

表面增强拉曼法快速检测猪肉中齐帕特罗残留

董祥辉, 杨方威, 于航, 姚卫蓉, 谢云飞*

江南大学食品学院, 江苏 无锡 214000

摘要 齐帕特罗是一种 β_2 -受体激动剂, 也就是俗称的“瘦肉精”, 经常被不法商家用于牲畜养殖, 目前也没有相关国家标准对其残留限量作出规定。该兽药进入牲畜体内以后可以改变某些营养素的代谢方式, 促进牲畜肌肉的生长, 对牲畜体内的脂肪进行快速的消耗和转化, 从而提高牲畜的瘦肉率。目前对该药物的检测方法主要是液相色谱串联质谱法, 该方法具有成本高昂、操作繁琐、耗时较长等优点, 表面增强拉曼光谱法具有灵敏度高、检测速度快等优势, 近年来被广泛应用于食品中有毒有害物的检测。为了实现猪肉中齐帕特罗的快速检测, 建立了一种猪肉中齐帕特罗残留的表面增强拉曼光谱快速检测方法。通过优化比较一系列实验结果, 确定样品与金胶的最佳体积比为 1:2 以及最优混匀检测时间为 3 min; 通过对多种萃取溶剂的比较最终确定使用乙酸乙酯为提取剂; 通过密度泛函理论中 B3LYP/6-311+G(d) 基组对齐帕特罗的理论光谱进行计算, 确定齐帕特罗的 SERS 特征峰并进行振动归属, 以 1 116, 1 447 和 1 573 cm^{-1} 处的特征峰作为齐帕特罗的定量特征峰, 其中 1 116 cm^{-1} 是苯环内变形振动, 1 447 cm^{-1} 是 C—H 键面外摇摆振动, 1 573 cm^{-1} 是苯环 C—H 键伸缩振动; 在最佳实验条件下, 建立了齐帕特罗标准溶液特征峰 SERS 信号与浓度对数的标准曲线, 线性方程 R^2 值均在 0.9 以上; 对不同加标浓度的实际样品进行检测, 得到平均回收率为 90.39%~101.24%, RSD 值为 7.90%~8.94%。该法方便快速、稳定性好, 无需对样品进行复杂的预处理即可实现对猪肉中齐帕特罗残留的快速准确测定, 可为齐帕特罗的检测以及相关标准的制定提供一种新的思路。

关键词 齐帕特罗; 表面增强拉曼; 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)09-2843-05

引言

齐帕特罗 (Zilpaterol) 是一种 β_2 -受体激动剂, 也就是俗称的“瘦肉精”, 结构式如图 1 所示。该药食品动物应用起源于墨西哥, 后传至中国, 被广泛用于养殖业^[1]。饲料中添加此类药物可使动物体内蛋白合成增加, 促进脂类转化, 从而显著提高动物瘦肉比例。齐帕特罗被机体摄入后主要通过肾脏和肝脏将其代谢排出体外, 残留在体内的齐帕特罗要 8 天以上才能被清除^[2]。含有此类药物残留的食品会对人体健康产生极大危害, 可能出现急性中毒、心悸、头晕等症状。鉴于其危害性, 我国禁止在畜禽养殖中使用 β_2 -受体激动剂类药物, 但至今这类药物违法添加事件屡禁不止, 今年的 3.15 晚会再次曝光河北养殖场违法使用瘦肉精类药物, 因此需要建立相关快速检测方法对瘦肉精类药物残留进行检测。

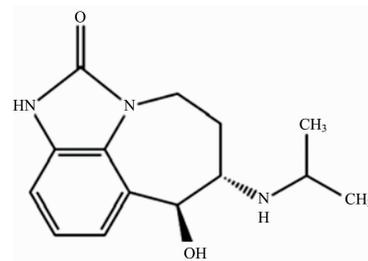


图 1 齐帕特罗化学结构式

Fig. 1 Chemical structural formula of zilpaterol

目前国内外报道对齐帕特罗进行检测的方法多为液相色谱串联质谱法^[3]和酶联免疫检测法^[4]。液相色谱串联质谱法灵敏度高、准确性好且适用范围广, 但是相关设备昂贵、前处理复杂、步骤繁琐且花费时间长, 在现场大规模筛选中受

收稿日期: 2021-07-26, 修订日期: 2021-10-17

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: 董祥辉, 1997 年生, 江南大学食品学院硕士研究生 e-mail: 1006625088@qq.com

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

限严重；酶联免疫检测法可以进行特异性检测，操作简便，但是制备困难且成本高昂，很难大规模应用。

表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)具有检测灵敏度高、分析速度快、成本低廉等优点，在大规模筛选检测方面具有极大的潜力，因此该技术被广泛用于食品中有毒有害物的快速检测。赵进辉等^[5]基于柠檬酸钠还原制成的金胶对鸭肉中四环素的残留进行检测，预处理方法简单快速，鸭肉提取物中四环素的检出限可达 $1.120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，是一种快速检测鸭肉中四环素类药物残留的良好检测方案；Cheng 等^[6]利用再氧化氧化石墨烯/金纳米粒子对尿液中的克仑特罗进行检测，检测时间短、准确率高，且该 SERS 方法仅需要便携式拉曼仪器作为配套设备，可用于现场快速筛查尿液，加强市场监测；Peng 等^[7]比较不同溶剂、不同金纳米粒子的浓度和积分时间对 SERS 检测氯霉素的影响，建立了可适用于多种食品中氯霉素检测的 SERS 检测方法。

目前尚未有 SERS 方法检测猪肉中齐帕特罗残留的报道。本研究基于经典的柠檬酸钠还原法制成了增强效果较好的金溶胶，然后对齐帕特罗的拉曼检测条件与实际样品提取方法进行摸索探究，最终建立了一种对猪肉中残留的齐帕特罗进行 SERS 检测的方法。

1 实验部分

1.1 试剂

齐帕特罗标准品(纯度 $>98.6\%$)，柠檬酸三钠盐二水合物(纯度 99.0%)，均购于阿拉丁试剂公司；氯金酸钾(纯度 97.0%)购于南京森贝伽生物科技有限公司；碳酸钠(分析纯)，乙酸乙酯(分析纯)，盐酸(分析纯)，硝酸(分析纯)，均购于国药集团化学试剂有限公司；超纯水。猪肉，购于京东。

王水：取 500 mL 浓硝酸缓慢倒入至 1 500 mL 浓盐酸中，在这个过程中不断搅拌使其混匀，用于清洗制备金胶的圆底烧瓶。

齐帕特罗工作液：精确称取 0.10 g 的齐帕特罗固体溶于 100 mL 的超纯水中，制得浓度为 $1 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的齐帕特罗储备液。用超纯水稀释齐帕特罗储备液制得各一种低浓度的齐帕特罗工作液。

10%质量分数的 Na_2CO_3 溶液：称取 10.0 g Na_2CO_3 固体，溶于 100 mL 水，混匀。

1.2 设备

ME204E 电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；ZNCL-GS 磁力加热油浴锅，上海越众仪器设备有限公司；可调试液器，美国 Thermo LabSystems 公司；Milli-Q 超纯水系统，美国 Millipore 公司；DHG-9053A 电热鼓风干燥箱，无锡玛瑞特有限公司医疗设备厂；BCD-602W 冰箱，青岛海尔股份有限公司；PS-10 超声波清洗器，东莞市洁康超声波设备有限公司；RamTracer-200-HS 便携式拉曼光谱仪，美国欧普图斯；ZGDCY-24 干式氮吹仪，上海梓桂仪器有限公司；TGL-16M 台式高速冷冻离心机，上海卢湘仪离心机仪器有

限公司；WH-2 微型漩涡混合仪，上海沪西分析仪器厂有限公司。

1.3 金溶胶制备

本研究使用金溶胶作为 SERS 增强基底，通过经典柠檬酸三钠还原氯金酸钾法制得。具体操作为：在事先用王水清洗过并烘干的圆底烧瓶中加入 23 mL 超纯水与 1.5 mL $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氯金酸钾，搅拌混匀，放入预热好的 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 油浴锅内，同时以 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌并保持温度恒定至溶液沸腾；保持沸腾 5 min 后加入 1 mL 1% (质量分数) 柠檬酸三钠水溶液，继续在 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 下恒温搅拌 15 min，得到紫红色的金纳米溶胶，冷却至室温， $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中冷藏保存备用。

1.4 样品处理

称取 2.5 g 经绞肉机粉碎的猪肉放入 50 mL 离心管中，依次加入 2 g 无水硫酸钠、4 mL 10% 质量分数的 Na_2CO_3 溶液、10 mL 乙酸乙酯，涡旋混匀 15 min。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min，取上层有机层留用。乙酸乙酯重复萃取两次并合并萃取液， $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 下氮吹至干，用超纯水复溶，待测。

1.5 仪器参数

仪器参数为：激光光源波长 785 nm，激光功率 250 mW，扫描时间 10 s，扫描次数 3 次。在包有锡纸的载玻片上依次滴加一定体积的金胶和待测液，混合均匀 3 min 后进行扫描。每个样品扫描 15 次取平均值。

1.6 理论光谱计算

先使用 Gaussview 5.0 软件画出齐帕特罗分子结构式，得到 Gaussian Input Files，然后进行理论光谱计算，首先通过 Optimization 功能对齐帕特罗分子结构式进行优化，以优化后分子结构式作为 Gaussian Input Files，通过 Frequency 功能 B3LYP/6-311+G(d) 基组水平对齐帕特罗进行光谱计算，该计算基组的校正因子为 0.938 0。计算结束后得到 Gaussian Output Files，获得理论计算拉曼光谱数据。通过理论计算光谱与固体标准物质拉曼光谱、标准溶液 SERS 光谱比较，对分子特征峰进行指认。

2 结果与讨论

2.1 理论光谱

齐帕特罗优化后结构式如图 2 所示。由图可以看到，经过校正因子校正后的理论光谱与固体光谱基本一致，其中苯环的面内变形振动在理论光谱计算进行校正后位于 $1 115 \text{ cm}^{-1}$ 处，固体光谱位于 $1 116 \text{ cm}^{-1}$ 处，C—H 面外摇摆理论光谱计算进行校正后位于 $1 498 \text{ cm}^{-1}$ 处，固体光谱位于 $1 447 \text{ cm}^{-1}$ 处，可以看出两者的误差较小，在可接受范围之内。

由于理论光谱的计算默认物质处于真空环境，实际固体光谱是存在分子间作用力的，所以理论计算与固体光谱还是有一定的差距，例如在 $500 \sim 700 \text{ cm}^{-1}$ 处理论计算中的较多峰均未在固体光谱中找到。

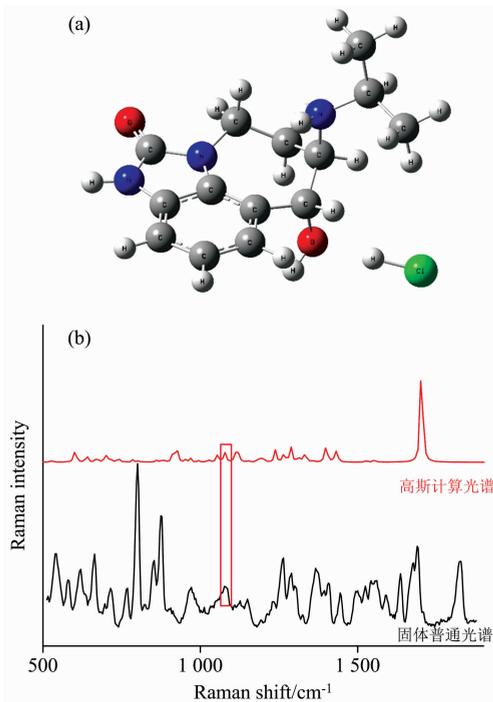


图 2 齐帕特罗理论计算结果

(a): 优化后齐帕特罗分子结构式;
(b): 理论计算光谱与固体拉曼比较

Fig. 2 Zipaterol's theoretical calculation results

(a): Optimize molecular structural formula of Raman zilpaterol hydrochloride; (b): Comparison between theoretical spectra and solid Raman spectra

2.2 检测条件优化

在检测过程中发现，金胶与待测样品的体积比、混匀时间都会对 SERS 强度有较大的影响，因此对这两个条件进行了优化，结果如图 3 所示。由图 3 可以发现，随着金胶体积的增加，拉曼强度先增强后减弱，当待测样品与金胶的体积比为 1:2 时，SERS 增强因子最大，增强效果最好。这是因为当金纳米颗粒占比比较低时，没有足够多的目标物分子被吸附到金纳米颗粒表面，导致目标物产生的表面增强信号不足。当金纳米颗粒占比过高时，多余的金纳米反而会阻碍激光对吸附在金纳米表面的目标分子的拉曼散射信号表达，使得增强效果变差^[8]。在待测样品与金胶的体积比 1:2 时最有利于金纳米粒子吸附齐帕特罗分子形成单分子吸附层状态，增强效果较好。同时发现，在金胶刚与齐帕特罗分子混合后，其拉曼强度并不是一成不变，而是先增强再趋于稳定，这是因为齐帕特罗与金纳米粒子结合生成“热点”需要一定时间，而“热点”对信号影响极大，实验表明 3 min 后，齐帕特罗的信号强度基本保持不变，因此后续实验中取最优测量时间为 3 min。

2.3 齐帕特罗的检测

将固体光谱、高斯计算光谱、超纯水光谱与齐帕特罗标准溶液中的光谱进行比较，发现 1 116, 1 447 和 1 573 cm^{-1} 这三个位置的峰在固体、标液与计算光谱中均有出峰且拉曼信号较强，因此将这 3 个峰作为齐帕特罗 SERS 检测中用于

定性和定量检测的特征峰。根据拉曼位移与分子的振动模式以及相关文献报道对这 3 个特征峰进行归属，1 116 cm^{-1} 为苯环面内变形振动^[9]，1 447 cm^{-1} 为 C—H 面外摇摆振动，1 573 cm^{-1} 为苯环 C—H 伸缩振动。

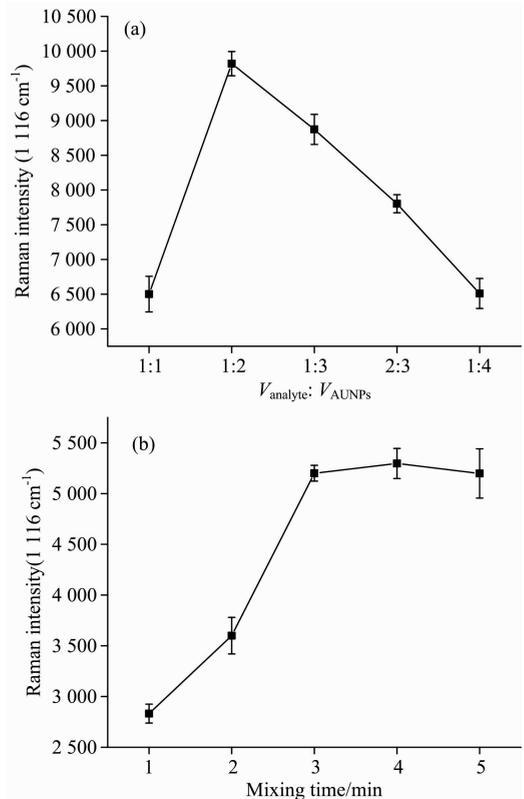


图 3 不同检测条件下特征峰 1 116 cm^{-1} 处 SERS 峰强情况

(a): 金胶体积比优化; (b): 混匀时间优化

Fig. 3 SERS peak intensity at 1 116 cm^{-1} under different detection conditions

(a): Optimization of gold sol volume ratio;
(b): Optimization of mixing time

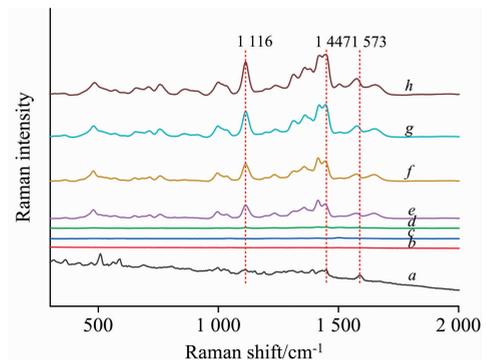


图 4 齐帕特罗不同浓度水溶液 SERS 光谱

a—h 分别为固体，水，1, 5, 10, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液

Fig. 4 SERS spectra of different concentrations of zilpaterol in aqueous solutions

a—h are solid, water, 1, 5, 10, 25, 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ solutions

在确定好的最优条件下对 1~100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的齐帕特罗

标准溶液进行拉曼检测。我们发现在 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 1 116, 1 447 和 1 573 cm^{-1} 这三个位置的峰依旧清晰可见, 当浓度再下降时, 无法观测到相应特征峰, 因此可得 SERS 检测齐帕特罗的检测限可 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

对 1 116, 1 447 和 1 573 cm^{-1} 这三个位置的峰的 SERS

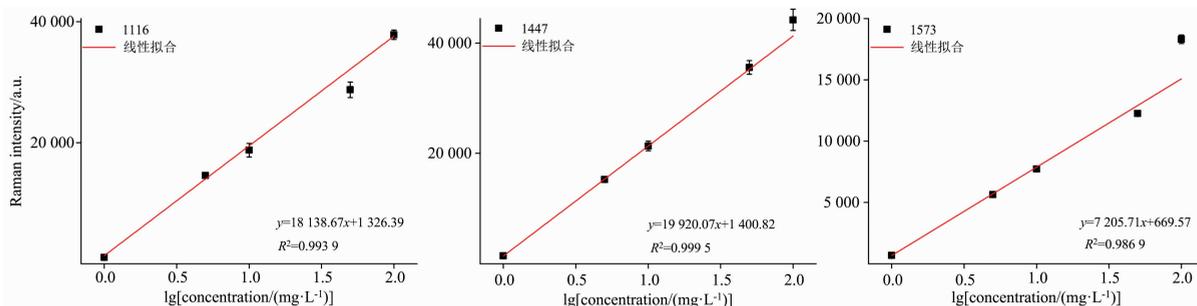


图 5 峰强与浓度线性关系图

Fig. 5 Linear relationship between peak intensity and concentration

2.4 实际样品的检测

猪肉是一种复杂的食品基质, 其含有的蛋白质、脂肪等成分对拉曼信号的干扰十分严重^[10], 蛋白质、脂肪等物质与金溶胶结合后, 会影响到目标物分子与金纳米颗粒的结合, 从而使目标物特征峰信号减弱甚至被掩盖, 因此需要对前处理方法进行优化。

齐帕特罗在弱碱性条件下更容易溶解到有机溶剂中^[3], 因此提取过程中加入了一定量的碳酸钠溶液。在提取溶剂的选取过程中, 首先使用了乙腈与异丙醇混合液(4:1)对目标物进行提取, 发现目标物特征峰被完全掩盖, 图谱中 1 020~1 130 与 1 400~1 500 cm^{-1} 处的峰应该是猪肉中未除尽脂类的峰^[11], 于是在乙腈提取后再加入正己烷进行除脂, 1 020~1 130 与 1 400~1 500 cm^{-1} 处的脂类峰强度有所下降, 但

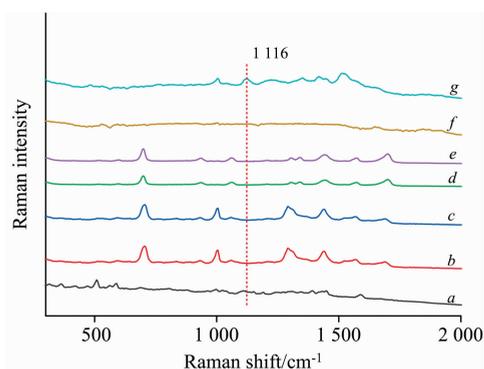


图 6 不同提取溶剂对比

a—g 分别为固体, 乙腈与异丙醇混合液(4:1)提取空白基质, 乙腈与异丙醇混合液(4:1)加标提取, 乙腈正己烷提取空白基质, 乙腈正己烷加标提取, 乙酸乙酯提取空白基质, 乙酸乙酯加标提取

Fig. 6 Comparison of different extraction solvents

a—g are solid, A mixture of acetonitrile and isopropanol (4:1) extracts the blank matrix, a mixture of acetonitrile and isopropanol (4:1) adds standard extraction, acetonitrile n-hexane extracts the blank matrix, acetonitrile n-hexane spikes extraction, ethyl acetate extraction Blank matrix, ethyl acetate spiked extraction

强度与浓度关系进行研究, 发现特征峰的 SERS 强度与浓度的对数值存在一定的线性关系, 如图 5 所示, 以浓度对数值与 SERS 特征峰强度进行拟合, 线性拟合方程 R^2 值均在 0.9 以上。

目标物的特征峰信号强度仍然很弱, 最后确定使用乙酸乙酯进行两次萃取, 由图 6 可以发现乙酸乙酯提取效果最好, 杂质的峰基本不会干扰目标物。

2.5 回收率的确定

为了考察 SERS 技术检测猪肉提取液中齐帕特罗残留量的可靠性, 利用所得标准工作曲线方程, 对不同加标浓度齐帕特罗样本进行预测。考察结果如表 1 所示。

表 1 回收率和精密度确定结果

Table 1 Recovery rate and precision determination results ($n=3$)

添加水平/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均测定值/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	平均 回收率/%	变异 系数/%
1.00	1.01	101.24	8.02
2.00	1.86	93.16	7.90
20.00	18.08	90.39	8.94

选择 1, 2 和 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为加标浓度进行加标实验, 结果得到预测样本中齐帕特罗的平均加标回收率为 90.39%~101.24%, RSD 值为 7.90%~8.94%, 说明采用该方法检测猪肉中齐帕特罗残留量准确度高, 精确性好, 可以用于猪肉中齐帕特罗残留的快速检测。

3 结论

对猪肉中齐帕特罗残留的 SERS 检测方法进行了研究, 确定了拉曼检测金胶与齐帕特罗的混合体积比以及混匀时间, 同时对多种提取溶剂进行比较, 最终确定了乙酸乙酯为提取溶剂。在最佳检测条件下, 在齐帕特罗特征峰 SERS 强度与浓度对数值(1~100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)之间建立了良好的线性关系, 线性方程 R^2 值均在 0.9 以上。对样品进行加标实验, 平均回收率 90.39%~101.24%, RSD 值为 7.90%~8.94%。这说明可以用该 SERS 方法进行大规模现场筛查, 从而达到对齐帕特罗残留量进行监控的作用。

References

- [1] LI Zhi-cheng, ZHENG Xiao-dong, LIU Xue-mei, et al(李志成, 郑晓冬, 刘雪梅, 等). *Modern Food Science and Technology(现代食品科技)*, 2021, 37(7): 321.
- [2] ZHANG Hai-yan(张海燕). Master Dissertation(硕士论文). Jinan University(暨南大学), 2016.
- [3] Yikilmaz Y, Kuzukiran O, Erdogan E, et al. *Biomedical Chromatography*, 2020, 34(10): e4926.
- [4] DONG Li-xue, GE Huai-li, ZHENG Bai-qin, et al(董李学, 葛怀礼, 郑百芹, 等). *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine(中国畜牧兽医)*, 2013, 40(3): 242.
- [5] ZHAO Jin-hui, YUAN Hai-chao, HU Qi, et al(赵进辉, 袁海超, 胡琪, 等). *Modern Food Science and Technology(现代食品科技)*, 2017, 33(2): 239.
- [6] Cheng J, Wang S, Zhang S, et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 279: 7.
- [7] Peng Y J, Liu M H, Zhao J H, et al. *Journal of Spectroscopy*, 2017, 50(10): 579.
- [8] Tamitake I, Ken-ichi Y, Hiroharu T, et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 2011, 219(2-3): 167.
- [9] Cheng J, Fan M D, Wang P L, et al. *Food Analytical Methods*, 2020, 13(4): 902.
- [10] Gao Ting, Ye Nengsheng, Li Jian. *Analytical Letters*, 2016, 49(8): 1163.
- [11] Fowler Stephanie M, Ponnampalam Eric N, Schmidt Heinar, et al. *Meat Science*, 2015, 110: 70.

Papid Detection of Zilpaterol Residues in Pork by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

DONG Xiang-hui, YANG Fang-wei, YU Hang, YAO Wei-rong, XIE Yun-fei*

School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214000, China

Abstract Zilpaterol is a β_2 -receptor agonist, also known as “Clenbuterol”, often used in livestock breeding by illegal businesses. There is no relevant national standard that stipulates its residue limit. After the veterinary drug enters the animal’s body, it can change the metabolic mode of certain nutrients, promote the growth of the animal’s muscle, and rapidly consume and transform the fat in the animal’s body, thereby increasing the lean meat rate of the animal. The current detection method for the drug is mainly liquid chromatography-tandem mass spectrometry, which has the disadvantages of high cost, cumbersome operation, and long time-consuming. Surface-enhanced Raman spectroscopy has the advantages of high sensitivity and fast detection speed. In recent years, it has been widely used to detect toxic and harmful substances in food. In order to realize the rapid detection of zilpaterol in pork, a surface-enhanced Raman spectroscopy method for rapid detection of zilpaterol residue in pork was established. By optimising and comparing a series of experimental results, it is determined that the best volume ratio of sample to gold glue is 1 : 2, and the best mixing detection time is 3 min. Through the comparison of multiple extraction solvents, it is finally determined that ethyl acetate is used as the extractant; through the calculation of the theoretical spectrum of B3LYP/6-311 + G(d) basis group aligned patro in density functional theory, the SERS characteristic peak of zipatro is determined and the vibration is assigned. The characteristic peaks at 1 116, 1 447 and 1 573 cm^{-1} are taken as the characteristic quantitative peaks of zilpaterol, of which 1 116 cm^{-1} is caused by the in-plane deformation vibration of a benzene ring, and 1 447 cm^{-1} is the out of plane swing vibration of C—H bond, 1 573 cm^{-1} is the stretching vibration of C—H bond of the benzene ring. Under the best experimental conditions, a standard curve of the characteristic peak SERS signal and concentration logarithm of zilpaterol standard solution was established, and the R^2 value of the linear equation was all above 0.9; actual samples with different spiked concentrations were performed. The detection showed that the average recovery rate was 80.39% ~ 101.24%, and the RSD value was 7.90% ~ 8.94%. This method is convenient, fast, and stable. It can realize the rapid and accurate determination of zilpaterol residues in pork without complicated sample pretreatment. It provides a new method for detecting zilpaterol and the formulation of related standards.

Keywords Zilpaterol; SERS; Rapid detection

* Corresponding author

(Received Jul. 26, 2021; accepted Oct. 17, 2021)