

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.12.015

基于表面增强拉曼光谱的养殖水中五氯酚残留检测

Detection of pentachlorophenol in fishery water using surface-enhanced Raman spectroscopy

张泸文¹ 余婉松² 夏苏捷¹ 陈燕¹ 王柯¹

ZHANG Lu-wen¹ YU Wan-song² XIA Su-jie¹ CHEN Yan¹ WANG Ke¹

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 2. 赛默飞世尔科技[中国]有限公司, 上海 201206)

(1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China;

2. Thermo Fisher Scientific [China] Co., Ltd., Shanghai 201206, China)

摘要:应用表面增强拉曼光谱(SERS)技术,建立了一种水产品流通过程养殖水中五氯酚残留量的快速测定方法。参照经典方法制备金溶胶后将其浓缩作为增强基底,通过优化促凝剂、调节体系 pH 值、选择纳米溶剂及其用量、考察吸附等待时间得到最佳 SERS 增强效果。所建立的方法在 0.2~4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内具有良好的线性相关性,养殖水中五氯酚的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,回收率为 78.74%~112.30%,精密度为 6.1%~11.3%,满足残留分析的要求。定性方法灵敏度、特异性 $\geq 95\%$ 、假阴性率和假阳性率 $\leq 5\%$,结果均符合食药监科便函[2017]43号《食品快速检测方法评价技术规范》要求。该方法快速准确、操作简便,适用于现场快速检测养殖水中五氯酚残留量。

关键词:五氯酚;养殖水;表面增强拉曼光谱;快速检测

Abstract: A method for rapid determination of pentachlorophenol in fishery water was established by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). The concentrated gold colloid was prepared to use as Raman substrate according to the classic method, and the optimal SERS enhancement effects were obtained by adjusting the pH of the system, optimizing the coagulants, nanoparticles volume and adsorption time. The method had a good linearity between the peak intensity and the pentachlorophenol concentration in the range of 0.2~4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the detection limit was 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The recovery ranged from 78.74% to 112.30%, and the relative standard deviation was between 6.1%~11.3%. The sensitivity and specificity of the SERS

method were over 95%, and the rates of false positive and false negative results were less than 5%, which were all conform to the evaluation specification of food rapid analysis method. The method is fast, accurate and easy to operate, and it provides a good foundation for the rapid detection of pentachlorophenol in fishery water.

Keywords: pentachlorophenol; fishery water; surface-enhanced Raman spectroscopy; rapid detection

五氯酚(pentachlorophenol, PCP)及其钠盐属高毒有机氯农药,在中国曾长期被用于消灭池塘、稻田内寄生血吸虫的宿主钉螺以及养殖水体的消毒、清塘等^[1]。五氯酚化学性质稳定,自然界中降解缓慢,易通过水载体扩散,可通过食物链进入人体而蓄积,具有明显的生物毒性以及致畸、致癌、致突变等毒副作用。世界各发达国家均将其列为优先控制的持久性有机污染物之一,严格限制其使用^[2-4]。中国农业部公告第 193 号及第 235 号和《无公害食品 渔用药物使用准则》(NY 5071—2002),均明确规定禁止五氯酚及其钠盐用于水生食品动物生产中。但近年来中国仍有部分渔民使用五氯酚钠杀灭杂鱼进行清塘,导致淡水沉积物中的五氯酚含量呈上升趋势^[5],对渔业产品质量的影响仍较严重。因此,有必要建立准确、可靠、快速的检测方法,从源头上对水产品生产养殖和流通环节进行安全监控。

目前五氯酚常用的检测方法有气相色谱法(GC)^[6]、液相色谱法(LC)^[7]、气相色谱—质谱法(GC-MS)^[8]、液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS)^[9]和超高效液相色谱—高分辨质谱法(UPLC-HRMS)^[10]。尽管此类方法具有较高的灵敏度和准确度,但是试验耗时较长,试验仪器规模较大,对操作人员要求高,并不适合现场快速检测。

表面增强拉曼光谱(Surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)技术是基于当激光照射到金、银等金属

基金项目:上海市科委研究计划项目(编号:16391904000, 18395810300)

作者简介:张泸文,女,上海市食品药品检验所主管药师,硕士。

通信作者:王柯(1971—),男,上海市食品药品检验所主任药师,硕士。E-mail: wangke@smda.sh.cn

收稿日期:2019-08-11

粗糙表面或溶胶中,由于电磁交互作用使得金属表面电场增强,将吸附在金属粗糙表面的待测物拉曼散射信号强度增加 $10^4 \sim 10^6$ 倍的类共振增强效应而研发出来的一种新型光谱分析检测技术^[11]。表面增强拉曼光谱具有百万级的光谱增强能力,且具备无需样品前处理、灵敏度高、操作简单、检测速度快、易实现现场检测等优点^[12],在食品安全快速监测领域获得了广泛的应用^[13-15],在水产品及加工制品中有毒有害物质快速检测方面越来越受到重视。王利华等^[16]应用SERS技术实现了对水产类产品中孔雀石绿的快速高灵敏检测,实际可测最低浓度为 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。郭小莹等^[17]以银溶胶为活性基底,应用SERS技术实现了对水产鱼制品中组胺的快速定量检测,最低检测浓度为 10 mg/L ,远低于GB 5009.208—2016中水产品中组胺最大限量检测限 50 mg/L 。

结合便携式拉曼光谱仪,试验拟采用表面增强拉曼光谱技术建立养殖水中五氯酚及其钠盐的残留量检测方法,以期在生产、流通环节中五氯酚及其钠盐残留的现场、快速检测探索新的途径和方法。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

五氯酚钠标准品(CAS号131-52-2):纯度 $>99.5\%$,德国Dr. Ehrenstorfer公司;

硝酸银、柠檬酸三钠:纯度 $>99.0\%$,美国Sigma公司;

氯金酸:纯度 99.99% ,百灵威科技有限公司;

甲醇:色谱纯,德国Merck公司;

氯化钠、氯化钾、碘化钾、碳酸钠、碳酸钾、三氯化铁、硫酸镁、硫酸钾、氢氧化钾、硝酸和氯化镁:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

$0.45 \mu\text{m}$ 水相滤膜:天津津滕公司;

实验室用水为Milli-Q超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.1.2 仪器设备

便携式拉曼光谱仪:FoodDefender RM型,美国Thermo Fisher Scientific公司;

高速离心机:CR21G型,德国Eppendorf公司;

涡旋仪:VORTEX 4 digital型,德国IKA公司;

天平:Sartorius BS 2202S/CP225D型,德国Sartorius公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂的制备

(1)金溶胶的制备:准确量取 0.01% 的氯金酸溶液 100 mL 于圆底烧瓶中, 1100 r/min 磁力搅拌条件下加热至沸腾,迅速加入 1% 的柠檬酸三钠水溶液 1 mL ,继续加热至颜色呈酒红色后持续加热 15 min ,冷却至室温后调

$\text{pH} \approx 7$,于冰箱内 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存^[18-19]。

(2)银溶胶的制备:精密称量 45 mg 硝酸银于圆底烧瓶中,加入 250 mL 超纯水溶解,安装好冷凝回流装置,加热至沸,逐滴加入 5 mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸三钠水溶液,继续加热 1 h 后停止。冷却至室温后于冰箱内 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存^[20]。

(3)浓缩金溶胶的制备:准确量取制备的金溶胶 2 mL 于离心管中, 10000 r/min 离心 10 min ,移除透明水层,重复操作至下层剩余 0.1 mL ,涡旋混匀即得浓缩金溶胶^[21]。

1.2.2 空白试样的选择 选取水产品养殖用水作为空白试样,均购自上海本地菜场,按GB 23200.92—2016《食品安全国家标准 动物源性食品中五氯酚残留量的测定 液相色谱—质谱法》进行检测,经检测不含五氯酚。

1.2.3 标准溶液配制

(1)标准储备溶液($100 \mu\text{g/mL}$):精密称取五氯酚钠标准品 10 mg ,置 100 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ 标准储备溶液。此储备液可在 $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光存放 12 个月。

(2)标准工作溶液($1 \mu\text{g/mL}$):精密量取五氯酚标准储备溶液 $100 \mu\text{L}$,置 10 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得到浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 标准工作溶液。

1.2.4 样品检测方法 取养殖水适量,用 $0.45 \mu\text{m}$ 水相滤膜过滤,待测。取 $100 \mu\text{L}$ 浓缩金溶胶,依次加入 0.01% 硝酸溶液 $20 \mu\text{L}$,水样 $100 \mu\text{L}$, 0.2 mol/L 硫酸镁溶液 $20 \mu\text{L}$, 0.2 mol/L 碳酸钠溶液 $20 \mu\text{L}$,充分混匀, 1 min 后检测分析。

1.2.5 拉曼光谱测定 激光源波长 785 nm ,激光光源功率 250 mW ,光谱采集范围 $250 \sim 2875 \text{ cm}^{-1}$ 。每个样品平行测定 3 次,并将采集的光谱计算平均值用于数据分析。

1.3 数据处理

图表处理主要采用Origin 8.0与Microsoft Excel软件。

2 结果与分析

2.1 五氯酚特征峰归属

五氯酚的SERS谱图如图1所示。五氯酚的主要组成部分苯环、C—Cl、C—O的拉曼频率主要集中在 $300 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$,其主要特征峰在图谱中清晰可见,具体归属: 341 cm^{-1} 处C—O弯曲振动和苯环变形振动; 381 cm^{-1} 处面外环弯曲振动; 486 cm^{-1} 处的C—O伸缩振动; 762 cm^{-1} 处的苯环变形振动和C—Cl伸缩振动, 1118 , 1277 cm^{-1} 处的苯环伸缩振动和C—H弯曲振动。上述谱峰均可作为定性鉴别五氯酚的特征谱峰。

2.2 拉曼检测条件的优化

2.2.1 纳米增强试剂的选择 试验比较了金溶胶、浓缩

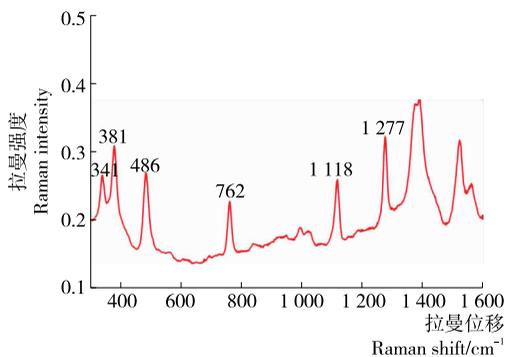


图 1 五氯酚的 SERS 光谱图

Figure 1 SERS spectra of pentachlorophenol

金溶胶及银溶胶对五氯酚的增强效果,图谱见图 2。结果表明,银溶胶的催化活性较弱,不足以产生拉曼增强效果。金溶胶的拉曼增强效果不佳,SERS 信号较弱。而使用浓缩金溶胶作为增强基底时,能得到很好的 SERS 图谱,五氯酚各个特征峰拉曼信号较强。因此,考虑增强效果与峰形规则性等因素,浓缩金纳米溶胶是五氯酚较为理想的纳米增强试剂。

2.2.2 纳米溶胶体积 SERS 技术的原理是待测分子与纳米基底表面产生一定的吸附作用,整个体系的极化率发生变化从而放大分子的拉曼信号,故待测物质与纳米基底之间的有效吸附直接影响到拉曼增强效应。分别选择加入量为 20, 50, 100, 200 μL 的增强基底浓缩金溶胶,对 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 五氯酚标准溶液进行拉曼光谱图检测。如图 3 所示,逐渐增加纳米粒子体积后,特征峰的强度呈现先增后减的趋势。纳米粒子的用量增加使得物质与纳米粒子结合更充分,拉曼响应信号有一定程度的增强,但当纳米粒子用量增加到一定程度后,SERS 信号反而减少,可能是由于金溶胶导致五氯酚表面形成过厚的包裹层,导致五氯酚中的电子跃迁概率降低,导致信号减弱。当纳米溶胶体积为 100 μL ,增强效果最明显,因此选取浓缩金溶胶的最佳体积为 100 μL 。

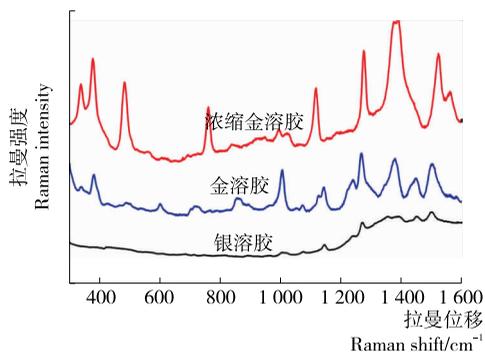


图 2 五氯酚纳米增强试剂优化拉曼光谱图

Figure 2 Raman spectra of pentachlorophenol in different colloidal nanoparticles

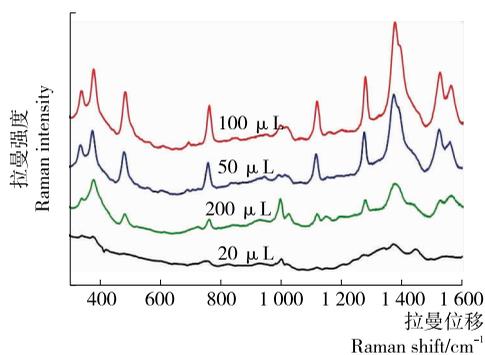


图 3 不同体积纳米溶胶对五氯酚拉曼光谱强度的影响

Figure 3 The intensity of Raman spectra of pentachlorophenol with various volumes of colloidal nanoparticles solution

2.2.3 促凝剂的优化 添加适量的无机盐作为促凝剂可以改变溶胶中纳米颗粒的分散状态,形成聚集体,进而产生更多的 SERS 热点,增强样品的拉曼信号强度。试验分别考察浓度均为 0.1 mol/L 的氯化钠、氯化钾、碘化钾、碳酸钠、碳酸钾、三氯化铁、硫酸镁、硫酸钾和氯化镁试剂作为促凝剂,检测浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的五氯酚标准溶液的 SERS 光谱图。检测时溶液中促凝剂的添加体积均为 20 μL ,在促凝剂加入 1 min 后采集 SERS 光谱以保证溶胶的促凝达到稳定状态。单个促凝剂优化的五氯酚拉曼光谱图如图 4(a) 所示,以 MgSO_4 作为溶胶促凝剂,拉曼光谱可观测到非常明显的拉曼特征峰,具有更好的 SERS 增强效果。同时,通过比较单一促凝剂和多种促凝剂组合的 SERS 增强效果,以 MgSO_4 和 Na_2CO_3 组合作为促凝剂,比单一其中一种促凝剂的增强效果均好,结果如图 4(b) 所示。因此选择 MgSO_4 和 Na_2CO_3 作为后续 SERS 分析中的促凝剂。

2.2.4 促凝剂用量的优化 适量的促凝剂能使纳米颗粒产生更多热点从而增强 SERS 信号,但当促凝剂过量时纳米颗粒会发生过度团聚,大大影响 SERS 效果。试验对 MgSO_4 和 Na_2CO_3 的用量对五氯酚 SERS 信号的影响进行对比研究,结果表明促凝剂 MgSO_4 和 Na_2CO_3 浓度均为 0.2 mol/L,体积为 20 μL 时,五氯酚 SERS 增强效果最优。

2.2.5 试剂加入顺序的优化 五氯酚与促凝剂的加入顺序对 SERS 信号有较大的影响。若先加入促凝剂后再加入待测样品,会导致金纳米粒子发生团聚,SERS 效果较差;而先将增强基底和分析物混合之后再加入 MgSO_4 和 Na_2CO_3 ,SERS 效果较好。因此,试剂的加入顺序为金纳米粒子、分析物、 MgSO_4 和 Na_2CO_3 。

2.2.6 pH 的影响 五氯酚电离程度、特征峰强度及吸附位置均受酸碱度差异的影响。为了得到最佳的表面增强拉曼效果,试验用不同浓度的硝酸调节五氯酚与金溶胶

的 pH,测量了不同 pH 条件下的表面增强拉曼光谱。如图 5 所示,当混合溶液的 pH 为 4 时,五氯酚的 SERS 信号明显优于其他 pH。由于 H^+ 的存在能中和金纳米粒子表面的负电荷($AuCl_4^-$ 和柠檬酸根),适宜的 pH 条件下纳米粒子会发生一定程度的团聚,有利于热点的产生,从而使得增强效果增加。pH 过低时,纳米粒子会过度团聚,降低增强效果;pH 过高时,纳米粒子表面的负离子没有完全中和,静电荷的“同性相斥”原理使得金属粒子间的距离太远,也会造成增强效果不佳。因此,pH=4 时五氯酚标准溶液的 SERS 检测效果最佳。

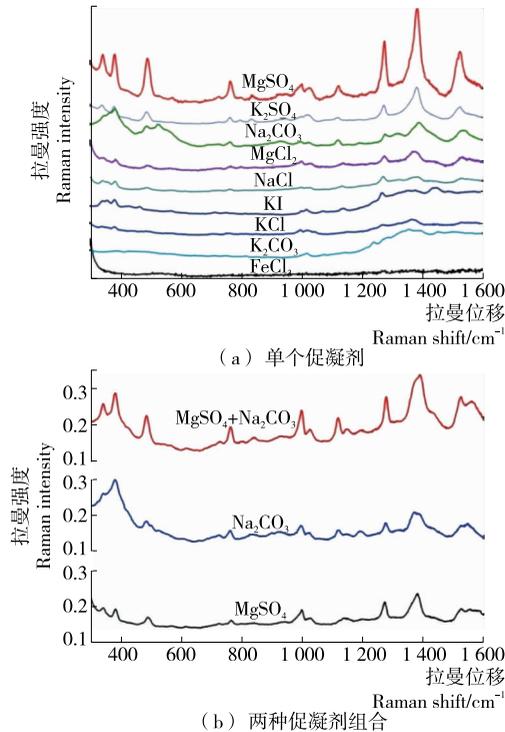


图 4 单个促凝剂和两种促凝剂组合对五氯酚测定的影响
Figure 4 Effects of different single coagulant and the combination of two coagulants on Raman spectra of pentachlorophenol

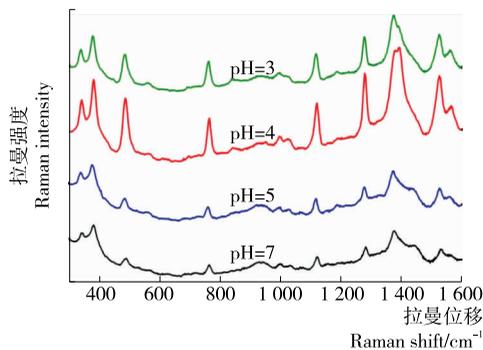


图 5 pH 值对 SERS 强度的影响
Figure 5 Effect of pH level on SERS intensity

2.2.7 吸附等待时间 设定五氯酚与增强基底浓缩金溶胶的吸附等待时间从 30 s 至 12 min,结果如图 6 所示。吸附等待时间从 30 s 至 12 min,五氯酚的 SERS 信号无明显差异,说明浓缩金溶胶与五氯酚标准液混合反应迅速,所产生的活性热点相对稳定,二者混合液有很好的化学稳定性。12 min 内的反应时间对测定基本无影响,均可测定。

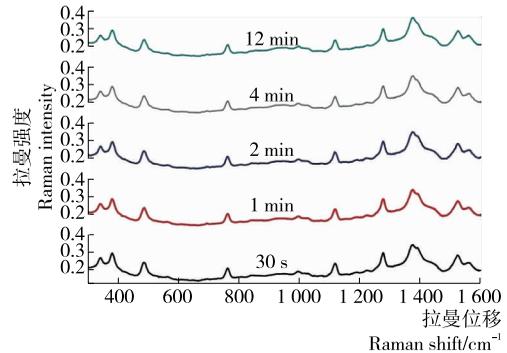


图 6 纳米溶胶在放置不同时间后对五氯酚增强效果对比图

Figure 6 Comparison of SERS spectra of pentachlorophenol in colloidal nanoparticles in different mixing time

2.3 方法学考察

2.3.1 定性分析

(1) 检出限:取空白养殖用水若干份,分别添加浓度为 0.0,0.1,0.2,0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 五氯酚标准品至空白样本中,按照分析步骤进行测定,每个浓度测定 6 次,观察检测结果,当五氯酚为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,拉曼检测结果均为阳性,最终确定五氯酚的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(2) 假阴性率和假阳性率:取空白养殖水若干,分别添加五氯酚标准溶液,分别制成添加水平为 0、最低检出限、2 倍最低检出限的样品各一式 20 份,按五氯酚前处理方法和分析步骤进行结果测定。检测结果显示,五氯酚中 20 份空白样本的检测结果为阴性的 20 个,阳性的 0 个,假阳性率为 0%;五氯酚中 40 份阳性添加浓度样本的检测结果为阳性的 39 个,阴性的 1 个,假阴性率为 2.5%。

(3) 特异性:五氯酚的特异性为 100%,符合食药监科便函[2017]43 号《食品快速检测方法评价技术规范》要求。

(4) 与现有方法一致性分析:将试验方法与基准方法 GB 23200.92—2016《食品安全国家标准 动物源性食品中五氯酚残留量的测定 液相色谱—质谱法》检测所得到的阳性结果比率相比较,这两种方法在 5% 置信区间内不存在统计学差异($\chi^2 < 3.84$);同时方法的灵敏度、特异性 > 95%、假阴性率和假阳性率 < 5%,均符合食药监科便函[2017]43 号《食品快速检测方法评价技术规范》的要求。

2.3.2 定量分析

(1) 标准曲线: 选取 486 cm^{-1} 处的特征峰作为分析对象, 取质量浓度分别为 $0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0\ \mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液, 在已优化的条件下, 以 486 cm^{-1} 处峰强度对相应的质量浓度作图, 绘制标准曲线, 并计算五氯酚线性回归方程及其相关系数, 结果见图 7。在 $0.2\sim 4.0\ \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 五氯酚线性方程为 $y=0.025\ 2x+0.010\ 3$, 线性关系良好, 相关系数 r 为 $0.992\ 8$ 。

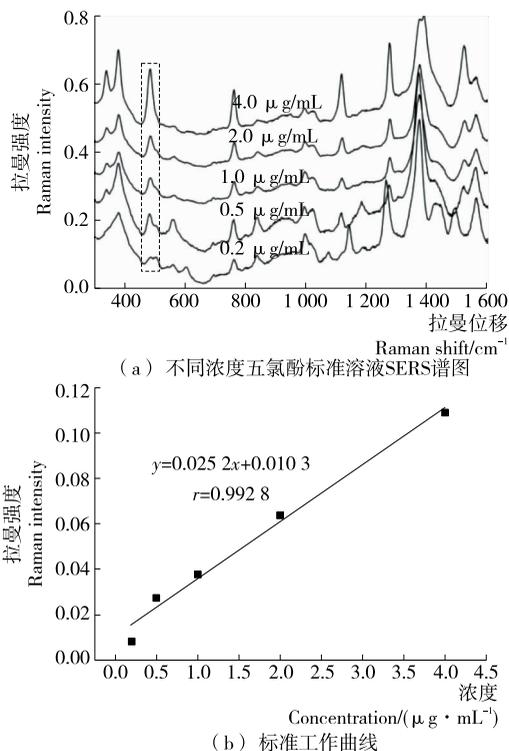


图 7 不同浓度五氯酚标准溶液 SERS 谱图及标准工作曲线

Figure 7 SERS spectra of pentachlorophenol in colloidal nanoparticles with different concentrations and the relationship between the Raman intensity and pentachlorophenol concentration

(2) 回收率及精密度试验: 以鱼和虾养殖水为代表基质, 进行添加回收和精密度试验。选取空白样品, 添加五氯酚标准品, 分别制成添加水平为 $0.5, 1.0, 2.0\ \mu\text{g/mL}$ 的样品各 6 份, 进行加标回收率试验, 计算平均回收率和相对标准偏差, 考察方法的准确度和精密度。由表 1 可见, 各添加水平的平均回收率为 $78.74\%\sim 112.30\%$, 精密度为 $6.1\%\sim 11.3\%$, 方法的准确度和精密度均满足残留分析的要求。

2.4 实际样品测定

为验证方法可行性, 收集各品种水产品养殖水, 包括虾类、鱼类、贝类等样品基质养殖用水共 60 批样品, 分别按照 SERS 拉曼法与确证方法 GB 23200.92—2016《食品

表 1 加标样品的回收率及其 RSD

Table 1 The recovery rate and RSD of pentachlorophenol ($n=6$)

添加水平/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	鱼养殖水		虾养殖水	
	回收率/ %	相对标准 偏差/%	回收率/ %	相对标准 偏差/%
0.5	78.74	11.3	111.80	9.5
1.0	82.51	8.4	101.40	6.1
2.0	112.30	7.7	96.42	8.2

安全国家标准 动物源性食品中五氯酚残留量的测定 液相色谱—质谱法》进行检测, 测定结果一致。

3 结论

基于 SERS 技术建立了养殖水样中五氯酚的快速检测方法。选取浓缩金溶胶为活性基底, 通过优化增强基底的加入量、pH、促凝剂的选择和加入顺序等拉曼增强条件, 以获得最佳的 SERS 信号。最佳试验条件下, 定性方法灵敏度和特异性 $\geq 95\%$, 假阴性率和假阳性率 $\leq 5\%$, 结果均符合食品快速检测方法评价技术规范。该方法不需复杂的前处理, 灵敏度和准确度高, 单个样品检测时间在 5 min 内, 所得结果令人满意, 较好地满足了现场快速检测的需求。该方法目前主要用于养殖水中五氯酚残留的快速检测, 后续可进行不同动物源样品中五氯酚残留量 SERS 检测的探索。

参考文献

[1] 何雄, 周静峰, 汤海青. 固相萃取—气相色谱—串联质谱法测定淡水鱼鱼肉中的五氯酚[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2 096-2 100.

[2] ZHENG Wei-wei, YU Huan, WANG Xia, et al. Systematic review of pentachlorophenol occurrence in the environment and in humans in China: Not a negligible health risk due to the re-emergence of schistosomiasis[J]. Environ Int, 2012 (42): 105-116.

[3] 周丽新, 陈晓红, 金米聪. 五氯酚对人体的毒性及防治研究进展[J]. 卫生研究, 2014, 43(2): 338-342.

[4] 孙秀梅, 胡红美, 钟志等. 水产品中五氯苯酚回收率影响因素的探讨[J]. 广州化工, 2013, 41(8): 75-77, 196.

[5] 陈春丽, 向洪锐, 戴星照, 等. 中国天然水体中五氯酚的浓度水平、管理及来源分析[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(6): 71-79.

[6] 蔡灏斌, 陈广银, 夏飞. 柱前衍生化—固相萃取—气相色谱法快速测定水中五氯酚[J]. 环境监控与预警, 2018, 10(5): 22-25.

[7] 欧天成, 郭艳芬, 陈少芳, 等. 高效液相色谱法同时测定水中挥发性酚(以苯酚计)、2,4,6-三氯酚、五氯酚[J]. 中国卫生工程学, 2018, 17(1): 55-57.

(下转第 157 页)