

## 表面增强拉曼光谱快速检测生鲜肉中的瘦肉精

翟晨, 李永玉, 彭彦昆\*, 杨宇, 李延

(中国农业大学工学院, 国家农产品加工技术装备研发分中心, 北京 100083)

**摘要:** 为了快速检测生鲜肉中的瘦肉精, 该研究利用表面增强拉曼光谱技术, 以沙丁胺醇为检测目标物, 建立了一种快速检测肌肉组织和肝脏中瘦肉精含量的方法。在碱性环境下利用乙酸乙酯对样品中沙丁胺醇进行提取, 采用 Savitzky-Golay 5 点平滑法和自适应迭代重加权惩罚最小二乘法消除光谱噪声以及荧光背景对分析建模的影响。为检测方法的重复性, 对 50 个相同沙丁胺醇质量分数 (1 mg/kg) 的肌肉组织样品进行信号采集, 对沙丁胺醇特征峰强度进行分析, 621、814、1 253、1 489、1 609  $\text{cm}^{-1}$  5 个特征峰强度的相对标准偏差 (RSD) 为 6.54%、6.07%、8.65%、7.44%、6.81%, 说明该方法具有较好的重复性。建立沙丁胺醇标准溶液的预测模型, 沙丁胺醇浓度与其特征峰强度相关性较好, 决定系数  $R^2$  为 0.968。对肌肉组织和肝脏中沙丁胺醇含量进行检测, 检测范围分别为 0.01~5 和 0.02~5 mg/kg, 检出限分别为 0.01 和 0.02 mg/kg, 其含量与预测实测值决定系数为 0.912 和 0.921。研究表明, 该方法可以实现肌肉组织和肝脏中沙丁胺醇含量的定量预测。

**关键词:** 光谱分析; 模型; 无损检测; 表面增强拉曼光谱; 沙丁胺醇; 肌肉组织; 肝脏

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2017.07.036

中图分类号: O657.37

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2017)-07-0275-06

翟晨, 李永玉, 彭彦昆, 杨宇, 李延. 表面增强拉曼光谱快速检测生鲜肉中的瘦肉精[J]. 农业工程学报, 2017, 33(7): 275—280. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2017.07.036 <http://www.tcsae.org>  
Zhai Chen, Li Yongyu, Peng Yankun, Yang Yu, Li Yan. Rapid detection of salbutamol in fresh muscle tissues based on surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2017, 33(7): 275 — 280. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2017.07.036 <http://www.tcsae.org>

### 0 引言

近年来瘦肉精问题频发, 瘦肉精是一类人工合成的  $\beta_2$ -肾上腺素兴奋剂, 包括盐酸克仑特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等, 本文主要研究沙丁胺醇的检测, 沙丁胺醇化学名为 1-(4-羟基-3-羟甲基苯基)-2-(叔丁氨基)乙醇<sup>[1]</sup>, 可治疗人和家畜支气管哮喘, 若加大药量和服用时间, 可明显促进动物生长, 并增加瘦肉率<sup>[2]</sup>。如果畜禽被喂食了大量沙丁胺醇, 其多数会沉积在动物的肝脏、肾脏、肺脏、肌肉等组织器官中, 人食用后会对肝、肾等内脏器官产生毒副作用, 严重影响身体健康<sup>[3-5]</sup>。欧盟、美国、日本等国家和地区都先后立法限制在畜禽生产中使用促进动物生长的兴奋剂作为饲料添加剂, 均规定不得检出沙丁胺醇。中国农业部在 235 号公告中规定了《动物性食品中兽药最高残留限量》, 其中禁止将沙丁胺醇及其盐、酯用于所有食用动物中<sup>[6]</sup>。2014 年, 农业部开展农产品质量安全专项整治行动, 专项整治行动中明确指出要严厉打击使用“瘦肉精”的违法行为<sup>[7]</sup>, 然而为了谋取

经济利益, 很多不法分子仍将沙丁胺醇用于养殖业。因此, 建立快速有效的检测手段是控制沙丁胺醇非法使用的迫切任务。沙丁胺醇残留量最高的为眼部视网膜组织, 其次为毛发、肺、肝、肾、肌肉等<sup>[8]</sup>, 消费者最常购买的为动物的肌肉组织和肝脏, 因此该研究主要探讨猪的肌肉组织和肝脏中的沙丁胺醇含量。目前测定沙丁胺醇的方法主要有高效液相色谱法、液相色谱—质谱联用法、气相色谱—质谱联用法、分光光度法、酶联免疫吸附法等<sup>[9-11]</sup>, 这些方法前处理较繁琐, 检测耗时长, 因此, 开发一种快速且准确的检测方法势在必行。

表面增强拉曼光谱 (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) 具有检测灵敏度高、分析速度快等优点, 在检测微量的小分子方面具有极大的潜力<sup>[12-14]</sup>, 因此近年来, 广泛用于食品中有毒有害物的检测<sup>[15-19]</sup>。当目标分子吸附到某些粗糙金属 (如金、银、铜) 的表面或溶胶中, 在激发区域内, 金属表面或近表面电磁场增强, 使目标分子的拉曼信号强度增强  $10^4 \sim 10^6$  倍<sup>[20]</sup>。在这些粗糙金属中, 银因具有较强的表面等离子共振效应, 其表面增强效果最好<sup>[21]</sup>。本研究采用盐酸羟胺还原法制备银溶胶<sup>[22]</sup>, 该方法简单、快速且银溶胶稳定性较好。

近几年, 采用表面增强拉曼光谱技术检测沙丁胺醇的研究多结合免疫层析法<sup>[23-24]</sup>, 该方法具有灵敏度高, 特异性好等优势, 但因其抗体等易耗材且易失去活性, 导致检测成本相对较高, 结果具有不稳定性。本研究直接采用表面增强拉曼光谱技术, 虽检出限相对较高, 但

收稿日期: 2016-08-04 修订日期: 2017-02-13

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0401205)

作者简介: 翟晨, 女, 山东人, 博士生, 主要从事农畜产品安全检测研究。北京 中国农业大学工学院, 100083。Email: 270905844@qq.com

\*通信作者: 彭彦昆, 男, 山东人, 教授, 博士生导师, 主要从事农畜产品品质安全无损检测研究。北京 中国农业大学工学院, 100083。

Email: ypeng@cau.edu.cn

具有以下优势: 1) 可同时检测样品中的多种有毒有害化学物质, 比如可以同时快速对多种瘦肉精以及抗生素等物质进行检测; 2) 操作简单, 样品经过简单的前处理, 直接进行拉曼光谱检测; 3) 检测成本低, 每次检测仅消耗微量银溶胶。目前, 直接应用表面增强拉曼技术检测肌肉组织以及肝脏中沙丁胺醇含量的研究鲜有报道。

本文以银溶胶作为表面增强剂, 对肌肉组织和肝脏中的沙丁胺醇含量进行检测, 通过简单的预处理, 对样品中的沙丁胺醇进行提取, 采集的光谱经过 Savitzky-Golay (S-G) 5 点平滑方法和自适应迭代重加权惩罚最小二乘法去除噪声和扣除荧光背景后, 分别建立标准溶液、肌肉组织以及肝脏中沙丁胺醇含量的数学预测模型。该研究应用 SERS 技术对肌肉组织、肝脏等复杂体系中化学物质进行检测, 为农畜产品中有毒有害化学物质的快速检测提供一种新的尝试。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

沙丁胺醇纯品 (99.7%) 购买于中国食品药品检定研究院, 硝酸银购买于广东光华科技股份有限公司, 乙酸乙酯、碳酸钠、柠檬酸钠等均购于北京化工厂, 所有试剂均为分析纯。

在超市购买新鲜的猪肌肉组织和肝脏, 经标准方法 (SNT 1924-2011) 检测不含有沙丁胺醇。

### 1.2 试验仪器

电子天平 (ME204, Mettler Toledo Measurement Technology Co. Ltd.); 恒温磁力搅拌器 (88-1, 常州国华电器有限公司); 离心机 (TDZ5-WS, 湖南赫西仪器装备有限公司); 漩涡混合器 (QL-901, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

采用实验室自行搭建的拉曼光谱检测系统采集样品的光谱信息<sup>[25]</sup>, 该系统包括激光器 (I0785MM0350MF-NL, Innovative Photonic Solutions, Monmouth Junction, N.J.)、拉曼光谱仪 (Raman Explorer 785, Headwall Photonics, Fitchburg, Mass)、CCD 相机 (Andor Newton DU920PBR-DD, Andor Technology, Inc., South Windsor, Conn.)、光纤、探针、平移台和计算机等硬件, 电机控制平移台实现三维运动。该仪器有效光谱范围是  $0 \sim 2\,344\text{ cm}^{-1}$ , 激发光波长为  $785\text{ nm}$ 。

### 1.3 样品制备

将新鲜的肌肉组织 (猪肉) 和肝脏分割成均匀小块, 每块质量为  $(15 \pm 0.05)\text{ g}$ , 将样品放置于平台上, 制备不同含量的沙丁胺醇水溶液, 均匀喷洒于样品表面, 待表面无明显水分后样品制备完成。

沙丁胺醇标准溶液预测模型的建模样品制备: 将乙酸乙酯作为溶剂, 制备不同浓度的沙丁胺醇标准溶液, 共制备 12 个浓度, 每个浓度 5 组平行, 质量浓度范围为  $1 \times 10^{-3} \sim 5.5\text{ mg/L}$ 。

肌肉组织以及肝脏中沙丁胺醇预测模型的建模样品制备: 制备含有不同含量沙丁胺醇的肌肉组织和肝脏样

品各 18 组, 每个含量 3 个平行样品, 肌肉组织中沙丁胺醇质量分数范围为  $5 \times 10^{-3} \sim 5\text{ mg/kg}$ , 肝脏中沙丁胺醇质量分数范围为  $1 \times 10^{-2} \sim 5\text{ mg/kg}$ 。另外分别制备相同范围内 10 个肌肉组织以及肝脏样品进行模型验证, 即预测集样品。

### 1.4 样品前处理

称取  $(5 \pm 0.05)\text{ g}$  猪肌肉组织 (或肝脏) 样品于离心管中, 加入  $2\text{ mL}$  质量分数为  $10.0\%$  碳酸钠溶液, 漩涡混匀  $1\text{ min}$ , 再加入  $15\text{ mL}$  纯乙酸乙酯溶剂, 漩涡混匀  $1\text{ min}$ , 然后以  $5\,000\text{ r/min}$  的速度离心  $10\text{ min}$ , 吸取上层有机溶剂于离心管中, 再用  $5\text{ mL}$  乙酸乙酯溶剂重复提取 1 次。将 2 次上层液合并, 水浴浓缩至近干, 再用  $5\text{ mL}$  乙酸乙酯溶解, 得到该样品的沙丁胺醇提取液。

### 1.5 银溶胶的合成

将  $0.017\text{ g}$  硝酸银溶解于  $90\text{ mL}$  去离子水中, 制备成  $1.11 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$  硝酸银溶液, 然后将  $0.010\text{ g}$  盐酸羟胺和  $0.012\text{ g}$  氢氧化钠溶解于  $10\text{ mL}$  的去离子水中, 浓度分别为  $1.5 \times 10^{-2}$  和  $3 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$ , 将该溶液迅速倒入  $90\text{ mL}$  硝酸银溶液中, 充分混合均匀, 得到纳米银胶, 将制备好的银溶胶置于  $4^\circ\text{C}$  黑暗环境中待用。

### 1.6 光谱采集

保持激光功率为  $450\text{ mW}$ , 相机曝光时间为  $3\text{ s}$ , 光谱采集软件选择 CCD 自带的 Andor SOLIS 光谱采集软件。将  $5\text{ }\mu\text{L}$  浓缩银溶胶滴涂于铝箔表面, 再滴涂  $5\text{ }\mu\text{L}$  沙丁胺醇提取液, 静置  $1\text{ min}$ , 将铝箔置于样品台上, 调节液滴与检测探头距离为  $7.5\text{ mm}$ , 开始采集拉曼信号, 曝光时间为  $5\text{ s}$ , 随着液滴慢慢挥发, 特征峰的拉曼信号越来越强烈, 液滴近干时, 拉曼信号达到最强, 保存该拉曼信号, 每个样品采集 20 次拉曼信号, 取其平均值作为该样品的拉曼光谱。

### 1.7 分析方法

由于系统波动、外界环境变化以及样品本身所产生荧光背景等多方面因素的影响, 所获得的光谱信号除了目标物质的信息外还包含其他无关的信息和荧光干扰。因此, 对原始光谱进行预处理以降低噪声和扣除荧光背景干扰是建立浓度预测模型的必要步骤。光谱噪声不含有用信息, 相反阻碍有用信息的提取, 去除噪声可以改善信噪比, 本研究去噪处理采用 Savitzky-Golay (S-G) 5 点平滑方法, 该方法可有效去除光谱噪声, 且较好保留原始光谱的有效信息<sup>[26-27]</sup>。扣除荧光背景采用自适应迭代重加权惩罚最小二乘法, 该方法快速且灵活, 对于信噪比较低的情况可以保持有效信号不变的条件将背景扣除<sup>[28]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 沙丁胺醇的普通拉曼光谱以及 SERS 特征峰归属

对沙丁胺醇纯品的拉曼光谱以及沙丁胺醇溶液的表面增强拉曼光谱进行研究, 光谱见图 1。沙丁胺醇纯品拉曼光谱和沙丁胺醇分子结构如图所示,  $621\text{ cm}^{-1}$  由脂肪族扭动引起,  $814\text{ cm}^{-1}$  由苯环中 C-H 键非平面弯曲振动引

起,  $1\,253\text{ cm}^{-1}$  为 C-C<sub>3</sub> 伸缩振动、C-N 伸缩振动以及 O-H 弯曲振动的作用引起的,  $1\,489\text{ cm}^{-1}$  由 C-H 弯曲振动引起,  $1\,609\text{ cm}^{-1}$  处的特征峰是由苯环中 C=C 伸缩振动引起<sup>[29-30]</sup>。沙丁胺醇结合银溶胶的 SERS 光谱与沙丁胺醇纯品光谱曲线相比拉曼位移有一定偏移, 而银溶胶在  $400\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$  范围内没有明显的特征峰(未列出), 因此沙丁胺醇与银溶胶结合产生的增强信号, 是由于沙丁胺醇吸附于银溶胶表面形成“热点”产生的, 而非银溶胶本身特征信号。

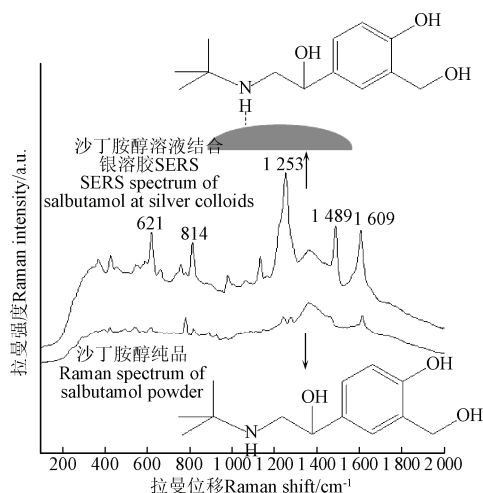
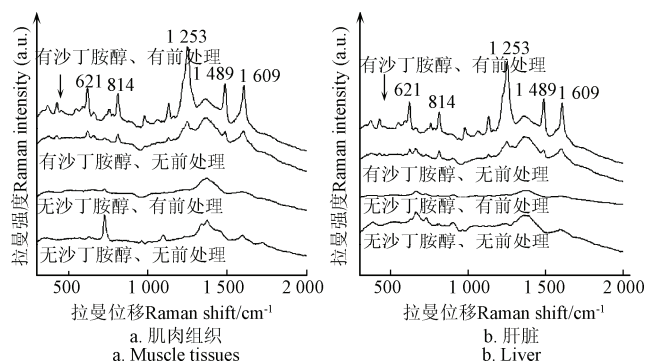


图1 沙丁胺醇纯品的拉曼光谱和沙丁胺醇溶液结合银溶胶 ( $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 的表面增强拉曼光谱

Fig.1 Raman spectrum of salbutamol powder, SERS spectrum of salbutamol solution ( $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) at silver colloids

## 2.2 肌肉组织和肝脏的 SERS 光谱分析

采用表面增强方法直接检测肌肉组织或者肝脏中的沙丁胺醇效果较差, 因为肌肉组织或者肝脏中含有的蛋白质、脂肪等物质易与银溶胶结合, 导致沙丁胺醇与银溶胶结合的机会与吸附能力大大减弱, 并且蛋白质、脂肪等物质与银溶胶结合后, 产生了较为明显的表面增强现象, 如图 2a 和 2b 中, 不含有沙丁胺醇的肌肉组织和肝脏的 SERS 光谱在  $600\sim 1\,600\text{ cm}^{-1}$  范围内有明显的拉曼峰, 且肌肉组织和肝脏本身的荧光背景很高, 导致沙丁胺醇的特征峰被掩埋。当该样品经过前处理后, 肌肉组织和肝脏的特征峰虽然存在, 但强度明显降低, 采集含有  $1\text{ mg/kg}$  沙丁胺醇的肌肉组织和肝脏的 SERS 光谱, 若不经样品前处理, 沙丁胺醇的特征峰信号较小, 经过样品前处理后, 沙丁胺醇的特征峰明显增高, 说明肌肉组织和肝脏中的蛋白质和脂肪等物质基本被去除, 沙丁胺醇被有效提取出来, 虽然光谱中也同时存在肌肉组织和肝脏的特征峰信号, 但是峰强度明显降低。样品前处理采用碳酸钠溶液创造碱性条件, 使沙丁胺醇易溶于乙酸乙酯中, 但碳酸钠本身不溶于乙酸乙酯, 因此样品提取液中不含碳酸钙, 乙酸乙酯具有挥发性, 滴涂于银溶胶后, 迅速挥发, 沙丁胺醇与银溶胶结合产生表面增强现象, 因此光谱中没有碳酸钠 ( $705, 1\,084\text{ cm}^{-1}$ ) 以及乙酸乙酯 ( $385, 637, 851, 1\,741\text{ cm}^{-1}$ ) 的特征峰。



注: 沙丁胺醇质量分数为  $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。  
Note: Salbutamol content is  $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

图2 肌肉组织以及肝脏的表面增强拉曼光谱图

Fig.2 SERS spectra of muscle tissues and liver

## 2.3 沙丁胺醇标准溶液预测模型的建立

将乙酸乙酯作为溶剂, 制备不同浓度的沙丁胺醇标准溶液, 原始光谱见图 3a, 原始光谱图有较强的噪声和荧光背景, 直接对其进行定量分析, 会存在一定的误差, 因此在定量分析之前, 首先对光谱进行去噪和扣除荧光背景处理。经过光谱前处理后, 校正光谱如图 3b 所示, 相比原始光谱图, 特征信号更加明显。随着沙丁胺醇质量浓度的增大, 其在  $621, 814, 1\,253, 1\,489, 1\,609\text{ cm}^{-1}$  处的特征峰强度也随之增大, 当沙丁胺醇质量浓度为  $0.005\text{ mg/L}$  时, 沙丁胺醇的 5 个特征峰均清晰可见, 因此可对沙丁胺醇质量浓度大于  $0.005\text{ mg/L}$  的乙酸乙酯溶液进行定量分析。以  $621, 814, 1\,253, 1\,489, 1\,609\text{ cm}^{-1}$  5 个特征峰强度为沙丁胺醇定量检测分析对象, 建立沙丁胺醇浓度预测的多元线性模型, 决定系数  $R^2$  为  $0.968$ , 说明该预测模型具有较高的预测精度。

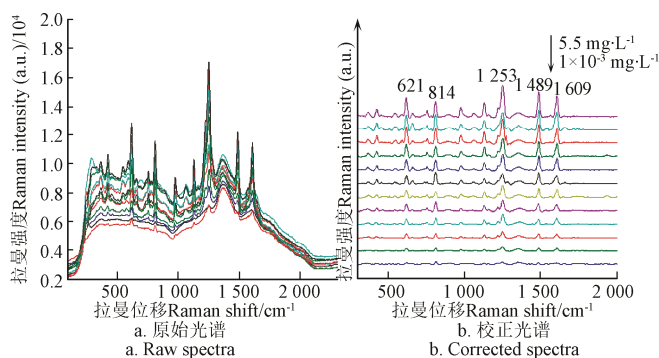


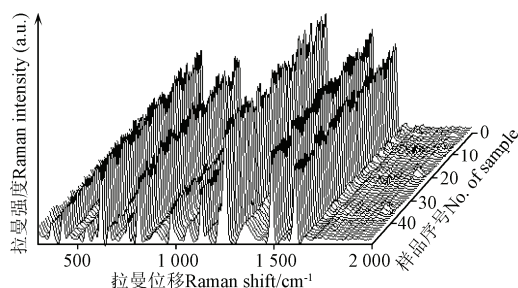
图3 不同质量浓度的沙丁胺醇标准溶液表面增强拉曼原始光谱图以及校正光谱图

Fig.3 Raw and corrected SERS spectra of salbutamol standard solution with different concentrations

## 2.4 重复性检测

建立可靠稳定的模型, 其拉曼系统的稳定性、样品的提取方法以及表面增强方法是否具有可重复性非常重要。本研究制备了 50 组相同沙丁胺醇质量分数 ( $1\text{ mg/kg}$ ) 的肌肉组织样品, 采用相同的样品预处理方法对沙丁胺醇进行提取后采用银溶胶进行信号增强, 测得的光谱信号如图 4 所示, 选取  $621, 814, 1\,253, 1\,489, 1\,609\text{ cm}^{-1}$

5 个特征峰强度进行分析, 计算其相对标准偏差 (RSD) 为 6.54%、6.07%、8.65%、7.44%、6.81%, 说明该检测方法具有较高的重复性。



注: 沙丁胺醇质量分数为  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。  
Note: Salbutamol content is  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

图 4 相同条件下 50 组样品的 3D 表面增强拉曼光谱图

Fig.4 3D SERS spectra of 50 muscle tissue samples with salbutamol at same concentration

## 2.5 肌肉组织和肝脏中沙丁胺醇含量预测模型的建立

制备不同含量沙丁胺醇的肌肉组织和肝脏样品各 18 组, 并进行 SERS 信号采集, 图 5a 和 5b 分别为不同含量沙丁胺醇的肌肉组织和肝脏的校正光谱曲线, 如图所示, 随着沙丁胺醇含量的增大, 特征峰的强度也逐渐增大, 在肌肉组织和肝脏中能检测的最低质量分数分别为  $0.01$  和  $0.02 \text{ mg/kg}$ , 分别建立 621、814、1 253、1 489、1 609  $\text{cm}^{-1}$  5 个特征峰强度与沙丁胺醇中肌肉组织和肝脏含量的预测模型, 其检测范围分别为  $0.01 \sim 5$  和  $0.02 \sim 5 \text{ mg/kg}$ , 校正集决定系数  $R^2$  为 0.948 和 0.952, 均方根误差分别为  $0.330$  和  $0.341 \text{ mg/kg}$ 。对该方法的回收率进行计算, 肌肉组织和肝脏的添加回收率分别为  $60.2\% \sim 75.3\%$  和  $64.4\% \sim 76.0\%$ 。导致回收率不高的主要原因来自从样品提取出的其他非检测目标物质, 比如蛋白质等, 虽然该样品提取方法已经能够大量减少样品蛋白质等的影响, 但是由于蛋白质等对银溶胶的吸附性太强, 使沙丁胺醇结合银溶胶的机会和状态受到一定影响, 另外样品前处理过程中, 沙丁胺醇的含量会有一定程度的损失, 这些原因导致肌肉组织和肝脏中沙丁胺醇的检测限高于沙丁胺醇标准溶液。

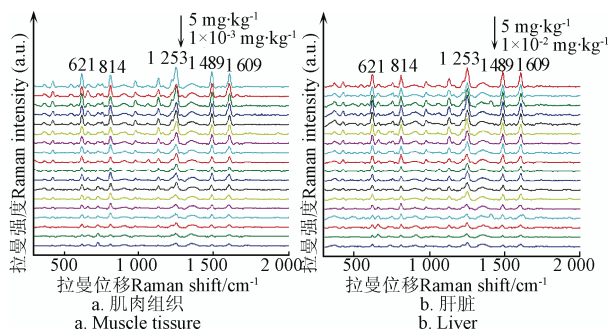


图 5 不同含量沙丁胺醇的肌肉组织和肝脏表面增强拉曼光谱平均校正光谱图

Fig.5 Average corrected SERS spectra of salbutamol in muscle tissues and livers with different concentrations

对模型的预测能力进行验证, 另外制备 10 个肌肉组

织和肝脏样品, 图 6a 和 6b 分别为预测集肌肉组织和肝脏中沙丁胺醇预测值和实测值的散点图, 其决定系数  $R^2$  分别为 0.912 和 0.921, 其均方根误差分别为  $0.409$  和  $0.416 \text{ mg/kg}$ , 具有较好的预测能力。本方法具有样品快速、预处理简单, 消耗少等优势, 但是目前存在检测限较高的问题, 可用于初步筛选高含量的瘦肉精样品。随着拉曼系统硬件更新迅速, 化学计量学的逐步深入, 检测限将会逐步降低, 同时, 进一步优化表面增强粒子以及样品提取方法也将是降低检测限的研究方向。

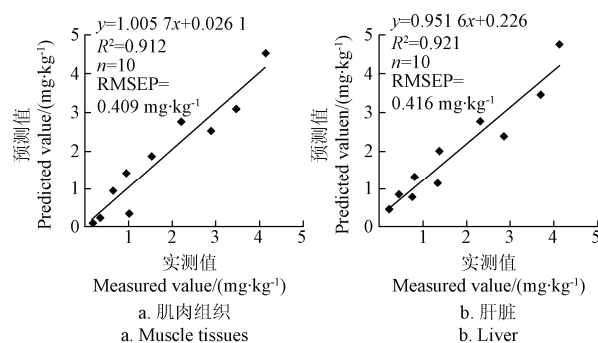


图 6 预测集肌肉组织和肝脏中沙丁胺醇实测值与预测值的散点图

Fig.6 Scatter plot of measured values of salbutamol in muscle tissues and livers versus their predicted values of prediction set

## 3 结论

本研究结合表面增强拉曼光谱技术对肌肉组织和肝脏中的沙丁胺醇含量进行了研究。经过样品前处理, 可对样品中的沙丁胺醇进行的高效提取。进一步结合银溶胶进行 SERS 信号采集, 通过 S-G 5 点平滑和自适应迭代重加权惩罚最小二乘法有效的去除噪声和扣除荧光背景。该方法具有较好的重复性, 以 5 个特征峰的拉曼强度作为建模依据, 对沙丁胺醇标准溶液建立预模型, 其决定系数为 0.968, 对肌肉组织和肝脏中沙丁胺醇的含量分别建立多元预测模型, 校正集决定系数分别为 0.948、0.952, 均方根误差分别为  $0.330$  和  $0.341 \text{ mg/kg}$ , 预测集决定系数分别为 0.912 和 0.921, 其均方根误差分别为  $0.409$  和  $0.416 \text{ mg/kg}$ , 最低检出量分别为  $0.01$  和  $0.02 \text{ mg/kg}$ 。该方法速度快、损耗低、操作简单, 为农畜产品中有毒有害化学物质的检测提供一种新思路。

## 【参考文献】

- [1] 白万乔, 黄华宇, 郭睿, 等. 石墨烯/聚硫基膜修饰玻碳电极上沙丁胺醇的电化学行为研究[J]. 分析测试学报, 2014, 33(3): 264—269.
- Bai Wanqiao, Huang Huayu, Guo Rui, et al. Electrochemical behaviors of salbutamol on graphene/polythionine modified glassy carbon electrode[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(3): 264—269. (in Chinese with English abstract)
- [2] Wang H, Zhang Y, Li H, et al. A silver-palladium alloy nanoparticle-based electrochemical biosensor for simultaneous detection of ractopamine, clenbuterol and salbutamol[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 49: 14—19.
- [3] Chan S H, Lee W, Asmawi M Z, et al. Chiral liquid



- chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method development for the detection of salbutamol in urine samples[J]. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2016, 1025: 83—91.
- [4] Jin O Y, Duan J L, Baeyens W R G, et al. A simple method for the study of salbutamol pharmacokinetics by ion chromatography with direct conductivity detection[J]. Talanta, 2005, 65(1): 1—6.
- [5] Ganjali M R, Norouzi P, Ghorbani M, et al. Fourier transform cyclic voltammetric technique for monitoring ultratrace amounts of salbutamol at gold ultra microelectrode in flowing solutions[J]. Talanta, 2005, 66(5): 1225—1233.
- [6] 农业部. 2002. 中华人民共和国农业部公告第235号-动物性食品中兽药最高残留限量[S].
- [7] 农业部. 2014年农产品质量安全专项整治方案. 农业部农产品质量安全监管局8号文件[Z]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/ncpzlaq/201403/t20140311\\_3809812.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/ncpzlaq/201403/t20140311_3809812.htm)
- [8] 白玉惠, 刘智宏, 徐士新. 沙丁胺醇残留检测技术研究[J]. 农产品质量与安全, 2016, (1): 52—56, 60.
- [9] Dave H N, Mashru R C, Thakkar A R. Simultaneous determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in pharmaceutical formulations with the use of four rapid derivative spectrophotometric methods[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597(1): 113—120.
- [10] Lindino C A, Bulhões L O. Determination of fenoterol and salbutamol in pharmaceutical formulations by electrogenerated chemiluminescence[J]. Talanta, 2007, 72(5): 1746—1751.
- [11] 蒋万枫, 赵珊. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查动物组织中7种 $\beta$ -受体激动剂残留[J]. 分析测试学报, 2013, 32(6): 675—680.
- Jiang Wanfeng, Zhao Shan. Rapid screening of  $\beta$ -agonists residues in animal tissue by ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(6): 675—680. (in Chinese with English abstract)
- [12] Zheng J, Pang S, Labuza T P, et al. Evaluation of surface-enhanced Raman scattering detection using a handheld and a bench-top Raman spectrometer: A comparative study[J]. Talanta, 2014, 129: 79—85.
- [13] 李水芳, 张欣, 李姣娟, 等. 拉曼光谱法无损检测蜂蜜中的果糖和葡萄糖含量[J]. 农业工程学报, 2014, 30(6): 249—255.
- Li Shuifang, Zhang Xin, Li Jiaojiao, et al. Non-destructive detecting fructose and glucose content of honey with Raman spectroscopy[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2014, 30(6): 249—255. (in Chinese with English abstract)
- [14] 闫正, 张丽冰, 任孟伟, 等. 表面增强激光拉曼光谱测定豆制品中的碱性嫩黄II、碱性橙II、皂黄[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(6): 1761—1764.
- Yan Zheng, Zhang Libing, Ren Mengwei, et al. Fast determination of Auramine II, Basic orange II, Metanil yellow in bean products on surface enhanced Raman spectroscopy and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to verify [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2016, 36(6): 1761—1764. (in Chinese with English abstract)
- [15] 张宗绵, 刘睿, 徐敦明, 等. Au@SiO<sub>2</sub>核壳结构-表面增强拉曼光谱原位检测食品中的酸性橙II[J]. 化学学报, 2012, 70(16): 1686—1689.
- Zhang Zongmian, Liu Rui, Xu Dunming, et al. In situ detection of acid orange II in food based on shell-isolated Au@SiO<sub>2</sub> nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy[J]. Chimica Sinica, 2012, 70(16): 1686—1689. (in Chinese with English abstract)
- [16] Ma C H, Zhang J, Hong Y C, et al. Determination of carbendazim in tea using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Chinese Chemical Letters, 2015, 26(12): 1455—1459.
- [17] Wang X, Du Y, Zhang H, et al. Fast enrichment and ultrasensitive in-situ detection of pesticide residues on oranges with surface-enhanced Raman spectroscopy based on Au nanoparticles decorated glycidyl methacrylate-ethylene dimethacrylate material[J]. Food Control, 2014, 46: 108—114.
- [18] Albuquerque C D L, Poppi R J. Detection of malathion in food peels by surface-enhanced Raman imaging spectroscopy and multivariate curve resolution[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 879: 24—33.
- [19] He L, Chen T, Labuza T P. Recovery and quantitative detection of thiabendazole on apples using a surface swab capture method followed by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Food Chem, 2014, 148: 42—46.
- [20] 黄双根, 吴燕, 胡建平, 等. 大白菜中马拉硫磷农药的表面增强拉曼光谱快速检测[J]. 农业工程学报, 2016, 32(6): 296—301.
- Huang Shuanggen, Wu Yan, Hu Jianping, et al. Rapid detection of malathion residues in Chinese cabbage by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(6): 296—301. (in Chinese with English abstract)
- [21] 翟晨, 彭彦昆, 李永玉, 等. 基于表面增强拉曼光谱的苹果毒死蜱残留无损检测方法[J]. 化学学报, 2015, 73(11): 1167—1172.
- Zhai Chen, Peng Yankun, Li Yongyu, et al. Nondestructive detection of chlorpyrifos in apples based on surface enhanced Raman scattering[J]. Acta Chimica Sinica, 2015, 73(11): 1167—1172. (in Chinese with English abstract)
- [22] Nicolae Leopold, Bernhard Lendl. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2003, 107(24): 5723—5727.
- [23] Xie Y, Chang H F, Zhao K, et al. A novel immunochromatographic assay (ICA) based on surface-enhanced Raman scattering for the sensitive and quantitative determination of clenbuterol[J]. Analytical Methods,

- 2015, 7(2): 513—520.
- [24] Li M, Yang H, Li S, et al. Ultrasensitive and quantitative detection of a new beta-agonist phenylethanamine a by a novel immunochromatographic assay based on surface-enhanced Raman scattering (SERS)[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(45): 10896—10902.
- [25] Dhakal S, Li Y, Peng Y, et al. Prototype instrument development for non-destructive detection of pesticide residue in apple surface using Raman technology[J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 123: 94—103.
- [26] 翟晨, 彭彦昆, 李永玉, 等. 基于拉曼光谱的苹果中农药残留种类识别及浓度预测的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2015, 35(8): 2180—2185.
- Zhai Chen, Peng Yankun, Li Yongyu, et al. Detection of chlorpyrifos on spinach based on surface enhanced Raman spectroscopy by silver colloids[J]. 2015, 35(8): 2180—2185. (in Chinese with English abstract)
- [27] Savitzky A, Golay M J E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures[J]. *Analytical Chemistry*, 1964, 36(8): 1627.
- [28] 房承宣, 李建华, 梁逸曾. 拉曼光谱结合背景扣除化学计量学方法用于汽油中 MTBE 含量的快速测定研究[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(5): 541—545.
- Fang Chengxuan, Li Jianhua, Liang Yizeng. Determination of MTBE in Gasoline by Raman Spectroscopy Combined with Baseline Correction Method[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, 31(5): 541—545. (in Chinese with English abstract)
- [29] Ali H R, Edwards H G, Kendrick J, et al. Vibrational spectroscopic study of salbutamol hemisulphate[J]. *Drug Test Anal*, 2009, 1(1): 51—56.
- [30] Izquierdo-Lorenzo I, Sanchez-Cortes S, Garcia-Ramos J V. Adsorption of beta-adrenergic agonists used in sport doping on metal nanoparticles: A detection study based on surface-enhanced Raman scattering[J]. *Langmuir*, 2010, 26(18): 14663—14670.

## Rapid detection of salbutamol in fresh muscle tissues based on surface enhanced Raman spectroscopy

Zhai Chen, Li Yongyu, Peng Yankun\*, Yang Yu, Li Yan

(National Research and Development Center for Agro-processing Equipment, College of Engineering,  
China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** In this research, the surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) technique is used to develop a fast detecting method for the detection of salbutamol in muscle tissues and liver. Silver colloids used for SERS are prepared by the reduction of silver nitrate with sodium citrate. 10 mL of hydroxylamine hydrochloride/sodium hydroxide solution ( $1.5 \times 10^{-2}$  mol/L;  $3 \times 10^{-2}$  mol/L, respectively) to 90 mL of silver nitrate solution ( $1.11 \times 10^{-2}$  mol/L), fully stirring and the silver colloids were obtained. Some constituents of muscle tissues and liver, such as protein, could significantly interfere with the SERS signal of salbutamol. Therefore, the ethyl acetate was used as the extraction solvent to precipitate the protein in muscle tissues and liver in alkaline (10% calcium carbonate solution), and the sample preparation method was simple and fast. This research was conducted based on a self-developed Raman system. The SERS spectra were obtained using 785 nm exciting radiation with 450 mW laser power and 5 s exposure time. Raman spectra of organic substances have severe fluorescence background, so it is crucial to remove fluorescence background from Raman signal first for subsequent signal analysis. In this study, Savitzky-Golay 5 points smoothing filter and the adaptive iteratively reweighted Penalized Least Squares (airPLS) correction method were used to remove the random noise and the fluorescence background for improving the accuracy of SERS results. In this research, we acquired the SERS spectra of salbutamol standard solution with different concentration from  $10^{-3}$  mg/L to 5.5 mg/L. The SERS signals intensities decreased when the concentrations decreased. The peak intensity of salbutamol at 621, 814, 1 253, 1 489, 1 609  $\text{cm}^{-1}$  could be used for monitoring the salbutamol levels. It could be found that these Raman peaks of salbutamol were still quite clear even at low concentration of 0.005 mg/L. Regression models showed a good linear relationship ( $R^2=0.968$ ) between the intensity of characteristic spectral peaks and concentration of salbutamol. The reproducibility of SERS detection was a very important parameter for SERS method. SERS signals of 50 muscle tissue samples with the salbutamol at the same concentration were measured to evaluate the reproducibility, and the relative standard deviation (RSD) of 50 parallel samples at 621, 814, 1 253, 1 489, 1 609  $\text{cm}^{-1}$  were 6.54%, 6.07%, 8.65%, 7.44%, 6.81%, which indicated good stability of the present method. Muscle tissues and liver samples were prepared with salbutamol at the concentration of 0.01-5 and 0.02-5 mg/kg, respectively. After the pretreatment of spectra, linear relationships were constructed to predict salbutamol concentration respectively. The lowest detectable levels for salbutamol and salbutamol concentration were 0.01 and 0.02 mg/kg for muscle tissues and liver samples, respectively. The recovery rate of muscle tissues and liver samples are 60.2%-75.3% and 64.4%-76.0%, respectively. Therefore, we constructed the models based on 5 characteristic spectral peaks intensity and salbutamol concentration in muscle tissues and liver samples, and the determination coefficients  $R^2$  were 0.912 and 0.921, respectively. The present study demonstrates a novel approach to detect salbutamol in muscle tissues and liver samples by using silver colloids, and the proposed method indicated a good potential for the evaluation of harmful additives in agricultural and animal product samples.

**Keywords:** spectrum analysis; models; nondestructive detection; surface enhanced Raman spectroscopy; salbutamol; muscle tissues; liver