

基于表面增强荧光的鸡蛋蛋清中土霉素残留含量检测分析

赵进辉 袁海超 胡 琪 洪 茜 彭义杰 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 以银纳米颗粒(AgNPs)作为表面增强荧光基底,形成的OTC-Eu-AgNPs-Egg white体系具有强荧光特性,可实现鸡蛋蛋清中土霉素残留含量的检测分析。分析了OTC-Eu-AgNPs-Egg white体系的三维荧光光谱,确定了最佳激发波长为380 nm。分析了AgNPs加入量、Eu³⁺加入量、反应时间和金属共存离子对荧光强度的影响,确定了实验中的AgNPs加入量和Eu³⁺加入量分别为0.25 mL和0.01 mL。应用最小二乘支持向量回归(LSSVR)在光谱区间605~630 nm建立了鸡蛋蛋清中土霉素残留含量检测的预测模型,模型预测集的决定系数(R^2)和预测均方根误差(RMSEP)分别为0.9909和0.9079 mg/L,说明铕(III)的AgNPs增强荧光结合LSSVR可用于鸡蛋蛋清中土霉素残留含量的检测。
关键词 光谱学; 土霉素; 表面增强荧光; 最小二乘支持向量回归; 鸡蛋蛋清; 铕

中图分类号 O433.4

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201542.0215002

Detection and Analysis of Oxytetracycline Content in Egg White Using Surface Enhanced Fluorescence

Zhao Jinhui Yuan Haichao Hu Qi Hong Qian Peng Yijie Liu Muhua

Optics-Electrics Application of Biomaterials Laboratory, College of Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China

Abstract With silver nanoparticles (AgNPs) as the substrate of the surface enhanced fluorescence, the OTC-Eu-AgNPs-Egg white system has a strong fluorescent characteristic, and the detection and analysis of oxytetracycline content in egg white can be realized. Three dimensional fluorescence spectra of the OTC-Eu-AgNPs-Egg white system is analyzed, and 380 nm is selected as the best excitation wavelength. Effect of the addition amount of AgNPs and Eu³⁺, reaction time and metal ions on fluorescence intensity is investigated, and the addition amount of AgNPs and Eu³⁺ is determined as 0.25 mL and 0.01 mL, respectively. A prediction model for determination of oxytetracycline content in egg white is established by using least squares support vector regression (LSSVR) between 605 nm and 630 nm, and the determination coefficient (R^2) and root mean squared error of prediction (RMSEP) are 0.9909 and 0.9079 mg/L, respectively. The results show that silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) combined with LSSVR can be used to detect the oxytetracycline residue in egg white.

Key words spectroscopy; oxytetracycline; surface enhanced fluorescence; least squares support vector regression; egg white; europium

OCIS codes 300.6450; 290.5860; 300.6490

1 引 言

土霉素(OTC)又称为地霉素或氧四环素,是一种广谱四环素类抗生素药物,可用于预防和治疗鸡疾病或

收稿日期: 2014-08-01; 收到修改稿日期: 2014-09-05

基金项目: 国家自然科学基金(31101295)、江西省科技厅对外科技合作计划(20132BDH80005)、江西省科技厅科技支撑项目(20121BBG70058)、江西省教育厅科技计划(GJJ12244)

作者简介: 赵进辉(1978—),男,博士,副教授,主要从事光谱分析与检测等方面的研究。E-mail: zjhxiaocao@sina.com

* 通信联系人。E-mail: suikelmh@sohu.com

作为鸡饲料添加剂使用。如果土霉素的用量不当,在药物的累积作用下,容易在鸡肉和鸡蛋中残留土霉素药物,进而对人体健康造成一系列的毒副作用,因此一些国家对鸡肉和鸡蛋中的土霉素残留作出了最高残留限量的规定,我国规定鸡肉中的土霉素含量不得超过0.1 mg/kg^[1]。目前用于鸡蛋等食品中的抗生素残留检测方法有酶联免疫分析法^[2-4]、微生物法^[5-6]、高效液相色谱法、气相色谱法、电泳法、化学发光法等理化检测方法^[7-8]。表面增强荧光(SEF)作为一种现代分子光谱检测方法,研究意义重大,已有学者将其应用到生物医疗诊断、DNA无损检测、生物传感器、化学分析等领域^[9-13]。Tan等^[10]利用银纳米颗粒(AgNPs)对铕(III)的配合物的荧光增强作用来检测牛奶中的四环素。Dasary等^[14]将金纳米粒子的表面增强荧光方法用于有机磷毒剂检测。冒薇等^[15]探索了AgNPs对荧光分子罗丹明B的表面增强效应。土霉素是一种弱荧光物质,很难用直接荧光分析法对其进行测定。但土霉素具有 β -二酮结构,和Eu³⁺结合形成具有荧光特性的螯合物,在AgNPs的作用下形成的OTC-Eu-AgNPs体系可使荧光强度得到明显的增强^[10,16]。基于表面增强荧光在痕量物质检测中体现出来的优越性,本文展开基于铕(III)的AgNPs增强荧光的鸡蛋蛋清中土霉素残留检测探索研究,并尝试建立基于最小二乘支持向量回归(LSSVR)的荧光光谱预测模型,对于鸡蛋蛋清中土霉素残留的快速检测有着重要意义。

2 实验部分

2.1 材料与试剂

鸡蛋(购于江西农业大学菜市场);土霉素标准品(纯度为98.7%,购于中国标准物质网);硝酸铕[Eu(NO₃)₃];羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES);硝酸银(AgNO₃);硼氢化钠(NaBH₄);柠檬酸三钠;氯化钙(CaCl₂);氯化铁(FeCl₃);氯化钾(KCl);氯化锰(MnCl₂);氯化钠(NaCl);试剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

2.2 仪器设备

Cary Eclipse 荧光分光光度计(Varian Inc., USA);实验室超纯水机(湖南科尔顿水务有限公司);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);1 cm 石英比色皿;HH-6型数显恒温水浴锅(上海浦东物理光学仪器厂);紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器责任有限公司)。

2.3 实验方法

1) Eu(NO₃)₃溶液的配制:称取223 mg Eu(NO₃)₃,用超纯水定容至10 mL,得到50 mM的Eu(NO₃)₃溶液。

2) HEPES缓冲液的配制:称取2.383 g HEPES溶解于100 mL超纯水中,得到100 mM HEPES缓冲液(pH 7.4)。

3) 土霉素标准储备液配制:称取10 mg土霉素标准品,用一定量的超纯水溶于100 mL棕色容量瓶中,超声溶解后再定容至刻度,即可得到100 mg/L的土霉素标准储备液。

4) AgNPs的配制^[10]:称取17 mg AgNO₃溶解于10 mL去离子水;称取1470 mg柠檬酸三钠溶解于10 mL去离子水;取1 mL AgNO₃溶液和1 mL柠檬酸三钠溶液加入47 mL去离子水中,搅拌,在室温下放置10 min;称取3.8 mg NaBH₄溶解于100 mL去离子水;取600 μ L NaBH₄溶液滴加到上述配制的溶液中,快速搅拌30 min;在4 $^{\circ}$ C环境下放置隔夜后使用。

5) 从鸡蛋中取出蛋清置于烧杯中,用玻璃棒将蛋清搅拌均匀作为缓冲液备用。

6) 分别取不同体积的土霉素标准储备液于10 mL棕色容量瓶中,并用鸡蛋蛋清定容至刻度,得到62个不同土霉素含量(0.1~30 mg/L)的鸡蛋蛋清溶液样本,其中,47个作为训练集样本,15个作为预测集样本。

7) 将0.25 mL AgNPs和0.01 mL Eu(NO₃)₃溶液加入石英比色皿中,混合均匀后再加入1.5 mL待测液(不同土霉素含量的鸡蛋蛋清),用HEPES缓冲液定容到3 mL,混合均匀后放置5 min待测。

8) 荧光光谱的采集:将待测样本置入石英比色皿中,利用荧光分光光度计采集其荧光光谱。光谱采集参数设置如下:激发波长为380 nm,发射滤波器参数设置为360~1100 nm,激发和发射狭缝尺寸为10 nm,光电倍增管(PMT)探测器电压为700 V,中等扫描速度,采用移动平均线平滑方式。

3 结果与讨论

3.1 最佳激发波长的确定

图 1(a)中的插图给出了实验中使用的 AgNPs 的紫外-可见吸收光谱图,由图可知,405 nm 为其最大吸收波长,半峰全宽为 87 nm,较窄的半峰全宽表明使用的 AgNPs 粒径分布相对比较均匀^[17]。

激发波长的大小关系到 OTC-Eu-AgNPs-Egg white 体系的荧光峰强度大小。为确定分析含有土霉素的鸡蛋蛋清的最佳荧光激发波长,有必要测试其三维荧光光谱,结果如图 1 所示,具体的实验条件如下:取 1.25 mL AgNPs 和 0.02 mL $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,再加入 1.5 mL 含 10 mg/L 土霉素的鸡蛋蛋清,用 HEPES 缓冲液定容到 3 mL,激发波长为 240~450 nm,步长为 10 nm。从图 1 可以看出,荧光特征发射峰是一个位置约在 617 nm 处的宽谱峰。随着激发波长的增加,这个荧光特征发射峰的强度呈现先增强后减弱的趋势,且在激发波长为 380 nm 时最强。综合分析,实验选择激发波长为 380 nm 条件下的光谱进行后续研究。

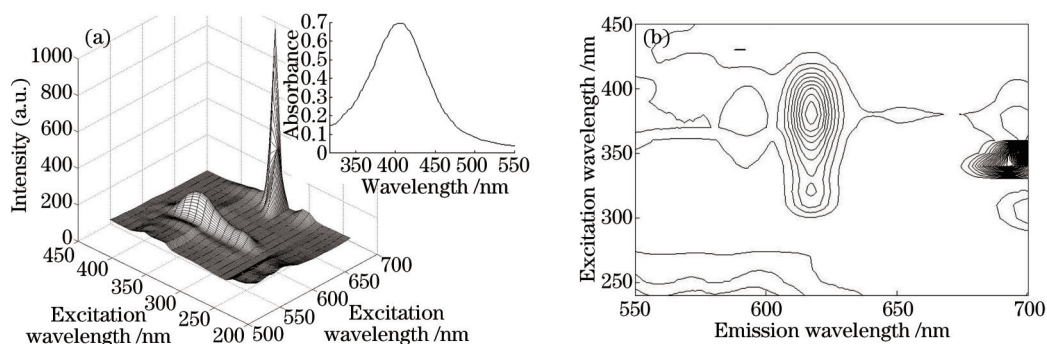


图 1 含有土霉素的鸡蛋蛋清样本的三维荧光光谱图。(a) 三维投影图,插图为 AgNPs 的紫外-可见吸收光谱图;
(b) 等高线光谱图

Fig.1 Three-dimensional fluorescence spectroscopy of egg white with oxytetracycline. (a) 3D projective view, the inset shows UV-Vis absorption spectrum of AgNPs; (b) contour map

3.2 样本的荧光光谱特性

图 2 给出了 OTC-Eu 和 OTC-Eu-AgNPs-Egg white 两种体系的荧光光谱。其中,OTC-Eu 体系由 0.01 mL $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液中加入 1.5 mL 10 mg/L 土霉素溶液混合均匀,再用 HEPES 缓冲液定容到 3 mL 获得;OTC-Eu-AgNPs-Egg white 由 0.25 mL AgNPs 和 0.01 mL $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液混合均匀后加入 1.5 mL 含 10 mg/L 土霉素的鸡蛋蛋清,再用 HEPES 缓冲液定容到 3 mL 获得。由图 2 可知,OTC-Eu 体系在 617 nm 处的荧光峰强度较弱,而 OTC-Eu-AgNPs-Egg white 体系在 617 nm 处的荧光峰强度增强了约 15 倍。OTC-Eu-AgNPs-Egg white 体系的荧光峰强度得到进一步增强的原因可能是一定量的 AgNPs 使银纳米颗粒向荧光分子发生能量转移,荧光强度得到增强;同时鸡蛋蛋清具有乳化剂功能,提高了荧光效率,有效地抑制了荧光猝灭。

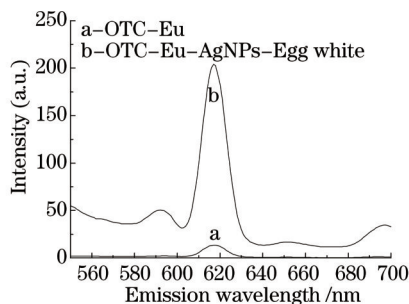


图 2 样本的荧光光谱图

Fig.2 Fluorescence spectra of the samples

3.3 AgNPs 加入量对荧光强度的影响

AgNPs 加入量是影响荧光强度的一个重要因素。为确定 AgNPs 加入量对 OTC-Eu-AgNPs-Egg white 体系的荧光强度的影响,固定 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液的体积(0.02 mL)和含 10 mg/L 土霉素的鸡蛋蛋清的体积(1.5 mL),考

查 AgNPs 加入量分别为 0.1、0.25、0.5、0.75、1 和 1.25 mL 时的荧光光谱,其中不同试剂的加入顺序与实验方法中的步骤 7) 相同。由图 3 可知,当 AgNPs 加入量为 0.25 mL 时,617 nm 处的荧光强度最强,因此,实验中选择 AgNPs 加入量为 0.25 mL。

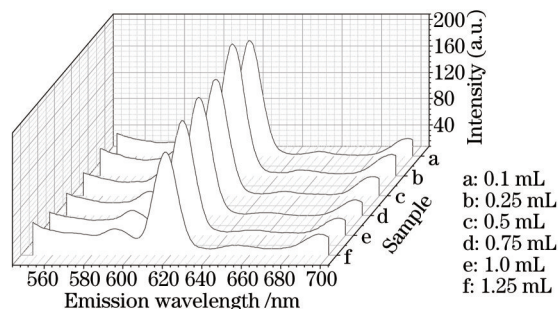


图 3 AgNPs 加入量对光谱强度的影响

Fig.3 Effect of addition amount of AgNPs on fluorescence intensity

3.4 Eu^{3+} 加入量对荧光强度的影响

Eu^{3+} 加入量是影响荧光强度的又一重要因素。为考查 Eu^{3+} 加入量对 OTC-Eu-AgNPs-Egg white 体系的荧光强度的影响,分别取不同体积(0.005、0.01、0.02、0.03 和 0.04 mL)的 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液与 0.25 mL AgNPs 混合均匀后加入 1.5 mL 含 10 mg/L 土霉素的鸡蛋蛋清,然后用 HEPES 缓冲液定容至 3 mL,得到了如图 4 所示的荧光光谱图。由图 4 可知,当 Eu^{3+} 加入量为 0.01 mL 时,617 nm 处的荧光强度最强,因此,实验中选择 Eu^{3+} 加入量为 0.01 mL。

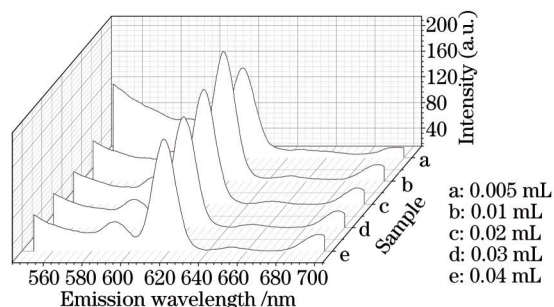


图 4 Eu^{3+} 加入量对光谱强度的影响

Fig.4 Effect of addition amount of Eu^{3+} on fluorescence intensity

3.5 反应时间对荧光强度的影响

在室温条件下,考查了 0.25 mL AgNPs 与 0.01 mL $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 混合均匀后加入 1.5 mL 含 10 mg/L 土霉素的鸡蛋蛋清,再用 HEPES 缓冲液定容到 3 mL 的实验条件下样本光谱强度随反应时间的变化情况。由图 5 可知,体系在 1 min 后可以反应完全,其光谱强度值在 25 min 内基本保持不变。因此实验中选择放置 5 min 后开始采集光谱。

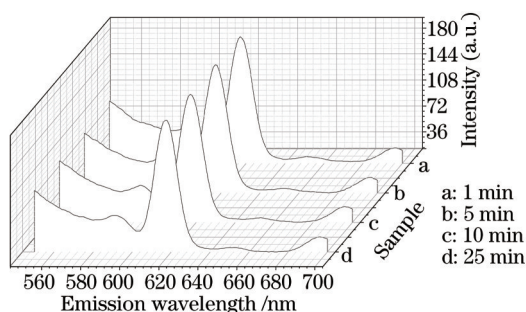


图 5 反应时间对光谱强度的影响

Fig.5 Effect of reaction time on fluorescence intensity

3.6 金属共存离子对荧光强度的影响

一定种类和浓度的金属离子会影响荧光强度的大小,将引起荧光强度变化范围超过 5% 的因素看作外

来金属离子干扰。将 0.25 mL AgNPs 与 0.01 mL $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 混合均匀后加入 1.5 mL 含某一浓度土霉素的鸡蛋清, 然后分别加入 0.5 mL 10 mg/L 不同的干扰离子(Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Na^+)溶液, 并用 HEPES 缓冲液定容到 3 mL 进行干扰实验, 结果如图 6 所示。从图 6 可以看出, 以不超过 5% 为限, 金属离子 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Na^+ 对光谱没有明显干扰。

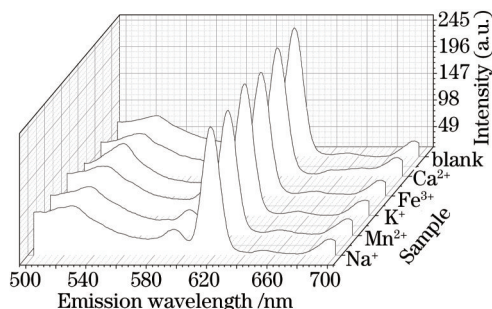


图 6 金属共存离子对光谱强度的影响

Fig.6 Effect of metal ions on fluorescence intensity

3.7 LSSVR 模型的预测结果

LSSVR 作为一种解决小样本、非线性问题的模式识别方法^[18-19], 已被应用到近红外、荧光等光谱模型建立中, 该研究选择 LSSVR 来建立鸡蛋蛋清中土霉素残留含量的定量测定模型。以荧光特征峰 617 nm 为中心的宽谱峰区间(605~630 nm)的光谱值作为 LSSVR 模型输入, 以径向基函数作为核函数, 核函数宽度 σ^2 与正则化参数 γ 用交叉验证方法进行参数优化, 建立的 LSSVR 模型预测结果如图 7 所示。从图 7 可以看出, LSSVR 模型预测集的决定系数 R^2 为 0.9909, 预测均方根误差 RMSEP 为 0.9079 mg/L, 说明该模型能够满足鸡蛋蛋清中土霉素残留含量快速测定要求。

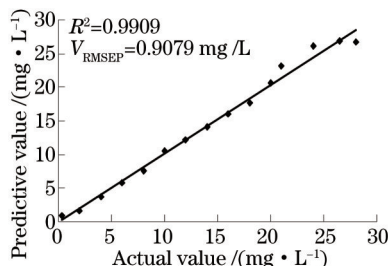


图 7 鸡蛋蛋清中土霉素含量测定中预测值与实测值之间的关系

Fig.7 Relationship between actual value and predictive value of oxytetracycline content in egg white

为客观评价建模效果的好坏, 对线性回归、偏最小二乘法(PLS)、LSSVR 建立的 4 种预测模型进行比较分析, 结果如表 1 所示。预测模型的 R^2 越大, RMSEP 越小, 则该模型的预测效果越好, 从表 1 可以看出, LSSVR 模型在光谱区间 605~630 nm 的预测效果优于全光谱区间(550~700 nm), 是这 4 种建模方法中预测能力最强的方法, 用特征峰 617 nm 处的荧光强度与鸡蛋蛋清中土霉素含量建立的线性回归模型的预测效果最差。综上所述, 在光谱区间 605~630 nm 应用 LSSVR 建立的鸡蛋蛋清中土霉素含量预测模型是可行的。

表 1 不同模型性能比较

Table 1 Comparison of different models

Model name	Spectral range /nm	R^2	RMSEP /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
Linear regression	617	0.9842	1.2778
PLS	605~630	0.9850	1.2271
LSSVR	605~630	0.9909	0.9079
LSSVR	550~700	0.9852	1.0476

4 结 论

对 OTC-Eu-AgNPs-Egg white 体系进行了表面增强荧光光谱分析研究, 以用于鸡蛋蛋清中土霉素残留

含量的检测。

1) 分析了 OTC-Eu-AgNPs-Egg white 体系的三维荧光光谱, 确定了最佳激发波长为 380 nm。

2) 分析了 AgNPs 加入量、Eu³⁺ 加入量、反应时间、金属共存离子对荧光强度的影响, 确定了实验中的 AgNPs 加入量为 0.25 mL, Eu³⁺ 加入量为 0.01 mL。

3) 对线性回归、PLS、LSSVR 建立的 4 种预测模型进行性能比较, 以 LSSVR 模型在光谱区间 605~630 nm 的预测效果最好, 其 R^2 和 RMSEP 分别为 0.9909 和 0.9079 mg/L, 说明该方法用于鸡蛋蛋清中土霉素残留含量的预测是可行的, 是一种较好的快速检测鸡蛋蛋清中土霉素残留的方案。

参 考 文 献

- 1 Standardization Administration of the People's Republic of China. GB16869-2005 Fresh and frozen poultry product[S]. China, 2005.
中国国家标准化管理委员会.GB16869-2005 鲜、冻禽产品[S]. 中国, 2005.
- 2 Y Zhou, C Li, Y Li, *et al.*. Monoclonal antibody based inhibition ELISA as a new tool for the analysis of melamine in milk and pet food samples[J]. Food Chemistry, 2012, 15(4): 2681-2686.
- 3 X Yan, X Hu, H Zhang, *et al.*. Direct determination of furaltadone metabolite, 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, in meats by a simple immunoassay[J]. Food and Agricultural Immunology, 2012, 23(3): 203-215.
- 4 J Li, J Liu, H Zhang, *et al.*. Broad specificity indirect competitive immunoassay for determination of nitrofurans in animal feeds[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 678(1): 1-6.
- 5 O G Nagel, M C Beltran, M P Molina, *et al.*. Novel microbiological system for antibiotic detection in ovine milk[J]. Small Ruminant Research, 2012, 102(1): 26-31.
- 6 K D Pham, G Degand, S Danyi, *et al.*. Validation of a two-plate microbiological method for screening antibiotic residues in shrimp tissue[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 672(1-2): 30-39.
- 7 M K Mohammad, H L Sang, S L Hyun, *et al.*. A batch chemiluminescence determination of enoxacin using a tris-(1,10-phenanthroline) ruthenium (II) — cerium(IV) system[J]. Journal of Fluorescence, 2006, 16(4): 535-540.
- 8 M G Pikkemaat. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(4): 893-905.
- 9 Lü Fengting, Zheng Hairong, Fang Yu. Studies of surface-enhanced fluorescence[J]. Progress in Chemistry, 2007, 19(2): 257-266.
吕凤婷, 郑海荣, 房 喻. 表面增强荧光研究进展[J]. 化学进展, 2007, 19(2): 257-266.
- 10 H Tan, Y Chen. Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) for detection of tetracycline in milk[J]. Sensors and Actuators B, 2012, 173(1): 262-267.
- 11 Wang Shuang, Jin Jing, Gao Wei, *et al.*. Study on surface-enhanced fluorescence of gold nanorods coated with polyelectrolyte multilayers[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(6): 408-411.
王 爽, 金 晶, 皋 伟, 等. 表面修饰聚合物自组装多层的金纳米棒的表面增强荧光[J]. 科学通报, 2012, 57(6): 408-411.
- 12 Wang Kangni, Zheng Jihong, Gui Kun, *et al.*. Surface plasmon resonance of holographic polymer dispersed liquid crystal grating doped with nano-Ag[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2014, 51(2): 021603.
王康妮, 郑继红, 桂 坤, 等. 纳米银掺杂的液晶/聚合物全息光栅中的表面等离子体共振[J]. 激光与光电子学进展, 2014, 51(2): 021603.
- 13 Pan Duohai, Ma Yonghong, Huan Yixian. Surface-enhanced energy transfer effect between molecules[J]. Acta Optica Sinica, 1996, 16(6): 881-884.
潘多海, 马永红, 郇宜贤. 表面增强的分子间能量转移效应[J]. 光学学报, 1996, 16(6): 881-884.
- 14 S S Dasary, U S Rai, H Yu, *et al.*. Gold nanoparticle based surface enhanced fluorescence for detection of organophosphorus agents [J]. Chemical Physics Letters, 2008, 460(1-3): 187-190.
- 15 Mao Wei, Li Yan, Zhou Keqin, *et al.*. Surface-enhanced fluorescence of rhodamine B on assembled structure of silver nanoparticles [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2009, 26(4): 885-887.
冒 薇, 李 艳, 周克勤, 等. 纳米银组装结构上罗丹明 B 的表面增强荧光效应[J]. 光谱实验室, 2009, 26(4): 885-887.
- 16 S Morandi, C Focardi, M Nocentini, *et al.*. Development and validation of europium-sensitized luminescence (ESL) method for the determination of tetracycline residues in milk[J]. Food Analytical Methods, 2009, 2(4): 271-281.
- 17 Qu Lulu, Li Dawei, Zhai Wenlei, *et al.*. Rapid on-site detection of aromatic amines in water by surface-enhanced Raman spectrometry

- [J]. *Environmental Chemistry*, 2011, 30(8): 1486-1492.
渠陆陆, 李大伟, 翟文磊, 等. 基于表面增强拉曼光谱的水中芳香胺类污染物现场快速检测技术[J]. *环境化学*, 2011, 30(8): 1486-1492.
- 18 Zhao Jinhui, Yuan Haichao, Liu Muhua, *et al.*. Rapid determination of neomycin content in duck egg white using derivative synchronous fluorescence-wavelet-subsection genetic algorithm-least squares support vector regression[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(4): 546-552.
赵进辉, 袁海超, 刘木华, 等. 导数同步荧光光谱-小波-SGA-LSSVR 联用快速测定鸭蛋蛋清中新霉素残留含量[J]. *分析化学*, 2013, 41(4): 546-552.
- 19 Guo Zhiming, Chen Liping, Huang Wenqian, *et al.*. Application of genetic algorithm-least squares support vector regression with near infrared spectroscopy for prediction of nicotine content in tobacco[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2012, 49(2): 021201.
郭志明, 陈立平, 黄文倩, 等. 近红外光谱结合 GA-LSSVR 分析烟草尼古丁含量[J]. *激光与光电子学进展*, 2012, 49(2): 021201.

栏目编辑: 吴秀娟