

表面增强拉曼光谱检测白酒中氨基甲酸甲酯含量研究

徐晨曦,付大友,谭文渊,汪菊

(四川理工学院材料与化学工程学院,四川 自贡 643000)

摘要:表面增强拉曼光谱(SERS)作为一种高灵敏度的光谱技术,广泛应用于食品中微量物质检测。通过化学法合成具有 SERS 活性的金溶胶,紫外可见光谱、电子探针表征显示制备的溶胶分散性良好,粒径均匀,稳定性好。利用制备的溶胶结合便携式拉曼光谱对白酒中氨基甲酸甲酯进行分析,其方法回收率可达到 90%~97%,检测限可达到 0.5 mg/L。研究表明,SERS 技术可用于白酒中氨基甲酸甲酯的现场快速检测,并有望成为一种快捷的食品安全检测技术。

关键词:表面增强拉曼光谱;氨基甲酸甲酯;快速检测

中图分类号:0657.3

文献标志码:A

引言

氨基甲酸甲酯(methyl carbamate, MC)广泛存于发酵食品中,无色无味,常温下呈白色晶体状,碱性和高温下易分解,沸点为 177 °C。MC 是多位点致癌物,可诱发肺癌、肝癌、皮肤癌等疾病^[1-5]。国内外已有相关报道酒精饮料中检测出天然发酵产物 MC,通过对 MC 的来源和形成机理进行调查,发现白酒中可能存在的 MC 来源和形成机理主要有:(1)以谷物为原料的发酵白酒中,谷物的氰化物前体在发酵和蒸馏时反应生成氰酸盐,氰酸盐在酒精中转化成 MC;(2)已发酵和未蒸馏白酒中的尿素与甲醇自发反应生成 MC^[6-9]。白酒是我国大众喜爱的酒品之一,其 MC 含量的检测对于公众健康和食品安全起着极为重要的意义。氨基甲酸甲酯检测的方法通常采用气相色谱、高效液相色谱及其质谱联用技术,方法繁琐,仪器成本昂贵,在实际应用和现场检测上受到较大限制^[10-16]。因此,本文基于激光拉曼光谱技术的高灵敏度,高鉴别能力的特点,首先建立氨基甲酸甲酯标准样品激光拉曼光谱数据库,研发拉曼增敏试剂使样品信号增强,达到定性定量的目的。为进一步研制微量

在线监测仪和市场现场检测仪提供理论支持。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

实验试剂:氨基甲酸甲酯(MC)标准试剂(上海奉贤奉城试剂厂),柠檬酸三钠(分析纯),鞣酸(分析纯),氯金酸(分析纯),抗坏血酸(分析纯),乙腈(分析纯),乙醇(分析纯),无水碳酸钾(分析纯)。

实验仪器:DXR Raman 激光显微拉曼光谱仪(赛默飞世尔科技公司),E-sweep 扫描探针(Hitachi High-Tech Science Corporation),ZNCL-BS 磁力搅拌器(上海越众仪器设备有限公司),RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),FA1004 电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),AS10200B 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 仪器条件

激光拉曼光谱仪测定条件:激光波长 780 nm,激光最大强度 24.0 mw,显微镜采用 10 倍目镜,光斑大小 3.1 μm,光圈 25 μm,光栅 400 gr/mm,分辨率 2.3~4.3 cm⁻¹,扫描范围 3425~82 cm⁻¹,积分时间 1 min,积分

收稿日期:2015-03-07

基金项目:四川理工学院研究生创新基金项目(y2013028;201410622025);酿酒生物技术及应用四川省重点实验室基金项目(NJ2014-15)

作者简介:徐晨曦(1990-),女,四川达州人,硕士生,主要从事化学分析方面的研究,(E-mail)xuchenxi126@126.com

10次。每个样品至少扫描3次,以得到准确的拉曼光谱图。

1.3 纳米胶体金的制备

根据文献[17]制备胶体金溶液,在进行金纳米颗粒合成之前,所有玻璃仪器均用王水浸泡,去除杂质,再用蒸馏水冲洗备用。取1%的柠檬酸三钠溶液4 mL,加入0.5 mL 0.1%鞣酸,双蒸水16 mL,此为溶液A,加热至60℃。取1 mL 1%氯金酸溶液,加入79 mL双蒸水,此为溶液B,加热至60℃。将溶液A缓慢加入到溶液B中,并不断搅拌,调节pH至中性,磁力搅拌器加热30 min。

1.4 纳米颗粒的表征

金纳米颗粒吸收光谱测定:将合成的金纳米颗粒放置0天,6天后以原始浓度置于石英比色皿中,利用UV-1100分光光度计分别测定其吸光度值。

金纳米颗粒的扫描探针图像测定:取1 mL纳米胶体金溶液于烧杯中,20 mL无水乙醇稀释,超声波分散2 min。用胶头滴管取一滴稀释后的金溶胶于云母片上,电吹风从底部吹干,将云母片置于E-sweep扫描探针载物台上检测分析。

1.5 标准曲线的测定

配制1 mg/L、3 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L的MC标准水溶液。取标液与金溶胶以体积1:1混合,加入0.01 mol/L的聚沉剂NaCl溶液后超声2 min。各六组装于核磁管中进行拉曼光谱检测。每个样品重复采集三次。

1.6 白酒样品中MC的测定

样品浓缩:取200 mL白酒样品于圆底烧瓶中,真空条件,转速2500 r·min⁻¹,恒温水浴温度为80℃,样品利用旋转蒸发仪浓缩出去多余的乙醇溶液。待样品蒸发至干时,乙腈定容至10 mL。

拉曼检测:取浓缩后的样品溶液与金溶胶以体积1:1混合,加入0.01 mol/L的NaCl溶液后超声2 min。置于核磁管中进行拉曼光谱检测。每个样品重复采集三次。

2 结果与讨论

2.1 金溶胶的表征

氯金酸溶液在加热过程中的颜色变化因溶液的沸腾时间和加热方式而改变,随着加热时间的延长,溶液颜色变化过程:浅黄色-灰色-浅蓝色-紫红色-橘红色。本实验利用磁力搅拌器在转速250 r·min⁻¹,加热温度60℃的条件下加入柠檬酸三钠4 mL制备金溶胶。

并将金溶胶置于4℃避光保存。放置6天后,采用紫外分光光度计在波长200 nm~400 nm下测定其吸光度值。由图1(a)可见溶胶只有1个吸收峰,最大吸收峰位于520 nm处,半峰宽100 nm。通常,溶胶紫外光谱的吸收峰和半峰宽与纳米的颗粒、粒径大小和粒径分布有关。根据谱图可知放置后的紫外吸收曲线没有出现蓝移或红移的现象,说明溶胶稳定性较好。图1(b)为溶胶的扫描探针图像,可进一步表征纳米颗粒分散性良好,直径在40 nm。根据文献可知^[18],尺寸在20 nm~80 nm之间的金颗粒能够获得较好的SERS活性,因此本实验所制备的溶胶可以达到较好的增强效果。

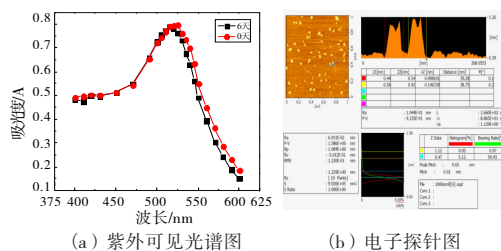


图1 金溶胶紫外可见光谱图、电子探针图

2.2 氨基甲酸甲酯粉末定性分析

将纯品固体粉末氨基甲酸甲酯置于拉曼光谱载物台上,在780 nm激光激发下测定其出峰位置,谱图如图2所示,通过对氨基甲酸甲酯化合物的拉曼出峰位置分析可知,2900 cm⁻¹处是氨基甲酸甲酯-CH₃的C-H伸缩振动。880 cm⁻¹处为V_{C-N}伸缩振动拉曼谱带,然而伯胺的-NH₂中的V_{N-H}反对称振动在3400~3330 cm⁻¹处有一个强峰,由于本实验使用的拉曼仪器在3000 cm⁻¹处就开始有很强的噪声,以至于淹没了V_{N-H}反对称振动峰。1700 cm⁻¹处为饱和甲酸酯V_{C=O}伸缩振动,1617 cm⁻¹左右为伯胺-NH₂的V_{N-H}弯曲振动,1472 cm⁻¹处为-CH₃的C-H弯曲振动频率。

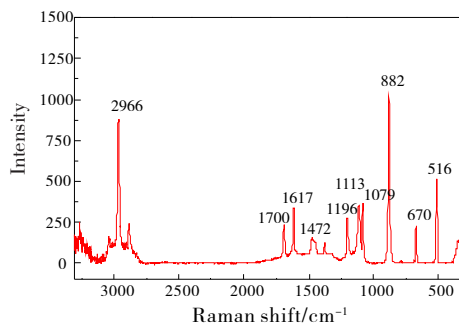


图2 纯品氨基甲酸甲酯拉曼光谱图

2.3 承载基底的选择

承载样品的基底可能会对待测物的拉曼峰产生干扰,实验考察三种方法对样品进行测定。图3为将液体

直接置于玻璃片、TLC 薄层色谱板以及核磁管内测定。由图 3 可见玻璃基底在 $1000 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ 有一个宽峰,对样品出峰造成了干扰。TLC 测定时虽然背景干扰较少,但直接将液体置于上面测定时,其检测下限远远高于核磁管聚焦测定。因此本实验选择核磁管聚焦测定样品。

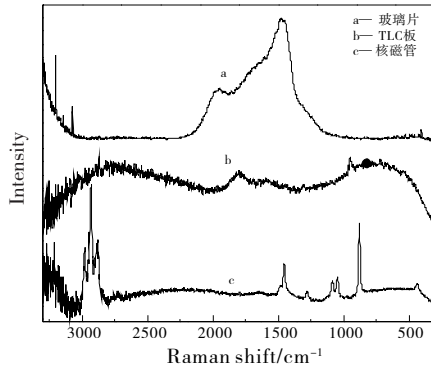


图 3 不同基底氨基甲酸甲酯溶液表面增强拉曼图

2.4 标准曲线的绘制

配制 0 mg/L 、 10 mg/L 、 20 mg/L 、 30 mg/L 、 40 mg/L 、 50 mg/L 、 60 mg/L 的氨基甲酸甲酯标准水溶液。标液与金溶胶以体积 $1:1$ 混合,加入 0.01 mg/L 的 NaCl 溶液后超声 2 min 。各五组装于核磁管中进行拉曼光谱检测。每个样品重复采集三次,其表面增强拉曼谱图如图 4 所示。其氨基甲酸甲酯特征峰 880 cm^{-1} 处随着浓度的增加,响应强度明显增强, 880 cm^{-1} 处为氨基甲酸甲酯 $\text{V}_{\text{C}-\text{N}}$ 伸缩振动拉曼谱带,可区别于其他基团峰,所以此处为定性峰。根据 880 cm^{-1} 处拉曼响应强度 y 对氨基甲酸甲酯浓度 x 做标准曲线(图 5)。可得到标准曲线:

$$y = 0.4429x + 6.1429, R^2 = 0.9846$$

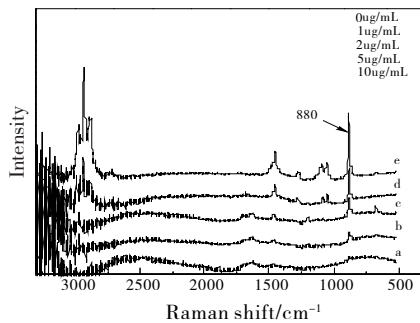


图 4 梯度浓度氨基甲酸甲酯加标白酒表面增强拉曼光谱图

2.5 白酒样品分析

本实验将白酒样品首先经过浓缩,然后用于表面增强拉曼检测。如图 6 所示,白酒样品中氨基甲酸甲酯表面增强拉曼谱图出峰较弱,不能明显辨识。说明选择的

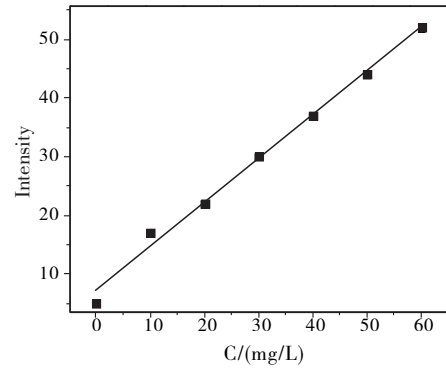


图 5 氨基甲酸甲酯标准曲线

此类白酒氨基甲酸甲酯含量低于方法检出限。通过对其添加不同浓度梯度的氨基甲酸甲酯水溶液后,进行测定。其氨基甲酸甲酯特征峰 880 cm^{-1} 处明显增强。经过多次平行取样测定,该特征峰稳定存在。并且随着氨基甲酸甲酯梯度浓度的变化,其特征峰的强度与浓度成相应的线性关系。因此,此特征峰可用于氨基甲酸甲酯的定性分析。通过谱图比较,可看出 880 cm^{-1} 特征峰并不能严格与氨基甲酸甲酯浓度成线性关系,这可能是由于每次测定时,激光聚焦不能严格一致。致使测量有一定误差。

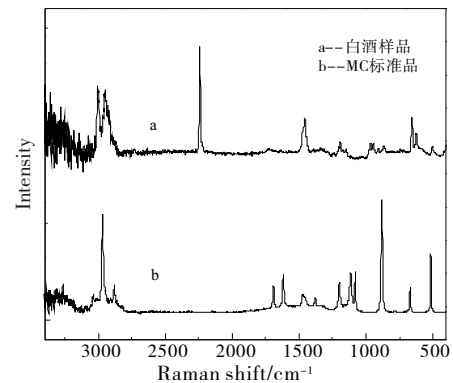


图 6 MC 标准品与样品对比拉曼光谱图

2.6 回收率和相对标准偏差测定

在白酒样品中,分别加入一定量标准品溶液,3 个添加水平(2 mg/L 、 5 mg/L 、 10 mg/L),一份作为空白。计算 3 种添加水平下的加标回收率,每个添加水平平行测定 3 次,分析得出样品的平均加标回收率和相对标准偏差,其值见表 1。平均加标回收率在 $90\% \sim 97\%$, $\text{RSD} < 6.2\%$ 。本次实验,由于激光显微拉曼光谱仪检测器的灵敏度较低,以及采集谱图时,不同时刻、不同采集位置都会造成一定的误差,整体 RSD 较为合适。

加标回收率的计算公式为:

$$X = \frac{B - A}{C} \times 100\%$$

式中: A ——白酒中氨基甲酸甲酯的含量,单位(g)
 B ——根据相应强度得出的氨基甲酸甲酯的含量,单位(g)

C ——加入的氨基甲酸甲酯标样量,单位(g)
 X ——加标回收率

表1 氨基甲酸甲酯溶液加标回收率,相对偏差

MC	Add level/(mg/L)	Recovery rate/%			Average	Average recovery rate of sample/%	RSD/%
		1	2	3			
1	2	89.56	92.34	87.68	89.86	94.6	4.5
	5	92.66	98.46	95.59	95.57		
	10	96.57	100.05	98.25	98.29		
2	2	86.32	90.28	84.18	86.94	90.2	4.7
	5	88.92	90.85	86.5	88.83		
	10	94.86	99.51	90.74	95.03		
3	2	87.14	98.16	90.54	91.94	96.6	6.2
	5	90.46	97.87	95.18	94.52		
	10	102.14	108.24	99.86	103.41		

3 结论

白酒中的发酵产物含量甚微,一般仪器很难检测或者检测条件繁琐,但随着对微量有毒物分析检测技术要求的提高,传统的分析方法难以满足简便、快速、实时、无损等分析要求,随着表面增强拉曼光谱分析技术的发展,不但降低了物质分析检出限,而且可做到快速、准确和简便的分析检测,使其为微量有毒物提供更为优越的检测技术。

本次实验以胶体金为增强试剂,对白酒中氨基甲酸甲酯进行表面增强拉曼检测。确定氨基甲酸甲酯鉴定峰在 880 cm^{-1} 处,直接测定白酒样品时,其含量低于检测限,不能明显辨识鉴定峰。通过对白酒样品进行加标回收实验,可得到其回收率在 $90\% \sim 97\%$, $RSD < 6.2\%$ 。以3倍噪声($S/N = 3$)计算最低检测限,本实验计算得出氨基甲酸甲酯的最低检测限为 0.5 mg/L 。此方法样品预处理简便,检测时间短,分析速度快,检测成本低,可用于酒精饮品的现场质量控制和市场监督。

参考文献:

- [1] 陈笑梅,胡贝贞,刘海山,等.高效液相色谱-串联质谱法测定粮谷中9种氨基甲酸酯类农药残留[J].分析化学,2007,35(1):106-110.
- [2] Anastasios E, Helen B, Spyros A, et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(31): 5856-5867.
- [3] Gavin R, Simon L, Robert J. The fate of fungicide and insecticide residues in Australian wine grape by-products

following field application[J]. Food Chemistry, 2009, 117(4): 634-640.

- [4] 杨丹婷.氨基甲酸乙酯和大肠杆菌的表面增强拉曼光谱检测方法[D].杭州:浙江大学,2013.
- [5] Pierluigi C, Paolo C. Pesticides' Influence on Wine Fermentation[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2010, 59(2): 43-62.
- [6] Aimilia G, Vasilios S, Fiamegos Y C, et al. Sensitive determination of pesticides residues in wine samples with the aid of single-drop microextraction and response surface methodology[J]. Talanta, 2010, 82(4): 1286-1291.
- [7] Yang Ruzhen, Wang Jinhua, Wang Minglin, et al. Dispersive Solid-Phase Extraction Cleanup Combined with Accelerated Solvent Extraction for the Determination of Carbamate Pesticide Residues in Radix Glycyrrhizae Samples by UPLC-MS-MS[J]. Journal of Chromatographic Science, 2011, 49(10): 702-708.
- [8] 王晓楠,潘献辉.水中氨基甲酸酯类农残前处理及色谱检测研究进展[J].化学分析计量,2012,51(3):95-98.
- [9] Dasgupta S, Banerjee K, Patil S H, et al. Optimization of two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for separation and estimation of the residues of 160 pesticides and 25 persistent organic pollutants in grape and wine[J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(24): 3881-3889.
- [10] Zhang Y, Zhang J. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages using a face-centered cube central composite design[J]. Analytica Chimica Acta,

- 2008,627(2):212-218.
- [11] Madrera R R, Valles B S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD[J]. Food Control, 2009,2(2):139-143.
- [12] Park S R, Ha S D, Yoon J H, et al. Exposure to ethyl carbamate in alcohol - drinking and nondrinking adults and its reduction by simple charcoal filtration[J]. Food Control, 2009,20(10):946-952.
- [13] 袁东,李艳清,付大友,等.气相色谱/质谱法测定白酒中有机氯农药残留[J].酿酒科技,2007(4):121-123.
- [14] 李华,冯丽丹,梁新红,等.固相萃取结合 GC/MS 法测定葡萄酒中氨基甲酸乙酯[J].食品与生物技术学报,2008(1):62-66.
- [15] 谭文渊,付大友,袁东,等.酒精饮料中氨基甲酸酯类农药残留分析研究进展[J].四川理工学院学报:自然科学版,2010,23(2):202-205.
- [16] Skoulika S G, Georgiou C A, Polissiou M G. FT-Raman spectroscopy—analytical tool for routine analysis of diazinon pesticide formulations[J]. Chemistry Laboratory, 2006,51(3):599-604.
- [17] Zhu Xuan, Yanf Haifeng, Wang Na, et al. A facile method for preparation of gold nanoparticles with high SERS efficiency in the presence of inositol hexaphosphate[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 342(2):571-574.
- [18] 渠陆陆,李大伟,翟文磊,等.基于表面增强拉曼光谱的水中芳香胺类污染物现场快速检测技术[J].环境化学,2011,30(8):1485-1490.

Study on the Analysis of Methyl Carbamate Content in Liquor by Surface Enhanced Raman Spectroscopy

XU Chenxi, FU Dayou, TAN Wenyuan, WANG Ju

(School of Materials and Chemical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) as a high sensitive spectroscopic technique, is widely used in food micro-sample detection. Through chemical method, SERS active gold sol is synthesized, UV visible spectroscopy and electron probe characterization show that the sol prepared has good dispersion, uniform particle size, good stability. The methyl carbamate in liquor is analyzed by using the prepared sol with portable Raman spectrometre, the recovery rate can reach 90% ~97%, the detection limit can reach $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Research shows that, SERS technology can be used for spot rapid detection of methyl carbamate in liquor, and it will be expected to become a fast detection technology for food safety.

Key words: Surface Enhanced Raman Spectroscopy; methyl carbamate; rapid detection