

表面增强拉曼光谱检测食品安全的教学实验开发^①

邓春艳, 谢云燕, 张翼

中南大学 化学化工学院, 长沙 410010

摘要: 针对表面增强拉曼光谱教学内容不够充实的问题, 为了加强学生讨论、参与实践和立即应用的互动式学习, 设计 and 实践了一组适合本科学生学习的表面增强拉曼光谱检测食品安全的教学实验, 从表面增强拉曼的原理、纳米粒子的合成和表征方法、表面增强拉曼光谱检测食品等几个方面, 探索了实验的教学方法和教学过程. 实践表明, 该实验能够提高学生的学习兴趣、实践能力和科研能力.

关键词: 表面增强拉曼散射效应; 食品安全; 教学实验; 拉曼效应

中图分类号: G642.423

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2020)09-0162-06

拉曼光谱法是中南大学应用化学专业本科生分析化学课程的重要学习内容, 掌握拉曼光谱法的基本原理、方法及其在应用化学中的应用, 培养利用基础知识解决实际问题的能力, 对应用化学专业本科生的培养具有重要的作用^[1-2]. 在传统的课堂教学中, 学生掌握知识的比率较少. “学习金字塔”理论反映了“以学生为中心”的现代课堂教学思想^[3], 该理论指出在通过讨论、参与实践和教他人或立即应用的 3 种互动式教学过程中, 学生掌握知识的比率分别是 50%, 75% 和 90%, 充分说明了学生讨论、参与实践等互动式教学的重要性.

受仪器等因素的限制, 目前国内高校在拉曼光谱方面的“以学生为中心”的实验教学内容较少. 通常采用四氯化碳、苯或一二氯乙烷等体系, 这类物质由于分子结构简单, 化学键种类较少, 所得拉曼光谱图比较直观, 分析起来比较容易, 利于学生对拉曼光谱知识的学习和理解^[3]. 但是由于这些化学物质在生活中应用不多, 实验过程比较枯燥, 学生兴趣不大. 针对拉曼光谱教学存在的问题, 2012 年同济大学的丛培盛等人^[4]开发了拉曼光谱鉴定宝石的新实验, 用于本科生实验教学, 大大增加了学生学习的兴趣; 2014 年首都医科大学的吴宝平等^[5]设计和实践了一组医学研究中运用表面增强拉曼光谱检测技术的教学实验, 非常适合本科低年级学生学习; 2017 年, 中国科技大学的陈彪^[6]对“文物光谱分析”进行了一系列的教学探索实践, 根据学生本科专业差别非常大的实际情况, 弱化过于理论性的内容, 强调拉曼光谱法的基本原理和方法, 强化拉曼光谱法在科技考古研究中的应用, 同时注意培养学生基本的学习和研究能力. 但是, 总体来说, 拉曼光谱实验课堂内容不够充实, 学生参与度有限, 限制了拉曼光谱在本科实验教学当中的应用.

针对这些问题, 中南大学化学化工学院利用便携式拉曼光谱仪, 开发了表面增强拉曼光谱检测食品安全的实验. 该实验一方面可作为专业实验开设, 用于拓展拉曼光谱类实验的教学内容, 加强学生讨论、参与实践和立即应用的互动式教学; 另一方面, 也可用于非化学专业的开放实验教学.

① 收稿日期: 2019-11-16

基金项目: 国家自然科学基金重大科研仪器研制项目(21727810).

作者简介: 邓春艳(1981—), 女, 博士, 主要从事电化学教学和新型传感器的研究.

1 表面增强拉曼光谱法检测食品安全实验原理

随着社会发展,各种各样的美食背后隐藏着各种危害. 9-(*o*-羧基苯基)-6-羟基-2,4,5,7-四碘-3H-咕吨-3-酮二钠盐-水合物(俗称赤藓红)作为一种食品非法添加剂经常被一些不法商贩使用;同时在水产养殖中,大量的碱式碳酸铜(俗称孔雀石绿)被用来杀菌,导致孔雀石绿的残留. 不论是赤藓红还是孔雀石绿对人体都具有致癌作用. 赤藓红和孔雀石绿的检测一般采用的是液相色谱-质谱法,该方法检测限低,适用于不同的检测样本,但耗时长,无法在现场检测,且要求实验员有较高的技术水平^[6-7].

拉曼散射是光通过介质时由于入射光与分子运动相互作用而引起的频率发生变化的散射,拉曼光谱常用来表征分子的结构特征,也被称为分子的“指纹谱”. 但是,由于普通拉曼光谱受到其拉曼散射信号较弱的限制,很难进行微量化学分析. 1974 年, Fleischmann 等人通过对银电极表面反复进行粗糙化处理后,首次获得了银电极表面单层吡啶分子的拉曼光谱图; 1976 年, Creighton 等人分别通过系列计算和实验,发现在粗糙表面上拉曼信号能够得到 105~106 倍的增强效果. 这种在贵金属和部分过渡金属粗糙表面以及相应的纳米粒子表面都存在较好的增强效果,这种增强效应称为表面增强拉曼散射效应(surface-enhanced Ramans, SERS)^[8-10]. 因此,在之后的研究中人们用贵金属粗糙表面获得 SERS,以达到灵敏检测样品的目的. SERS 的发现能有效避免溶液中相同物种的信号干扰,在食品质量安全快速检测方面具有良好的应用前景^[11].

金、银纳米颗粒由于其方便可控的合成方法、较好的化学稳定性,在 SERS 领域广受应用. 人们从结构、形貌和尺寸等各方面调控,形成了基于这两种贵金属成分的纳米颗粒 SERS 基底的系列研究^[12-13]. SERS 中常用的纳米粒子基底包括球形纳米粒子、纳米棒等粒子自组装或溶胶基底,核壳式纳米粒子基底,二聚体纳米粒子基底和具有较多热点的纳米星基底等等形式各异的基底. 因此,合成和表征方法是开展 SERS 检测的前提. 基于金、银纳米粒子的表面增强拉曼光谱法已被广泛地用于分析检测领域.

2 实验示例

2.1 仪器和样品

主要仪器: 荷兰 Avantes 公司的 AvaRaman-785TEC 便携式拉曼光谱仪,分辨率为 6 cm^{-1} . 拉曼光谱仪集成了高稳定性、窄线宽的激光器(波长为 785 nm).

待测样品: 赤藓红和孔雀石绿标准品的水溶液,直径为 56 nm 的金纳米粒子.

2.2 金纳米粒子的合成和检测

纳米粒子的合成一般采用湿法合成,即通过化学反应合成纳米粒子^[14]. 如控制一定的反应温度和浓度等条件,在表面活性剂保护下,使用还原剂(如具有还原性的柠檬酸钠、抗坏血酸、盐酸羟胺和硼氢化钠等)对金属盐溶液(如氯金酸、硝酸银)进行还原,即可得到所需的金、银纳米溶胶. 通常在合成粒径小于 10 nm 的金纳米粒子或银纳米颗粒时,需要采用还原能力较强的还原剂(如硼氢化钠等)进行还原,而对于 SERS 中常用的更大粒径的纳米粒子,通常应根据实验所需粒子形貌和尺寸,选择不同生长液,采用“种子生长法”合成. 直径为 56 nm 的金纳米粒子的具体合成过程如下.

1) 三口烧瓶、搅拌子、玻璃塞(王水浸泡 1 d,二次水冲洗,超声清洗 3 次);王水(硝酸与盐酸的体积比为 1:3);

2) 取 1.2 mL 的 1mg/L 氯金酸溶液和 99 mL 水,加入到三口烧瓶中,油浴搅拌加热到 130 °C,搅拌速度为 700 r/min;

3) 溶液沸腾(有较多气泡出现),一次性快速加入柠檬酸钠溶液(0.008 g 溶解于 1.5 mL 水中);加入后溶液颜色:无-黑-浅黄红色-黄红加深后(继续加热 15 min),自然搅拌冷却至室温.

2.3 金纳米粒子的表征

纳米粒子由于其独特的尺寸,往往需要借助特殊仪器对其进行表征^[15]. 针对纳米粒子粒径、形貌和组

成分等信息,一般可以采用 5 种方法进行表征. ①紫外-可见吸收光谱法:紫外-可见吸收光谱法可以很好地表征纳米粒子的尺寸、形貌相关信息. Mie 理论认为,球形纳米金粒子的紫外峰的位置随粒子尺寸的增大而红移,根据紫外四极峰判断纳米棒并计算其长径比等,由此可见,对纳米粒子紫外分析主要是基于局域电子离域化造成的差别进行判断的. 此外,通过紫外吸收峰吸收度也可以大致判断纳米金的浓度. ②扫描电子显微镜(SEM)及透射电子显微镜:通过电镜直观获得纳米粒子的尺寸、形貌、表面和内部成分以及微细结构等信息. ③X 射线衍射法(XRD):用 X 射线光源照射样品,根据特征谱峰图分析纳米粒子晶格等信息. ④动态光散射(DLS)技术:分析纳米粒子粒度信息,同时一般粒度仪配套测试溶胶 Zeta 电位信息可以判断纳米粒子溶胶稳定性等信息. ⑤暗场显微镜技术:可获得单颗粒纳米粒子表面光学、光催化反应等信息.

考虑到实验室仪器和操作的简易性,采用如下步骤来进行检测.

1) 紫外吸收测试:取 100 μL 于比色皿中,放入紫外可见分光光度计中测试,若在 520 nm 处出现吸收峰,可表明金纳米粒子合成成功;

2) 动态光散射测试:取 45 μL 于比色皿中,放入动态光散射仪中测试,出现峰值的位置,就是金纳米粒子的直径.

2.4 实验步骤

1) 调试仪器. 开机,仪器预热 5 min. 调整激光功率为 300 mW,曝光时间为 5 s;另外光谱分辨率为 6 cm^{-1} ,然后把酒精放置在拉曼光谱仪的比色皿内校正(主峰为 3000 cm^{-1} 处),检验仪器状态.

2) 测样. 把液体样品和金纳米粒子溶液混合放置在比色皿内. 10 min 后,拉曼光谱仪开始采集拉曼光谱,直到窗口中出现蓝色的光谱曲线,采集光谱结束,保存实验结果.

3) 数据处理. 用 Origin 作图工具对得到的数据进行处理,利用拉曼光谱的特征峰位置信息鉴定、识别食品非法添加剂和农药残留物.

2.5 结果示例

实例 1 赤藓红

赤藓红为红褐色颗粒或粉末状物质、无臭,易溶于水,水溶液为红色,对氧、热、氧化还原剂的耐受性好,染着力强,但耐酸及耐光性差,吸湿性差,在 pH 值小于 4.5 的条件下,形成不溶性的黄棕色沉淀,碱性时产生红色沉淀. 主要用于饮料、配制酒和糖果和焙烤食品等. 有不良厂家为了改变产品外观,吸引消费者购买,滥用人工合成色素. 美、英等国的科研人员在进行相关的研究后发现,人工合成色素非但不能向人体提供营养物质,而且会导致生育力下降、畸胎等等,甚至可能转换成致癌物质.

图 1 为实验过程中测得的质量浓度分别为 15 mg/L 和 5 mg/L 赤藓红溶液的拉曼光谱图,图 1 中 780 nm 附近的峰值是溶液对拉曼光谱仪中波长 λ_0 为的 785 nm 激光的瑞利散射导致.

按照拉曼频移 ν 的计算公式: $\nu = 10^7/\lambda_0 - 10^7/\lambda$, 其中波长 λ 和 λ_0 的单位都为 nm, ν 的单位为 cm^{-1} . 利用 Origin 软件处理得到不同质量浓度赤藓红溶液的拉曼频移图,波数范围在 $600 \sim 2\,000\text{ cm}^{-1}$ 的拉曼频移见图 2. 从图 2 可以看出,赤藓红溶液的拉曼光谱最强的特征频移分别 $620, 1\,270\text{ cm}^{-1}$, 与理论计算和实验测量的赤藓红拉曼特征频移一致^[16]. 所以学生可以通过这 2 个特征峰来判断在市场上买到各种饮料、红酒等液体食品中是否非法加入了赤藓红.

实例 2 孔雀石绿

孔雀石绿为金属光泽的结晶体,极易溶于水,水溶液呈蓝绿色. 它可用作杀菌、驱虫剂,是药用染料中抗菌效力较强的一类,属于三苯甲烷类染料,对鱼类养殖一般用于防治水霉病、烂鳃病以及寄生虫病等^[17-18]. 孔雀石绿是有毒的三苯甲烷类化学物,既是染料,也是杀真菌、杀细菌、杀寄生虫的药物,长期超量使用可致癌,在无公害水产养殖领域国家明令禁止添加. 由于孔雀石绿在水产养殖中抗菌效果较好,价格低廉,使得不少养鱼专业户还在使用,因此对于孔雀石绿的监控就显得格外重要.

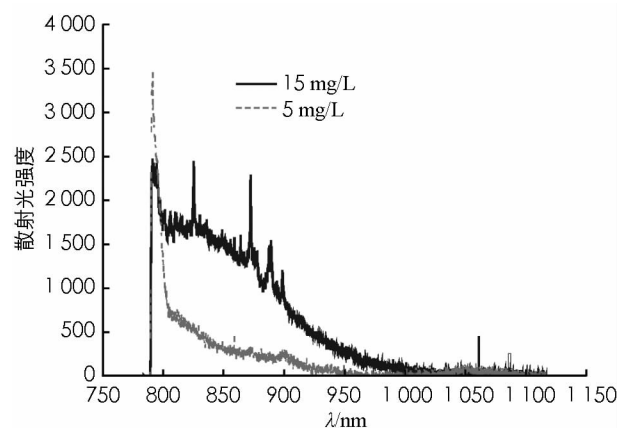


图 1 赤藓红溶液的表面增强拉曼光谱实验结果图

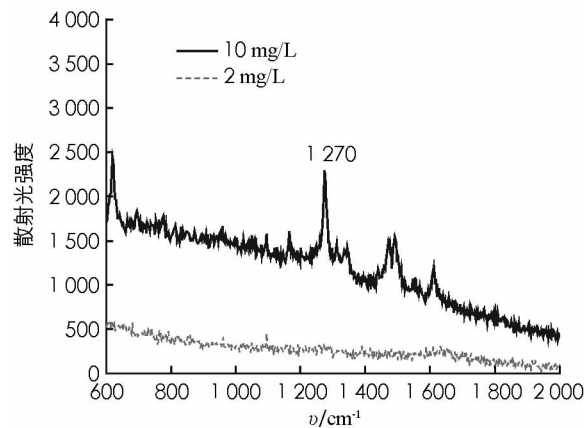


图 2 赤藓红溶液的表面增强拉曼频移图

图 3 为学生在实验过程中测得的不同浓度孔雀石绿标准液的拉曼光谱图, 按照拉曼频移 ν 的计算公式, 利用 Origin 软件处理得到质量浓度分别为 0.01 和 0.10 mg/L 孔雀石绿溶液的拉曼频移图。

按照拉曼频移计算公式, 波数范围在 $400 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ 的拉曼频移见图 4。从图 4 中可以看出, 孔雀石绿溶液的拉曼光谱最强的特征频移分别是 $436, 1170, 1615 \text{ cm}^{-1}$, 与理论计算和实验测量的孔雀石绿拉曼特征频移一致^[19], 可以通过这 3 个特征峰来判断在养鱼池塘中的水中是否非法加入了孔雀石绿。

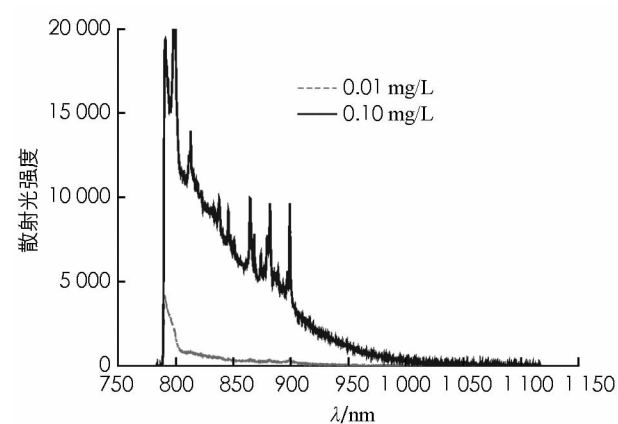


图 3 孔雀石绿溶液的表面增强拉曼光谱实验结果图

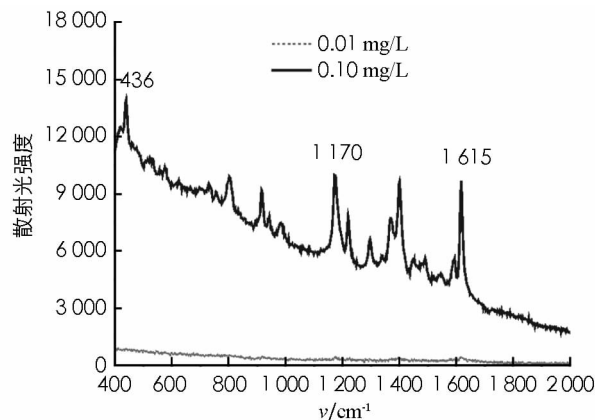


图 4 孔雀石绿溶液的表面增强拉曼频移图

3 教学效果分析

3.1 培养了学生的学习兴趣

在实验过程中, 学生自己带来了各种饮料用来检测是否含有赤藓红, 也有些学生带来了养鱼池塘里面的水来检测是否含有孔雀石绿。在检测饮料和池水时, 出现的拉曼谱线如果对应了赤藓红或者孔雀石绿两种物质的特征峰, 学生们会认真进行多次测量和数据分析。

如果多次测量的结果相同, 学生们会牢记以后不买这些饮料和鱼食用。而在检测饮料和池水时, 出现的拉曼特征谱线, 即使没有对应赤藓红和孔雀石绿两种物质的特征峰, 教师也会组织学生讨论这些特征谱线可能对应的化学物质, 这大大增加了学生学习拉曼光谱的兴趣。

3.2 提高了学生的科研能力

整个实验设计突出了研究方法的学习, 使学生不仅掌握了一种实验仪器, 也学习了科学研究的方法和过程。从学生进入实验室开始, 就指导学生进行文献查询。首先, 在实验过程中充分尊重学生的实验思路, 以启发和鼓励为主, 尽可能地帮助学生设计一个科学合理的实验过程; 其次, 后期的数据处理和分析也是一个完整的科研训练不可缺少的部分, 特别是利用 Origin 软件处理拉曼光谱仪的数据。在处理数据的过程

中,根据电磁波波长和波数的关系,学生掌握了波长的单位 nm 和波数的单位 cm^{-1} 之间的换算,具体换算公式为:波数 $=10^7/\text{波长}$.另外从换算公式中学生们也能深刻地理解光波波数的概念:波数是指在 1 个厘米之内包含光波波长的数目.

3.3 实验后的讨论

在常规的教学实验之后,为了提高学生的兴趣和创新能,组织学生一起开展了“海水为什么是蓝色的”的讨论.在 20 世纪 20 年代,印度著名的科学家拉曼就是因为 在轮船上针对一个小孩提出的这个问题的思考和研究,而成为第一位获得诺贝尔物理学奖的亚洲科学家.由于这个现象大家经常看见,学生对这个讨论非常感兴趣.

首先让学生回答出自己的答案,然后一起讨论这个问题和拉曼效应的内在关系.实际上,通过拉曼的研究,海水比天空更蓝.当光照射到海水上发生弹性散射和非弹性散射,弹性散射的散射光是与激发光波长相同的成分,非弹性散射的散射光有比激发光波长长的和短的成分,统称为拉曼效应.海水即水分子对光谱上蓝色一端的色光散射更为强烈,所以海水呈现蓝色.拉曼和他的学生们想了许多办法研究这一现象,他们在固体、液体和气体中,分别发现了一种普遍存在的光的非弹性散射效应,现被人们统称为拉曼效应.拉曼效应的发现为 20 世纪初科学界最终接受了光的粒子学说提供了强有力的证据.

通过深刻思考和激烈讨论,学生们从拉曼效应的发现过程中,深刻体会到做任何事情如果有一颗对“未知”的好奇心,并保持持之以恒的努力,肯定会取得收获的道理.

4 结 论

通过分析拉曼光谱的特征峰位置信息,结合实验室已有的科研设备,开发了表面增强拉曼光谱检测食品安全的教学实验.在教学过程中,还包含了对表面增强拉曼的理论解释、金纳米粒子的合成和检测实验以及讨论拉曼效应的发现过程.

该教学实验集专业性和趣味性为一体,和学生的日常生活息息相关,不仅拓宽了实验的教学内容、增加了学生的学习兴趣 and 动力,还通过学生之间充分的讨论和思考,达到激发学生创新意识、提高学生科学素质的目的,在实践中也取得了良好的效果.

参考文献:

- [1] 钟国清.无机及分析化学实验改革与绿色化实验教材建设[J].西南师范大学学报(自然科学版),2018,43(5):162-166.
- [2] 张家毅,李丽枝,王凤琴,等.构建地方高校开放实验室创新模式的实践[J].西南师范大学学报(自然科学版),2019,44(7):150-155.
- [3] 白广梅,任海荣,赵靖强.学习金字塔理论在无机/普化实验教学中的应用[J].实验室科学,2018,21(5):144-147.
- [4] 丛培盛,孙玉萍,王晓岗,等.拉曼光谱鉴别宝石教学实验的开发[J].实验技术与管理,2012,29(8):137-139.
- [5] 吴宝平,曲典,王燕,等.表面增强拉曼光谱检测系统在实验教学中的应用[J].实验技术与管理,2014,31(5):55-57,70.
- [6] 陈彪.科技考古课程中拉曼光谱法教学改革初探[J].西南师范大学学报(自然科学版),2015,40(7):188-192.
- [7] 陈蓓蓓,陆洋,马宁,等.表面增强拉曼光谱技术在食品安全快速检测中的应用[J].贵州科学,2012,30(6):24-29.
- [8] 蒋睿,罗理勇,常睿,等.普洱生茶和熟茶的品质化学成分分析比较[J].西南大学学报(自然科学版),2018,40(6):38-47.
- [9] 张璐涛,周光明,罗丹,等.表面增强拉曼光谱快速检测蜂蜜中的金霉素残留[J].高等学校化学学报,2018,39(8):1662-1667.
- [10] 郭小莹,邱立,张进杰,等.表面增强拉曼光谱对鱼肉中组胺的快速定量分析[J].光谱学与光谱分析,2019,39(8):2561-2567.

- [11] 刘春伟,郭 浔,焦 义,等.表面增强拉曼光谱技术在食品安全现场快速检测中的应用 [C]//第二届国际食品安全高峰论坛,2009:9-11.
- [12] 冯 微,王博蔚,郑 艳,等.金纳米粒子簇的制备及表面增强拉曼光谱 [J]. 高等学校化学学报,2018,39(9):1875-1880.
- [13] 钟 洁,黄 青.基于不同大小 $\text{SiO}_2 @ \text{Au}$ 纳米粒子的 SERS 技术检测多氯联苯 [J]. 光散射学报,2018,30(4):325-331.
- [14] 周 亭,刘淑贞,杨涛瑞,等.金纳米颗粒制备及性能研究综合性实验 [J]. 实验技术与管理,2019,36(4):57-62.
- [15] 周睿璐,付大友,袁 东,等.纳米金的制备、表征及应用研究 [J]. 四川理工学院学报(自然科学版),2016,29(3):14-18.
- [16] 李 言,谢云飞,钱 和,等.表面增强拉曼光谱快速检测赤藓红 [J]. 食品工业科技,2013,34(11):307-309,312.
- [17] 张梓涵,赵志慧,张苑怡,等.新型银包铜纳米线的制备及在检测罗非鱼中孔雀石绿残留中的应用 [J]. 食品工业科技,2019,40(16):212-217.
- [18] 王蓓蓓,李尔春,卫星华,等.液质联用法测定水产品中孔雀石绿和隐色孔雀石绿残留量 [J], 食品安全质量检测学报,2020,11(6):1827-1832.
- [19] 王利华,王佳慧,韩艳云,等. $\text{Au}@ \text{Ag}$ 纳米粒子表面增强拉曼光谱法高灵敏检测孔雀石绿 [J]. 武汉工程大学学报,2018,40(1):40-45.

Development of Teaching Experimental for Food Safety Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

DENG Chun-yan, XIE Yun-yan, ZHANG Yi

School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410010, China

Abstract: In order to strengthen the interactive learning of students' discussion, practice and immediate application, a series of teaching experiments of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for food safety detection have been designed and practiced, which are suitable for undergraduate students. The principles of SERS, the synthesis and characterization of nanoparticles, and SERS have been introduced. The teaching methods and process of the experiment have been explored in the aspects of food detection. Practice shows that the experiment can improve students' learning interest, practical ability and scientific research ability.

Key words: surface-enhanced Raman; food safety; experimental teaching; Raman effect

责任编辑 潘春燕