

表面增强拉曼光谱法快速检测猪肉中氟尼辛葡甲胺残留

张茜, 董祥辉, 姚卫蓉, 于航, 谢云飞*

江南大学食品学院, 江苏 无锡 214000

摘要 氟尼辛葡甲胺(FM)是动物专用的非甾体类消炎药,是兽医临床上最常用的消炎镇痛类药物。近年来,随着其应用范围的扩大,其不良反应逐渐显现,其在兽肉中的残留引起了人们的重视。目前猪肉中FM残留的主要检测方法为色谱法、色谱质谱联用法。设备昂贵、笨重、操作复杂等缺点极大的限制了这类方法在现场快速检测中的应用,表面增强拉曼(SERS)具有指纹识别、迅速检测、便携等优势,能克服色谱技术在现场检测中带来的不便,因而近年来被广泛应用于兽药残留的快速筛查检测。因此,为实现猪肉中FM的现场快速检测,建立了猪肉中FM的SERS检测方法。用柠檬酸钠还原氯金酸钾的方法制备金溶胶,通过单因素实验确定在样品与金胶体积比为1:3,样品pH为6,不添加促凝剂,为检测条件。用密度泛函理论计算理论光谱,结合固体拉曼光谱,对各峰进行振动模式归属。其中 731 cm^{-1} 处为吡啶环、苯环摇摆, 1085 和 1376 cm^{-1} 处均为苯环上C—H振动。之后通过优化萃取前处理方法与萃取剂的选取,建立了猪肉中FM的定性定量检测方法。在该方法中,FM在猪肉基质中的特征峰为 731 , 1085 和 1376 cm^{-1} 。选取 731 cm^{-1} 作为定性定量峰,该处拉曼强度与FM浓度在 $1\sim 250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内有良好的线性关系, R^2 为0.99。对加标样品的实际浓度进行检测,其检测限为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,回收率在 $89.61\%\sim 95.63\%$,RSD在 $1.80\%\sim 3.30\%$ 内。该法稳定、快速、简单,可实现FM在猪肉中的现场快速筛查检测。

关键词 氟尼辛葡甲胺;表面增强拉曼光谱;快速检测

中图分类号: O657.37 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)10-3155-06

引言

氟尼辛葡甲胺(flunixin meglumine, FM)CAS号:42461-84-7,结构式如图1,是唯一动物专用的非甾体类抗炎药物(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs),由增溶剂葡甲胺与氟尼辛以1:1的形式结合而成。1996年,由Doran等研产,美国SINEBOR公司将其做成商品名为Banamine的注射液,用于动物疾病治疗^[1]。2007年6月1日,齐鲁动物保健品有限公司独立研制并申报的FM被农业部批准为国家三类新兽药^[2]。

FM是一种强效环氧酶抑制剂,通过选择性抑制的环氧酶来阻止血栓烷素、前列腺等炎症物质的生成,从而起到消炎、解热、镇痛的作用。临床上常用于缓解猪、马、牛的内脏、肌肉、骨骼、乳房、子宫紊乱等引起的炎症及绞痛,以及传染病引起的各种急性炎症的控制、犬内毒素血症的治疗等^[3]。因其具有给药量小、吸收迅速、持续时间长、疗效显

著、不良反应轻等特点^[4],深受兽医青睐,是目前国内外兽医临床上消费量最大的NSAIDs。近年来,随着氟尼辛葡甲胺在兽医临床上的广泛应用,其不良反应液逐渐凸显。多表现为胃肠道的毒副作用,如犬、猫的呕吐、腹泻和胃溃疡^[5]。因此,建立确证有效的检测方法,对于FM在兽肉中的残留检测,至关重要。

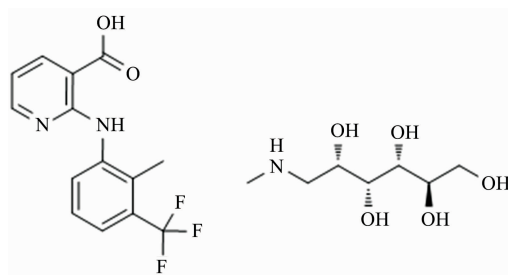


图1 FM的结构式

Fig. 1 The structure of FM

收稿日期:2021-04-09,修订日期:2022-01-20

基金项目:国家重点研发项目(2018YFC1602300),国家自然科学基金项目(32001627)资助

作者简介:张茜,1999年生,江南大学食品学院硕士研究生 e-mail:775013757@qq.com

* 通讯作者 e-mail:xieyunfei@jiangnan.edu.cn

国内外文献报道中,针对肉类食品中 FM 或 F(氟尼辛)的检测方法主要有高效液相色谱法^[6]、液质联用法^[7]、分光光度法^[8]、IC-Elisa 法^[9]。但这些方法存在设备昂贵,前处理、检测操作复杂,不便携等缺点,因此极大地限制了其在现场快速检测中的应用。而便携式拉曼光谱技术具有便携、快速、指纹识别等优点,能克服上述方法带来的不便,因而被广泛用于动物源食品中兽药残留检测。如翟晨等^[10]基于 SERS 技术,以银溶胶为增强基底,建立了肝脏与肌肉组织中沙丁胺醇的定量检测方法,其回收率分别为 91.2% 和 92.1%。Shao 等^[11]以银溶胶为增强基底,建立了鸡鸭肉中二硝基胺和托曲唑的 SERS 检测方法,回收率分别为 95.67%, 105.39% 和 94.79%, 99.44%, 徐宁^[12]以金溶胶为增强基底,结合 SERS 检测与主成分分析法,建立了 SVM 模型,对鸡肉中磺胺类药物进行快速检测。

据文献调研,目前国内外均无与 FM 相关的 SERS 检测方法的报道。因此,本研究以金溶胶作为 SERS 增强基底,通过优化 FM 的检测条件与猪肉中 FM 的提取条件,建立了猪肉中氟尼辛葡甲胺残留的 SERS 检测方法,实现猪肉中 FM 的快速筛查检测。

1 实验部分

1.1 试剂

氟尼辛葡甲胺(FM,纯度 99.77%,购于西弗沃实验室);氯金酸钾(纯度 97.0%)、柠檬酸三钠二水合物(纯度 99.0%)购于南京森贝伽生物科技有限公司;提取中所用有机试剂均为色谱级,无机试剂均为分析纯,均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 设备

便携式拉曼光谱仪(RamTracer-200-HS,美国欧普图斯公司);磁力油浴锅(ZNCL-S,巩义市京华仪器有限公司);超纯水制备仪(Direct-Q 5UV, Millipore 公司)。

1.3 金溶胶基底的制备

通过柠檬酸钠(1%)还原氯金酸钾($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)法制增强基底。实验所用玻璃器皿、转子均用王水泡 12 h,之后用超纯水冲洗六次,烘干备用;将油浴锅升温至 $120 \text{ }^\circ\text{C}$;设置磁力搅拌器参数为 $565 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$;在圆底烧瓶中加入 47 mL 超纯水、3 mL 氯金酸钾充分混合,放入 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 油浴锅内,同时启动磁力搅拌器搅拌至沸腾;加入 2 mL 还原剂,沸腾 20 min;冷却备用, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 存放。

1.4 样品处理

称取 2.5 g 绞碎猪肉于离心管中,加入 2 mL 10% (W/V) Na_2CO_3 溶液,涡旋 2 min 混匀;加入 5 mL 乙酸乙酯进行液液萃取,涡旋 2 min,离心;取上清溶液于另一离心管中,残渣用 5 mL 乙酸乙酯重复萃取一次。将两次上清液合并,之后于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮吹浓缩至 5 mL。加入乙腈 5 mL、乙腈饱和正己烷 7.5 mL 除脂质。涡旋 2 min,离心,尽除去上层液体以及上下层交界处薄薄的一层液体,下层液体转入另一离心管。将下层液体重复除脂一次。将最终得到的下层清液在 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下氮气吹干,用 2 mL 甲醇复溶,用于检测。离心条件

均为 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 10 min。

1.5 SERS 光谱采集

在包裹锡箔纸的玻璃片上,将金溶胶与液体样品按一定比例混匀。用激发光源为 785 nm 的便携式拉曼光谱仪进行扫描,扫描功率 150 mW,扫描时间 10 s,扫描次数 5 次。每一个样品采集 10 张光谱图,做平均拉曼光谱。FM 固体样品光谱采集时,直接将 FM 粉末放在锡箔纸上进行采集,采集条件同液体样品。

1.6 密度泛函理论计算

为了对 FM 的拉曼峰进行归属指认,采用密度泛函理论(density functional theory, DFT),模拟了 FM 的理论拉曼光谱。操作如下:使用 Gauss View 5.0 软件构建 FM 分子模型;分别对氟尼辛和葡甲胺分子进行几何构型优化,之后采用同样的几何优化方法,将已经优化好的氟尼辛、葡甲胺分子放在一起进行几何优化。采用 Gaussian 09 程序进行 DFT 计算,计算关键字为“freq=raman b3lyp/6-311g(d)”。将理论拉曼光谱图与固体拉曼光谱图对比,进行峰归属指认。

2 结果与讨论

2.1 理论计算光谱

图 2(a)为 FM 在 DFT 计算中的结构优化图,葡甲胺分子的位置与氟尼辛中羧基位置较为接近。图 2(b)为固体拉曼光谱与理论计算拉曼光谱的比较,理论光谱矫正因子为 0.966。可看理论计算谱图与固体拉曼谱图存在部分偏差,如普通拉曼出峰位置为 429 cm^{-1} ,而理论计算光谱的出峰位置为 397 cm^{-1} 。由于实际检测条件与理论计算中的理想条件有出入,在出峰情况上,二者也存在在一定的差异,如理论计算光谱中 $824 \sim 1\,085 \text{ cm}^{-1}$ 范围内有峰,而固体拉曼光谱中没有出峰;理论计算光谱在 $1\,597 \sim 2\,000 \text{ cm}^{-1}$ 范围内出峰,而固体拉曼图没有出峰。理论计算中设定物质处于真空环境,而实际实验中 FM 以粉末存在,有分子间作用力以及外界非真空环境的影响。

结合理论计算光谱,对这些峰进行了振动归属指认。其主要的振动模式为苯环、吡啶环变形振动,以及苯环、吡啶环上 C—H 键的伸缩与摇摆运动。 402 cm^{-1} 主要为 C—N 摇摆、C—O 摇摆; 731 cm^{-1} 为吡啶环、苯环的面外摇摆,以及 C—F 摇摆; 824 cm^{-1} 为葡甲胺分子上 C—H 摇摆; $1\,085$, $1\,201$, $1\,251$, $1\,309$, $1\,376$ 和 $1\,597 \text{ cm}^{-1}$ 为苯环、吡啶环上 C—H 摇摆; $1\,309 \text{ cm}^{-1}$ 处还表现为吡啶环上 C=C, C=N 伸缩运动。

2.2 检测条件优化

对样品与金胶之间的体积比进行了优化。结果如图 3(a)所示,随着金溶胶体积比增大, 731 cm^{-1} 处的 SERS 信号先增强后减弱,当样品与金溶胶的体积比为 1:31(V/V)时,SERS 增强效果最好。在此过程中,金纳米粒子上有限的活性位点与样品浓度共同影响了 SERS 强度。1:3 前,活性位点占据主导影响因素。此时随着金纳米粒子的增多,吸附的样品分子数增多,因此 SERS 信号逐渐增强。1:3 时,活性位点饱和,此时 SERS 效果最好。1:3 后,金溶胶对 FM 浓

度的稀释作用逐渐占据主导地位，因此 SERS 信号逐渐减弱。

颗粒。此时比表面积减小，热点数目也减少，所以增强效果反而减弱，甚至消失。

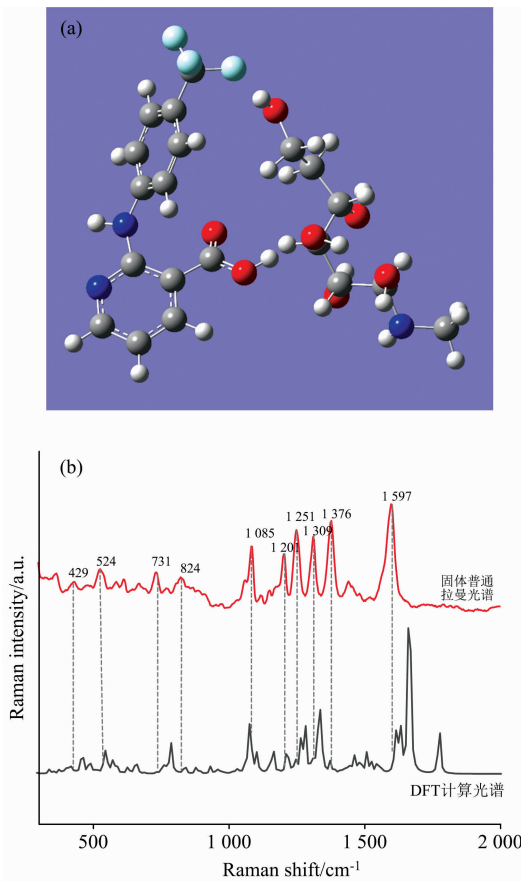


图 2 优化后的结构式(a)，蓝、红、灰、白、绿球分别为 N、O、C、H、F 原子；理论计算拉曼光谱与固体拉曼光谱比较(b)

Fig. 2 Optimize molecular structural formula of FM (a), the blue, red, grey, white, green ball are N, O, C, H, F atom respectively; Comparison between theoretical Raman spectra and solid Raman spectra (b)

金溶胶中，纳米粒子之间的热点距离对增强待测物信号有很大的影响，合适的聚沉有利于缩短纳米粒子之间的热点距离，提高增强效果。在柠檬酸钠还原氯金酸钾制备金溶胶中，过多的柠檬酸根离子充当稳定剂，包裹在金纳米粒子周围，进而防止金纳米粒子的过度聚沉，pH 的变化与促凝剂的添加都容易破坏该静电保护层，从而影响增强效果。

FM 甲醇溶液的 pH 为 6.5，在调 pH 后，从图 3(b)可以看出，pH 在 5~6 时，731 cm⁻¹ 处的 SERS 信号最好，过度调酸与调碱都会使拉曼信号减弱。促凝剂的添加，会使纳米颗粒聚集，在增加热点的同时也增加了分析物的吸附，因此能极大地提高 SERS 增强效果。因此，实验选取了 NaCl, KI, NaBr 和 MgSO₄ 四种盐溶液，探究促凝剂对 FM 的增强效果的影响。实验结果如图 3(c) 所示，促凝剂加入后，SERS 信号并没有得到增强，反而更弱。出现该现象的可能原因是加入促凝剂后，完全破坏了金溶胶静电平衡，使其聚沉为大

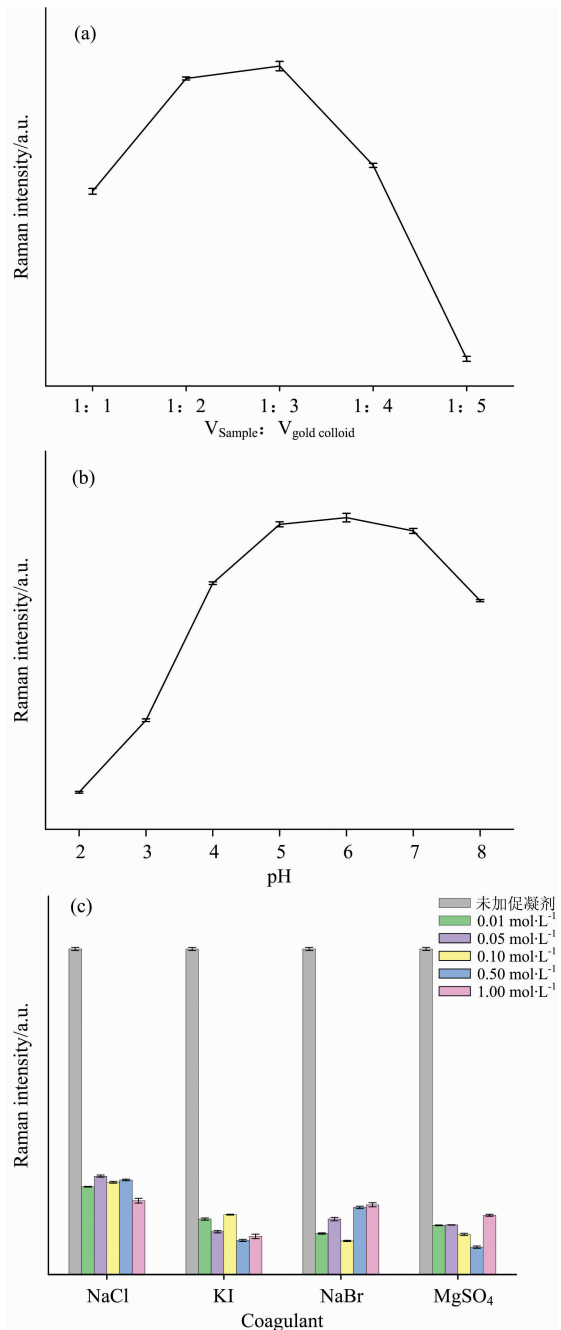


图 3 金胶体积比(a)、样品 pH(b)、促凝剂(c)对 FM SERS 信号的影响

Fig. 3 Effect of gold colloid volume ratio (a), sample pH (b) and coagulant (c) on SERS signal of FM

2.3 标准溶液的定性定量检测

根据上述优化结果，最终选择 10 μL 样品，30 μL 金胶，将待测样品的 pH 调至 6，不加任何促凝剂作为制样条件，功率为 150 mW，积分时间 10 s，积分次数 5 次作为检测条件。对 0.1~1 000 mg · L⁻¹ FM 甲醇溶液进行 SERS 检测，测试光谱如图 4 所示。

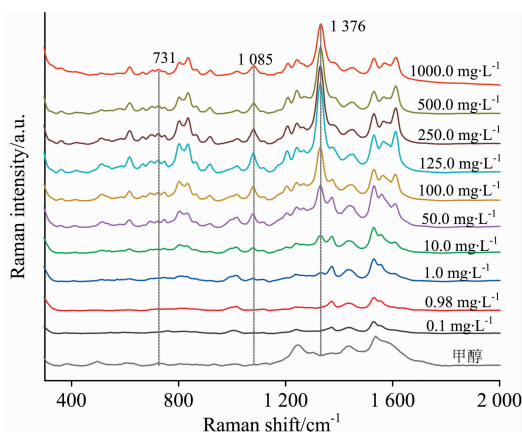


图 4 不同浓度 FM 甲醇溶液的 SERS 谱图

Fig. 4 SERS spectra of flunixin meglumine in methanol solution with different concentrations

发现在 731, 1085 和 1376 cm^{-1} 处, 当浓度低至 0.98 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 仍可看见微弱的峰, 浓度继续低至 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 1376 cm^{-1} 处仍有极其微弱的峰出现, 但是 731 和 1085 cm^{-1} 处完全无峰。因此甲醇溶液中 FM 溶液的检测限为 0.98 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分析了图中典型峰位 731, 1085 和 1376 cm^{-1} 等处的线性拟合情况, 结果如表 2 所示, 在 0.98~125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内都具有良好的线性关系。

表 1 各波数线性拟合

Table 1 Linear relationship for each wave number

波数	R^2	线性拟合方程
731	0.98	$I_{\text{SERS}} = 13.86X_c + 358.98$
1085	0.948 3	$I_{\text{SERS}} = 25.055X_c + 305.89$
1376	0.983 7	$I_{\text{SERS}} = 49.558X_c + 771.44$

2.4 实际样品提取方法优化

FM 易与猪肉基质结合, 不利于加标后的萃取。因此, 为使 FM 与基质分离, 使用强酸 (6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, 90 $^{\circ}\text{C}$, 2 h)、酶 (β -葡萄糖苷酶、常温、5 h) 将猪肉水解, 再进行萃取。结果如图 5(a) 所示, 两组组均没出现特征峰。强酸水解、酶解使蛋白、脂质被分解小分子物质, 导致萃取后的净化难度增大, 因此在检测时基质干扰极大, 无特征峰出现。考虑到上述情况, 尝试通过调节提取环境酸碱的方式来进行萃取前处理。将 2 mL 10% Na_2CO_3 与 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 加入到猪肉中, 之后再行萃取。实验结果如图 6(a) 所示, 10% Na_2CO_3 组在 731, 1085 和 1376 cm^{-1} 处出现特征峰。而 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 处理没有出现特征峰。因此加入 10% Na_2CO_3 进行萃取前处理方法。

FM 易溶于水、甲醇、乙醇、乙酸乙酯等溶剂, 实验比较了这几种常用萃取剂的萃取效果。如图 5(b) 所示, 使用乙酸乙酯萃取时, 基质干扰较少, 加标组 (200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ FM) 在 731, 1085 和 1376 cm^{-1} 等处出现特征峰。而当萃取剂为甲醇、乙醇时, 无特征峰出现。可能原因是肉类中含有的蛋白质会与乙醇、甲醇反应产生变性现象, 导致反应产物的干扰

太大, 从而无法出特征峰。而选用乙酸乙酯作为萃取剂时, 基质干扰小。因此, 后续实验加入 10% Na_2CO_3 进行萃取前处理, 然后再用乙酸乙酯进行液液萃取。

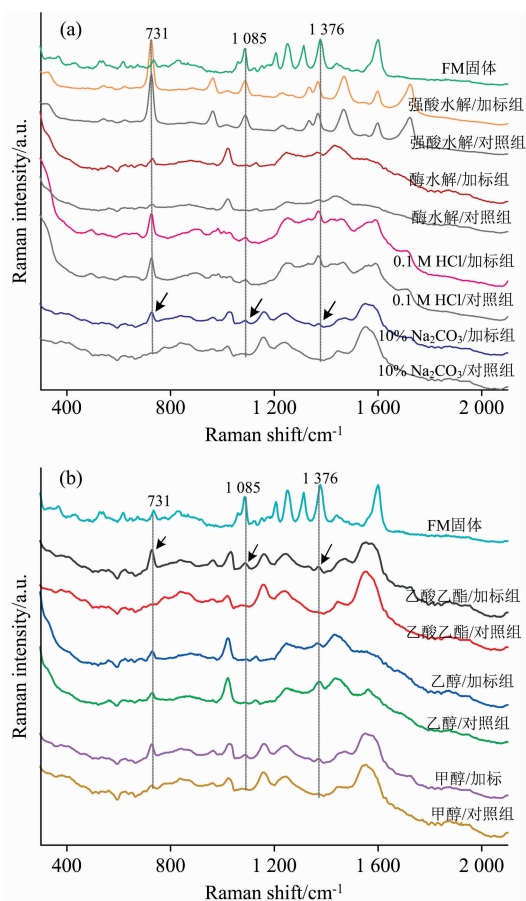


图 5 萃取环境 (a) 与萃取剂 (b) 的影响

Fig. 5 Impact of extraction environmental (a) and extractant (b)

2.5 实际样品的检测

如图 6(a) 所示, 确定 731, 1085 和 1376 cm^{-1} 为其特征峰。选 731 cm^{-1} 作为定性定量峰, 采用空白样本基质液加标的方法绘制标曲。图 6(b) 所示, 在 1~250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 基质加标液的浓度与拉曼峰强之间具有良好的线性关系, 其 R^2 为 0.99, 拟合方程 $I_{\text{SERS}} = 49.13X_c + 3359.5$ 。通过回收率实验预测线性拟合方程的准确性, 对理论浓度分别为 200, 100 和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的猪肉加标液进行 SERS 检测。其平均回收率在 89.61%~95.63%, RSD 在 1.80%~3.30%, 猪肉中的检测限为 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

3 结论

通过对比 FM 甲醇溶液与甲醇溶液 SERS 光谱图, 确定了 FM 的特征峰, 并运用密度泛函理论计算, 对这些峰进行归属确认, 其中 731 cm^{-1} 为吡啶环、苯环的面外摇摆, 以及 C—F 摇摆, 1085 和 1376 cm^{-1} 为苯环、吡啶环上 C—H 摇摆; 接着对 FM 甲醇溶液进行了半定量分析, 建立了猪肉中

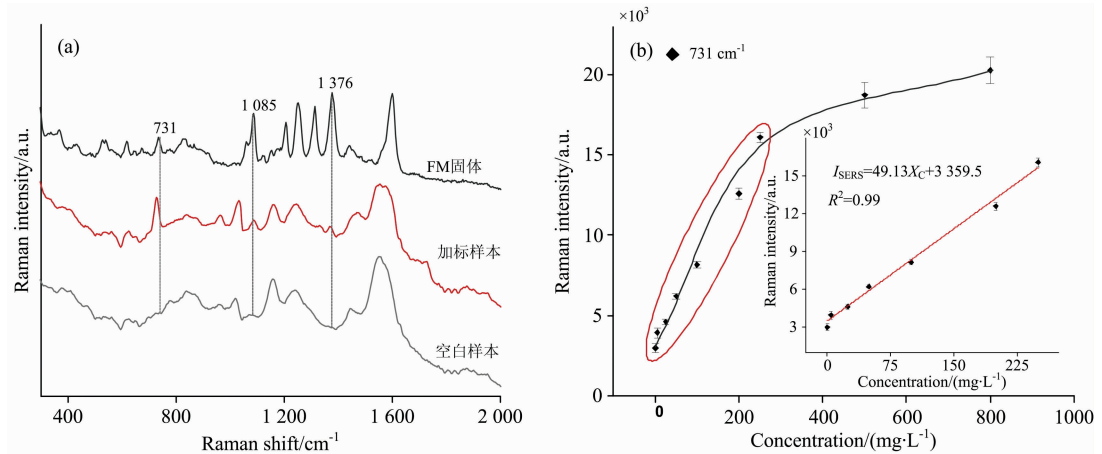


图 6 实际样品出峰(a); 731 cm^{-1} 处 FM 浓度与 SERS 强度之间的线性拟合关系(b)

Fig. 6 The actual sample peaks (a), Linear relationship between FM concentration and SERS intensity at 731 cm^{-1} (b)

FM 残留的 SERS 检测方法。其在猪肉中的检测限为 $1\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 线性范围在 $1 \sim 250\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测的回收率为 $89.61\% \sim 95.63\%$, RSD 在 $1.80\% \sim 3.30\%$ 。本方法快速、

稳定、结果确证, 适用于现场快速检测。但其检测限偏高, 不能达到国家最大残留限量的灵敏度。因此如何降低其检测限, 值得进一步研究。

References

- [1] WANG Hong-lei, LIU Yi-ming, WU Lian-yong, et al(王宏磊, 刘义明, 吴连勇, 等). Chinese Journal of Veterinary Medicine(中国兽医杂志), 2019, 55(1): 44.
- [2] XU Chuan-lai, LIN Lu, KUANG Hua, et al(胥传来, 林璐, 匡华, 等). CN201710285176. X. [P], 2017.
- [3] ZHAO Huan-huan, PAN Yuan-hu, WANG Xiang-ru, et al(赵欢欢, 潘源虎, 王湘如, 等). Progress in Veterinary Medicine(动物医学进展), 2020, 41(2): 114.
- [4] MENG Fang, ZHENG Li, LIN Hong, et al(孟芳, 郑莉, 林红, 等). Chinese Journal of Veterinary Drug(中国兽药杂志), 2018, 52(05): 56.
- [5] LUO Xiao-qing, ZHANG Zhen-rui, GUO Fan-xi, et al(罗小清, 张珍瑞, 郭凡溪, 等). Journal of Nanjing Agricultural University(南京农业大学学报), 2017, 40(6): 1105.
- [6] Fathalla F Belal, Sawsan A Abd El-Razeq, et al. Analytical Chemistry Research, 2015, 3: 63.
- [7] Carmen Igualada, Francisco Moragues, Jorge Pitarch. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1-2): 432.
- [8] Hanan A Merey, Mahmoud S Abd-Elmonem, Hagar N Nazlawy, et al. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2017, 2017: 2321572.
- [9] Lin Lu, Jiang Wei, Xu Liguang, et al. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 193.
- [10] ZHAI Chen, LI Yong-yu, PENG Yan-kun, et al(翟晨, 李永玉, 彭彦昆, 等). Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(农业工程学报), 2017, 33(7): 275.
- [11] Shao Di, Bi Shuyun, Zhao Rui. Sensors and Actuators: B, 2020, 37: 127644.
- [12] XU Ning, LIU Mu-hua, YUAN Hai-chao, et al(徐宁, 刘木华, 袁海超, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2021, 41(3): 924.

Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Rapid Detection of Flunixin Meglumine Residues in Pork

ZHANG Qian, DONG Xiang-hui, YAO Wei-rong, YU Hang, XIE Yun-fei*

College of Food, Jiangnan University, Wuxi 214000, China

Abstract Flunixin meglumine (FM) is the only animal-specific non-steroidal anti-inflammatory drug, and it is the most commonly used anti-inflammatory and analgesic drug in veterinary clinics. In recent years, with the expansion of its application scope, its adverse reactions gradually appeared, and the residues of Flunixin meglumine in animal meat gradually attracted people's attention and attention. The current detection methods of FM include liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and liquid chromatography. However, this method has disadvantages such as expensive equipment, cumbersome and complicated operation, which is highly unfavourable for rapid on-site detection. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) has the advantages of portability, rapid detection, fingerprint recognition, etc., which can overcome the chromatographic technology brought by on-site detection. Because of the inconvenience, it has been widely used in the rapid screening and detection of veterinary drug residues in recent years. Therefore, in order to realize the rapid detection of FM in pork, a rapid detection method of levamisole residues in pork by SERS was established. The gold sol was prepared by reducing potassium chloroaurate with sodium citrate. Through a single factor experiment, it was determined that when the volume ratio of sample to gold gel was 1 : 3, the pH of the sample was 6, and no coagulant was added, the detection effect was the best. Combining density functional theory to calculate theoretical spectra, compare theoretical calculation spectra with solid Raman spectra, assigning vibration modes to characteristic peaks. Among them, the pyridine ring and benzene ring swing at 731, 1 085 and 1 376 cm^{-1} are C—H vibration on the benzene ring. After optimizing the extraction pretreatment method and the selection of extractant, a qualitative and quantitative detection method for FM in pork was established under the best detection conditions. In this method, the characteristic peaks of FM in the pork matrix are 731, 1 085 and 1 376 cm^{-1} . Choose 731 cm^{-1} as the qualitative and quantitative peak, where the Raman intensity and the FM concentration have a good linear relationship within 1~250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and R^2 is 0.99. The actual concentration of the spiked samples was tested, the recovery rate was 89.61%~95.63%, and the RSD was 1.80%~3.30%. The method is simple, fast and stable in operation, and is beneficial to the rapid on-site detection of FM residues in pork.

Keywords Flunixin meglumine; Surface-enhanced Raman spectroscopy; Rapid detection

(Received Apr. 9, 2021; accepted Jan. 20, 2022)

* Corresponding author