

# 表面增强拉曼光谱(SERS)快速检测食用油中的苯并[a]芘

王珊<sup>1,2</sup>, 李忠<sup>2</sup>, 潘亮<sup>2</sup>, 刘陆<sup>2</sup>, 薛良辰<sup>2</sup>, 曾川<sup>2</sup>, 彭碧宁<sup>2</sup>, 许喜林<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东珠海 519000)

**摘要:** 苯并(a)芘广泛存在于煤焦油、炼油等工业污水中, 多次使用的高温植物油、烧焦的食物都可能含有苯并(a)芘。我国目前对食用植物油类产品中苯并(a)芘的限量标准是 $<10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。检测食品中苯并(a)芘的方法中使用较多的是高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法等方法, 但检测过程样品的前处理复杂、检测耗时长、检测效率低, 尚不能满足实时、现场检测的要求。

本文使用纳米金修饰的多孔材料作为 SERS 基底, 利用 SERS 对食用油中的苯并(a)芘的含量进行快速检测。苯并(a)芘在  $0\sim 200 \mu\text{g}/\text{L}$  范围内与 SERS 的信号值呈线性关系, 线性方程为  $y=134.98x-571.77$ ,  $R^2=0.9942$ ; 在  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  含量水平下, 样品回收率为  $93.2\sim 125.7\%$ , 相对标准偏差为  $10\sim 18\%$ , 方法检出限为  $5.6 \mu\text{g}/\text{L}$ 。SERS 可使用便携式拉曼光谱仪进行现场检测, 测试时间短(一般为数十秒至一两分钟)。在检测灵敏度满足要求的情况下, SERS 方法为快速筛查食用油中苯并(a)芘含量提供了一种新的选择。

**关键词:** 表面增强拉曼光谱技术(SERS); 苯并(a)芘; 快速测定

文章编号: 1673-9078(2017)9-271-275

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.9.040

## Study on Rapid Quantification of Benzo[a]pyrene in Edible Oil by Surface Enhanced Raman Spectroscopy

WANG Shan<sup>1,2</sup>, LI Zhong<sup>2</sup>, PAN Liang<sup>2</sup>, LIU Lu<sup>2</sup>, XUE Liang-chen<sup>2</sup>, ZENG Chuan<sup>2</sup>, PENG Bi-ning<sup>2</sup>, XU Xi-lin<sup>1</sup>

(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.Technical Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519000, China)

**Abstract:** Benzo[a]pyrene (BaP) is widespread in the industrial sewage from coal tar and oil refining; vegetable oil subjected multiple times to a high temperature as well as charred food may also contain BaP. The permissible limit of BaP in China for edible vegetable oil products is below  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ . At present, the most widely used methods for quantification of BaP in food are high performance liquid chromatography, gas chromatography with mass spectrometry, and some others. Nonetheless, in the above methods, sample pretreatment is complicated, measurement time is long, and measurement efficiency is low; therefore, they still cannot meet the requirements for real-time and *in situ* analysis.

Rapid quantification of BaP in edible oil by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) was studied here by means of nanogold-modified porous materials as a SERS substrate. A linear relation between the peak area of SERS and the concentration of BaP was obtained in the range of  $0\sim 200 \mu\text{g}/\text{L}$ . The linear equation was  $y=134.98x-571.77$  ( $R^2=0.9942$ ). At a concentration of  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ , the recovery rates of samples ranged from  $93.2\%$  to  $125.7\%$ , and the relative standard deviations (RSDs) were between  $10\%$  and  $18\%$ . The detection limit of the SERS method was  $5.6 \mu\text{g}/\text{L}$ . The analysis of BaP by the SERS method could be carried out on site using a portable Raman spectrometer, and measurement time was short (generally tens of seconds to one or two minutes). The SERS method provides a new option for rapid quantification of BaP in edible oils if the analytical sensitivity meets the requirements.

**Key words:** surface enhanced Raman spectroscopy; benzo[a]pyrene; rapid determination

苯并(a)芘(英文缩写 BaP)又名 3,4-苯并芘, 广

收稿日期: 2017-05-22

作者简介: 王珊(1986-), 女, 大学本科, 工程师, 研究方向: 食品工程

通讯作者: 许喜林(1964-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 食品加工与安全

全

泛存在于煤焦油、汽车尾气和炼油等工业污水中, 经多次使用的高温植物油和烧焦的食物亦都含有苯并(a)芘<sup>[1]</sup>。它是多环芳烃中毒性最大的强致癌物, 约占全部环境致癌多环芳烃类化合物的 20%。同时具有致畸性和致突变性, 所产生的危害具有长期性和隐匿性。

正是因为以苯并(a)芘为代表的多环芳烃危害巨大,所以对这些物质的检测显得尤为重要。

传统的检测方法,样品均需要经过较为繁琐的前处理过程,且实验的过程只能在实验室进行。不仅测试时间长、效率低,而且尚不能满足实时、原位检测的要求。因此,当务之急是发展一种既快速、简便,又灵敏的检测方法对食用油中的苯并(a)芘进行定性鉴别和定量检测。

拉曼散射<sup>[2]</sup>是指当一定频率的入射光照射被测物质,一部分光会在物质表面发生散射,其中少部分散射光子与被测分子发生非弹性碰撞,进行能量交换,散射光频率发生改变,被测物分子发生能级间的跃迁。当被测物吸附在金、银和铜等粗糙金属表面,拉曼散射的信号强度将会提高 $10^6\sim 10^9$ 倍<sup>[3]</sup>,即表面增强拉曼散射,对应的光谱称为表面增强拉曼光谱(Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)。SERS技术能够提供更丰富的化学分子结构信息,实现实时、原位探测,且数据处理简单,灵敏度高,准确率高,是强有力的痕量检测工具<sup>[4]</sup>。

由于苯并(a)芘分子本身不含有能与金属配位或键合的官能团,所以增加了SERS技术直接对其进行检测的难度。本文选择了以纳米金修饰的氨基改性硅烷化担体作为表面增强拉曼光谱的活性基底,对食用油中的苯并(a)芘进行检测,以期在检测灵敏度满足需要的情况下,为食用油中苯并(a)芘的快速筛查方法提供新的选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器:拉曼光谱仪:i-Raman 拉曼光谱仪(B&K Tek公司,美国),二极管激光器,激光波长 785 nm,最大激发功率 300 mW,积分时间 0~25 s,配备显微拉曼检测平台(20 倍物镜)。

试剂:苯并(a)芘标准品(200 mg/L 二氯甲烷溶液,购自 Sigma 公司);201 型硅烷化红色硅藻土型担体(上海试剂一厂);MIP-BaP 固相萃取小柱(上海安谱实验科技股份有限公司);乙二胺、正己烷、二氯甲烷、氯金酸、乙腈、柠檬酸钠及实验用其他试剂均为均为市售分析纯或以上级别试剂。

实验用水为实验室自制的去离子水。

苯并(a)芘标准溶液:取 250  $\mu\text{L}$  苯并(a)芘标准品,置于洁净试管,在氮气保护下于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴蒸发至干,加乙腈溶解定容至 10 mL,再量取所得溶液加水稀释至 10 mL,得到 500  $\mu\text{g/L}$  的苯并(a)芘标准溶液(10%乙

腈-水溶液),使用时再按需稀释至不同浓度。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 新型活性 SERS 基底的制备

##### 1.2.1.1 纳米金颗粒的合成

将 50 mL 氯金酸溶液(1 mmol/L)置于 250 mL 圆底烧瓶,搅拌加热至沸腾,于沸腾状态快速加入 1.85 mL 柠檬酸三钠溶液(38.8 mmol/L),继续加热 15 min,不断搅拌后停止加热,继续搅拌 10 min。冷却至室温,得到酒红色的纳米金溶胶,置于棕色广口瓶,在 4  $^{\circ}\text{C}$  下储存。

##### 1.2.1.2 硅烷化硅藻土型担体的氨基改性

以硅藻土为原料煅烧制成的红色担体表面存在大量极性中心,拥有更多反应位点,故选择孔径为 0.4~1  $\mu\text{m}$ ,比表面积为 4.0~6.0  $\text{m}^2/\text{g}$  的红色担体作为基础材料进行氨基改性。将 15 mg 红色担体置于 25 mL 具塞三角烧瓶内,加入 5 mL (1 mol/L) 的乙二胺溶液,搅拌加热至 70  $^{\circ}\text{C}$ ,持续反应 5 h,即可得到氨基改性的硅烷化担体。

##### 1.2.1.3 以纳米金修饰氨基改性的硅烷化担体

氨基改性的硅烷化担体,表面性质由硅烷基团的疏水性转为氨基的亲水性,有利于金纳米颗粒的吸附。

向氨基改性硅烷化担体的反应液中加入 1 mL 纳米金溶胶,于室温震荡混合,纳米金溶胶的酒红色逐渐退去,由此可见纳米金颗粒已逐渐被多孔担体吸附,待混合液的颜色退去后,再补充 1 mL 纳米金溶胶,重复 4 次直至担体吸附的纳米金颗粒不再增加。将混合物置于布氏漏斗上过滤,并加水洗涤数次,洗去多余的金溶胶颗粒,再用适量水将剩余的粉末状物体冲洗转移至 50 mL 离心管内,即得到 SERS 基底,避光储存。

#### 1.2.2 基于纳米金修饰的氨基改性硅烷化担体作为活性基底的苯并(a)芘的 SERS 光谱检测

##### 1.2.2.1 确定苯并(a)芘标准溶液的 SERS 特征拉曼位移

本文尝试以 528  $\text{cm}^{-1}$  和 614  $\text{cm}^{-1}$  这两个频数的拉曼位移进行苯并(a)芘的检测。

取 500  $\mu\text{g/L}$  苯并(a)芘标准溶液适量,以 10%乙腈-水溶液分别稀释至 200  $\mu\text{g/L}$  和 20  $\mu\text{g/L}$ 。取这两种浓度的稀释液和 10%乙腈-水溶液各 200  $\mu\text{L}$ ,分别置于三个 2 mL 离心管中。吸取少量制备的 SERS 基底颗粒加入三个离心管中,置于振荡器振摇约 20 min。从离心管内吸取 SERS 基底颗粒,滴加在载玻片上,吸走多余水分,将颗粒置于拉曼光谱仪显微平台上。

##### 1.2.2.2 苯并(a)芘标准溶液的 SERS 检测

配制不同浓度的苯并(a)芘标准溶液: 用微量移液器量取 250  $\mu\text{L}$  苯并(a)芘标准品, 置于洁净的试管中, 在氮气保护下于 40  $^{\circ}\text{C}$  水浴上蒸发至干, 加乙腈溶解并定容至 10 mL, 再量取所得溶液 1 mL, 加水稀释至 10 mL, 得到 500  $\mu\text{g/L}$  的苯并(a)芘标准储备溶液(10% 乙腈-水溶液), 分别移取苯并(a)芘标准储备溶液 0、0.1、0.2、0.4、1.0、2.0 和 4.0 mL, 移入 10 mL 容量瓶, 用 10% 乙腈-水溶液稀释至刻度, 即得苯并(a)芘标准系列溶液, 其中苯并(a)芘的含量分别为 0、5、10、20、50、100、200  $\mu\text{g/L}$ 。在相同的条件下测试, 所得拉曼谱图如图 1。

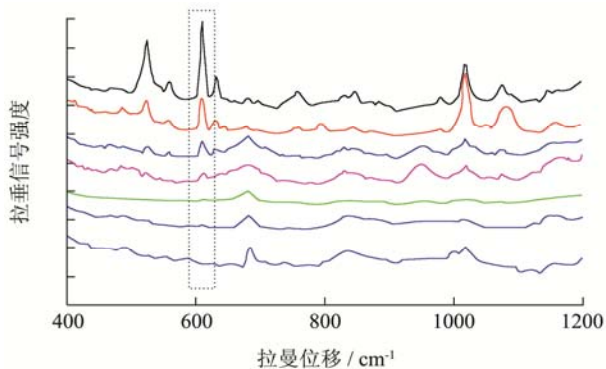


图 1 不同浓度的苯并(a)芘的 SERS 谱图

Fig.1 SERS spectra of different concentrations of BaP

注: 由上至下为: 200, 100, 50, 20, 10, 5, 0  $\mu\text{g/L}$ 。

### 1.2.2.3 食用植物油的 SERS 测试

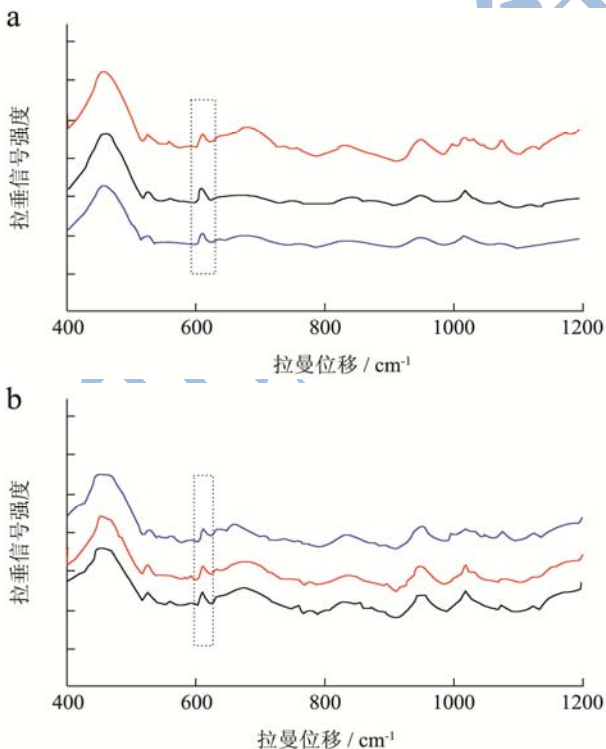


图 2 食用油样品的 SERS 谱图

Fig.2 SERS spectra of cooking oil and standard samples

注: a.大豆油; b.葵花籽油。

取 2.5 g 食用油样品, 加入苯并(a)芘溶液 (200  $\mu\text{g/L}$ ) 125  $\mu\text{L}$ , 使苯并(a)芘的含量为 10  $\mu\text{g/kg}$ 。加入少量自制 SERS 基底材料, 振摇 20 min。用滴管吸出基底材料滴加在玻片上, 吸除多余水分。将玻片置于拉曼光谱仪显微平台, 使激光束照射 SERS 基底颗粒, 设置功率为 70%, 积分时间 25 s, 采集拉曼光谱。图 8 是食用油的 SERS 谱图, 样品为市售的大豆油和葵花籽油, 分别测试 3 次。所得拉曼光谱如图 2。

## 2 结果与讨论

### 2.1 纳米金颗粒的均匀性

用透射电子显微镜(TEM)对所得金溶胶进行观察, 如图 3, 此方法制得的金溶胶颗粒大小分布较为均匀, 平均粒径约为 40 nm。

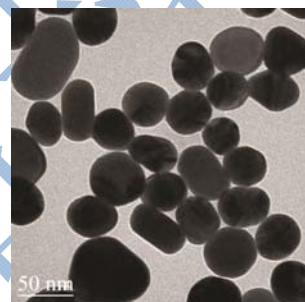


图 3 纳米金颗粒 TEM 图

Fig.3 Typical TEM image of gold nanoparticles used

### 2.2 氨基改性时间对硅烷化硅藻土型担体的影响

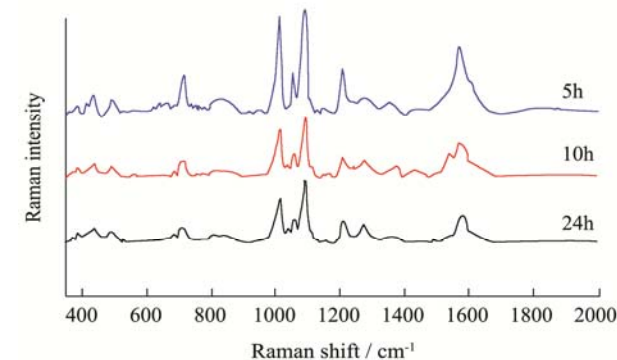


图 4 以 4-巯基吡啶考察反应时间对氨基改性效果的影响

Fig.4 Effects of reaction time on modification of amino groups investigated using 4-mercaptopyridine

反应时间对于所获得的 SERS 基底的活性有一定影响。4-巯基吡啶对于纳米金修饰氨基改性的硅烷化担体反应敏感、特异性强, 并且漫反射效果明显, 所以选择 4-巯基吡啶作为分子探针, 考察制备的 SERS

活性基底的增强效果。

如图4所示,使用不同反应时间制备的基底进行拉曼测试,所获得的4-巯基吡啶的拉曼光谱,可以确定5h即为最佳的氨基改性反应时间,反应时间过长并不能提高基底的活性。

### 2.3 纳米金颗粒被吸附过程及储存时间对新型 SERS 基底稳定性的影响

通过电子显微镜可观察到吸附在氨基改性硅烷化担体材料上的纳米金颗粒,见图5。

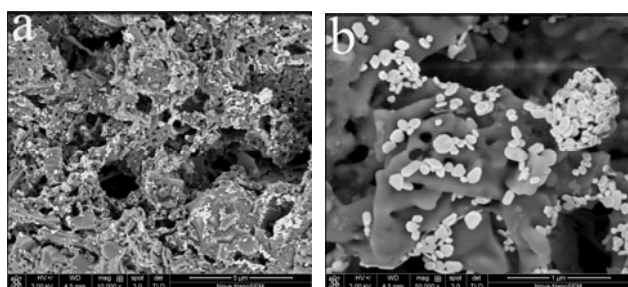


图5 纳米金修饰的氨基改性硅烷化担体电镜图

Fig.5 Electron microscopy images of amino modified silanized support after nano gold modification

注: a, ×10000; b, ×50000。

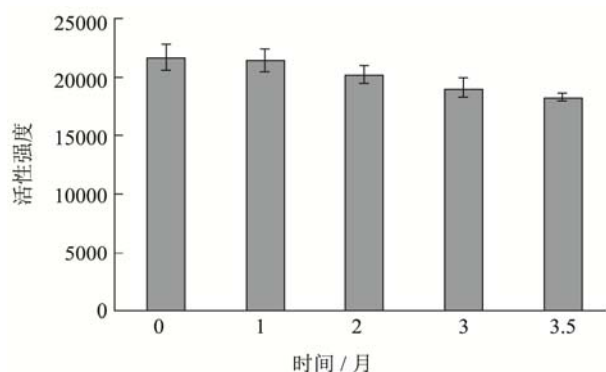


图6 纳米金修饰氨基改性硅烷化担体的时间稳定性

Fig.6 The time-course of stability of an amino-modified silanized support after nanogold modification

活性、稳定性和重现性是制备 SERS 基底的三个主要原则。裸金胶体如果放置较长时间,纳米金颗粒会逐渐团聚而失去活性。储存时间对新型 SERS 基底的稳定性的影响不容忽视。裸金胶体在室温下放置约10d,纳米金颗粒便团聚失去活性<sup>[5]</sup>。将纳米金颗粒修饰到氨基改性硅烷化担体材料上后,其稳定性显著增加。以4-巯基吡啶作为分子探针考察所制备 SERS 基底的稳定性。如图6所示,基底活性在3.5月内基本保持稳定,因此用前述方法制备的新型 SERS 基底具有较好的稳定性。

### 2.4 苯并(a)芘标准溶液的 SERS 特征拉曼位移对测定结果的影响

打开拉曼光谱仪,调节视野,使激光束照射 SERS 基底颗粒,设置功率为70%,积分时间25s,采集拉曼光谱。所得光谱见图7:

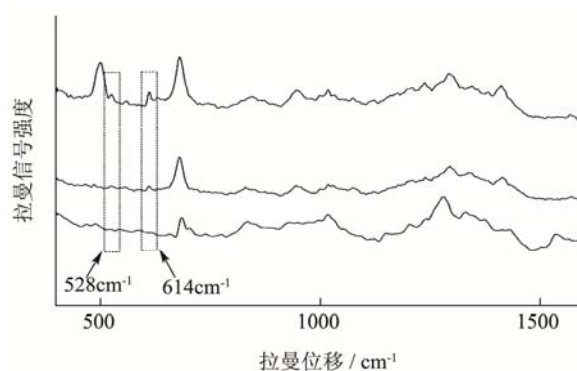


图7 苯并(a)芘的特征拉曼位移

Fig.7 The characteristic Raman shift of BaP

注:由上至下分别是200,20,0 μg/L 苯并(a)芘标准溶液的 SERS 谱图。

10%乙腈-水溶液在614 cm<sup>-1</sup>及528 cm<sup>-1</sup>处无明显的谱峰,而两个不同浓度的苯并(a)芘溶液则有。由于这两处谱峰与文献值符合,且谱峰强度与苯并(a)芘浓度正相关,因此认为这两处谱峰确是苯并(a)芘的特征拉曼位移,将这两个波数的拉曼位移作为苯并(a)芘的定性依据。由于614 cm<sup>-1</sup>处的拉曼信号更强,因此以下的工作中使用这一处信号。

### 2.5 苯并(a)芘检出限和定量下线的确定

以苯并(a)芘浓度为横坐标,614 cm<sup>-1</sup>处的拉曼信号强度为纵坐标,绘制线性回归曲线,如图8。

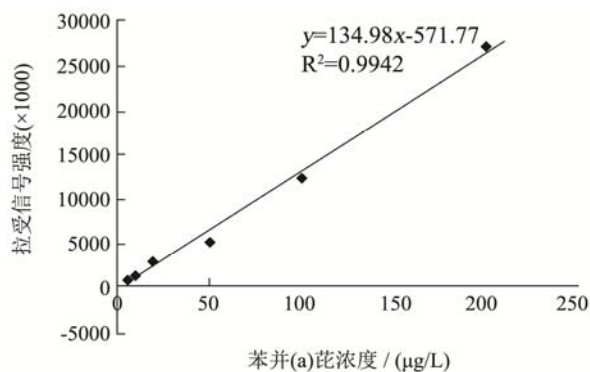


图8 苯并(a)芘 SERS 信号与浓度的线性关系

Fig.8 The linear relation of the BaP SERS signal with the BaP concentration

计算低浓度苯并(a)芘(5 μg/L)的信号的标准偏

差  $s$ ，以 3 倍  $s$  值除以线性回归方程的斜率，得到此方法检测苯并(a)芘的检出限；以 10 倍  $s$  值除以线性回归方程的斜率，得到此方法检测苯并(a)芘的定量下限。苯并(a)芘在 0~200  $\mu\text{g/L}$  范围内与 SERS 的信号值呈线性关系，线性关系良好。线性方程为  $y=134.98x-571.77$ ， $R^2=0.9942$ 。经计算，此方法检测苯并(a)芘的检出限为 5.6  $\mu\text{g/L}$ ，定量下限为 18.8  $\mu\text{g/L}$ 。

## 2.6 食用油样品检测后的标准偏差及回收率

将食用油样品本所获得的 SERS 信号强度代入线性回归方程，计算得到苯并(a)芘的检出率及回收率，列在下表 1 中。

表 1 苯并(a)芘加标回收结果

**Table 1 Spike-and-recovery results on BaP**

	加标量 /( $\mu\text{g/kg}$ )	检出量 /( $\mu\text{g/kg}$ )	回收率 /%
大豆油	10	12.57	125.7
	10	9.63	96.3
	10	9.32	93.2
	10	10.5	105
标准偏差 $s$	-	1.8	18
葵花籽油	10	11.68	116.8
	10	9.99	99.9
	10	9.86	98.6
	10	10.5	105
标准偏差 $s$	-	1.0	10

在 10  $\mu\text{g/kg}$  的含量水平上，采用本项目提出的 SERS 方法检测食用油中苯并(a)芘的含量，其单次测量的标准偏差为 1.0~1.8  $\mu\text{g/kg}$ ，相对标准偏差为 10~18%，回收率为 93.2~125.7%。

## 3 结果与讨论

3.1 本文的目的是制备纳米金修饰的氨基改性硅烷化担体新材料，将之应用为表面增强拉曼光谱的活性基底，并探讨其用于食用油中苯并(a)芘快速检测的可能性。从上述试验结果看，纳米金修饰氨基改性硅烷化担体在技术上是可行的，所制备的新材料具有较高的 SERS 活性，并且能在较长的一段时间内保持稳定，

克服了金溶胶稳定性差，不易保存的缺点。

3.2 将制备的新型 SERS 基底应用于苯并(a)芘的拉曼光谱检测后，发现这一方法的检苯并(a)芘的检出限为 5.6  $\mu\text{g/L}$ ，定量下限为 18.8  $\mu\text{g/L}$ 。与传统的气相色谱-质谱联用法或高效液相色谱法相比，虽然在检出限或精密度上不具优势，但也有一些独特的优点，如 (1) SERS 可以使用便携式拉曼光谱仪，在现场进行检测<sup>[6]</sup>；(2) 传统拉曼光谱测试时间短，一般为数十秒至一两分钟。在检测灵敏度满足要求的情况下，SERS 方法提供了一种快速筛查食用油中苯并(a)芘含量的新选择。

## 参考文献

- [1] 谢君红,姚祖江,冯辉.食品中苯并芘的来源和危害及其预防[J].中外食品,2014,1:51-53  
XIE Jun-hong, YAO Zu-jiang, FENG Hui. The source and harm of benzopyrene in food and its prevention [J]. Chinese and Foreign Food, 2014, 1: 51-53
- [2] 里佐威.近代 Raman 光谱技术[J].物理实验,2002,22(1):3-7  
LI Zuo-wei. Modern Raman spectroscopy [J]. Physical Experiment, 2002, 22(1): 3-7
- [3] An Q, Zhang P, Li J M, et al. Silver-coated magnetite-carbon core-shell microspheres as substrate-enhanced SERS probes for detection of trace persistent organic pollutants [J]. Nanoscale, 2012, 4(16): 5210-5216
- [4] 郭淑霞.表面增强拉曼光谱信息处理技术的研究与应用[D].厦门:厦门大学,2014  
GUO Shu-xia. Research and application of surface enhancement Raman spectrum information processing technology [D]. Xiamen: Xiamen University, 2014
- [5] Grabar K C, Freeman R G, Hommer M B, et al. Preparation and characterization of au colloid monolayers [J]. Anal. Chem., 1995, 67(3): 735-743
- [6] 徐利英,王锐.拉曼光谱技术在物证鉴定中的应用[J].刑事技术,2014,39(1):9-13  
XU Li-ying, WANG Rui. Application of Raman spectroscopy in material evidence identification [J]. Criminal Technology, 2014, 39(1): 9-13