

激光与光电子学进展

纳米薄膜基底对表面增强拉曼光谱检测环丙沙星的影响

郭义乾¹, 王红艳², 秦苗², 曾一达^{1*}, 夏丽³, 胡扬坡³¹南昌航空大学航空制造工程学院, 江西 南昌 330063;²宿州学院化学化工学院, 安徽 宿州 234099;³江西洪都航空工业集团有限责任公司, 江西 南昌 330024

摘要 基于金纳米颗粒薄膜基底和金纳米棒薄膜基底, 使用表面增强拉曼光谱(SERS)技术对环丙沙星(CIP)的含量进行了分析检测, 为食品中CIP残留检测提供了新方法。通过使用柠檬酸钠还原氯金酸制备金纳米颗粒胶体, 以及通过晶种生长法制备金纳米棒胶体, 以应用于SERS增强基底。通过不同激发光波长对CIP进行SERS检测, 确定了最佳激光波长为780 nm。使用校正集CIP标准溶液, 建立CIP浓度-SERS信号强度的工作曲线, 使用检验集样本观察工作曲线的预测能力。结果表明: 使用金纳米颗粒基底进行CIP的SERS检测, 回收率在97.1%~105.0%; 使用金纳米棒基底进行SERS检测, 回收率在96.3%~121.8%。因此, SERS在检测CIP抗生素领域具有高灵敏度、快速检测等优势。

关键词 医用光学与生物技术; 表面增强拉曼光谱; 环丙沙星; 金纳米颗粒; 金纳米棒

中图分类号 O657.37

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP202259.2317001

Effect of Nano-Film Substrates on Ciprofloxacin Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Guo Yiqian¹, Wang Hongyan², Qin Miao², Zeng Yida^{1*}, Xia Li³, Hu Yangpo³¹School of Aeronautical Manufacturing Engineering, Nanchang Hangkong University, Nanchang 330063, Jiangxi, China;²School of Chemistry & Chemical Engineering, Suzhou University, Suzhou 234099, Anhui, China;³Jiangxi Hongdu Aviation Industry Co., Ltd., Nanchang 330024, Jiangxi, China

Abstract Based on gold nanoparticle and gold nanorod film substrates, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) technology is used to detect the content of ciprofloxacin (CIP), providing a new mode of detecting ciprofloxacin residues in food. The gold nanoparticle colloid is prepared by using sodium citrate to reduce chloroauric acid, whereas the gold nanorod colloid is prepared by the seed growth method, and then applied to the SERS reinforced substrate. SERS detection of CIP is conducted using different excitation light wavelengths, and the optimal laser wavelength is determined to be 780 nm. The calibration-set CIP standard solution is used to establish a working curve of CIP concentration-SERS signal intensity, and the validation-set standard samples are used to observe the predictive ability. The results show that the recovery rates of SERS detection for CIP using gold nanoparticle and gold nanorod substrates are approximately 97.1%–105.0% and 96.3%–121.8%, respectively. This confirms that SERS has advantages of high sensitivity and rapid detection potential in the field of detecting CIP antibiotics.

Key words medical optics and biotechnology; surface-enhanced Raman spectroscopy; ciprofloxacin; gold nanoparticles; gold nanorods

1 引言

环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)属于喹诺酮类抗生素, 在人体中可以抑制或杀死的细菌种类和范围较广, 但对于消化系统和神经系统存在毒性作用^[1]。根据

《食品安全国家标准-食品中兽药最大残留限量》(GB 31650-2019)中的规定, 在鸡肉中恩诺沙星和CIP之和的最大残留量为100 μg/kg^[2]。

目前广泛使用高效液相色谱法(HPLC)以及分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法(QuEChERS-

收稿日期: 2021-10-19; 修回日期: 2021-11-19; 录用日期: 2021-11-29

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2020A0730, KJ2019A0669)、国家自然科学基金(52105451)、江西省重点研发计划(20202BBEL53029)、轻合金加工科学与技术国防重点学科实验室开放课题研究基金(EG202003411)

通信作者: *394764103@qq.com

UPLC-MS/MS)等方法,用于检测 CIP 或其他抗生素的含量。HPLC 测定喹诺酮类抗生素的检出限为 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 $82\% \sim 105\%$,标准偏差为 $4\% \sim 12\%$,但操作过程繁琐,仪器不便携带^[3-4]。QuEChERS-UPLC-MS/MS 集中了色谱与质谱的特点,测定喹诺酮类抗生素的检出限为 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,平均回收率为 $72\% \sim 121\%$,相对标准偏差为 $1.5\% \sim 23.4\%$ ^[5]。但是由于 HPLC 和 QuEChERS-UPLC-MS/MS 设备费用昂贵,需经专业培训的人员进行检测,实验操作流程复杂繁琐,检测多个样本耗时较长,很难进行样本大批量快速检测。

表面增强拉曼光谱(SERS)技术是指在激光的照射下,基底表面产生等离子共振,引起局域电磁场大大增强,使得吸附在基底表面的待测物质的拉曼信号成倍增强,增强效果约为数百万倍^[6]。SERS 具有灵敏度高、生物指纹信息特征明显、准确可靠、成本较低、可批量检测等特点^[7]。Zhang 等^[8]通过使用银溶胶基底检测水中总氮和总磷含量,其模型预测的相关系数为 0.9985,均方误差为 0.0376;Jin 等^[9]通过气液界面自组装制备了金纳米颗粒单层膜作为 SERS 基底,对于邻巯基苯甲酸进行拉曼检测,推广了表面等离子体共振催化的表面反应机理;Yang 等^[10]利用制备的银胶体对草甘膦农药进行 SERS 检测,检测限可达 $1.8 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$ 。可见使用不同的 SERS 基底,由于纳米粒子材料、形状、尺寸与间距不同,对于抗生素类物质的检测灵敏度及检出限存在差异^[11]。一般而言,纳米级薄膜基底的粗糙度会直接影响拉曼信号的增强,甚至会存在数量级的差别^[12]。因此本文基于不同基底观察 CIP 的 SERS 谱图差异。

本文制备了两种常用的 SERS 薄膜基底,即金纳米颗粒(Au NPs)薄膜增强基底与金纳米棒(Au NRs)薄膜增强基底。通过检测校正集中的 CIP 抗生素样本的实验,将所得到的拉曼特征峰信号进行线性拟合并获取线性方程。通过观测检验集样本的回收率进而判

断线性方程预测能力。本文主要目的是探究 SERS 技术检测 CIP 抗生素的准确性与可靠性,为实现食品类中 CIP 抗生素的检测提供理论支持。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

实验仪器:紫外-可见分光光度计(UV-2550 型,岛津公司,日本);便携式拉曼光谱仪(Spk-2-0588 型,上海如海光电有限公司,上海);扫描电子显微镜(FEI Sirion-200 型,岛津公司,日本);高速离心机(TGL-16G 型,上海安亭科学仪器厂,上海)。

实验试剂:实验用的鸡肉购于某菜市场;CIP 标准品(纯度为 99.0%);氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $M=393.83$,其中金含量 $>49.0\%$,美国 Sigma-Aldrich 公司);柠檬酸钠溶液(含量 $>99.0\%$);硝酸银溶液(浓度为 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$);浓盐酸(含量 $36\% \sim 38\%$);浓硝酸(含量 $65\% \sim 68\%$);浓硫酸(含量 $95\% \sim 98\%$);抗坏血酸(Ascorbic Acid, AA)、十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)、乙醇、正己烷、乙腈(分析纯);双氧水(过氧化氢的浓度为 30%);硼氢化钠溶液(浓度为 $0.01 \text{ mol}/\text{L}$);无水硫酸钠(纯度 $>99.0\%$);实验用水为超纯水。

2.2 双金胶的制备与样品处理

Au NPs 增强基底的制备:根据郭浩等^[13]所述的方法,对其进行改进以便更适用于 CIP 的快速检测。在三口烧瓶内缓慢加入 99 mL 的超纯水和 1 mL 氯金酸溶液且混合均匀,缓慢加热至出现微沸的现象;出现微沸时,缓慢加入 4 mL 质量分数为 1% 柠檬酸钠溶液, 30 min 后停止加热。冷却至室温后进行离心并去除上清液,此时得到呈现出酒红色的 Au NPs 溶胶。取 $5 \mu\text{L}$ 的 Au NPs 溶胶滴在作为衬底的硅片上,自然干燥至在硅片上只留一层金色薄膜,得到 Au NPs 增强基底,组装过程如图 1 所示。

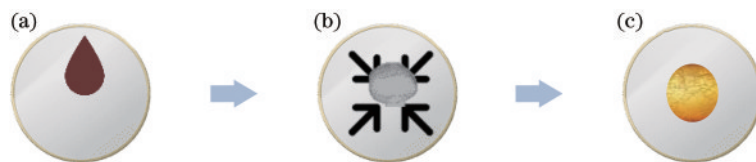


图 1 金纳米增强基底组装过程示意图。(a) $5 \mu\text{L}$ 的金纳米溶胶滴在作为衬底的硅片上;(b) 金胶体自然干燥过程中体积减小;(c) 金胶体完全干燥后在硅片上形成金色薄膜

Fig. 1 Schematic diagram of assembly process of gold nano-colloid enhanced substrate. (a) $5 \mu\text{L}$ of gold nano-colloids are dropped onto silicon wafer as substrate; (b) volume of gold colloids decrease during natural drying; (c) gold colloids are dried completely to form golden films on silicon wafers

Au NRs 增强基底的制备:参考潘碧峰等^[14]所述的方法,对其进行改进以便更好地应用于 CIP 的检测:在 25 mL 的锥形瓶内,加入 $10 \mu\text{L}$ 的 CTAB、 $103 \mu\text{L}$ 的氯金酸溶液,在恒温磁力搅拌器上安装固定住 250 mL 的锥形瓶,温度为 $28 \text{ }^\circ\text{C}$,转速为 $500 \text{ r}/\text{min}$, 5 min 后加入 $0.01 \text{ mol}/\text{L}$ 的硼氢化钠溶液,混匀,制得 $2 \sim 3 \text{ mmol}/\text{L}$ 、

粒径在 $3 \sim 5 \text{ nm}$ 之间的晶种溶液。在恒温磁力搅拌器上放置 250 mL 的锥形瓶,设置温度 $28 \text{ }^\circ\text{C}$,转速为 $500 \text{ r}/\text{min}$ 。缓慢加入已配置的 $200 \mu\text{L}$ CTAB、 2 mL 硝酸银溶液、 4.12 mL 氯金酸溶液、 2 mL 的 $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 硝酸溶液,迅速加入 1.2 mL 的抗坏血酸,搅拌 10 min 后制得生长液。将晶种溶液正常速度加入到生长液

中。搅拌 4 min 后放入恒温水浴锅中, 24 h 后进行离心。取 5 μL 离心后的 Au NRs 溶胶滴在硅片上, 自然干燥后得到 Au NRs 固体薄膜基底(如图 1)。

标准溶液的配制及其组装: 称取适量的 CIP 标准品, 使用超纯水定容得到质量分数为 100×10^{-6} 的 CIP 标准溶液, 使用时逐级稀释到 0.1×10^{-6} 、 0.5×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 10×10^{-6} 。取稀释后的 CIP 标准溶液 5 μL 滴在两种不同的增强基底上, 自然干燥至半透明薄膜状态, 形成含有待测液薄膜的待测芯片。

鸡肉提取液的配制及其组装: 制备鸡肉提取液最关键的两步分别是抗生素的提取以及生物大分子的去除。本文采取较为普遍的提取禽类体内抗生素的方法: 通过加入体积分数为 2%、 $\text{pH}=6$ 的盐酸的乙腈溶液以便于提取出鸡肉中的抗生素。在超声提取、离心操作后获取上清液, 通过加入正己烷进行脱脂以及加入无水硫酸钠使得蛋白质变性, 再次离心后的下层液体即为鸡肉提取液。准确称量 CIP 药品, 精确制备质量分数为 2.0×10^{-6} 的 CIP 的鸡肉提取液样品, 滴在不同的增强基底上, 制备含有鸡肉加标液薄膜的待测芯片。

2.3 表面增强拉曼光谱的检测条件

拉曼光谱仪的参数设置为: 激光功率 500 mW, 分

辨率 2 cm^{-1} , 选取光谱范围 $-70 \sim 2875 \text{ cm}^{-1}$ 作为光谱的扫描范围, 积分时间为 5 s, 积分 4 次, 取平均值。研究 $600 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ 的光谱波段。

本文所述的 SERS 基底制备过程是目前使用最为广泛的方法, 但也存在“咖啡环”效应: 该效应是指“咖啡”滴在物体表面上, 自然干燥后会形成深色环状物, 这是一种边缘颜色比中间更深的现象, 是一种自组装、致密堆积的环形立体结构。“咖啡环”的优越性在于该位置存在大量的 SERS 基底热点^[15], 增加了 SERS 检测的灵敏度。故在使用 SERS 增强基底时, 需要时刻注意测量“咖啡环”位置, 基底中间位置的 SERS 信号增强效果可能不明显。

2.4 SERS 数据处理方法

使用 SERS 基底检测 CIP 药物时, 原始 SERS 不仅含有 CIP 本身的拉曼信号, 而且存在干扰信号, 如图 2(a) 所示。干扰信号主要来自于荧光背景^[16]。为了准确获取 CIP 药物的拉曼信号强度, 本文采用 LabSpec 软件中的 Baseline 扣除功能获取去除荧光背景后的 SERS, 操作窗口如图 2(b) 所示。图 2(c) 为去除荧光背景后的 SERS 图, 可以看出干扰信号得到了有效的去除。此外使用 Origin 软件进行曲线平滑处理。

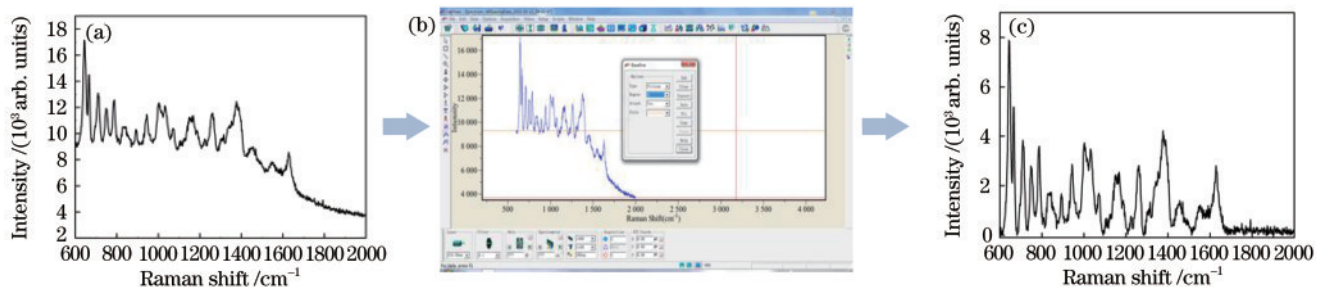


图 2 SERS 预处理。(a) 原始 SERS; (b) LabSpec 软件操作界面; (c) 预处理后的 SERS

Fig. 2 SERS pretreatment. (a) Original SERS; (b) LabSpec software operation interface; (c) SERS after pretreatment

3 结果与讨论

3.1 不同纳米基底的表征

提升拉曼光谱信号强度的前提是 SERS 基底的应用, 不同的基底在拉曼信号增强方面差别很大。目前广泛应用金属纳米粒子制备的 SERS 增强基底, 其制备速度快, 稳定性、均一性能好^[17]且具备优异的催化活性和生物兼容性^[18]而被广大学者所接受。本文分别制备了 Au NPs 和 Au NRs 的 SERS 增强基底。

将 500 μL 的自制金胶加 1 mL 超纯水稀释, 用超纯水作为吸收峰背景, 进行紫外可见吸收(UV-vis)光谱的检测。图 3(a) 为 Au NPs 胶体的 UV-vis 光谱。位于 520 nm 左右出现最大吸收峰, 是金胶体典型的离子吸收共振峰。吸收峰谱线对称, 半峰全宽窄, 说明制备的 Au NPs 溶胶的单分散性能好, 可悬浮在液体介质中且不聚集, 尺寸均匀且粒径统一^[19]。

图 3(b) 为 Au NRs 胶体的 UV-vis 光谱。从图中可以看出: 存在位于 511 nm 处的横向等离子共振峰, 以及 757 nm 处的吸光度较强的纵向等离子共振峰, 这是 Au NRs 的 UV-vis 光谱的典型特征。Au NRs 轴比、形状大小方面等与纵向等离子共振峰的位置有关。Brioude 等^[20]在进行模拟连续粒子时, 使用了大量偶极子组成的阵列, 通过求解得到物体吸收与散射电磁波的性质, 即使用离散偶极近似模拟(DDA)的方法求解得到了 λ_{max} 与 r_{AR} 的线性关系式^[20]为

$$\lambda_{\text{max}} = 96r_{\text{AR}} + 418, \quad (1)$$

式中: λ_{max} 表示长波纵向表面等离子体共振吸收峰的峰位, 统一量纲为 nm; r_{AR} 表示 Au NRs 的长径比; 418 为常数。在本次表征中可以观察到 λ_{max} 数值为 757, 因此 $r_{\text{AR}}=3.52$ 。此数值可能偏大且仅可以表示 Au NRs 的平均长径比, 无法准确表现出长径比分散性的信息^[21], 故需要通过扫描电子显微镜(SEM)进一步表征观察长径比的分散情况。

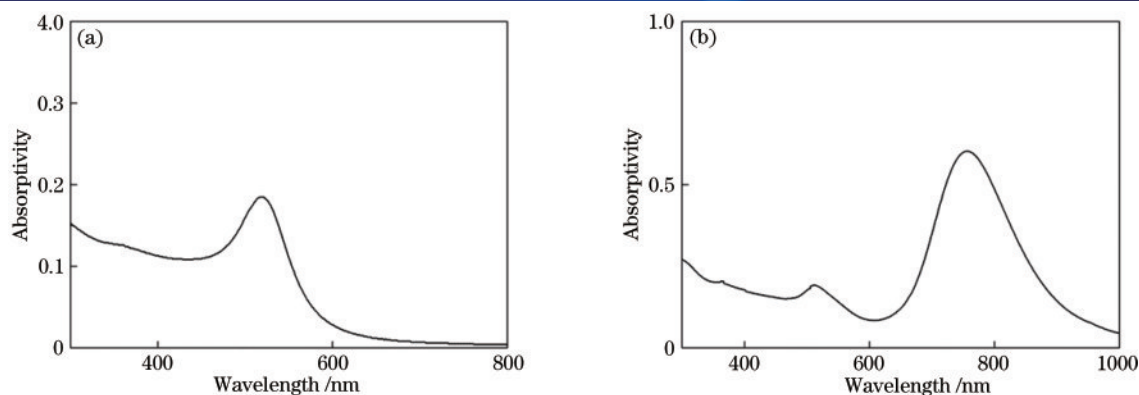


图3 自制金胶的UV-vis光谱。(a) Au NPs;(b) Au NRs

Fig. 3 UV-vis spectra of self-made gold colloids. (a) Au NPs; (b) Au NRs

设置SEM仪器工作参数为:工作距离4.9 mm;加速高压5.0 kV;放大倍数83.85 Kx;探测器信号类型Signal A = InLens。图4(a)为Au NPs的SEM图,通过Nano Measurer软件分析得到图4(a)插图,其中Au NPs平均粒径为60 nm。从图4中可以看出,Au NPs分散均匀,未出现团聚的现象,这是因为制备时使用了柠檬酸钠,这不仅起到了还原剂的作用,同时还起到了稳定剂的作用^[22]。图4(b)为Au NRs的SEM图,其中

的Au NRs纯净且未出现其长径比不均匀或不一致的情况,其主要机理是反应时形成了易出现晶体结构的Ag进而促进了Au NRs的单向性生长^[9],图4(b)所反映的现象完全符合其生长机理,故可以通过晶种生长法大批量、规模性地制备Au NRs材料。纳米棒状结构具备较大的“避雷针效应”的优势,粒子尖端处在激光照射下会产生极强的局域表面电磁场,可极大增强拉曼信号强度^[23-24]。

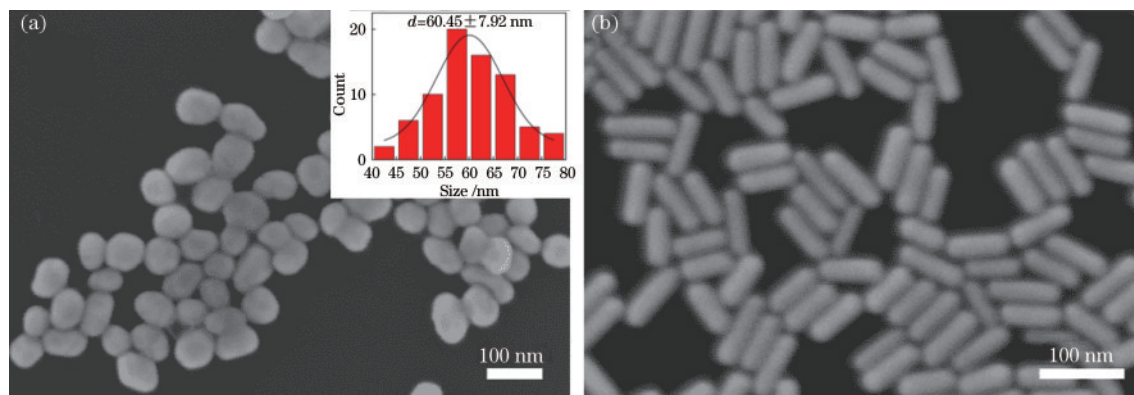


图4 金纳米粒子的SEM形貌。(a) Au NPs以及粒径分布图;(b) Au NRs

Fig. 4 SEM morphology of gold nanoparticles. (a) Au NPs and particle size distribution; (b) Au NRs

3.2 CIP的分子结构和普通拉曼光谱(NRS)振动峰指认

对于CIP固体粉末进行NRS检测。通过对CIP的拉曼信号采集和相关文献^[25-26]对其特征峰进行归属和指认(见表1)。从图5中可以看出,判断CIP的主要特征峰为:1026 cm^{-1} 处的哌嗪环的面内变形振动以及环上的 $-\text{CH}_2$ 基团的面内摆动;1136 cm^{-1} 处的萘啶环上的 $\text{C}=\text{O}$ 键的伸缩振动;1172 cm^{-1} 处的亚甲基的面内变形转动;1267 cm^{-1} 处的萘啶环的环呼吸振动;1384 cm^{-1} 处的萘啶环的环呼吸振动以及哌嗪环上的 $\text{C}-\text{H}$ 摇摆振动。位于1384 cm^{-1} 处的拉曼峰,相较于其他的拉曼信号所得到的信号强度最高。

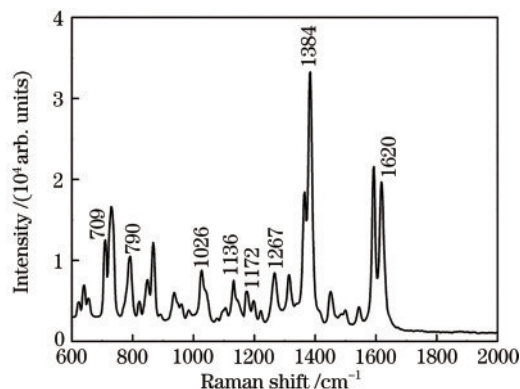


图5 CIP的NRS

Fig. 5 Normal Raman spectra (NRS) of CIP

表 1 NRS、基于 Au NPs 基底的 SERS 和基于 Au NRs 基底的 SERS 的 CIP 主要峰归属

Table 1 Main peak attribution of NRS, SERS based on Au NPs substrate and Au NRs substrate of CIP

NRS / cm^{-1}	SERS based on Au NPs / cm^{-1}	SERS based on Au NRs / cm^{-1}	Attribution of characteristic peaks
709	709	707	$\gamma(\text{C}-\text{C})_{\text{ring}} + \gamma(\text{C}=\text{O})_{\text{ring}}$
790	786	782	$\gamma(\text{C}-\text{N})_{\text{ring}} + \gamma(\text{C}-\text{H})_{\text{ring}}$
1026	1032	1039	$\delta(\text{C}-\text{N})_{\text{ring}} + \delta(\text{C}-\text{C})_{\text{ring}} + \delta(\text{CH}_2)_{\text{rock}}$
1136	-	1142	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{ring}}$
1172	1167	-	$\delta(\text{CH}_2)_{\text{twist}}$
1267	1261	1269	ring breathing
1384	1378	1389	$\text{vas}(\text{C}-\text{C})_{\text{benzene}} + \nu(\text{C}-\text{H})_{\text{rock}}$
1620	1630	-	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{ring}} + \nu(\text{C}=\text{C})_{\text{ring}}$

Notes: 1) ν represents stretching vibration; δ represents scissor vibration; γ represents out-of-plane bending vibration; 2) as asymmetric

3.3 基于不同激光波长对于 CIP 的 SERS 分析

基于 Au NPs 增强基底,对比分析了在 780、633 nm 的激光光源下, 10×10^{-6} 的 CIP 的拉曼光谱的增强效果。从图 6 中可以看出,虽然 CIP 标志性特征峰 1378 cm^{-1} 位置的拉曼强度几乎一致,但在 780 nm 波长的激光光源下, $1000 \sim 1250 \text{ cm}^{-1}$ 处的拉曼光谱相对强度更高。故选为 780 nm 作为激发光波长。这是因为不同的激光波长所含有的激发能量不同,在合适的激光波长下,特定的纳米结构可以产生较强的局域表面等离子共振 (LSPR),对于官能团的振动峰起到较大的增强效果。此外,激发光波长与 SERS 峰的强度不遵循传统拉曼光谱下的散射强度 I 正比于 ω^4 的关系^[12]。

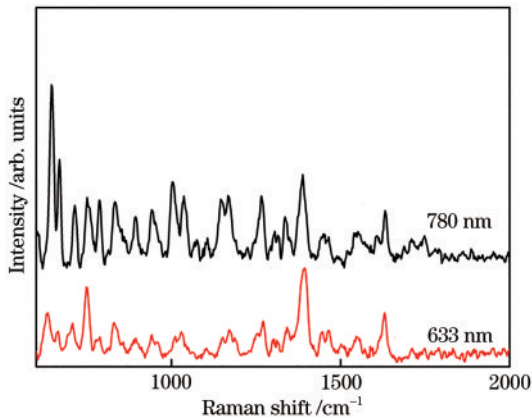


图 6 基于不同激光波长的 CIP 的 SERS

Fig. 6 SERS of CIP based on different laser wavelengths

3.4 基于不同纳米增强基底对 CIP 的 SERS 分析

为了观察 Au NPs 基底和 Au NRs 基底对 CIP 的拉曼光谱信号放大的效应,本文测定了 CIP 水溶液的 NRS 以及 SERS。分别取 $5 \mu\text{L}$ 的 Au NPs 胶体、 10×10^{-6} 的 CIP 标准溶液滴在空白硅片衬底上等待干燥,以及取 10×10^{-6} 的 CIP 标准溶液 $5 \mu\text{L}$ 在 Au NPs 增强芯片上,并获取他们的拉曼光谱。图 7 中原始拉曼检测 CIP 溶液,未使用增强基底,未出现 CIP 的特征峰,这说明使用常规的拉曼光谱无法直接检测 CIP 水溶液。

在使用 Au NPs 增强基底的条件下,位于 1167、

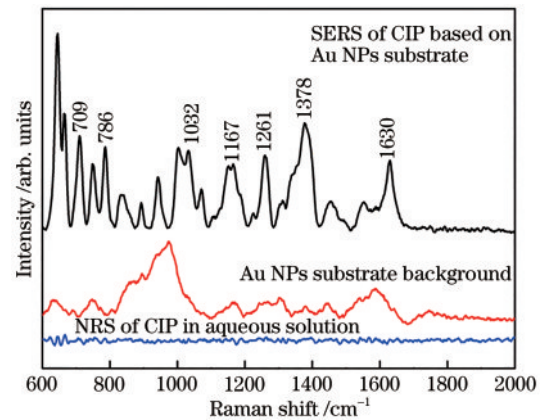


图 7 CIP 水溶液的 NRS、基于 Au NPs 的 SERS 与 Au NPs 基底的拉曼光谱

Fig. 7 NRS, SERS based on Au NPs substrate of CIP aqueous solution and Raman spectra of Au NPs substrate

1378 cm^{-1} 处的 CIP 的特征峰得到了显著增强。亚甲基基团的面内变形转动从 NRS 的 1172 cm^{-1} 处偏移到 SERS 谱图的 1167 cm^{-1} 位置。在 $600 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ 波数范围内, 1378 cm^{-1} 处的最强拉曼峰降低至次强拉曼峰。为了防止 Au NPs 团聚,其表面含有活性剂残留,故 Au NPs 增强基底本身存在较弱的拉曼峰并位于 $800 \sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ 处,此峰并未出现在使用 Au NPs 基底检测 CIP 溶液的 SERS 谱图,故无需考虑基底特征峰对检测结果的影响。拉曼峰存在偏移现象存在两种解释被广泛学者所接受:一是由于药品从固体状态转化成液体状态,环境的变化导致电子云的分布发生了改变;二是由于部分官能团与纳米 Au 基底的吸附过程存在差异,进而导致电子云分布瞬间极化产生的偶极矩受到了不同的影响^[27]。但由于偏移现象较为微弱,不影响对 CIP 的定性和定量检测。

基于 Au NRs 基底检测 10×10^{-6} 的 CIP 溶液,从图 8 中看出: Au NRs 基底在 756 cm^{-1} 以及 1446 cm^{-1} 处出现了强拉曼峰,此拉曼峰是由于 CTAB 残留于 Au NRs 表面引起,同时也出现在了 CIP 的 SERS 图中,故在使用 Au NRs 作为增强基底时应排除此波数处的拉曼信号。在 CIP 的 SERS 谱图可以观察到: 萘啶环上的

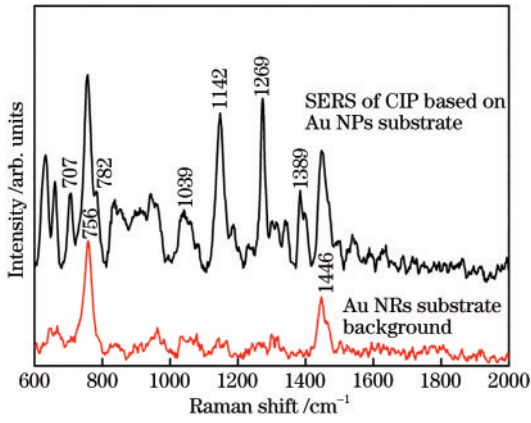


图 8 基于水溶液的 Au NRs 基底的 SERS 与 Au NRs 基底的拉曼光谱

Fig. 8 SERS based on Au NRs substrate of CIP aqueous solution and Raman spectra of Au NRs substrate substrate

C=O 键的伸缩振动从 NRS 的 1136 cm^{-1} 处偏移到了增强拉曼中的 1142 cm^{-1} ; 萘啉环的环呼吸振动也从 1267 cm^{-1} 偏移到 1269 cm^{-1} 位置, 同时也成为了最强拉曼峰; 在拉曼光谱中位于 1384 cm^{-1} 的峰也偏移到了 1389 cm^{-1} 处。可以从表 1 中看出 CIP 的特征峰以及特征峰的偏移情况, 且并不是所有的 CIP 的 NRS 特征峰也都出现在了 SERS 谱图中, 主要原因是吸附在金纳米基底的主体为不同的官能团, 导致在吸附过程中 CIP 分子电子云出现差异, 进而表现为 SERS 特征峰的差异。

3.5 Au NPS、Au NRS 基底检测 CIP 稳定性研究

由于存在“咖啡环”效应, 故进行 SERS 检测时需将激光对准“咖啡环”位置, 以确保 SERS 基底的增强效果以及稳定性。实验中选择了采用多个 10×10^{-6} 的 CIP 溶液滴在不同增强基底上, 自然干燥后对于不同波数位置计算相对标准偏差 (RSD)。从图 9 中 RSD

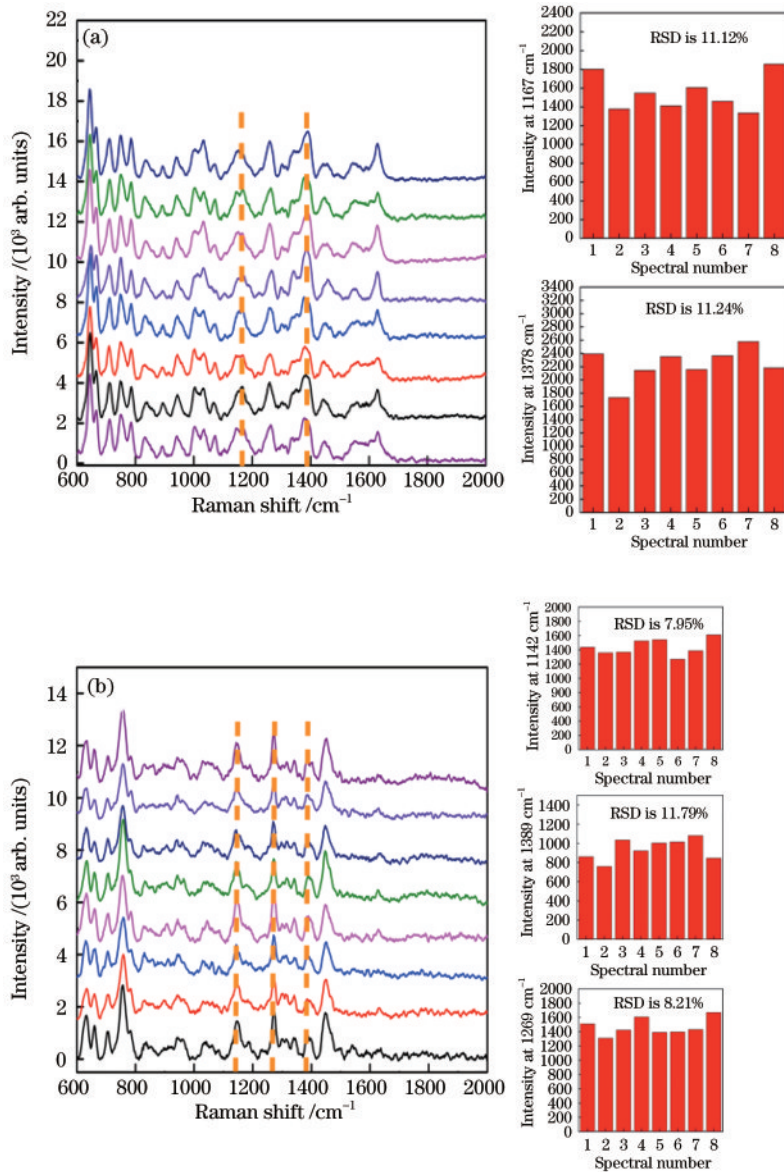


图 9 稳定性研究图谱。(a) Au NPs 基底; (b) Au NRs 基底

Fig. 9 Stability research atlas. (a) Au NPs substrate; (b) Au NRs substrate

数据可以看出, Au NPS、Au NRS 基底稳定性较好, 可用于工作曲线的建立。

3.6 用于建立工作曲线的固定波数处的选取

为了增强本文的实际用途, 通过制备含有 2.0×10^{-6} 的 CIP 的鸡肉提取液进行 SERS 定性检测。可以从图 10 中看出使用 Au NPs 基底时, 部分 CIP 特征峰不明显, 例如 1261 cm^{-1} 的特征峰可能是因为羰基环的呼吸振动受到其他生物大分子作用而导致信号未明显增强^[28], 故不考虑在此波数处建立工作曲线。为了保证后期便于统一观察 CIP 在鸡肉提取液、水溶液环境下的工作曲线预测能力的差异, 本文选取了在两种环境下同时出现 CIP 特征峰的波数处, 故在使用 Au NPs 基底时, 选取 1167 、 1378 cm^{-1} 波数处建立标准浓度工作曲线; 同样地, 在使用 Au NRs 基底时, 选取

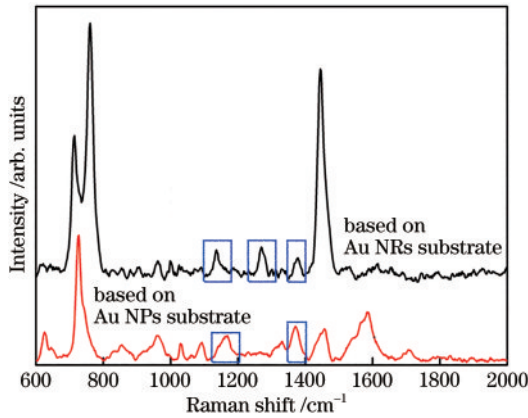


图 10 基于不同增强基底检测含有 2.0×10^{-6} 的 CIP 的鸡肉提取液的 SERS

Fig. 10 SERS of chicken extracts containing 2.0×10^{-6} CIP detected based on different enhanced substrates

1142 、 1269 、 1389 cm^{-1} 波数处建立标准浓度的工作曲线。

3.7 CIP 浓度-SERS 信号强度的工作曲线的建立

按照 SERS 技术的实验标准将 CIP 标准溶液组装在 Au NPs 基底后, 通过信号采集, 获取如图 11 所示的光谱。本次使用 10×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 0.5×10^{-6} 、 0.1×10^{-6} 的 CIP 标准溶液, 选取全部样本作为校正集从而建立工作曲线: 按照 x 轴为质量分数以及 z 轴为信号强度, 选取 1167 、 1378 cm^{-1} 波数处的 SERS 峰建立多种线性方程, 计算得出标准曲线(参数见表 2, 曲线见图 12)。

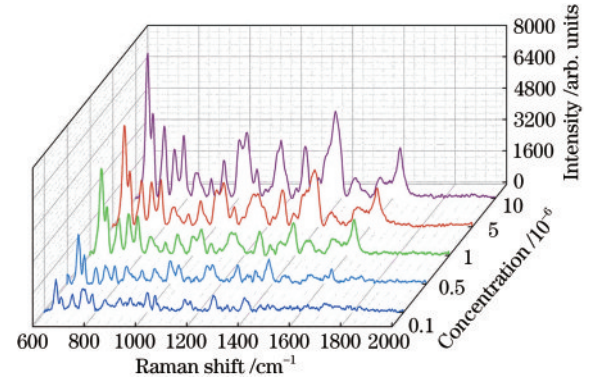


图 11 基于 Au NPs 基底检测不同浓度 CIP 溶液的 SERS
Fig. 11 SERS images of different concentrations of CIP solution detected based on Au NPs substrate

本文使用 0.2×10^{-6} 、 0.7×10^{-6} 、 2.0×10^{-6} 的 CIP 溶液作为实际含量值应用于观察标准曲线的预测能力。回收率是指试样测定值占实际含量值的百分比。

根据模型可决系数 (R^2) 与均方根误差 (RMSE) 判断标准曲线的拟合效果, 以及根据回收率判断标准曲

表 2 基于 Au NPs 基底检测 CIP 标准溶液的不同拉曼位移下的标准曲线

Table 2 Standard curves of CIP standard solution under different Raman displacements measured based on Au NPs substrate

Raman shift / cm^{-1}	0.1×10^{-6}	0.5×10^{-6}	1×10^{-6}	5×10^{-6}	10×10^{-6}	Standard curve	Coefficient of determination (R^2)	Root mean squared error (RMSE)
1167	473	839	947	1590	2753	$y = 210.48x + 621.61$	0.9806	111.6517
1378	653	1028	1119	2811	4289	$y = 362.28x + 777.24$	0.9902	136.2291

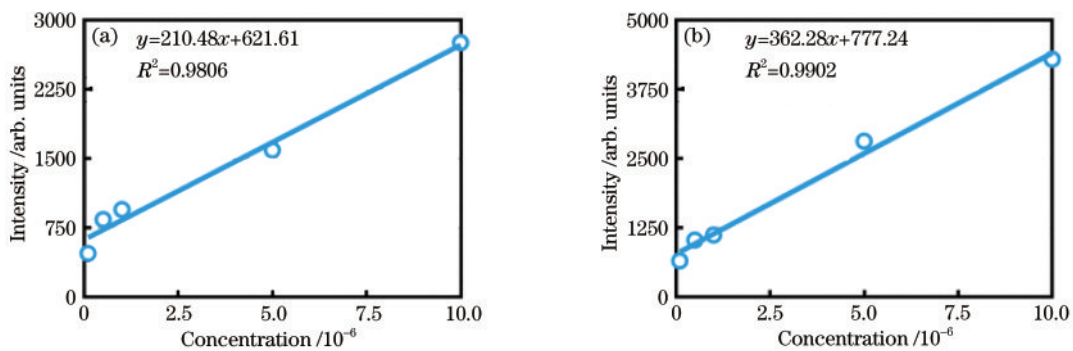


图 12 基于 Au NPs 基底检测不同浓度 CIP 溶液的工作曲线。(a) 1167 cm^{-1} ; (b) 1378 cm^{-1}

Fig. 12 Working curves of CIP solutions with different concentrations detected based on Au NPs substrate. (a) 1167 cm^{-1} ; (b) 1378 cm^{-1}

表 3 基于 Au NPs 基底检测 CIP 溶液的回收参数

Table 3 Recovery parameters of CIP solution detected based on Au NPs substrate

Raman shift / cm^{-1}	Working curve	Actual content / 10^{-6}	SERS intensity / arb. units	Predicted content / 10^{-6}	Recovery rate / %
1167	$y = 210.48x + 621.61$	0.2	645	0.11	55.0
		0.7	762	0.67	95.7
		2.0	1077	2.16	108.4
1378	$y = 362.28x + 777.24$	0.2	851	0.21	105.0
		0.7	1023	0.68	97.1
		2.0	1518	2.04	102.3

线的预测能力。结合表 2、表 3 可以看出, 1167 cm^{-1} 处标准曲线虽然 RMSE 较小, 但回收效果不佳, 不考虑作为工作曲线。1378 cm^{-1} 处的标准曲线可决系数接近于 1, 且回收率在 97.1%~105.0%, 故采用 $y = 362.28x + 777.24$ 作为工作曲线。

本文用同样的方法建立了基于 Au NRs 基底的 SERS 谱图 (图 13), 此外可以观察到在 CIP 浓度变化时, 756 cm^{-1} 以及 1446 cm^{-1} 的 Au NRs 自身的特征峰信号强度基本不变。

选取 1142、1269、1389 cm^{-1} 处的 SERS 峰建立标准曲线 (参数见表 4, 曲线见图 14), 其回收试验数据见表 5。可以看出位于 1389 cm^{-1} 处的标准曲线 RMSE 数值最小, 但位于 1269 cm^{-1} 的标准曲线的可决系数与回收率接近于 1, 故选取 1269 cm^{-1} 处标准曲线 $y = 179.9x + 825.14$ 作为工作曲线, 回收率为 96.3%~121.8%。

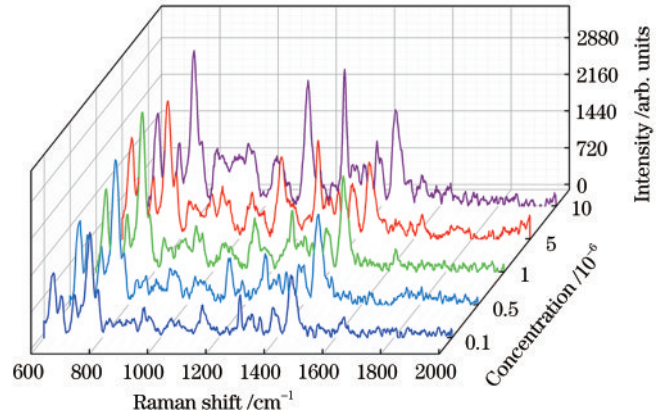


图 13 基于 Au NRs 基底检测不同浓度 CIP 溶液的 SERS
Fig. 13 SERS images of different concentrations of CIP solution detected based on Au NRs substrate

表 4 基于 Au NRs 基底检测 CIP 标准溶液的不同拉曼位移下的标准曲线

Table 4 Standard curves of CIP standard solution under different Raman displacements measured based on Au NRs substrate

Raman shift / cm^{-1}	0.1×10^{-6}	0.5×10^{-6}	1×10^{-6}	5×10^{-6}	10×10^{-6}	Standard curve	R^2	RMSE
1142	607	810	918	1507	2361	$y = 167.75x + 683.69$	0.9925	55.15
1269	832	848	1044	1804	2584	$y = 179.9x + 825.14$	0.9939	53.01
1389	585	661	712	963	1175	$y = 57.166x + 629.41$	0.9743	35.01

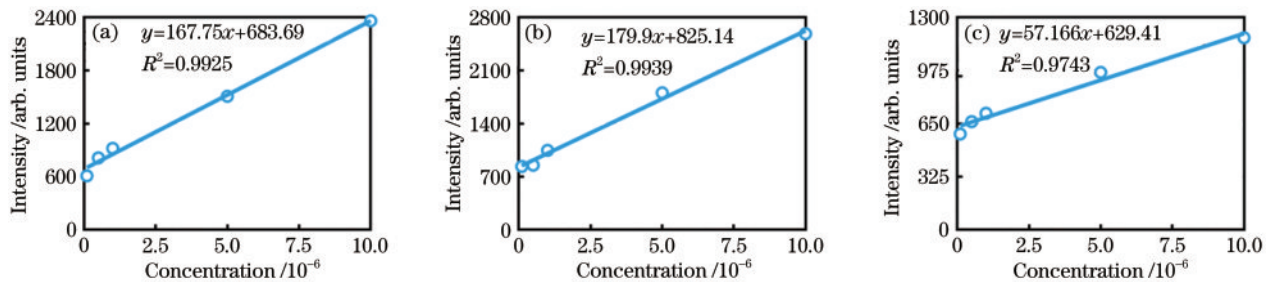


图 14 基于 Au NRs 基底检测不同浓度 CIP 溶液的工作曲线。(a) 1142 cm^{-1} ; (b) 1269 cm^{-1} ; (c) 1389 cm^{-1}

Fig. 14 Working curves of CIP solutions with different concentrations detected based on Au NRs substrate. (a) 1142 cm^{-1} ; (b) 1269 cm^{-1} ; (c) 1389 cm^{-1}

3.8 Au NPs、Au NRs 基底对 CIP 的拉曼信号增强效果分析

通过对比图 11、图 13 的拉曼信号强度, 以及最优工作曲线的回收率, 可以判断出基于 Au NPs 基底增强效果较优。这是由于在制备 Au NPs 胶体时, 使用

柠檬酸钠作为表面活性剂, 柠檬酸根吸附在 Au NPs 表面, 使其带有部分负电荷; 在制备 Au NRs 基底时使用 CTAB 作为表面活性剂, 使得在 Au NRs 表面残留有带正电的季铵基团, Au NRs 表面携带部分正电荷。CIP 分子中含有电负性相对较强的羧基, 电负性越强

表 5 基于 Au NRs 基底检测 CIP 溶液的回收参数

Table 5 Recovery parameters of CIP solution detected based on Au NRs substrate

Raman shift / cm^{-1}	Working curve	Actual content / 10^{-6}	SERS intensity / arb. units	Predicted content / 10^{-6}	Recovery rate /%
1142	$y = 167.75x + 683.69$	0.2	722	0.22	111.5
		0.7	808	0.74	106.0
		2.0	1129	2.65	132.5
1269	$y = 179.9x + 825.14$	0.2	859	0.19	96.3
		0.7	960	0.75	107.8
		2.0	1263	2.44	121.8
1389	$y = 57.166x + 629.41$	0.2	648	0.32	161.4
		0.7	687	1.00	143.3
		2.0	779	2.61	130.4

则代表化合物中原子吸引电子的能力越强,故 CIP 可以通过静电作用稳定吸附在 Au NPs 基底表面。但 CIP 与 Au NPs 基底是否存在镜像场作用还需进一步讨论,这是一种待测分子与 Au 基底表面产生共轭的电偶极的一种极短程效应,一般认为此效应在拉曼信号增强方面贡献不大。此外,从表 4 可以看出随浓度降低,1269 cm^{-1} 处的 SERS 信号强度下降趋势较快,而 1389 cm^{-1} 处信号强度下降趋势较慢,这是因为 CIP 分子中不同官能团吸附于金纳米增强基底的方向与力的大小不同而导致的。

4 结 论

通过制备 Au NPs、Au NRs 薄膜基底用于 CIP 的 SERS 检测,通过 UV-vis 和 SEM 对于自制金胶进行表征,可以看出金胶分散性好,粒径均匀且不聚集;通过不同激发光波长的条件下观察 CIP 的拉曼信号增强效果,确定了最佳激光波长为 780 nm。通过 CIP 的 NRS,使用 Au NPs 基底、Au NRs 基底的 SERS 图像,对其进行特征峰的指认与分析;通过基于两种不同基底对于 CIP 的 SERS 定量检测,以及进行回收率试验,确定了不同基底的最佳工作曲线。基于 Au NPs 基底的回收率为 97.1%~105.0%,基于 Au NRs 基底的回收率为 96.3%~121.8%。结果表明采用 Au 基底的 SERS 检测方法的线性关系良好,可满足检测 CIP 含量的需求。

参 考 文 献

- [1] 韩健, 杨克艳. CIP 的副作用[J]. 中国综合临床, 2003, 19(2): 109-110.
Han J, Yang K Y. Side effects of ciprofloxacin[J]. Clinical Medicine of China, 2003, 19(2): 109-110.
- [2] 中华人民共和国农业农村部. 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量: GB 31650—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. National food safety standard-Maximum

residue limits for veterinary drugs in foods: GB 31650—2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.

- [3] 潘媛, 牛华, 程晓云, 等. 高效液相色谱法检测六种氟喹诺酮类兽药残留前处理的优化[J]. 分析实验室, 2011, 30(5): 69-72.
Pan Y, Niu H, Cheng X Y, et al. Optimization of pretreatment for determination of six fluoroquinolones by liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2011, 30(5): 69-72.
- [4] 刘明生, 甘辉群, 谭菊, 等. 高效液相色谱法同时测定鸡蛋中恩诺沙星和环丙沙星的残留[J]. 饲料工业, 2007, 28(21): 39-40.
Liu M S, Gan H Q, Tan J, et al. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in eggs by high performance liquid chromatography[J]. Feed Industry, 2007, 28(21): 39-40.
- [5] 李锋格, 苏敏, 李晓岩, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肝中磺胺类、喹诺酮类和苯并咪唑类药物及其代谢物的残留量[J]. 色谱, 2011, 29(2): 120-125.
Li F G, Su M, Li X Y, et al. Determination of sulfonamides, quinolones, benzimidazoles and the metabolites of benzimidazoles in chicken livers by dispersive solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2011, 29(2): 120-125.
- [6] Moskovits M. Surface-enhanced spectroscopy[J]. Reviews of Modern Physics, 1985, 57(3): 783-826.
- [7] 樊玉霞, 赖克强, 黄轶群. 表面增强拉曼光谱技术在食品痕量化学危害检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(7): 1859-1864.
Fan Y X, Lai K Q, Huang Y Q. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy to the determination of trace chemical hazards in food products[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(7): 1859-1864.
- [8] 张燕君, 康成龙, 柳雅倩, 等. 基于表面增强拉曼光谱技术和GWO-SVR算法快速实现水中总氮总磷含量检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(10): 3147-3152.
Zhang Y J, Kang C L, Liu Y Q, et al. Rapidly detection of total nitrogen and phosphorus content in water by surface enhanced Raman spectroscopy and GWO-SVR

- algorithm[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2021, 41(10): 3147-3152.
- [9] 金向鹏, 李幸佳, 张晨杰, 等. 金膜表面等离子体诱导邻巯基苯甲酸脱羧反应的表面增强拉曼光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2021, 41(10): 3153-3158.
- Jin X P, Li X J, Zhang C J, et al. Surface enhanced Raman spectroscopic investigation on SPR catalyzed decarboxylation of ortho-mercaptobenzoic acid at Au nanoparticles monolayer film[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2021, 41(10): 3153.
- [10] 杨永安, 张德清, 张川云, 等. 草甘膦溶液挥发物的表面增强拉曼光谱分析[J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(13): 133003.
- Yang Y A, Zhang D Q, Zhang C Y, et al. Surface enhanced Raman spectroscopy analysis of glyphosate solution volatiles[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(13): 133003.
- [11] 王晓辉, 徐涛涛, 黄轶群, 等. 表面增强拉曼光谱结合不同纳米基底快速检测酸性橙 II [J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(1): 136-141.
- Wang X H, Xu T T, Huang Y Q, et al. Rapid detection of acid orange II by surface-enhanced Raman spectroscopy coated with different nano-substrates[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(1): 136-141.
- [12] 李剑锋. 核壳结构纳米粒子增强拉曼光谱[D]. 厦门: 厦门大学, 2010: 3-9.
- Li J F. Core-shell nanoparticles-enhanced Raman spectroscopy[D]. Xiamen: Xiamen University, 2010: 3-9.
- [13] 郭浩, 戴树玺, 张兴堂, 等. 银、金溶胶及银/金混合胶体的制备和拉曼增强特性的研究[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2011, 41(3): 246-250.
- Guo H, Dai S X, Zhang X T, et al. The preparation and surface-enhanced Raman scattering study of Ag colloid, Au colloid and Au/Ag mixed colloids[J]. Journal of Henan University (Natural Science), 2011, 41(3): 246-250.
- [14] 潘碧峰, 崔大祥, 徐萍, 等. 种子生长法制备长径比为 2-5 的金纳米棒[J]. 材料科学与工程学报, 2007, 25(3): 333-335.
- Pan B F, Cui D X, Xu P, et al. Preparation of gold nanorods with aspect ratio 2-5 by using seed mediated growth method[J]. Journal of Materials Science and Engineering, 2007, 25(3): 333-335.
- [15] 潘孝宇. 基于 AgNP@ β -CD 的咖啡环效应构筑高灵敏 SERS 基底研究[D]. 南京: 东南大学, 2016.
- Pan X Y. The research for constructing ultrasensitive SERS substrates based on coffee ring effect of AgNP@ β -CD[D]. Nanjing: Southeast University, 2016.
- [16] 陈珊, 李晓宁, 梁逸曾, 等. 拉曼光谱的荧光背景扣除及其用于药物聚类分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(8): 2157-2160.
- Chen S, Li X N, Liang Y Z, et al. Raman spectroscopy fluorescence background correction and its application in clustering analysis of medicines[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(8): 2157-2160.
- [17] 李贞, 徐维平, 吴亚东, 等. 表面增强拉曼散射活性基底制备的研究进展[J]. 中国药业, 2015, 24(3): 4-6.
- Li Z, Xu W P, Wu Y D, et al. Research progress on preparation of surface enhanced Raman scattering active substrate[J]. China Pharmaceuticals, 2015, 24(3): 4-6.
- [18] 鲁芬芬, 喻玖宏. 纳米金胶修饰碳糊电极的制备及对多巴胺的电催化氧化[J]. 武汉工业学院学报, 2011, 30(1): 39-42.
- Lu F F, Yu J H. Fabrication of colloidal gold nanoparticle modified carbon paste electrode and its electrocatalytic oxidation to dopamine[J]. Journal of Wuhan Polytechnic University, 2011, 30(1): 39-42.
- [19] 王静, 易中周, 李自静. 金纳米粒子的制备及表征研究[J]. 四川化工, 2011, 14(3): 8-10.
- Wang J, Yi Z Z, Li Z J. Synthesis and characterization of gold nanoparticles[J]. Sichuan Chemical Industry, 2011, 14(3): 8-10.
- [20] Brioude A, Jiang X C, Pileni M P. Optical properties of gold nanorods: DDA simulations supported by experiments [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2005, 109(27): 13138-13142.
- [21] 邹先波, 杨健茂, 林丹丽, 等. 3 种测定金纳米棒长径比方法的比较[J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(10): 243-245, 385.
- Zou X B, Yang J M, Lin D L, et al. Comparison of three methods for measuring aspect ratios of gold nanorods[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2012, 31(10): 243-245, 385.
- [22] Turkevich J, Stevenson P C, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold[J]. Discussions of the Faraday Society, 1951, 11: 55-75.
- [23] Xiong Y J, McLellan J M, Chen J Y, et al. Kinetically controlled synthesis of triangular and hexagonal nanoplates of palladium and their SPR/SERS properties[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(48): 17118-17127.
- [24] McLellan J M, Xiong Y J, Hu M, et al. Surface-enhanced Raman scattering of 4-mercaptopyridine on thin films of nanoscale Pd cubes, boxes, and cages[J]. Chemical Physics Letters, 2006, 417(1-3): 230-234.
- [25] 李盼. 基于不同活性基底的表面增强拉曼光谱法对农兽药残留的分析检测研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017: 16.
- Li P. Study on the detection of pesticide and veterinary drug residues by Surface-enhanced Raman scattering based on different active substrates[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2017: 16.
- [26] 李子春. 利用拉曼光谱法检测抗生素的研究[D]. 长春: 长春理工大学, 2013: 26.
- Li Z C. Analysis of Raman spectrum detect antibiotics [D]. Changchun: Changchun University of Science and Technology, 2013: 26.
- [27] Olson T Y, Schwartzberg A M, Orme C A, et al. Hollow Gold-Silver double-shell nanospheres: structure, optical absorption, and surface-enhanced Raman scattering[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2008, 112(16): 6319-6329.
- [28] 韩斯琴高娃, 包琳, 陈炳伟, 等. SERS 检测牛奶中磺胺二甲嘧啶[J]. 食品与药品, 2016, 18(3): 161-165.
- Han S, Bao L, Chen B W, et al. Detection of sulfadimidine in milk using surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Food and Drug, 2016, 18(3): 161-165.