

文章编号: 0258-7025(2009)10-2657-05

二维纳米结构银膜表面增强拉曼散射基底的制备与研究

刘仁明¹ 自兴发¹ 武延春² 康颐璞³ 向文丽¹ 司民真^{1*}

(¹ 楚雄师范学院光谱技术应用研究所, 云南 楚雄 675000; ² 楚雄彝族自治州人民医院, 云南 楚雄 675000)
³ 云南师范大学物理与电子科学系, 云南 昆明 650092)

摘要 采用电解法制备了粒径分布为(50±8) nm, 表面呈正电性的纳米银粒子。基于该纳米银粒子, 采用静电自组装技术在经过特殊处理、表面呈负电性的玻璃基底上生成了具有高效、稳定性的二维纳米结构银膜。该银膜外层纳米银粒子平均粒径约 200 nm, 相邻纳米银粒子之间形成了不规则的纳米微区, 平均尺寸达到 200 nm 左右。基于该纳米银膜, 采用便携式拉曼光谱仪对 20 个正常人血清样本进行了表面增强拉曼散射(SERS)光谱的检测。同时, 也对同一正常人血清基于同种条件下制备的不同纳米银膜的 SERS 光谱进行了检测。实验发现: 该纳米银膜对人血清的拉曼散射具有较好的增强效果, 有望为人血清的研究提供新的途径。

关键词 光谱学; 纳米银膜; 自组装; 表面增强拉曼散射; 人血清

中图分类号 O657.3 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2657

Studies and Preparation of Surface Enhanced Raman Scattering Substrate of Two-Dimensional Silver Nanofilms

Liu Renming¹ Zi Xingfa¹ Wu Yanchun² Kang Yipu³ Xiang Wenli¹ Si Minzhen^{1*}

¹ Application Institute of Spectroscopy Technology, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000, China

² The People's Hospital of Chuxiong, Chuxiong, Yunnan 675000, China;

³ Department of Physics and Electronics, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650092, China

Abstract The fabrication of silver nanoarchitectures (Ag nanofilms) on glass substrates by using a low-cost electrochemical strategy at a proper voltage and polyvinyl alcohol concentration in electrolyte is reported. Ag nanofilms are grown and built with nanoblocks of two-dimensional spherelike nanostructures, which show a highly active and stable surface enhanced Raman scattering (SERS) effect. It shows that the average particle size of silver nanoparticles on the surface of the Ag nanofilms is about 200 nm, and the average size of the nanoblocks is also about 200 nm. The SERS spectra of the human sera for 20 healthy donors were studied on a portable Raman spectrometer, meanwhile, SERS spectra of the serum for the same person was also detected based on different Ag nanofilms prepared with the same conditions. The results show that the SERS effect of human serum is perfect based on the SERS substrate, which will provide a potential tool for analyzing human serum.

Key words spectroscopy; Ag nanofilm; self-assembly; surface enhanced Raman scattering; human serum

1 引 言

生物体液中包括血液、尿液、淋巴和唾液等, 能够对人体的健康状况提供丰富的信息, 同时体液检测也是目前临床上常用的一种疾病诊断手段。每年全世界范围内约有 6 亿人次进行血液中胆固醇含量的检测来诊断心血管疾病; 超过 1 亿人次的糖尿病患者进

行血液中葡萄糖水平的检查^[1]。采用的方法主要是利用高压液相色谱、电泳等手段^[2]。该方法所用仪器价格昂贵, 耗费时间, 且用过的样品不能再用于其他检测。Raman 光谱法简便、快速、灵敏、无损^[3,4], 在生命科学领域有很大的应用潜力^[5], 但存在的问题是由于血清等体液具有较强的自体荧光, 很难得到 Raman

收稿日期: 2009-05-09; 收到修改稿日期: 2009-06-11

基金项目: 国家自然科学基金(10864001)和云南省科技厅(2008ZC159M)资助课题。

作者简介: 刘仁明(1979—)男, 硕士, 助教, 主要从事光散射及纳米材料等方面的研究。E-mail: liurenmingok@126.com

* 通信联系人。E-mail: siminzhen@hotmail.com

信号,或者得到很弱的 Raman 信号^[6~8],所以国内外对血清等体液的 Raman 光谱研究相对较少。表面增强拉曼散射(SERS)以其独特的增强效应和淬灭荧光性则有望在该领域得到很好的应用。本课题组在原有的研究基础^[9]上经过探索,初步找到了对人血清具有较好的增强效果的新型 SERS 基底。本文利用便携式 Raman 光谱仪对 20 个正常人的血清进行了 SERS 光谱的初步研究,发现该二维纳米银膜对人血清拉曼散射具有较好的增强效应。

2 实 验

2.1 仪器与样品

仪器:小型台式离心机 TGL216G,紫外-可见吸收光谱仪(UV-3101,日本岛津公司),电子扫描显微镜(S-505,荷兰飞利浦公司);电子透射显微镜(H-606,日本日立公司),便携式拉曼光谱仪(R-3000TM,美国海洋光学公司)。

人血清:20 个健康人血清样本均采集于楚雄彝族自治州人民医院。

化学试剂(质量分数):硝酸银(99.8%),浓硫酸(98%),聚乙烯醇(95%),银电极(99.9%),双氧水(30%),载玻片,氨水(28%),去离子水(18.0 M Ω ·cm)。

2.2 实验方法

2.2.1 正电性胶态纳米银粒子的制备和表征

参照课题组前期有关正电性胶态纳米银粒子的制备方法^[9],采用电解法在 30 V 直流电压下电解 200 mL 含有 20 mg 硝酸银和 100 mg 聚乙烯醇的电解液 1 h,Ag⁺在阴极附近获得电子而大量析出,作为分散剂的聚乙烯醇可以有效地覆盖在所生成的纳米银粒子表面抑制其大量凝聚,使其均匀分散。根据电泳实验可以知道所制取的纳米银粒子表面呈现正电性。避光静置,待其稳定后利用紫外-可见吸收光谱仪测出该胶态银纳米粒子的吸收光谱,同时应用电子透射显微镜(TEM)对银纳米粒子的形貌进行表征。

2.2.2 纳米银自组装膜的制备和表征

将玻璃载玻片基底分别在乙醇、丙酮、去离子水中分别超声洗涤 30 min,高纯 N₂ 氛围中干燥后,在 70 ℃ Piranha 液 [$w(\text{H}_2\text{SO}_4) = 98\%$, $w(\text{H}_2\text{O}_2) = 30\%$,它们的体积比为 7:3]中浸泡 1 h,在高纯 N₂ 中干燥后再次浸入质量分数为 30%的 H₂O₂,质量分数为 28%的 NH₃和去离子水混合液(它们的体积比为 1:1:5)中 12 h,高纯 N₂ 中干燥。由于玻璃表面主要成份是硅酸盐,在碱性条件下处理后,其表

面呈现—O—Si—O—,呈负电性;同时,玻璃基底表面由于受到混合液中活性氧离子等负电性离子的修饰,最后在化学性质稳定的 N₂ 中干燥也不会清除其表面吸附的活性负离子。最终致使玻璃板表面呈现负电性。然后将表面呈负电性的玻璃基底浸入上述利用电解法所制得的正电性纳米银胶中进行静电自组装 12 h,便在玻璃基底上生成纳米银膜,然后用电子扫描显微镜(SEM)对其进行形貌表征。

2.2.3 人血清 SERS 光谱的测定

采用便携式拉曼光谱仪 R-3000TM(美国海洋光学公司)对人血清的 SERS 谱进行检测,激光波长 785 nm,垂直照射在样品上的激光功率密度 $J = 10^3 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$,扫描积分时间设置为 16 s。20 个健康人血清样本均由楚雄州人民医院提供。将血清与去离子水按体积比 1:1 混合后分别取出 200 μL 均匀地涂在玻璃基底及所制备银膜上,自然干燥;同时,将人血清 200 μL 加入 2.8 mL 浓度为 10^{-1} mol/L KBr 的纳米银胶中,充分混合 5 min,然后进行 SERS 光谱的测定。

3 结果与讨论

利用电解法所制得的胶态纳米银粒子,其 TEM 形貌图和紫外-可见吸收光谱如图 1(a)和(b)所示。

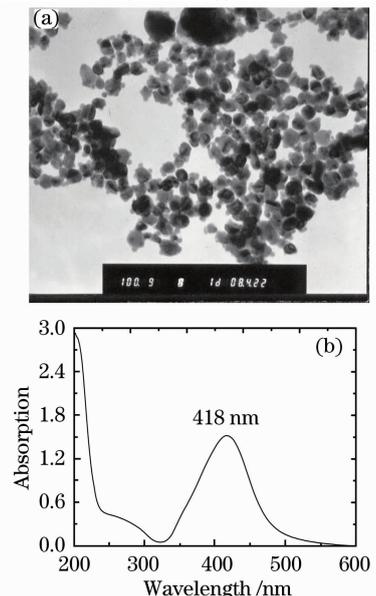


图 1 利用电解法制得的胶态纳米银粒子的 TEM 形貌图(a)及其紫外吸收光谱(b)

Fig. 1 Representative transmission electron microscope (TEM) image (a) and UV-vis absorption spectrum (b) of the colloidal Ag nanoparticles obtained by the method of electrolysis

从粒子的 TEM 形貌图中可以看出该胶态纳米银粒子的粒径分布约为 (50 ± 8) nm, 大部分纳米粒子粒径分布比较均匀, 且呈现出圆球形形貌, 但也存在个别纳米粒子的聚集体; 从该胶态纳米银粒子的紫外-可见吸收光谱中可以看到, 其共振吸收峰位于 418 nm 附近。

利用静电自组装技术在玻璃基底上所制得的二维纳米银膜的表面形貌如图 2 所示。

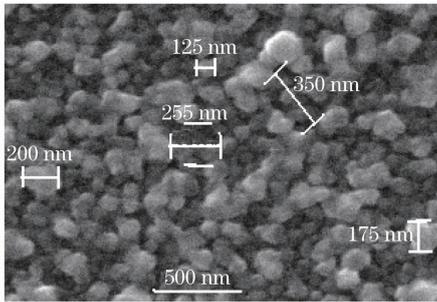


图 2 利用静电自组装技术所制得的二维纳米银膜的 SEM 形貌图

Fig. 2 Scanning electron micrograph (SEM) image of Ag nanofilms

可以看出银膜表面的纳米粒子的平均粒径约 200 nm, 同时相邻的纳米银粒子间形成了大小不一的纳米微区, 其平均大小达到 200 nm。这些相邻的纳米粒子之间形成所谓的“活性纳米结 (hot nanojunctions)”^[10], 处于这些紧密相邻的纳米银粒子之间的电磁场可以得到巨大的增强, 增强因子可达到 $10^{14} \sim 10^{15}$ ^[11]。图 3 中展示了人血清分别基于玻璃基底、加入 10^{-1} mol/L KBr 的纳米银胶以及二维纳米银膜的拉曼光谱。可以看到, 在玻璃基底上几乎得不到人血清的任何拉曼信号。当把人血清加

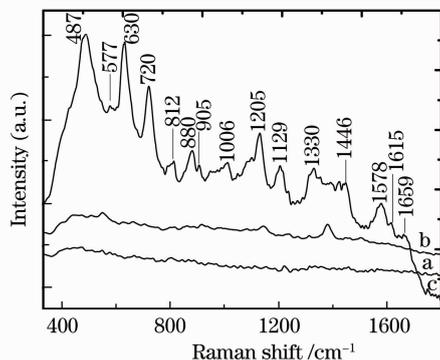


图 3 人血清分别基于玻璃基底 a, 胶态纳米银粒子 b, 二维纳米结构银膜 c 的拉曼散射光谱

Fig. 3 SERS spectra of human serum based on glass substrate a, colloidal Ag nanoparticles b, and Ag nanofilms c, respectively

入适量的正电性纳米银胶中, 即使加入了 KBr 作为凝聚剂, 其拉曼信号依然很微弱, 增强效应不明显。一方面, 这与人血清中生物大分子本身的强荧光性有关; 同时, 由于血清中含有多种蛋白大分子组分, 这些生物大分子由于其巨大的分子量和体积, 一般很难吸附到胶态银胶纳米粒子上。因此, 一般的胶态银胶纳米粒子对生物大分子的 SERS 增强效应不明显。因此探寻具有高效、生物兼容性的 SERS 基底也是国内外的研究热点之一^[12]。本文中所制得的二维纳米结构银膜是一种对人血清具有较好 SERS 效应的基底, 图 3 中曲线 c 是基于该纳米银膜的人血清 SERS 光谱, 可以看出该纳米银膜对人血清拉曼信号的增强是显著的。图 4 展示了同一健康人血清分别基于相同条件下所制备的不同纳米银膜上的 SERS 光谱, 可以看出银膜间的重复性比较好, 相同条件下所制备的不同纳米银膜间对人血

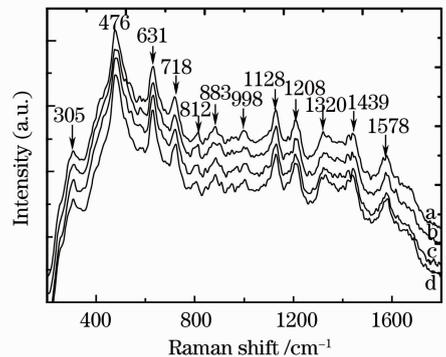


图 4 同一健康人血清分别基于相同条件下制备的不同纳米银膜 a, b, c, d 的 SERS 光谱

Fig. 4 SERS spectra of the same human serum sample based on two-dimension Ag nanofilms a, b, c, d, which were prepared in the same conditions

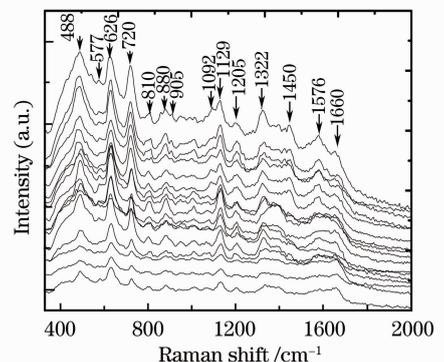


图 5 不同健康人血清基于相同条件下所制备的二维纳米结构银膜的 SERS 光谱

Fig. 5 Typical SERS spectra of human serum based on two-dimension Ag nanofilms prepared in the same conditions

清 SERS 光谱的影响比较小。基于此,采用相同条件下所制备的纳米银膜对 20 个不同健康人血清进行了 SERS 光谱检测,如图 5 所示(为了便于观察,图中部分谱线经过了向上/下的平移处理,谱图相互分开)。表 1 中列出了 20 个健康人血清基于该纳米银膜的 SERS 光谱谱带(平均值)及其初步归属。不同人血清的 SERS 光谱具有一定的差异,这一方面与个体差异有关,同时也不排除会受到不同银膜的影响。

表 1 20 个健康人血清 SERS 光谱拉曼谱带平均值(Mean \pm S. D., $n=20$)的初步归属

Table 1 Preliminary assignments of the average Raman bands (Mean \pm S. D., $n=20$) for the SERS spectra of the 20 serum samples

Average Raman bands/cm ⁻¹ Mean S. D.	Preliminary assignments
488.946 \pm 2.761	ν (S-S)
579.066 \pm 2.625	ν (S-S), HSA
630.026 \pm 2.296	δ (C-C=O)
722.426 \pm 2.659	ν (C-S)
806.777 \pm 4.501	Tyr
881.709 \pm 1.911	Tyr
907.293 \pm 1.539	ν (C-C), peptide
1007.226 \pm 5.320	ν (CH ₃), Phe
1129.665 \pm 3.650	ν (C-C), Tyr
1203.483 \pm 4.585	Tyr or Phe
1329.660 \pm 6.125	Trp
1443.065 \pm 2.776	δ_{as} (CH ₂), Trp
1579.212 \pm 1.822	Phe
1656.574 \pm 5.165	Amide I, HSA

人血清白蛋白是细胞外主要的疏运蛋白,在人血浆中的质量浓度约 40 mg/mL^[13],该蛋白中包含有 17 个二硫键,这些二硫键的伸缩振动就反映在拉曼光谱 480~600 cm⁻¹区域^[14,15]。人血清 SERS 光谱中位于 810 cm⁻¹,880 cm⁻¹,1129 cm⁻¹附近的拉曼峰源自于蛋白质中酪氨酸残基的振动^[16],位于 1330 cm⁻¹,1445 cm⁻¹附近的拉曼峰则归属于蛋白质中色氨酸残基的振动^[17],而位于 1006 cm⁻¹,1578 cm⁻¹附近的拉曼峰则归属于蛋白质中苯丙氨酸残基的振动^[18]。血清中缩氨酸基团 C-C 键的伸缩振动位于 900~950 cm⁻¹的拉曼谱带^[19],而位于 1615 cm⁻¹,1656 cm⁻¹附近拉曼峰则是源自于人血清白蛋白中酰胺 I 的 α -螺旋结构振动^[15~17]。

该纳米银膜对人血清拉曼散射的显著增强效应与其表面特性有直接的关系,其由多层银纳米粒子相互堆积而成,表面的纳米银粒子颗粒平均粒径约

200 nm,大于普通银胶中银纳米粒子几十纳米的平均粒径,使得银膜表面的纳米粒子可以更加有效地吸附血清中体积较大的生物大分子,从而使其拉曼散射得到加强;同时,在相邻的纳米粒子之间形成大量不规则的纳米区域(图 2),这些区域平均尺寸约 200 nm。我们认为这些大小不一的区域也可以使血清中的生物大分子有效地嵌入,有助于解决生物大分子由于其巨大的分子量、庞大的体积而难以有效地吸附到一般的银纳米粒子上的问题,进而对其拉曼散射起到显著的增强作用。

4 结 论

在电解法所制备的纳米银胶的基础上,利用静电自组装技术制备的二维纳米结构银膜是一种具有高效、稳定性的 SERS 基底。该纳米银膜对人血清的拉曼散射具有显著的增强作用,且重复性较好。同时,实验中采用便携式拉曼光谱仪,该拉曼光谱仪体积小、质量轻、价格便宜,具有普及意义。可以随地进行的在户外进行拉曼检测,这为拉曼分析走出实验室而进行方便、快捷的时时检测提供了可能。

参 考 文 献

- 1 A. M. K. Enejder, T. W. Koo, J. Oh *et al.*. Progress toward an in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy glucose sensor [J]. *Opt. Lett.*, 2002, **27**(22): 2004~2007
- 2 Y. Zhang, G. Xu, D. Liu *et al.*. Study of urinary nucleosides as biological marker in cancer patients analyzed by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Electrophoresis*, 2002, **23**(24): 4104~4109
- 3 Shen Gaoshan, Gu Huaimin, Yan Tianxiu *et al.*. Micro-Raman spectroscopy of the interaction between sodium nitrite and oxyhemoglobin [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(9): 1432~1436
沈高山,谷怀民,闫天秀等.亚硝酸钠和氧合血红蛋白反应的拉曼光谱[J].中国激光,2008,**35**(9):1432~1436
- 4 Liang Erjun, Liang Huiqin. Study on the properties and phasetransition in laser quenching and cladding layers by Raman spectroscopy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2006, **33**(1): 120~123
梁二军,梁会琴.激光淬火及熔覆层性能与物相变化的拉曼光谱研究[J].中国激光,2006,**33**(1):120~123
- 5 Jichun Zhu, Yanhui Zhang, Liangping Wu *et al.*. Dependence of surface-enhanced Raman scattering from calf thymus DNA on anions [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(7): 526~529
- 6 Wang Lexin, Zhao Zhimin, Guo Linfeng *et al.*. Experimental investigation and application of low luminescence of serum [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(5): 797~800
王乐新,赵志敏,郭林峰等.血清微弱发光的实验研究与应用[J].中国激光,2008,**35**(5):797~800
- 7 Dahu Qi, Andrew J. Berger. Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy [J]. *Opt. Lett.*, 2007, **46**(10): 1725~1734
- 8 D. Rohleder, W. Kiefer, W. Petrich. Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy

- [J]. *Analyst.*, 2004, **10**: 906~911
- 9 R. M. Liu, Y. P. Kang, X. F. Zi *et al.*. The ultratrace detection of crystal violet using surface enhanced Raman scattering on colloidal Ag nanoparticles prepared by electrolysis [J]. *Chin. Chem. Lett.*, 2009, **20**(6): 711~715
- 10 H. Xu, M. Kall. Surface-plasmon-enhanced optical forces in silver nanoaggregates [J]. *Phys. Rev. Lett.*, 2002, **89**(24): 246802
- 11 H. Xu, J. Aizpurua, M. Kall *et al.*. Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering[J]. *Phys. Rev. E*, 2000, **62**(3): 4318~4324
- 12 Radha Narayanan, Robert J. Lipert, Marc D. Porter. Cetyltrimethylammonium bromide-modified spherical and cube-like gold nanoparticles as extrinsic Raman labels in surface-enhanced Raman spectroscopy based heterogeneous immunoassays [J]. *Anal. Chem.*, 2008, **80**(6): 2265~2271
- 13 S. Nie, S. R. Emory. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering [J]. *Science*, 1997, **275**(5303): 1102~1106
- 14 V. J. C. Lin, J. L. Koenig. Raman studies of bovine serum albumin [J]. *Biopolymers*, 1976, **15**(1): 203~218
- 15 H. Fabian, P. Anzenbacher. New developments in Raman spectroscopy of biological systems[J]. *Vibr. Spectrosc.*, 1993, **4**: 125~148
- 16 A. I. Ivanov, E. A. Korolenko, E. V. Korolik *et al.*. Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, **408**(1): 69~77
- 17 S. Stewart, P. M. Fredericks. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface[J]. *Spectroch. Acta A*, 1999, **55**(7-8): 1641~1660
- 18 H. Y. Han, Y. F. Jia, Z. C. Wang *et al.*. Analytical technique for label-free multi-protein detection based on western blot and surface-enhanced Raman scattering [J]. *Anal. Chem.*, 2008, **80**(8): 2799~2804
- 19 M. C. Chen, R. C. Lord. Laser Raman spectroscopic studies of the thermal unfolding of ribonuclease[J]. *Biochemistry*, 1976, **15**(9): 1889~1897