

鸭肉中吉他霉素残留的 SERS 测定

Detection of kitasamycin residues in duck meat using surface-enhanced Raman spectroscopy

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

ZHAO Jin-hui^{1,2} HONG Qian^{1,2} YUAN Hai-chao^{1,2} LIU Mu-hua^{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, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

摘要:应用表面增强拉曼光谱(SERS)法建立一种鸭肉中吉他霉素(KIT)残留的快速检测方法。在分析增强基底的紫外—可见吸收光谱与鸭肉中KIT的SERS光谱的基础上,采用单因素试验法优化了鸭肉中KIT的SERS检测条件,并分别建立了KIT水溶液检测与鸭肉中KIT残留检测的标准曲线。试验结果表明,KIT水溶液检测的标准曲线方程 $y = 0.046 2x + 0.215 3$,决定系数(R^2)为0.927 9,对KIT水溶液预测的平均回收率为99%~123%。鸭肉中KIT残留检测的标准曲线方程为 $y = 0.011 9x + 0.940 9$, R^2 为0.923 2,对鸭肉中KIT预测的平均回收率为104%~108%。采用SERS技术检测鸭肉中KIT残留是可行的。

关键词: 吉他霉素; 表面增强拉曼光谱; 鸭肉; 检测

Abstract: By applying surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), a rapid detection of Kitasamycin (KIT) residues in duck meat was proposed. On the bases of analyzing UV-visible absorption spectrum of enhanced substrate and SERS of KIT in duck meat, the SERS detection conditions of KIT in duck meat, the addition amount of duck meat extract containing KIT and adsorption time, were optimized by single factor method, and the standard curves for the detection of KIT aqueous solution and KIT residues in duck meat were build respectively. The experiment results showed that the standard curve equation and the coefficient of determination were $y = 0.046 2x + 0.215 3$ and 0.927 9 respectively for the detection of KIT in aqueous solution with the average recovery rate of 99%~123%. The standard curve

equation and the coefficient of determination were $y = 0.011 9x + 0.940 9$ and 0.923 2 respectively for the detection of KIT residues in duck meat with the average recovery rate of 104%~108%. The experiment results showed that it was feasible to detect the KIT residues in duck meat by using SERS technology.

Keywords: Kitasamycin; surface-enhanced Raman spectroscopy; duck meat; detection

吉他霉素(Kitasamycin, KIT)是一种半合成畜禽专用的16元环大环内酯类抗生素^{[1]5-6}。由于KIT比泰乐菌素(Tylosin, TYS)对溶血性巴氏杆菌与畜禽霉形体等有更好的抗菌活性,在预防及治疗鸡、鸭等畜禽呼吸道与肠道疾病中使用广泛且效果良好^{[1]6-8[2]}。但容易造成KIT在鸭等畜禽可食用组织中残留,有潜在危害人们身体健康的可能性^{[1]11}。目前可用于畜禽组织中的KIT等大环内酯类抗生素检测的传统方法有高效液相色谱法^[3]、微生物法^[4]、气质联用法^[5]、液质联用法^[6]等。但这些方法往往需要昂贵的仪器设备或复杂耗时的样品处理过程^[7],在鸭肉中的KIT快速检测中较难应用。表面增强拉曼光谱(Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)是一种快速、灵敏的化学与生物化学分析技术,已经在食品污染物检测中表现出了巨大的潜力^[8]。Zhang Yuan-yuan等^[9]应用表面增强拉曼散射检测鱼组织中的孔雀石绿和无色孔雀石绿残留, Zhai Fu-li等^[10]采用SERS来快速检测猪尿中的莱克多巴胺残留,表明采用SERS技术进行鸭肉中的KIT残留快速检测是可行的。基于此,本研究拟在分析增强基底的紫外—可见吸收光谱和鸭肉中KIT的SERS光谱的基础上,分析含KIT的鸭肉提取液的加入量和吸附时间对SERS信号强度的影响,并分别建立KIT水溶液与鸭肉中KIT残留检测的标准曲线,旨在为实现快速检测鸭肉中KIT残留打下基础。

基金项目: 江西省科技厅对外科技合作计划项目(编号: 20132BDH80005); 江西省科技厅科技支撑项目(编号: 20121BBG70058)

作者简介: 赵进辉,男,江西农业大学副教授,博士。

通信作者: 刘木华(1969—),男,江西农业大学教授,博士。

E-mail: suikelmh@sohu.com

收稿日期: 2017-01-15

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样品

麻鸭:购于江西农业大学菜市场。

1.1.2 试验试剂

吉他霉素标准品:纯度约为 92.0%,购于中国物质标准网;

OTR202 和 OTR103:欧普图斯光学纳米科技有限公司;

乙酸乙酯、正己烷:分析纯,汕头西陇化工股份有限公司。

1.1.3 试验设备

便携式激光拉曼光谱仪:RamTracer-200-HS 型,欧普图斯光学纳米科技有限公司;

超声波清洗器:JK-50B 型,合肥金尼克机械有限公司;

漩涡混合器:VORTEX-5 型,海门市其林贝尔仪器有限公司;

离心机:JW-1024 型,安徽嘉文仪器装备有限公司;

氮吹仪:HSC-24B 型,天津市恒奥科技发展有限公司;

实验室超纯水机:T10 型,湖南科尔顿水务有限公司;

紫外可见分光光度计:T6 系列,北京普析通用仪器责任有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 含 KIT 的鸭肉提取液加标样本溶液的配 置 用搅拌机将麻鸭胸脯肉搅碎,然后用电子天平称取搅碎的鸭胸脯肉 5 g,用移液枪取乙酸乙酯 10 mL,一起加入到离心管中。将离心管放在漩涡混合器上振荡 1 min,用低速离心机离心 15 min(4 500 r/min)。用移液枪取上清液 4 mL,向其中加入正己烷 2 mL,用漩涡混合器涡旋振荡 1 min。待其静置分层后,移去下层白色沉淀物。重复处理 3 次后,用氮吹仪在 30 ℃温水浴条件下将其吹干,然后用超纯水定容到 4 mL 即为鸭肉提取液。将 10 mg KIT 溶于 100 mL 鸭肉提取液中得到含 100 mg/L KIT 的鸭肉提取液加标储备液。用鸭肉提取液将其稀释可得含不同浓度 KIT 的鸭肉提取液加标样本溶液。

1.2.2 KIT 标准品样本溶液的配 置 将 KIT 标准品 10 mg 用超声波清洗器超声溶解于 100 mL 超纯水中,得到 100 mg/L 的 KIT 标准储备液。用超纯水将其稀释可得不同浓度的 KIT 标准品样本溶液。

1.2.3 紫外—可见吸收光谱的采 集 用 T6 系列紫外可见分光光度计分别采集金溶胶 OTR202 和由 OTR202、KIT 水溶液和 OTR103 组成的混合溶液的紫外—可见吸收光谱,其光谱的扫描范围为 400~700 nm。

1.2.4 SERS 光谱的采 集 使用便携式激光拉曼光谱仪采集试验样本的拉曼光谱。拉曼光谱仪的参数设置:激光波长 785 nm、激光功率 200 mW,分辨率 6 cm^{-1} ,积分时间 10 s,积分 2 次求平均值。待测混合溶液中金胶 OTR202、待测样品与 OTR103 的体积分别为 500,20,100 μL 。

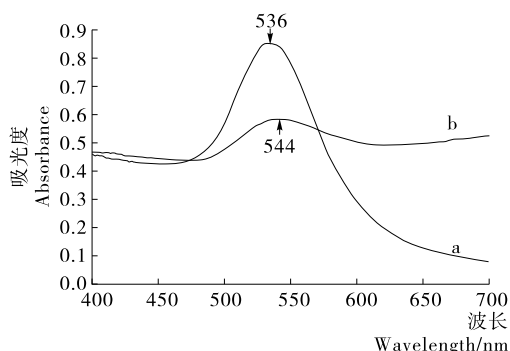
1.2.5 SERS 光谱的前处理方法 样本的拉曼光谱均采集

5 次,并取平均值进行数据分析。在标定曲线建立前均应用自适应迭代重加权惩罚最小二乘法 (air-PLS) 扣除样本拉曼光谱中的荧光等背景信号。

2 结果与分析

2.1 增强基底的紫外—可见吸收光谱

由图 1 可知,金溶胶 OTR202 的最大吸收峰峰位约在 536 nm 处,同时拥有较窄的半峰宽(约 50 nm),说明本次使用的 OTR202 金纳米粒子拥有较均匀的粒径分布和较好的增强潜力;OTR202、KIT 水溶液和 OTR103 组成的混合溶液的最大吸收峰峰位(544 nm)相对于 OTR202 的峰位红移了约 8 nm,同时半峰宽增大。说明 KIT 分子已经吸附到了增强基底表面。



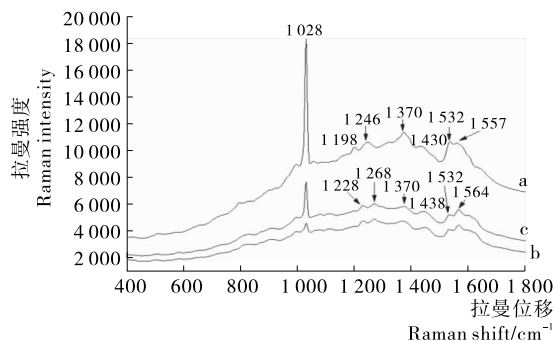
a. OTR202 b. OTR202+KIT+OTR103

图 1 紫外—可见吸收光谱图

Figure 1 UV-Vis absorption spectrum

2.2 鸭肉中 KIT 的 SERS 分析及归属

由图 2 可知,鸭肉提取液的主要 SERS 特征峰为 1 557, 1 532, 1 430, 1 370, 1 246, 1 208, 1 198 cm^{-1} ;KIT 水溶液的主要 SERS 特征峰为 1 564, 1 532, 1 444, 1 364, 1 268, 1 228, 1 208 cm^{-1} ;含有 KIT 的鸭肉提取液的主要 SERS 特征峰为 1 564, 1 532, 1 438, 1 370, 1 268, 1 228, 1 208 cm^{-1} 。对比 3 条光谱曲线可知,1 532, 1 370, 1 208 cm^{-1} 为三者共同的 SERS 特征峰,同时,含有 KIT 的鸭肉提取液的 SERS 特征峰(1 438, 1 564 cm^{-1})分别与鸭肉提取液的 SERS 特征峰 1 430, 1 557 cm^{-1} 的峰位比较靠近,因此,上述 SERS 特征峰



a. 鸭肉提取液 b. KIT 水溶液 c. 含有 KIT 的鸭肉提取液

图 2 样品的 SERS 光谱图

Figure 2 SERS spectra of duck meat extract, KIT solution and duck meat extract containing KIT

不适合用于检测鸭肉中 KIT 存在的 SERS 特征峰。而 $1\ 228, 1\ 268\ \text{cm}^{-1}$ 处 SERS 特征峰出现在 KIT 水溶液和含有 KIT 的鸭肉提取液的 SERS 光谱曲线上,在鸭肉提取液的 SERS 光谱曲线上没有出现。因此, $1\ 228, 1\ 268\ \text{cm}^{-1}$ 作为判别鸭肉中 KIT 存在的 SERS 特征峰,同时为了减小外界因素和光谱分析的非线性,以 $1\ 268\ \text{cm}^{-1}$ 与 $1\ 228\ \text{cm}^{-1}$ 峰高比 ($I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$) 作为变量进行后续分析和处理。 $1\ 228\ \text{cm}^{-1}$ 处 SERS 特征峰的产生可能与吡喃基团上的 C—H 剪切振动、C—H 和 O—H 摇摆振动有关, $1\ 268\ \text{cm}^{-1}$ 处 SERS 特征峰的产生可能是吡喃基团上的 C—H 和 O—H 摇摆振动^[11-12]。

2.3 鸭肉中 KIT 检测条件的优化

为了获得更好的鸭肉中 KIT 残留的 SERS 检测效果,本研究尝试优化含 KIT 的鸭肉提取液的加入量和吸附时间。在固定 OTR202(500 μL) 和 OTR103(100 μL) 加入量的条件下,改变含 KIT(浓度:15.0 mg/L) 的鸭肉提取液加入量,得到如图 3(a) 所示的变化趋势。由图 3(a) 可知,随着含 KIT 的鸭肉提取液加入量的增加,比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 呈先增大后减小的趋势,说明增强基底与含 KIT 的鸭肉提取液之间的体积比会影响比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 的大小。同时,当含 KIT 的鸭肉提取液加入量达到 20 μL 时,比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 达到最大值,基于此,选定含 KIT 的鸭肉提取液加入量是 20 μL 。

图 3(b) 给出了比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 随吸附时间的变化趋势图。由图 3(b) 可知,不同吸附时间比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 不同,说

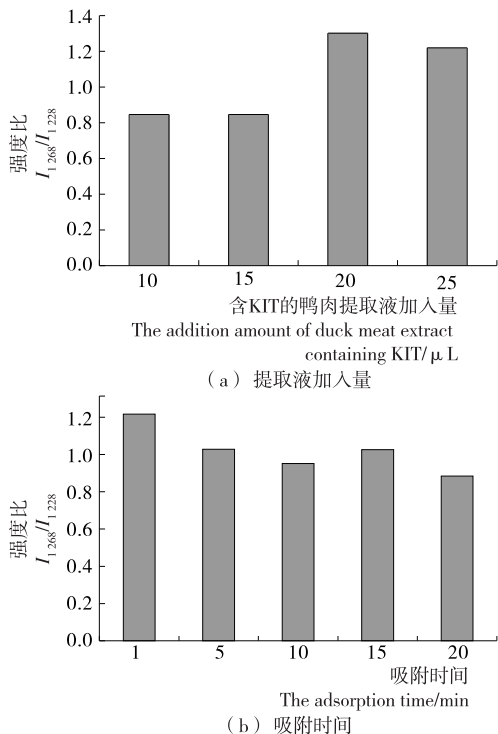


图 3 含 KIT 的鸭肉提取液加入量和吸附时间对 SERS 信号的影响

Figure 3 Effect of the addition amount of duck meat extract containing KIT and adsorption time on SERS intensity

明不同吸附时间金纳米粒子 OTR202 聚集产生的活性热点会对鸭肉中 KIT 的 SERS 特征峰强度产生影响。吸附 1 min 时,比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 最大,说明在给定的吸附时间范围内,1 min 为较优的吸附时间。

2.4 KIT 水溶液检测的标准曲线及预测结果

以 KIT 水溶液的浓度为横坐标,以 SERS 特征峰比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 为纵坐标,建立了 KIT 水溶液检测的标准曲线。由图 4 可知,KIT 水溶液检测的标准曲线方程 $y=0.046\ 2x+0.215\ 3$,决定系数 (R^2) 为 0.927 9,说明 KIT 水溶液浓度 (0.05~28.0 mg/L) 与比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 具有一定的线性关系,水溶液中 KIT 的最低检测限可达 0.05 mg/L。为了验证该标准曲线检测 KIT 水溶液的可靠性,对不同浓度的 KIT 水溶液进行预测,结果见表 1。由表 1 可知,对 KIT 水溶液预测的平均回收率为 99%~123%,说明本研究方法的可靠性较好,可为后续建立鸭肉中 KIT 残留的 SERS 检测提供依据。

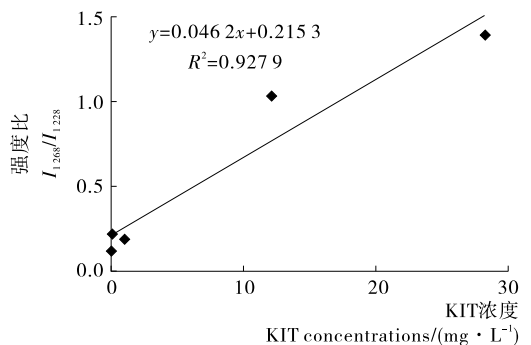


图 4 KIT 水溶液的标准曲线

Figure 4 Standard curve of KIT solution

表 1 KIT 水溶液预测结果分析

Table 1 Analysis of prediction results for KIT aqueous solution ($n=5$)

实际值/(mg · L ⁻¹)	预测值/(mg · L ⁻¹)	平均回收率/%
5.0	5.093 7	101.87
19.0	23.313 2	122.70
23.0	22.691 0	98.66

2.5 鸭肉中 KIT 残留检测标准曲线的确定与预测结果

以鸭肉提取液中 KIT 浓度为横坐标,以 SERS 特征峰比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 为纵坐标,得到的鸭肉提取液中 KIT 检测的标准曲线见图 5。由图 5 可知,鸭肉中 KIT 残留检测的标准曲线方程为 $y=0.011\ 9x+0.940\ 9$, R^2 为 0.923 2,表明鸭肉中的 KIT 浓度与比值 $I_{1\ 268}/I_{1\ 228}$ 呈良好的线性关系。为了验证该标准曲线检测鸭肉提取液中 KIT 残留的可靠性,对鸭肉提取液中的 KIT 残留进行预测,结果见表 2。由表 2 可知,对鸭肉中 KIT 预测的平均回收率为 104%~108%。表明采用 SERS 方法来检测鸭肉中的 KIT 残留是可行的。

3 结论

本研究进行了增强基底的紫外—可见吸收光谱与鸭肉

表2 鸭肉提取液中的KIT的预测结果分析

Table 2 Analysis of prediction results for KIT residues in duck meat ($n=5$)

实际值/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	预测值/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均回收率/%
10.0	10.835 0	108.35
30.0	32.409 3	108.03
35.0	36.553 8	104.44

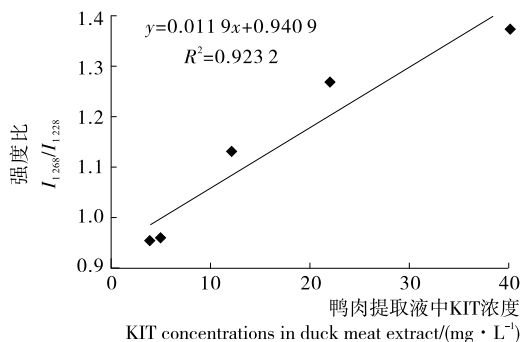


图5 含KIT的鸭肉提取液的标准曲线

Figure 5 Standard curve of duck meat extract containing KIT

中KIT的SERS分析,确定了以峰高比 I_{1268}/I_{1228} 作为鸭肉中KIT残留快速检测的SERS分析特征变量。对含KIT的鸭肉提取液加入量和吸附时间进行优化。KIT水溶液检测的标准曲线方程 $y = 0.0462x + 0.2153$, R^2 为0.9279,对KIT水溶液预测的平均回收率为99%~123%。鸭肉中KIT残留检测的标准曲线方程为 $y = 0.0119x + 0.9409$, R^2 为0.9232,对鸭肉中KIT预测的平均回收率为104%~108%。

参考文献

- [1] 张楠. 替米考星在肉鸭体内生物利用度及组织分布研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [2] 郭立刚. 不同剂型吉他霉素对肉仔鸡生产性能的影响[J]. 饲料与畜牧, 2012, 21(9): 31-33.
- [3] 刘晔. 动物性食品中大环内酯类抗生素残留的HPLC分析[D]. 无锡: 江南大学, 2007: 13-22.
- [4] 黄晓蓉, 郑晶, 吴谦, 等. 食品中多种抗生素残留的微生物筛检方法研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 418-421.
- [5] TAKASUKI K, USHIZAWA I, SHOJI T. Gas chromatography-mass spectrometric determination of macrolide in beef and pork using single ion monitoring[J]. Chromatogr, 1987, 391: 207-217.
- [6] HORIE M, HARUMI T, KAZUO T. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. Acta Analytica Chimica Acta, 2003, 492(1/2): 187-197.
- [7] TAN Hong-liang, CHEN Yang. Silver nanoparticle enhanced fluorescence of enropium(III) for detection of tetracycline in milk[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 173: 262-267.
- [8] LI Chun-ying, HUANG Yi-qun, PEI Lu, et al. Analyses of Trace Crystal Violet and Leucocrystal Violet with Gold Nanospheres and Commercial Gold Nanosubstrates for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy[J]. Food Anal. Methods, 2014, 7(10): 2107-2112.
- [9] ZHANG Yuan-yuan, YU Wan-song, PEI Lu, et al. Rapid analysis of malachite green and leucomalachite green in fish muscles with surface-enhanced resonance Raman scattering[J]. Food Chemistry, 2015, 169: 80-84.
- [10] ZHAI Fu-li, HUANG Yi-qun, LI Chun-ying, et al. Rapid Determination of Ractopamine in Swine Urine Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(18): 10023-10027.
- [11] 朱自莹, 顾仁放, 陆天虹. 拉曼光谱在化学中的应用[M]. 沈阳: 东北大学出版社, 1998: 295-307.
- [12] 许以明. 拉曼光谱及其在结构生物学中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 90-124.

信息窗

韩国正式实施致敏食品标示制度

5月29日,韩国食品药品安全处(MFDS)发表消息称,自本月30日起,正式实施“致敏食品标示制度”,对于烹饪、销售汉堡、披萨等儿童嗜好食品的食品服务业中连锁企业连锁店在100家以上的必须进行致敏食品标示。

随着标示制度的实施,消费者在烹饪、销售糕点、面包类、冰淇淋类、汉堡、披萨等儿童嗜好食品的快餐店等连锁店也可以确认致敏信息进行选择购买。

致敏食品标示对象有:使用含有蛋类(仅限家禽类)、牛奶、荞麦、花生、大豆、小麦、鲑鱼、蟹、虾、猪肉、桃子、西红柿、亚硫酸盐残留量超过10 mg/kg时(以 SO_2 计)、核桃、

鸡肉、牛肉、鱿鱼、贝类(牡蛎、鲍鱼、海虹等)等类似致敏食品时,与用量或含量无关均要标识致敏原材料名称。

卖场中烹饪、销售的相关食品要在菜单等的产品名称或价格周围标识相关原料名称,或在册子或海报中统一标识致敏食品信息。

通过网站等线上下单的食品,要在相关网页标识该原材料名称;以电话下单的情况,要一并提供标有致敏原材料名称的传单、标签等。

(来源:www.foodmate.net)