

安全监测

基于 SERS 技术检测牛奶中环丙沙星的研究^{*}韩斯琴高娃¹, 孙佳², 包琳², 赵航², 哈斯乌力吉^{2**}

(1. 内蒙古民族大学附属医院, 通辽 028007;

2. 哈尔滨工业大学可调谐(气体)激光技术国家级重点实验室, 哈尔滨 150080)

摘要 目的: 建立牛奶中环丙沙星的表面增强拉曼光谱(SERS)检测方法。**方法:** 对环丙沙星的主要拉曼峰进行归属, 选取 $1\,384\text{ cm}^{-1}$ 拉曼特征峰, 在最佳实验条件下进行了 SERS 检测。**结果:** 环丙沙星在牛奶中检测下限约为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 牛奶溶液中特征峰强度与浓度的曲线方程为 $Y=224.244\,8+2.582\,4X$, $R^2=0.939$, 回收率在 92.7%~108.3% 之间, RSD 小于 8.3%。**结论:** 该方法具有快速、准确、无损及操作简便等优点, 在牛奶中环丙沙星的检测具有一定的应用潜力。

关键词: 食品安全; 牛奶; 药物残留; 环丙沙星; 银溶胶; 检测下限; 快速鉴别; 表面增强拉曼光谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)05-0802-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.05.10

Detection of ciprofloxacin in milk based on SERS technology^{*}HAN Si-qin-gao-wa¹, SUN Jia², BAO Lin², ZHAO Hang², HASI Wu-li-ji^{2**}

(1. Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028007, China;

2. National Key Laboratory of Science and Technology on Tunable Laser, Harbin Institute of Technology, Harbin 150080, China)

Abstract Objective: To establish a method for the surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) detection of ciprofloxacin in milk. **Methods:** Main Raman vibration characteristic peaks of the ciprofloxacin molecules were identified. The Raman characteristic peak at $1\,384\text{ cm}^{-1}$ was selected and the SERS detection of ciprofloxacin was carried out under the optimal experimental conditions. **Results:** The limit of detection of ciprofloxacin was $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in milk. The equation curve of the characteristic peak intensity and concentrations in milk was $Y=224.244\,8+2.582\,4X$. The linear correlation coefficient (R^2) was 0.939. The recovery of this method ranges from 92.7% to 108.3%. The RSD is less than 8.3%. **Conclusion:** The SERS detection method is rapid, accurate, nondestructive and easy to operate. It has a good potential in terms of ciprofloxacin detection in milk.

Keywords: food safety; milk; drug residues; ciprofloxacin; silver colloid; limit of detection; rapid identification; SERS

食品安全是全球的一项重大问题, 快速识别和检测食品中存在的有害物质是食品检测中的一项重要

任务。随着人民生活质量的逐渐提升, 牛奶已经成为现代人必不可少的食品, 因此对牛奶安全质量的监控

* 国家国际技术合作专项项目 (No.2011DFA31770) 资助的课题

** 通信作者 Tel: 13644563962; E-mail: hasiwuliji@sohu.com

第一作者 Tel: 15134747958; E-mail: hansiqin@126.com

管理显得尤为重要。在食品畜禽动物的饲料中适当添加抗生素,可有效阻止肠道有害菌增殖,使畜禽机体保持健康,减少发病率,但是抗生素的滥用给人们的身体健康带来威胁。例如大量或经常饮用含有抗生素的牛奶,人体内抗生素超标,会使侵入人体的细菌产生抗药性,从而面临更大的健康威胁。因此,建立牛奶中抗生素的检测方法在食品安全上有着重要意义。

环丙沙星属于喹诺酮类抗菌药物,是目前广泛应用的抗生素之一^[1]。当前,国内外对于喹诺酮类抗生素残留的检测方法多有报道,主要包括分光光度法^[2],高效液相色谱法^[3],液质联用法^[4],电化学法^[5]和微生物法等^[6]。由于上述检测方法都存在预处理过程烦琐、检验周期长、检测成本高、仪器昂贵等缺点,因此严重限制了现场检测的推广和应用。针对上述问题,本文提出利用表面增强拉曼光谱(SERS)技术检测牛奶中的环丙沙星,该方法具有快速、准确、无损及操作简便等优点。

拉曼光谱可以检测样品中存在的化学物质及其相对含量^[7-8],SERS技术不仅继承了常规拉曼光谱技术高特异性,不受水的干扰,支持多成分同时检测,对样品无损毁等优点,而且克服了拉曼光谱灵敏度低的问题^[9-10]。随着便携式拉曼光谱仪的市场化,常规拉曼光谱和SERS技术在食品^[11-12]和药品^[13-14]安全检测中的应用越来越广泛。虽然部分文献^[15-17]利用SERS技术测定了环丙沙星,但是主要是定性方面的研究,很少有人开展过定量分析。本文基于SERS技术检测牛奶中的环丙沙星,为牛奶中环丙沙星的现场、快速检测探索新的途径。

1 实验部分

1.1 实验材料 硝酸银(国药集团化学试剂有限公司,批号20110104,含量 $\geq 99.8\%$);抗坏血酸(阿法埃莎(中国)化学有限公司,批号023269);柠檬酸钠(国药集团化学试剂有限公司,批号20120118,含量 $\geq 99.0\%$);环丙沙星(上海源叶生物科技有限公司,批号SM0325YG14,含量 $\geq 98.0\%$);硝酸(西陇化工有限公司,批号1601161,含量 $\geq 65.0\%$);石英片购于南通瑞森光学科技有限公司;实验中所用水均为18.2 M Ω 超纯水。

1.2 银溶胶的制备 按照文献^[18]所述方法制备。在30℃水浴,900 r $\cdot$ min⁻¹搅拌的情况下,向8 mL抗坏血酸(6.0×10^{-4} mol $\cdot$ L⁻¹)和柠檬酸钠(3.0×10^{-3} mol $\cdot$ L⁻¹)的混合溶液中加入0.1 mol $\cdot$ L⁻¹硝酸银水

溶液0.08 mL,可观察到锥形瓶中液体由无色变为黄色,最后至蓝色浑浊液体。15 min后,将所得到的溶胶用4℃冰水稀释10倍,得到实验所用银溶胶。制备过程中柠檬酸钠作为氧化剂,抗坏血酸作为还原剂。

1.3 拉曼光谱仪及其检测条件 本实验使用BWS415-785H型(B&W Tek, Inc.)便携式拉曼光谱仪采集光谱。激发光源为785 nm的二极管激光器,光谱测量范围为68~2 700 cm⁻¹,光谱分辨率小于3 cm⁻¹。使用焦距为6.8 mm的透镜汇聚光束,聚焦后的光斑尺寸约为10 μ m。实验中,以疏水反光的铝箔胶带贴在载玻片上作为盛放检测物的平台,控制仪器探头与铝箔胶带面垂直使激发光垂直入射,取混合后样本20 μ L滴在铝箔胶带上,让激光焦点聚焦在液滴中心-铝箔胶带面处。本实验中激光器功率为50 mW,积分时间均为10 s,每个样品测定5次后取平均值,如无特殊说明,本文SERS均在此条件下检测所得。数据采集及光谱处理均采用光谱仪自带软件Bwram 1.01.20,使用快速傅氏变换(FFT)平滑方法对采集到的光谱进行平滑处理,并使用软件自带算法对光谱数据进行背景扣除。

2 结果和讨论

2.1 环丙沙星特征峰的归属及最佳实验条件 环丙沙星的分子结构式如图1所示。首先对环丙沙星的固体粉末进行常规拉曼峰的检测,然后对100 μ g $\cdot$ mL⁻¹的水溶液进行了SERS检测,如图2所示。从图2可以看出,环丙沙星固体粉末的拉曼特征峰十分明显,主要分布在1 029、1 384、1 459和1 625 cm⁻¹处,其中1 029 cm⁻¹为C-H摇摆振动,1 384为O-C-O对称伸缩振动,1 459 cm⁻¹为苯环振动,1 625 cm⁻¹为C=O伸缩振动^[1]。在100 μ g $\cdot$ mL⁻¹水溶液的SERS检测中也可以清晰地观察到这些峰位。

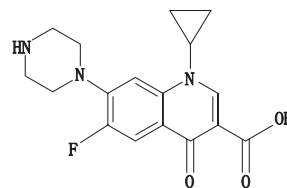


图1 环丙沙星分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of ciprofloxacin

可以通过添加适量的无机盐(促凝剂)改变溶胶中纳米颗粒稳定的分散状态,集聚产生更多的SERS热点,从而取得更好的增强效果^[19-20]。对于不

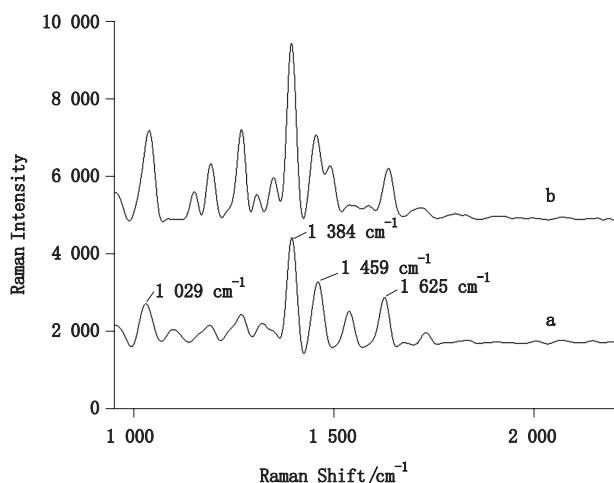


图2 环丙沙星固体粉末拉曼光谱(a)和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水溶液SERS光谱(b)

Fig. 2 Normal Raman spectrum of ciprofloxacin solid powder (a) and SERS spectrum of $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ciprofloxacin solution (b)

同的溶胶体系而言,不同的无机盐对样品检测的增强效果有所差异。本研究经过多次实验发现,环丙沙星牛奶溶液中盐酸的增强效果最好,因此选取 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸为促凝剂。混合顺序为环丙沙星牛奶溶液、银溶胶、盐酸,体积比为3:3:1。

2.2 灵敏度和线性试验 配制了质量浓度为500、350、200、100、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的环丙沙星牛奶溶液,分别取此液5 mL于10 mL离心管中,向其中滴入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸15 μL 作为蛋白质沉淀剂,之后放入离心机中, $7500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min。分别取各种浓度的牛奶上清液30 μL 、银溶胶30 μL 与10 μL 盐酸($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)混合,再取15 μL 滴于铝箔胶带上,对其进行SERS检测,检测结果如图3所示。从图3可以看到,当环丙沙星的牛奶溶液的质量浓度低至 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,仍然可以观察到1029、1384以及1625 cm^{-1} 等处的特征峰,因此牛奶中检测下限约为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

根据图3的实验数据,绘出了1384 cm^{-1} 处的拉曼特征峰强度随环丙沙星牛奶溶液浓度的曲线,如图4所示。通过对数据拟合得到曲线方程:

$$Y=224.2448+2.5824X \quad R^2=0.939$$

2.3 回收率试验 为了验证本法的准确性以及可靠性,采集3种加标质量浓度分别为150、300、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品进行了回收率的分析,如表1所示。由表1可知,回收率在92.7%~108.3%之间,RSD小于8.3%。

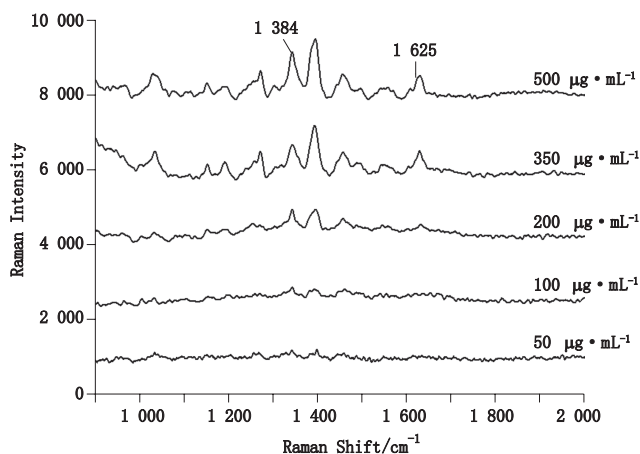


图3 不同浓度的环丙沙星牛奶溶液的SERS光谱图

Fig. 3 SERS spectra of ciprofloxacin in milk at various concentrations

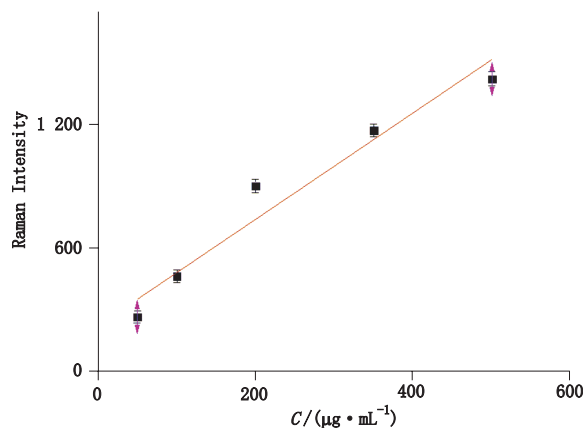


图4 环丙沙星牛奶溶液拉曼特征峰强度随其浓度的变化曲线

Fig. 4 The relationship between the Raman intensity and the concentration of ciprofloxacin in milk

表1 牛奶中环丙沙星的回收率及RSD

Tab. 1 Recovery and RSD of ciprofloxacin in milk

加标浓度 (spiked)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	样品标号 (sample No.)	计算浓度 (found)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
150	1	159.27	106.2	102.4	8.3
	2	162.48	108.3		
	3	139.02	92.7		
300	1	312.25	104.1	103.5	0.58
	2	308.65	102.9		
	3	310.66	103.6		
400	1	387.65	96.9	99.4	3.7
	2	390.75	97.6		
	3	414.63	103.7		

3 结论

本文开展了基于 SERS 技术检测牛奶中环丙沙星的研究。环丙沙星的主要拉曼峰位于 1 029、1 384、1 459 和 1 625 cm^{-1} 等处,选取 1 384 cm^{-1} 拉曼峰作为特征峰,在最佳实验条件进行了 SERS 检测。结果表明,环丙沙星牛奶溶液中检测下限约为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,在 1 384 cm^{-1} 拉曼特征峰处,环丙沙星牛奶溶液特征峰强度与浓度的曲线方程为 $Y=224.2448+2.5824X$,线性相关系数为 $R^2=0.939$ 。同时,对该方法的回收率进行了测试,回收率范围在 92.7%~108.3% 之间, RSD 小于 8.3%。该方法具有快速、准确、无损及操作简便等优点,在牛奶中环丙沙星的检测具有一定的应用潜力。

参考文献

- [1] HE L, LIN M, LI H, *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with dendritic silver nanosubstrate for detection of restricted antibiotics [J]. *J Raman Spectrosc*, 2010, 41 (7): 739
- [2] 蔡卓,甘寅宾,李斯光,等. 紫外可见分光光度法在抗生素类药物分析中的应用[J]. *化工技术与开发*, 2007, 36 (12): 24
CAI Z, GAN BB, LI SG, *et al.* Application of ultraviolet-visible spectrophotometry in analysis of antibiotics [J]. *Technol Dev Chem Ind*, 2007, 36 (12): 24
- [3] 李小玲,黄向荣,万译文,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星[J]. *中国渔业质量与标准*, 2013, 3 (4): 25
LI XL, HUANG XR, WAN YW, *et al.* Simultaneous determination of norfloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin Fish Qual Stand*, 2013, 3 (4): 25
- [4] 曹莹,蒋音. 利用液质联用仪快速确证中兽药中的氟喹诺酮类药物[J]. *中国兽药杂志*, 2012, 46 (6): 27
CAO Y, JIANG Y. Rapid confirmation of fluoroquinolones in traditional Chinese medicine by LC-MS [J]. *Chin J Vet Drug*, 2012, 46 (6): 27
- [5] 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 [D]. 长春: 吉林大学, 2015
GAO B. Preparation and Computational Simulation of Molecularly Imprinted Polymers with Optical and Electrochemical [D]. Changchun: Jilin University, 2015
- [6] 吴琳玲,毕亚萍,李丹,等. 微生物学检测技术在食品抗生素残留检测的研究应用[J]. *中国微生态学杂志*, 2014, 26 (5): 598
WU LL, BI YP, LI D, *et al.* Detection of antibiotic residues in food by microbiological detection technology [J]. *Chin J Microecol*, 2014, 26 (5): 598
- [7] PETRY R, SCHMITT M, POPP J. Raman spectroscopy—a prospective tool in the life sciences [J]. *Chem Phys Chem*, 2003, 4 (1): 14
- [8] KNEIPP K, KNEIPP H, ITZKAN I, *et al.* Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy [J]. *Chem Rev*, 1999, 99 (10): 2957
- [9] CAMPION A, KAMBHAMPATI P. Surface-enhanced Raman scattering [J]. *Chem Soc Rev*, 1998, 27 (4): 241
- [10] SCHLUCKER S. Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53 (19): 4756
- [11] HUANG H, SHI H, FENG S, *et al.* Quick detection of traditional Chinese medicine ‘Atractylodis Macrocephalae Rhizoma’ pieces by surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Laser Phys*, 2013, 23 (1): 15601
- [12] 布仁巴图,韩斯琴高娃,哈斯乌力吉,等. 2 种蒙药中硫磺的拉曼光谱测定分析[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35 (7): 1279
BUREN BT, HAN SQGW, HASI WLJ, *et al.* Detection of sulphur in 2 Mongolian medicines using Raman spectroscopy [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35 (7): 1279
- [13] ZHENG J, HE LL. Surface-enhanced Raman spectroscopy for the chemical analysis of food [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2014, 13 (3): 317
- [14] QIN J, CHAO K, KIM MS. Simultaneous detection of multiple adulterants in dry milk using macro-scale Raman chemical imaging [J]. *Food Chem*, 2013, 138 (2): 998
- [15] 郭志男,陈雷,王旭,磁性分子印迹聚合物对环丙沙星的分离以及 SERS 检测[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30 (11): 235
GUO ZN, CHEN L, WANG X, *et al.* Ciprofloxacin separation with magnetic molecularly imprinted polymers (MIPs) and detection based on SERS [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2010, 30 (11): 235
- [16] 秦晓宇. 基于表面增强拉曼散射的几种抗生素药物检测研究 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2015
QIN XY. Study on the Detection of Several Antibiotics Based on Surface Enhanced Raman Scattering [D]. Jiamusi: Jiamusi University, 2015
- [17] 江欣. 几种基于半导体 TiO_2 的表面增强拉曼散射研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015
JIANG X. Investigations on Semiconductor-based TiO_2 Surface-enhanced Raman Scattering [D]. Changchun: Jilin University, 2015
- [18] LEE PC, MEISEL D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols [J]. *J Chem Phys*, 1982, 86 (17): 3391
- [19] JANA NR, PAL T. Anisotropic metal nanoparticles for use as surface-enhanced Raman substrates [J]. *Adv Mater*, 2007, 19 (13): 1761
- [20] ZHANG ML, LIN X, ZHAO XR, *et al.* Rapid and simple detection of pethidine hydrochloride injection using surface-enhanced Raman spectroscopy based on silver aggregates [J]. *Anal Methods*, 2015, 19: 8241

(本文于 2017 年 4 月 20 日收到)