

仪器分析实验课程建设：表面增强拉曼光谱快速分析食用色素

张卓旻*, 黄韩冰, 林亮秋, 刘景松, 李攻科*

中山大学化学学院, 广州 510006

摘要: 表面增强拉曼光谱(Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)由于具有检测速度快、仪器便携性好、灵敏度高及谱图指纹特征丰富等特点, 近年来作为一种重要的仪器分析方法已逐步应用于食品安全分析。因此, 我们结合前期科研基础, 科教融合, 设计了“表面增强拉曼光谱快速分析食用色素”实验。学生通过增强基底制备、SERS检测条件的优化、SERS快速分析方法的建立及应用等内容的训练, 可充分学习SERS快速分析方法的实验技能, 并收获相关的前沿知识, 培养实验创新能力。

关键词: 仪器分析实验; 表面增强拉曼光谱; 快速分析; 食用色素

中图分类号: G64; O6

Course Construction of Instrumental Analysis Experiment: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Rapid Detection of Edible Pigments

Zhuomin Zhang*, Hanbing Huang, Liangqiu Lin, Jingsong Liu, Gongke Li*

School of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China.

Abstract: Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), as an important instrumental analysis method, has been gradually applied to food safety analysis in recent years due to its advantages in fast detection speed, convenient instrument portability, high sensitivity and abundant fingerprint characteristics. Building on prior research foundations and integrating science with education, we designed an experiment titled “Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Rapid Detection of Edible Pigment”. This experiment aims to provide students with hands-on training in the preparation of SERS substrates, optimization of SERS detection, and the development and application of SERS-based rapid analytical methods. By engaging in this experiment, students will not only acquire essential skills in SERS rapid detection but also gain in-depth knowledge of cutting-edge techniques and cultivate their abilities in experimental innovation.

Key Words: Instrumental analysis experiment; Surface-enhanced Raman spectroscopy; Rapid detection; Edible pigments

仪器分析实验课程是许多高等学校化学类及其相关专业面向本科生开设的核心专业课程^[1]。学生通过该课程的学习, 将从“常量”的经典化学分析方法学习向“痕量”的前沿仪器分析方法学习过渡, 并学习现代仪器分析方法的操作及使用^[2,3]。因此, 将相对成熟的分析化学前沿方法引入仪器

收稿: 2023-08-07; 录用: 2023-09-11; 网络发表: 2023-10-13

*通讯作者, Emails: zzm@mail.sysu.edu.cn (张卓旻); cesgkl@mail.sysu.edu.cn (李攻科)

基金资助: 2022年(教务(2022)91号)及2023年中山大学教学质量与教学改革工程项目; 国家自然科学基金项目(22074161); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2023A1515011548)

分析实验课程,对所开设的实验内容进行定期更新,对培养学生全景化的分析化学视野及创新创造能力,具有重要的意义。

作为分子光谱典型代表技术之一的表面增强拉曼光谱(Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS),由于具有检测速度快、灵敏度高及谱图指纹特征丰富等特点^[4,5],近年来已逐渐应用于食品安全快速分析体系中。快速分析方法作为现代分析化学的重要发展方向之一,我们课题组近年来发展了一系列食品安全SERS快速分析技术^[6-8],有效提高了SERS快速分析的选择性、灵敏度及准确度。因此,在前期研究的基础上,结合仪器分析实验课程的教学要求,将食品安全SERS快速分析引入到本科实验教学体系中,科教融合,建设仪器分析实验课程,将为化学及其相关专业的创新型人才培养提供助力。

偶氮类食用色素是食品加工中广泛使用的一类人工合成色素,可用于增强食品的外观特征。由于偶氮类色素具有芳香环结构和偶氮官能团,大量摄入此类色素对人体身体健康将产生潜在风险,因此相关国家标准(如GB 2760-2014^[9]等)严格限定了其添加量,如柠檬黄(Lemon Yellow, LY)和赤藓红(Erythrosine B, EB)在饮料类中的最大使用限量分别为 $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $0.05\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。发展食品中偶氮类食用色素的快速分析方法,对食品安全监测具有重要意义。SERS技术灵敏度高,理论上能检测单个分子,其检出限远低于LY和EB的限量,还具有操作简便、检测时间短等优点,因此适用于食用色素的快速分析。目前,许多国家标准^[10,11]采用分光光度法检测LY和EB,灵敏度不佳,且易受样品基质的干扰。而SERS光谱谱图具有精细的指纹特征,灵敏度高,且能进行无损检测,保持样品的完整性,因此非常适合于食用色素的快速分析。

因此,我们设计了“表面增强拉曼光谱快速分析食用色素”的实验,实验内容涉及SERS基底的制备、SERS检测条件的优化、SERS快速分析方法的建立及应用等,实验内容饱满、实验技能训练充分、整体难易适中、实用性强,适合作为高等学校化学类及其相关专业仪器分析实验课程的选用实验。

1 实验目的

- (1) 了解拉曼光谱仪的工作原理、基本结构。
- (2) 了解常规贵金属增强基底的合成方法。
- (3) 掌握表面增强拉曼光谱分析法的原理及操作。

2 实验部分

2.1 实验原理

拉曼光谱是一种分子振动光谱技术,主要利用光子的非弹性散射,也就是拉曼散射,来获取可用于识别分子结构的指纹光谱。然而,自发的拉曼散射通常很微弱,这限制了拉曼光谱分析的应用和发展。当分子靠近粗糙的金属纳米粒子(如金或银纳米粒子)时,由于金属的局域表面等离子体共振导致的电磁增强和金属与分子之间的电荷转移引起的化学增强,分子的拉曼信号会被放大,产生SERS现象。本实验通过化学还原法制备纳米金增强基底,并优化SERS检测条件,建立食用色素LY及EB的SERS快速分析方法,并实际应用于有色饮料中痕量食用色素的快速分析。

2.2 仪器

爱丁堡一体化全自动显微共聚焦拉曼光谱仪RM5(英国);恒温油浴锅等。拉曼检测条件:波长为633 nm的激光并设置激光功率为100%,光栅分辨率为 $900\text{ gr}\cdot\text{mm}^{-1}$,焦孔为2 mm,狭缝为50 μm ,曝光时间为1 s,积分时间为30 s。

2.3 试剂

三水合氯金酸($\text{HAuCl}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 48%–50% Au basis)、三水合柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 98%)、赤藓红B钠盐标准品(93%)、柠檬黄标准品(95%)。

2.4 实验步骤

2.4.1 纳米金SERS增强基底的制备

用分析天平称取1.00 g $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，使用超纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)溶解，配制成质量浓度为1.0%的 HAuCl_4 溶液。移取1.0%的 HAuCl_4 溶液1.0 mL稀释定容于100.0 mL容量瓶，然后转移到干净的三颈圆底烧瓶中，在磁力搅拌器上加热并在 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下搅拌，至初沸，采用移液枪一次性快速加入质量浓度为1.0%的柠檬酸三钠溶液1.0 mL到烧瓶中。搅拌10 min后停止加热，此时可观察到反应溶液变成透亮的酒红色。最后，以 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速继续搅拌5 min，逐渐冷却至室温。将冷却后的溶液转移至100.0 mL容量瓶中定容，备用。采用紫外-可见光度计在200–800 nm波长范围内对所制备的纳米金进行扫描，确定粒径大小。

2.4.2 定性分析

用乙醇擦拭载玻片，待自然风干后，分别滴加浓度为 $100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LY和EB溶液到玻片上。将承载着液滴的玻片进行烘干直至水分完全蒸发，用拉曼光谱仪采集LY和EB的拉曼光谱图，通过解析所获得光谱的特征峰进行定性分析，并确定后续的定量特征峰。

2.4.3 定量分析

(1) SERS定量分析条件的优化。

LY标准溶液的配制：分析天平准确称取0.1000 g LY标样，用少量超纯水溶解后定容于100.0 mL容量瓶中，配制标准储备液；采用超纯水逐级稀释储备液，获得相应浓度的LY标准溶液。EB标准溶液的配制：分析天平准确称取0.0100 g EB标样，用少量超纯水溶解后定容于100.0 mL容量瓶中，配制标准储备液；采用超纯水逐级稀释储备液，获得相应浓度的EB标准溶液。

基底的“热点”密度是影响信号增强的重要因素。为了获得理想的增强效果，实验首先优化了样品溶液与SERS增强基底的体积比。对于LY，采用 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LY标准溶液与纳米金基底溶液混合均匀后孵育15 min，得到LY标准溶液与纳米金基底体积比($V_1 : V_2$)分别为2 : 1、4 : 3、1 : 1、2 : 3、1 : 2、1 : 3的混合溶液。对于EB，类似地配制 $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EB标准溶液与纳米金基底体积比($V_1 : V_2$)分别为2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4的混合溶液。移取 $10.0 \mu\text{L}$ 上述混合溶液滴到硅片上，在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥浓缩制成待测试样。用拉曼光谱仪检测时，需要先调整测试样与物镜之间的距离，缓慢向上移动样品台直至显微成像系统上可观察到清晰的图像，此时对焦成功。关闭成像光源后在暗场条件下开始采集光谱，得到SERS特征峰的信号强度。在坐标纸上以样品溶液与纳米金基底体积比($V_1 : V_2$)为横坐标，相应的SERS特征峰强度为纵坐标，绘制曲线，确定样品溶液与SERS增强基底的最佳体积比。

其次，优化SERS积分时间。分别将 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LY溶液 $100 \mu\text{L}$ 和 $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的EB溶液 $100 \mu\text{L}$ 与纳米金基底按照最佳体积比各自混合孵育后，分别移取 $10.0 \mu\text{L}$ 孵育后的溶液滴到硅片上，在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥浓缩制成待测试样。用拉曼光谱仪在不同的积分时间(LY: 10、20、30、40、50和60 s; EB: 1、3、5、7、10和12 s)采集测试样的信号，得到SERS特征峰的信号强度。在坐标纸上以积分时间(s)为横坐标，相应的SERS特征峰强度为纵坐标，绘制曲线，确定优化的积分时间。

(2) SERS定量分析方法的建立。

移取不同浓度的LY或EB标准溶液于微量离心管，并加入纳米金基底，摇匀后孵育15 min。分别移取 $10.0 \mu\text{L}$ 上述混合溶液滴加于硅片上，在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥浓缩制成待测试样。在优化的条件下，用拉曼光谱仪测定待测试样，以定量特征峰强度为纵坐标，LY或EB标准溶液的浓度为横坐标，拟合标准曲线，考查方法的精密度，获取方法检出限(Limit of detection, LOD)，建立SERS定量分析方法。

2.4.4 实际样品分析

在实际样品测试中，采用超声和过滤快速前处理方法去除样品中的 CO_2 和糖类等基体成分，减少基质效应对SERS分析结果的影响，有效提高分析选择性。用移液管移取25.0 mL饮料样品于50.0 mL离心管中，超声40 min去除二氧化碳后，置于离心机中，以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心8 min，取10.0 mL

上清液用0.45 μm 水系有机尼龙滤头过滤至试管中得到滤液。

移取100.0 μL 滤液与200.0 μL 纳米金基底于1.5 mL微量离心管内混匀振荡5 min并孵育15 min, 得到待测溶液。移取10.0 μL 待测溶液滴加于硅片上, 在60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥制成待测试样。用拉曼光谱仪测定待测试样, 记录定量特征峰强度, 并计算饮料样品中LY或EB的含量(用 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 表示)。

3 实验结果

3.1 定性分析

对LY和EB标准品进行拉曼光谱测定, 获取相应的拉曼光谱图。由图1可见, LY的拉曼谱图在625、1129、1360、1500和1600 cm^{-1} 处出现了特征峰, 分别归属于环变形、C-C伸缩振动、N=N伸缩振动、C=C伸缩振动^[10], 与LY的结构特征吻合。进一步选取1500 cm^{-1} 处特征峰用于后续的定量分析。EB的主要特征峰出现在614、1166、1276和1618 cm^{-1} 处, 其分别归属于C-C-C、C-H面内弯曲振动、C-C伸缩振动和C=C伸缩振动^[12], 与EB的结构特征吻合。进一步选取1618 cm^{-1} 处特征峰用于后续的定量分析。

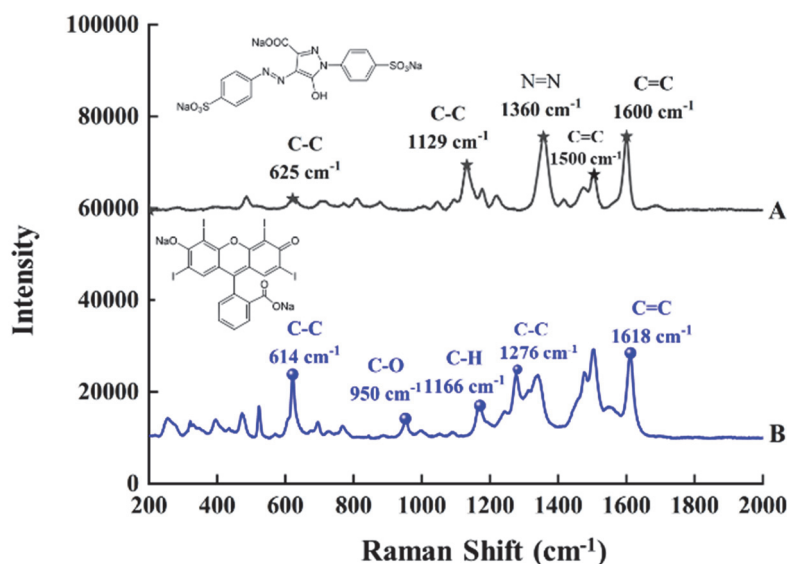


图1 LY (A)和EB (B)的拉曼光谱图

3.2 分析条件的优化

实验优化了影响方法灵敏度及准确度的分析条件, 包括样品溶液与纳米金基底的体积比及积分时间。首先, 增强基底的用量会直接影响“热点”密度, 从而影响SERS分析方法灵敏度及准确度。实验优化了样品溶液与纳米金基底体积比($V_1 : V_2$), 结果如图2A和2B显示, 随着Au NPs基底体积的增加, SERS响应逐级增加, 在 $V_1 : V_2$ 为1 : 2时获得最大响应, 之后响应有所降低。Au NPs基底溶液使用量过低, 可能会降低“热点”密度, 导致SERS信号强度低; 而使用过多的Au NPs基底也可能会稀释样品, 甚至引起纳米颗粒团聚, 导致SERS信号强度下降。因此, 实验选取 $V_1 : V_2 = 1 : 2$ 为优化的样品溶液与纳米金基底体积比。

积分时间也是影响SERS分析灵敏度的重要因素, 同时充足的积分时间才能保证采集到完整清晰的指纹图谱。实验分别对LY (10–60 s)和EB SERS(1–12 s)分析的积分时间进行了优化, 结果如图2C和2D所示。结果表明, 随着积分时间的延长, SERS信号强度呈现先升高后降低, 且分别30 s和10 s时获得最大SERS响应。积分时间的增加会使采集到的光谱信号逐渐累积, 导致SERS信号上升; 而积分时间过长时, 过量的激光照射可能分解样品, 反而引起SERS响应降低。因此, 实验分别选取30 s和10 s作为优化的LY和EB积分时间。

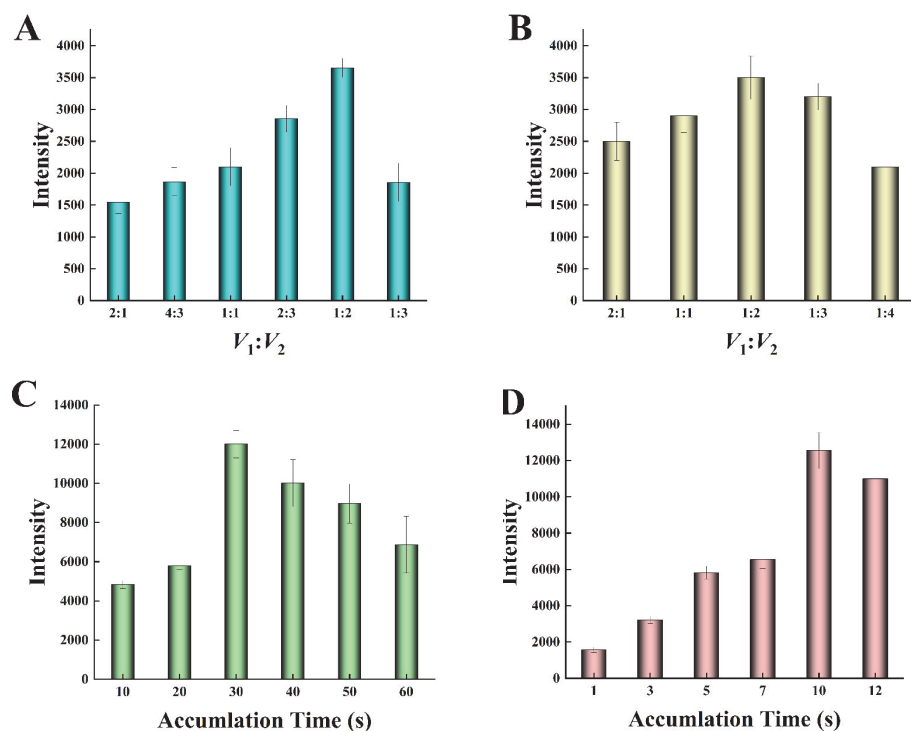


图2 样品溶液与纳米金基底的体积比(A: LY; B: EB)及积分时间的优化(C: LY; D: EB)

3.3 定量分析

在优化的实验条件下,采用纳米金基底分别建立了食用色素LY和EB的SERS快速分析方法。通过检测不同浓度的LY标准溶液在 1500 cm^{-1} 处的SERS响应所建立的标准曲线,结果如图3A和3B所示。结果表明LY标准曲线线性方程为 $I_{1500} = 588.5C_{LY} + 23.92$,其中 I_{1500} 为 1500 cm^{-1} 处的信号值, C_{LY} 为LY的浓度,线性范围为 $2.50\text{--}60.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,相关系数 R^2 为0.9978,LOD为 $1.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$)。此外,通过检测不同浓度的EB标准溶液在 1618 cm^{-1} 处的SERS响应所建立的标准曲线,结果如图3C和3D所示。结果表明EB标准曲线线性方程为 $I_{1618} = 782.54C_{EB} + 51.312$,其中 I_{1618} 为 1618 cm^{-1} 处的信号值, C_{EB} 为EB的浓度,线性范围为 $0.25\text{--}7.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,相关系数 R^2 为0.9946,LOD为 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$)。所建立的LY和EB分析方法线性范围及检出限均能满足实际样品分析要求。

3.4 实际样品分析

将所建立的SERS方法分别实际应用于2种有色饮料中LY及EB的快速检测,结果见表1。在饮料样品1中,可实际检出LY含量为 $14.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;饮料样品2中并未检出EB。通过加标回收实验进一步验证了该方法在实际样品检测中的可靠性。从表1可以看出,该方法对实际样品中LY和EB的加标回收率分别为92.0%–114%和96.0%–117%,并与HPLC分析方法进行了比较,SERS法与HPLC法的相对误差为–10.0%,进一步验证了SERS分析方法的准确性。结果表明,该方法可用于有色饮料中食用色素LY和EB的快速分析,结果准确可靠。相较于HPLC,SERS方法操作更为简单,仪器成本更低和检测时间更短,也适合于大学生进行基础实验教学。

4 实验教学安排及学生反馈

实验总时长约为7个学时,其中教师讲授1个学时,学生实验操作5个学时,课堂讨论1学时,可安排在一次实验课内完成。学生实验的学时分布为:纳米金SERS增强基底的制备,1.5学时;LY及EB标准品的定性分析,0.5学时;SERS定量分析方法的优化及建立,2学时;实际样品分析,1学时。

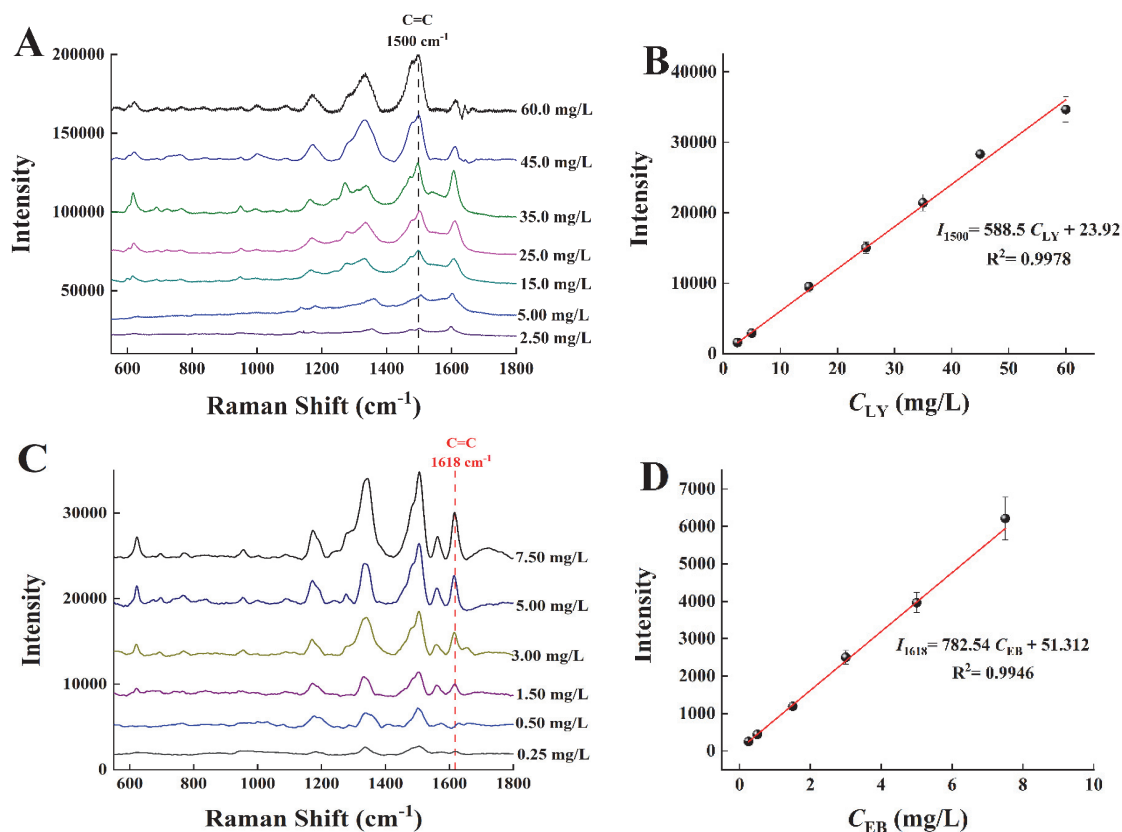


图3 纳米金基底对不同浓度LY标准溶液的SERS响应图(A)及所建立的标准曲线(B); 纳米金基底对不同浓度EB标准溶液的SERS响应图(C)及所建立的标准曲线(D)

表1 饮料样品中食用色素的含量测定及加标回收实验结果

分析物	样品	SERS方法				相对标准偏差 ($n = 3$, %)	HPLC-UV	相对 误差/%
		测定值/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	加标量/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	加标后 测定值/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%		测定值/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	
LY	饮料样品1	14.3	10.0	23.5	92.0	7.6	15.9	-10.0
			25.0	42.7	114	2.8		
EB	饮料样品2	N.D.	3.00	3.50	117	4.3	未检出	-
			5.00	4.80	96.0	6.7		

请大二化学类本科生按照上述实验步骤,开展纳米金基底制备、SERS检测条件的优化、SERS快速分析方法的建立及应用等实验,学生均能在规定学时内完成相应的实验内容,并取得测定结果。对参与实验的学生进行调查,学生反馈如下:通过“表面拉曼增强光谱快速分析食用色素”实验的学习,进一步加深了对SERS仪器结构及分析原理的认识,了解了SERS电磁增强及化学增强机理;掌握了SERS定性定量分析的基本操作,有效提升了纳米(材料)增强基底制备的实验技能;学习了SERS技术在食用安全快检分析中的实际应用,拓展了复杂体系快速分析的前沿知识。

5 结语

本实验结合典型的食品安全快检项目,将SERS分析方法与技术引入到仪器分析实验课程教学中

来, 设计了适合于化学类及其相关专业的本科基础实验, 难易适中, 可操作性强, 具有实际意义。该实验可系统训练学生制备纳米级增强基底-SERS分析条件优化-SERS定性定量分析方法建立-实际应用的实验操作技能及动手能力, 同时使学生将前沿知识与实际应用相结合, 进一步培养学生分析问题、解决问题及创新创造能力, 加强学生对分析化学中以“量”为核心概念的理解和应用。

参 考 文 献

- [1] 邹桂征, 孙树喆, 徐晓文, 黄锡荣, 杨国生, 吴波, 张斌. *大学化学*, **2022**, 37 (4), 2108084.
- [2] 张卓旻, 余忠宁, 陈颖诗, 代寒冰, 李攻科. *大学化学*, **2021**, 36 (9), 2106020.
- [3] 张卓旻, 黄路, 李攻科. *大学化学*, **2020**, 35 (3), 32.
- [4] Li, J. F.; Zhang, Y. J.; Ding, S. Y.; Panneerselvam, R.; Tian, Z. Q. *Chem. Rev.* **2017**, 117 (7), 5002.
- [5] Zhang, H.; Duan, S.; Radjenovic, P.-M.; Tian, Z. Q.; Li, J. F. *Acc. Chem. Res.* **2020**, 53 (4), 729.
- [6] Huang, L.; Huang, H. B.; Zhang, Z. M.; Li, G. K. *Anal. Chem.* **2023**, 95 (14), 5946.
- [7] Lai, H. S.; Chen, Z. Y.; Li, G. K.; Zhang, Z. M. *Anal. Chem.* **2022**, 94 (47), 16275.
- [8] Yu, Z. N.; Huang, L.; Zhang, Z. M.; Li, G. K. *Anal. Chem.* **2021**, 93 (38), 13072.
- [9] 国家卫生和计划生育委员会. GB2760-2014 食品安全国家标准食品添加剂使用标准实施指南. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会. GB 4481.1-2010 食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬黄. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [11] 国家卫生和计划生育委员会. GB 17512.1-2010 食品安全国家标准 食品添加剂 赤藓红. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [12] Li, L. Q.; Cui, Q. Q.; Li, M. H.; Li, T. H.; Cao, S. C.; Dong, S.; Wang, Y. J.; Dai, Q. Y.; Ning, J. M. *Food Chem.* **2023**, 398, 133841.