

表面增强拉曼光谱在食品人工合成色素的现场快速筛查中的应用

陈启振^{1,2}, 曾勇明^{1,2}, 林惠真³, 陈宏炬³, 田中群³, 刘国坤^{1*}

(1. 厦门大学 环境与生态学院 近海海洋环境科学国家重点实验室 福建 厦门 361102;

2. 厦门市普识纳米科技有限公司 福建 厦门 361005; 3. 厦门大学化学化工学院 福建 厦门 361005)

摘要: 已有研究表明食品加工过程中添加的人工合成色素不仅不能提供营养物质, 而且可能是导致小儿多动症的来源之一, 影响儿童智力发育。基于表面增强拉曼光谱(SERS)原理和便携式拉曼光谱仪, 提出了一种非定向的现场快速筛查方法。该方法只需对疑似含有人工合成色素的固体或液体状食品样品进行简单前处理, 即可进行 SERS 检测。样品前处理和检测的总时长不超过 15 min, 检出质量浓度在 1 mg/L 水平, 可有效满足政府职能部门的现场执法需求。除具有快速、方便、灵敏度高等特点之外, 该检测方法的重大优势在于实现了未知样品的现场非定向测试: 在同一种前处理过程和检测方法下, 可对食品中常添加的亮蓝、胭脂红、日落黄、柠檬黄、苋菜红和诱惑红 6 种人工合成色素进行快速鉴定和半定量分析。

关键词: 表面增强拉曼光谱; 非定向; 现场; 快速; 高灵敏

中图分类号: O 657. 37

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2016)05-0754-06

食品加工过程中, 添加适量的人工合成色素(非营养成分)可以保持食品色泽鲜艳, 促进人们的食欲, 提高食品的商品价值。虽然人工合成色素有别于苏丹红、美术绿等严禁添加的非食用强致癌性工业用色素, 但是, 它们大都是以煤焦油中的苯胺为原料合成的偶氮类化合物, 食品中过量添加会导致食用人群慢性中毒并具有致癌作用, 且可能是导致小儿多动症的来源之一, 影响儿童智力发育。因此, 世界范围内(中国、美国、日本等国家和欧洲地区)对可食用人工合成色素的使用有着严格的限量(通常在 mg/L 级别)及可用范围限定。

对于食品这类复杂体系中 mg/L 级痕量物质的检测, 实验室的常规检测流程是: 1) 利用液液萃取、固相萃取、超临界流体萃取或 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe) 等前处理方法有效消除基质等非目标物的干扰; 2) 利用大型仪器设备对提取溶

液进行有效分析和鉴定。常用的色素检测方法有高效液相色谱法(国家标准)、超高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法、毛细管电泳法、荧光光度法和分光光度法等^[1-11]。尽管上述方法准确可靠, 可作为执法鉴定依据, 但是仍存在仪器昂贵、体积大、操作复杂或前处理过程费时费力的缺点, 无法满足政府职能部门进行现场执法的迫切需求。近年来, 市场上涌现了一些基于可见分光光度法或生物分子特异性识别的快速检测方法, 然而这些方法只能针对指定色素进行定向检测, 易受结构类似物质的干扰, 而且基质复杂的固体样品的前处理过程复杂, 难以进行全面推广。因此, 有必要发展一种高灵敏、准确可靠且简单的现场快速检测仪器和方法, 提高相关职能部门的现场应急能力。

具有分子指纹信息的拉曼光谱是分析和鉴定检测物质最重要的光谱技术之一, 但由于其检测灵敏度低, 难以用于痕量成分的鉴定。借助于纳米结构金属

收稿日期: 2016-03-29 录用日期: 2016-07-12

基金项目: 国家自然科学基金(21473140); 福建省高校产学研合作项目(2016Y4012); 中央高校基本科研业务费专项(2072016011)

* 通信作者: guokunliu@xmu.edu.cn

引文格式: 陈启振, 曾勇明, 林惠真, 等. 表面增强拉曼光谱在食品人工合成色素的现场快速筛查中的应用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(5): 754-759.

Citation: CHEN Q Z, ZENG Y M, LIN H Z, et al. Developing on-site quick screening platform for artificial pigments in food using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2016, 55(5): 754-759. (in Chinese)



基底的表面等离子体诱导的表面电磁场的增强效应,表面增强拉曼光谱(SERS)可将待测目标物的信号放大数百万倍^[12-13].SERS技术已成功用于人工合成色素等痕量目标物的高灵敏检测,然而这些工作的重点集中在:1) SERS基底的增强性能优化,仅对标准物质进行痕量检测以提高灵敏度和实际体系存在显著性差异;2) 虽然以实际样品为检测对象,但沿袭的是实验室的常规前处理过程,并未根据SERS的指纹图谱特点进行优化,前处理复杂冗长^[14-16].

对于基质复杂的实际样品,样品前处理是分析方法的关键环节,主要包括:样品的制备、待测组分的提取、净化、浓缩、待测组分转变为可测定的物质等步骤.样品前处理中待测组分的损失或其他组分的干扰将显著影响检测方法的准确度、精密度、选择性和灵敏度.检测方法的分析速度往往取决于样品前处理的复杂程度.对于色谱和质谱等检测方法,样品前处理时间约占整个分析时间的2/3.相比于色谱和质谱等方法,SERS的最大优势在于检测速度快,仪器便携且操作方便,但是在灵敏度和定量准确度等指标上偏弱.因此,欲将SERS真正应用于食品安全领域,必须结合拉曼光谱的指纹图谱特点,发展高效、快速、简便和可靠的前处理技术,将SERS技术发展成为一种现场快速检测方法.

结合SERS技术和QuEChERS技术,本文中提出了一种基于便携式拉曼光谱仪的快速检测方法,实现了食品中常添加的亮蓝、胭脂红、日落黄、柠檬黄、苋菜红和诱惑红6种人工合成色素的快速分析.该方法具有非定向、现场、快速、方便和高灵敏度等特点.

1 实验部分

1.1 材料

氯金酸(HAuCl_4)、柠檬酸钠、聚酰胺粉(100~200目)、甲醇、甲酸、乙醇和氨水等实验中所用试剂皆为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司),水溶液皆用超纯水(Millipore)配置.

1.2 SERS增强活性的金纳米溶胶的制备

金纳米粒子由厦门市普识纳米科技有限公司提供,粒径约为55 nm,利用经典的柠檬酸钠还原 HAuCl_4 的方法合成^[17].制备过程如下:1.2 mL 1%(质量分数)柠檬酸钠迅速加入到含有1 mmol/L HAuCl_4 的100 mL沸水溶液中,并继续剧烈搅拌40 min,得到粒径在55 nm左右的红色金纳米溶胶.

1.3 实际样品的前处理和SERS检测

样品的前处理过程借鉴传统的聚酰胺粉法,并结合SERS检测的特点进行优化,形成高效的QuEChERS前处理方法.对于薯片等固体样品,基本步骤如下:1) 取5 g样品于50 mL离心管中,加入25 mL的乙醇-水溶液,超声5 min;2) 将该溶液以6 000 r/min转速离心,取上层清液;3) 于注射器中,取25 mL待测溶液与聚酰胺粉混合,反复抽取吸附多次后挤出废液;4) 用注射器抽取5 mL水,反复震荡10 s后挤出废液,该步骤重复3次;5) 依次用甲醇-甲酸(体积比8:2)溶液和乙醇重复步骤4);6) 吸取1 mL乙醇-氨水溶液,静置1 min后挤出洗脱液待用.整个前处理过程不超过15 min.对于酒品和饮料等液体样品,前处理便可略去步骤1)和2),直接进行聚酰胺萃取步骤,处理时间可控制在10 min以内.需指出,由于SERS的指纹图谱特点,部分液体样品无需任何前处理便可直接进行检测.

SERS检测步骤如下:取200 μL 金纳米溶胶,20 μL pers-A1增强助剂(厦门市普识纳米科技公司提供)与20 μL 洗脱液混合5 s后开始测定拉曼光谱,谱图采集时间为5~10 s.

1.4 拉曼光谱分析

于B & W TEK公司的iRaman拉曼光谱仪上完成.该仪器的激光波长为785 nm,功率为275 mW,10倍物镜下达到样品表面的激光光斑直径约为80 μm .

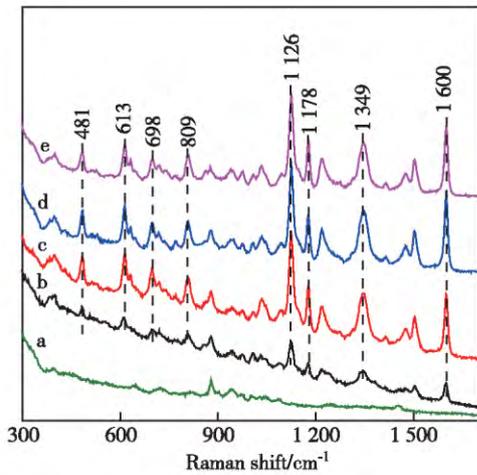
2 结果与讨论

2.1 可行性分析

图1为加标不同质量浓度柠檬黄的薯片样品的SERS谱图,前处理加上检测的总时长不超过15 min.从图中可以观察到:未添加柠檬黄的薯片样品(即空白样品)的SERS谱图中,在300~1 700 cm^{-1} 区间,除了位于878 cm^{-1} 的一个相对明显的谱峰外,基本表现为无信号的背景曲线;加标1 mg/L柠檬黄后,SERS谱图上可清晰观察到481, 613, 698, 809, 1 126, 1 178, 1 349和1 600 cm^{-1} 处的尖锐谱峰;随着柠檬黄的加标质量浓度提高到5和10 mg/L时,这些谱峰的拉曼强度迅速提高且趋于饱和.对照1 mg/L柠檬黄标准样品及空白样品的SERS谱图,可以确认这些谱峰皆来自于薯片样品中添加的柠檬黄,主要是柠檬黄分子中苯环和吡啶环骨架的不同振动模式的贡献.尽管更明确的谱峰归属指认有待于进一步的理论计算模拟,但是

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

图中所展示的谱峰强度的浓度依赖性及与空白样品的比对结果表明,本文中提出的方法实现了加标样品中柠檬黄的快速、定性和半定量检测。



a. 薯片空白样品; b~d. 柠檬黄加标质量浓度分别为 1, 5, 10 mg/L; e. 1 mg/L 柠檬黄标准样品。

图 1 加标不同质量浓度柠檬黄的薯片样品的 SERS 谱图

Fig. 1 SERS spectra of the chips samples with different spiked concentrations of lemon yellow

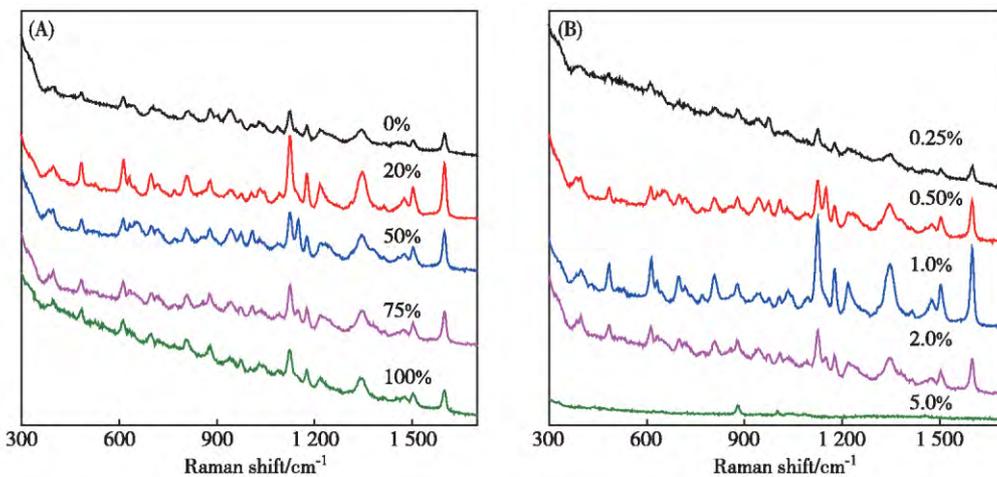
2.2 前处理条件优化

为得到图 1 所示信噪比良好的 SERS 谱图,以加标 1 mg/L 柠檬黄的薯片样品为例,分别对固体样品的提取溶剂(乙醇-水溶液)和洗脱溶剂(乙醇-氨水溶液)的配比进行了优化.图 2(A) 为用不同配比乙醇-水

溶液作为提取溶剂时得到的 SERS 谱图,可以看出:使用纯水提取固体食品中的人工合成色素时,能够获得比较好的 SERS 检测效果;提取溶剂中加入 20%(体积分数,下同)乙醇后,SERS 信号强度提高了 3~4 倍,表明乙醇的加入可以显著提升提取溶剂对固体样品中柠檬黄的提取效率;进一步提高乙醇的体积分数至纯乙醇的过程中,提取效率反而有所下降,和纯水的提取效率相当.由此推测:薯片样品基质中的其他杂质可同时被乙醇提取,其提取效率随乙醇体积分数提高而提高;该杂质和柠檬黄在金纳米粒子表面产生竞争共吸附行为,将影响柠檬黄的 SERS 信号强度.因此只有当乙醇体积分数合适时,可获得最佳的柠檬黄和杂质浓度比,从而检测到柠檬黄的最佳 SERS 信号强度.考虑到乙醇的加入能够提高提取效率且其对人体和环境基本无危害性,最终选择了 20%的乙醇-水溶液作为固体样品的提取溶剂。

图 2(B) 为柠檬黄的 SERS 信号强度随乙醇-氨水溶液中乙醇体积分数的变化:表现为先增强后减弱的趋势.随着乙醇的体积分数由 0.25% 提升到 1.0%,SERS 信号强度达到最强;但进一步提升乙醇体积分数到 2.0%和 5.0%时,信号强度减弱至消失.这可能是由于乙醇体积分数显著影响柠檬黄在氨水中的溶解度,进而影响氨水提取聚酰胺粉中柠檬黄的能力;也可能存在着图 2(A) 所阐述的目标物和杂质提取效率的竞争关系.因此,最终选择 1.0%的乙醇-氨水溶液作为洗脱溶剂。

与传统聚酰胺粉萃取方法相比,提取溶剂和洗脱



图中的百分数均为乙醇的体积分数。

图 2 不同配比乙醇-水溶液提取(A)和不同配比乙醇-氨水溶液洗脱时(B)时,加标 1 mg/L 柠檬黄的薯片样品的 SERS 谱图

Fig. 2 SERS spectra of 1 mg/L lemon yellow spiked chips samples with different extract concentrations of alcohol aqueous solution(A), and with different eluent concentrations of alcohol ammonia solution(B)

溶剂的配比都有明显差异,本研究的前处理步骤更为简单且试剂用量显著减小.这可能是由于传统方法是基于待测目标物的吸光度(包括液相色谱法和紫外-可见分光光度法)进行定性定量分析,检测器的能量分辨率弱于SERS技术,所以对前处理的提纯要求更高.

2.3 方法的普适性

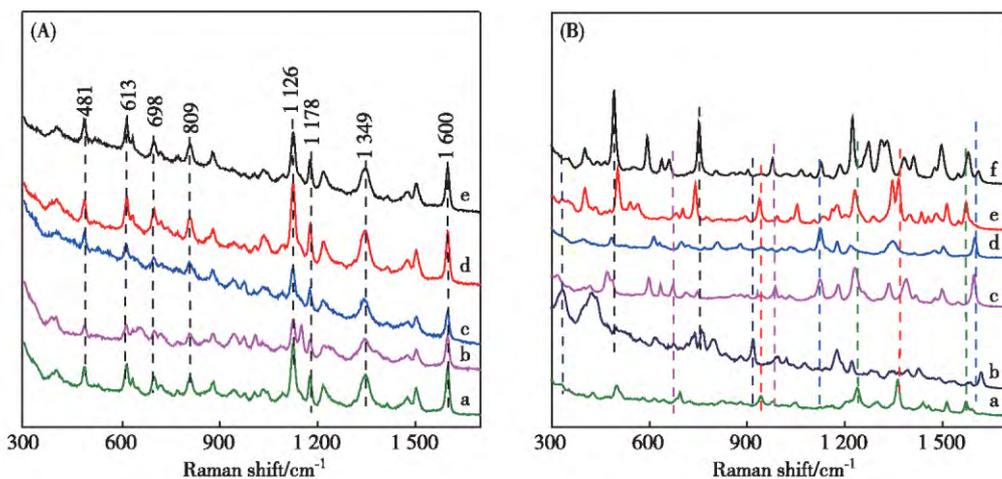
上述前处理条件的优化是基于加标1 mg/L柠檬黄的薯片样品,为验证该前处理条件的普适性,分别对数十种固体和液体加标样品以及不同人工色素加标样品进行检测.

图3(A)给出在乌龙茶、果粒橙、蛋糕、火腿肠和薯片等食品样品中加标1 mg/L柠檬黄所得到的SERS谱图.尽管这些食品的基质差异显著:如乌龙茶含有高浓度的茶多酚和咖啡碱等,果粒橙含有胡萝卜素等,蛋糕含有植物脂肪和蛋白等,火腿肠含有动物脂肪和淀粉等,薯片则含有淀粉等;但从图中可以看出,位于481, 613, 698, 809, 1126, 1178, 1349和1600 cm^{-1} 处的柠檬黄的特征拉曼谱峰清晰.这表明SERS方法能对这些基质复杂且多样的食品样品中所含有的痕量柠檬黄进行高灵敏的快速检测.基于拉曼光谱的指纹图谱及SERS的特异性识别的特点,优化后的前处理方法在很大程度上消除了这些基质的干扰,体现出来的差异仅仅是SERS谱峰的拉曼强度有所不同(最高值约为最低值的2~3倍).该结果说明,尽管所采用的前处理方法尚无法完全排除不同介质中的基质干扰,但是并不影响目标物的高灵敏检出.

图3(B)分别为加标1 mg/L的亮蓝、胭脂红、日

落黄、柠檬黄、苋菜红、诱惑红的薯片样品,经前处理后所得洗脱液的SERS谱图,这些谱图分别和这6种人工合成色素标准样的SERS谱图(未展示)完全一致.尽管这6种色素(偶氮类)在化学结构上存在共同之处(苯环、偶氮和磺酸根基团等)使得部分SERS谱峰位置很近(如苋菜红和诱惑红),但是分子结构的明显区别导致SERS谱图的差异显著,如SERS谱峰位置存在明显偏移,或谱峰的相对强度变化显著.该结果说明,使用同一种前处理和SERS检测方法,成功实现了对食品样品中不同人工合成色素的1 mg/L水平的高灵敏检测.在数十种不同类型的固体或液体食品样品体系中,都获得了一致的结果,意味着本文中提出的方法能够实现盲样的非定向检测,即对于任意食品样品,采用上述前处理和SERS检测方法,可以实现人工合成色素的快速、高灵敏检出.对食品中的人工合成色素的快速检测,现有基于紫外-可见分光光度法的快速检测产品需要1~2 h的前处理过程,对于含脂肪和蛋白的食品样品,前处理过程更为复杂;而且只能作为一种定向检测手段,否则会发生误判,这是因为这些色素吸收峰交叠严重,能量分辨率远弱于拉曼光谱.

综上所述本方法能够实现非定向检测,但是在实际食品样品中,往往会添加多种人工色素进行调色,为了考察在添加多种人工色素的体系中本方法的适用性,图4给出分别加标10 mg/L苋菜红、胭脂红、诱惑红和三者混合物的葡萄酒中经前处理后的洗脱液的SERS谱图(质检系统中,葡萄酒中的这几类人工色素检测常用于评估检验员的色谱操作技能,加标质量

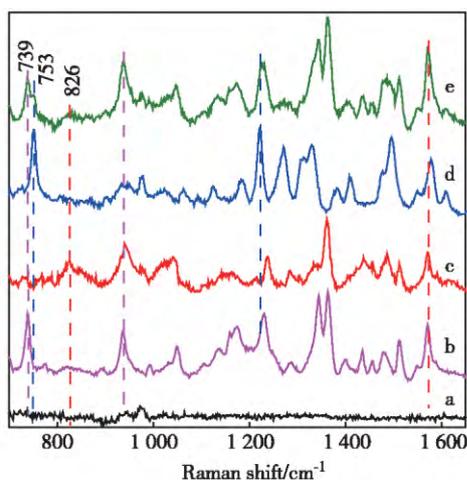


(A): a.薯片; b.火腿肠; c.蛋糕; d.果粒橙; e.乌龙茶。(B): a.胭脂红; b.亮蓝; c.日落黄; d.柠檬黄; e.苋菜红; f.诱惑红。

图3 不同食品加标1 mg/L柠檬黄后的SERS谱图(A)和薯片加标1 mg/L不同人工合成色素后的SERS谱图(B)

Fig. 3 SERS spectra of 1 mg/L lemon yellow spiked various food samples (A), and different artificial pigment (1 mg/L) spiked chips samples (B)

浓度一般在几十 mg/L 水平)。



a.葡萄酒空白样品; b~d.分别添加 10 mg/L 的苋菜红、胭脂红、诱惑红; e.添加了苋菜红、胭脂红和诱惑红各 10 mg/L.

图 4 加标单一或者混合人工合成色素 (10 mg/L) 的葡萄酒的 SERS 谱图

Fig. 4 SERS spectra of the graph wines samples spiked with different artificial pigments (10 mg/L)

由图 4 可以观察到:对于单一色素加标样品,根据 SERS 谱图中谱峰位置和谱峰的相对强度,能够轻易进行区分是否添加色素及添加了何种色素;当有 3 种色素共存时,单纯肉眼分辨显得有些困难,尽管仍能比较明确地指认位于 739, 753 和 826 cm^{-1} 的谱峰分别来自苋菜红、诱惑红和胭脂红,但是其他谱峰交叠严重,难以清晰分辨。一旦有 4 种以上的色素混合,将显著提升肉眼观察的难度,这时必须引入化学计量学,综合考虑谱峰的相对强度和谱峰的位置,进行有效区分和指认。尽管如此,相比于只含有天然色素的葡萄酒样品,对于未知是否添加一种还是多种色素的伪劣葡萄酒样品, SERS 谱图都能准确表达并检出。

3 结 论

针对现有实验室方法操作复杂、费时费力,已有快速检测方法准确率低、假阳性高等缺点,本文中提出了一种基于 SERS 技术的非定向的现场快速筛查方法。该方法具有快速(总检测时间不足 15 min)、方便(可现场操作)、灵敏度高(检出质量浓度在 1 mg/L 水平且无假阳性)以及非定向(同一种方案鉴定和区分不同食品不同人工合成色素)等特点。因此,本研究建立的方法可以作为一种高灵敏、无假阳性的非定向的

快速筛查手段,用于违禁添加人工合成色素的食品检测,可同时满足执能部门的现场执法和实验室预检需求。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部.食品中合成着色剂的测定:GB/T 5009.35—2003[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [2] PAYÁ P, ANASTASSIADES M, MACK D, et al. Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(6): 1697-1714.
- [3] 周宏霞, 韩喜东, 于军强, 等.食用色素及其检测方法的研究进展[J].*检验检疫学刊*, 2009, 19(4): 74-76.
- [4] 周伟娥, 凌云, 张元, 等.食品中合成色素的前处理与检测分析方法研究进展[J].*中国食品添加剂*, 2015(9): 150-156.
- [5] THOMPSON C O, TRENERRY V C. Determination of synthetic colours in confectionery and cordials by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1995, 704: 195-201.
- [6] 龙巍然, 岑怡红, 王兴益, 等.毛细管区带电泳法同时测定饮料中 16 种食品添加剂[J].*色谱*, 2012, 30(7): 747-751.
- [7] YOSHIOKA N, ICHIHASHI K, CATHERINE O, et al. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection [J]. *Talanta*, 2008, 74(5): 1408-1413.
- [8] SHEN Y X, ZHANG X M, PRINYAWIWATKUL W, et al. Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products [J]. *Food Chem*, 2014, 157: 553-558.
- [9] TATEO F, BONONI M. Fast determination of sudan I by HPLC/APCI-MS in hot chilli, spices, and oven-baked foods [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(4): 655-658.
- [10] NI Y N, WANG Y, KOKOT S. Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics [J]. *Talanta*, 2009, 78(2): 432-441.
- [11] ALGHAMDI A H, ALSHAMMERY H M, ABDALLA M A, et al. Determination of carmine food dye (E120) in foodstuffs by stripping voltammetry [J]. *J AOAC Int*, 2009, 92(5): 1454-1459.
- [12] TIAN Z Q, REN B, WU D Y. Surface-enhanced Raman scattering: from noble to transition metals and from rough surfaces to ordered nanostructures [J]. *J Phys Chem B*, 2002, 106(37): 9463-9483.

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

- [13] TIAN Z Q. Surface – enhanced Raman spectroscopy: advancements and applications [J]. *J Raman Spectrosc* 2005 , 36(6/7) : 466-470.
- [14] CHEN J ,SHEN W ,DAS B ,et al. Fabrication of tunable Au SERS nanostructures by a versatile technique and application in detecting sodium cyclamate [J]. *RSC Adv* , 2014 4(43) : 22660-22668.
- [15] ZHU Y Q ,ZHANG L ,YANG L B. Designing of the functional paper-based surface-enhanced Raman spectroscopy substrates for colorants detection [J]. *Mater Res Bull* , 2015 63: 199-204.
- [16] PEKSA V ,JAHN M ,ŠTOLCOVÁ L ,et al. Quantitative SERS analysis of azorubine (E 122) in sweet drinks [J]. *Anal Chem* 2015 87(5) : 2840-2844.
- [17] FRENS G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. *Nature Phys Sci* ,1973 241: 20-22.

Developing On-site Quick Screening Platform for Artificial Pigments in Food Using Surface-enhanced Raman Spectroscopy

CHEN Qizhen^{1 2} , ZENG Yongming^{1 2} , LIN Huizhen³ ,
CHEN Hongju³ , TIAN Zhongqun³ , LIU Guokun^{1*}

(1.State Key Laboratory of Marine Environmental Science ,College of the Environment & Ecology , Xiamen University ,Xiamen 361102 ,China; 2.PERSer Nanotechnology Ltd. ,Xiamen 361005 ,China; 3.College of Chemistry and Chemical Engineering ,Xiamen University ,Xiamen 361005 ,China)

Abstract: As widely used additives in food processing ,artificial pigments have no any nutrition but are potential sources of hyper-activity and affect the intellectual development of children. On the basis of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and portable Raman instrument ,we developed a non-targeting on-site and quick screening platform for artificial pigments in food matrix. SERS measurement could be carried out after the food matrix (either in solid or liquid states) being simply pretreated for 15 min. The detectable concentration is as low as 1 mg/L , a level meeting the demand of the on-site enforcement by the government. Besides the advantages of quick easy-on-going and high sensitivity ,the most distinguished point of SERS is the non-targeting qualitative on-site detection for the typical pigment additives ,including brilliant blue ,carmine ,sunset yellow ,lemon yellow ,amaranth and allura red ,et al. ,while both the pretreatment procedure and the SERS detection remain the same.

Key words: surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) ; non-targeting; on-site; quick; high sensitivity