

基于表面增强拉曼光谱快速定量检测碳酸饮料中苯甲酸钠的方法

房晓倩, 彭彦昆, 李永玉, 王 凡, 卜晓朴, 赵 芳

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 利用实验室自行搭建的拉曼光谱检测系统, 确定了苯甲酸钠位于 843.5 cm^{-1} 、 1007 cm^{-1} 和 1605 cm^{-1} 处的 3 个拉曼特征峰; 以柠檬酸钠还原硝酸银配制的银溶胶作为表面增强剂, 设计了快速检测市售碳酸饮料中苯甲酸钠含量的方法。将 44 个苯甲酸钠浓度不同的碳酸饮料的原始光谱曲线进行 Savitzky-Golay 平滑降噪及基线背景扣除预处理, 然后随机分为 32 个校正集和 12 个验证集, 采用一元线性回归、多元线性回归、偏最小二乘回归、主成分回归和支持向量机回归等方法进行建模。结果表明, 以 843.5 cm^{-1} 、 1605 cm^{-1} 处的 2 个特征峰建立的二元线性回归模型的建模结果最好, 验证集相关系数为 0.9603, 验证集的均方根误差为 0.0867×10^{-3} 。该二元线性回归模型可以实现市售碳酸饮料中苯甲酸钠的快速定量检测, 为食品中的苯甲酸钠含量的实时在线检测提供了技术支撑。

关键词 光谱学; 表面增强拉曼光谱; 快速检测; 银溶胶; 碳酸饮料; 苯甲酸钠

中图分类号 O657.37 文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201737.0930001

Rapid and Quantitative Detection Method of Sodium Benzoate in Carbonated Beverage Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Fang Xiaoqian, Peng Yankun, Li Yongyu, Wang Fan, Bu Xiaopu, Zhao Fang

National Research and Development Center for Agro-Processing Equipment, College of Engineering,

China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract Three Raman characteristic peaks of sodium benzoate located in 843.5 cm^{-1} , 1007 cm^{-1} and 1605 cm^{-1} are identified by using self-built Raman spectroscopy detection system. Using silver colloidal prepared by reduction of silver nitrate with sodium citrate as surface enhancer, we develop a rapid detection method for sodium benzoate in commercial carbonated beverage. The surface enhanced Raman spectra of 44 carbonated beverage samples with different sodium benzoate concentrations are randomly divided into 32 calibration sets and 12 validation sets, and all Raman spectra are carried out the pretreatments of Savitzky-Golay smoothing and baseline removal of fluorescence background. Simple linear regression analysis method, multiple linear regression analysis method, partial least squares regression analysis method, principal component regression analysis method and support vector machine regression analysis method are used to build models. The results show that the optimal model is binary linear regression analysis model based on the sodium benzoate characteristic peaks at Raman shift of 843.5 cm^{-1} and 1605 cm^{-1} . In the binary linear regression model, correlation coefficient of validation set is 0.9603, root mean square error of validation set is 0.0867×10^{-3} . The rapid and quantitative detection of sodium benzoate in commercial carbonated beverages can be realized by the binary linear regression analysis model, and this provides technical support for the real-time online detection of the content of sodium benzoate in food.

Key words spectroscopy; surface-enhanced Raman spectroscopy; rapid detection; silver colloid; carbonated beverage; sodium benzoate

OCIS codes 300.6450; 170.5660; 330.1880

收稿日期: 2017-03-25; 收到修改稿日期: 2017-04-07

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2017GX001)

作者简介: 房晓倩(1992—), 女, 硕士研究生, 主要从事拉曼光谱方面的研究。E-mail: fxiaoqian0213@163.com

导师简介: 李永玉(1971—), 女, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事农畜产品光学无损快速检测方面的研究。

E-mail: yyli@cau.edu.cn(通信联系人)

1 引 言

目前,我国批准在食品中使用的防腐剂有十几种,其中的苯甲酸钠是最常用的防腐剂之一^[1]。苯甲酸钠的毒性较大,在许多国家已被禁止使用,但其价格便宜,在我国仍作为添加剂广泛用于各类食品中。我国食品添加剂使用标准(GB 2760—2014)规定苯甲酸钠在碳酸饮料中的最大含量为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在安全剂量范围内的苯甲酸钠并不会对人体健康造成危害,但过量的苯甲酸钠可在胃酸作用下转化为毒性较强的苯甲酸,从而对肝脏产生较大危害^[2]。近年来,部分不法商家为了延长食品的保质期而滥用苯甲酸钠的报道屡见不鲜。目前,苯甲酸钠的主要检测方法有紫外分光光度法^[2-3]、高效液相色谱法^[4]和气相色谱法^[5]等,这些方法均具有较低的检测限,但操作过程复杂,耗时长,需要专业人员进行操作,很难应用于实时在线检测。近几年,出现了一些关于表面增强拉曼光谱(SERS)在食品添加剂检测方面的研究报道^[6-10]。如:Lin等^[9]以聚集的银溶胶作为表面增强活性基底,对牛奶中的硫氰酸钠进行了检测;Buyukgoz等^[10]检测了矿泉水中阿斯巴甜的浓度。但目前还未见基于拉曼光谱对苯甲酸钠进行检测的研究报道,因此,本文借助实验室自行搭建的拉曼光谱检测系统,以市售碳酸饮料为研究对象,以柠檬酸钠还原硝酸银配制的银溶胶作为表面增强剂,建立了碳酸饮料中苯甲酸钠含量的预测模型,为饮料中苯甲酸钠含量的实时在线检测提供技术支撑。

2 材料与amp;方法

2.1 实验材料

实验材料主要包括苯甲酸钠标准品、硝酸银、柠檬酸钠和碳酸饮料。苯甲酸钠标准品的纯度不低于99%,购于青岛优索化学科技有限公司,用于确定苯甲酸钠拉曼特征峰位移及不同浓度待测样品的配制。硝酸银为分析纯,购于广东光华科技股份有限公司。柠檬酸钠为分析纯,购于北京化工厂。硝酸银和柠檬酸钠用于制备银溶胶。碳酸饮料(可乐型)购置于北京美廉美超市,其主要成分为水、食用香精;其中的添加剂主要包括苯甲酸钠、二氧化碳、焦糖色、磷酸、阿斯巴甜、安赛蜜、柠檬酸钠、咖啡因和蔗糖素。

2.2 实验仪器

借助实验室自行搭建的拉曼光谱检测系统^[11]采集样品的拉曼光谱信息。该系统的主要结构包括785 nm激光器、拉曼探针、光纤、CCD相机、三维平移台和计算机,该系统的有效光谱范围为 $0 \sim 2400 \text{ cm}^{-1}$ 。

此外,实验仪器还包括TDZ5-WS型台式低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司)、ME 204 102型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)和88-1型大功率磁力搅拌器(常州国华电器有限公司)。

2.3 实验方法

样品的配制:先用高效液相色谱法测定碳酸饮料中苯甲酸钠的含量,然后将苯甲酸钠标准品溶于碳酸饮料中,配制出44个苯甲酸钠含量不同的饮料样品,样品中苯甲酸钠的质量分数范围为 $0.0510 \times 10^{-3} \sim 1.5000 \times 10^{-3}$ 。配制过程中为避免 CO_2 气泡对样品体积的影响,需将饮料倒入50 mL离心管中敞口静置30 min。

银溶胶的配制:根据Lee等^[12]的经典银溶胶制备方法,首先制备浓度为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸银溶液和质量分数为1%的柠檬酸钠水溶液。在持续搅拌状态下,将硝酸银溶液加热至沸腾,按照硝酸银与柠檬酸钠水溶液体积比为40:1的比例,向硝酸银溶液中缓慢滴加柠檬酸钠水溶液,持续加热搅拌1 h左右^[13]。然后将混合溶液置于转速为 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的离心机中,离心处理约30 min,弃去上清液即可得到纳米银溶胶,然后将其置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱中避光存放。

光谱采集及预处理:吸取 $2.5 \text{ } \mu\text{L}$ 待测样品滴在铝箔纸上,然后再将 $2.5 \text{ } \mu\text{L}$ 的银溶胶滴在待测样品上,静置2 s(对样品进行增强处理);在激光功率为450 mW、曝光时间为3 s、样品与探头距离为7.5 mm的条件下,利用CCD相机自带的软件采集拉曼光谱。每个样品重复采集3次,将3次的平均光谱作为该样品的原始拉曼光谱。采用Matlab 7.10.0(R2010a)及其附带的PLS数据库对拉曼光谱曲线进行Savitzky-Golay(5点, Polynomial order 1)平滑降噪、基线背景扣除处理(Automatic Whittaker filter, Lambda 1, P 0.001)以及建模分析。

3 结果与讨论

3.1 苯甲酸钠拉曼特征峰的确定

苯甲酸钠的分子式为 $C_7H_5NaO_2$, 其分子结构主要由苯基和羧基组成。苯甲酸钠标准品的拉曼光谱曲线如图 1 所示。苯甲酸钠在整个波段范围内的拉曼信号较丰富, 在 $851.4, 1012, 1610\text{ cm}^{-1}$ 处均出现了明显的拉曼特征峰, 它们分别对应着苯基和羧基相连的 C—C 键的伸缩振动、环“呼吸”振动和苯的简并环伸缩振动^[14-15]。由图 1 还可以看出, 因苯甲酸钠与银溶胶间的相互作用, 表面增强后的样品中苯甲酸钠的拉曼特征峰出现了较小的偏移^[16], 但在 $843.5, 1007, 1605\text{ cm}^{-1}$ 处仍可观察到明显的苯甲酸钠的拉曼特征峰。

由图 2 可见: 不同浓度的苯甲酸钠饮料样品在 $843.5, 1007, 1605\text{ cm}^{-1}$ 处都出现了十分清晰的特征峰; 随着苯甲酸钠浓度的降低, 拉曼特征位移处的峰强度也呈递减的趋势, 说明苯甲酸钠的浓度与其拉曼特征峰信号强度之间存在明显的相关性。因此, 将 $843.5, 1007, 1605\text{ cm}^{-1}$ 处的 3 个拉曼峰强作为碳酸饮料中苯甲酸钠的拉曼特征峰用于建模分析。

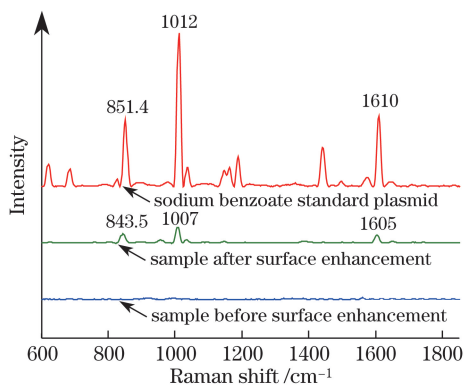


图 1 苯甲酸钠标准品及表面增强前后饮料样品的拉曼光谱
Fig. 1 Raman spectra of sodium benzoate standard plasmid and beverage samples before and after surface enhancement treatment

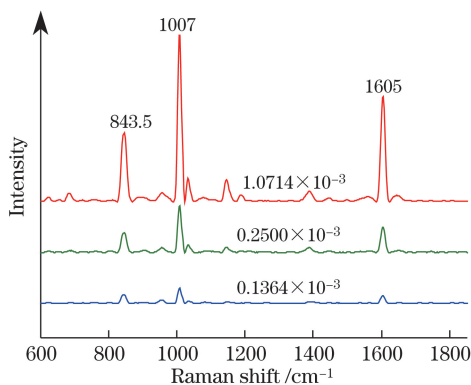


图 2 不同浓度苯甲酸钠饮料样品的表面增强拉曼光谱
Fig. 2 Surface-enhanced Raman spectra of beverage samples with different sodium benzoate concentrations

3.2 表面增强拉曼特征峰的稳定性

配制了 9 个苯甲酸钠浓度不同的饮料样品, 每个样品分别采集 5 次拉曼光谱, 分析 $843.5, 1007, 1605\text{ cm}^{-1}$ 拉曼特征位移处的峰强稳定性。由图 3 可见, 与苯甲酸钠浓度较高的饮料样品相比, 苯甲酸钠浓度较低的饮料样品的 3 个拉曼特征峰强的相对标准偏差均有所增加, 但平均相对标准偏差均小于 10%, 分别为 6.80%、9.35%、9.15%。饮料样品中苯甲酸钠的质量分数范围为 $0.0510 \times 10^{-3} \sim 1.5000 \times 10^{-3}$, 覆盖了 GB 2760—2014 规定的碳酸饮料中苯甲酸钠的检测限, 所有饮料样品的拉曼特征峰强的平均相对标准偏差为 8.43%, 表现出了较好的重复性及稳定性^[17]。

3.3 碳酸饮料中苯甲酸钠的定量预测模型

经 Savitzky-Golay 平滑降噪及 Baseline 基线扣除预处理后的 44 个苯甲酸钠浓度不同的饮料样品的原始拉曼光谱如图 4 所示。将 44 个样品分为 32 个校正集和 12 个验证集, 分别采用一元线性回归、多元线性回归、偏最小二乘回归、主成分回归和支持向量机回归分析方法建模。

采用一元线性回归、多元线性回归分析方法对 $843.5\text{ cm}^{-1}, 1007\text{ cm}^{-1}, 1605\text{ cm}^{-1}$ 处的苯甲酸钠拉曼特征峰进行建模, 建模结果如表 1 所示。表中数据为利用 SPSS Statistics 17.0 软件进行的单因素方差分析结果, 同列相同小写字母表示在置信度为 0.05 的水平下不存在显著性差异。结果显示: 1007 cm^{-1} 特征峰处的一元线性回归建模结果显著优于其他特征峰处的建模结果; 843.5 cm^{-1} 和 1605 cm^{-1} 特征峰处的二元线性回归建模结果优于其他特征峰处的多元线性建模结果, 它们的校正集相关系数 (R_c^2)、校正集均方根误差 (RMSEC)、验证集相关系数 (R_v^2) 以及验证集均方根误差 (RMSEP) 等均有显著性差异。此外, 表 1 中的 RSD 为相对标准偏差, RPD 为相对分析误差。

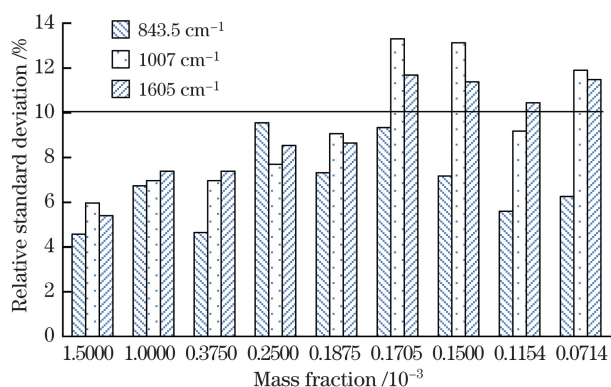


图 3 不同浓度苯甲酸钠饮料样品在 3 个特征位移处峰强的相对标准偏差

Fig. 3 Relative standard deviation of peak intensity of beverage samples with different sodium benzoate concentrations at three characteristic Raman shifts

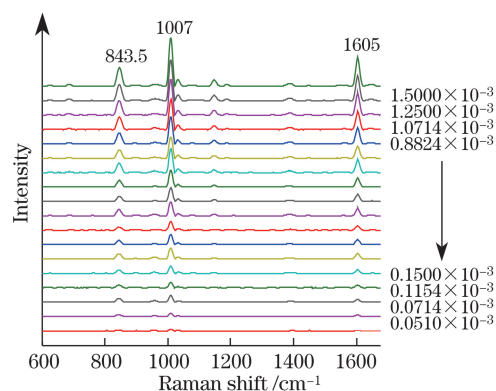


图 4 不同浓度苯甲酸钠饮料样品的表面增强拉曼光谱

Fig. 4 Surface-enhanced Raman spectra of beverage samples with different sodium benzoate concentrations

表 1 线性回归分析方法的建模结果

Table 1 Modeling results of linear regression analysis methods

Modeling method	Raman shift /cm ⁻¹	R _c ²	RMSEC /10 ⁻³	R _p ²	RMSEP /10 ⁻³	RSD /%	RPD
Simple linear regression analysis method	1007	0.9730 ^a	0.0697 ^c	0.9574 ^a	0.0964 ^b	16.13 ^b	4.49 ^a
	1605	0.9678 ^b	0.0761 ^b	0.9530 ^b	0.1017 ^a	17.02 ^a	4.25 ^a
	843.5	0.9630 ^b	0.0817 ^a	0.9560 ^a	0.0964 ^b	16.14 ^b	4.48 ^a
Multiple linear regression analysis method	1007,1605	0.9730 ^a	0.0721 ^b	0.9574 ^c	0.0921 ^b	15.01 ^b	4.53 ^a
	843.5,1007	0.9713 ^b	0.0719 ^b	0.9593 ^b	0.0922 ^b	16.36 ^a	4.71 ^a
	843.5,1605	0.9769 ^a	0.0655 ^c	0.9603 ^a	0.0867 ^c	14.46 ^c	4.78 ^a
	843.5,1007,1605	0.9681 ^c	0.0781 ^a	0.9566 ^c	0.0946 ^a	14.74 ^c	4.08 ^b

将筛选出的 1007 cm⁻¹处的一元线性回归分析结果和 843.5 cm⁻¹、1605 cm⁻¹处的二元线性回归分析结果,以及偏最小二乘回归、主成分回归、支持向量机回归分析结果进行比较分析,结果如表 2 所示。表中数据为 SPSS Statistics 17.0 软件进行的单因素方差分析结果,同列相同小写字母表示在置信度为 0.05 的水平下不存在显著性差异。由表 2 可见,支持向量机回归分析预测模型的 R_c² 为 0.9957,与 843.5 cm⁻¹、1605 cm⁻¹处二元线性回归预测模型的 R_c² 具有显著性差异,但两者的 R_p² 并不存在显著性差异,二元线性回归预测模型的 RMSEP 及 RSD 等指标均显著优于支持向量机回归分析预测模型的相应指标。碳酸饮料中苯甲酸钠的最佳预测模型为在 843.5 cm⁻¹和 1605 cm⁻¹处的二元线性回归预测模型,如图 5 所示。模型公式为 Y=0.088029-0.000162X₁+0.000283X₂,其中的 X₁和 X₂分别为苯甲酸钠拉曼特征位移在 843.5 cm⁻¹和 1605 cm⁻¹处的峰强,Y为苯甲酸钠浓度的预测值。结果表明,以银溶胶作为表面增强剂,基于拉曼光谱可以实现市售碳酸饮料中苯甲酸钠的定量检测。

表 2 不同建模方法建模结果的比较

Table 2 Comparison on modeling results of different modeling methods

Modeling method	Raman shift /cm ⁻¹	R _c ²	RMSEC /10 ⁻³	R _p ²	RMSEP /10 ⁻³	RSD /%	RPD
Simple linear regression analysis method	1007	0.9730 ^c	0.0697 ^b	0.9574 ^b	0.0964 ^b	16.13 ^b	4.49 ^a
Multiple linear regression analysis method	843.5,1605	0.9769 ^b	0.0655 ^c	0.9603 ^a	0.0867 ^c	14.46 ^d	4.78 ^a
Partial least squares regression analysis method	650.87-1650.67	0.9703 ^c	0.0743 ^a	0.9431 ^c	0.1024 ^a	17.65 ^a	4.06 ^b
Principal component regression analysis method	650.87-1650.67	0.9712 ^c	0.0720 ^a	0.9408 ^c	0.1085 ^a	17.26 ^a	3.95 ^b
Support vector machine analysis method	650.87-1650.67	0.9957 ^a	0.0294 ^d	0.9593 ^{ab}	0.0932 ^b	15.62 ^c	4.65 ^a

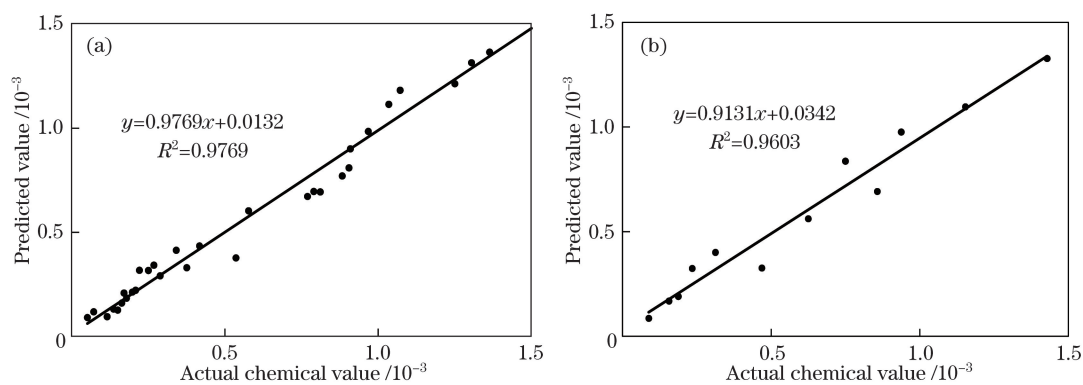


图5 饮料样品中苯甲酸钠质量分数的最佳预测结果。(a)校正集;(b)验证集

Fig. 5 Optimum prediction results of mass fraction of sodium benzoate in beverage samples.

(a) calibration set; (b) validation set

4 结 论

以市售碳酸饮料为研究对象,以柠檬酸钠还原硝酸银配制的银溶胶作为表面增强剂,采用实验室自行搭建的拉曼光谱检测系统对市售碳酸饮料中的苯甲酸钠进行了检测。结果表明,苯甲酸钠在 843.5 cm^{-1} 和 1605 cm^{-1} 处的 2 个特征峰建立的二元线性回归模型的建模结果最好,校正集相关系数为 0.9769,验证集相关系数为 0.9603,校正集的均方根误差为 0.0655×10^{-3} ,验证集的均方根误差为 0.0867×10^{-3} 。该二元线性回归模型可为食品中苯甲酸钠的实时在线检测提供技术支撑,同时为多种添加剂的同时在线检测奠定了基础,这对食品添加剂的检测和监控具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Wang Li, Zhang Yu, Chen Cuilan. Application and trend of development on food preservations in China[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2011, 2(2): 83-87.
王 丽, 张 毓, 陈翠岚. 我国食品防腐剂的应用及发展趋势[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2(2): 83-87.
- [2] 谢良汉. 紫外分光光度法测定碳酸饮料中苯甲酸钠含量的实验条件探索[J]. 化工管理, 2014(29): 103.
- [3] 黄 嫔. 紫外可见分光光度法测定碳酸饮料中苯甲酸钠的含量[J]. 科技创新导报, 2014(31): 112.
- [4] Mazdeh F Z, Moradi Z, Moghaddam G, *et al.* Determination of synthetic food colors, caffeine, sodium benzoate and potassium sorbate in sports drinks[J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2016, 15(1): 183-188.
- [5] Gan Pingsheng, Huang Cong, Yu Hong, *et al.* Determining benzoic acid in powdered milk by GC-MS[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(1): 75-76.
甘平胜, 黄 聪, 于 鸿, 等. 气相色谱-质谱联用法测定奶粉中苯甲酸(钠)含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 75-76.
- [6] Liu Anqi, Li Gongke, Hu Yuling. Research progress of surface enhanced Raman spectroscopy in the rapid analysis of food additives[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(6): 2214-2223.
刘安琪, 李攻科, 胡玉玲. 表面增强拉曼光谱快速检测食品添加剂的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2214-2223.
- [7] Yan Kuanglin, Xiao Xiaohua, Li Gongke. Application of surface enhanced Raman spectroscopy in food safety analysis[J]. Chemistry, 2014, 77(5): 388-395.
严矿林, 肖小华, 李攻科. 表面增强拉曼光谱在食品安全分析中的应用[J]. 化学通报, 2014, 77(5): 388-395.
- [8] Zhang Zongmian, Liu Rui, Xu Dunming, *et al.* *In situ* detection of acid orange II in food based on shell-isolated Au@SiO₂ nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy[J]. Acta Chimica Sinica, 2012, 70(16): 1686-1689.
张宗绵, 刘 睿, 徐敦明, 等. Au@SiO₂ 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.
- [9] Lin X, Hasi W L J, Lou X T, *et al.* Rapid and simple detection of sodium thiocyanate in milk using surface-enhanced Raman spectroscopy based on silver aggregates[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2014, 45(2): 162-167.
- [10] Buyukgoz G G, Bozkurt A G, Akgul N B, *et al.* Spectroscopic detection of aspartame in soft drinks by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. European Food Research & Technology, 2015, 240(3): 567-575.

- [11] Dhakal S, Li Y Y, Peng Y K, *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.
- [12] Lee P C, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1982, 86(17): 3391-3395.
- [13] Liu Gang, Xing Da, Wang Haimin, *et al.* Study of protein in human gallstones by Fourier transform infrared spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2002, 22(4): 441-446.
刘 刚, 邢 达, 王海珉, 等. 胆结石中蛋白质的傅里叶变换红外光谱和表面增强拉曼光谱研究[J]. *光学学报*, 2002, 22(4): 441-446.
- [14] Zhu Ziyang, Gu Ren'ao, Lu Tianhong. Application of Raman spectroscopy in chemistry[M]. Shenyang: Northeastern University Press, 1998: 295-301.
朱自莹, 顾仁敖, 陆天虹. 拉曼光谱在化学中的应用[M]. 沈阳: 东北大学出版社, 1998: 295-301.
- [15] Wang Xiaobin, Huang Wenqian, Wang Qingyan, *et al.* Analysis of benzoic acid by Raman hyperspectral imaging[J]. *Food Science*, 2017, 38(4): 290-295.
王晓彬, 黄文倩, 王庆艳, 等. 苯甲酸添加剂的拉曼高光谱分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(4): 290-295.
- [16] Ding Songyuan, Wu Deyin, Yang Zhilin, *et al.* Some progresses in mechanistic studies on surface-enhanced Raman scattering[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2008, 29(12): 2569-2581.
丁松园, 吴德印, 杨志林, 等. 表面增强拉曼散射增强机理的部分研究进展[J]. *高等学校化学学报*, 2008, 29(12): 2569-2581.
- [17] Zhang L, Wang B, Zhu G, *et al.* Synthesis of silver nanowires as a SERS substrate for the detection of pesticide thiram[J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2014, 133: 411-416.