

蘑菇孢子的表面增强拉曼光谱研究

安冉¹, 欧全宏¹, 刘刚^{1*}, 杨卫梅¹, 符致秋¹, 李建美¹, 时有明²

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 微生物在生态系统中具有重要的作用, 所以鉴别微生物具有重要的意义。采用表面增强拉曼光谱(SERS)对雪松花粉(PML)、双色牛肝菌(BBP)孢子、小美牛肝菌(BSF)孢子和紫色粉孢牛肝菌孢子(TPS)进行鉴别研究。结果显示:雪松花粉的常规拉曼信号在 1702, 1680, 1513, 1382, 1243, 1011, 793 cm^{-1} 处, 表面增强之后在 1698, 1653, 1592, 1516, 1403, 1288, 1210, 813, 562 cm^{-1} 出现明显的拉曼峰; 三种牛肝菌孢子的常规拉曼未显示拉曼峰, 雪松花粉、双色牛肝菌孢子、小美牛肝菌孢子和紫色粉孢牛肝菌孢子的表面增强拉曼光谱在 1700~1100 cm^{-1} 差异明显。结果表明, 利用 SERS 可以实现对雪松花粉、双色牛肝菌孢子、小美牛肝菌孢子和紫色粉孢牛肝菌孢子的鉴别。

关键词 光谱学; 表面增强拉曼光谱; 雪松花粉; 蘑菇孢子; 鉴别分析

中图分类号 O436

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP56.153001

Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Mushroom Spores

An Ran¹, Ou Quanhong¹, Liu Gang^{1*}, Yang Weimei¹, Fu Zhiqiu¹, Li Jianmei¹, Shi Youming²

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

² College of Physics and Electronic Engineering, Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 650011, China

Abstract Microorganisms play an important role in the ecosystem; thus, the identification of microorganisms is an important task. Herein, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is applied to identify pinus massoniana lamb pollen (PML), boletus bicolor peck (BBP) spores, boletus speciosus frost (BSF) spores, and tylopilus plumbeoviolaceus spores (TPS). Spectroscopy results indicate that, after the surface enhancement, the locations of the conventional Raman signal of PML are at 1702, 1680, 1513, 1382, 1243, 1011, and 793 cm^{-1} , with observable Raman peaks at 1698, 1653, 1592, 1516, 1403, 1288, 1210, 813, and 562 cm^{-1} . Three boletus spores identified via the conventional Raman spectroscopy do not exhibit any Raman peak, whereas the surface-enhanced Raman spectra of PML, BBP spores, BSF spores, and TPS are significantly different in the range of 1700-1100 cm^{-1} . Experimental results validate that SERS can effectively identify PML, BBP spores, BSF spores, and TPS.

Key words spectroscopy; surface-enhanced Raman spectroscopy; pinus massoniana lamb pollen; mushroom spores; discrimination analysis

OCIS codes 300.6450; 300.6490

1 引言

微生物包括细菌、病毒、真菌等, 在医学、农业生产、工业、环保、生物工程、生物学基础研究等领域有重要作用, 但是不同微生物的作用、功能不一, 所以鉴别、分类微生物具有重要的意义。微生物的常规鉴别方法是通过观察微观形貌特征进行的, 一些分

析技术, 如质谱分析法、聚合酶链式反应、荧光原位杂交技术等^[1-2] 也被用于微生物的分类鉴定, 但这些实验操作繁琐、耗时费力、成本高, 而且技术要求比较高。也有研究人员将共聚焦显微拉曼^[3]、傅里叶变换拉曼光谱^[4]、紫外共振拉曼光谱^[5] 等应用于微生物研究, 但也存在如下问题: 在可见激发常规拉曼测试过程中生物样品会产生强荧光干扰, 从而掩盖

收稿日期: 2019-02-20; 修回日期: 2019-03-03; 录用日期: 2019-03-07

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

* E-mail: gliu66@163.com

拉曼信号^[6];傅里叶变换拉曼的散射效率较低,采集样品累计时间长;紫外激光激发下,样品易因光分解而遭到破坏。

拉曼光谱是一种散射光谱,可以从拉曼光谱中简单快速鉴别生物样品。表面增强拉曼光谱的测量具有快速、灵敏度高、耗样量少、制样简单等优点,成为一种非常有潜力的微生物检测方法。表面增强拉曼光谱(SERS)技术具有很好的灵敏度,能够减少荧光干扰,现已应用于食品检测^[7-9]、生物^[10-11]、医药^[12-13]等领域。Li等^[14]利用表面增强拉曼光谱检测血清,诊断前列腺癌;郭晶等^[15]运用表面增强拉曼光谱技术对人类血清进行研究;Guedes等^[16]利用拉曼光谱鉴别空气中的花粉;贾潇潇等^[17]用表面增强拉曼光谱鉴定微生物;林居强等^[18]用表面增强拉曼光谱对肿瘤组织、肿瘤细胞,及癌症患者的血液进行研究。

雪松花粉(PML)、双色牛肝菌(BBP)孢子、小美牛(BSF)孢子肝菌和紫色粉孢牛肝菌孢子(TPS)等4种样品的颜色接近黄色、黄褐色,但作用各不相同,其中,雪松不仅具有观赏价值,其花粉还属于中药的一种,但与蘑菇孢子不易区分。本文采用表面增强拉曼光谱对雪松花粉、双色牛肝菌孢子、小美牛肝菌孢子和紫色粉孢牛肝菌孢子进行鉴别研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

实验仪器:拉曼光谱仪(ANDOR SR-500型,安道尔公司,英国);扫描电子显微镜(FEI Quanta250型,FEI公司,美国);紫外-可见分光光度计(UV-2600型,岛津公司,日本);智能多联磁力搅拌器(ZNCL-DLT型,250 mL,四联,上海瑞兹仪器设备有限公司,上海);高速离心机(TGL-16G型,上海安亭科学仪器厂,上海);超纯水器(UPT-I-20T型,四川优普超纯科技有限公司,四川),水电阻率为17~18 M Ω ·cm。

拉曼测试条件:用785 nm激光激发,检测器为热电冷却的iDUS 416 CCD检测器,光谱采集范围为200~3000 cm⁻¹,光谱分辨率为2 cm⁻¹,扫描时间为40 s,叠加为5次,到达样品上的功率约为6.4 mW。

实验试剂:硝酸银(纯度99.8%,上海旭达精细化工厂,上海),柠檬酸钠(纯度99.0%,天津市恒兴化学试剂制造有限公司,天津),结晶紫(天津市科密欧化学试剂有限公司)。实验中所用到的水均为超纯水。

2.2 不同粒径银纳米颗粒的制备

参考Lee等^[19]的方法,用柠檬酸钠还原硝酸银制备银溶胶,制取不同粒径的银纳米颗粒,检验不同粒径银纳米颗粒对表面增强的效果。实验前,将烧瓶、四氟磁子,以及与实验相关的玻璃仪器均在酸性溶液中浸泡,再用去离子水清洗干净,放干燥箱内烘干待用。制取不同直径的银纳米颗粒:称取硝酸银15 mg,去离子水定容至100 mL,将硝酸银溶液置于烧瓶中,在磁力搅拌器上直至沸腾,然后加入2 mL质量分数为1%的柠檬酸钠,保持沸腾,搅拌60 min,然后冷却至室温,记作P₁银纳米颗粒。同样的条件下,分别称取硝酸银16,17,18 mg,用去离子水定容至100 mL,将硝酸银溶液置于烧瓶中,在磁力搅拌器上直至沸腾,然后分别加入2 mL质量分数为1%的柠檬酸钠,保持沸腾,搅拌60 min,然后冷却至室温,分别记作P₂、P₃、P₄银纳米颗粒。将得到的银溶胶纳米颗粒溶液离心,去除上清液,再用去离子水洗涤4次,离心振荡,得到不同粒径的银纳米颗粒,放4℃冰箱中待用。

2.3 样品制备

雪松花粉的收集:采摘花穗,晒干,收集雪松花粉,除去杂质。牛肝菌孢子的制取:分别选取新鲜的双色牛肝菌、小美牛肝菌、紫色粉孢牛肝菌,剪去菌柄,将菌盖盖在光滑纸上,扣上玻璃罩,放置24 h,收集孢子。

2.4 样品的表面增强拉曼光谱采集

银纳米颗粒拉曼光谱测量:把离心后的银胶溶液滴加到硅片上,放入真空干燥箱晾干,然后置于激光显微拉曼光谱仪的物镜视野下,调焦后,采集拉曼光谱。雪松花粉,以及三种牛肝菌孢子的拉曼光谱测量:取少量的雪松花粉和牛肝菌孢子置于硅片上,使用盖玻片将粉末表面压平,放在样品台上,物镜选择50 \times ,然后用785软件进行拉曼光谱扫描。另外一组取少量雪松花粉与牛肝菌孢子样品置于硅片上,分别用移液枪滴加10 μ L银纳米颗粒溶液,待其成糊状后压平,然后晾干,测试拉曼光谱。实验获得的拉曼光谱数据均采用OMINC、Origin 8.6软件进行处理。

3 结果与讨论

3.1 银纳米颗粒

将制得的编号为P₁、P₂、P₃、P₄的4种银纳米颗粒经离心处理后滴加到硅片上,在真空干燥箱中晾干,之后于扫描电子显微镜(SEM)下检测得到电镜图(图1),可以观察到4种银纳米颗粒的形状和大

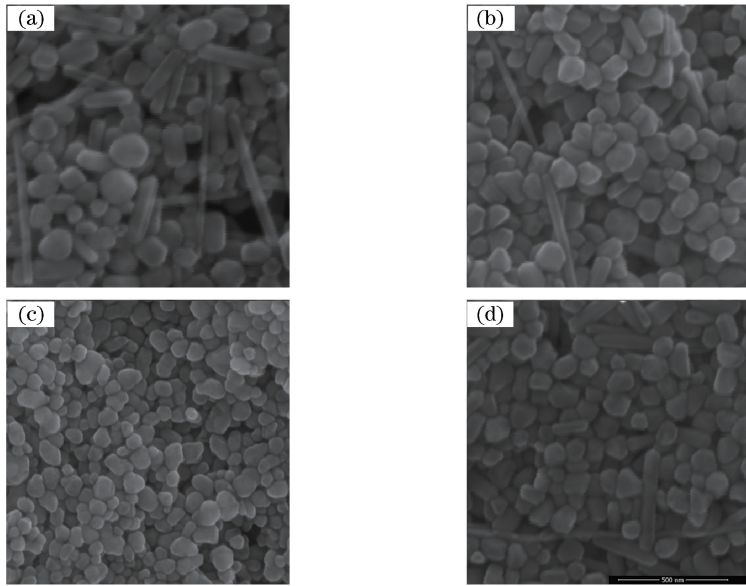


图1 不同粒径银纳米颗粒的 SEM 图。(a) P_1 银纳米颗粒;(b) P_2 银纳米颗粒;
(c) P_3 银纳米颗粒;(d) P_4 银纳米颗粒

Fig. 1 SEM images of silver nanoparticles with different particle diameters. (a) P_1 silver nanoparticles; (b) P_2 silver nanoparticles; (c) P_3 silver nanoparticles; (d) P_4 silver nanoparticles

小。从图1可以看出,所得的银纳米颗粒的大小、形状不同,同时有银纳米棒出现;且 P_1 、 P_2 、 P_4 有较多的银纳米棒,使得整体显得杂乱无序; P_3 的银纳米颗粒相对来说大小均匀,形状规则,且银纳米棒较少。采用 Nano Measurer 1.2 软件对 P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 的银纳米颗粒进行测量,图中 P_1 、 P_2 、 P_4 银纳米颗粒的粒径分别为 $0\sim 100$ nm、 $50\sim 100$ nm、 $100\sim 150$ nm,而 P_3 的银纳米颗

粒粒径大致为 $60\sim 80$ nm,范围较小,故本实验选择颗粒较为均匀的 P_3 作为表面增强拉曼实验的基底。

图2(a)为 P_3 银纳米颗粒的紫外-可见(UV-VIS)吸收光谱,吸收峰位于 400 nm;图2(b)为银纳米颗粒的尺寸分布(采用 Nano Measurer 1.2 软件统计),可以看出,银纳米颗粒的粒径主要分布范围为 $60\sim 80$ nm。

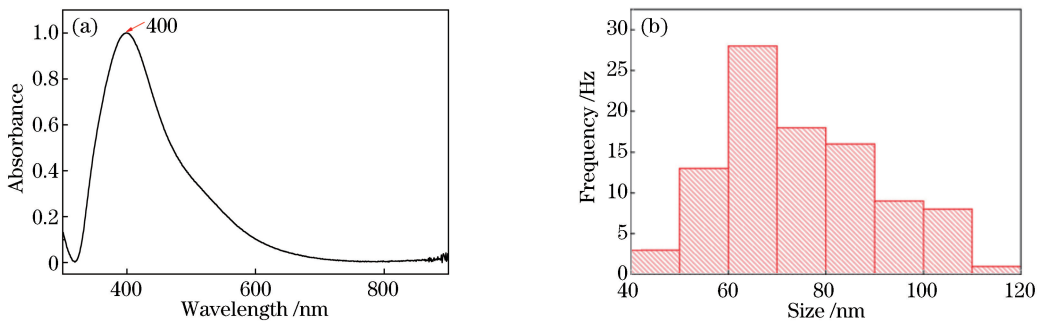


图2 银纳米颗粒的 UV-VIS 吸收光谱与尺寸分布。(a)银纳米颗粒的 UV-VIS 光谱;(b)银纳米颗粒的尺寸分布
Fig. 2 UV-VIS absorption spectrum and size distribution of silver nanoparticles. (a) UV-VIS spectrum of silver nanoparticles; (b) size distribution of silver nanoparticles

验证 4 种粒径银纳米颗粒的增强效果。图3(a)为掺有不同粒径的银纳米颗粒的浓度为 10^{-4} mol/L 结晶紫的表面增强拉曼光谱图,可以看出,4 种银纳米颗粒的结晶紫都具有增强的效果,并且 P_3 银纳米颗粒对结晶紫的增强效果在 1480 cm^{-1} 与 $800\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 最佳。图3(b)为结晶紫的拉曼光谱图。其中, P_0 是结晶紫的拉曼光谱,

只在 520 cm^{-1} 出现拉曼信号,这主要是因为单晶硅的拉曼振动峰来自衬底硅片,在其他范围没有出现拉曼信号; P_3 为基底对结晶紫的增强拉曼光谱图。两者对比可见, P_3 有明显的增强效果。因此,实验中以 17 mg 的硝酸银与 2 mL 质量分数为 1% 的柠檬酸钠制备的银纳米颗粒作为基底。

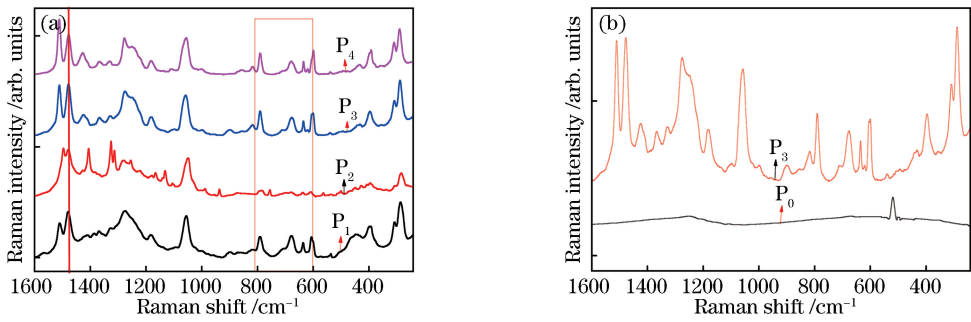


图3 银纳米颗粒的增强效果。(a)不同粒径的银纳米颗粒对相同浓度结晶紫的表面增强拉曼光谱图;(b)结晶紫拉曼光谱图
Fig. 3 Enhancement of silver nanoparticles. (a) SERS of silver nanoparticles with different particle diameters on same concentration of crystal violet; (b) Raman spectra of crystal violet

3.2 雪松花粉和三种牛肝菌孢子的 SEM 形态

图4为雪松花粉的SEM图。图4(a)为雪松花粉的SEM图,可以看出,雪松花粉表面光滑,直径约为60 μm,并且中间有一个沟壑将其分成两半;图4(b)是表面增强雪松花粉的SEM图,可以看出,在雪松花粉表层附有银纳米颗粒的小团簇,即图4(c),可以看出雪松花粉相比银纳米颗粒体型较大。

图5为三种牛肝菌孢子的SEM图。图5(a)为双色牛肝菌孢子,图5(b)为小美牛肝菌孢子,图5

(c)为紫色粉孢牛肝菌孢子。可以看出,三种牛肝菌孢子的形状相近,均为椭圆形,双色牛肝菌相比小美牛肝菌、紫色粉孢牛肝菌孢子较大。小美牛肝菌与紫色粉孢牛肝菌的孢子形态、大小几乎一致,从图中不能区分二者。从图5可以看到,牛肝菌孢子表面有形成的银纳米颗粒小团簇(白色部分),但从图中不易区分三种牛肝菌孢子。对比图4与图5可以明显观察到雪松花粉与牛肝菌孢子不同,从图4中可以鉴别出雪松花粉。

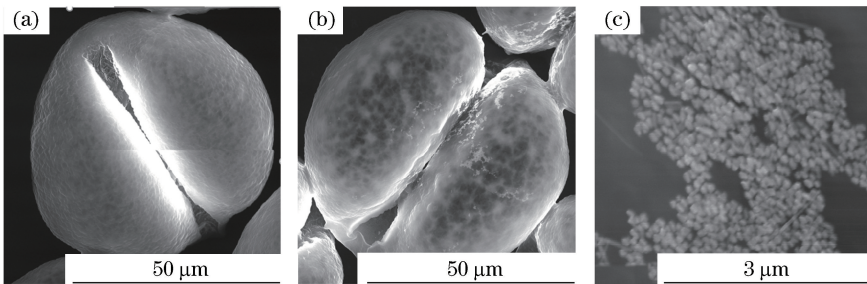


图4 雪松花粉 SEM 图。(a)雪松花粉;(b)表面增强雪松花粉;(c)表层的银纳米颗粒

Fig. 4 SEM images of PML: (a) PML; (b) surface-enhanced PML; (c) surface silver nanoparticles

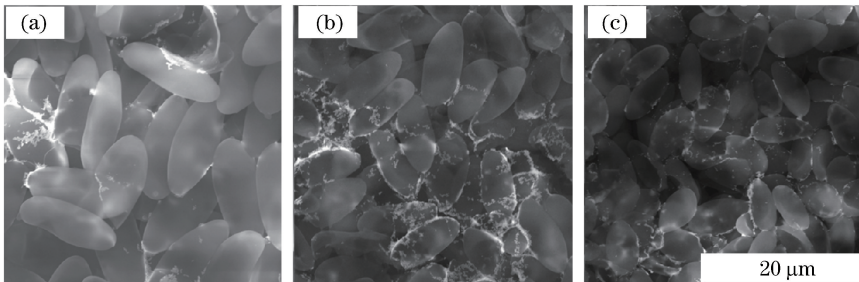


图5 有银胶体成簇的牛肝菌孢子 SEM 图。(a)双色牛肝菌孢子;(b)小美牛肝菌孢子;(c)紫色粉孢牛肝菌孢子

Fig. 5 SEM images of clustered boletus spores with silver colloid. (a) BBP spores; (b) BSF spores; (c) TPS

3.3 雪松花粉与紫色粉孢牛肝菌孢子的拉曼光谱图

图6为雪松花粉与紫色粉孢牛肝菌孢子在1800~450 cm⁻¹的拉曼光谱图。从图6(a)可以看

出,在此范围内,雪松花粉银溶胶的拉曼光谱几乎没有信号;拉曼光谱图中,1702, 1513, 1382, 1243, 1011, 793 cm⁻¹等位置出现了微弱的拉曼信号,在1680 cm⁻¹处出现了较强的拉曼信号,即在没有增

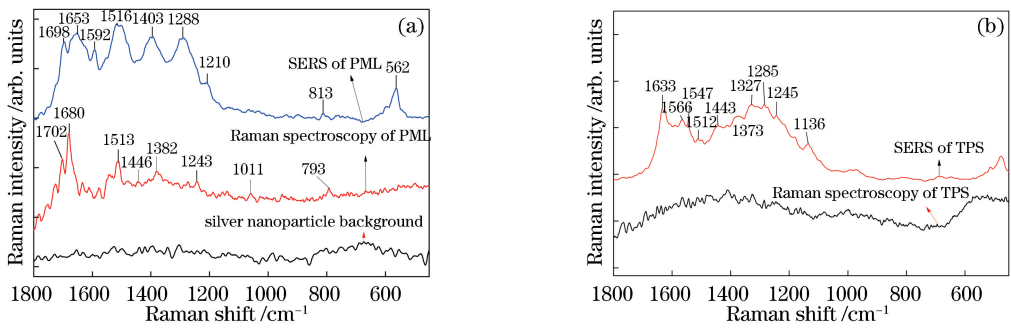


图6 在1800~450 cm^{-1} 范围内拉曼光谱图。(a)雪松花粉;(b)紫色粉孢牛肝菌孢子

Fig. 6 Raman spectra in range of 1800-450 cm^{-1} . (a) PML; (b) TPS

强的拉曼光谱中,除了1680 cm^{-1} 处信号较强外,其他位置的信号都比较弱;表面增强拉曼光谱图显示,1698,1653,1592,1516,1403,1288,1210,813,562 cm^{-1} 等位置均出现了明显的拉曼信号。在此区间,重要的振动峰位置有1653 cm^{-1} ,此处是酰胺I带中C=O双键的伸缩振动峰^[20-22],1592 cm^{-1} 处的强带也是花粉拉曼光谱的共同特征,对应于苯丙氨酸和酪氨酸^[20]。1403 cm^{-1} 处,是CN的伸缩振动和CH₃的对称伸缩振动对应的拉曼峰;1446 cm^{-1} 处,是CH₃的反对称振动峰。在1305~1252 cm^{-1} 区间,存在着一系列酰胺III中的N-H变角和C-N键伸缩振动峰^[23-25];在1288 cm^{-1} 及1011 cm^{-1} 处,存在两个苯丙氨酸残基的振动峰;以上振动峰均是蛋白质的振动峰。在1500~1200 cm^{-1} 区间有几个较宽的振动峰,对应C-H键的变形振动。813 cm^{-1} 处主要是C-C键和C-O键的对称伸缩振动峰,为多糖类的振动峰^[7,23-24]。在1446,1403,1382 cm^{-1} 处,存在一系列特征振动峰,都属于不饱和脂肪族链中CH₂/CH₃的变形振动峰^[26-28],由长链脂肪酸分子中的甲基、亚甲基产生。

图6(b)为紫色粉孢牛肝菌孢子在1800~450 cm^{-1} 的拉曼光谱图。紫色粉孢牛肝菌孢子拉曼光谱图由于受荧光干扰,几乎无任何信号出现;但表面增强拉曼光谱图显示,在1633,1566,1443,1373,1327,1285,1136 cm^{-1} 处出现了较强的拉曼信号,在1547,1512,1245 cm^{-1} 处出现拉曼信号,主要是孢子中所含的蛋白质、多糖的特征振动峰。图6(a)与图6(b)相比,雪松花粉的表面增强拉曼光谱在1698,1653,1592,1516,1403,1288,1210,813,562 cm^{-1} 等位置出现了信号,而紫色粉孢牛肝菌孢子的表面增强拉曼光谱主要在1633,1566,1547,1512,1443,1373,1327,1285,1245,1136 cm^{-1} 处出现了信号,两者的表面增强拉曼光谱信号强度以及

出现位置相差较大,易于区分。

3.4 雪松花粉与不同牛肝菌孢子的表面增强拉曼光谱图

图7为雪松花粉、双色牛肝菌孢子、小美牛肝菌孢子、紫色粉孢牛肝菌孢子在1800~450 cm^{-1} 的表面增强拉曼光谱图。从图中可以看出,雪松花粉在1697,1653,1592,1516,1400,1288,1212 cm^{-1} 出现了明显的拉曼信号,与三种牛肝菌孢子的拉曼信号差别较大。与雪松花粉相比,双色牛肝菌孢子的表面增强拉曼信号较为清晰,分别在1635,1571,1442,1331,1224,1232 cm^{-1} 出现了较强的拉曼信号,但两者出现拉曼信号的位置以及信号强度相差较大,这是由于细胞中组成蛋白质的氨基酸种类不同;因此,表面增强拉曼光谱可以鉴别雪松花粉与双色牛肝菌孢子。小美牛肝菌的拉曼信号在1623,1566,1408,1330,1241,1145 cm^{-1} 处;紫色粉孢牛肝菌孢子的拉曼信号主要在1700~1100 cm^{-1} ,出现的拉曼信号较为密集,强度不明显。因此,从表面增强拉曼光谱可以识别出雪松花粉与三种牛肝菌孢子。

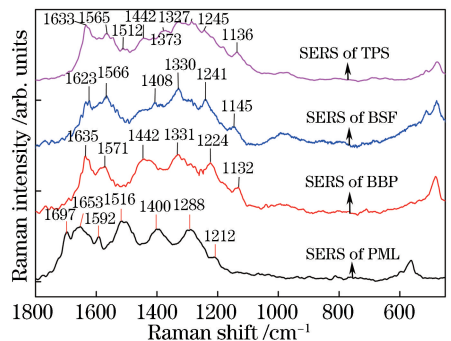


图7 雪松花粉以及三种牛肝菌孢子在1800~450 cm^{-1} 的表面增强拉曼光谱图

Fig. 7 SERS diagrams of PML and three boletus spores in range of 1800-450 cm^{-1}

对比图7中三种牛肝菌孢子的表面增强拉曼光谱;双色牛肝菌孢子的表面增强拉曼信号主要在

1635, 1571, 1442, 1331, 1224, 1232 cm^{-1} 处, 小美牛肝菌的表面增强拉曼信号主要在 1623, 1566, 1408, 1330, 1241, 1145 cm^{-1} 处, 紫色粉孢牛肝菌的表面增强拉曼信号主要在 1633, 1565, 1547, 1512, 1442, 1373, 1327, 1285, 1245, 1136 cm^{-1} 处。三种孢子的表面增强拉曼信号主要在 1634~1136 cm^{-1} 。双色牛肝菌孢子在 1331 cm^{-1} 处出现了较强的拉曼信号, 这主要是酰胺 III 中的 N-H 变角和 C-N 键伸缩振动; 小美牛肝菌孢子的拉曼信号较弱, 最强峰在 1330 cm^{-1} 处; 紫色粉孢牛肝菌孢子的表面增强拉曼信号主要在 1700~1100 cm^{-1} , 并且出现的拉曼峰较多。可以看出, 三种孢子的拉曼信号差别较大。实验结果表明: 雪松花粉与双色牛肝菌孢子、小美牛肝菌孢子、紫色粉孢牛肝菌孢子的拉曼峰的位置以及强度不同, 根据拉曼信号的强度和位置能鉴别三种牛肝菌孢子。

3.5 主成分分析

由于双色牛肝菌孢子和小美牛肝菌孢子的拉曼原始光谱相近, 故采用主成分分析^[29]对光谱进行降维。选择雪松花粉、双色牛肝菌孢子、小美牛肝菌孢子、紫色粉孢牛肝菌孢子拉曼光谱数据, 对其进行主成分分析。从 4 种样品的主成分可以看出, 主成分 1 对总方差的贡献率为 63%, 主成分 2 对总方差的贡献率为 20%, 主成分 1、主成分 2 和主成分 3 的累计贡献率达到 96%, 说明可以用前三个主成分来显示样品之间的关系, 主成分分析可以用于区分雪松花粉、双色牛肝菌孢子、小美牛肝菌孢子、紫色粉孢牛肝菌孢子。

4 结 论

实验表明, 利用表面增强拉曼光谱可以鉴别不同种类的微生物, 利用 17 mg 的硝酸银与 2 mL 质量分数为 1% 的柠檬酸钠制备的银纳米颗粒具有较强的增强效果。实验所选用的雪松花粉, 其拉曼光谱在 1653 cm^{-1} 附近主要是蛋白质的特征振动峰, 在 1500~1200 cm^{-1} 主要是多糖的特征振动峰, 在 1680 cm^{-1} 主要是脂类的特征振动峰。三种牛肝菌孢子在 1800~450 cm^{-1} 的拉曼光谱图差别较大, 用表面增强拉曼光谱和主成分分析易于区分三种牛肝菌孢子。因此, 根据表面增强拉曼光谱能够快速准确地鉴别雪松花粉、双色牛肝菌孢子、小美牛肝菌孢子和紫色粉孢牛肝菌孢子。

参 考 文 献

[1] Hügler M, Böckle K, Eberhagen I, *et al.* Detection

and quantification of *E. coli* and coliform bacteria in water samples with a new method based on fluorescence *in situ* hybridisation [M] // Kay D, Fricker C. The significance of faecal indicators in water: a global perspective. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2012: 123-130.

- [2] Kenzaka T, Yamaguchi N, Utrarachkij F, *et al.* Rapid identification and enumeration of antibiotic resistant bacteria in urban canals by microcolony-fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Journal of Health Science*, 2006, 52(6): 703-710.
- [3] Puppels G J, de Mul F F M, Otto C, *et al.* Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy [J]. *Nature*, 1990, 347(6290): 301-303.
- [4] Williams A C, Edwards H G M. Fourier transform Raman spectroscopy of bacterial cell walls [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1994, 25(7/8): 673-677.
- [5] Chadha S, Manoharan R, Moënné-Loccoz P, *et al.* Comparison of the UV resonance Raman spectra of bacteria, bacterial cell walls, and ribosomes excited in the deep UV [J]. *Applied Spectroscopy*, 1993, 47(1): 38-43.
- [6] Ngundi M M, Qadri S A, Wallace E V, *et al.* Detection of deoxynivalenol in foods and indoor air using an array biosensor [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(7): 2352-2356.
- [7] Zajac A, Hanuza J, Dymińska L. Raman spectroscopy in determination of horse meat content in the mixture with other meats [J]. *Food Chemistry*, 2014, 156: 333-338.
- [8] Haughey S A, Galvin-King P, Ho Y C, *et al.* The feasibility of using near infrared and Raman spectroscopic techniques to detect fraudulent adulteration of chili powders with Sudan dye [J]. *Food Control*, 2015, 48: 75-83.
- [9] Özbacı B, Boyacı İ H, Topcu A, *et al.* Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3/4): 1444-1452.
- [10] Nakashima S, Ogura T, Kitagawa T. Infrared and Raman spectroscopic investigation of the reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2015, 1847(1): 86-97.
- [11] Orelis C C, Beiboer S H W, Morsink M C, *et al.*

- Comparison of Raman spectroscopy and two molecular diagnostic methods for Burkholderia cepacia complex species identification[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 107: 126-132.
- [12] Gao Q, Liu Y, Li H, *et al.* Comparison of several chemometric methods of libraries and classifiers for the analysis of expired drugs based on Raman spectra [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 94: 58-64.
- [13] Boiret M, Rutledge D N, Gorretta N, *et al.* Application of independent component analysis on Raman images of a pharmaceutical drug product: pure spectra determination and spatial distribution of constituents [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 90: 78-84.
- [14] Li S X, Zhang Y J, Xu J F, *et al.* Noninvasive prostate cancer screening based on serum surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine[J]. *Applied Physics Letters*, 2014, 105(9): 091104.
- [15] Guo J, Rong Z, Xiao R, *et al.* Application of surface-enhanced Raman spectroscopy in human serum[J]. *Military Medical Sciences*, 2016, 40(4): 350-352.
郭晶, 荣振, 肖瑞, 等. 表面增强拉曼光谱在人类血清中的应用[J]. *军事医学*, 2016, 40(4): 350-352.
- [16] Guedes A, Ribeiro H, Fernández-González M, *et al.* Pollen Raman spectra database: application to the identification of airborne pollen[J]. *Talanta*, 2014, 119: 473-478.
- [17] Jia X X, Li J, Qin T, *et al.* Current views on surface enhanced Raman spectroscopy in microbiology [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(5): 611-620.
贾潇潇, 李晶, 秦天, 等. 表面增强拉曼光谱技术在微生物鉴定中的应用进展[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(5): 611-620.
- [18] Lin J Q, Ruan Q Y, Chen G N, *et al.* Research progress of surface enhanced Raman spectroscopy for cancer detection [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(8): 080020.
林居强, 阮秋咏, 陈冠楠, 等. 基于表面增强拉曼散射技术的癌症检测研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(8): 080020.
- [19] 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.
- [20] Félix-Rivera H, Hernández-Rivera S P. Raman spectroscopy techniques for the detection of biological samples in suspensions and as aerosol particles: a review[J]. *Sensing and Imaging: An International Journal*, 2012, 13(1): 1-25.
- [21] Ivleva N P, Wagner M, Horn H, *et al.* Towards a nondestructive chemical characterization of biofilm matrix by Raman microscopy [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(1): 197-206.
- [22] Liu C, Yin Y. Inherent optical properties of pollen particles: a case study for the morning glory pollen [J]. *Optics Express*, 2016, 24(2): A104-A113.
- [23] Yan B, Li B, Wen Z N, *et al.* Label-free blood serum detection by using surface-enhanced Raman spectroscopy and support vector machine for the preoperative diagnosis of parotid gland tumors [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 650.
- [24] Yonzon C R, Haynes C L, Zhang X Y, *et al.* A glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering: improved partition layer, temporal stability, reversibility, and resistance to serum protein interference[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(1): 78-85.
- [25] Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I U. Raman spectroscopy of biological tissues [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2007, 42(5): 493-541.
- [26] Sigurdsson S, Philipsen P A, Hansen L K, *et al.* Detection of skin cancer by classification of Raman spectra [J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2004, 51(10): 1784-1793.
- [27] Vandenabeele P, Wehling B, Moens L, *et al.* Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 407(1/2): 261-274.
- [28] Leroy M, Labbé J F, Ouellet M, *et al.* A comparative study between human skin substitutes and normal human skin using Raman microspectroscopy[J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(6): 2703-2711.
- [29] Hua X, Zhang G, Yang J W, *et al.* Theory study and application of the BP-ANN method for power grid short-term load forecasting [J]. *ZTE Communications*, 2015(3): 2-5.