

TLC-SERS 法快速筛查猪尿中磺胺类抗生素

朱晓宇¹, 上官新晨¹, 艾施荣², 彭雄鑫³, 杨红飞², 陈涛³, 吴瑞梅²

(1. 江西农业大学南昌市农产品加工与质量控制重点实验室, 江西南昌 330045)

(2. 江西农业大学工学院, 江西南昌 330045) (3. 江西农业大学理学院, 江西南昌 330045)

摘要: 采用薄层色谱法 (TLC) 与表面增强拉曼光谱 (SERS) 联用技术, 建立猪尿中磺胺类抗生素残留的快速筛查方法。用阴性猪尿样本模拟阳性样品, 以氯仿-乙醇-石油醚 (1:1:2) 为展开剂, 利用 TLC 将猪尿中的抗生素与猪尿基质初步分离。以 785 nm 激光为激发波长, 金溶胶为表面增强剂, 采用 SERS 技术对分离出的抗生素沉积斑点进行检测。结合密度泛函理论, 得到定性定量分析猪尿中磺胺嘧啶分子特征峰 877 cm^{-1} 和 994 cm^{-1} 、磺胺二甲嘧啶分子特征峰 661 cm^{-1} 、磺胺噻唑分子特征峰 862 cm^{-1} 和 1127 cm^{-1} 。该方法检测猪尿中磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶和磺胺噻唑的最低检测浓度分别为 0.1、0.1、0.2 mg/L。且 TLC 技术可实现猪尿中混合抗生素的分离, 当猪尿中 3 种混合抗生素点样沉积量为 0.01 μg 时, 各抗生素的特征峰均清晰可辨。由此可见, TLC-SERS 技术可用于猪尿中混合抗生素残留的快速筛查。

关键词: 薄层色谱; 表面增强拉曼光谱; 猪尿; 抗生素残留

文章编号: 1673-9078(2019)02-238-246

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.2.033

Rapid Detection for Sulfonamide Antibiotics Residues in Swine Urine Using TLC-SERS

ZHU Xiao-yu¹, SHANGGUAN Xin-chen¹, AI Shi-rong², PENG Xiong-xin³, YANG Hong-fei², CHEN Tao³,
WU Rui-mei²

(1. Key Lab for Agro-Products Processing and Quality Control of Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

(2. School of Engineering of Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

(3. College of Science of Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

Abstract: A rapid detection method for sulfonamide antibiotics residues in swine urine was developed based on thin layer chromatography (TLC) and surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) technology. Position samples were made by antibiotics being added to negative swine urine. Chloroform-ethanol-petroleum ether (1:1:2) was used as a mobile phase to separate antibiotics from swine urine. The excitation wavelength was 785 nm. Gold colloidal was used to enhance Raman signals. Coupled with Density functional theory, sulfadiazine characteristic peaks 877 cm^{-1} and 994 cm^{-1} , sulfamethazine characteristic peak 661 cm^{-1} , sulfathiazole characteristic peaks 862 cm^{-1} and 1127 cm^{-1} were found and used to qualitatively and quantitatively analyze antibiotics residues in swine urine. The minimum detection amounts of sulfadiazine, sulfamethazine and sulfathiazole in swine urine were 0.1, 0.1 and 0.2 mg/L, respectively. And TLC can achieve the separation of mixed antibiotics in swine urine. The characteristic peaks of each antibiotic are easily distinguished when the concentration of three mixed antibiotics in swine urine was 0.01 μg . TLC-SERS technology showed to be suitable for rapid detection of antibiotic residues in pig urine.

Key words: TLC; SERS; swine urine; antibiotics residues

抗生素是一类重要广谱抗菌药, 有些养殖户将抗生素添加到饲料中, 用以预防和治疗疾病, 同时提高饲料转化率, 促进动物生长, 提高畜牧养殖业的经济

收稿日期: 2018-10-29

基金项目: 江西省博士后科研项目资助 (2015KY21)

作者简介: 朱晓宇 (1995-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 吴瑞梅 (1975-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品农产品质量安全光谱快速新技术的研究

效益。但目前存在严重滥用抗生素现象, 动物源性食品中药物残留超标现象常有发生。猪食用添加抗生素的饲料后, 残留抗生素会随猪尿排出体外, 通过监控猪尿中抗生素残留量, 可大体监控其休药期, 从而有效监控猪肉中抗生素的残留状况。常规抗生素残留检测方法有超高效液相色谱-质谱 (UPLC-MS)、高效液相色谱 (HPLC)、液相色谱-质谱 (LC-MS) 等^[1-3], 这些方法存在前处理复杂、操作技术性强、检测成本高等缺陷, 难以满足现场实时快速检测需求。

表面增强拉曼光谱 (Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) 是近年来研究较多的现场快速检测技术之一, 具有样品前处理简单、检测速度快、检测灵敏度高优点^[4-5], 广泛用于食品农产品中抗生素残留检测^[6-8]。马海宽^[9]等利用 SERS 技术对鱼肉中磺胺类抗生素进行分析, 以银溶胶为增强基底、乙酸乙酯为提取剂。采用 SERS 技术进行检测, 磺胺甲基嘧啶和磺胺二甲嘧啶的检测限分别为 0.16×10^{-6} 和 0.59×10^{-6} 。李春颖^[10]等利用 SERS 技术对鱼肉中的孔雀石绿、结晶紫、氯霉素、磺胺甲基嘧啶进行痕量检测, 孔雀石绿和结晶紫的含量为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 和 $10 \mu\text{g/kg}$ 氯霉素、磺胺甲基嘧啶最低检测浓度为 50 、 $500 \mu\text{g/L}$, 方法检测结果与经典化学方法结果具有一致性。

猪尿成分复杂, 对 SERS 检测基质效应大, 但对猪尿中的一些复杂成分分离后, 再进行 SERS 快速检测, 可提高 SERS 的检测灵敏度。薄层色谱 (Thin Layer Chromatography, TLC) 是一种经典分析分离方法, 具有简单、高效、成本低等优点^[11,12], 常用于定性鉴别, 但需要显色剂随行对照, 稳定性差。研究者将 TLC 与 SERS 技术联用应用于多种物质的分离和检测, 在中药分析中得到广泛应用^[13-15], 但目前未见利用 TLC 与 SERS 技术分析猪尿中兽药残留的相关报道。

本文以生猪养殖常用的磺胺类抗生素 (磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑) 为对象, 利用 TLC 技术, 将猪尿中的抗生素从复杂基质中进行初步分离, 再用 SERS 技术快速筛查猪尿中的抗生素残留, 建立猪尿中 3 种磺胺类抗生素的快速筛查方法, 为生猪养殖兽药残留快速监控提供新方法。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

实验室自行搭建的显微拉曼光谱仪: 由 DAC151B-785 显微拉曼检测平台 (B&W TEK Inc.) 和 RamTracer-200-HS 激光拉曼光谱仪 (欧普图斯光学纳米科技有限公司) 组成, 激发波长 785 nm , 分辨率 5 cm^{-1} ; 电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 智能恒温磁力搅拌器, 郑州市亚荣仪器有限公司; 涡旋混合器, 海门市其林贝尔仪器有限公司; ZF-200 暗箱式紫外分析仪, 德国 Heidolph 公司; 离心机, 安徽嘉文仪器设备有限公司; Hitachi S-4800 扫描电子显微镜, Hitachi company; T6 紫外可见分光光度计, 北京浦西通用仪器有限公司。

磺胺嘧啶 ($\geq 99.00\%$), Stanford Analytical Chemicals Inc.; 磺胺二甲嘧啶 ($\geq 99.00\%$), Stanford

Analytical Chemicals Inc.; 磺胺噻唑 ($\geq 99.00\%$), Stanford Analytical Chemicals Inc.; 氯金酸 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 柠檬酸三钠 (99.0% , 分析纯), 西陇化工股份有限公司; 甲醇 ($\geq 99.5\%$, 分析纯)、三氯甲烷 ($\geq 99.0\%$, 分析纯)、石油醚 ($\geq 99.0\%$, 分析纯)、无水乙醇 ($\geq 99.7\%$, 分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 硅胶吸附板 (GF_{254}), 烟台江友硅胶开发有限公司; 超纯水, 阴性猪尿样本由江西出入境检验检疫局提供。

1.2 金纳米增强基底制备及表征

采用经典柠檬酸钠还原 HAuCl_4 方法制备金纳米增强基底^[16]。具体制备过程如下: 取 100 mL 1 mmol/L 氯金酸溶液加入到圆底烧瓶中, 加热至沸腾; 将 3.7 mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液迅速加入到沸腾的氯金酸溶液中, 继续加热并剧烈搅拌 20 min , 得到红棕色悬浮液, 自然冷却至室温, -4°C 下保存备用。

1.3 溶液的制备

标准溶液: 准确称量 0.0100 g 的磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶和磺胺噻唑 3 种抗生素标准品, 用甲醇溶于烧杯中, 待完全溶解后转移至 100 mL 棕色容量瓶中, 超声溶解后, 用甲醇定容至刻度, 得到浓度为 100 mg/L 的 3 种标准品溶液, -4°C 保存备用。

模拟阳性样品溶液: 移取猪尿阴性样品溶液, 分别配制 20 、 10 、 5 、 2 、 1 、 0.8 mg/L 的 3 种抗生素阳性样品溶液, 充分涡旋 3 min , 再以 4500 r/min 的转速离心 5 min , 取上清液备用。

模拟混标阳性样品溶液: 浓度为 100 mg/L 的磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶及磺胺噻唑标准溶液与阴性猪尿按比例混合, 得到 3 种抗生素浓度均为 10 mg/L 的真实样品溶, 充分涡旋 3 min , 再以转速 4500 r/min 电动离心机离心 5 min , 取上清液备用。

1.4 磺胺类抗生素分子的理论模拟

采用 Gaussview 软件构建磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑的分子结构, 然后采用 Gauss03 对 3 种抗生素分子进行计算, 计算方法设置为密度泛函理论 (Density Functional Theory, DFT) 中的 B3LYP, 基组设置为 6-31G, 最后由 Gaussview 打开计算结果, 得到 3 种抗生素分子理论拉曼光谱。

1.5 TLC-SERS 检测

分别吸取 3 种抗生素标准溶液、阳性样品溶液、混合标准溶液以混标模拟阳性样品溶液各 $5 \mu\text{L}$, 点于

硅胶薄层色谱板上,点样时尽量使各斑点直径保持最小。以氯仿-乙醇-石油醚(1:1:2)为展开剂,在室温下展开,取出,晾干,展开剂挥发完全后,在254 nm紫外下检视定位。在模拟阳性样品色谱条带中与标准品相同Rf值处的斑点处、标准品色谱条带中斑点处各滴加1 μ L金胶,待干后,用显微共焦拉曼光谱仪测量滴加点位置的拉曼谱峰。

2 结果与分析

2.1 薄层色谱条件优化

参照相关文献^[17],对实验中展开剂优化进行考察。实验过程中考察了氯仿-乙醇-石油醚(1:1:1)和氯仿-乙醇-石油醚(1:1:2)对三种抗生素的展开情况,结果如图1所示。图1a是展开剂为(1:1:1)、b是展开剂为(1:1:2)时三种抗生素分离效果。从图1a中可以看出,展开剂比例为1:1:1时,磺胺嘧啶和磺胺噻唑Rf值大致相同,而与磺胺二甲嘧啶的不同。说明磺胺嘧啶和磺胺噻唑没有分离开,不利于实验分析。由图1b可知,3种抗生素的Rf值都不同,说明3种抗生素的分离效果好,因此,实验最终采用氯仿-乙醇-石油醚(1:1:2)为展开剂。

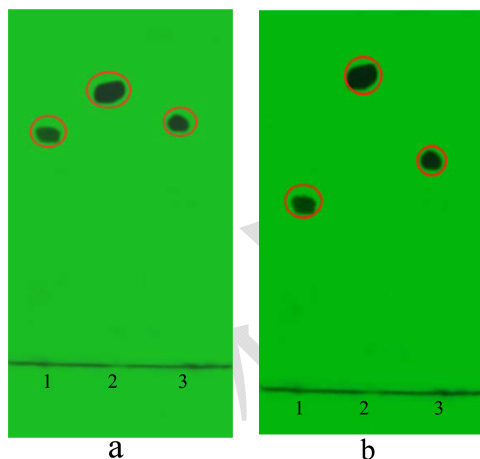


图1 不同配比展开剂对三种抗生素分离效果图

Fig.1 Separate effect of different ratio mobile phase

注: 1.磺胺嘧啶, 2.磺胺二甲嘧啶, 3.磺胺噻唑。a是(1:1:1)、b是(1:1:2)。

2.2 金胶稳定性考察

2.2.1 金胶表征

图2是金溶胶紫外吸收光谱图(a)和电镜扫描图(b)。由图可见,金溶胶最大吸收峰在540 nm,该吸收峰呈单峰,表明试验所制备的金纳米粒子呈球形且粒径均匀,粒径约55 nm^[18]。由电镜扫描图可看出,

金纳米粒子呈球形且颗粒均匀,其粒径约为55 nm。

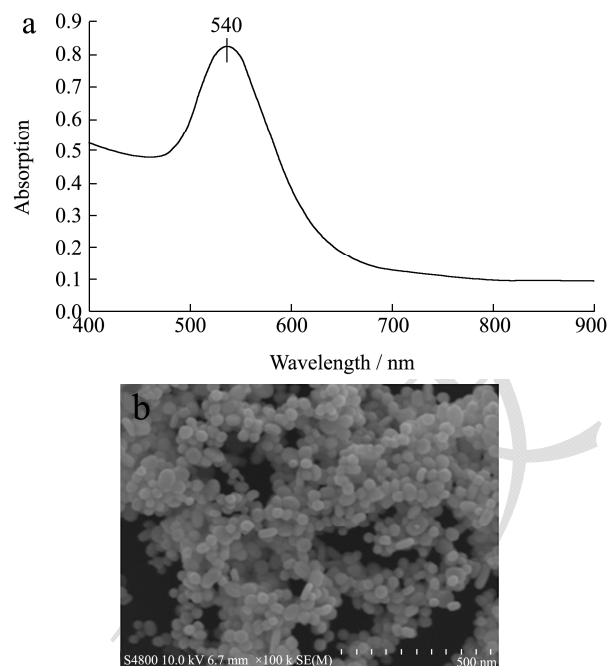


图2 金纳米溶胶的UV-Vis图(a)和SEM图(b)

Fig.2 UV-Vis spectrum (a) and SEM (b) spectrum of gold colloids

2.2.2 金溶胶放置时间对TLC-SERS的影响

自金溶胶制备之日起,每隔一段时间对磺胺噻唑进行检测,比较放置不同时间的金溶胶对磺胺噻唑SERS谱图的影响。图3是金溶胶放置不同时间对磺胺噻唑SERS谱图的影响。从图中可以看出,在150 d内,磺胺噻唑的SERS谱图基本一致,峰强略有差别,说明实验室自制金溶胶可以重复使用,具有良好的稳定性。

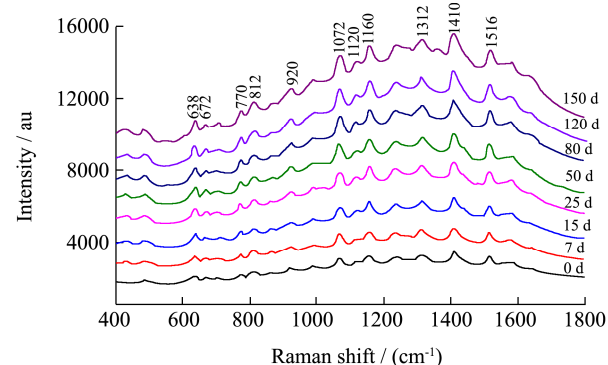


图3 金溶胶放置时间对磺胺噻唑SERS信号的影响

Fig.3 Effect of storage time of gold colloid of sulfathiazole on SERS

2.3 普通拉曼光谱与SERS光谱分析

图4是磺胺嘧啶标准溶液的SERS和普通拉曼光谱(a)、磺胺二甲嘧啶标准溶液SERS和普通拉曼光

谱(b)、磺胺噻唑标准溶液 SERS 和普通拉曼光谱(c)、甲醇的 SERS、金纳米胶体拉曼谱图。从图中可看出,金溶胶中未出现拉曼峰,说明所制备的增强基底未对试验产生干扰;磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑普通拉曼光谱中出现不明显的特征峰,说明磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑普通拉曼光谱特征峰未得到增强;磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑标准溶液的 SERS 具有明显的拉曼谱峰,说明所制备的金纳米胶体对磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑分子增强效应显著。

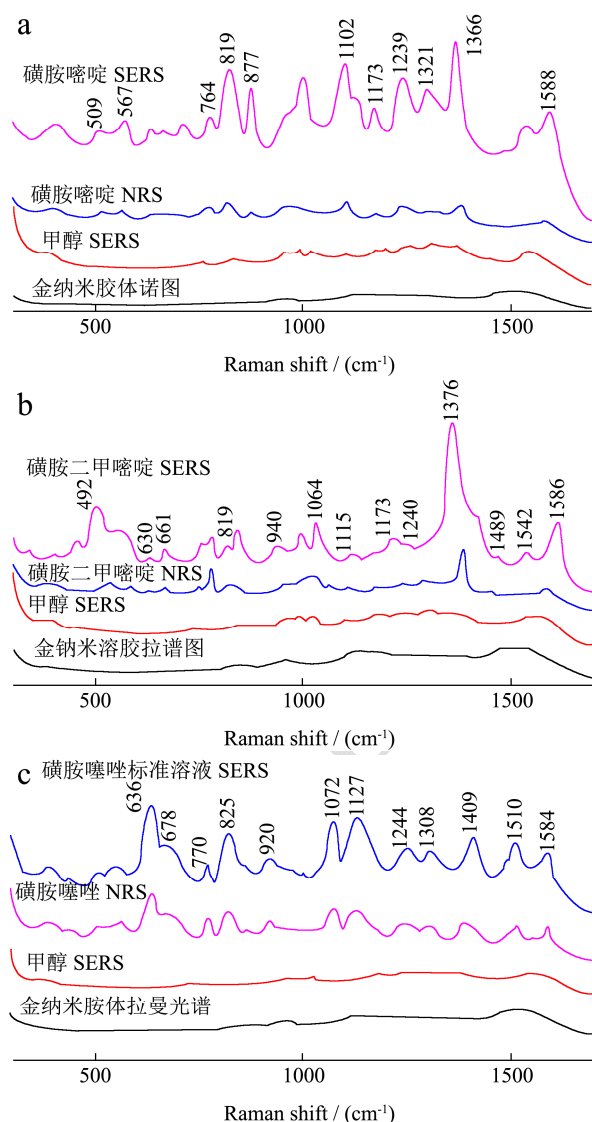


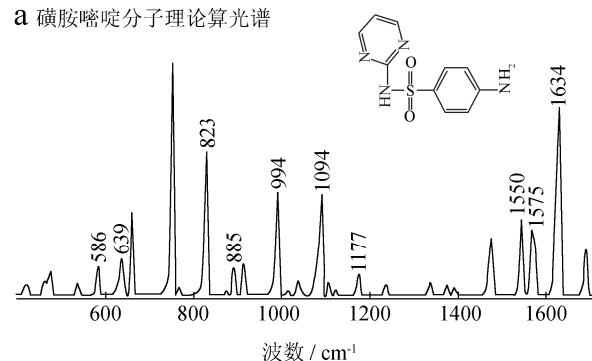
图4 磺胺嘧啶(a)、磺胺二甲嘧啶(b)和磺胺噻唑(c)标准溶液普通拉曼光谱和 SERS 谱图比较

Fig.4 The comparison between normal Raman spectrum and SERS spectrum of sulfadiazine (a), sulfadimidine (b), and sulfathiazole (c)

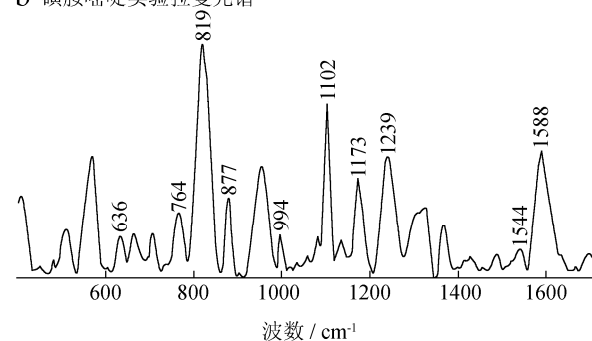
2.4 磺胺类抗生素拉曼光谱特征峰确定

2.4.1 理论计算谱峰与试验谱峰比较

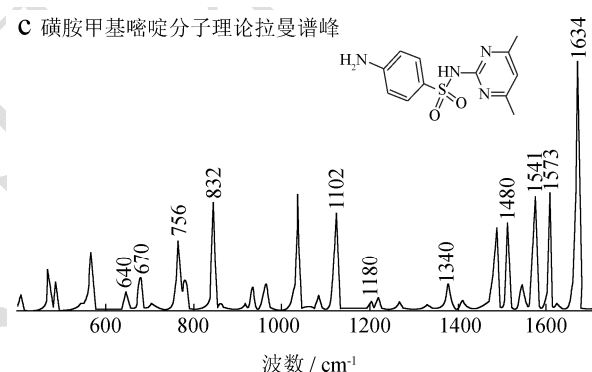
a 磺胺嘧啶分子理论拉曼光谱



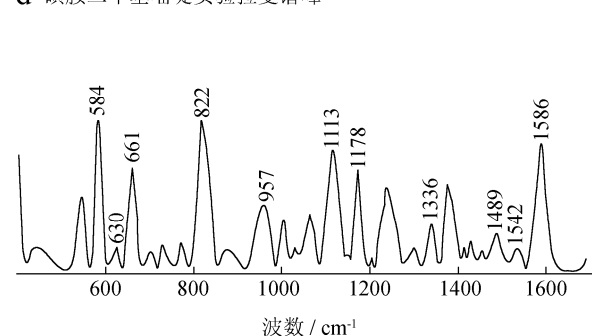
b 磺胺嘧啶实验拉曼光谱



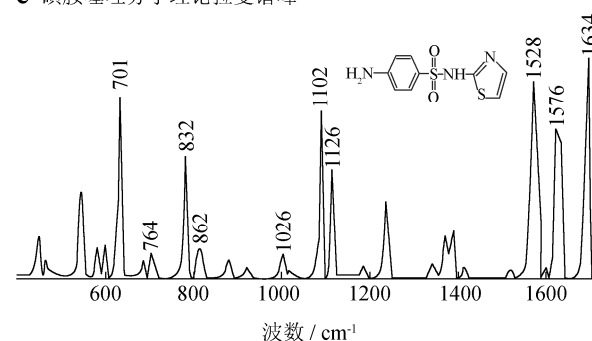
c 磺胺甲基嘧啶分子理论拉曼谱峰



d 磺胺二甲嘧啶实验拉曼谱峰



e 磺胺噻唑分子理论拉曼谱峰



f 磺胺噻唑实验拉曼谱峰

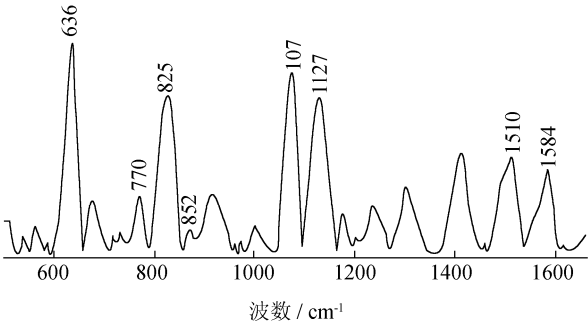


图5 磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶和磺胺噻唑的分子理论计算谱峰和实验谱峰

Fig.5 Theoretical calculation spectrum and experiment spectrum of sulfadiazine molecule, sulfadimidine molecule, and sulfathiazole molecule

注：a、b：磺胺嘧啶，c、d：磺胺二甲嘧啶，e、f：磺胺噻唑；a、c、e：分子理论计算谱峰，b、d、f：实验谱峰。

图 5a、5b 是磺胺嘧啶分子理论计算谱峰和实验谱峰，图 5c、5d 是磺胺二甲嘧啶分子理论计算谱峰和实验谱峰，图 5e、5f 是磺胺噻唑分子理论计算谱峰和

实验谱峰。从图可看出，磺胺嘧啶在波数 994 cm^{-1} 处实验值与理论值完全一致，而在 764、819、877、1102、1173、1544 和 1588 cm^{-1} 处试验谱峰与理论谱峰略有偏移，且理论计算谱峰 586 和 1634 cm^{-1} 在试验谱峰未出现，试验谱峰 1239 cm^{-1} 理论计算中未出现；磺胺二甲嘧啶在波数 630、661、822、1113、1178、1336、1489、1542 和 1586 cm^{-1} 处实验谱峰与理论谱峰基本一致；理论计算谱峰 756 cm^{-1} 和 1634 cm^{-1} 在实验谱峰中未出现，而实验谱峰 584 cm^{-1} 和 957 cm^{-1} 等在理论计算中未出现；磺胺噻唑在 770、825、862、1127、1582 cm^{-1} 处实验谱峰与理论谱峰基本一致，理论计算谱峰 701、1026、1102、1528、1634 cm^{-1} 在实验谱峰中未出现，实验谱峰 636、996、1072、1151 cm^{-1} 在理论计算中未出现。推测偏移原因是待测分子与溶剂体系之间存在分子作用力，导致增强基底对不同基团的增强效果不同，从而影响分子基团的位移偏移，而理论模拟计算只针对单个分子进行理想计算，不受到分子间作用力的影响^[19]。表 1 是磺胺类抗生素的谱峰归属结果^[9,20]。

表 1 磺胺类抗生素理论谱峰和实验谱峰及谱峰归属

Table 1 Theoretical and experimental peaks and attributions of sulfonamides antibiotics			
抗生素	理论谱峰/ cm^{-1}	实验谱峰/ cm^{-1}	拉曼峰归属
磺胺嘧啶	586(w)	-	C-S 伸缩振动
	639(m)	636(m)	对位二取代苯环变形振动
	756(s)	764(m)	对位二取代苯环呼吸振动
	823(s)	819(s)	C-S,C-N 弯曲振动
	885(s)	877(s)	C-N 伸缩振动
	994(m)	994(m)	C-H 面内弯曲振动
	1094(m)	1102(s)	C-N 伸缩振动
	1177(w)	1173(m)	嘧啶环呼吸振动
	-	1239(m)	C-N 伸缩振动
	1550(m)	1544(w)	嘧啶环伸缩振动
	1575(m)	1588(m)	嘧啶环伸缩振动
磺胺二甲嘧啶	1634(s)	-	对位二取代苯环伸缩振动
	-	584(s)	C-S 伸缩振动
	640(w)	630(w)	对位二取代苯环变形振动
	670(s)	661(s)	N-S 变形振动
	756(m)	-	对位二取代苯环呼吸振动
	832(s)	822(s)	C-S,C-N 弯曲振动
	-	957(m)	C-H 面内弯曲振动
	1102(m)	1113(s)	C-N 伸缩振动
	1180(w)	1178(w)	嘧啶环呼吸振动
	1340(s)	1336(s)	嘧啶环呼吸振动
	1480(m)	1489(w)	-CH ₃ 对称变形振动

接上页		
	1541(s)	1542(m) 嘧啶环伸缩振动
	1573(s)	1586(m) 嘧啶环伸缩振动
	1634(s)	- 对位二取代苯环伸缩振动
	-	636 (s) 对位二取代苯环变形振动
	701(s)	- C-S 伸缩振动
	764(w)	770(w) 面内环变形振动
	832(s)	825(s) C-S,C-N 弯曲振动
	862(w)	862(w) 噻唑环呼吸振动
	1026(m)	- 苯环 C=C 伸缩振动
磺胺噻唑	-	1072(s) C-N 伸缩振动
	1102(s)	- C-N 伸缩振动
	1126(s)	1127(w) 面内 C-H 变形振动
	-	1510(s) 噻唑环伸缩振动
	1528(s)	- 噻唑环伸缩振动
	1576(s)	1584(w) 噻唑环伸缩振动
	1634(s)	- 对位二取代苯环伸缩振动

磺胺嘧啶中 994 cm^{-1} 归属于苯环上 C-H 面内弯曲振动, 764 cm^{-1} 归属于对位二取代苯环呼吸振动, 819 cm^{-1} 归属于磺酰胺基上 C-N 和 R-C-S-结构上 C-S 弯曲振动, 1102 cm^{-1} 归属于磺酰胺基上 C-N 伸缩振动, 1173 cm^{-1} 归属于对位二取代苯环呼吸振动及嘧啶环呼吸振动, 1588 cm^{-1} 和 1544 cm^{-1} 归属于嘧啶环伸缩振动。 764 、 819 、 877 、 994 、 1102 、 1173 、 1544 和 1588 cm^{-1} 可作为鉴别磺胺嘧啶分子的特征谱峰。

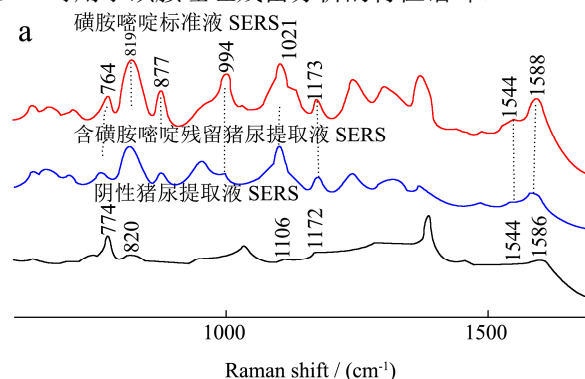
磺胺二甲嘧啶中 630 cm^{-1} 归属于对位二取代苯环变形振动, 661 cm^{-1} 归属于嘧啶环上 N-S 变形振动, 822 cm^{-1} 归属于对位二取代苯环呼吸振动, 1113 cm^{-1} 归属于嘧啶基团和苯环取代基 C-N 的变形振动 1178 cm^{-1} 和 1336 cm^{-1} 归属于嘧啶环呼吸振动, 1489 cm^{-1} 归属于嘧啶基团取代基-CH₃ 的对称变形振动, 1542 cm^{-1} 和 1586 cm^{-1} 归属于嘧啶环伸缩振动, 630 、 661 、 822 、 1113 、 1178 、 1336 、 1489 、 1542 和 1586 cm^{-1} 可作为鉴别磺胺二甲嘧啶的特征谱峰。

磺胺噻唑中 770 cm^{-1} 归属于面内苯环变形振动, 825 cm^{-1} 归属于磺酰胺基上 C-S 的弯曲振动和噻唑环上 C-N 的弯曲振动, 862 cm^{-1} 归属于噻唑环呼吸振动, 1127 cm^{-1} 归属于苯环和噻唑环上面内 C-H 变形振动, 1582 cm^{-1} 归属于噻唑环伸缩振动。 770 、 825 、 862 、 1127 、 1582 cm^{-1} 可作为鉴别磺胺噻唑的特征谱峰。

2.4.2 特征谱峰确定

图 6 是磺胺嘧啶 (a)、磺胺二甲嘧啶 (b)、磺胺噻唑 (c) 标准溶液、含抗生素残留猪尿提取液和阴性

猪尿提取液的 SERS。由图 6 可见, 阴性猪尿提取液 SERS 谱图出现大量谱峰, 其中 774 、 820 、 1106 、 1172 、 1544 、 1586 cm^{-1} 与磺胺嘧啶分子特征谱峰 (764 、 819 、 1102 、 1173 、 1544 和 1588 cm^{-1}) 相接近; 632 、 819 、 1108 、 1174 、 1340 、 1486 、 1540 、 1584 cm^{-1} 与磺胺二甲嘧啶分子特征谱峰 (630 、 661 、 822 、 1113 、 1178 、 1336 、 1489 、 1542 和 1586 cm^{-1}) 相接近; 774 、 819 、 1584 cm^{-1} 与磺胺噻唑分子特征谱峰 (770 、 825 、 862 、 1127 、 1582 cm^{-1}) 相似。因此, 这些特征谱峰不能用于猪尿中抗生素残留的分析, 而对比图 5、表 1 及图 6, 磺胺嘧啶分子特征谱峰 877 cm^{-1} 和 994 cm^{-1} 、磺胺二甲嘧啶分子特征谱峰 661 cm^{-1} 、胺噻唑分子特征谱峰 862 cm^{-1} 和 1127 cm^{-1} 与猪尿提取液的谱峰均不重叠。由此得出, 877 cm^{-1} 和 994 cm^{-1} 可用于猪尿中磺胺嘧啶残留定性定量分析的特征谱峰, 661 cm^{-1} 可用于磺胺二甲嘧啶残留分析的特征谱峰, 862 cm^{-1} 和 1127 cm^{-1} 可用于磺胺噻唑残留分析的特征谱峰。



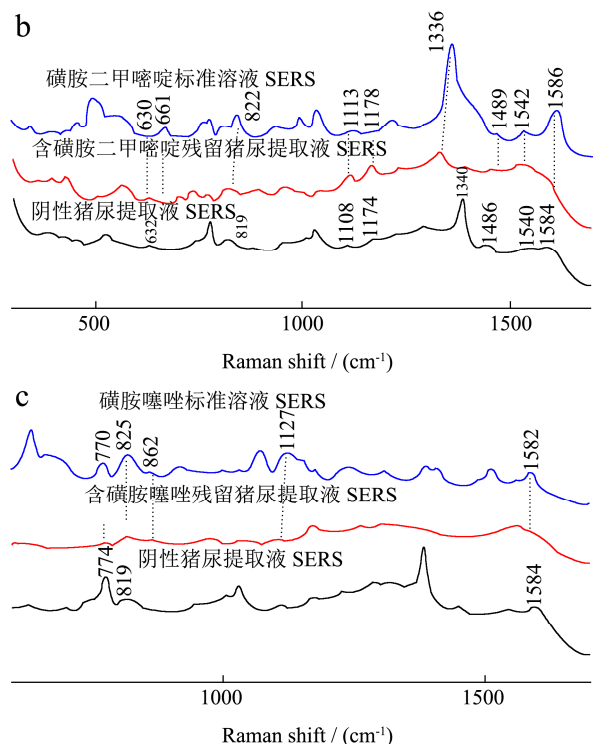


图6 磺胺嘧啶(a)、磺胺二甲嘧啶(b)和磺胺噻唑(c)标准溶液、含抗生素残留猪尿提取液和阴性猪尿提取液的SERS

Fig.6 SERS of Sulfadiazine (a), sulfadimidine (b) and sulfathiazole(c) standard solution, antibiotics-containing swine urine extract and negative pig urine extract

2.5 检测限的考察

根据1.3中配制的磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑阳性样品溶液浓度梯度(20、10、5、2、1、0.8 mg/L)及固定点样量5 μ L,可知抗生素点样沉积量分别为0.1、0.05、0.025、0.01、0.005、0.004 μ g、浓度分别为2、1、0.5、0.2、0.1、0.08 mg/L。

图7是3种抗生素在猪尿中不同点样沉积量的显微拉曼谱图。从图7a中可看出,当沉积量为0.1 μ g时,磺胺嘧啶特征拉曼谱峰877、994 cm^{-1} 清晰可见。随着磺胺嘧啶含量降低,其特征峰强度逐渐减弱。当样品沉积量到0.005 μ g时,877、994 cm^{-1} 依然可见,但沉积量为0.004 μ g时,各特征峰基本无法辨别。可知该方法检测猪尿中磺胺嘧啶的点样沉积量约0.005 μ g,检测限为0.1 mg/L。

从图7b中可看出,当沉积量为0.1 μ g时,磺胺二甲嘧啶特征谱峰662 cm^{-1} 具明显,随着点样含量降低,其特征峰强度逐渐减弱,当样品沉积量为0.005 μ g时,特征峰662 cm^{-1} 仍然存在,当沉积量为0.004 μ g时,662 cm^{-1} 特征峰无法辨别。可知该方法检测猪尿中磺胺二甲嘧啶的点样沉积量约为0.005 μ g,检测限为0.1 mg/L。

从图7c可看出,当沉积量为0.25 μ g时,磺胺噻唑特征谱峰862 cm^{-1} 和1127 cm^{-1} 明显,随着点样含量降低,其特征峰强度逐渐减弱,当样品沉积量为0.005 μ g时,862 cm^{-1} 和1127 cm^{-1} 同样可见,当沉积量为0.004 μ g时,所有特征峰无法辨别。可知该方法检测猪尿中磺胺噻唑的点样沉积量约为0.01 μ g,检测限为0.2 mg/L。

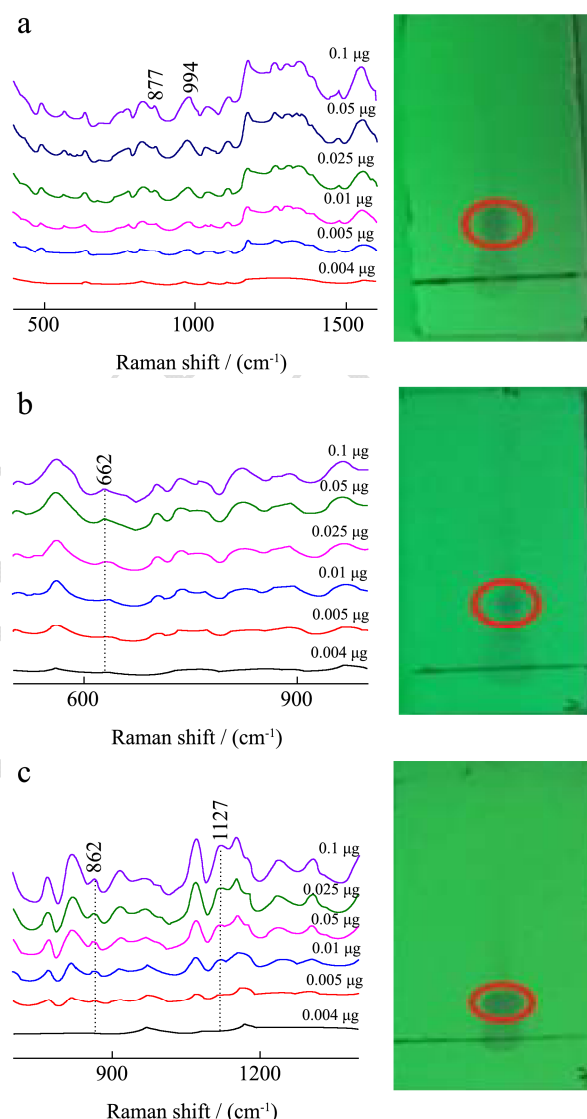


图7 不同抗生素点样沉积量的固体显微拉曼光谱图

Fig.7 The different antibiotic spot depositions micro-Raman spectroscopy

注: a: 磺胺嘧啶, b: 磺胺二甲嘧啶, c: 磺胺噻唑。

2.6 模拟猪尿中混合抗生素残留的 TLC-SERS 检测

将溶液制备中“模拟混标阳性样品”按照“实验1.5”进行操作,得到薄层色谱结果如图8, SERS检测结果如图9。从图8可知,1号混标样品出现与磺胺

嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑对照品相似的斑点，其 R_f 值大致相同，说明采用 TLC 可实现猪尿中 3 种抗生素的分离。为了进一步确定 3 种抗生素混合溶液在猪尿中的检测，对混标阳性样品的色谱带中出现的斑点进行 SERS 检测。从图 9 可知，当三种抗生素在薄层色谱板上的点样沉积量为 $0.01\ \mu\text{g}$ 时（其浓度为 $0.01\ \text{mg/mL}$ ），出现了磺胺嘧啶分子 $877\ \text{cm}^{-1}$ 和 $994\ \text{cm}^{-1}$ 特征峰（图 9a）、磺胺二甲嘧啶分子 $660\ \text{cm}^{-1}$ 特征峰（图 9b）、磺胺噻唑分子 $862\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1127\ \text{cm}^{-1}$ 特征峰（图 9c）。说明 TLC-SERS 技术可应用于猪尿中混合抗生素残留的快速筛查，单个样本检测可在 15 min 内完成。

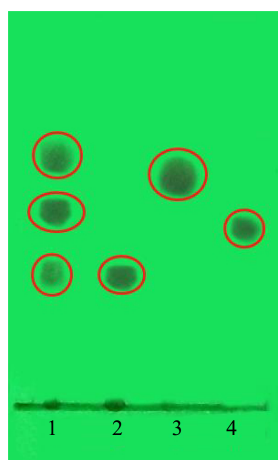


图8 混标样品与标准溶液的薄层色谱图

Fig.8 The TLC picture of samples and standard substances

注：（1）猪尿中3种抗生素的混合样品，（2）磺胺嘧啶标准溶液，（3）磺胺二甲嘧啶标准溶液，（4）磺胺噻唑标准溶液。

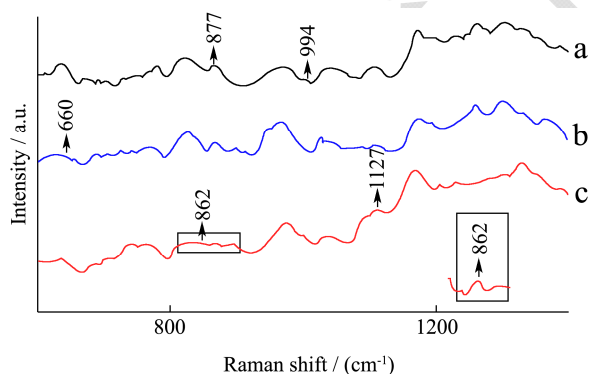


图9 猪尿中三种抗生素混合样品检测结果

Fig.9 Detection results for mixed sample of three antibiotics in pig urine

注：a.混合样品中与磺胺嘧啶标准品 R_f 相近的色谱斑点，b.混合样品中与磺胺二甲嘧啶标准品 R_f 相近的色谱斑点，c.混合样品中与磺胺噻唑标准品 R_f 相近的色谱斑点。

3 结论

本文通过模拟阴性猪尿中添加磺胺类抗生素（磺

胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑），获得猪尿阳性样本，研究了猪尿中抗生素残留的 TLC-SERS 快速检测方法。采用氯仿-乙醇-石油醚为展开剂，利用 TLC 技术实现猪尿中抗生素的分离，获取抗生素沉积点的 SERS。结果表明，TLC 能很好地将猪尿中的 3 种抗生素分离且方法检测猪尿中磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶和磺胺噻唑的最低检测浓度均为 $0.01\ \text{mg/mL}$ 。本方法前处理简单，单个样本检测在 15 min 内完成，而采用传统检测方法需要约 3 h^[21]，且检测成本高，为猪尿中抗生素残留快速筛查提供方法参考。

参考文献

- [1] 梁金玲,黄玉霞,何金兴.分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测鸡肉中的四环素类抗生素残留[J].现代食品科技,2018,34(7):1-6
LIANG Jin-ling, HUANG Yu-xia, HE Jin-xing. Determination of tetracycline antibiotic residues in chicken by molecularly imprinted solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(7): 1-6
- [2] Sollicc Morgan, Roy-Lachapelle Audrey, Sauvé Sébastien. Development of a suspect and non-target screening approach to detect veterinary antibiotic residues in a complex biological matrix using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2015, 29(24): 2361-2373
- [3] Tlili Ines, Caria Giovanni, Ouddane Baghdad, et al. Simultaneous detection of antibiotics and other drug residues in the dissolved and particulate phases of water by an off-line SPE combined with on-line SPE-LC-MS/MS: Method development and application [J]. Science of the Total Environment, 2016, 563-564: 424-433
- [4] Tian Z Q. Surface-enhanced Raman spectroscopy: advancements and applications [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2005, 36(6-7): 466-470
- [5] Luo Hairui, Huang Yiqun, Lai Keqiang, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with gold nanoparticles for rapid detection of phosmet and thiabendazole residues in apples [J]. Food Control, 2016, 68: 229-235
- [6] Mamián-López Mónica B, Poppi Ronei J. Quantification of moxifloxacin in urine using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate curve resolution on a nanostructured gold surface [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(24): 7671-7677
- [7] Xie Y, Zhu X, Sun Y, et al. Rapid detection method for

- nitrofurantoin antibiotic residues by surface-enhanced Raman Spectroscopy [J]. European Food Research and Technology, 2012, 235: 555-561
- [8] 马海宽,张旭,钟石磊,等.基于静电富集-表面增强拉曼光谱联用技术的抗生素检测[J].中国激光,2018,2:306-313
MA Hai-kuan, ZHANG Xu, ZHONG Shi-lei, et al. Detection of antibiotics based on hyphenated technique of electrostatic-preconcentration and surface-enhanced-raman-spectroscopy [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 2: 306-313
- [9] 马海宽,韩晓红,张财华,等.鱼肉中磺胺类抗生素的表面增强拉曼光谱探测与分析[J].激光生物学报,2014,6:560-565
MA Hai-kuan, HAN Xiao-hong, ZHANG Cai-hua, et al. The study of sulfonamide antibiotics in fish based on surface-enhanced raman spectroscopy technology [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2014, 6: 560-565
- [10] 李春颖,赖克强,张源园,等.表面增强拉曼光谱检测鱼肉中禁用和限用药物研究[J].化学学报,2013,45(2):221-226
LI Chun-ying, LAI Ke-qiang, ZHANG Yuan-yuan, et al. Use of surface-enhanced raman spectroscopy for the test of residuals of prohibited and restricted drugs in fish muscle [J]. Acta Chimica Sinica, 2013, 45(2): 221-226
- [11] 陈娟,孙楠楠,邵亚兰,等.TLC-SERS法快速检测复方杜仲胶囊中非法添加化学药物的研究[J].激光与光电子学进展, 2015,7:295-300
CHEN Juan, SUN Nan-nan, SHAO Ya-lan, et al. Rapid detection for chemical drugs illegally added into compound product of *Eucommiae* capsule using TLC-SERS [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2015, 7:295-300
- [12] 朱青霞,曹永兵,曹颖璞,等.TLC-SERS法快速检测降压类中药中非法添加的四种化学成分[J].光谱学与光谱分析,2014, 4:990-993
ZHU Qing-xia, CAO Yong-bing, CAO Ying-ying, et al. Rapid detection of four antihypertensive chemicals adulterated in traditional chinese medicine for hypertension using TLC-SERS [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 4: 990-993
- [13] 李静辉,程闹闹,刘吉成,等.TLC-SERS法快速检测改善睡眠类保健食品中四种化学成分[J].光谱学与光谱分析,2018, 38(4):1122-1128
LI Jing-hui, CHENG Nao-nao, LIU Ji-cheng, et al. Rapid on-site TLC-SERS detection of four sleep problems drugs used as adulterants in health-care food [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(4): 1122-1128
- [14] 吴棉棉,武媚然,张彬彬,等.降压中成药中违禁添加化学成分的TLC-SERS法快速筛查[J].中国医药工业杂志,2017,1:82-89
WU Mian-mian, WU Mei-ran, ZHANG Bin-bin et al. Rapid screening of the chemical components illegally added in anti-hypertensive chinese patent medicine by TLC-SERS method [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2017, 1: 82-89
- [15] Lv Diya, Cao Yan, Lou Ziyang, et al. Rapid on-site detection of ephedrine and its analogues used as adulterants in slimming dietary supplements by TLC-SERS [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(5): 1313-1325
- [16] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. Nature Physical Science, 1973, 241: 20-22
- [17] 张进治,汪瑗.表面增强拉曼光谱与薄层色谱结合对磺胺类药物的研究[J].北方工业大学学报,1997,1:58-62
ZHANG Jin-zhi, WANG Yuan. Surface-enhanced-raman spectroscopy combined with thin layer chromatography [J]. Journal of North China University of Technology, 1997, 1: 58-62
- [18] 王红梅,李玲玲,陈海滨,等.表面增强拉曼光谱对西地那非类药物的快速检测[J].高等学校化学学报,2017,6:1040-1045
WANG Hong-mei, LI Ling-ling, CHEN Hai-bin, et al. Application of surface-enhanced raman spectroscopy in the fast screening of phosphodiesterase type 5 inhibitors [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2017, 6: 1040-1045
- [19] 陈思,郭平,万建春,等.白酒中糖精钠添加剂表面增强拉曼光谱快速检测研究[J].光谱学与光谱分析,2017,5:1412-1417
CHEN Si, GUO Ping, WAN Jian-chun, et al. Rapid detecting study of sodium saccharin additive in spirit with SERS [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 5: 1412-1417
- [20] Ratkaj Marina, Miljanić Snežana. Adsorption mechanisms of sulfathiazole on gold, silver and copper surfaces studied by SERS [J]. Vibrational Spectroscopy, 2014, 74: 104-109
- [21] 孙晶玮,赵新淮.牛奶中多种磺胺类抗生素残留的HPLC快速分析[J].食品科学,2007,6:256-259
SUN Jing-wei, ZHAO Xin-huai. Analysis of sulfonamide residues in milk with rapid HPLC method [J]. Food Science, 2007, 6: 256-259