

基于 R6G 探针表面增强拉曼散射的 pH 传感

邓子昂¹, 李姝洁¹, 刘杰¹, 欧全宏¹, 时有明², 刘刚*¹ 云南师范大学物理与电子信息学院, 云南 昆明 650500;² 曲靖师范学院物理与电子工程学院, 云南 曲靖 655011

摘要 用金纳米粒子(Au NPs)作为基底,基于罗丹明 6G(R6G)探针分子拉曼特征峰随 pH 的变化,构建了一种具有表面增强拉曼散射(SERS)信号输出的 pH 传感器。由于(闭)开环形式下存在的(去)质子化 R6G 分子吸附于增强基底表面的倾斜度取向不同,R6G 在不同 pH 下表现出了不同的 SERS 活性。根据寻找到的 R6G 在 1363 cm^{-1} 和 1314 cm^{-1} 位置处的 SERS 光谱峰面积比与 pH 的线性关系,设计出 pH 传感器。实验结果表明:R6G 的 SERS 信号在室温下可以稳定 2 h 以上;当样品溶液 pH 在 7 和 3 之间转换时,传感器表现出了较好的恢复性。在 pH 检测过程中引入其他金属阳离子后,该探针表现出了对 H^+ 较好的选择性。通过检测实际样品的 pH 发现,该探针的分析性能良好,适于在酸性介质中检测 pH。

关键词 光谱学;表面增强拉曼散射;pH 传感器;罗丹明 6G;金纳米粒子

中图分类号 O433

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202148.0311003

1 引言

氢离子浓度指数 pH 是 1909 年丹麦生物化学家 Soren Peter Lauritz Sorensen 提出来的,用以描述酸度^[1]。在一些科研领域和实际应用中,准确测定 pH 至关重要。特别是在生物学领域,细胞内 pH 的变化在细胞生长、凋亡、离子转运和酶解等生命过程中具有举足轻重的作用^[2-3]。

目前,对 pH 进行检测的方法主要有 pH 指示剂法、pH 试纸法、玻璃 pH 电极法。使用 pH 指示剂和 pH 试纸的原理基本一致,都是利用指示剂或试纸与待测液反应后呈现不同的颜色来确定 pH。但该方法是根据颜色变化对照标准比色卡来确定溶液 pH 的,容易受主观意识的影响。同时,该方法的检测范围较小,如 pH 试纸无法测量油分的 pH。此外,pH 的准确性还受自身方法的限制。玻璃 pH 电极法是准确测定 pH 的主要方法,但该方法由于制备时间长、校准繁复、会引入电干扰等缺点而不适合长期使用,且检测目标受限。因此,寻求一种简单、非接触式、可靠的检测 pH 的方法是很有必要的。

近年来,许多基于合成探针光谱响应的光学 pH 传感器被开发出来^[4-6]。其中基于荧光^[7-8]和表面增强拉曼(SERS)^[9-11]传感器的方法由于具有高灵敏度、无损检测和实时空间定位能力的特点而被广泛用于溶液和组织细胞中 pH 的监测。特别是 SERS 方法,其作为一种强大而有吸引力的光谱分析技术,如今已在生物医学^[12-13]、化学分析^[14-15]等领域实现了对各种极少量物质进行超敏监测与分析。同时,相较于 SERS 法所具备的较高空间分辨率、高度分子特异性、生物稳定性^[16]等优点,单种荧光标记技术的光解和光漂白特性带来了许多问题^[17]。

具有封闭螺内酯单元的罗丹明基团能够产生阳离子激发的荧光和 SERS 信号,其优异的光物理性质被广泛用于荧光探针和 SERS 中^[18-20]。罗丹明 6G(R6G)是一种表征表面增强拉曼谱的染色剂,具有很强的荧光,在 SERS 超灵敏单分子探测中具有良好的应用效果。

本实验以金纳米粒子(Au NPs)作为增强基底,以 R6G 作为探针分子。在不同的 pH 下,R6G 在(闭)开环形式下存在的(去)质子化分子结构变化不

收稿日期: 2020-08-31; 修回日期: 2020-09-13; 录用日期: 2020-09-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760341)、云南省高校科技创新团队支持计划项目

*E-mail: gliu66@163.com

同,而且吸附于增强基底表面的倾斜度取向不同,因此,R6G 表现出了不同的 SERS 活性。本文通过寻找 SERS 信号与 pH 之间的关系,设计出了基于 R6G 探针分子 SERS 信号的 pH 传感器,该传感器可以方便快速地测定样品溶液的 pH。

2 实验部分

2.1 材料

氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 纯度为 99.9%)购自天津凯玛科技有限公司,柠檬酸钠、R6G、NaCl、 FeCl_3 均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司, CuCl_2 、 ZnCl_2 、CsCl、 PdCl_2 均购自天津市致远化学试剂有限公司。所有化学品的纯度均为分析纯。

显微载玻片为石英玻璃载玻片,尺寸为 $75\text{ mm} \times 25\text{ mm} \times 1.1\text{ mm}$,购自一帆设备有限公司;滤纸采用的是定量加厚滤纸,尺寸为 $12.5\text{ cm} \times 12.5\text{ cm}$,购自北京思齐生物技术有限公司;硅片选用的是单抛硅片,尺寸为 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$,购自顺生电子科技有限公司。超纯水用于溶液配制,其电阻率大于 $18.25\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

2.2 仪器

使用 Quanta FEG 250 扫描电子显微镜(SEM)观察基底金纳米颗粒的形貌;pH 分析仪选用的是 STARTER 2C 型;使用 UV-2600 分光光度计记录紫外可见光谱,波长范围为 $185 \sim 1400\text{ nm}$ 。

采用共聚焦显微拉曼光谱仪进行拉曼实验,该设备主要由 532 nm 绿光固态激光器、Shamrock SR-500iB2 光谱仪(焦长为 500 mm , 1200 line/mm 光栅,光谱分辨率为 1 cm^{-1})、CCD 相机组成。光谱仪与 Leica DM 2700M 显微镜连接。使用 50 倍($NA=0.5$)物镜将激光束聚焦到样品表面,拉曼散射信号由热电制冷 CCD 相机采集。为减小热噪声,CCD 相机被冷却至 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 。采用 Edge 滤光片阻挡杂散光。使用 Andor SOLIS 软件进行光谱数据的采集,测试范围为 $400 \sim 2000\text{ cm}^{-1}$,狭缝宽度设置为 $100\text{ }\mu\text{m}$,样品位置的激光功率约为 6 mW ,积分时间为 10 s ,累计次数为 3 次。

2.3 基底及样品的制备

本实验采用经典的柠檬酸钠还原法对 Au NPs 进行合成^[21-22]。将 100 mL 质量分数为 0.01% 的氯金酸水溶液倒入圆底烧瓶中,并将烧瓶放入磁力搅拌器内,将搅拌器的转速调至 1000 r/s ,温度调至 $95\text{ }^\circ\text{C}$,在四氟磁子的搅拌下将烧瓶内的溶液加热至沸腾;之后迅速加入质量分数为 1% 的柠檬酸钠水

溶液(加入的体积分别为 $0.3, 0.5, 0.7, 0.9\text{ mL}$),溶液颜色由淡黄色变为黑色,再由黑色逐渐变为棕红色。保持溶液沸腾并搅拌 40 min 后停止加热,自然冷却至室温后放置在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 的环境中保存待用。通过改变还原剂的添加量制备出了 4 种粒径大小不同的基底,该基底将用于进行预实验。

配制 R6G 浓度分别为 $10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}\text{ mol/L}$ 的待测溶液进行预实验。以 0.1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 作为缓冲液调节待测溶液的 pH 在 $2 \sim 12$ 范围内。在 H^+ 选择性实验中,将 CuCl_2 、 FeCl_2 、NaCl、 ZnCl_2 、CsCl、 PdCl_2 配制成分数为 1% 的溶液,并将各溶液与不同酸碱度的 10^{-6} mol/L R6G 溶液以 1:1 的体积比进行混合,以达到引入 7 种干扰阳离子到 pH 探针分子上的目的。实际测试样品选择矿泉水、洗手液、茶水(普洱茶)、环境水样(滇池水)。所有样品均采用亲水定量滤纸进行了过滤,过滤后均保持在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。之后,将过滤后的样品与 10^{-6} mol/L R6G 溶液以 5:1 的体积比进行混合,混合后的溶液用于测试。

为保障拉曼光谱测试的效果,测试前对 Au NPs 进行了 3 次离心清洗,以达到除去大量杂质以及使纳米粒子富集的目的。之后,将清洗好的 Au NPs 滴在采用浓硫酸与过氧化氢浸泡法改性后的硅片上,在真空干燥箱中晾干后,将硅片浸泡于测试样品中, 10 min 后取出,然后用少量超纯水冲洗硅片表面,以去除未结合的样品分子。最后,将硅片在室温下晾干后进行 SERS 检测。

2.4 数据处理

采用 Nano Measurer 1.2 软件对 SEM 图像中 Au NPs 的粒径进行分析。采用 OMNIC 8.2 软件对采集的原始光谱进行基线校正、纵坐标归一化、平均谱图处理。采用 Origin 9.0 软件对 SERS 光谱数据进行处理及绘图,并利用其 Peak Analyzer 功能计算峰面积。采用 Excel 2010 对数据进行计算。

3 结果与讨论

3.1 预实验

制备的 Au NPs 的 SEM 形貌如图 1(a)~(d)所示。可以看出,合成的 Au NPs 颗粒的尺寸比较均匀,但团聚程度不同。为估算 Au NPs 的粒径,本文采用 Nano Measurer 软件对 200 颗 Au NPs 的粒径进行了统计分析,统计柱状图如图 1(e)~(h)所示。统计分析结果表明,通过控制柠檬酸钠的添加量,得到了平均粒径约为 $96, 53, 45, 34\text{ nm}$ 的 4 种纳米颗粒。

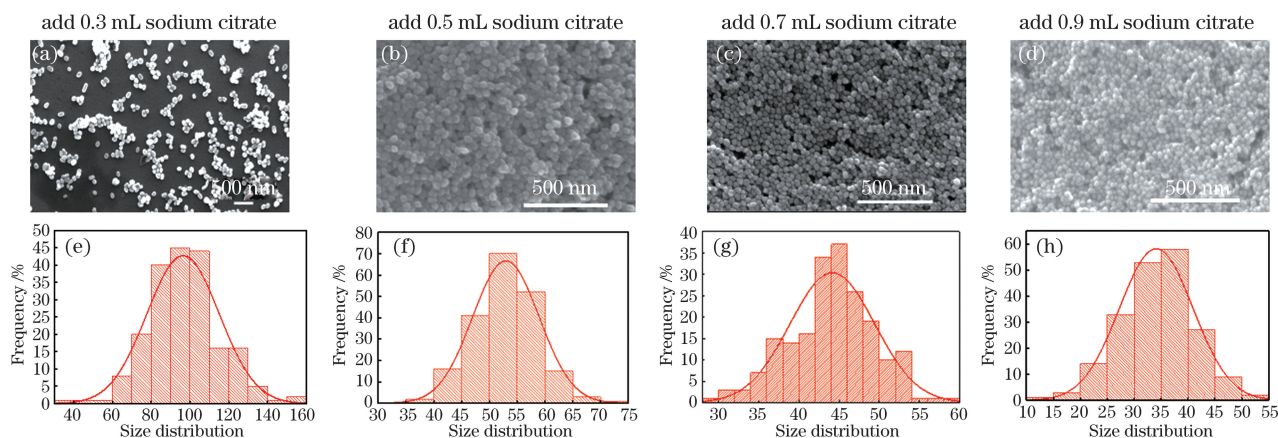


图 1 Au NPs 的 SEM 形貌和粒径分布。(a)~(d)SEM 形貌;(e)~(h)粒径分布

Fig. 1 SEM images and particle size distribution of Au NPs. (a)–(d) SEM images; (e)–(h) particle size distribution

选取 4 种粒径(96,53,45,34 nm)的 Au NPs 和三种浓度(10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} mol/L)的 R6G 进行预实验,得到的 SERS 谱图如图 2(a)所示。以 SERS 谱图中 1363 cm^{-1} 处特征峰峰面积[如图 2(b)所示]为量化指标,衡量 SERS 基底的增强效果以及后续实验中探针分子所选用的浓度是否合适。可以发

现,当 R6G 的浓度较高时,如浓度为 10^{-6} mol/L 和 10^{-8} mol/L 时,粒径较小的 Au NPs 的增强效果较好,而当 R6G 的浓度较低时,如浓度为 10^{-10} mol/L 时,粒径较大的 Au NPs 的增强效果较好。这可能是由于当 R6G 浓度较高时,探针分子易于吸附于粒径较小的 Au NPs 颗粒之间形成热点效应,粒径较

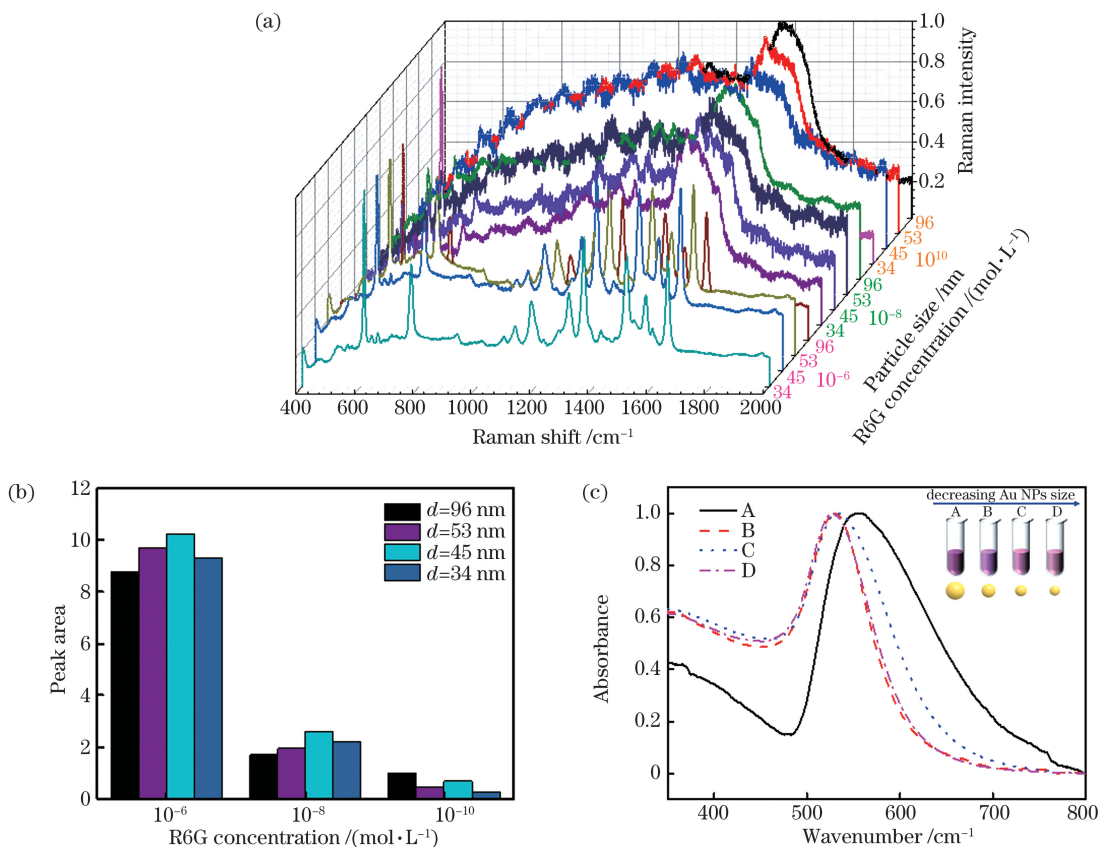


图 2 不同粒径 Au NPs 的 SERS 性能测试。(a)不同 Au NPs 粒径和不同 R6G 浓度条件下的 SERS 谱图;(b)不同 Au NPs 粒径和不同 R6G 浓度条件下的 SERS 峰在 1363 cm^{-1} 处的峰面积;(c)不同粒径 Au NPs 的紫外光谱

Fig. 2 SERS performance test of Au NPs with different particle sizes. (a) SERS spectra under different Au NPs particle sizes and R6G concentrations; (b) SERS peak area at 1363 cm^{-1} under different Au NPs particle sizes and R6G concentrations; (c) UV spectra of Au NPs with different particle sizes

大的颗粒与探针分子之间的团聚热点效应减少;而当 R6G 的浓度较低时,团聚效应减小,粒径较大颗粒的增强效果回升,表现出更强的电磁增强(EM)效率和电荷转移(CT)效率。其中粒径为 45 nm 的 Au NPs 表现出了良好的增强效果和稳定性。

为了探究 Au NPs 的局域表面等离子体共振(LSPR)特性,本文测试了上述 4 种粒径 Au NPs 的紫外可见吸收光谱,结果如图 2(c)所示。可以发现:随着柠檬酸钠用量增加,合成的 Au NPs 的粒径逐渐减小,颜色由暗紫色逐渐变为杏粉色,而且 LSPR 峰位置不断向长波区偏移;粒径为 45 nm 的 Au NPs 的 LSPR 峰位置为 532 nm,在 4

种合成 Au NPs 中具有最强的 LSPR。因此,本文将粒径为 45 nm 的 Au NPs 作为增强衬底,进行后续实验。

为检测增强基底拉曼信号的均匀性和重现性,本文测试了粒径为 45 nm 的 Au NPs 基底随机 20 个不同位置处浓度为 10^{-6} mol/L 的 R6G 的拉曼信号,测试结果如图 3(a)所示。图 3(b)则是将 1363 cm^{-1} 处的强度进行归一化处理,计算得到的 20 个随机采样点处 R6G 的拉曼增强信号的相对标准差(RSD)。可以看到, 1363 cm^{-1} 处的 RSD 值为 6.65%,小于 15%,这表明该 Au NPs 增强基底拉曼信号的重现性和均匀性较好。

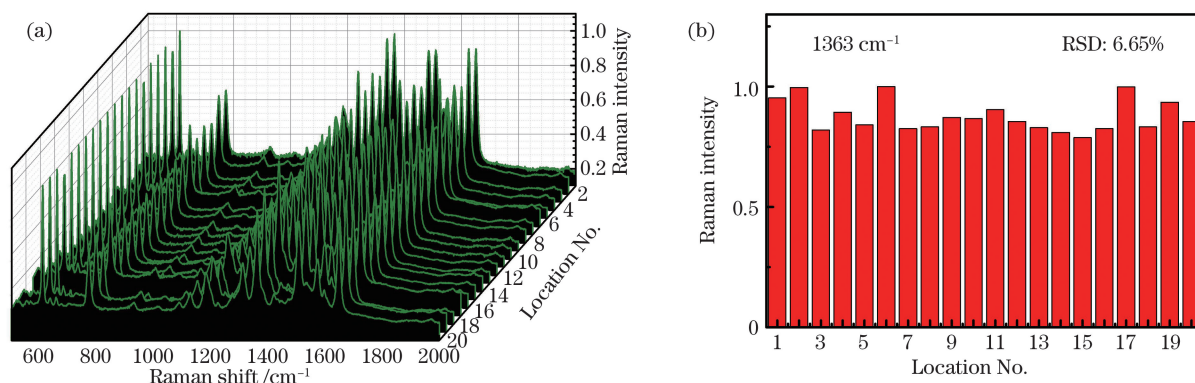


图 3 45 nm Au NPs 增强基底拉曼信号的均匀性及重现性测试。(a)在基底上 20 个不同位置处测得的浓度为 10^{-6} mol/L R6G 的 SERS 图;(b)计算得到的 SERS 峰在 1363 cm^{-1} 处的相对标准差

Fig. 3 Uniformity and reproducibility of Raman signal of 45 nm Au NPs enhanced substrate. (a) SERS graphs of R6G with a concentration of 10^{-6} mol/L tested at 20 different substrate locations; (b) calculated relative standard deviation (RSD) of SERS peak at 1363 cm^{-1}

3.2 pH 对 R6G SERS 强度的影响

选择粒径为 45 nm 的 Au NPs 和浓度为 10^{-6} mol/L 的 R6G 进行实验。用 0.1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 作为缓冲液调节 R6G 溶液的 pH,使用玻璃 pH 电极准确测试调节过程中 pH 的变化。

图 4(a)为测得的 R6G 在不同 pH 水平下的 SERS 光谱。从图 4(a)可以清楚地看到 R6G 的特征峰,其中 611 cm^{-1} 处的特征峰对应 C—C—C 环面内的弯曲振动, 772 cm^{-1} 处的特征峰对应 C—H 平面的弯曲振动, 1185 cm^{-1} 处的特征峰对应 C—C 的伸缩振动, 1314 cm^{-1} 处的特征峰对应芳香环 C—N 的伸缩振动, 1363 cm^{-1} 处的特征峰对应芳香环 C—C 的伸缩振动, 1512 cm^{-1} 、 1578 cm^{-1} 和 1652 cm^{-1} 处的特征峰对应苯环 C=C 的伸缩振动^[23-24]。

为了更好地分析 pH 对探针分子的影响,本文展示了几种 pH 下在 C—N 键和 C—C 键伸缩振动光谱范围内的 SERS 光谱图,如图 4(b)所示。可以

看出,随着 pH 增大, 1314 cm^{-1} 和 1363 cm^{-1} 处特征峰的强度都出现了一定程度的下降,特别是由强酸性过渡到弱酸性时光谱强度下降明显。这是由于在溶液中存在着质子化反应平衡,不同的 pH 条件对 R6G 分子的影响不同。由图 4(c)、(d)可以看出:随着 pH 增大,R6G 分子与芳香环连接的 C—N 键发生质子化,影响了 C—N 键的伸缩振动;当 pH 较小时,以开环形式存在的质子化 R6G 分子垂直吸附于 Au NPs 表面,使芳香环 C—C 键远离 Au NPs 表面;而当 pH 变大时,以闭环形式存在的去质子化 R6G 分子倾斜吸附于 Au NPs 表面,满足分子的 SERS 选择规律^[24],即垂直吸附于 SERS 衬底上的 R6G 分子产生的信号比倾斜吸附的 R6G 分子产生的信号更强^[25]。由此,本文选取 1314 cm^{-1} 和 1363 cm^{-1} 处特征峰的峰面积进行量化,寻找规律。

图 5(a)给出了 pH 为 3~8 范围内 1363 cm^{-1} 与 1314 cm^{-1} 处峰面积比的关系以及拟合曲线,得

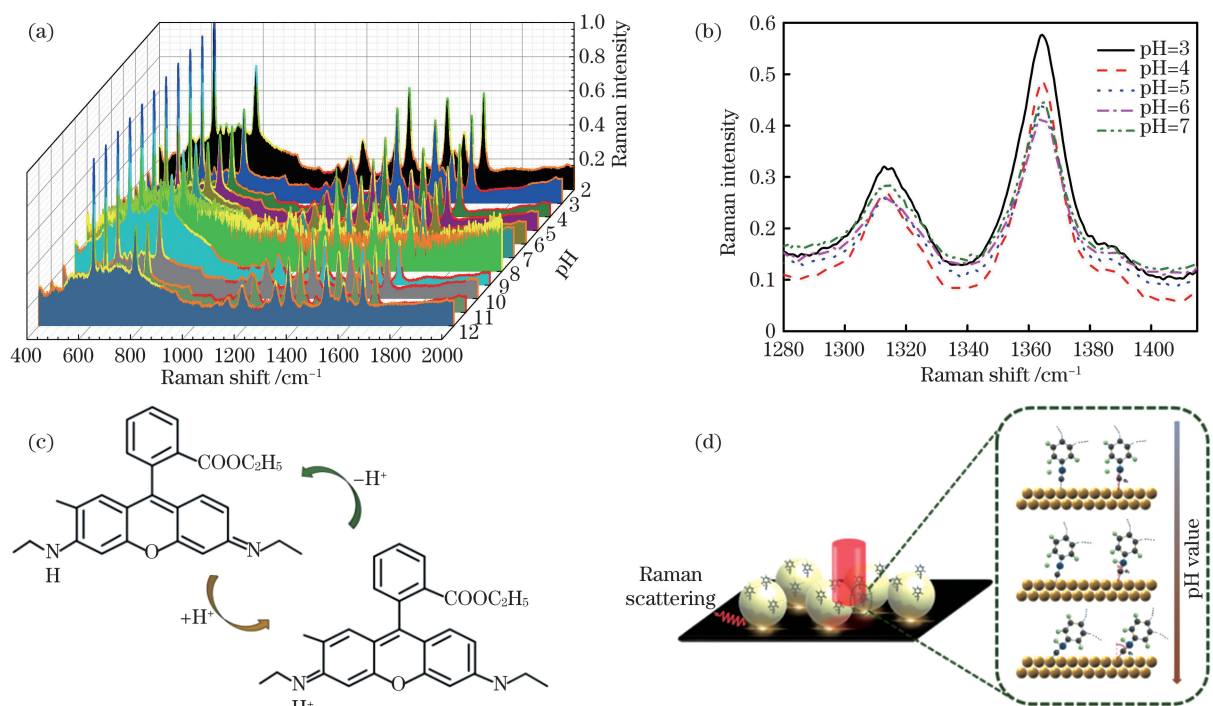


图 4 利用吸附在 Au NPs 表面的 R6G 分子进行 pH 传感。(a) R6G 在不同 pH 下的 SERS 光谱;(b) 在 C—N 键和 C—C 键伸缩振动光谱范围内的 SERS 光谱;(c) 不同 pH 水平下 R6G 分子结构转变的机理;(d) pH 依赖性的 SERS 检测和 pH 诱导 R6G 分子取向变化以及分子质子化过程示意图

Fig. 4 pH sensing using R6G molecules adsorbed on the surface of Au NPs. (a) SERS spectra of R6G at different pH levels; (b) SERS spectra within the range of stretching vibration spectra of C—N and C—C bonds; (c) mechanism of molecular structure transformation of R6G at different pH levels; (d) schematic of pH-dependent SERS measurement, pH-induced orientation change of R6G molecules and schematic of molecular protonation

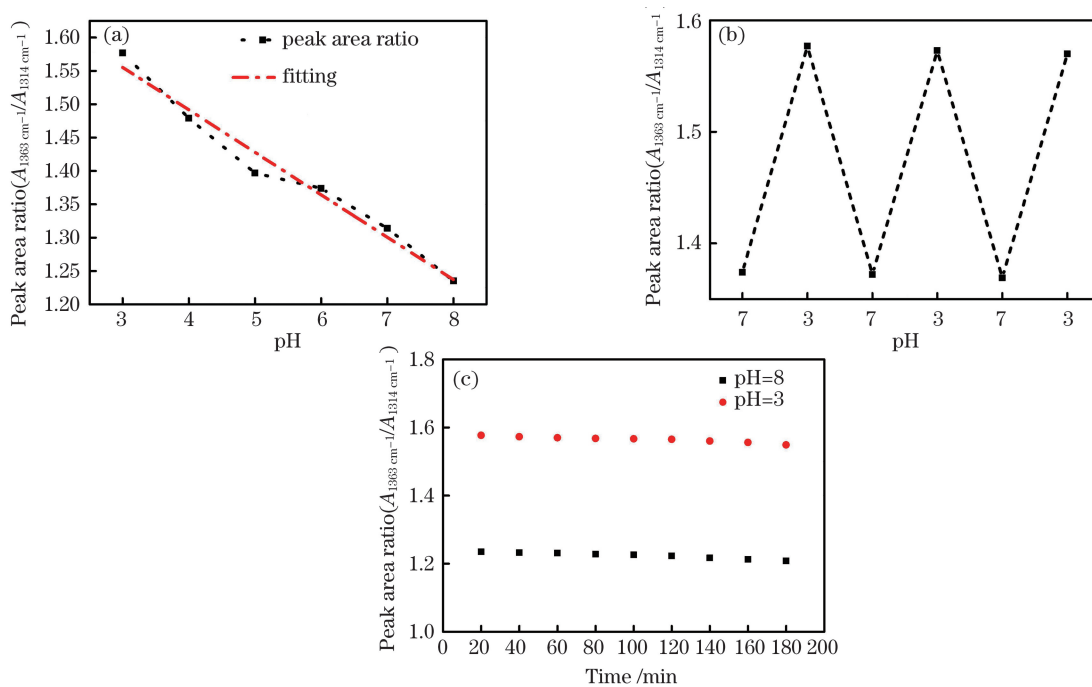


图 5 R6G 在 1363 cm⁻¹ 和 1314 cm⁻¹ 处 SERS 光谱峰面积比。(a) 峰面积比与 pH 的拟合曲线;(b) 峰面积比在 pH=3 和 pH=7 之间的变化;(c) 峰面积比与时间的关系

Fig. 5 Peak area ratio of SERS spectrum of R6G at 1363 cm⁻¹ to 1314 cm⁻¹. (a) Fitted curve between peak area and pH; (b) change of peak area ratio between pH=3 and pH=7; (c) relationship between peak area and time

到的拟合方程为 $y = -0.0637x + 1.7461$, 相关系数 $R^2 = 0.968 > 0.95$ 。可以发现, SERS 峰面积比与 pH 呈线性关系。这可能是因为在样品溶液 pH 过高(碱性条件)时, OH^- 与 R6G 分子中芳香环外的酯基、乙基、亚氨基发生了水解反应, 使探针分子的 SERS 光谱变化较大, 两个特征峰峰面积比不再保持一致的线性关系。

从图 5(b)可以看出, 样品溶液的 pH 值在 7 和 3 之间转换三次, 峰面积比变化不大, 表明传感器具有较好的恢复性。为验证 SERS 信号在常温下的稳定性, 将吸附了样品的 SERS 基底放置于常温下, 每隔 20 min 在相同位置进行一次拉曼检测, 检测结果如图 5(c)所示。由图 5(c)可以发现, 在相同的 pH 下, 测试结果有逐渐减小的趋势。这主要是由于在相同的 pH 条件下, R6G 分子吸附于增强基底表面的倾斜程度相同, 而 Au NPs 暴露于空气中逐渐氧化, 其 SERS 基底热点效应降低, 对于数量更多的芳香环 C—C 键的拉曼峰影响更大, 相对的峰面积比就会略微减小。由图 5(c)还可以看出, R6G 的 SERS 信号在常温下可以稳定 2 h 以上。

3.3 H^+ 对 R6G SERS 峰面积比的选择性

选择性是评价光学探针性能的一个非常重要的指标。为评价现有 SERS 探针的选择性, 将 0.7 mL 浓度为 10^{-6} mol/L 的 R6G(pH=3, 5, 7) 与一个潜在干扰物质混合后进行 SERS 分析。考虑到非金属离子在理想状态下主要与其他原子共同使用外层电子, 组成比较稳定的共价键, 而其他一些阴离子, 例如溶液中的弱酸根离子, 虽然存在水解, 但其本身的水解程度很小, 而且还被原分子所抑制, 因此在弱酸、弱碱溶液中不考虑弱酸根离子的水解。对于该 SERS 探针, 对 H^+ 选择性影响较大的是金属阳离子通过离子键形成的化合物, 该化合物可在酸性或者碱性溶液中发生复分解反应, 生成新的弱酸和盐, 对整体的 pH 有一定影响。因此, 本文选取几种常见的金属阳离子

对 SERS 探针的 H^+ 选择性进行探究(加入含金属阳离子的溶液均为 7 mL, 质量分数均为 1%)。

在不同 pH 下, 引入 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Na^+ 、 Pd^{2+} 、 Cs^+ 、 Zn^{2+} 后 R6G 的 SERS 光谱峰面积比 ($A_{1363 \text{ cm}^{-1}}/A_{1314 \text{ cm}^{-1}}$) 如图 6 所示。可以发现, 在不同的 pH 下引入金属阳离子后, 峰面积比出现了一定变化, 但变化率最大没有超过 10%, 说明该探针对于 H^+ 的选择还是很敏感的。

此外, 由图 6 还可以发现, 引入其他金属阳离子后, R6G 的峰面积都变小了, 这可能与添加物质的水解变化有关。最明显的就是当添加 ZnCl_2 (即引入 Zn^{2+}) 后, 峰面积比变小, 但并未发生太大变化。这可能是由于 ZnCl_2 溶于水后会形成一些配酸 $\text{H}[\text{ZnCl}_2(\text{OH})]$, 它对 Au NPs 基底造成了影响, 使拉曼增强效应发生了变化, 因此峰面积有所改变。

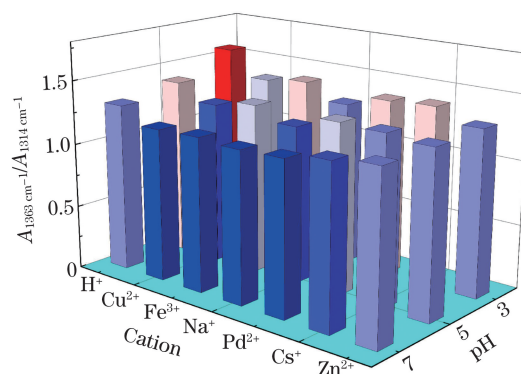


图 6 加入常见金属阳离子后, R6G 在不同 pH 下的峰面积比

Fig. 6 Peak area ratio of R6G at different pH levels after adding common metal cations

3.4 真实样品的 pH 检测

接下来通过测定矿泉水、洗手液、茶水、环境水样(滇池水)等真实样品的 pH, 验证此探针的实际分析性能。使用 Origin 9.0 数据处理软件对测试结果进行拟合, 定量测定 pH, 并将测量结果与 pH 分析仪的结果进行比较, 比较结果如表 1 所示。

表 1 真实样品的 pH 检测结果

Table 1 pH test results of real samples

Sample	pH	Present probe(SERS)	Absolute error	Relative error/%
Mineral water	7.10	8.08	0.98	13.80
Hand sanitizer	4.15	4.48	0.33	7.95
Tea water	5.44	5.79	0.35	6.43
Environmental water(Dianchi lake)	9.28	8.40	-0.88	-9.48

洗手液和茶水这样的酸性样品的 pH 与实际值相差不大, 绝对误差较小 (< 0.4); 但像矿泉水和环

境水样(滇池水)这样接近中性的样品, 误差相对较大。这同前述 pH 与特征峰峰面积比拟合实验结果

相吻合。这说明该探针比较适合应用于酸性条件下的 pH 检测。

4 结 论

本文探究了利用吸附在 Au NPs 上的 R6G 分子进行 pH 传感的方法。在 pH 由小变大过程中, R6G 分子从以开环形式存在的质子化变化到以闭环形式存在的去质子化, 分子在 Au NPs 表面的夹角逐渐变大, 致使与苯环连接的 C—N 键及芳香环 C—C 键的伸缩振动受到干扰。pH 与 C—C、C—N 伸缩振动频率之间存在线性关系。测试结果表明, 该探针具有良好的灵敏性、选择性、可逆性和稳定性, 可以反映实际酸性介质 pH 的变化。

相较于传统的 pH 检测方法以及其他利用基于合成探针光谱响应的光学 pH 传感器, 本文制备的 pH 传感器具有高灵敏度、高生物稳定性以及无损检测的优点, 拓宽了 pH 传感的应用范围。选用的探针分子易于获取, 使用成本较低, 且检测过程中不易发生光解和光漂白。罗丹明基团产生阳离子激发的 SERS 信号具有较强的荧光, 在 SERS 超灵敏单分子探测中具有良好的应用效果, 在生物医学和化学分析中表现出巨大潜力, 例如在单分子和组织细胞 pH 变化的跟踪方面具有更广阔的应用前景。然而, 为提高 pH 传感的准确性、敏感性, 基底与探针分子的吸附, 更均匀灵敏的基底制备, 以及对 pH 敏感的新材料的合成等, 都值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Li F M. 分析化学 [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 49-57.
李发美. 分析化学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 49-57.
- [2] Li G L, Zhang B, Song X B, et al. Ratiometric imaging of mitochondrial pH in living cells with a colorimetric fluorescent probe based on fluorescein derivative[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 253: 58-68.
- [3] Niu W F, Wei Z W, Jia J, et al. A ratiometric emission NIR-fluorescent probe for sensing and imaging pH changes in live cells [J]. Dyes and Pigments, 2018, 152: 155-160.
- [4] Li J Y, Zhuge X X, Yan X Z, et al. Two pH-responsive fluorescence probes based on indole derivatives[J]. Optical Materials, 2019, 90: 257-263.
- [5] Pourreza N, Golmohammadi H. Application of curcumin nanoparticles in a lab-on-paper device as a simple and green pH probe[J]. Talanta, 2015, 131: 136-141.
- [6] Fang W, Wang Z, Zong S, et al. pH-controllable drug carrier with SERS activity for targeting cancer cells[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 57: 10-15.
- [7] Cheng S Y, Pan X H, Shi M Y, et al. Naphthalene-benzoinole derived two novel fluorometric pH-responsive probes for environmental systems and bioimaging[J]. Talanta, 2019, 203: 90-98.
- [8] Yang G H, Zhang Q, Liang Y, et al. Fluorescence-SERS dual-signal probes for pH sensing in live cells [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2019, 562: 289-295.
- [9] Zong S, Wang Z, Yang J, et al. Intracellular pH sensing using p-aminothiophenol functionalized gold nanorods with low cytotoxicity [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(11): 4178-4183.
- [10] Chen P, Wang Z, Zong S, et al. A wide range optical pH sensor for living cells using Au@Ag nanoparticles functionalized carbon nanotubes based on SERS signals[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(25): 6337-6346.
- [11] Liu X Y, Wang X Q, Zha L S, et al. Temperature- and pH-tunable plasmonic properties and SERS efficiency of the silver nanoparticles within the dual stimuli-responsive microgels [J]. Journal Materials Chemistry C, 2014, 2(35): 7326-7335.
- [12] Liang Z H, Wang Z, Peng L, et al. Detection of miRNA-106a based on dual SERS amplifications of SiC@Ag substrate and silver-biotin-streptavidin nanoaggregates[J]. Acta Photonica Sinica, 2019, 48(7): 0717002.
梁照恒, 王哲, 彭乐, 等. 基于 SiC@Ag 基底和银-生物素-链霉亲和素纳米聚集体双重 SERS 放大的 miRNA-106a 检测 [J]. 光子学报, 2019, 48(7): 0717002.
- [13] Fu H, Lü W F, Gao Y F, et al. Highly sensitive detection of tumor marker miRNA-21 based on sandwich SERS structure and enzymatic cleavage technique[J]. Acta Photonica Sinica, 2019, 48(7): 0717003.
洪颖, 吕炜烽, 高永峰, 等. 基于三明治 SERS 结构和酶剪切技术的肿瘤标志物 miRNA-21 的高灵敏检测 [J]. 光子学报, 2019, 48(7): 0717003.
- [14] Chen Y, Yan X, Zhang X, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons based on support vector machine algorithm [J]. Chinese Journal of Lasers, 2019, 46(3): 0311005.
陈阳, 严霞, 张旭, 等. 基于支持向量机算法的多环

- 芳烃表面增强拉曼光谱的定量分析[J]. 中国激光, 2019, 46(3): 0311005.
- [15] Wang T Y, Wang Y Y, Lin X L, et al. Ultrasensitive quantitative detection of alpha-fetoprotein based on SERS spectroscopy[J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(2): 0207026.
王廷银, 王运焱, 林学亮, 等. 基于 SERS 光谱技术的甲胎蛋白超灵敏定量检测[J]. 中国激光, 2020, 47(2): 0207026.
- [16] Yaseen T, Pu H B, Sun D W. Fabrication of silver-coated gold nanoparticles to simultaneously detect multi-class insecticide residues in peach with SERS technique[J]. Talanta, 2019, 196: 537-545.
- [17] Eggeling C, Widengren J, Rigler R, et al. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: evidence of two-step photolysis[J]. Analytical Chemistry, 1998, 70(13): 2651-2659.
- [18] Fu Y, Jiang X J, Zhu Y Y, et al. A new fluorescent probe for Al^{3+} based on rhodamine 6G and its application to bioimaging[J]. Dalton Transactions, 2014, 43(33): 12624-12632.
- [19] Tang G C, Du L P, Su X G. Detection of melamine based on the fluorescence resonance energy transfer between CdTe QDs and Rhodamine B [J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 4060-4065.
- [20] Li P, Zhou X, Liu H L, et al. Surface-enhanced Raman evidence for Rhodamine 6G and its derivative with different adsorption geometry to colloidal silver nanoparticle [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2013, 44(7): 999-1003.
- [21] Hofmann O, Doblhofer K, Gerischer H. Infrared reflexion-absorption measurements on emersed gold electrodes[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1984, 161(2): 337-344.
- [22] Li J F. Coreshell nanoparticles enhanced Raman spectroscopy[D]. Fujian: Xiamen University, 2010: 40-57.
李剑锋. 核壳结构纳米粒子增强拉曼光谱[D]. 福建: 厦门大学, 2010: 40-57.
- [23] Lei S J, Tao C J, Li J L, et al. Visible light-induced charge transfer to improve sensitive surface-enhanced Raman scattering of ZnO/Ag nanorod arrays [J]. Applied Surface Science, 2018, 452: 148-154.
- [24] Ma P Y, Liang F H, Wang D, et al. A novel fluorescence and surface-enhanced Raman scattering dual-signal probe for pH sensing based on Rhodamine derivative[J]. Dyes and Pigments, 2015, 122: 224-230.
- [25] Pristinski D, Tan S L, Erol M, et al. *In situ* SERS study of Rhodamine 6G adsorbed on individually immobilized Ag nanoparticles[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2006, 37(7): 762-770.

pH Sensing Based on Surface-Enhanced Raman Scattering Using R6G Probe

Deng Ziang¹, Li Shujie¹, Liu Jie¹, Ou Quanhong¹, Shi Youming², Liu Gang^{1*}

¹School of Physics and Electronic Information, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China;

²School of Physics and Electronic Engineering, Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 655011, China

Abstract

Objective In some research fields and practical applications, the accurate determination of pH is extremely important. For example, in biology, the change in intracellular pH plays an important role in cell growth, apoptosis, ion transport, homeostasis, and enzymolysis. There are three main methods for traditional detection of pH: pH indicator; pH test paper; glass pH electrode. The principles of the pH indicator and test paper are essentially the same, and the pH value is determined from color change after the reaction using the indicator and test paper. However, because of the color change, the pH value of the solution is determined according to a standard colorimetric card, which is easily affected by subjective consciousness. At the same time, the detection target range is small; for example, pH test paper cannot display the pH value of oil. Furthermore, the accuracy of the pH value is limited by the method used. The use of a glass pH electrode is the main method for accurately determining pH, but it is not suitable for long-term use owing to susceptibility to mechanical damage, electrical interference, long preparation time, complex calibration, and other reasons; moreover, the detection targets are limited. Therefore, it is necessary to find a simple, noncontact, and reliable method to detect pH. In this study, a pH optical probe with good sensitivity, selectivity, reversibility, and stability was constructed using SERS technology, Au NPs as

reinforcement substrate, and R6G as a probe molecule. Our basic strategy and research results are expected to be helpful for the combination of pH detection with other fields and the tracking of pH changes in single molecules and tissue cells.

Methods In this study, Au NPs were used as the enhancement substrate and R6G was used as the probe molecule to output SERS signals. The pH value of the sample solution was rapidly and conveniently measured. First, Au NPs were prepared via chemical reduction, and the silicon wafers were modified using the soaking method to obtain four types of dispersed distributions; the particle size of the SERS-enhanced substrate was within the range of 30–100 nm. Second, the morphology, particle size, particle dispersion, and LSPR resonance frequency of Au NPs were characterized using scanning electron microscopy (SEM) and ultraviolet visible absorption spectroscopy. We explored the uniformity and reproducibility of the enhanced Raman signal and the influence of different R6G concentrations and Au NPs size on the SERS spectrum and finally select the appropriate molecular concentration of Au NPs and R6G probe for subsequent experiments. Subsequently, we measured the SERS spectrum changes of the probe molecules under different pH conditions and determined the linear relationship between the peak area ratio of SERS and the pH value of R6G at 1363 and 1314 cm^{-1} so as to design the pH sensor. In addition, we conducted experiments on recovery, stability, H^+ selectivity, and real sample pH value to explore the performance of the pH sensor.

Results and Discussions The 45 nm Au NPs substrate exhibited better enhancement effect, stability (Fig. 2) and uniformity of the Raman signal (Fig. 3). Because of the different inclination orientation of the deprotonated and protonated R6G molecules adsorbed on the enhanced base surface in closed- and open-loop forms, R6G exhibited different SERS activities at different pH levels (Fig. 4). We found a linear relationship between the SERS spectral peak area ratio of R6G and pH value at 1363 and 1314 cm^{-1} to design the pH sensor. Experimental results show that the SERS signal of R6G can be stabilized for more than 2 h at room temperature. The sensor showed good recoverability when the pH value of the sample solution was changed back and forth between 7 and 3 (Fig. 5). After the introduction of other interfering metal cations in the pH detection process, the probe showed better selectivity of H^+ (Fig. 6). The detection of the actual sample pH revealed that the probe has good analytical performance and that it is easy to detect the pH value in acidic mediums (Table 1).

Conclusions We explored the method of pH sensing using R6G molecules adsorbed on Au NPs. In the process of pH increasing from small to large values, R6G molecules changed from protonation in the form of an open ring to deprotonation in the form of a closed loop, and the angle between the R6G molecules on Au NPs' surface increased gradually, resulting in the interference of stretching vibration of the C—N bond connected with the benzene ring and C—C bond of the aromatic ring. We found a linear relationship between pH and the C—C and C—N frequencies. Results show that the probe has superior sensitivity, selectivity, reversibility, and stability. The SERS signal can be stabilized for more than 2 h at room temperature. Moreover, the probe has the ability to detect dynamic changes in pH, which can reflect the change in pH in actual acidic mediums. Compared with traditional pH-detection methods and other optical pH sensors based on the spectral response of synthetic probes, the pH sensor prepared in the present work has the advantages of high sensitivity, nondestructive detection, and good biological stability. The application range of the pH sensor is widened, the selected probe molecules are easy to obtain and economical, and the phenomena of photolysis and photobleaching do not occur easily in the detection process. The rhodamine group produces cationic stimulated SERS signals with strong fluorescence; this has good application prospects in SERS ultrasensitive single-molecule detection. Moreover, it is easy to be combined with other fields and has greater application prospects in tracking the pH changes in single molecules and tissue cells.

Key words spectroscopy; surface enhanced Raman scattering (SERS); pH sensor; R6G; gold nanoparticles (Au NPs)

OCIS codes 300.6450; 300.6490; 040.1880