

# 鸡蛋清中金霉素残留的银胶表面增强 Eu(III)的 荧光检测

彭义杰 刘木华 赵进辉\* 袁海超 洪茜 李耀

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** 鸡蛋清中残留的金霉素(CTC)易进入人体内蓄积,从而对人体的健康产生损害。研究表明,银胶能作为表面基底来修饰金霉素与Eu(III)的配合物,进而使配合物的荧光强度得到显著性的增强。本研究应用银胶表面增强Eu(III)的荧光来检测鸡蛋清中金霉素的残留量,分别分析了不同胶体、银胶的加入量、Eu(III)的加入量、反应时间等因素对荧光强度的影响,并确定了最佳的实验条件,在最佳条件下建立了以617 nm处的荧光特征峰强度(Y)与鸡蛋清中金霉素含量(X)之间的标定曲线。结果表明:鸡蛋清中金霉素浓度范围在1.5~29.5 mg/L时,鸡蛋清中金霉素含量与荧光强度之间呈现良好的线性关系,线性方程为 $Y=5.2265X+24.033$ ,决定系数 $R^2$ 为0.9043,实测值与预测值之间的 $R^2=0.9182$ 。可见用银胶表面增强Eu(III)的荧光来快速检测鸡蛋清中金霉素的残留量是可行的。

**关键字** 光谱学; 金霉素; 荧光; 银胶; Eu(III)

**中图分类号** O657.3 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/LOP51.103002

## Detection of Chlortetracycline Residues in Egg Albumen Using Silver Colloids Surface-Enhanced Fluorescence of Eu (III)

Peng Yijie Liu Muhua Zhao Jinhui Yuan Haichao Hong Qian Li Yao

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

**Abstract** Chlortetracycline residues in egg albumen are accumulated easily in human body, resulting in producing harm to human body. According to the research, silver colloids can be used as surface substrate to modify complexes of chlortetracycline and Eu(III), which makes the fluorescence intensity of complexes enhanced significantly. Silver colloids surface-enhanced fluorescence of Eu(III) is applied to detect chlortetracycline residues in egg albumen. Different addition amount of colloid and Eu(III), reaction time and other factors which have influence on fluorescence intensity are analyzed respectively in the research. The best experimental conditions are determined, and the calibration curve under the optimum condition is established between the fluorescence intensity of characteristic peak at 617 nm (Y) and chlortetracycline content (X). The results show that a good linearity is obtained between the fluorescence intensity and chlortetracycline concentration in egg albumen in the range of 1.5~29.5 mg/L. The linear function is  $Y=5.2265+24.033 X$ , and the determination coefficient is 0.9043. The determination coefficient between the measured values and predicted values is 0.9182. The results show that it is feasible to use silver colloids surface-enhanced fluorescence of Eu (III) to detect chlortetracycline residues in egg albumen rapidly.

**Key words** spectroscopy; chlortetracycline; fluorescence; silver colloids; Eu(III)

**OCIS codes** 300.6490; 240.6490; 240.6675; 240.6680

收稿日期: 2014-05-07; 收到修改稿日期: 2014-05-20; 网络出版日期: 2014-09-03

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(2012BBG70058)、江西省教育厅科技计划(GJJ12244)

作者简介: 彭义杰(1988—),男,硕士研究生,主要从事农畜产品无损检测方面的研究。E-mail: 541623442@qq.com

导师简介: 赵进辉(1978—),男,副教授,主要从事光谱分析与农畜产品无损检测方面的研究。

E-mail: zjhxiaocao@sina.com(通信联系人)

## 1 引言

金霉素(CTC)是一种四环素类广谱抗生素,常用作禽畜的饲料添加剂和传染病治疗药物,作为饲料添加剂它可以促进生长发育,缩短成熟期,提高育成率,对多种病原菌有能起到抑制作用<sup>[1]</sup>。当前许多养殖户为了追求经济利益,在鸡的养殖过程中使用大量含有抗生素类的饲料和药物,导致抗生素在鸡的体内残留,进而残存在鸡蛋清里面。人们长期食用含有抗生素的鸡蛋后,会造成抗生素在人体内蓄积,对人体产生较强的毒副作用,会使人体内的细菌产生耐药菌,导致抗生素药物效果变差,甚至无效,而且残留的抗生素还会杀灭人体内正常细菌,让致病菌乘虚而入,间接可造成人的死亡<sup>[2]</sup>。目前,检测金霉素残留的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)<sup>[3-4]</sup>、化学发光法<sup>[5]</sup>、微生物法<sup>[6]</sup>、胶体金免疫层析法<sup>[7]</sup>、荧光分析法<sup>[8-9]</sup>等。近年来已有学者利用Eu(III)作为荧光探针来进行抗生素残留检测的研究。侯法菊等<sup>[10]</sup>应用荧光光度法研究了修饰 $\beta$ -环糊精与Eu(III)-金霉素体系的相互作用及其应用。曹文丽等<sup>[11]</sup>采用时间分辨荧光法,以Eu(III)为荧光探针来测定洛美沙星的残留量。M S. Attia等<sup>[12]</sup>应用Eu(III)敏化与PH辅助荧光分析法同时测定药物和血清中环丙沙星、诺氟沙星、加替沙星及其混合物的残留量。但尚未见用银胶作基底增强Eu(III)荧光来检测鸡蛋清中金霉素残留的研究报道。本研究采用银胶作表面基底修饰金霉素与Eu(III)配合物,并应用荧光分析法建立了一种鸡蛋清中金霉素残留量的快速检测方法。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器设备

本实验过程中所使用到的仪器如下: Cary Eclipse 三维荧光光谱仪(Varian, Inc., USA); FA1004B 型电子天平(精确度为 0.1 mg, 上海上平仪器有限公司); JK-50B 超声波清洗器(合肥金尼克机械有限公司); ZNCL-T 型智能恒温磁力搅拌器(郑州市亚荣仪器有限公司); T10 型实验室超纯水级(科尔顿水务公司); 石英比色皿(1 cm 光程)。

### 2.2 材料与试剂

本实验过程中所使用的材料与试剂如下: 鸡蛋(购于江西农业大学市场); 盐酸金霉素标准品(纯度为 90%, 购于中国标准物质网); 硝酸铊(纯度为 99.9%, 阿拉丁试剂有限公司);  $\text{AgNO}_3$ 、柠檬酸三钠、 $\text{NaBH}_4$ 、氯金酸钾、HEPES 均为分析纯; 水为超纯水。

### 2.3 实验过程

1) 制备金霉素储备液: 准确称取 10.0 mg 盐酸金霉素, 用一定量的超纯水超声溶解后定容至 100 mL 的容量瓶中; 2) 银胶<sup>[13]</sup>: 称取 17 mg 的  $\text{AgNO}_3$ 、1470 mg 的柠檬酸三钠分别溶解于 10 mL 的超纯水中, 然后取 1 mL 的  $\text{AgNO}_3$  溶液和 1 mL 的柠檬酸三钠溶液加入到 47 mL 超纯水中, 搅拌, 在室温下放置 10 min, 称取 3.8 mg 的  $\text{NaBH}_4$  溶解于 100 mL 的超纯水中, 再取 600  $\mu\text{L}$  的  $\text{NaBH}_4$  溶液滴加到上述配制的溶液中, 快速搅拌 30 min, 最后在 4  $^{\circ}\text{C}$  的环境下放置一晚。3) 制备银胶: 称取 30 mg 的氯金酸钾溶解于 4 mL 的超纯水, 摇匀, 将氯金酸钾溶液加入到 46 mL 超纯水中, 用 120  $^{\circ}\text{C}$  油浴加热至沸腾, 再称取 60 mg 的柠檬酸三钠溶解于 6 mL 超纯水中, 摇匀后加入沸腾的氯金酸钾溶液, 开始搅拌继续加热维持 30 min, 可得红棕色悬浮液, 然后自然冷却至室温。4) Eu(III) 储备液: 称取 2.23 mg Eu(III), 超声溶解于 100 mL 的超纯水中。5) 制备 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 缓冲液: 称取 2.383 g 的 HEPES, 超声溶解于 100 mL 的超纯水中, 得到 HEPES 缓冲液(100 mmol/L, pH7.4)。6) 将鸡蛋中的鸡蛋清与蛋黄分开, 把鸡蛋清放入烧杯中, 用玻璃棒将鸡蛋清搅匀, 然后用移液枪量取不同体积的金霉素储备液到 10 mL 棕色容量瓶中, 再加入鸡蛋清定容至 10 mL, 震荡摇匀, 最终得到 15 个样本, 选取 10 个绘制标定曲线, 5 个进行预测。7) 依次把银胶、Eu(III)、含金霉素的鸡蛋清溶液加入到比色皿中, 然后用 HEPES 缓冲液定容至 3 mL, 5 min 后测其荧光光谱。8) 设置三维荧光光谱仪参数: 激发波长范围为 340~430 nm, 发射波长范围为 310~750 nm, 步长为 10 nm, Emission filter 参数设置为 360~1100 nm, 平滑方式为 Moving average, PMT 电压为 700 V, 在中等扫描速度下进行荧光光谱采集。

## 3 实验结果与讨论

### 3.1 激发波长与发射波长

当使用银胶做表面基底修饰金霉素与Eu(III)的配合物用以检测鸡蛋清中金霉素残留含量时,为了确定

其最佳的激发与发射条件,实验采用三维荧光法对由银胶、Eu(III)、含金霉素的鸡蛋清溶液和 HEPES 组成的混合物样本进行荧光光谱分析。由图 1 可以看出,在激发波长分别为 340、350、360、370、380、390、400、410、420、430 nm 条件下,发射波长为 617 nm 处的荧光特征峰强度呈现出先增大后减小的趋势,并在激发波长为 390 nm 条件下荧光强度达到最大值。结果表明,检测含金霉素的鸡蛋清溶液的最佳激发波长为 390 nm,最佳发射波长为 617 nm。综上所述,本研究在激发波长为 390 nm 条件下进行荧光光谱的采集。

### 3.2 金霉素及其混合物的荧光光谱

为了进一步说明银胶对 Eu(III) 荧光光谱的增强,从而实现鸡蛋清中金霉素残留量的快速检测。实验采集了银胶、Eu(III)、含金霉素的鸡蛋清溶液和 HEPES 混合液(a),含金霉素的鸡蛋清溶液(b),银胶,含金霉素的鸡蛋清溶液和 HEPES 混合液(c),Eu(III)、含金霉素的鸡蛋清溶液和 HEPES 混合液(d),鸡蛋清样本(e)以及金霉素储备液(f)的荧光光谱加以辩证,如图 2 所示,在 617nm 处鸡蛋清、含金霉素的鸡蛋清溶液、金霉素储备液和银胶、含金霉素的鸡蛋清溶液以及 HEPES 混合液等不存在荧光特征峰,只有在 Eu(III) 存在的条件下,才出现特征峰。相比较曲线 a 与 d,在同等条件下,当鸡蛋清中含有金霉素时,发现银胶作为表面基底来修饰 Eu(III) 能使鸡蛋清中金霉素的荧光特征峰得到显著的增强,这可能是由于银胶的金属增强效应进一步增强了金霉素与 Eu(III) 分子的能量转移,从而增强了金霉素与 Eu(III) 混合物的荧光强度<sup>[13]</sup>。这就为实现鸡蛋清中金霉素残留量的快速检测提供了可能。

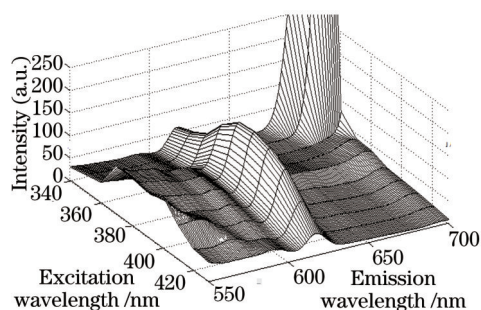


图 1 混合物样本的三维荧光光谱

Fig.1 Three-dimensional fluorescence spectra of the mixture samples

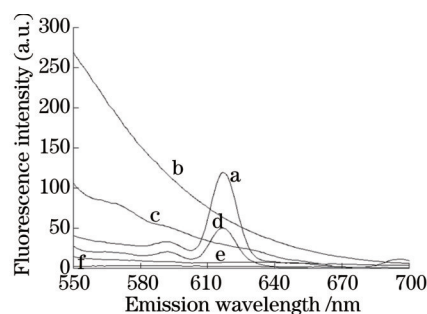


图 2 金霉素及混合物的荧光光谱

Fig.2 Fluorescence spectra of chlortetracycline and mixture

### 3.3 不同胶体对荧光增强的效果

当鸡蛋清含有金霉素时,为了验证不同胶体对金霉素与 Eu(III) 配合物的荧光特征峰增强效果,试验采取三种胶体作对比试验进行说明,在比色皿中加入相同体积的不同胶体与 Eu(III),再加进 1.5 mL 相同浓度含金霉素的鸡蛋清溶液,然后用 HEPES 缓冲液定容至 3 mL,最后采集荧光光谱。由图 3 明显看出,在激发波长 390 nm 和发射波长 617 nm 条件下,对比银胶 I(本研究采用的银胶)、银胶 II<sup>[14]</sup>和金胶三种胶体的荧光增强效果,银胶 I 的荧光强度最大,这极有可能是银胶 I 与金霉素的荧光分子之间具有合适的间隔,适当的间隔可以增大局域场、减少猝灭,从而达到增强荧光强度的目的<sup>[15]</sup>。所以在本研究采用银胶 I 作为最佳的实验胶体。

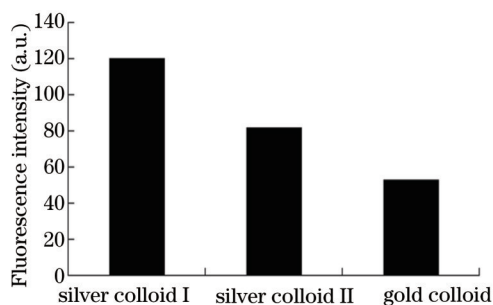


图 3 金霉素与 Eu(III) 配合物在不同胶体中的荧光强度  
Fig.3 Fluorescence intensity of chlortetracycline and Eu (III) complexes in different colloids

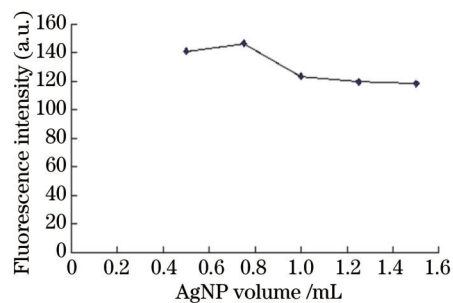


图 4 银胶对荧光强度的影响  
Fig.4 Effect of AgNP on fluorescence intensity



### 3.4 银胶的加入量对荧光强度的影响

实验分析了不同体积的银胶对 Eu(III)、含金霉素的鸡蛋清溶液以及 HEPES 混合液荧光强度的影响。由图 4 可知,分别加入体积为 0.5、0.75、1、1.25、1.5 mL 的银胶,检测得知当加入银胶体积为 0.75 mL 时,荧光强度达到最大。这可能是由于适量的银胶能够增强金霉素与 Eu(III) 的配合物的荧光辐射衰变率,过量的银胶会引起荧光猝灭<sup>[13]</sup>。因此本研究采用银胶的加入量为 0.75 mL。

### 3.5 Eu(III)的加入量对荧光强度的影响

为了验证 Eu(III) 的加入量对荧光强度的影响,实验固定了银胶和含金霉素的鸡蛋清溶液的体积,先加入 0.75 mL 的银胶,再加入不同体积的 Eu(III),体积分别为 0.01、0.02、0.03、0.06、0.09、0.12 mL,然后加入 1.5 mL 同等浓度含金霉素的鸡蛋清溶液,最后用 HEPES 定容至 3 mL 采集荧光光谱。从图 5 可以看出,随着 Eu(III) 体积的增加,其荧光强度也不断增加,当超过某个值时,荧光强度开始平缓下降,这可能是由于过量的 Eu(III) 引发聚合,导致荧光的猝灭<sup>[13]</sup>。实验表明,当 Eu(III) 体积为 0.02 mL 时为最佳,荧光特征峰(617 nm 强度)达到最大值。

### 3.6 反应时间对荧光强度的影响

实验也对反应体系进行了时间上的对比,以便寻找最佳的实验时间。如图 6 所示,在最佳环境下,体系在不同的时间段,其荧光强度几乎是成一条直线,这表明银胶对增强鸡蛋清中金霉素与 Eu(III) 配合物的荧光强度是比较稳定的。本研究选择 5 min 后采集荧光光谱。

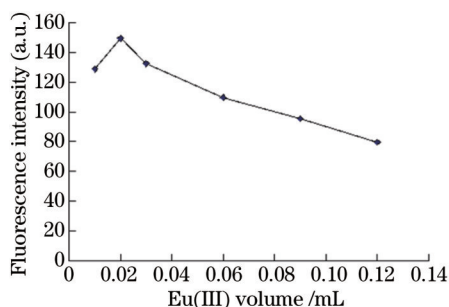


图 5 Eu(III)对荧光强度的影响

Fig.5 Effect of Eu(III) volume on fluorescence intensity

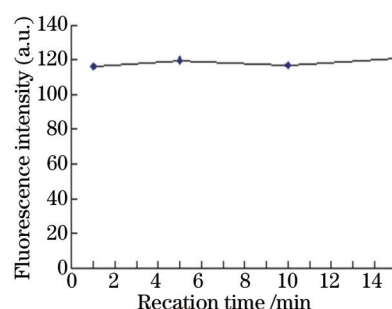


图 6 反应时间对荧光强度的影响

Fig.6 Effect of reaction time on fluorescence intensity

### 3.7 模型的预测结果分析

在选定的最佳实验条件下,为了实现鸡蛋清中金霉素残留量的检测,本研究对 15 个含有不同浓度金霉素的鸡蛋清样本进行了荧光光谱的采集,其中选取 10 个浓度绘制标定曲线,剩余 5 个样本作预测。

如图 7 所示,以 617 nm 处的荧光特征峰强度(Y)与鸡蛋清中金霉素含量(X)绘制标定曲线,得标定曲线为  $Y=5.2265X+24.033$ ,决定系数  $R^2=0.9043$ ,这表明鸡蛋清中金霉素含量与荧光强度存在良好的线性关系。利用预测样本,对所建模型的准确性进行验证,用预测值与金霉素浓度的真实值进行拟合,如图 8 所示,鸡蛋清中金霉素含量的真实值与预测值之间的  $R^2=0.9182$ ,均方根误差  $R_{MSEP}=3.1121$ 。可见用银胶表面增强 Eu(III) 的荧光来确定鸡蛋清中金霉素的残留量是可以实现的。

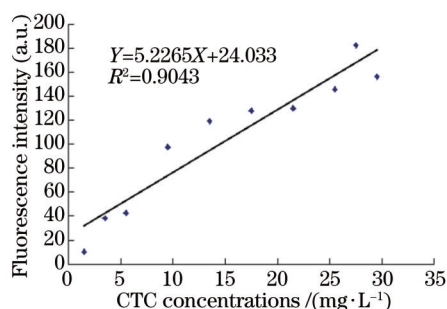


图 7 含金霉素残留量的鸡蛋清样本的标定曲线

Fig.7 Calibration curve of chlortetracycline residues sample in Egg albumen

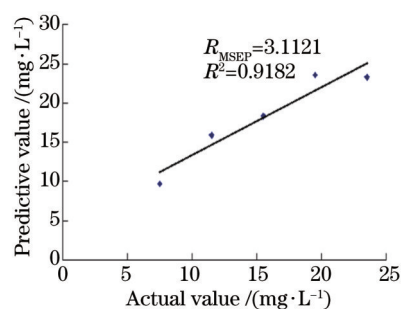


图 8 真实值与预测值的关系图

Fig.8 Relationship between actual value and predictive value

## 4 结 论

探讨了用银胶作为表面基底来增强金霉素与Eu(III)配合物的荧光强度,进而实现对鸡蛋清中金霉素残留量的检测。研究利用银胶能够显著增强增强金霉素与Eu(III)配合物荧光强度的特性,先后对荧光激发与发射波长、不同的胶体、银胶的加入量、Eu(III)的加入量和反应时间等因素进行了对比实验,从而选取最佳实验条件,在最佳的实验条件下,对15个含有不同浓度金霉素的鸡蛋清样本进行了荧光光谱的采集,最后对其荧光光谱进行了模型的预测分析。结果表明,预测值与实际值之间的决定系数 $R^2=0.9182$ ,均方根误差 $R_{MSEP}=3.1121$ 。可见用胶体银纳米粒子作表面基底修饰金霉素与Eu(III)配合物,并应用荧光分析法对鸡蛋清中金霉素的残留量进行快速、简便的检测是可行的。

## 参 考 文 献

- 1 Pu Fengyu, Zhang Xiaoyong, Wu Xinzi. Feed aureomycin in the application and test of broiler feeding[J]. *Animal Raising Technology*, 2003, 24-25.  
朴凤玉, 张小勇, 吴信子. 饲用金霉素在肉鸡饲养上的应用及检测[J]. *农业科技通讯*, 2003, 24-25.
- 2 Hu Jing. "Crash chicken" how far away from us?[J]. *Friend of Science (Early)*, 2013, 76-77.  
胡 静. "速成鸡"离我们有多远? [J]. *科学之友(上旬)*, 2013, 76-77.
- 3 Fang Zhongyi, Liu Sumei, Song Zhichao, *et al.*. Determination of 4 tetracyclines in eggs by high performance liquid chromatography[C]. *The First China Veterinary Congress Animal Medicine and Animal ChineseInstitute of Animal Husbandry and Veterinary Drug Association of the 2008 Symposium*, 2008, 221-224.  
方忠意, 刘素梅, 宋志超, 等. 高效液相色谱法测定鸡蛋中4种四环素类抗生素残留量[C]. 首届中国兽药大会动物药品学暨中国畜牧兽医学动物药品学分会2008学术年会, 2008, 221-224.
- 4 Song Ge, Zheng Wei. Determination of various tetracycline antibiotics residues in milk and dairy products by high performance liquid chromatography[J]. *Chinesedairy Industry*, 2012, 40(8): 40-42.  
宋 戈, 郑 伟. 高效液相色谱法测定乳及乳制品中多种四环素类药物残留[J]. *中国乳品工业*, 2012, 40(8): 40-42.
- 5 Fu Youli, Zhang Jianjun, Jia Yan, *et al.*. Determination on chlortetracycline residues in honey by chemiluminescence analysis[J]. *Henan Science*, 2011, 29(10): 1176-1180.  
付有利, 章建军, 贾 艳, 等. 化学发光法测定蜂蜜中金霉素的残留含量[J]. *河南科学*, 2011, 29(10): 1176-1180.
- 6 Zhai Yunzhong, Wu Jianmin, Xu Jun, *et al.*. Rapid detection of antibiotic residues in eggs by microbiological method[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(8): 839-841.  
翟云忠, 吴建敏, 徐 俊, 等. 鸡蛋中抗生素残留微生物法快速检测的研究[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(8): 839-841.
- 7 Fu Yunjie, Liu Zhiguo, Wu Yuxiang. Development of a one-step immunochromatographic strip test for rapid detection of chlortetracycline residue in food[J]. *Food Science*, 2010, 31(2): 191-194.  
付云洁, 刘志国, 武玉香. 胶体金免疫层析法快速检测食品中金霉素残留[J]. *食品科学*, 2010, 31(2): 191-194.
- 8 Tang Haibo, Qi Wei, Tang Shixing. Rapid detection of tetracyclines residue in fresh milk using quantitative fluorescent assay[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(11): 1600-1602.  
唐海波, 齐 维, 唐时幸. 荧光定量法快速检测鲜奶中四环素类总量残留[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(11): 1600-1602.
- 9 Zhao Jinhui, Yuan Haichao, Liu Muhua, *et al.*. Determination of aureomycin content in duck egg white with derivative synchronous fluorescence method[J]. *Acta Agricultural Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(1): 0189-0194.  
赵进辉, 袁海超, 刘木华, 等. 导数同步荧光法测定鸭蛋蛋清中金霉素残留含量[J]. *江西农业大学学报*, 2013, 35(1): 0189-0194.
- 10 Hou Faju, Wang Yubao, Miao Yanhong, *et al.*. Fluorescence study of the interaction between the modified  $\beta$ -cyclodextrin and europium(III)- chlortetracycline system and its analytical application[J]. *Journal of Analytical Science*, 2011, 27(2): 231-234.  
候法菊, 王玉宝, 苗延虹, 等. 荧光光度法研究修饰 $\beta$ -环糊精与Eu(III)-金霉素体系的相互作用及其应用[J]. *分析科学学报*, 2011, 27(2): 231-234.
- 11 Cao Wenli, Yu Yongli, Xu Shukun, *et al.*. Determination of lomefloxacin in using europium ion as fluorescent probe by time-resolved fluorometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, 29(2): 147-151.  
曹文丽, 于永丽, 徐淑坤, 等. 洛美沙星的铕离子荧光探针时间分辨荧光法测定[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(2): 147-151.
- 12 M S Attia, Amr A Essawy, A O Yousset. Europium-sensitized and simultaneous pH-assisted spectrofluorimetric

- assessment of ciprofloxacin, norfloxacin and gatifloxacin in pharmaceutical and serum samples[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2012, 236(15): 26–34.
- 13 Hongliang tan, Yang Chen. Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium(III) for detection of tetracycline in milk[J]. *Sensors and Actuators B*, 2012, 173: 262–267.
- 14 Lee P C, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. *J Phys Chem*, 1982, 86(17): 3991–3995.
- 15 Xu Liangmin, Zhang Zhenglong, Cai Xiaoyan, *et al.*. Physical mechanisms of fluorescence enhancement at metal surface [J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2009, 30(3): 373–378.
- 徐良敏, 张正龙, 蔡晓燕, 等. 金属表面荧光增强的物理增强机制[J]. *发光学报*, 2009, 30(3): 373–378.