

负载荧光探针的指示标签对三文鱼新鲜度的实时可视化监测

孙小飞^{1,3}, 李娟¹, 官慧慧¹, 王增东², 钟克利^{1*}, 汤立军¹, 李学鹏¹, 励建荣¹

(¹渤海大学食品科学与工程学院 化学与材料工程学院 海洋研究院

生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

²山东安源种业科技有限公司 山东烟台 265617

³中国科学院大连化学物理研究所 分子反应动力学国家重点实验室 辽宁大连 116023)

摘要 实时可视化监测鱼肉新鲜度,对于保障食品质量和消费者安全至关重要。以二甲氨基肉桂醛和异弗尔酮丙二腈为原料,合成一种具有供体(D)- π -受体(A)结构的荧光探针 CDI,用来实时监测三文鱼肉的新鲜度。此探针对 13 种胺类物质响应明显,且对水产品腐败过程中产生的尸胺的荧光检测限低至 9.91 $\mu\text{mol/L}$ 。采用物理沉降法将探针 CDI 负载到纤维滤纸上,再加入盐酸使其质子化,得到负载探针 CDI+H⁺的指示标签。将指示标签置于三文鱼肉上空时,随着三文鱼肉新鲜度的下降,指示标签从白色变为浅黄色直至黄色,荧光逐渐开启,从紫粉色变为橙红色。通过对照总挥发性盐基氮值,验证了负载探针 CDI+H⁺的指示标签可以通过比色荧光双响应信号很好地区分三文鱼肉的 3 个新鲜度等级。

关键词 荧光探针; 指示标签; 三文鱼; 新鲜度

文章编号 1009-7848(2024)04-0327-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.031

水产品新鲜度的实时监测对于食品质量和消费者安全至关重要。水产品腐败不仅会造成巨大的经济损失和资源浪费,还会对人民健康造成严重威胁^[1-3]。三文鱼因肉质鲜美,营养价值高而深受广大消费者的喜爱^[4-5]。其主要食用方式为生食,因而对其品质要求极高。由于高蛋白和脂肪酸导致三文鱼在运输和储存过程中极易变质,使其营养价值降低,还会产生对人体有害的物质^[6],因此对三文鱼新鲜度进行实时可视化监测势在必行。评价水产品新鲜度的方法有感官评价法、K 值法^[7]、微生物指标法^[8]和总挥发性盐基氮法^[9]。此外,还可以通过仪器检测与食品新鲜度相关的挥发性生物胺的浓度,如使用气相色谱法^[10-11]、高效液相-质谱法^[12]、比色阵列^[13]和电子鼻技术^[14-15]等。这些方法可以实现对水产品质量的评估,然而有的操作耗时长,有的对样品具有破坏性,需要有经过专业培训的人员,不适合现场或大规模操作。鉴于此,开发

出一种便携、无损、实时监测水产品新鲜度的方法,对保证水产品质量安全和保障消费者健康至关重要^[16-18]。

荧光探针检测法因成本低、操作简便、响应快速、检测限低且对目标物无损等优良性能,而被广泛应用于环境科学、生物学和药理学等多个研究领域^[19-23]。近年来,荧光探针技术在智能食品包装中的应用引起人们的关注。2022 年,Zeng 等^[24]设计了一种比率荧光探针双氰基乙烯基香豆素 CMDC,将 CMDC 沉积在滤纸上制备一种便携式、简单、低成本的传感器,将其暴露于浓度不断增加的尸胺(Cadaverine, CAD)蒸气后,滤纸条显示出从红色到绿色的明显荧光变化,与紫外(UV)灯联合使用,基于智能手机和使用红绿蓝(RGB)数字模式成功地对牛肉的新鲜度进行可视化监测。2022 年,Chen 等^[25]开发了一种典型的供体(D)-受体(A)结构的聚集诱导发光 pH 敏感型荧光素探针 ASQ,通过在滤纸上物理沉积 ASQ,然后用盐酸酸化,成功制备了负载 H⁺+ASQ 的标签,在暴露于氨蒸气时,表现出明显的颜色和比率荧光响应,并应用于肉类和海鲜新鲜度的实时无损和可视化监测。由此可见,开发对胺类比色荧光双通道响应的荧光探针,构建负载荧光探针的指示标签,作为一种无损检测技术,在未来食品新鲜度检测领域具

收稿日期: 2023-08-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32201948);
辽宁省科技厅自然科学基金项目(2022-BS-304);
辽宁省教育厅项目(LJKMZ20221480, LJKQZ
2021135)

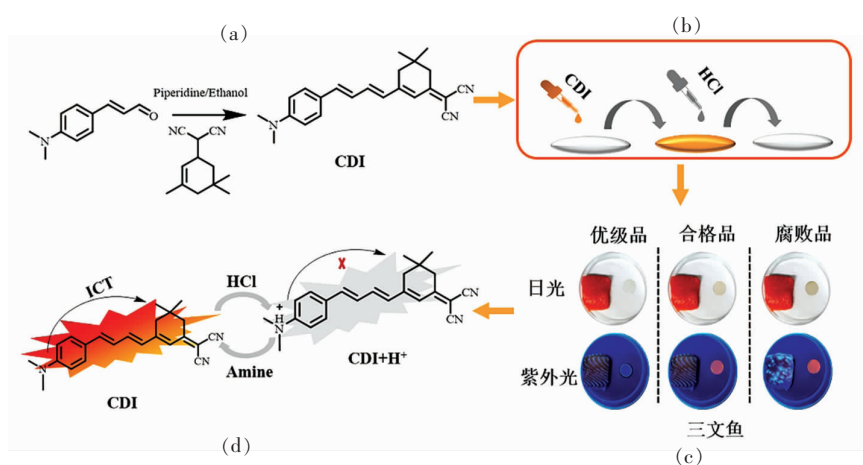
第一作者: 孙小飞,女,博士,副教授

通信作者: 钟克利 E-mail: zhongkeli2000@bhu.edu.cn

有广泛的应用前景^[26-27]。

本研究以二甲氨基肉桂醛和异弗尔酮丙二腈为原料,通过 Knoevenagel 缩合反应连接扩大分子共轭体系,基于分子内电荷转移(ICT)效应^[28],合成具有典型供体(D)- π -受体(A)结构的荧光探针 CDI,探针分子在溶液体系中对胺类物质具有荧光开启的响应效果(图 1)。此外,基于“质子化-去质子化”机制,构建了负载探针 CDI+H⁺的指示标签^[29]。通过物理沉降法将探针 CDI 负载到滤纸上,加盐酸将探针质子化,改变分子内 ICT 效应猝灭

其荧光,得到负载探针 CDI+H⁺的指示标签,当暴露于胺蒸气中,CDI+H⁺分子易于去质子化,从而恢复分子内 ICT 效应发出荧光。本研究通过调节分子内供体和受体的电子推拉作用来改变探针的光学行为,从而达到检测胺类来评价水产品新鲜度的目的。将指示标签检测三文鱼肉新鲜度的结果与 TVB-N 测定结果进行比较,验证探针应用的可行性。本研究为水产品新鲜度的实时可视化无损监测提供了参考。



注:(a)探针 CDI 的合成;(b)CDI+H⁺指示标签的制备;(c)CDI+H⁺指示标签监测三文鱼肉新鲜度的应用;(d)探针 CDI 传感机理。

图 1 CDI+H⁺指示标签的制备及对三文鱼肉新鲜度实时监测示意图

Fig.1 Preparation of CDI+H⁺ indicator labels and real-time monitoring of freshness of salmon meat

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜三文鱼,锦州市当地市场。4-二甲氨基肉桂醛、异弗尔酮丙二腈、哌啶、无水乙醇、乙胺、二乙胺、三乙胺、正丙胺、异丙胺、CAD、精胺、腐胺、苯乙胺、酪胺、氨水、二甲胺、三甲胺等(无需纯化直接使用),安耐吉有限公司;试验用水均为去离子水;所用试剂均为天津永大公司生产。

1.2 仪器与设备

电子天平(JY12001),赛多利斯科学仪器有限公司;旋转蒸发器(RE-2000),郑州长城科工贸有限公司;高速均质机(FSH-2A),上海仪电科学仪器股份有限公司;全自动凯式定氮仪(Kjeltec 8400),上海浦予工业科技有限公司;核磁共振仪(400 MHz),Agilent 仪器公司;荧光分光光度计

(F-4700),Hitachi 公司;紫外分光光度计(U-T1810DS),屹谱仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 探针 CDI 的合成与表征 探针 CDI 根据文献^{[30]-[31]}合成。4-二甲氨基肉桂醛(175 mg, 1 mmol)和异弗尔酮丙二腈(186 mg, 1 mmol)放入梨形烧瓶中,加入 30 mL 干乙醇,然后加入催化量的哌啶。在 N₂ 保护下回流 6 h, TLC 监测显示反应结束后,冷却至室温,过滤,析出的固体用乙醇洗涤即得产物,产率为 50%。M.p.174.9~178 °C, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.27 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.96~7.46 (m, 4H), 6.80 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 3.35 (s, 2H), 2.98 (s, 6H), 2.83 (d, J = 6.6 Hz, 4H), 1.01 (s, 6H)。 ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.92, 151.21, 146.02, 142.52, 128.32,

128.08, 126.38, 125.16, 123.41, 115.33, 114.80, 112.79, 76.96, 46.18, 43.57, 33.17, 28.00。HRMS (ESI⁺), calculated for C₂₃H₂₉KN₃O₂⁺ [M+2H₂O+K]⁺ calcd: 418.1891, found: 418.1849。

1.3.2 探针溶液的配制 称取 3.43 mg 的探针 CDI, 用 DMSO 定容至 10 mL 配制成 1 mmol/L 的探针储备液, 使用前将该储备液用 DMSO/H₂O (V/V = 7/3) 进一步稀释至最终浓度为 10 μmol/L。

1.3.3 胺类溶液的配制 各种有机胺溶液(苯胺、三甲胺、氨水、色胺、乙胺、正丙胺、环己二胺、二甲胺、精胺、CAD、腐胺、组胺、二己胺、三乙胺)的制备方法。以 CAD 为例: 将 54.2 μL CAD 溶解在去离子水中, 定容至 10 mL, 得到 50 mmol/L 的 CAD 溶液, 通过稀释可得到测试所需的一系列不同浓度的 CAD 溶液, 其它有机胺溶液也通过该方法制备, 色胺用乙醇定容得到相同浓度的溶液。荧光测试的激发和发射狭缝宽度均为 5 nm, 电压为 750 V, 激发波长为 380 nm。

1.3.4 负载 CDI+H⁺指示标签的制备 指示标签的基材选用孔径大、易于气体透过的纤维材质的滤纸材料, 将空白滤纸裁剪为直径 1 cm 的圆片, 置于 CDI 的二氯甲烷溶液 (1 mmol/L) 中浸泡 10 min 后晾干, 使探针 CDI 利用物理沉降法附着在空白滤纸标签上, 然后滴加盐酸将探针 CDI 质子化, 晾干后即得到负载 CDI+H⁺的指示标签。

1.3.5 基于 CDI+H⁺指示标签的鱼类新鲜度检测 三文鱼通常以分装的形式储存或者售卖, 为了使指示标签可以在实际应用中效果更好, 选用 20.0 g 的鱼肉进行试验。将鱼肉分装 20.0 g 于无菌培养皿中, 同时将负载 CDI+H⁺的指示标签贴于培养皿盖子内侧, 用封口膜密封后, 将其置于 4 °C 下储存 7 d。在此期间, 定时测量总挥发性盐基氮 (TVB-N)、pH、菌落总数 (TVC) 和硫代巴比妥酸值 (TBA) 4 个指示鱼肉新鲜度的指标, 并拍照记录指示标签的比色和荧光变化。

TVB-N 的测定参照《食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定》(GB 5009.228-2016)^[32]。称取 5.0 g 三文鱼肉, 加入 37.5 mL 去离子水, 均质, 静置 30 min, 再加入 0.5 g 氧化镁粉末, 利用凯氏定氮分析仪进行蒸馏, 盐酸滴定, 计算 TVB-N 含量, 以 mg/100 g 表示。每组试验重复 3 次。

使用 pH 计测定 pH 值。称取 5.0 g 三文鱼肉, 加 45 mL 去离子水, 均质, 静置 30 min 后过滤, 使用 pH 计读取滤液的 pH 值。每组试验重复 3 次。

TVC 的测定参照《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定》(GB 4789.2-2022)^[33] 中的平板计数培养基 (PCA) 倾注法。取 5.0 g 三文鱼肉置于无菌袋中, 加入 45 mL 无菌生理盐水, 用拍打式均质器拍打 1~2 min, 制成 1:10 的均匀稀释液。将稀释液依次进行 10 倍梯度稀释。选择 3~4 个适宜浓度梯度的稀释液, 分别吸取 1 mL 注入无菌平板中, 向平板中倾注约 15~20 mL PCA, 摇匀。待其冷却凝固后倒置平板, 30 °C 培养 (72±3) h 进行计数。每组试验重复 3 次。

TBA 的测定参照《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》(GB 5009.181-2016)^[34]。三文鱼肉中不饱和脂肪酸的含量较高, 而不饱和脂肪酸的氧化产物 (丙二醛) 经三氯乙酸溶液提取后, 与 2-硫代巴比妥酸作用生成粉红色化合物, 在波长 532 nm 处有最大吸收峰, 通过与标准系列比较定量, 可用来测定脂质氧化程度, 结果以脂肪氧化产物丙二醛含量 (MDA/kg) 表示。每组试验重复 3 次。

2 结果与分析

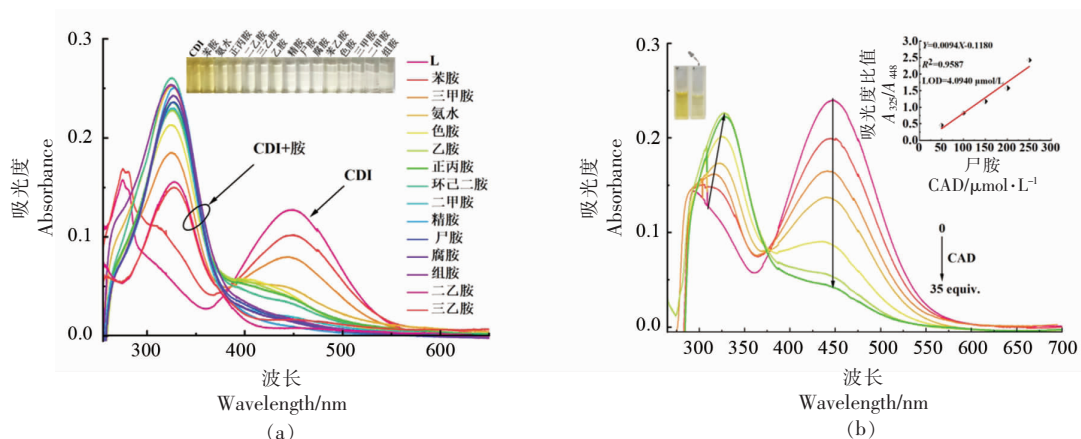
2.1 探针 CDI 对胺类的紫外响应

测试探针 CDI 在溶液中对胺类的紫外响应, 以考察其对各种胺的紫外识别效果。如图 2a 所示, 在 DMSO/H₂O (V/V = 7/3) 体系中, 探针 CDI 在波长 448 nm 处具有最大吸收峰, 加入不同胺后, 除苯胺外, 多种胺均能引起波长 448 nm 处的吸收峰消失, 在波长 325 nm 处出现新的吸收峰, 同时溶液在自然光下由黄色变为无色。结果表明, 荧光探针 CDI 在溶液中可识别多种胺类化合物, 具有肉眼识别效果。

随后, 选择 CAD 进行紫外滴定试验, 以探究探针对 CAD 的定量响应。如图 2b 所示, 随着 CAD 溶液浓度的增加, 探针 CDI 在波长 448 nm 处的吸收峰逐渐降低, 在波长 325 nm 处的吸收峰逐渐升高, 当加入 35 倍当量的 CAD 时, 吸收强度达到平稳。同时, 将吸收峰强度的比值 (Y) 和 CAD 的浓度 (X) 进行线性拟合, 发现 CAD 浓度在 50~250

$\mu\text{mol/L}$ 范围内, CDI 吸收峰强度的比值与 CAD 浓度呈良好的线性关系 ($R^2 > 0.9$, 图 2b 中的内插图), 根据方程 $\text{LOD} = 3S/K$ (式中, S ——空白溶液的标准偏差; K ——标准曲线的斜率), 计算出探针

CDI 对 CAD 胺响应的紫外检测限为 $4.09 \mu\text{mol/L}$ 。结果表明, 探针 CDI 检测限低, 具有较高的灵敏度。



注: (a) 探针 CDI 在 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V/V = 7/3$) 体系中对胺类响应的紫外-吸收光谱变化; (b) 不同浓度的 CAD 对探针 CDI 紫外吸收光谱的影响, 内插图: 探针 CDI 吸收峰强度的比值与 CAD 的浓度之间的线性关系。

图 2 探针 CDI 对胺类的紫外-可见吸收光谱响应

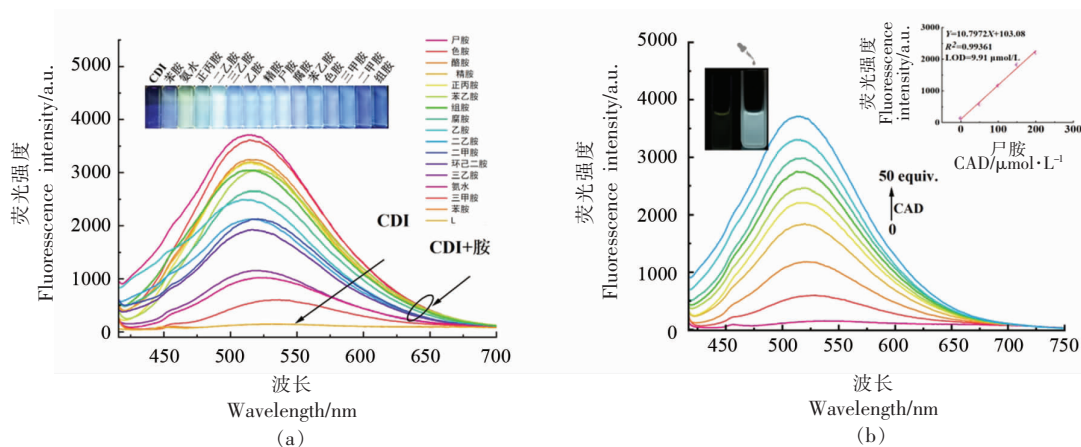
Fig.2 Uv-vis absorption spectral response of probe CDI to amine

2.2 探针 CDI 对胺类的荧光响应

测试探针 CDI 在溶液中对胺类的荧光响应, 以考察其对各种胺的荧光识别效果。如图 3a 所示, 在 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V/V = 7/3$) 体系中, 探针 CDI 没有荧光发射峰, 加入不同的胺后, 在波长 505 nm 处的荧光显著增强, 而且大部分胺均能引起波长

505 nm 处的蓝绿色荧光增强。结果表明, 探针 CDI 在溶液中对多种胺类化合物荧光响应良好。

随后, 同样选择 CAD 进行荧光滴定试验, 以探究探针 CDI 对胺类的荧光响应灵敏度。如图 3b 所示, 随着 CAD 溶液浓度的增加, 在波长 505 nm 处的荧光发射逐渐增强, 当加入 50 倍当量的 CAD



注: (a) 探针 CDI 在 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V/V = 7/3$) 体系中对胺类响应的荧光光谱; (b) 不同浓度的 CAD 对探针 CDI 的荧光光谱的影响, 内插图: 探针 CDI 荧光强度与 CAD 的浓度之间的关系。

图 3 胺类存在下探针 CDI 的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of probe CDI in the presence of amines

时,荧光强度基本稳定,说明反应达到饱和。将荧光强度(Y)与 CAD 的浓度(X)进行线性拟合,发现 CAD 浓度在 $0\sim 200\ \mu\text{mol/L}$ 范围时,CAD 的荧光强度与 CAD 浓度呈良好的线性关系 ($R^2 > 0.99$, 图 3b 中的内插图),计算出探针 CDI 对 CAD 响应的荧光检测限为 $9.91\ \mu\text{mol/L}$ 。荧光测试结果表明,探针 CDI 的检测限较低,对 CAD 具有较高的响应灵敏度。因此,该探针能够实现对 CAD 的比色荧光双通道响应。

2.3 不同浓度盐酸溶液对探针 CDI 荧光光谱的影响

测试不同浓度的盐酸溶液对探针 CDI 荧光光谱的影响。如图 4 所示,在盐酸浓度为 $0\ \text{mol/L}$ 的水溶液中,探针 CDI 在波长 $650\ \text{nm}$ 处有较强的发射峰,而在不同浓度的盐酸溶液中,探针 CDI 的荧光均被猝灭。说明探针易受 pH 值的影响,导致荧光性质改变。CDI 在强酸性条件下,分子内供体基团(二甲氨基)易被质子化,导致分子内 ICT 效应受阻,从而猝灭分子荧光。而在中性和偏碱性条件下,二甲氨基容易发生去质子化,分子内的 ICT 效应恢复,从而导致荧光增强^[28]。这也正是碱性胺类物质会导致探针 CDI 荧光增强的原因。

2.4 负载 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签制备条件优化

向制备好的负载探针 CDI 的指示标签滴加不同浓度的盐酸溶液,如图 5a 所示,随着盐酸浓度增大,负载探针 CDI 的指示标签颜色逐渐变浅,荧

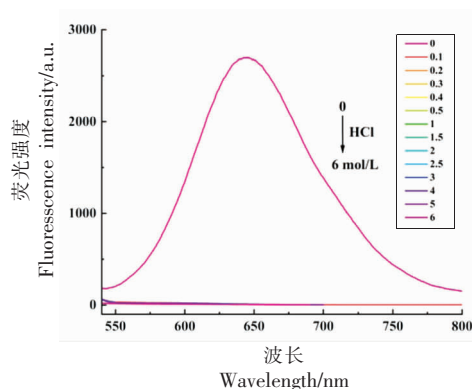
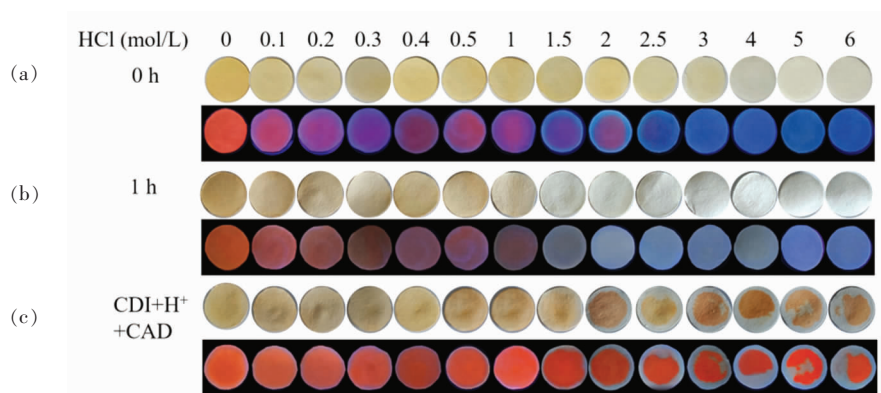


图 4 探针 CDI 在不同 pH 环境下的荧光光谱
Fig.4 Fluorescence spectra of probe CDI in different pH environments

光亮逐渐降低,说明探针达到不同程度的质子化效果。在滴加盐酸 1 h 后,如图 5b 所示,标签完全干燥,颜色和荧光更加均匀稳定,表明盐酸对探针具有质子化能力,并且质子化后的探针稳定性较好。

为了探究 CAD 对质子化探针 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的去质子化效果,对质子化后的指示标签分别滴加 CAD 溶液。如图 5c 所示,滴加 CAD 溶液后,指示标签的颜色和荧光均能得到不同程度的恢复,随着盐酸浓度增大,标签的恢复程度变小。

当盐酸浓度低于 $1.5\ \text{mol/L}$ 时,指示标签未完全质子化,颜色和荧光变化均不明显;当盐酸浓度高于 $1.5\ \text{mol/L}$ 时,虽然能够对标签完全质子化,



注:(a)负载 CDI 的标签滴加不同浓度盐酸质子化后的颜色和荧光变化;(b)负载 CDI 的标签滴加不同浓度盐酸质子化 1 h 后的颜色和荧光变化;(c)质子化标签滴加 CAD($50\ \text{mmol/L}$)后的颜色和荧光变化。

图 5 制备 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签盐酸浓度的优化

Fig.5 Optimization of the concentrations of hydrochloric acid for preparing $\text{CDI}+\text{H}^+$ indicator labels

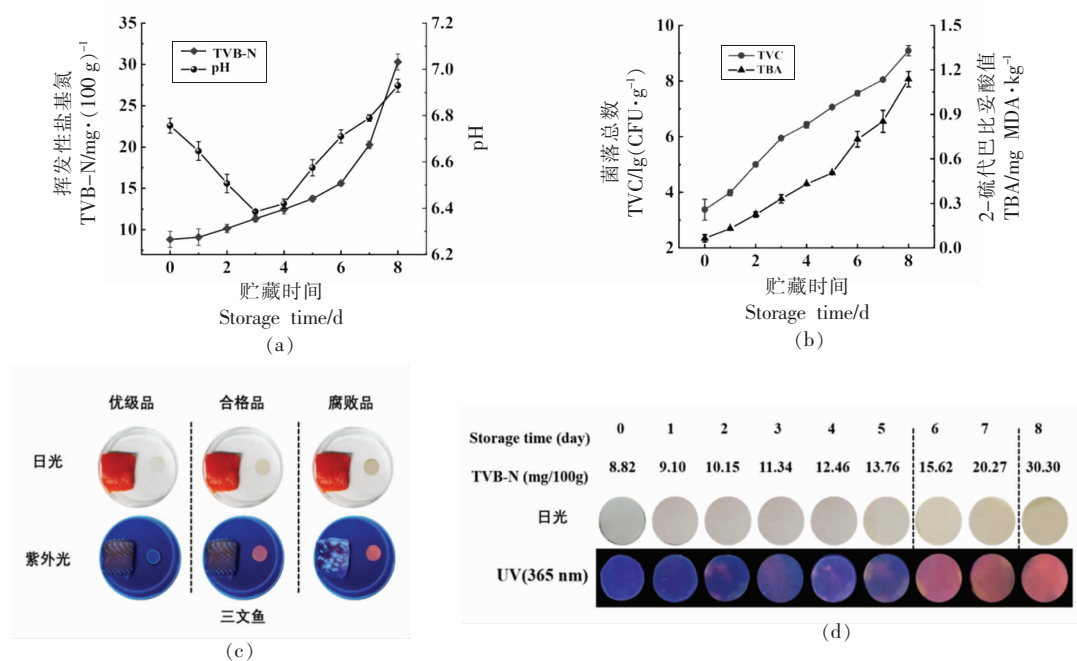
但由于过量的质子存在,加入 CAD 后,不能使标签完全去质子化,标签的颜色和荧光均未能完全恢复;而滴加 1.5 mol/L 浓度的盐酸制备的指示标签,在滴加 CAD 前、后,颜色和荧光变化均明显。因此,后续选择滴加浓度 1.5 mol/L 的盐酸制备负载 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签。

2.5 负载 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签在监测鱼类新鲜度中的应用

在贮藏过程中,微生物对水产品中蛋白质的分解通常会导致 TVB-N 含量的增加。因此,TVB-N 值作为新鲜度分级的评价指标被广泛应用;同时,TVB-N 含量的增加也会导致 TVC 和 TBA 含量增大^[35]。如图 6a 所示,随着储存时间的延长,TVB-N 值逐渐增大,冷藏至第 6 天时,TVB-N 值达到 15.62 mg/100 g,此时三文鱼肉仍然为合格的次级新鲜产品;第 8 天时,TVB-N 值大于 30 mg/100 g,说明此时三文鱼肉已经进入腐败阶段。冷藏至第 3 天时,pH 值达到最低,之后呈逐渐上升的趋势。这是因为鱼死后,营养物质在微生物作用下产生乳酸,乳酸的积累导致 pH 值降低,经过一

段时间后,鱼体内的蛋白质在微生物作用下分解成氨、三甲胺、二甲胺、CAD、腐胺等碱性物质,从而导致 pH 值上升^[36]。由图 6b 可以看出,随着储存时间的延长,TVC 呈不断增加的趋势,并在第 8 天超过最高安全限量值[7.0 lg(CFU/g)],同时 TBA 的含量也不断增加,同样在第 8 天超过可接受限量(1.0 mg MDA/kg)。因此,冷藏条件下的三文鱼肉在 0~5 d 内为优级产品,6~7 d 内为合格产品,8 d 后为腐败产品。

此外,利用负载 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签对三文鱼肉的新鲜度进行监测。将指示标签与三文鱼肉一起置于冷藏条件下,每天同一时间采集数据。负载 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签对三文鱼肉新鲜度监测效果如 6c 所示,持续响应变化如 6d 所示,随着储存时间的延长,指示标签颜色由白色逐渐变为黄色,荧光信号开启且逐渐变为橙红色。初始新鲜度的三文鱼肉为优级产品,负载 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签指示为白色,无荧光;随着三文鱼新鲜度下降,指示标签变为淡黄色,荧光信号变为紫粉色;当三文鱼肉腐败后,指示标签变为黄色,荧光信号变为橙红色。



注:(a)三文鱼肉 TVB-N 与 pH 随贮藏时间的变化;(b)三文鱼肉 TVC 与 TBA 随贮藏时间的变化;(c)负载 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签监测三文鱼肉新鲜度的比色荧光变化及评定的新鲜度等级;(d)监测三文鱼肉新鲜度的指示标签的日光和荧光变化。

图 6 负载 $\text{CDI}+\text{H}^+$ 的指示标签对冷藏条件下三文鱼肉进行实时的新鲜度监测

Fig.6 The $\text{CDI}+\text{H}^+$ indicator label monitors the freshness of salmon meat in real time under refrigerated conditions

因此,通过指示标签颜色和荧光的双通道响应,可以判断三文鱼肉的新鲜度等级,这表明制备的负载 CDI+H⁺的指示标签在监测三文鱼新鲜度方面具有可行性。

3 结论

利用二甲氨基肉桂醛与异弗尔酮丙二腈缩合,基于“质子化-去质子化”机制,开发了一种对胺类物质响应良好、灵敏度高的荧光开启型探针 CDI,将 CDI 负载于滤纸上成功制备了一种便携式指示标签,通过标签颜色与三文鱼肉的 TVB-N 等新鲜度指标关联,实现了通过颜色和荧光变化判定鱼肉鲜度的等级,并验证了标签实际应用的可行性。结果表明,在溶液中 CDI 对胺类具有明显的荧光开启响应,制备的负载 CDI+H⁺的指示标签用于比色和荧光双通道可视化监测冷藏条件下三文鱼肉的新鲜度时,可实现比色和荧光双指示效果。因此,本研究开发的指示标签作为一种水产品新鲜度可视化无损监测工具,有望应用于水产品智能包装中。

参 考 文 献

- [1] YANG Z, TONG F, PENG Z W, et al. Development of colorimetric/Fluorescent two-channel intelligent response labels to monitor shrimp freshness[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 135(2): 108125.
- [2] LIU Y W, WANG Y, SHEN S W, et al. Novel natural microbial preservative nisin/*Tremella fuciformis* polysaccharide (TFP)/*Lactobacillus plantarum* (LP) live particle (NTN@LP) and its effect on the accumulation of biogenic amines during sausage fermentation[J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 427(1): 131713.
- [3] MA Q Y, LU X M, WANG W X, et al. Recent developments in colorimetric and optical indicators stimulated by volatile base nitrogen to monitor seafood freshness[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2021, 28(2): 100634.
- [4] HEIR E, SOLBERG L E, CARLEH M, et al. Improved control of *Listeria monocytogenes* during storage of raw salmon by treatment with the fermentate Verdad N6 and nisin [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 336(1): 108895.
- [5] PRABHAKAR P K, VATSA S, SRIVASTAV P P, et al. A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations[J]. Food Research International, 2020, 133(7): 109157.
- [6] CHEN J, ZHENG Y H, KONG Q, et al. A Wechat miniprogram ('Fresh color') based on smart phone to indicate the freshness of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and oysters on site by detection of the color changes of curcumin films[J]. Food Control, 2023, 145(3): 109520.
- [7] LI X X, WANG B, XIE T H, et al. Research progress on nondestructive testing technology for aquatic products freshness[J]. Journal of Food Process Engineering, 2022, 45(5): e14025.
- [8] JOYATI D, NIWAS M H. A comprehensive review of the spoilage of shrimp and advances in various indicators/ sensors for shrimp spoilage monitoring[J]. Food Research International, 2023, 173 (P1): 113270.
- [9] HOLMAN B, BEKHIT A, MICHAEL W, et al. The association between total volatile basic nitrogen (TVB-N) concentration and other biomarkers of quality and spoilage for vacuum packaged beef[J]. Meat Science, 2021, 179(9): 108551.
- [10] LI X, LIN H, YANG M, et al. The first instance of HPR-deleted ISAV detection in eviscerated, fresh salmon at a Chinese entry-exit port[J]. Aquaculture, 2018, 485(4): 220-224.
- [11] ÖNAL A, TEKKELI S E K, ÖNAL C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods[J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 509-515.
- [12] PAULO V C, PEREIRA D C, SILVA V L M, et al. Development and validation of RP-HPLC-DAD method for biogenic amines determination in probiotic yogurts[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2020, 13(1): 1582-1597.
- [13] ZHONG X, HUO D, FA H, et al. Rapid and ultrasensitive detection of biogenic amines with colorimetric sensor array[J]. Sensors and Actuators: B Chemical, 2018, 274(21): 464-471.
- [14] RAMÍREZ H L, SORIANO A, GÓMEZ S, et al. Evaluation of the food sniffer electronic nose for assessing the shelf life of fresh pork meat compared to

- physicochemical measurements of meat quality [J]. *European Food Research and Technology*, 2018, 244(6): 1047–1055.
- [15] WOJCIECH W, KAJA K, TOMASZ M, et al. Prediction of the biogenic amines index of poultry meat using an electronic nose[J]. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2019, 19(7): 1580.
- [16] ZHANG W, SUN D W, MA J, et al. A volatile basic nitrogens-responsive tag based on aggregation-induced emission luminogen for real-time monitoring and in situ visualization of salmon freshness[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1221(33): 340122.
- [17] CHEN S Y, PAN S J, SHAO X X, et al. Portable and reversible smart labels for non-destructive detection of seafood freshness via amine-response fluorescent ionic liquids[J]. *Food Chemistry*, 2023, 430(1): 136946.
- [18] LIU X, WANG Y, ZHANG Z, et al. On-package ratiometric fluorescent sensing label based on AIE polymers for real-time and visual detection of fish freshness[J]. *Food Chemistry*, 2022, 390(25): 133153.
- [19] JIANG L R, CHEN T H, SONG E W, et al. High-performance near-infrared fluorescence probe for fast and specific visualization of harmful sulfite in food, living cells, and zebrafish[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 427(1): 131563.
- [20] YAN Q, YAO X Y, LI Y, et al. A red fluorescence probe for reversible detection of $\text{HSO}_3^-/\text{H}_2\text{O}_2$ and its application in food samples and bioimaging [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 299(16): 122882.
- [21] LI Y, HUANG Y R, SUN X F, et al. An AIE mechanism-based fluorescent probe for relay recognition of $\text{HSO}_3^-/\text{H}_2\text{O}_2$ and its application in food detection and bioimaging[J]. *Talanta*, 2023, 258(8): 124412.
- [22] WANG Z L, ZHANG Y, MENG Z Y, et al. Development of a ratiometric fluorescent probe with large Stokes shift and emission wavelength shift for real-time tracking of hydrazine and its multiple applications in environmental analysis and biological imaging[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 422(2): 126891.
- [23] QIN T Y, ZHAO X F, SONG C, et al. A ratiometric supramolecular fluorescent probe for on-site determination of cyfluthrin in real food samples[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 451(P4): 139022.
- [24] ZENG L T, XIAO X X, YE H, et al. Fast visual monitoring of the freshness of beef using a smart fluorescent sensor[J]. *Food Chemistry*, 2022, 394(29): 133489.
- [25] CHEN X R, TU Y J, CHENG S, et al. A colorimetric and ratiometric fluorescent paper chip for biogenic amine monitoring based on a simple pH-sensitive AIEgen[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 450(P1): 137928.
- [26] MA Q Y, LU X M, WANG W X, et al. Recent developments in colorimetric and optical indicators stimulated by volatile base nitrogen to monitor seafood freshness[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2021, 28(2): 100634.
- [27] HUANG X W, ZOU X B, SHI J Y, et al. Colorimetric sensor arrays based on chemo-responsive dyes for food odor visualization[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 81(11): 90–107.
- [28] ZHONG K L, LIN C, PAN Y, et al. A colorimetric and near-infrared fluorescent probe for detection of hydrogen sulfide and its real multiple applications [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 221(16): 117135.
- [29] GUO X J, CHEN X R, CHEN R, et al. Ratiometric monitoring of biogenic amines by a simple ammonia-response AIEgen[J]. *Foods*, 2022, 11(7): 932.
- [30] DAI X, KONG X Q, LIN W Y. A novel fluorescent probe with large Stokes shift for two-photon imaging of biothiols in living cells, liver tissues and tumor tissues[J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 142(7): 306–314.
- [31] IRYNA D, STEPHEN B, RAJESH S, et al. Facile incorporation of $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Hal}$ substituents into polymethines, merocyanines, and perylene diimides as a means of suppressing intermolecular interactions [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(32): 10112–10115.
- [32] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中挥发性盐基氮的测定: GB 5009.228–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 12.
- National Health and Family Planning Commission. Determination of volatile salt nitrogen in foods: GB 5009.228–2016[S]. Beijing: Standards Press of Chi-

- na, 2016: 12.
- [33] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2-2022 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022: 12.
- National Health Commission, State Administration for Market Supervision and Regulation. Microbiological examination of food. Determination of total colonies: GB 4789.2-2022 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2022: 12.
- [34] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中丙二醛的测定: GB 5009.181-2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 12.
- National Health and Family Planning Commission. Determination of malondialdehyde in foods: GB 5009.181-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 12.
- [35] BEKHIT A E-D A, HOLMAN B W B, GITERU S G, et al. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109(3): 280-302.
- [36] RINGØ E, GATESOUBE F J. Lactic acid bacteria in fish: A review[J]. Aquaculture, 1998, 160(3): 177-203.

Real-time and Visual Monitoring of Salmon Freshness by the Indicator Label Loaded with Fluorescent Probe

Sun Xiaofei^{1,3}, Li Juan¹, Gong Huihui¹, Wang Zengdong², Zhong Keli^{*}, Tang Lijun¹, Li Xuepeng¹, Li Jianrong¹

¹College of Food Science and Engineering, College of Chemistry and Materials Engineering, Institute of Ocean, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²Shandong Anyuan Marine Breeding Co., Ltd., Yantai 265617, Shandong

³State Key Laboratory of Molecular Reaction Dynamics, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116023, Liaoning)

Abstract Real-time and visual monitoring fish freshness is crucial to safeguard food quality and consumer safety. In this study, a fluorescent probe CDI with a donor (D)- π -acceptor (A) structure was synthesized from 4-(dimethylamino) cinnamaldehyde and isophorone malononitrile to monitor the freshness of salmon in real time. The probe responded apparently to 13 amines and its fluorescence detection limit was as low as 9.91 $\mu\text{mol/L}$ for the cadaverine produced during the spoilage process of aquatic products. The indicator label loaded with probe CDI+H⁺ was obtained by physically depositing probe CDI on fiber filter paper, and then hydrochloric acid was added to protonate it. When the indicator label was placed over salmon meat, the indicator label changed from white to light yellow until yellow, and the fluorescence gradually turned on from purplish pink to orange-red as the freshness of salmon meat decreased. By comparing with the total volatile base nitrogen value, it was verified that the indicator label loaded with probe CDI+H⁺ could effectively distinguish the three freshness levels of salmon by colorimetric and fluorescent dual response.

Keywords fluorescent probe; indicator label; salmon; freshness