

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.05.012

纳米银为基底的表面增强拉曼光谱研究 香豆素与牛血清白蛋白的相互作用^①

陈蓉, 周光明, 罗丹, 张璐涛

发光与实时分析教育部重点实验室/西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

摘要: 实验报道了香豆素的拉曼光谱以及在银纳米粒子基底上的表面增强拉曼光谱, 并对其特征峰进行了归属, 与固体香豆素的常规拉曼进行对比, 发现香豆素的特征峰位置基本没变. 实验优化了牛血清白蛋白(BSA)与银纳米粒子的体积混合比例, 研究了香豆素与 BSA 相互作用的表面增强拉曼光谱. 实验表明, BSA 与银纳米粒子体积比为 1:3 混合时, BSA 的拉曼增强信号最佳. 在低浓度下, 银纳米粒子对香豆素及 BSA 都有明显的增强效果, 其增强效果主要体现在银纳米粒子与香豆素苯环中的 π 电子、羰基中的氧原子以及 BSA 中含有孤电子的 N 原子、蛋白质中二硫键中的 S 原子发生吸附作用. 加入 BSA 后, 香豆素中 $525, 675 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,327 \text{ cm}^{-1}$ 处的拉曼信号发生红移, 但并未消失, 说明香豆素的骨架振动因与牛血清白蛋白发生作用而受到影响; 拉曼位移 $1\,184, 1\,230, 1\,563 \text{ cm}^{-1}$ 处的拉曼峰信号明显减弱, 这是由于加入 BSA 后, 香豆素的 C—O 不对称伸缩振动以及 C=O 的伸缩振动造成的; $847, 897, 1\,488 \text{ cm}^{-1}$ 拉曼峰消失, 这是由于香豆素中芳环平面与 BSA 作用而导致的. 与香豆素的表面增强拉曼光谱信号相比, 香豆素与 BSA 复合物的表面增强拉曼光谱信号明显减弱, 可能是 BSA 的 α -螺旋结构被香豆素分子中的平面结构所插入, 产生非共价键的 π - π 堆积的作用, 使香豆素中芳环 π 电子密度发生变化, 引起能量改变. 以银纳米粒子为基底, 利用表面增强拉曼光谱考察香豆素与 BSA 的相互作用, 具有分析时间短、操作简单快速、原位无损检测等优点, 为香豆素及其他增香剂与蛋白质相互作用的深入研究及其药理研究提供了参考.

关键词: 香豆素; 银纳米粒子; 牛血清白蛋白; 表面增强拉曼光谱

中图分类号: O657.37

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)05-0072-08

目前市场上的增香剂种类繁多, 香豆素就是其中的一类, 被广泛用于食品、化妆品等行业^[1-2]. 而动物实验表明香豆素具有致癌性, 是一种高毒性的内酯类化合物^[3]. 毒理研究发现香豆素在人体的含量达到一定量时, 会给肝脏带来一定的伤害^[4], 进而欧洲一些国家对香豆素的添加量做了规定^[5-6]. 牛血清白蛋白(BSA)是一种单链结构蛋白质, 既能与亲水性分子结合, 也能和疏水性物质结合^[7-8], 加之在结构与性能上, BSA 与人血清白蛋白有一定的相似性, 把它放到模拟人体环境中研究生物效应机理具有一定的指导意义^[9].

① 收稿日期: 2018-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(21475014).

作者简介: 陈蓉(1995-), 女, 硕士研究生, 主要从事拉曼光谱研究.

通信作者: 周光明, 教授, 博士研究生导师.

目前科研工作人员对香豆素的研究也做了大量的工作,杨树平等人^[10]用荧光光谱法研究了不同温度下配合物与 BSA 的相互作用;陈爱菊^[11]运用紫外-可见分光光度法(UV-vis)以及荧光光谱法等探讨了香豆素类抗癌药物与环糊精及 BSA 在水溶液中的相互作用;Shobini J 团队^[12]研究了合成香豆素与人血清白蛋白的相互作用;刘雪锋等人^[13]利用运用荧光光谱(FS)、紫外光谱(UV)法研究了 3 种香豆素中药小分子与 BSA 的相互作用. 这些方法虽然灵敏度高,重现性好,但存在背景干扰大、分析时间长、操作复杂等问题. 本研究主要以银纳米粒子为基底,表面增强拉曼光谱(SERS)技术具有制样简单、分析时间短等优点,首次运用 SERS 技术考察香豆素与 BSA 的相互作用,以进一步从分子层面深入了解香豆素的药效机理.

1 实验部分

1.1 实验主要仪器与试剂

FS-100 型傅立叶变换拉曼光谱仪(德国 Bruker 公司), Nd: YAG 激光光源,液氮冷却 Ge 探测器; UV-2450 紫外-可见分光光度计(岛津); S4800 型扫描电子显微镜(SEM)(日本日立公司); 80-1 台式低速离心机(金坛科技仪器有限公司). 根据 Jingjing Ma's team^[14]的方法并稍加修改制备银纳米基底, 0.5 mol/L 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)溶液作保护剂,乙二醇作为还原剂,乙二醇(C_2H_6OH)和 PVP, 统购于科龙化工试剂厂;根据方艳团队^[15]的方法配制 Tris-HCl(pH=7.40)缓冲溶液和 BSA 溶液, BSA 购于如吉生物科技;三(羟甲基)氨基甲烷购于天津市科密欧化学试剂有限公司;称取 0.05 g 香豆素($C_8H_6O_2$)溶于无水乙醇,定容到 500 mL 容量瓶中配制成质量浓度为 100 mg/L 的香豆素标准溶液,保存备用. 以上试剂均为分析纯.

1.2 SERS 检测

测定 BSA 和香豆素的常规拉曼光谱(NRS)与 SERS,并对其峰进行归属;优化银纳米粒子与 BSA 的体积比,按体积比为 4:1,3:1,2:1,1:1,1:2 混合后进行拉曼测试;比较 Ag 和 coumarin 银纳米粒子为基底,香豆素溶液与 Ag 和 BSA-coumarin 银纳米粒子为基底,BSA 与香豆素混合溶液混合的 SERS.

2 结果与讨论

2.1 PVP 背景信号的研究

由于在实验中 PVP 的使用浓度较高,为避免 PVP 对后续样品的 SERS 产生背景信号干扰,因此对 PVP 溶液进行背景拉曼测试,结果见图 1. 从图 1 中可以看出, PVP 溶液本身并没有 SERS 背景信号,即在后续的 SERS 检测过程中,较高浓度的 PVP 并不会对实验的结果产生任何干扰.

2.2 银纳米粒子的 SEM 形貌表征

取少量制好的纳米银稀释后滴加到干净的硅片上,室温下干燥,在加速电压为 20 kV 的扫描电镜下进行扫描. 图 2 是银纳米粒子的扫描电镜(SEM). 从图 2 中可以明显地看到,银纳米粒子的外形呈棒状,长短大小较为均匀,其粒径大小在 80 nm 左右^[14]. 银纳米粒子表面能有效吸附目标分子,有较好的拉曼增强效果.

2.3 Ag 和 coumarin 与 Ag 和 BSA-coumarin 的紫外吸收光谱图

通过紫外吸收光谱分别对 Ag 和 coumarin 与 Ag 和 BSA-coumarin 进行了表征(图 3),前者的吸收峰在 478 nm 左右,后者的吸收峰在 468 nm 左右,吸收峰略微蓝移. 这是由于银纳米粒子的等离子体吸收峰与粒子的尺寸、形状和周围的介电常数有关,BSA 是一个大的蛋白质,其吸附到银纳米粒子上,改变了它

周围的介电环境, 导致谱峰蓝移.

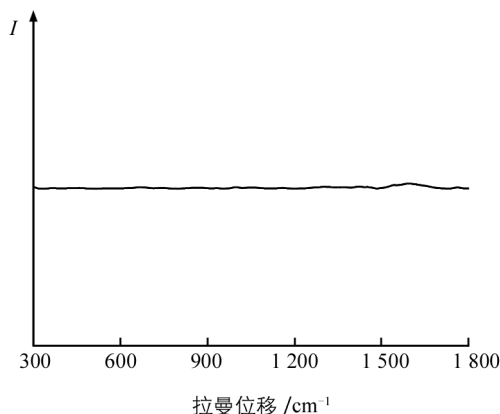


图 1 PVP 的 SERS 背景信号

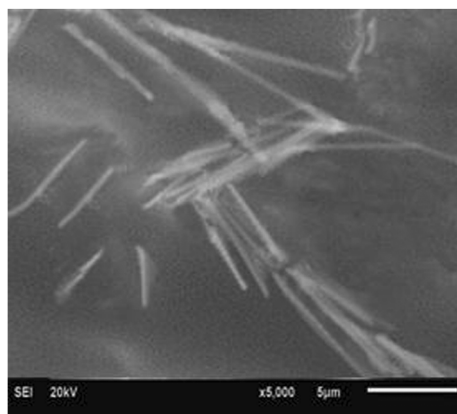
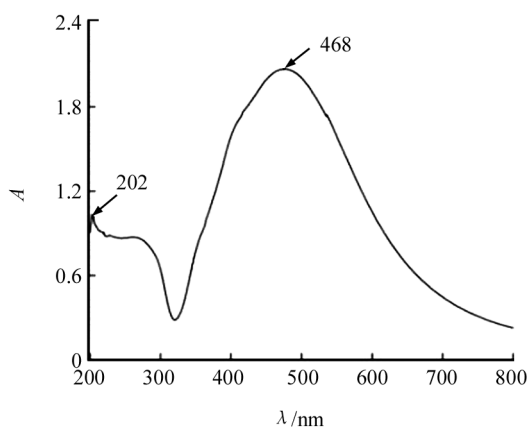
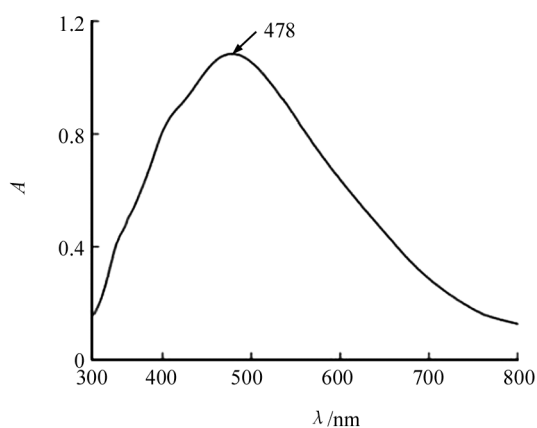


图 2 银纳米粒子的 SEM 图



(a) 香豆素与纳米银



(b) 香豆素-BSA 与纳米银

图 3 紫外吸收光谱

2.4 BSA 的 NRS 与 SERS

图 4 是 BSA 的 NRS 与 SERS. 从图 4 中可以看出银纳米粒子对 BSA 有明显的增强效果. 图中的曲线 a 是 BSA 的 NRS, 没有明显的特征峰出现, 图中的曲线 b 是 BSA 与纳米银按照最佳体积比例 1 : 3 混合所测得的表面增强拉曼光谱, 与曲线 a 相比, 曲线 b 中出现了较多的峰, 其中 760 cm^{-1} 与 $1\,461\text{ cm}^{-1}$ 这两个峰有明显的增强. BSA 的 SERS 早有报道^[16], 760 cm^{-1} 归属于 C—H 面外变形振动, $1\,053\text{ cm}^{-1}$ 归属于 C—N 伸缩振动; $1\,461\text{ cm}^{-1}$ 归属于色氨酸残基环中 O—C=O 对称伸缩振动.

2.5 银纳米粒子与 BSA 不同体积比例的 SERS

图 5 是银纳米粒子与 BSA 不同体积比例混合的表面增强拉曼光谱图. 从图 5 中可以看出, 当 Ag 与 BSA 体积比为 3 : 1 时, BSA 的拉曼信号最强. 在位移为 $760, 1\,051, 1\,460\text{ cm}^{-1}$ 处有明显的增强, 其 760 cm^{-1} 处峰最为尖锐, 在 886 cm^{-1} 和 930 cm^{-1} 左右有小峰出现, 随着 BSA 的加入, 可能对物质形成了比较厚的包裹层, 拉曼响应明显变弱, 因此选用体积比为 3 : 1 作为最佳混合比例.

2.6 香豆素的 NRS 与 SERS

香豆素是一种内酯类化合物, 结构见图 6. 取一定量的香豆素溶液滴在玻片上, 室温下自然晾干, 图 7 中曲线 a 是香豆素的 NRS. 图中曲线 b 是香豆素的 SERS, 从图中可以看出曲线 a 没有明显的峰, 而对比 NRS, 香豆素的 SERS 峰的强度明显增加, 参考《拉曼光谱手册》和《拉曼光谱在有机化学中的应用》这两本书, 对香豆素的拉曼峰进行归属, 其中 $348, 374\text{ cm}^{-1}$ 处的 C—C—C 的扭曲振动; $449,$

494, 563, 581, 590 cm^{-1} 处的骨架变形振动; 686, 730, 763 cm^{-1} 处的 C—H 面外弯曲振动, 1 558, 1 603 cm^{-1} 归属于 C=C(芳烃)骨架伸缩振动的特征峰, 由于苯环存在 π 电子共轭体系, 可与银纳米粒子发生吸附, 峰信号较强; 817, 865 cm^{-1} 处的一O—环呼吸不对称伸缩振动; 936 cm^{-1} 处的一O—环呼吸对称伸缩振动; 1 029 cm^{-1} 归属于 C—O—C 对称伸缩振动, 增强效果明显; 1 119, 1 152, 1 178, 1 224 cm^{-1} 处的 C—O 不对称伸缩振动; 1 277 cm^{-1} 处 C—O—C 伸缩振动, 1 382, 1 334, 1 448 cm^{-1} 处的面内变形振动。

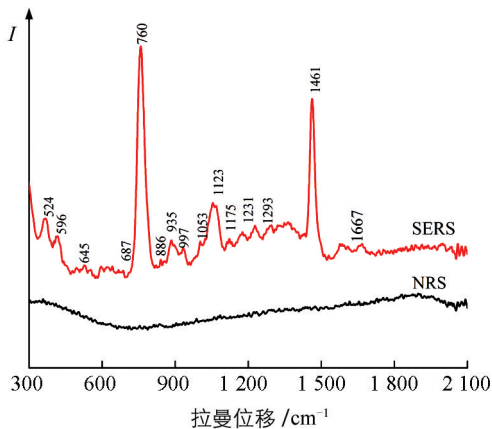
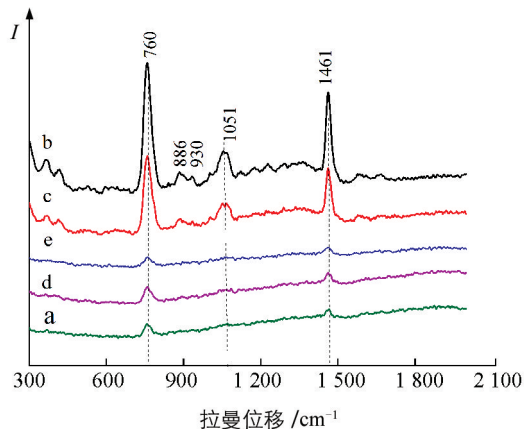


图 4 BSA 的 NRS 与 SERS



a. 4 : 1; b. 3 : 1; c. 2 : 1; d. 1 : 1; e. 1 : 2.

图 5 银纳米粒子与 BSA 不同比例混合的拉曼光谱图

图 8 为香豆素固体常规拉曼峰. 与香豆素的 SERS 拉曼峰相比, 可以发现峰的位置大致没有改变, 只是有些峰发生了移动. 其中 523 cm^{-1} 处的骨架伸缩振动移到了 581 cm^{-1} , 峰型发生了改变; 728 cm^{-1} , 761 cm^{-1} 的 C—H 面外变形振动移到了 730 cm^{-1} 和 763 cm^{-1} ; 888 cm^{-1} 的峰分裂为 817 cm^{-1} 和 865 cm^{-1} , 1 399 cm^{-1} 的 C—H 面内变形振动移到了 1 448 cm^{-1} ; 1 702 cm^{-1} 拉曼峰在 SERS 中消失, 这是因为香豆素中 C=O 与银纳米粒子发生了吸附; 其他大多数出峰位置与香豆素的 SERS 一致. 综上所述, 以银纳米粒子为基底, 香豆素的拉曼峰有明显的增强效果. 实验对香豆素的拉曼位移进行了归属, 香豆素的拉曼位移及归属见表 1.

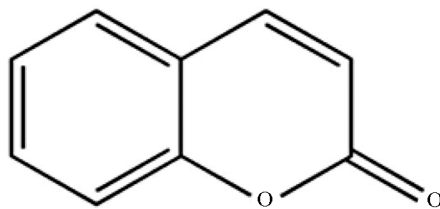


图 6 香豆素的结构图

图 7 为香豆素的 NRS 与 SERS 拉曼光谱. 与香豆素的 SERS 拉曼峰相比, 可以发现峰的位置大致没有改变, 只是有些峰发生了移动. 其中 523 cm^{-1} 处的骨架伸缩振动移到了 581 cm^{-1} , 峰型发生了改变; 728 cm^{-1} , 761 cm^{-1} 的 C—H 面外变形振动移到了 730 cm^{-1} 和 763 cm^{-1} ; 888 cm^{-1} 的峰分裂为 817 cm^{-1} 和 865 cm^{-1} , 1 399 cm^{-1} 的 C—H 面内变形振动移到了 1 448 cm^{-1} ; 1 702 cm^{-1} 拉曼峰在 SERS 中消失, 这是因为香豆素中 C=O 与银纳米粒子发生了吸附; 其他大多数出峰位置与香豆素的 SERS 一致. 综上所述, 以银纳米粒子为基底, 香豆素的拉曼峰有明显的增强效果. 实验对香豆素的拉曼位移进行了归属, 香豆素的拉曼位移及归属见表 1.

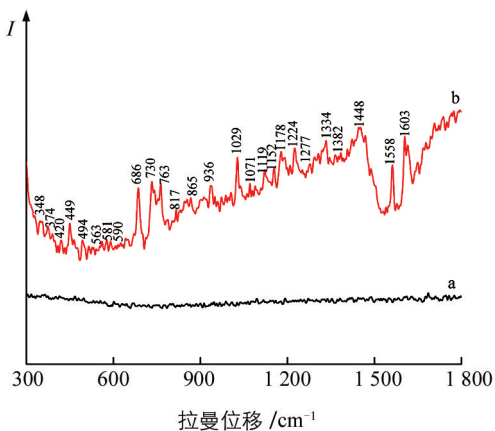


图 7 香豆素的 NRS 与 SERS

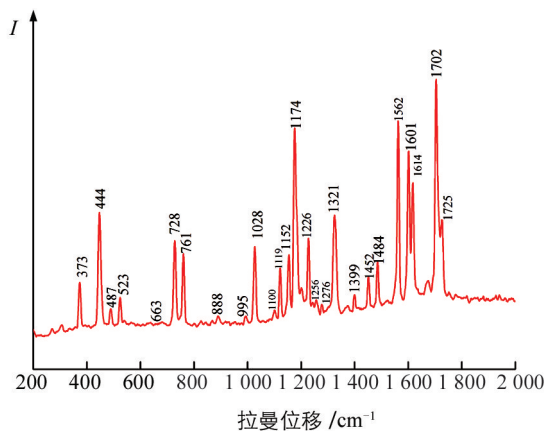


图 8 香豆素固体常规拉曼

表 1 香豆素的拉曼位移及归属

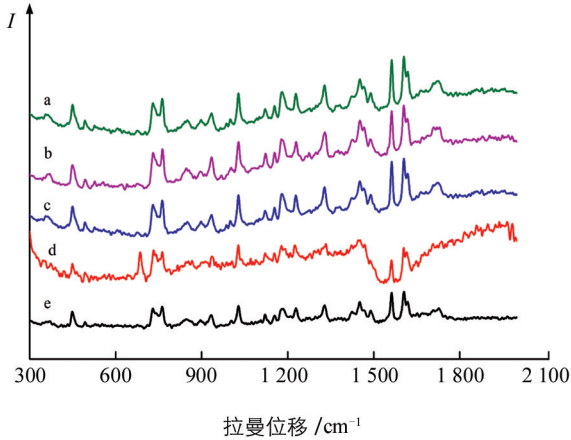
NRS/cm ⁻¹	SERS/cm ⁻¹	Assignment
373(m)	348(w)	
	374(w)	τ (C—C—C)
	420(w)	
444(s)	449(m)	
487(w)	494(w)	Frame deformation vibration
523(w)	563(w)	
	581(w)	
	590(w)	
728(m)	686(s)	
761(m)	730(m)	γ (C—H)
	763(m)	
888(w)	817(w)	
	865(w)	br ν as(—O—)
995(w)	936(w)	br ν (—O—)
1 028m(s)	1 029(s)	
1 100(w)	1 071(w)	ν s(C—O—C)
1 119(m)	1 119(m)	
1 152(m)	1 152(w)	ν as(C—O)
1 174(s)	1 178(w)	
1 226(m)	1 224(m)	
1 256(w)	1 277(w)	ν (C—O—C)
1 276(w)		
1 321(m)	1 334(m)	δ (C—H)
1 399(w)	1 382(w)	
1 452(w)	1 448(m)	
1 484(w)		
1 562(s)	1 558(s)	
1 601(s)	1 603(s)	ν (C = C)
1 614(s)		
1 702(s)		ν (C = O)
1 725(w)		

注: τ , 扭曲振动; γ , 面外弯曲振动; δ , 面内弯曲振动; b, 环呼吸; ν , 伸缩振动; ν s, 对称伸缩振动; ν as, 不对称伸缩振动; s, 强峰; m, 中等强度峰; w, 弱峰.

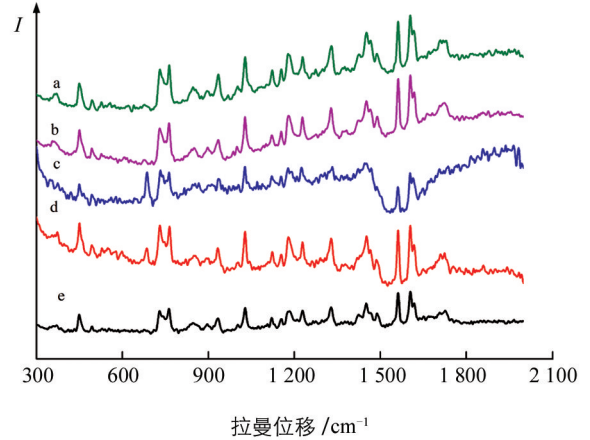
2.7 香豆素与 BSA 相互作用研究

图 9 为体积比为 1 : 5, 1 : 4, 1 : 3, 1 : 2, 1 : 1 的 Ag 和 Coumain 与 Ag 和 BSA-Coumain 的 SERS. 从图 9 中可以看到拉曼峰的位置基本没有什么变化, 香豆素的 SERS 信号在混合体积比为 1 : 1 和 1 : 3 时, 682, 968, 1 485, 1 725 cm⁻¹ 处拉曼峰不稳定, 说明香豆素直接吸附在银纳米粒子表面是不均匀的, 当混合体积比为 1 : 4 时, 拉曼峰的强度较好, 表明两者混合比较充分, BSA 能稳定吸附香豆素. 而 BSA 与香豆

素的复合物吸附在银纳米粒子上, SERS 信号相对降低了, 但峰的强度基本没有变化, 这是由于 BSA 含有大量的侧链区域和立体的空间结构, 能够均匀而稳定有序地吸附香豆素, 使得 SERS 信号更加稳定.



(a) 银纳米粒子与香豆素不同体积比混合

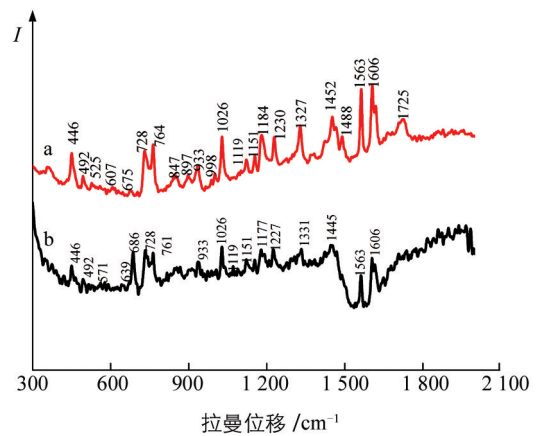


(b) 银纳米粒子与 BSA 香豆素不同体积比混合

a. 1 : 5; b. 1 : 4; c. 1 : 3; d. 1 : 2; e. 1 : 1.

图 9 拉曼光谱图

图 10 研究了与 BSA 作用后香豆素 SERS 的变化情况. 图 10 中 a 为香豆素的 SERS 信号, b 为 Ag 和 BSA-Coumarin 按照体积比为 1 : 4 的比例混合后复合物的 SERS 信号. 从图中可以看出当加入牛血清白蛋白(BSA)后, 香豆素中 $525, 675$ 和 $1\ 327\ \text{cm}^{-1}$ 处的拉曼信号发生红移, 拉曼位移 $1\ 184, 1\ 230, 1\ 327$ 以及 $1\ 563\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰拉曼信号明显减弱, $847, 897$ 与 $1\ 488\ \text{cm}^{-1}$ 拉曼峰消失. 说明加入 BSA 后, 香豆素的结构发生了变化. 香豆素与 BSA 复合物的 SERS 信号比香豆素本身的 SERS 信号强度明显减弱, 可能是 BSA 的 α -螺旋结构当中被香豆素分子中的平面结构所插入, 产生了非共价键 π - π 堆积的作用, 使得香豆素分子中芳环的 π 电子密度发生改变, 进而引起能量的改变, 致使 SERS 信号减弱^[17-18]. $525\ \text{cm}^{-1}$ 和 $675\ \text{cm}^{-1}$ 处的拉曼信号发生红移, 但并未消失, 说明香豆素的骨架振动因与 BSA 发生作用而受到影响, 拉曼位移 $1\ 184, 1\ 230, 1\ 327$, 以及 $1\ 563\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰拉曼信号明显减弱, 这是由于 BSA 的加入对香豆素的 C—O 不对称伸缩振动及 C=O 的伸缩振动造成了影响, 导致位曼峰 $847, 897\ \text{cm}^{-1}$ 消失, 香豆素中芳环平面与 BSA 作用, 使得 $1\ 488\ \text{cm}^{-1}$ 处 C—H 面内变形振动峰消失, 说明香豆素的结构发生了变化.



a. 香豆素; b. 香豆素与 BSA.

图 10 香豆素的 SERS 和香豆素与 BSA 的 SERS

3 结 论

优化 BSA 与银纳米粒子体积比为 1 : 3 混合时, BSA 的拉曼增强信号最强. 在低浓度下, 银纳米粒子对 BSA 以及香豆素都有明显的增强效果, 其增强效应主要由于 BSA 中含有孤电子的 N 原子及二硫键中的 S 原子与银纳米粒子的结合, 以及香豆素中苯环中的 π 电子及羰基中的氧原子与纳米银发生了吸附作用. 以银纳米粒子为表面增强拉曼基底, 香豆素可与 BSA 直接作用, 其混合后的复合物的拉曼增强效果有所降低, 这是由于香豆素分子中的平面结构插入到了 BSA 的 α 螺旋结构中, 致使能量发生改变, 但

峰的位置几乎没变, 表明 BSA 具有较好的立体空间, 能与香豆素稳定地结合. SERS 作为一种无损的痕量分析手段, 具有灵敏度高、分析速度快等优点. 利用 SERS 技术研究 BSA 与香豆素的相互作用, 该方法具有分析时间短, 操作简单快速、使用样品量少等优点, 为进一步研究增香剂与蛋白分子之间的作用提供了新思路.

参考文献:

- [1] BETTERO A, BENASSI C A. Determination of Coumarin and 6-methylcoumarin in Cosmetics by High-performance Liquid Chromatography [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1983, 1(2): 229-233.
- [2] WOEHLIN F, FRY H, ABRAHAM K, et al. Quantification of Flavoring Constituents in Cinnamon; High Variation of Coumarin in Cassia Bark from the German Retail Market and in Authentic Samples from Indonesia [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(19): 10568-10575.
- [3] 黄梅英, 李攻科, 胡玉玲. 表面增强拉曼光谱法定量检测食品中香豆素 [J]. *分析化学*, 2015, 43(8): 1218-1223.
- [4] ZAHEER Z, KONALE A G, PATEL K A, et al. Comparative Phytochemical Screening of Flowers of *Plumeria Alba* and *Plumeria Rubra* [J]. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2010, 3(4): 88-89.
- [5] 吴新华, 朱瑞芝, 陆舍铭, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定香精中香豆素的含量 [J]. *理化检验: 化学分册*, 2009, 45(12): 1407-1409.
- [6] 韩 熠, 张承明, 喻 坤, 等. 食品及化妆品中香豆素和黄樟素类化合物分析方法研究进展 [J]. *香料香精化妆品*, 2013(1): 45-49.
- [7] PETERS T, AZZAZYJ H M E, CHRISTENSON R H. All about Albumin; Biochemistry, Genetics, and Medical Applications [M]. us: Academic Press, 1995.
- [8] Carter D C, Ho J X. Structure of Serum Albumin [C] // *Advances in Protein Chemistry*. US: Academic Press, 1994, 45: 153-203.
- [9] 王 珊, 高丰琴, 杨小玲. 以唑草·苯磺隆为模型研究酮类小分子与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. *化工科技*, 2016, 24(1): 20-23.
- [10] 杨树平, 韩立军, 王大奇, 等. 香豆素-3-羧酸铈(III)-维配位聚合物 $[\text{Er}(\text{CCA})_3(\text{H}_2\text{O})_2]_n \cdot 2n\text{H}_2\text{O}$ 的溶剂热法合成, 晶体结构及与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用 [J]. *化学学报*, 2011, 69(19): 2319-2327.
- [11] 陈爱菊. 香豆素类抗癌药物与环糊精及生物大分子的相互作用 [D]. 聊城: 聊城大学, 2014.
- [12] SHOBINI J, MISHRA A K, SANDHYA K, et al. Interaction of Coumarin Derivatives with Human Serum Albumin; Investigation by Fluorescence Spectroscopic Technique and Modeling Studies [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2001, 57(5): 1133-1147.
- [13] 刘雪锋, 夏咏梅, 方 云, 等. 三种香豆素类中药小分子与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. *化学学报*, 2004, 62(16): 1484-1490.
- [14] MA J J, ZHAN M S. Rapid Production of Silver Nanowires Based on High Concentration of AgNO_3 Precursor and Use of FeCl_3 as Reaction Promoter [J]. *RSC Advances*, 2014, 4(40): 21060-21071.
- [15] 方 艳, 马琳琳, 陕多亮, 等. 石墨烯-金纳米粒子复合膜修饰电极的制备及对双酚 A 的测定 [J] *高等学校化学学报* [J]. 2015, 36(8): 1491-1497.
- [16] 王小玉, 康 和, 邓朝阳, 等. 核壳纳米粒子与牛血清白蛋白表面增强拉曼光谱的研究 [J]. *分析科学学报*, 2009, 25(4): 443-446.
- [17] 任毅华, 周光明, 吴 捷, 等. 诺氟沙星与 DNA 的拉曼光谱研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(11): 2980-2983.
- [18] 张彩红, 周光明, 程洪梅, 等. 包裹 BSA 的线状银为基底探讨小檗碱的拉曼光谱 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2016, 38(11): 113-118.

Surface-Enhanced Raman Spectroscopy with Nanosilver as the Substrate to Study the Interaction Between Coumarin and Bovine Serum Albumin (BSA)

CHEN Rong, ZHOU Guang-ming, LUO Dan, ZHANG Lu-tao

Key Laboratory of Luminescence and Real-Time Analysis of the Ministry of Education/

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The Raman spectrum of coumarin and the surface-enhanced Raman spectrum (SERS) on the silver nanoparticle substrate were reported and the characteristic peaks were assigned. A comparison of SERS with the normal Raman spectrum (NRS) of solid coumarin indicated that the position of the characteristic peak of coumarin was basically unchanged. The experiment optimized the volume mixing ratio of bovine serum albumin (BSA) and silver nanoparticles and studied the SERS of the interaction of coumarin with BSA. The results demonstrated that when the volume ratio of BSA to silver nanoparticles was 1 : 3, the bovine serum albumin showed the strongest Raman enhancement signal. At low concentrations, silver nanoparticles had obvious enhancement effects on both bovine serum albumin and coumarin. The enhancement effect was mainly reflected in the adsorption of π electrons in silver benzene and coumarin benzene ring, oxygen atom in carbonyl group, N atom containing lone electron in BSA, and S atom in disulfide bond in protein. After the addition of BSA, the Raman signal at 525 cm^{-1} , 675 cm^{-1} , and $1\ 327\text{ cm}^{-1}$ in coumarin was red-shifted but did not disappear, indicating that the skeletal vibration of coumarin was affected by the interaction with BSA. The Raman signals at Raman shifts of $1\ 184\text{ cm}^{-1}$, $1\ 230\text{ cm}^{-1}$, $1\ 327\text{ cm}^{-1}$ and $1\ 563\text{ cm}^{-1}$ were significantly weakened, due to the C—O asymmetric stretching vibration and C=O stretching vibration of coumarin after BSA addition. The 847 cm^{-1} , 897 cm^{-1} , and $1\ 488\text{ cm}^{-1}$ Raman peaks disappeared due to the action of the aromatic ring plane and bovine serum albumin in the coumarin. Compared with the SERS signal of coumarin, the SERS signals of coumarin and bovine serum albumin complex were obviously weakened. The cause might be that the α -helical structure of BSA was inserted by the planar structure in the coumarin molecule, resulting in π of non-covalent bond. The π stacking action changed the π electron density of the aromatic ring in the coumarin, bringing about an energy change. In summary, in this study silver nanoparticles were used as the substrate to investigate the interaction between coumarin and BSA with the SERS technique. The method has the advantages of short analysis time, simple and rapid operation, and in situ nondestructive detection, and provides a reference for the in-depth study of the interaction of other flavoring agents with proteins and its pharmacological research.

Key words: coumarin; nanosilver; bovine serum albumin (BSA); surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)

责任编辑 潘春燕