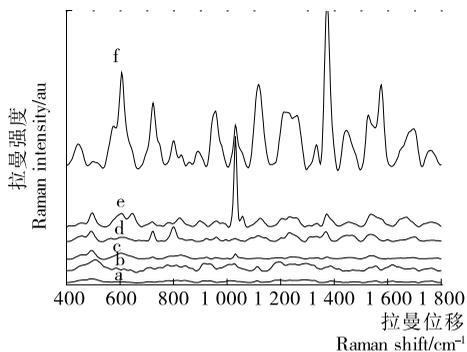
2 结果与分析

2.1 鸡肉样本的 SERS 光谱

由图 1 可知,通过单峰无法直接将鸡肉中残留的 AMOZ 和 AHD 类别分辨出来。

2.2 鸡肉中 AHD 和 AMOZ 残留的主成分提取

通过试验可知,前 3 个主成分对鸡肉中 AHD 和 AMOZ 残留的光谱数据的贡献率分别为 57.77%,37.62%,3.31%,累计贡献率分别为 57.77%,95.39%,98.70%;随着主成分数目的增加,主成分的贡献率越来越小,其中 PC1 贡献率最大,为 57.77%;当主成分数目为 3 时,累计贡献率达 98.70%,表明前 3 个主成分因子可代



a. 纳米金胶 b. 纳米金胶+氯化钠 c. 鸡肉提取液 d. 含 AMOZ 的鸡肉提取液 e. 含 AHD 的鸡肉提取液 f. 含 AMOZ+AHD 的鸡肉提取液

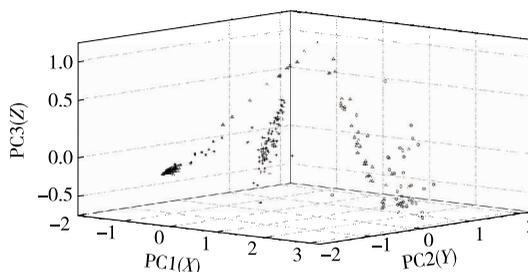
图 1 SERS 光谱图

Figure 1 The spectra of SERS

表原始数据信息中的大部分有效信息,在保证检测有效性的基础上,很大程度上消除了较多无用信息,提高了检测分析效率^[19-20]。因此,选择前 3 个主成分绘制得分图。

2.3 主成分得分

由图 2 可知,鸡肉提取液中只含 AHD 的样品绝大部分都分布在 X 轴、Y 轴的正半轴及 Z 轴负半轴部分;鸡肉提取液中只含 AMOZ 的样品都聚集在一起,基本都在 YZ 平面;鸡肉空白提取液样品产生团簇现象,基本集中在 XZ 平面与 YZ 平面的交界处;而鸡肉提取液中含 AHD 和 AMOZ 两种代谢物的样品出现了分离现象,一部分与鸡肉提取液中只含 AHD 的样品重合,一部分与鸡肉提取液中只含 AMOZ 的样品重合,说明含 AHD 和 AMOZ 的鸡肉提取液样品的拉曼峰中不仅有只含 AHD 的鸡肉提取液样品的拉曼峰,还有只含 AMOZ 的鸡肉提取液样品的拉曼峰。从图 2 可以看出,应用主成分分析方法可以有效地鉴别出鸡肉提取液中是否含有 AHD,是否含有 AMOZ,但不能有效鉴别出含 AHD 和 AMOZ 的鸡肉提取液样品。



空心圆表示含 AHD 的鸡肉提取液;五角星表示含 AMOZ 的鸡肉提取液;三角形表示含 AHD+AMOZ 的鸡肉提取液;加号表示鸡肉空白提取液

图 2 主成分得分三维散点图

Figure 2 3D scatter plot of PCA scores

2.4 模型及预测结果

由表 1 可知,在建立的模型中鸡肉空白提取液样本的校正集和预测集的判别正确率都达到了 100%;只含 AHD 的鸡肉提取液样品的校正集的判别正确率为 96.67%,预测集的判别正确率为 100%;含 AHD 和 AMOZ 的鸡肉提取液样品的校正集的判别正确率为 89.33%,预测集的判别正确率为 96%;而只含 AMOZ 的鸡肉提取液样品的校正集的正确识别率较低,为 63.33%,预测集的正确率为 70%,可能是鸡肉中只含 AMOZ 时的拉曼峰会与鸡肉中同时含 AHD 和 AMOZ 时的拉曼峰有重合。

结合图 2 和表 1 可知,鸡肉中分别只含 AHD 和 AMOZ 的样品的主成分得分散点图均与鸡肉中同时含 AHD 和 AMOZ 的样品的得分散点图有部分重合,当模型识别时,很可能将只含 AHD 的和只含 AMOZ 的样品被认为是鸡肉中同时含 AHD 和 AMOZ 的样品。但总体而言,模型校正集的判别正确率为 90.48%,预测集的

表 1 主成分—线性判别模型的结果
Table 1 The results of PCA-LDA model

样品	校正集			预测集		
	正确数	错误数	判别正确率/%	正确数	错误数	判别正确率/%
仅含 AHD 的鸡肉提取液	29	1	96.67	10	0	100.00
仅含 AMOZ 的鸡肉提取液	19	11	63.33	7	3	70.00
含 AHD+AMOZ 的鸡肉提取液	67	8	89.33	24	1	96.00
鸡肉空白提取液	75	0	100.00	25	0	100.00
总计	190	20	90.48	66	4	94.29

正确率为 94.29%。故应用 PCA-LDA 建立的模型能有效识别鸡肉提取液中是否含 AHD 和 AMOZ,且可以鉴别出鸡肉中 AHD 和 AMOZ 残留的类别。

3 结论

试验以纳米 Au 溶胶和 NaCl 溶液为活性增强基底,应用 SERS 技术结合 PCA-LDA 对鸡肉中 AHD 和 AMOZ 残留进行识别分类。对鸡肉中 AHD 和 AMOZ 残留的 4 类样品建立的模型中,校正集的判别正确率为 63.33%~100.00%,总的判别正确率为 90.48%;预测集的判别正确率为 70.00%~100.00%,总的判别正确率达到了 94.29%。试验结果表明,与液相色谱、气相色谱等传统检测方法相比,应用 PCA-LDA 能快速鉴别出鸡肉中 AHD 和 AMOZ 残留的类别,是鸡肉中抗生素残留快速检测的发展趋势。后期可采用非加标样本来完善预测模型,进而为鸡肉中的其他抗生素残留快速检测的实现提供重要理论依据。

参考文献

- [1] 侯向昶, 黄金凤, 杜志峰, 等. SPE-LC-MS/MS 法检测肉粉中 5 种硝基喹啉类药物的代谢物[J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1 381-1 385.
- [2] 王明明, 许娜, 唐云, 等. 食品中硝基喹啉类药物残留检测方法的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(8): 2 202-2 207.
- [3] VERDON E, COUEDROR P, SANDERS P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaladone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry-in-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 586(1/2): 336-347.
- [4] FRANEK M, DIBLIKOVA I, CERNOCH I, et al. Broad specificity immunoassays for sulfonamide detection: Immunochemical strategy for generic antibodies and competitors[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(5): 1 559-1 567.
- [5] FLEISCHMANN M, HENDRA P J, MC QUILLAN A J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode[J]. *Chemical Physics Letters*, 1974, 26(2): 163-166.
- [6] 樊玉霞, 赖克强, 黄轶群. 表面增强拉曼光谱技术在食品痕量化学危害检测中的应用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2014, 34(7): 1 859-1 864.
- [7] JEANMARIE D L, VAN DUYN R P. Surface Raman spectroelectrochemistry[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1977, 84(1): 1-20.
- [8] 张璐涛, 周光明, 罗丹, 等. 表面增强拉曼光谱快速检测蜂蜜中的金霉素残留[J]. *高等学校化学学报*, 2018, 39(8): 1 662-1 667.
- [9] 陈阳, 严霞, 张旭, 等. 基于支持向量机算法的多环芳烃表面增强拉曼光谱的定量分析[J]. *中国激光*, 2019, 46(3): 298-305.
- [10] 徐天扬, 杨娟, 孙晓荣, 等. 中红外光谱法结合支持向量机快速鉴别蜂蜜品种[J]. *激光与光电子学进展*, 2018, 55(6): 431-439.
- [11] 李康, 张毛毛, 杨忠, 等. 基于神经网络的人造板装饰纸表面色泽特征分类研究[J]. *林业工程学报*, 2018, 3(1): 16-20.
- [12] 樊双喜, 钟其顶, 黄占斌, 等. 基于非目标~1H NMR 指纹图谱技术验证中国葡萄酒原产地[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(2): 1-11.
- [13] 白云慧, 温海超, 张磊, 等. 基于酚类化合物组成差异的 7 类植物油脂识别研究[J]. *食品科学*, 2017, 39(2): 1-13.
- [14] 张新新, 李雨, 纪玉佳, 等. 主成分—线性判别分析在中药药性识别中的应用[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2012, 50(1): 143-146.
- [15] 张芳, 周昊, 徐蓉, 等. 红外光谱结合 PCA-LDA 判别道地和非道地山药[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(24): 217-220.
- [16] 余婉松. 基于金属溶胶表面增强拉曼光谱技术检测饲料及水产品中呋喃唑酮和孔雀石绿的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015: 11.
- [17] 郭红青, 刘木华, 袁海超, 等. 应用表面增强拉曼光谱法快速检测鸭肉中呋喃唑酮代谢物残留[J]. *分析实验室*, 2017, 36(10): 1 141-1 145.
- [18] CHEN Jian, LIU Mu-hua, YUAN Hai-chao, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for classification of testosterone propionate and nandrolone residues in chicken[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2018, 99: 7-12.
- [19] 郭英姿, 贾文庆, 刘会超, 等. 32 个品种芍药观赏性状的主成分分析[J]. *北方园艺*, 2018, 42(4): 110-116.
- [20] 卢明艳, 潘越, 安鹭, 等. 基于因子分析的加工型苹果品质性状的综合评价[J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(1): 130-137.