

文章编号:1674-2869(2018)01-0040-06

Au@Ag纳米粒子表面增强拉曼光谱法高灵敏检测孔雀石绿

王利华,王佳慧,韩艳云,朱运峰,吴文辉,肖康飞,战艺芳,曾令文*

武汉市农业科学院环境与安全研究所,湖北 武汉 430074

摘要:采用晶种增长-抗坏血酸室温还原法有效合成了 Au@Ag 纳米粒子。通过进一步优化 Au@Ag 纳米粒子的组成和体积、助剂 H (NaCl 和 KBr 的混合溶液) 的体积以及待测样品的加样顺序,在便携式拉曼光谱仪上成功实现了孔雀石绿(MG)的快速高灵敏检测。其对 MG 检测线性范围为 0.5 $\mu\text{g/L}$ ~10 $\mu\text{g/L}$,线性相关系数达到 0.991,实际可测最低浓度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。将本方法用于基围虾肉中 MG 的检测,直接检测未检出;用前处理液配制 MG 模拟样本,10 $\mu\text{g/L}$ 时信号明显可见。本方法有望用于水产品中 MG 的快速高灵敏检测。

关键词: Au@Ag 纳米粒子; 表面增强拉曼光谱; 孔雀石绿; 高灵敏检测; 基围虾

中图分类号:O657.37 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2018.01.007

Highly Sensitive Detection of Malachite Green by Surface-Enhanced Raman Scattering Method Using Au@Ag Nanoparticles

WANG Lihua, WANG Jiahui, HAN Yanyun, ZHU Yunfeng,
WU Wenhui, XIAO Kangfei, ZHAN Yifang, ZENG Lingwen*

Institute of Environment and Safety, Wuhan Academy of Agricultural Science, Wuhan 430074, China

Abstract: Au@Ag nanoparticles with excellent surface enhancement were synthesized by a seeded growth-ascorbic acid reduction. Through optimizing the molar ratio of Ag/Au, the volume of Au@Ag nanoparticles, the volume of auxiliary H (the mixture of KBr and NaCl) and the adding order of auxiliary H and tested samples, a highly sensitive and rapid qualitative detection of malachite green (MG) was achieved with a portable Raman spectrometer, whose detection limit was 0.5 $\mu\text{g/L}$ with a linear range from 0.5 $\mu\text{g/L}$ to 10 $\mu\text{g/L}$ ($R^2=0.991$). This detection method was also applied in the determination of MG in a shrimp sample from Baishazhou market of Wuhan, and no MG was found. However, the solution containing 10 $\mu\text{g/L}$ MG were detected with strong signals. This detection method is expected to be used in detecting MG for the aquatic products.

Keywords: Au@Ag nanoparticles; surface enhanced Raman scattering; malachite green; high sensitivity detection; shrimp

孔雀石绿(malachite green, MG),结构式见图1,是一种人工合成的三苯甲烷类有机化合物,既是染料也是细菌、真菌等的优质杀菌剂^[1]。因其对

水产类鱼虾体水霉病、鱼卵水霉病以及鳃霉病等细菌性疾病有良好的防治效果,20世纪30年代起就被广泛用于渔业生产^[2]。MG加入养殖水中后,

收稿日期:2017-12-06

基金项目:湖北省自然科学基金(ZRMS2017001031)

作者简介:王利华,博士,助理研究员。E-mail:wanglihua19850116@126.com

*通讯作者:曾令文,博士,研究员。E-mail:lzeng8@126.com

引文格式:王利华,王佳慧,韩艳云,等. Au@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.

容易被鱼、虾等吸收并代谢为无色 MG,两者均具有较高毒性和致癌性^[3-4]。因此,自 20 世纪 90 年代开始,世界上许多国家相继禁止其在可食用的水产类养殖中使用。我国于 2002 年也将 MG 列入了《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》,并明确禁止其用于所有食用动物的养殖^[5]。尽管如此,由于 MG 杀菌的高效性、廉价性,且暂时没有其他理想的替代药物,目前一些不法渔民仍将其用于水产养殖中,这种不法行为势必对人们的生命健康造成重大隐患。因此,在水产类产品流入市场之前,有必要进行 MG 检测。

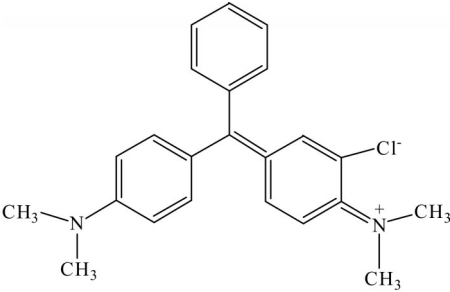


图1 孔雀石绿盐酸盐的结构式

Fig. 1 Structure of malachite green hydrochloride

MG 传统的检测方法主要有液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法等^[6-7]。尽管这些方法灵敏度高、准确度高,但均需要大型昂贵的仪器、专业的操作人员以及复杂的样品前处理等,检测时间长,无法满足水产类产品日益增长的现场快速筛查需求。表面增强拉曼光谱技术(surface enhanced Raman scattering, SERS)作为一种新兴的指纹光谱式检测技术,具有灵敏度高、特异性好、检测快速、操作简便且可实现无损检测的特点,在食品安全快检领域越来越受到重视^[8-10],它是现有快检方法中最有可能实现“傻瓜式”检测的技术之一。近年来,基于 SERS 技术的 MG 现场检测方法已有相关报道。例如,顾振华等^[11]基于纳米金和便携式拉曼光谱仪发展了一种养殖水中孔雀石绿快速检测方法。尽管该方法简单、快速,但灵敏度不够高,检测限为 5.0 μg/L。众所周知, SERS 技术最核心的内容是制备均一性好、增强效果好的金/银纳米材料充当增强基底实现待测对象的高灵敏检测。在金/银纳米材料中,尽管纳米金具有良好的稳定性,但其增强效果明显劣于银纳米材料;而单纯的银纳米材料在空气中又易氧化^[12]。因此,考虑到银包金材料不仅具有良好的稳定性且增强效果非常好,本文通过品种增长-抗坏血酸室温还原法合成了 Au@Ag 纳米材料,并以此为基底,采用 SERS 技术,成功构建了一种基于便携式

拉曼光谱仪的 MG 现场快速高灵敏检测方法,实际可实现的检测限低至 0.5 μg/L。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

紫外可见吸收光谱 (ultraviolet-visible absorption spectrum, UV-vis) 在 UV 分光光度计 (Shimadzu, UV-2600) 上采集。样品的透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 图在 FEI Tecnai G2 20 透射电子显微镜 (TWIN, Japan) 上测定。样品的 SERS 光谱在海洋光学亚洲分公司生产的便携式拉曼光谱仪 Accuman SR-510 Pro 上采集,其所用的激光光源波长为 (785 ± 0.5) nm,功率 350 mW。对于每一个样品,均在基底的不同位置至少采集 3 个 SERS 光谱,然后取平均值。

氯金酸购自上海九鼎化学科技有限公司,抗坏血酸 (质量分数为 99% ~ 100.5%)、柠檬酸钠和柠檬酸 (质量分数为 99%) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,硝酸银购自中国上海试剂一厂, MG 购自苏州快捷康生物技术有限公司,结晶紫 (crystal violet, CV) 购自国药集团化学试剂有限公司。所有其它试剂均为分析纯或更高纯度,且使用前未进一步处理。实验用水为 Milli-Q 超纯水 (阻值大于 18.2 MΩ·cm),基围虾购自武汉市白沙洲大市场。

1.2 纳米金的合成

纳米金的合成参照文献^[13]采用两步增长法合成。首先,合成增长所需的晶种。典型的过程如下:在烧瓶中,加入 2.5 mL HAuCl₄·3H₂O (质量浓度为 2 g/L) 溶液,稀释至 50 mL,剧烈搅拌,加热至沸腾后,快速加入 2 mL 柠檬酸钠-柠檬酸混合溶液 (其质量浓度分别为 10 g/L 和 5 g/L)。继续加热搅拌 5 min,冷却至室温备用。

第一步增长:取 3 mL 晶种稀释至 20 mL,室温下剧烈搅拌,将溶液 A 和 B 同时缓慢加入烧瓶中;之后在油浴条件下加热至沸腾,继续搅拌 30 min,最后冷却至室温。

第二步增长:取 4.5 mL 第一步增长获得的溶液稀释至 20 mL,室温下剧烈搅拌,将溶液 A 和 B 分别同时缓慢加入烧瓶中;之后在油浴中加热至沸腾,继续搅拌 30 min,最后冷却至室温备用。

以上两步增长中溶液 A 和溶液 B 的配制:

溶液 A: 2 mL HAuCl₄·3H₂O (质量浓度为 2 g/L) 溶液用水稀释至 10 mL;

溶液 B: 0.5 mL 抗坏血酸和 0.25 mL 柠檬酸钠 (其质量浓度均为 10 g/L) 混合用水稀释至 10 mL。

1.3 Au@Ag纳米颗粒的合成

Au@Ag纳米颗粒的合成参照文献^[14]进行。典型的合成过程如下:在5 μL 纳米金溶液中依次加入200 mL 柠檬酸钠溶液(38.8 mmol/L)、50 μL 抗坏血酸溶液(0.1 mol/L),室温剧烈搅拌下缓慢加入200 μL 硝酸银溶液(0.01 mol/L),持续剧烈搅拌约15 min后,将产物保存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.4 MG标准品以及实际样的SERS检测

MG标准溶液的配制:准确称取1.0 mg MG标准品粉末溶于1 mL 乙腈中,制得1 g/L 标准溶液。然后用水依次稀释不同倍数,分别配制100 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、3 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 的MG标准溶液。

MG标准品的SERS检测:200 μL Au@Ag纳米粒子溶液中,依次加入30 μL 助剂H(NaCl和KBr的混合溶液),200 μL 待测标准溶液,混匀后进行SERS测试。采集频率为5 s 5次。CV标准溶液的测试与MG类似,只需将MG标准品换成CV标准品即可。

MG实际样检测:首先,将菜市场购买的基围虾虾肉在国标的基础上稍加改变进行相关的前处理,直接检测时并未检出。随后将处理后获得的溶液用作基质,向其中加入MG的标准溶液,配成模拟样本进行检测。具体测试过程与标准品类似。

2 结果与讨论

2.1 纳米金和Au@Ag纳米粒子的表征

首先,对纳米金的合成过程进行了UV-vis表征。如图2(a)所示,初始合成的晶种颗粒在518.5 nm处有最大吸收峰,其可归属为纳米金的表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)峰。随着HAuCl₄溶液的加入,逐步增长后,该峰依次红移至520 nm和535 nm。对二次增长合成的金颗粒进一步进行TEM表征发现,此时的金颗粒为球形,且分散性较好、粒径较均一,如图2(a)中的插图所示。由于Au@Ag纳米粒子的SERS增强效果明显优于纳米金^[12],以二次增长合成的金纳米颗粒为种子,进一步合成了Au@Ag纳米粒子。从图2(b)中UV-vis可以看出,相对金纳米颗粒而言,此时的Au@Ag纳米粒子在402 nm和521 nm处有两个最大吸收峰,其分别归属为Au@Ag纳米粒子中银壳和金核的SPR峰。Au@Ag纳米粒子的TEM结果表明,因银壳的包裹,此时粒子的粒径相对增大,约100 nm,如图2(b)中的插图所示。

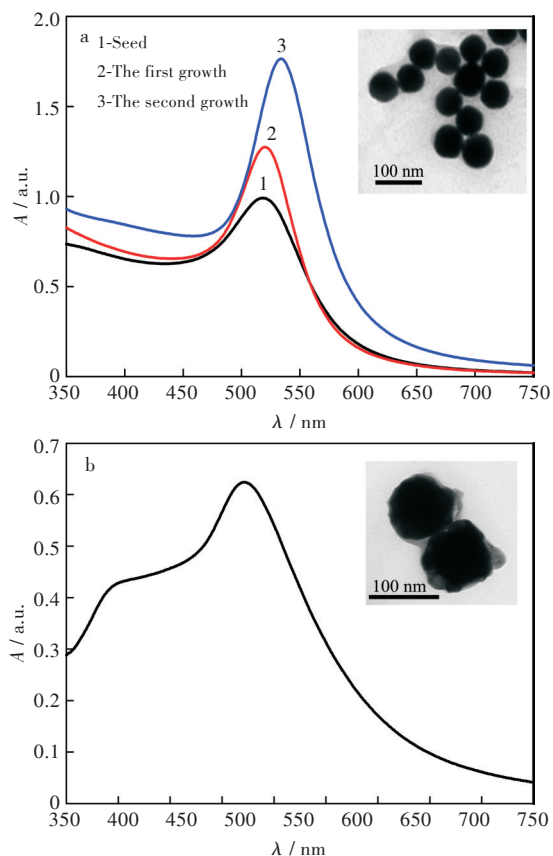


图2 (a)纳米金和(b)Au@Ag纳米粒子的UV-vis和TEM图
Fig. 2 UV-vis and TEM images of (a) Au nanoparticles and (b) Au@Ag nanoparticles

2.2 MG的表面增强拉曼光谱图

用SERS技术对10 $\mu\text{g/L}$ MG的可行性检测进行了验证。如图3所示,Au@Ag纳米粒子及Au@Ag纳米颗粒-助剂H的混合溶液均没有明显拉曼峰。当10 $\mu\text{g/L}$ MG标准溶液加入后,在438 cm^{-1} 、1 170 cm^{-1} 、1 617 cm^{-1} 处均显示出MG的特征峰,这与文献^[15-16]报道一致,可作为MG定性检测的依据。

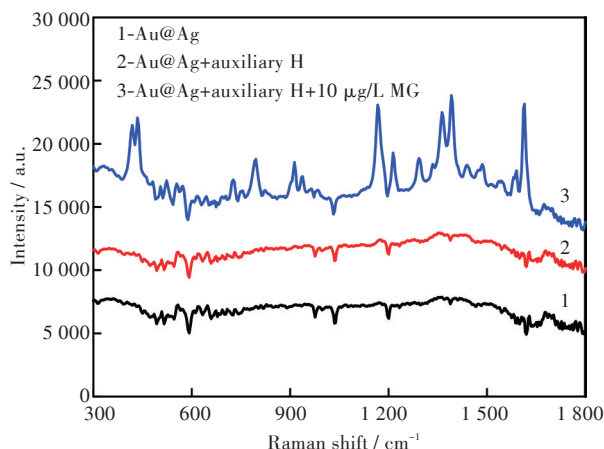


图3 不同溶液的SERS图

Fig. 3 SERS spectra of different solutions

2.3 MG检测条件的优化

为提高MG检测的灵敏度,本文对测试过程中 Au@Ag 纳米粒子中银层厚度、Au@Ag 纳米粒子的体积、助剂 H 的体积以及 MG 样品的加样顺序进行了优化,该优化过程均以 3 μg/L MG 在 1 617 cm⁻¹ 处峰作为参考(见图 4 中虚线框)。

由于不同银层厚度的 Au@Ag 纳米粒子增强效果不一样,通过固定 Au@Ag 纳米粒子合成过程中纳米金的粒径以及改变 AgNO₃ 加入的量,首先对 Au@Ag 纳米粒子的银层厚度进行了优化。如图 4(a) 所示,随着 AgNO₃ 体积的增加, Au@Ag 纳米粒子中银壳逐渐变厚, SERS 增强效果逐渐明显;当 AgNO₃ 体积增加至 200 μL 时, 1 617 cm⁻¹ 处峰强达到最大;而当 AgNO₃ 体积继续增加时,形成的 Au@Ag 纳米粒子溶液变得更加浑浊且容易聚沉, 增强效果有下降的趋势。因此,选取 AgNO₃ 的最佳体积为 200 μL。

接着,对增强试剂的量进行了优化。如图 4(b) 所示,随着 Au@Ag 纳米粒子体积的增加, MG 在 1 617 cm⁻¹ 处峰强逐渐增大;当体积增加至 200 μL 时,峰强达到最大值;继续增加体积,增强效果有下降的趋势。该现象表明, Au@Ag 纳米粒子的体积为 200 μL 时, MG 在其表面的单分子层吸附已达到最大值。因此,选取 Au@Ag 纳米粒子的最佳体积为 200 μL。

本文中助剂 H 为 NaCl 和 KBr 的混合溶液,其加入 Au@Ag 纳米粒子溶液胶中后会导致纳米颗粒发生聚集,使其局域等离子电磁场发生变化,继而在纳米颗粒间产生许多“热点”^[17]。当 MG 分子处于这些“热点”位置时,其拉曼信号会得到极大增强。其中,纳米颗粒聚集程度的高低直接影响“热点”的数量以及溶胶的沉降速度;而聚集过程中处于“热点”位置的 MG 分子数进一步影响其拉曼信号的放大倍数,最终影响其检测灵敏度。基于此,本文进一步对助剂 H 的体积进行了优化。从图 4(c) 可以看出,随着助剂 H 体积的增加, 1 617 cm⁻¹ 处峰强逐渐增大;当体积增加至 30 μL 时,峰强达到最大值;继续增加体积,增强效果逐步下降,当体积增加至 80 μL 时, 1 617 cm⁻¹ 处峰几乎消失。该现象表明,当助剂 H 体积为 30 μL 时,处于“热点”位置的 MG 分子达到最大值,此时再增加助剂体积,导致 Au@Ag 纳米颗粒聚集速度过快,很快下沉到检测器皿底部, MG 分子难以顺利到达“热点”位置,反而会影响 MG 拉曼信号的放大,起不到增强效果。因此,选取助剂 H 的最佳体积为 30 μL。

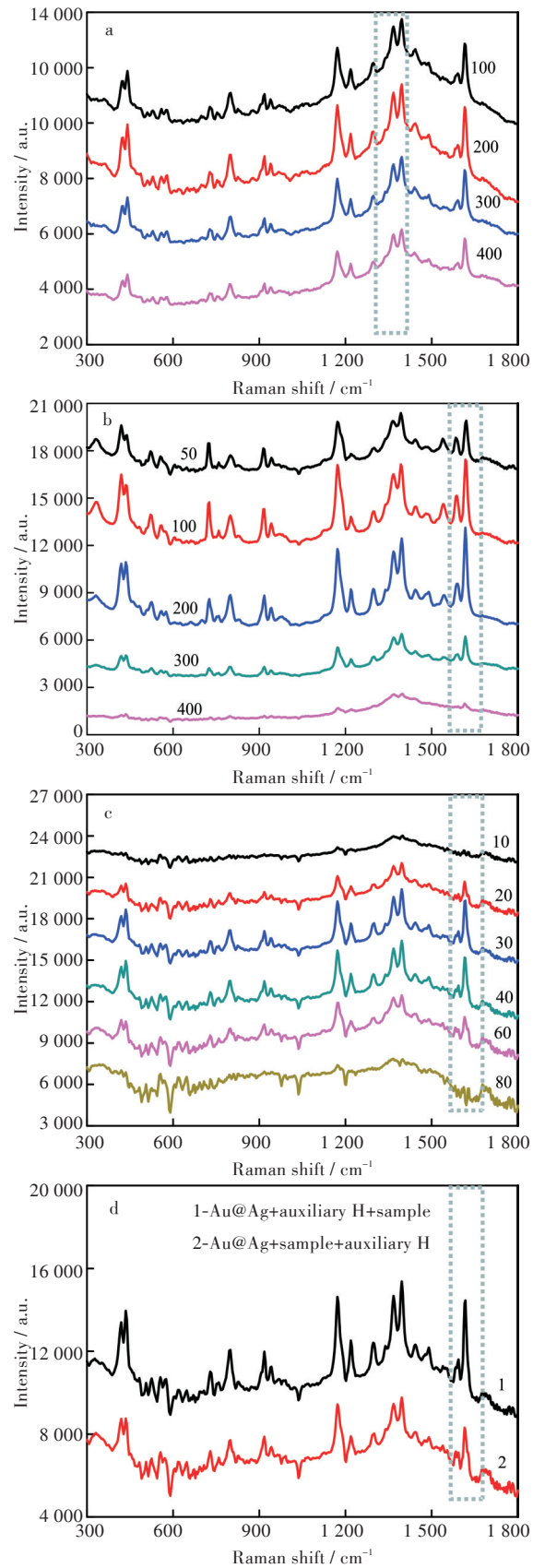


图 4 检测条件优化:(a)不同体积 AgNO₃ 对应的 Au@Ag 纳米粒子;(b) Au@Ag 纳米粒子溶液体积;(c) 助剂 H 体积;(d) 加样顺序(体积单位: mL)

Fig. 4 Optimized test conditions: (a) Au@Ag nanoparticles with different volumes of AgNO₃; (b) Volumes of Au@Ag nanoparticles; (c) Volumes of auxiliary H; (d) Order of sample added

最后,对检测过程中的加样顺序进行了优化。如图 4(d)所示,当待测液在助剂 H 之后加入时,1 617 cm⁻¹处峰强明显增大。这可能因为助剂中的卤素离子优先吸附到 Au@Ag 纳米粒子表面^[18],当待测液加入时,更有利于促进 MG 分子吸附到 Au@Ag 纳米粒子表面,从而使增强效果变得更强。因此,选用增强试剂、助剂 H、待测液为测试时的最佳加样顺序。

2.4 灵敏度实验

基于上述实验获得的优化条件,本文进一步考察了该方法检测 MG 的灵敏度情况。如图 5(a)所示,随着 MG 质量浓度的增加,其在 1 617 cm⁻¹处的特征峰逐渐增强。当 MG 质量浓度为 0.5 μg/L 时,其在 438 cm⁻¹、1 170 cm⁻¹、1 617 cm⁻¹处的特征峰仍明显可见。该方法最终检测 MG 的线性范围为 0.5 μg/L~10 μg/L ($R^2 = 0.991$),如图 5(b)所示,实际可检测到的最低浓度为 0.5 μg/L,优于现有基于便携式拉曼光谱仪的相关文献报道(例如,顾振华等^[11]检测养殖水中孔雀石绿检测限为 5 μg/L、李春颖等^[19]检测孔雀石绿标准品检测限为 0.8 μg/L),

表明该方法检测 MG 灵敏度很高。

此外,CV 与 MG 具有类似的杀菌作用,常被一起用于水产养殖中^[20-21]。因此,本文尝试用该方法对 CV 进行测试。从图 6(a)可以看出,该方法对 1 μg/L CV 具有非常好的测试效果,其在 802 cm⁻¹、941 cm⁻¹、1 170 cm⁻¹、1 620 cm⁻¹处的特征峰信号非常明显^[14]。

2.5 实际样测试

将基围虾虾肉进行前处理,与增强试剂 Au@Ag 纳米粒子以及助剂 H 混合后,直接进行 SERS 检测,未检出 MG。为测试该方法在实际样本中的检测能力,以虾肉前处理获得的溶液作为基质,配制 10 μg/L 和 20 μg/L 的 MG 模拟样本溶液进行测试。如图 6(b)所示,由于提取液中非组分(如小分子蛋白质)的干扰,拉曼谱图中荧光背景增强明显,拉曼峰强度较同浓度标准品有明显下降。尽管如此,模拟样本中 MG 质量浓度为 10 μg/L 时,其特征峰仍较好分辨。该结果表明,作为一种快速定性检测方式,该方法有望应用于实际样品的检测中。

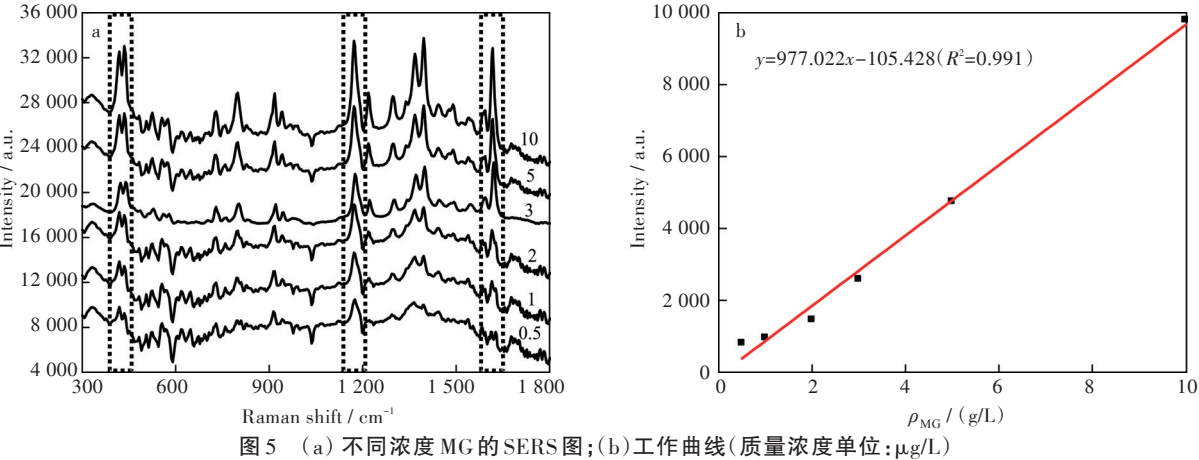


图 5 (a) 不同浓度 MG 的 SERS 图; (b) 工作曲线(质量浓度单位: μg/L)

Fig. 5 (a) SERS spectra of Au@Ag nanoparticles with different MG mass concentrations; (b) Working curve

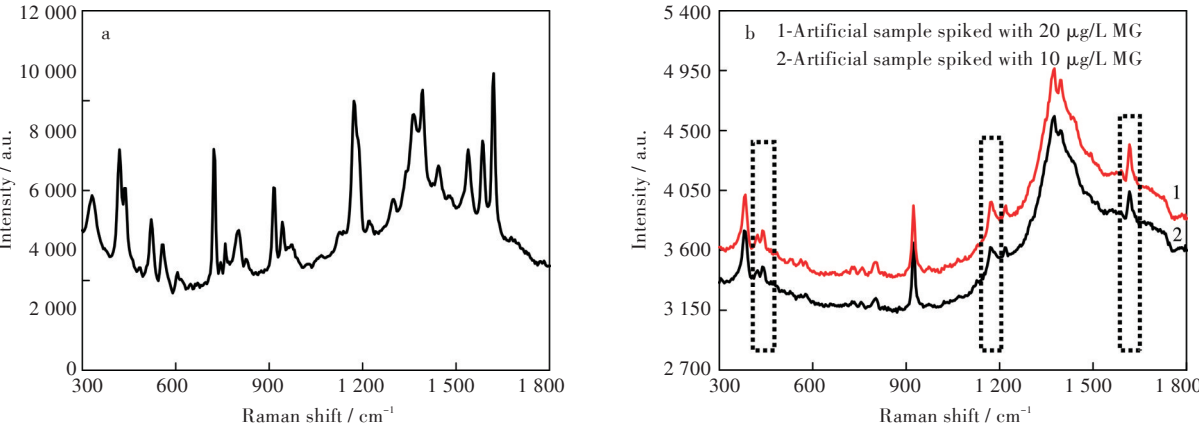


图 6 (a) 1 μg/L CV 的 SERS 图; (b) MG 模拟样本的 SERS 图

Fig. 6 (a) SERS spectrum of CV with 1 μg/L; (b) SERS spectra of artificial MG samples

3 结 语

本文采用晶种增长法合成粒径较均一、分散性良好的纳米金,并以此为种子进一步合成了 Au@Ag 纳米粒子。基于该材料优良的 SERS 增强效果以及便携式拉曼光谱仪,成功构建了一种简单、快速、高灵敏的 MG 的现场定性检测方法,对 MG 标准品可以实现低至 0.5 μg/L 的检测。进一步的实际样测试表明,该方法有望用于鱼肉、虾肉等水产品组织样本中 MG 的现场快速筛查,对保障人们舌尖上的安全具有重要的意义。

参考文献:

[1] 邱绪建,林洪,江洁. 渔药 MG 及关联化合物检测方法研究进展[J]. 海洋水产研究,2005,26(2):92-96.

[2] 王群,宋怿,马兵. 水产品中 MG 的风险评估(一)[J]. 中国渔业质量与标准,2011,1(2):38-43.

[3] SRIVASTAVA S, SINHA R, ROY D. Toxicological effects of malachite green [J]. Aquatic Toxicology, 2004,66(3):319-329.

[4] CULP S J, BLANKENSHIP L R, KUSEWITT D F, et al. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F₁ mice [J]. Chemico-Biological Interactions, 1999, 122 (3) : 153-170.

[5] 王玉堂. 禁用渔药化合物及其危害[J]. 中国水产, 2017(1):76-80.

[6] CHEN G Y, MIAO S. HPLC determination and MS confirmation of malachite green, gentian violet, and their leuco metabolite residues in channel catfish muscle [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (12):7109-7114.

[7] 李永夫,高华鹏,姚芳,等. 高效液相色谱法检测鳗鱼中 MG 及其代谢物残留[J]. 安徽农业科学,2009,37 (1):31-33.

[8] HUANG J, CHEN F, ZHANG Q, et al. 3D silver nanoparticles decorated zinc oxide/silicon heterostructured nanomace arrays as high-performance surface enhanced Raman scattering substrates [J]. ACS Applied Material & Interfaces, 2015, 7 (10) : 5725-5735.

[9] WANG P, WU L, LU Z C, et al. Gecko-inspired nanotentacle surface-enhanced Raman spectroscopy substrate for sampling and reliable detection of pesticide residues in fruits and vegetables [J]. Analytical

Chemistry, 2017, 89(4):2424-2431.

[10] WANG J F, WU X Z, WANG C W, et al. Facile synthesis of Au-coated magnetic nanoparticles and their application in bacteria detection via a SERS method [J]. ACS Applied Material & Interfaces, 2016,8(31):19958-19967.

[11] 顾振华,赵宇翔,吴卫平,等. 表面增强拉曼光谱法快速检测水产品中的孔雀石绿 [J]. 化学世界, 2011,52(1):14-16,22.

[12] SHEN A G, CHEN L F, XIE W, et al. Triplex Au-Ag-C core-shell nanoparticles as a novel Raman label [J]. Advanced Functional Materials, 2010, 20 (6) : 969-975.

[13] ZIEGLER C, EYCHMÜLLER A. Seeded growth synthesis of uniform gold nanoparticles with diameters of 15-300 nm [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2011,115(11):4502-4506.

[14] WANG L H, SHEN A G, LI X C, et al. Inclusion of guest materials in aqueous coordination network shells spontaneously generated by reacting 2, 5-dimercapto-1, 3, 4-thiadiazole with nanoscale metallic silver [J]. RSC Advances, 2014,4(65):34294-34302.

[15] ZHONG L B, YIN J, ZHENG Y M, et al. Self-assembly of Au nanoparticles on PMMA template as flexible, transparent, and highly active SERS substrates [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(13):6262-6267.

[16] HUANG J, MA D Y, CHEN F, et al. Green in situ synthesis of clean 3D chestnutlike Ag/WO_{3-x} nanostructures for highly efficient, recyclable and sensitive SERS sensing [J]. ACS Applied Material & Interfaces, 2017,9(8):7436-7446.

[17] ZENG Y, WANG L H, ZENG L W, et al. A label-free SERS probe for highly sensitive detection of Hg²⁺ based on functionalized Au@Ag nanoparticles [J]. Talanta, 2017,162:374-379.

[18] 杜勇,方炎. 卤离子吸附竞争对罗丹明 B-金胶体系 NIR-SERS 的影响[J]. 光电子激光, 2003, 14(8) : 881-885.

[19] 李春颖,赖克强,张源园,等. 表面增强拉曼光谱检测鱼肉中禁用和限用药物研究[J]. 化学学报, 2013,71(2):221-226.

[20] 张志刚,冰施,陈鹭平,等. 液相色谱法同时测定水产品中 MG 和结晶紫残留[J]. 分析化学, 2006, 34 (5):663-667.

[21] 朱程云,魏杰,董雪芳,等. 改进的 QuEChERS 方法用于鱼肉中 MG、隐色 MG、结晶紫和隐色结晶紫的快速检测[J]. 色谱, 2014, 32(4):419-425.