

表面增强拉曼光谱结合化学计量学快速检测黄酒中的组胺

苏心悦¹, 锁然¹, 翟晨², 马倩云¹, 孙剑锋¹, 王文秀^{1*}

(¹河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

²中粮营养健康研究院 营养健康与食品安全北京市重点实验室 北京 102209)

摘要 组胺是一种生物胺,由组氨酸脱羧产生,是黄酒发酵的副产物之一,其含量超标会对人体健康有重大影响。本研究将表面增强拉曼光谱(SERS)技术与化学计量学方法相结合,快速检测黄酒中的组胺。以制备的银纳米粒子(Ag NPs)为增强剂,NaCl溶液为聚集剂来获取组胺的SERS光谱。首先利用组胺水溶液对NaCl溶液浓度、组胺与NaCl和Ag NPs的混合比例、三者混合时间等反应条件进行优化。然后基于最优条件对比C18固相萃取柱和PXC强阳离子交换反相固相萃取柱对黄酒的净化效果,对黄酒中的组胺进行分析。结果表明:当NaCl溶液浓度为0.5 mol/L,组胺水溶液:Ag NPs:NaCl溶液(体积比)=2:1:3,混合时间为15 s时,组胺1 002 cm⁻¹特征峰处增强效果最好,在该条件下组胺水溶液的检出限为1 mg/L。PXC强阳离子交换反相固相萃取柱为黄酒前处理方法,黄酒中组胺的检出限为2 mg/L。建立了组胺含量的多元线性回归分析和偏最小二乘回归(PLSR)预测模型,并对竞争性自适应重加权抽样(CARS)、主成分分析(PCA)、连续投影算法(SPA)对组胺特征信息提取的有效性,其中利用CARS筛选出的51个变量建立的PLSR模型校正集和验证集均获得较高的决定系数 $R_c^2=0.9777$, $R_v^2=0.9604$,以及较低的均方根误差RMSEC=0.0712 mg/L,RMSEV=0.1405 mg/L。结论:SERS技术和化学计量学结合的方法可用于黄酒中组胺的快速检测。

关键词 表面增强拉曼光谱;组胺检测;黄酒;化学计量学分析

文章编号 1009-7848(2024)12-0332-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.12.030

黄酒是以糯米、黍米、大米等谷物为原料,利用酒曲中多种微生物发酵而成的低度酒^[1],具有极高的营养价值,氨基酸含量丰富。然而,发酵过程中丰富的微生物体系会产生大量的蛋白酶和氨基酸脱羧酶,易产生生物胺等有害物^[2]。组胺是生物胺中的单胺类物质,由组氨酸在酶或微生物的作用下脱羧形成,多产生于氨基酸含量丰富的发酵食品和水产品中^[3]。食品中的组胺含量与人体健康关系密切,当摄入组胺过量时,会引起腹泻、心悸、过敏、呕吐甚至休克死亡等一系列不良反应^[4]。有研究表明不同类型的黄酒中组胺平均含量在(2.94±0.16)~(24.9±2.3)mg/L之间^[5],范围较大。建立黄酒中组胺的快速灵敏、痕量检测方法具有十分重要的意义。目前国际上对于食品中的组胺限量尚未有统一标准,一些国家已对葡萄酒中的组

胺含量做出规定,例如,瑞士、澳大利亚等规定不得超过10 mg/L,德国不得超过2 mg/L^[6],而国内外对于黄酒中的组胺限量均未有明确规定^[7]。

目前发酵酒精饮品中组胺的检测方法主要集中在高效液相色谱法、荧光光谱法、高效液相色谱-串联质谱法等^[8-11]。这些方法均存在检测时间长,样品需要衍生,试验过程繁琐,需专业人员操作等问题。开发一种简单快速、效率高的检测方法具有重要的意义。表面增强拉曼光谱技术(Surface enhanced Raman spectroscopy,SERS)具有检测迅速,所需样本量小,灵敏度高,不受水干扰等优点,近年来被广泛应用于食品质量与安全检测中^[12-15]。SERS技术是将被测分子吸附和沉积在粗糙的金属纳米结构表面上,利用待测物与基底之间的化学反应和电磁等离子共振效应来实现拉曼信号的增强^[16]。目前已有SERS技术定量检测食品中有害物的研究报道^[17-19]。Wu等^[20]将SERS技术与分子印迹相结合,检测葡萄酒中的氨基甲酸乙酯,通过主成分分析处理的光谱可清晰地区分不同氨基甲酸乙酯含量的葡萄酒样品。Kong等^[21]建立了一种基于SERS技术的亚硫酸盐/SO₂检测平

收稿日期:2023-12-08

基金项目:研究生教育质量提升-在读研究生创新项目(2022/1009209);国家自然科学基金项目(32001732)

第一作者:苏心悦,女,硕士生

通信作者:王文秀 E-mail:cauwx@hebau.edu.cn

台,将捕获探针与亚硫酸盐释放的 SO_2 结合,利用 600 cm^{-1} 和 910 cm^{-1} 处产生的光谱变化检测红酒样品中的亚硫酸盐残留,检出限达 10^{-6} mol/L 。Chu 等^[22]利用 SERS 技术结合密度泛函理论测定鱼肉中的组胺,结果表明,在 $5\sim 400\text{ mg/kg}$ 范围,组胺浓度与 1262 cm^{-1} 处拉曼峰强度线性相关,预测决定系数为 0.9755。然而,液体食品基质较为复杂且组胺含量相对较少,目前 SERS 技术对组胺的检测主要集中在水产品方面,对发酵型酒精饮品中组胺残留的检测较少。

基于此,为建立基于 SERS 技术的黄酒中组胺残留的快速检测方法,本研究优化 SERS 采集条件和黄酒前处理方法,结合多元线性回归和偏最小二乘回归等化学计量学方法,建立组胺拉曼特征峰强度与浓度的定量预测模型,以实现黄酒中组胺的快速、灵敏检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

便携式拉曼光谱仪,美国 Ocean optics 公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;ZMCL-BS 磁力搅拌器,上海越众仪器设备有限公司;Q2-811 涡旋混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;UGC-12CE 自动升降圆形水浴氮吹仪,北京优晟联合科技有限公司;SEM 扫描电子显微镜,ZEISS MERLIN Compact。

组胺标品(99%),北京百灵威科技有限公司;硝酸银($\geq 99\%$)、氯化钠(分析纯),国药集团化学

试剂有限公司;盐酸羟胺(分析纯),福晨化学试剂有限公司;氢氧化钠(分析纯),天津市汇杭化工科技有限公司;甲醇(分析纯),常熟市鸿盛精细化工有限公司;氨水(分析纯),天津市大茂化学试剂厂;C18 固相萃取柱,上海靳澜仪器制造有限公司;PXC 强阳离子交换反相固相萃取柱,北京迪科马科技有限公司。黄酒购自河南省石龙堰酒业有限公司,密封、阴凉、避光存放。

试验过程中所用水均为超纯去离子水。

1.2 方法

1.2.1 盐酸羟胺银溶胶(Ag NPs)的制备和表征 参考 Leopold 等^[23]的经典方法制备银溶胶,具体操作为:准确称取 19 mg 硝酸银于烧杯中,去离子水溶解并定容至 100 mL,量取 90 mL 至锥形瓶中备用,分别称取 10 mg 盐酸羟胺和 12 mg 氢氧化钠于同一烧杯中,加入 10 mL 去离子水混合均匀,使其浓度分别为 15 mmol/L 和 30 mmol/L,将混合液迅速倒入 90 mL 硝酸银中,同时磁力搅拌器剧烈搅拌 30 min,溶液颜色最终为灰绿色,4 °C 避光储存。利用紫外分光光度计和 SEM 扫描电镜对 Ag NPs 的光学特性和形貌进行表征。为检验 Ag NPs 的重复性和灵敏度,以罗丹明 B(RB)作为探针分子,将浓度为 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} mol/L 的 RB 溶液与 Ag NPs 以体积比为 1:1 的比例混合均匀,进行拉曼检测。

1.2.2 SERS 条件优化 试验流程如图 1 所示。首先,配制不同浓度梯度的组胺水溶液;然后,基于 10 mg/L 组胺水溶液,对 NaCl 溶液浓度、组胺水溶

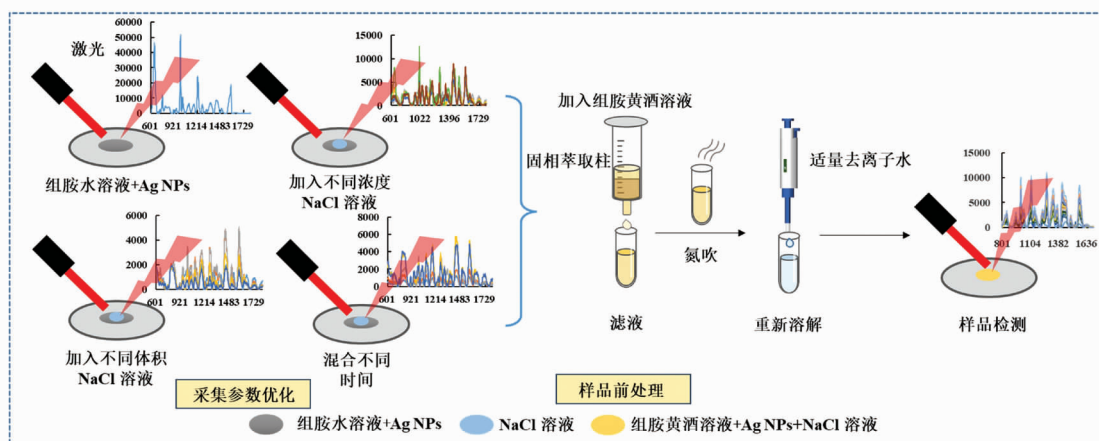


图 1 组胺检测试验流程图

Fig.1 Flow chart of histamine detection experiment

液与 Ag NPs 和 NaCl 溶液的混合体积比、三者混合时间进行优化,通过比较组胺拉曼特征峰强度确定最优检测条件,并确定组胺水溶液的检出限;最后,比较 C18 固相萃取柱和 PXC 强阳离子交换反相固相萃取柱对黄酒的净化效果,结合最优的 SERS 检测条件,对黄酒样品中的组胺进行定量检测。

1.2.2.1 组胺标品水溶液制备 准确称取 0.01 g 组胺固体标品,去离子水溶解并定容 100 mL,配制成 100 mg/L 的组胺标准储备液置于 4 °C 冰箱避光储存。分别吸取一定体积的储备液于 100 mL 容量瓶中,用适量去离子水定容稀释得到质量浓度范围为 1~50 mg/L 的组胺标准水溶液。

1.2.2.2 NaCl 浓度优化 取 2 mL 质量浓度为 10 mg/L 的组胺水溶液和 1 mL 制备的 Ag NPs 胶体混合后,分别与浓度为 0.1,0.5,1.0,1.5,2.0 mol/L 的 NaCl 溶液按体积比为 2:1:1 的比例混合 15 s,进行拉曼信号的采集。

1.2.2.3 组胺水溶液、Ag NPs 和 NaCl 混合比例优化 取 2 mL 质量浓度为 10 mg/L 的组胺水溶液,与 1 mL 制备的 Ag NPs 胶体混合后,分别按体积比为 2:1:1~2:1:10 的比例加入不同体积 0.5 mol/L NaCl 溶液,混合 15 s 进行拉曼信号采集。

1.2.2.4 组胺水溶液、Ag NPs 和 NaCl 混合时间优化 取 2 mL 质量浓度为 10 mg/L 的组胺水溶液和 1 mL 制备的 Ag NPs 胶体,将其与 0.5 mol/L 的 NaCl 溶液按 2:1:3 的体积比,分别混合 5,10,15,25,30 s 后进行拉曼信号的采集。

1.3 黄酒组胺样品制备

1.3.1 黄酒组胺样品制备 加标处理: 分别取 5 mL 黄酒于离心管中,添加一定体积的组胺标准储备液混合均匀得到质量浓度为 1~200 mg/L 的组胺黄酒溶液。

1.3.2 黄酒组胺样品前处理

1) C18 固相萃取柱净化 C18 固相萃取柱是检测食品中生物胺的常用前处理方法之一。首先向 C18 固相萃取柱中依次加入 6 mL 甲醇和 6 mL 去离子水进行活化、淋洗,随后加入 6 mL 浓度为 50 mg/L 的组胺黄酒溶液,收集滤液。取 2 mL 滤液氮吹吹干,加入 2 mL 去离子水重新溶解,作为样品溶液待用。

2) PXC 混合型强阳离子交换反相固相萃取柱净化 PXC 固相萃取柱也是检测食品中生物胺的常用前处理方法之一。根据国标方法^[24]向 PXC 固相萃取柱中依次加入 6 mL 甲醇和 6 mL 去离子水进行活化、淋洗后,将 6 mL 浓度为 50 mg/L 的组胺黄酒溶液加入小柱中,流出液弃去,再次用 6 mL 去离子水和 6 mL 甲醇淋洗。最后,加入 6 mL 5%氨水甲醇溶液洗脱,收集洗脱液。取 2 mL 洗脱液氮吹吹干后加入 2 mL 去离子水溶解,作为样品溶液待用。

1.4 光谱数据采集和参数设置

取 10 μ L 混合液滴于铝箔纸上进行拉曼信号采集。拉曼光谱采集参数设置为:光谱范围 0~2 000 cm^{-1} ,分辨率为 0.42 nm FWHM,激发波长为 785 nm,激光功率设置为 300 mW,曝光时间 5 s。拉曼光谱采集前,用校准帽进行波长校正。每个样品采集 3 次,以平均后的光谱作为样品原始光谱。

1.5 数据处理

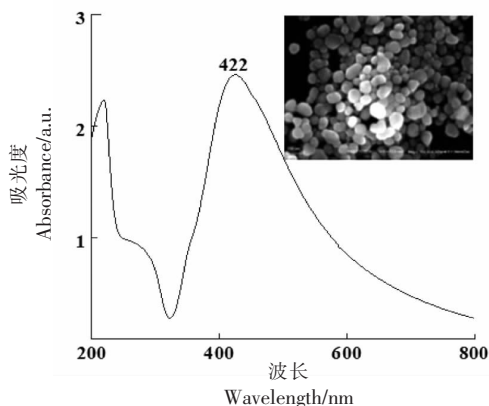
拉曼光谱在采集时会受到外界环境和仪器自身等因素影响,导致采集的光谱荧光背景较大,含有一些无用的信息。因此,本研究首先利用 Savitzky-Golay 五点平滑对原始光谱进行去噪,利用 Baseline (Automatic Whittaker Filter, $\lambda=100$, $P=0.001$) 进行基线校正。同时采用标准正态变量变换 (Standard normal variable transformation, SNV) 和二阶导数 (Secondary derivative transformation, 2nd SD) 校正样品间因散射而引起的光谱误差,强化谱带特征。最后,基于多个拉曼特征峰强度,与组胺浓度建立预测模型。由于化学计量学算法能够从复杂或重叠的拉曼光谱信息中分离和提取特定信息,将其引入到黄酒组胺表面增强拉曼光谱分析中,有助于进一步提高组胺的预测精度。因此,本研究进一步采用竞争性自适应重加权抽样 (Competitive adaptive reweighted sampling, CARS)、主成分分析 (Principal component analysis, PCA)、连续投影 (Successive projections algorithm, SPA) 方法优选特征变量,建立稳健的预测模型。按照 3:1 的比例将全部样品分为校正集和验证集,利用校正集决定系数 (Determination coefficient in the calibration set, R_c^2)、验证集决定系

数 (Determination coefficient in the validation set, R_v^2)、校正集均方根误差 (Root mean square error of calibration set, RMSEC) 和验证集均方根误差 (Root mean square error of validation set, RMSEV)、相对分析误差 (RPD) 对模型进行评价。当校正集和验证集数值接近、 R^2 接近 1, RMSE 越小时模型效果越好。RPD > 3.0 时表明模型预测能力极好, 具有较高可靠性。

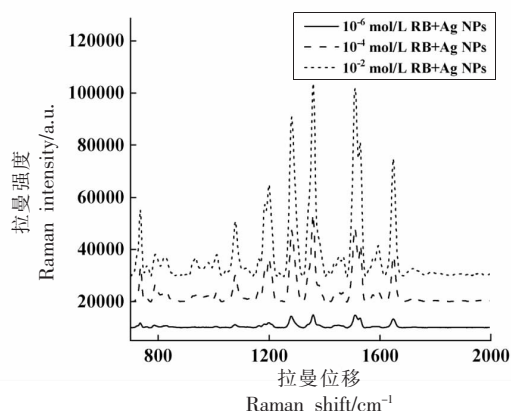
光谱数据采用 MATLAB 2016 处理, Origin9.0 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 银纳米粒子的表征



(a) Ag NPs 紫外可见吸收光谱和 SEM 图像



(b) RB 的 SERS 光谱图

图 2 Ag NPs 的表征结果及 RB 的 SERS 光谱图

Fig.2 The characterization results of Ag NPs and SERS spectra of RB

2.2 组胺拉曼特征峰的归属

组胺的固体标准品及 100 mg/L 组胺水溶液拉曼光谱如图 3 所示。由组胺固体的拉曼光谱可以看出, 在 983, 1 097, 1 247, 1 430, 1 476, 1 589 cm^{-1} 处有明显的特征峰, 其中, 983 cm^{-1} 处特征峰与咪唑环面内弯曲和侧链骨架振动有关, 1 097 cm^{-1} 与 C-N 键伸缩振动有关, 1 247 cm^{-1} 和 1 476 cm^{-1} 分别对应咪唑环中 C-H 面内弯曲和环呼吸、子环伸缩振动^[17,26]。与固体组胺 SERS 光谱相比, 由于组胺水溶液与 Ag NPs 发生偶联反应, 导致组胺水溶液的 SERS 光谱中 1 002, 1 107, 1 268, 1 432, 1 498, 1 572 cm^{-1} 等主要特征峰处均发生了一定偏移。但由于分子的结构特性, 这些偏移并不影响拉曼光谱的“指纹”特性^[17]。与固体组胺 SERS

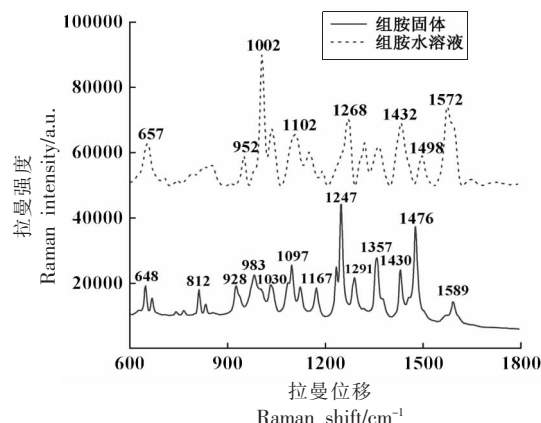


图 3 组胺固体及水溶液 SERS 光谱

Fig.3 SERS spectra of histamine solid and histamine aqueous solution

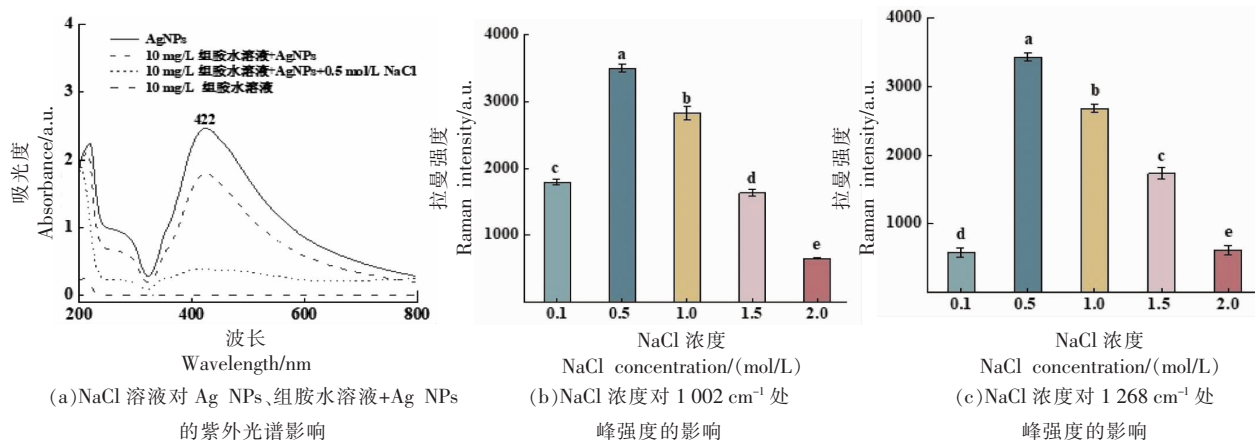
光谱相比,特征峰的相对强度也有一定的变化,这是由待测分子与 Ag NPs 表面的相互作用、吸附位点和附着在基底表面的分子取向等引起的^[26]。

2.3 SERS 检测条件优化

2.3.1 NaCl 浓度优化 在优化聚集剂 NaCl 溶液浓度之前,分别配制了 10 mg/L 组胺水溶液、Ag NPs、10 mg/L 组胺水溶液+ Ag NPs 混合液(体积比 2:1)、10 mg/L 组胺水溶液+Ag NPs+NaCl 混合液(体积比 2:1:1)4 种溶液,对比其紫外吸收光谱,以此来说明 NaCl 溶液的加入对 SERS 检测的影响。由图 4a 可以看出,组胺水溶液在 200~800 nm 之间没有任何紫外吸收峰;组胺水溶液与 Ag NPs 混合后,Ag NPs 吸收峰有大幅度下降,但在加入 NaCl 溶液后,Ag NPs 最大吸收峰大幅度下

降,吸光度改变,这说明 NaCl 溶液的加入使 Ag NPs 表面的电荷得到中和,纳米粒子之间的静电排斥力被消除,发生了一定的团聚,形成了更多热点区域,使拉曼信号得到增强^[27]。

图 4b、4c 分别为不同浓度 NaCl 溶液对组胺水溶液 1 002,1 268 cm^{-1} 处特征峰强度的影响。可以看出,在不同浓度的 NaCl 条件下获得的 SERS 信号差异性显著($P<0.05$)。随着 NaCl 浓度增加,峰强度呈先上升后降低趋势,这是由于当 NaCl 浓度过高时,团聚速度过快,甚至会使基底产生一定的沉淀,阻碍待测分子与 Ag NPs 表面的结合,使拉曼信号降低;当 NaCl 浓度过低时,Ag NPs 团聚现象不明显,未能形成较多的热点区域^[28]。当 NaCl 浓度为 0.5 mol/L 时,SERS 增强效果最好。



注:不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),下同。

图 4 NaCl 对组胺水溶液紫外光谱及组胺特征峰强度的影响

Fig.4 Effect of NaCl on ultraviolet spectra of histamine aqueous solution and feature peak intensity of histamine

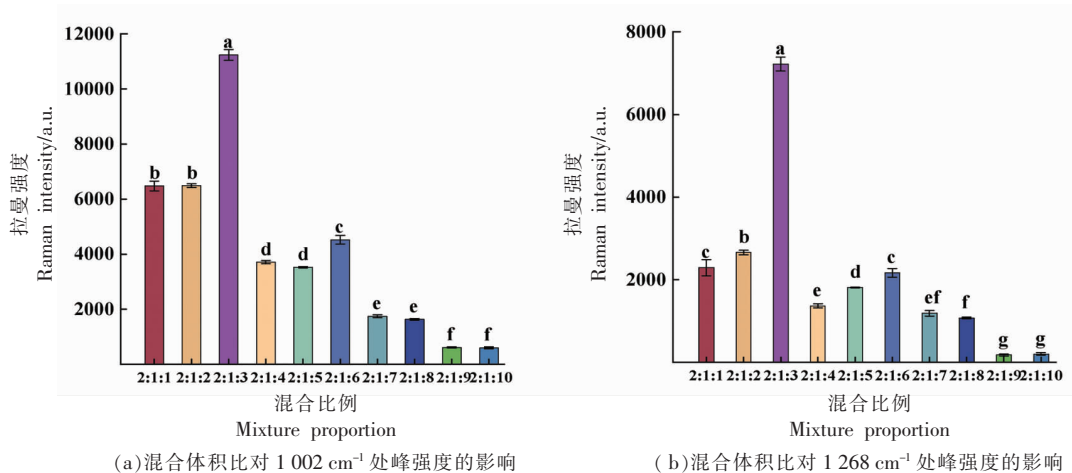
2.3.2 组胺水溶液、Ag NPs 和 NaCl 混合比例优化 将 10 mg/L 组胺水溶液、Ag NPs 和 0.5 mol/L NaCl 三者按不同体积比混合后进行 SERS 信号采集,图 5a、5b 分别为不同混合比例对组胺水溶液 1 002,1 268 cm^{-1} 处特征峰强度的影响。总体来说,当组胺水溶液:Ag NPs:NaCl 溶液=2:1:3 时,与其它混合比例之间存在显著性差异($P<0.05$)。从 1 002 cm^{-1} 和 1 268 cm^{-1} 处组胺特征峰的强度变化可以看出,当组胺水溶液:Ag NPs:NaCl 溶液=2:1:3 时,组胺特征峰处对应的强度值最高,增强效果最好。组胺水溶液与 NaCl、Ag NPs 混合体积过高或者过低时均会对 SERS 信号产生影响:当加入的 NaCl 溶液体积过低时,会与 Ag

NPs 混合不充分,导致热点区域较少;当加入的体积过高时,Ag NPs 易与 NaCl 发生团聚现象,进而影响待测物与基底的结合,导致 SERS 信号降低。

2.3.3 组胺水溶液、Ag NPs 和 NaCl 混合时间优化 将 10 mg/L 组胺水溶液、Ag NPs 和 0.5 mol/L 的 NaCl 混合液滴于铝箔纸上后,每间隔 1 s 采样 1 次,连续记录 30 s 内组胺水溶液的拉曼光谱。图 6a、6b 分别为不同混合时间对组胺水溶液 1 002,1 268 cm^{-1} 处特征峰强度的影响。可以看出,在不同的混合时间下获得的 SERS 信号存在显著性差异($P<0.05$)。随着混合时间延长,拉曼信号呈先增加后下降的趋势,在混合时间 15 s 时获得最大值。这是由于在混合初期,NaCl 的加入能够改变 Ag

NPs 的表面性质, 促进 Ag NPs 对组胺的吸附, 并且在混合初期会形成大量不同大小的聚合物, 这些聚合物能够提供大量的活性位点, 促进待测分

子与 Ag NPs 的结合; 随着混合时间增加, 聚集体在后期合并、生长, 活性位点的数量会急剧减少, 进而使 SERS 信号的强度降低^[12]。

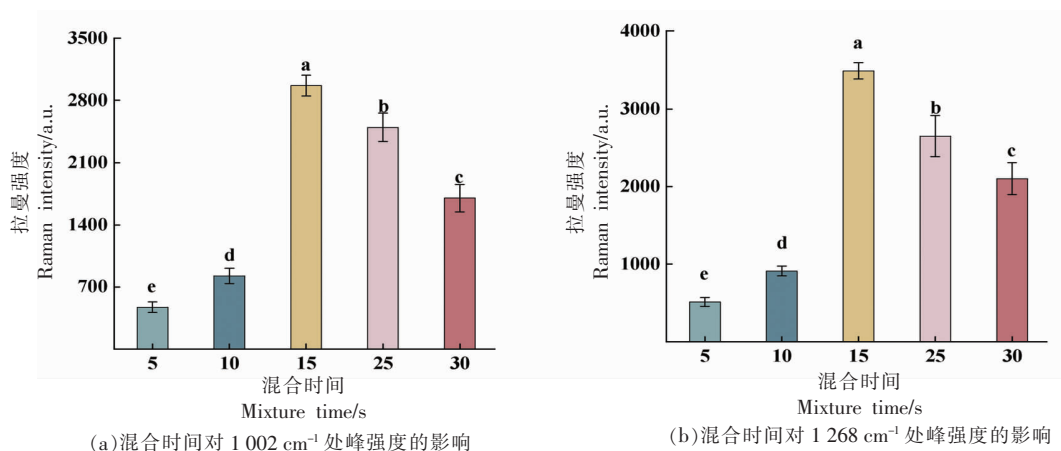


(a) 混合体积比对 1 002 cm⁻¹ 处峰强度的影响

(b) 混合体积比对 1 268 cm⁻¹ 处峰强度的影响

图 5 混合体积比对 1 002 cm⁻¹ 和 1 268 cm⁻¹ 处拉曼峰强度的影响

Fig.5 Effect of mixture proportion on the Raman peak intensity at 1 002 cm⁻¹ and 1 268 cm⁻¹



(a) 混合时间对 1 002 cm⁻¹ 处峰强度的影响

(b) 混合时间对 1 268 cm⁻¹ 处峰强度的影响

图 6 混合时间对 1 002 cm⁻¹ 和 1 268 cm⁻¹ 处拉曼峰强度的影响

Fig.6 Effect of mixture time on the Raman peak intensity at 1 002 cm⁻¹ and 1 268 cm⁻¹

2.3.4 组胺水溶液检测 基于上述最优 SERS 反应条件, 获取不同浓度组胺水溶液的拉曼光谱, 如图 7 所示。空白样品为相同条件下去离子水代替组胺溶液所得, 将原始光谱数据经基线校正后可以看出, 空白溶液无明显杂峰, 对组胺水溶液的检测无干扰。最低的检出限基本上对应于强度最大的特征峰, 因此基于 3 倍空白标准差原理^[29], 采用 1 002 cm⁻¹ 处峰强度检测组胺水溶液的检出限为 1 mg/L。

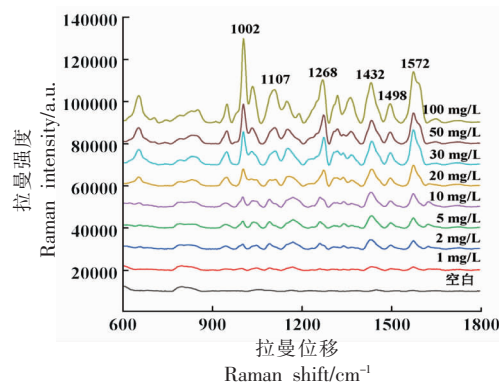


图 7 组胺水溶液 SERS 光谱

Fig.7 SERS spectra of histamine in aqueous solution

2.4 黄酒样品前处理优化

SERS 活性取决于分子固有的拉曼特性和分子对等离子体表面的亲和力,具有较大拉曼横截面且与基底接近的分子可有效地获得 SERS 信号^[30]。而组胺含有氨基、咪唑氮,拉曼横截面小,导致 SERS 反应弱^[31]。黄酒营养成分较多且复杂,为避免黄酒中一些非靶向成分吸附在 Ag NPs 活性表面,影响组胺相关官能团与 Ag NPs 的结合,因此对黄酒进行一定除杂处理是十分必要的。图 8a 为不同前处理后 50 mg/L 组胺黄酒溶液的 SERS 光谱。可以看出,未处理和经过 C18 固相萃取柱除杂后的 50 mg/L 组胺黄酒溶液均未能检测出组胺特征峰。这是由于黄酒中杂质分子过多,C18 固相萃取柱只过滤掉了黄酒中的一些不溶物、糖和色素等非极性有机物,而有机酸等极性分子被保留在了滤液中,这些杂质荧光背景强且具有极强的拉曼活性,阻碍了待测分子与基底的结合,对组胺

的 SERS 信号产生了强烈的干扰。组胺在黄酒溶液中以碱性阳离子形式存在,黄酒经 PXC 混合型强阳离子交换反相固相萃取柱处理后的洗脱液中只存在碱性化合物,氮吹后重新溶解的样品环境相对纯净,对组胺的 SERS 信号影响较小,因此选择 PXC 合型强阳离子交换反相固相萃取柱作为黄酒前处理方法。

图 8b 为组胺黄酒混合溶液的 SERS 光谱,可以看出在 1 008,1 116,1 274,1 344 cm^{-1} 左右均有组胺特征峰,较组胺水溶液拉曼峰有一定偏移,这是由于黄酒样品溶液中存在的一些碱性物质对组胺 SERS 检测产生了一些干扰^[32]。基于 3 倍空白标准差原理^[29],采用 1 008 cm^{-1} 处峰强度检测黄酒中组胺检出限为 2 mg/L。在 1 008,1 116,1 274 cm^{-1} 处的特征峰强度随组胺浓度增加而增加,因此选择这 3 个特征峰进行进一步比较分析。

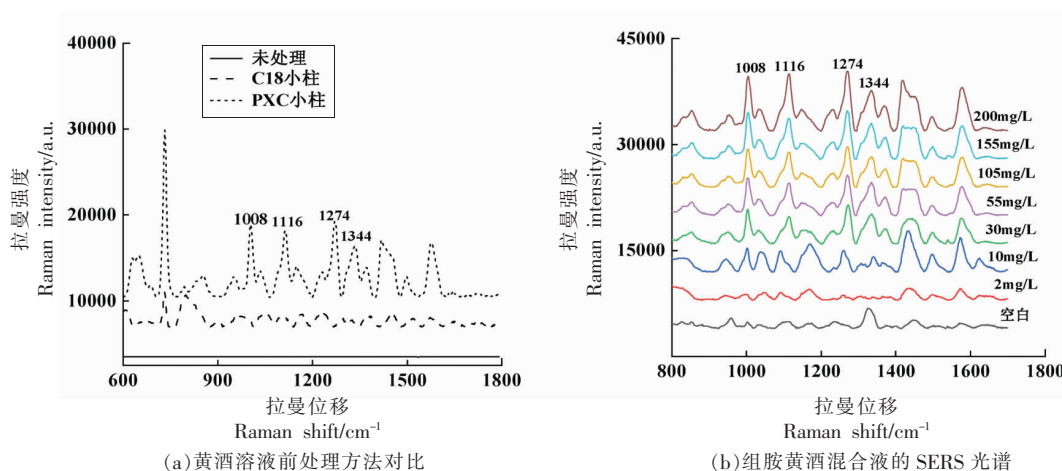


图 8 黄酒前处理方法对比及组胺黄酒混合液的 SERS 光谱

Fig.8 Comparison of pretreatment methods for Huangjiu and SERS spectra of histamine in Huangjiu

2.5 定量预测模型的建立

采集了浓度范围为 1,2,5~200 mg/L (5 mg/L 的质量浓度间隔)的 42 个组胺黄酒溶液 SERS 光谱,每个样品采集 3 次取平均。先对原始光谱进行了 S-G 五点平滑和 Baseline 基线校正,采用 SNV 和 2nd SD 算法消除样本间的误差。处理后的 42 个样品光谱数据按 3:1 比例随机分为校正集和验证集,分别采用多元线性回归和偏最小二乘回归两种方法建立了组胺浓度的预测模型。

组胺在黄酒样品溶液中的特征峰主要在

1 008,1 116,1 274 cm^{-1} 处,因此选择该位置处峰强度与组胺浓度对数进行多元线性回归分析,结果如表 1 所示,模型的相关性和可靠性有待提高,可能是由于系统不稳定、噪声等因素造成组胺特征峰偏移从而导致信息丢失^[30],进一步采用 PLSR 方法建立预测模型。先利用全部光谱信息建立 PLSR 定量预测模型, $R^2=0.9148$,RMSEV=0.2006 mg/L,表明模型的定量预测能力得到显著提升,利用 SERS 光谱信息所建立的 PLSR 组胺定量预测模型更具有优势。为了提高模型的精确度和可靠

性,达到简化模型的目的,选取 CARS、PCA、SPA 3 种方法进行特征信息提取,以去除无关信息,结果如表 1 所示。各模型的验证集决定系数均在 0.9 以上,且经 CARS 和 SPA 筛选后模型的 RPD 值 > 3,说明筛选特征变量后能有效的去除无关信息对模型的干扰,提高了模型的预测能力,同时进一步表明 SERS 技术适合于黄酒中组胺的定量检测。

相比于 PCA 和 SPA,经 CRAS 筛选出的 51 个特征变量建立的 PLSR 定量预测模型,相关性和稳定性更高,误差更小。该结果表明 CARS 筛选出的特征变量包含了更多组胺特征峰处的信息,保证了模型的准确度和可靠性。综上,利用 CARS 筛选 SERS 光谱信息建立的 PLSR 模型可以实际应用于黄酒中组胺的快速定量检测。

表 1 组胺黄酒样品溶液定量预测模型比较

化学计量学算法	拉曼位移/cm ⁻¹	特征变量数	R _c ²	RMSEC/(mg/L)	R _v ²	RMSEV/(mg/L)	RPD
多元线性回归	1 008,1 116,1 274	3	0.8261	0.2331	0.7113	0.2095	1.8620
PLSR	200~2 000	1 044	0.9317	0.1236	0.9148	0.2006	2.8254
CARS-PLSR	—	51	0.9777	0.0712	0.9604	0.1405	3.7084
PCA-PLSR	—	25	0.9148	0.1490	0.9136	0.2507	2.9700
SPA-PLSR	—	14	0.9455	0.1303	0.9357	0.1444	3.5414

3 结论

本研究采用 SERS 技术结合化学计量学方法成功实现了黄酒中组胺的快速定量检测,确定了 SERS 反应条件为 NaCl 溶液 0.5 mol/L,组胺水溶液:NaCl:Ag NPs 体积比=2:1:3,混合时间为 15 s 时,检测效果最优,PXC 混合型强阳离子交换反相固相萃取柱用于黄酒前处理除杂效果最好。并分析比较了多元线性回归和 PLSR 模型用于黄酒中组胺定量检测的可能性,利用 CARS、PCA、SPA 算法进一步对 SERS 光谱信息进行特征变量提取建立 PLSR 模型,以评价基于较少特征变量建立的 PLSR 模型性能,结果表明在较少特征变量的情况下,CARS 建立的 PLSR 模型 R_c²=0.9777、R_v²=0.9604,RPD=3.7084,具有较高的相关性,精确度高、稳定性好,可实现黄酒中组胺的快速定量检测。综上,利用 SERS 技术结合化学计量学方法可实现黄酒中组胺的快速定量预测,为发酵酒精饮品中组胺的现场监测提供了方法参考,对建立黄酒中组胺含量的动态监测和控制体系完善提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] YUE C S, SELVI C, TANG A N, et al. Determination of biogenic amines in Malaysian traditional wine by high-performance liquid chromatography (HPLC)[J]. *Analytical Letter*, 2021, 54(12): 1968-1994.
- [2] 牛天娇, 郭永杰, 孙二娜, 等. 高效液相色谱法测定黄酒发酵醪液中生物胺含量[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(5): 184-188.
- [3] NIU T J, GUO Y J, SUN E N, et al. Determination of biogenic amines in yellow rice wine fermented mash by HPLC[J]. *Shipin Yanjiu Yu Kaifa*, 2020, 41(5): 184-188.
- [4] 朱帅, 张水锋, 郑仕剑, 等. 高效液相色谱法测定酱油中组胺的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(4): 1574-1579.
- [5] ZHU S, ZHANG S F, ZHENG S J, et al. Determination of histamine in soy sauce by HPLC [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(4): 1574-1579.
- [6] GAGIC M, NEJDL L, XHAXHIU K, et al. Fully automated process for histamine detection based on magnetic separation and fluorescence detection [J]. *Talanta*, 2020, 212: 120789.
- [7] ZHONG J J, YE X Q, FANG Z X, et al. Determination of biogenic amines in semi-dry and semi-sweet Chinese rice wines from the Shaoxing region [J]. *Food Control*, 2012, 28(1): 151-156.
- [8] 刘慕妆, 任红, 孙哲, 等. 黄酒生物胺的研究进展 [J]. *中国酿造*, 2022, 41(3): 30-37.
- [9] LIU M Z, REN H, SUN Z, et al. Research

- progress on biogenic amines in Huangjiu[J]. *Zhongguo Niangzao*, 2022, 41(3): 30–37.
- [7] LUO Q Q, SHI R Y, GONG P F, et al. Biogenic amines in Huangjiu (Chinese rice wine): Formation, hazard, detection, and reduction[J]. *LWT—Food Science and technology*, 2022, 168: 113952.
- [8] MILHEIRO J, FERREIRA L C, FILIPE—RIBEIRO L, et al. A simple dispersive solid phase extraction clean-up/concentration method for selective and sensitive quantification of biogenic amines in wines using benzoyl chloride derivatization[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 110–117.
- [9] PALOMINO—VASCO M, RODRÍGUEZ—CÁCERES M I, MORA—DIEZ N, et al. Biogenic amines profile in red wines regarding aging and storage condition [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2019, 83: 103295.
- [10] ZHANG X, HUI Y H, JIANG M, et al. Determination of 6 biogenic amines in food using high-performance liquid chromatography—tandem mass spectrometry without derivatization[J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1653: 462415.
- [11] KALINOWSKA K, TOBISZEWSKI M. Green, simple analytical method for total biogenic amines content determination in wine using spectrophotometry[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134457.
- [12] JANČI T, MIKAC L, IVANDA M, et al. Optimization of parameters for histamine detection in fish muscle extracts by surface-enhanced Raman spectroscopy using silver colloid SERS substrate[J]. *Raman Spectroscopy*, 2017, 48(1): 64–72.
- [13] QU Y Q, TIAN Y, CHEN Y H, et al. Chemical profiling of red wines using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)[J]. *Analytical Methods*, 2020, 12(10): 1324–1332.
- [14] FENG J Q, FENG J J, LOUSSALA H M, et al. Dendritic mesoporous silica nanospheres@porous carbon for in-tube solid-phase microextraction to detect polycyclic aromatic hydrocarbons in tea beverages[J]. *Food Chemistry*, 2021, 364: 130379.
- [15] GILLIBERT R, HUANG J Q, ZHANG Y, et al. Food quality control by surface enhanced Raman scattering[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 105: 185–190.
- [16] HE J, LI H X, ZHANG L L, et al. Silver microspheres aggregation-induced Raman enhanced scattering used for rapid detection of carbendazim in Chinese tea[J]. *Food Chemistry*, 2021, 339: 128085.
- [17] 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.
- GUO X Y, QIU L, ZHANG J J, et al. Rapid and quantitative analysis of histamine in fish using surface enhanced raman spectroscopy [J]. *Guangpu Xue Yu Guangpu Fenxi*, 2019, 39(8): 2561–2567.
- [18] KOLOSOVAS—MACHUCA E S, CUADRADO A, OJEDA—GALVAN H J, et al. Detection of histamine dihydrochloride at low concentrations using Raman spectroscopy enhanced by gold nanostars colloids nanomaterials[J]. *Nanomaterials*, 2019, 9(2): 211.
- [19] FILIPEC S V, VALINGER D, MIKAC L, et al. Influence of sample matrix on determination of histamine in fish by surface enhanced Raman spectroscopy coupled with chemometric modelling [J]. *Foods*, 2021, 10(8): 1767.
- [20] WU Z Z, XU E B, LI J P, et al. Highly sensitive determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by surface-enhanced Raman spectroscopy combined with a molecular imprinting polymer[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(111): 109442–109452.
- [21] KONG D X, ZHU W F, LI M. A facile and sensitive SERS-based platform for sulfite residues / SO₂ detection in food[J]. *Microchemical Journal*, 2021, 165: 106174.
- [22] CHU B Q, LIN L, HE Y. Rapid determination of histamine concentration in fish (*Miichthys Miiuy*) by surface-enhanced Raman spectroscopy and density functional theory[J]. *Int J Agric & Biol Eng*, 2017, 10(4): 252–258.
- [23] LEOPOLD N, LENDL B J. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride[J]. *Phys Chem B*, 2003, 107(24): 5723–5727.
- [24] 国家卫生健康委员会. 食品安全国家标准食品中生物胺的测定: GB/T 5009.208—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3.
- National Health Commission. Determination of biogenic amines in food by national food safety stan-

- dard: GB/T 5009.208-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 3.
- [25] 韩斯琴高娃, 张晨, 陈薪璇, 等. 基于SERS技术快速检测水溶液、尿液和血清中咪达唑仑的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2020, 40(7): 2073-2078.
- HAN S Q G W, ZHANG C, CHEN X X, et al. Study on rapid detection of midazolam in aqueous solution, urine and serum based on SERS technology[J]. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 2020, 40(7): 2073-2078.
- [26] 余志引, 蔺磊. 表面增强拉曼光谱法分析米鱼肌肉中组胺[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(9): 1886-1891.
- XU Z Y, LIN L. Analysis of histamine in rice fish muscle by surface enhanced Raman spectroscopy[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2021, 62(9): 1886-1891.
- [27] SMITH W E. Practical understanding and use of surface enhanced Raman scattering/surface enhanced resonance Raman scattering in chemical and biological analysis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37(5): 955-964.
- [28] 王宇龙, 翟文磊, 韩晨瑞, 等. QuEChERS-表面增强拉曼光谱法测定花生中黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(5): 1502-1508.
- WANG Y L, ZHAI W L, HAN C R, et al. Determination of aflatoxin B₁ in peanuts by QuEChERS- surface enhanced Raman spectrometry[J]. *Food Safety and Quality*, 2022, 13(5): 1502-1508.
- [29] 闫帅, 李永玉, 彭彦昆, 等. 表面增强拉曼光谱结合化学计量学快速检测鸡蛋中的喹诺酮类抗生素残留[J]. 分析化学, 2022, 50(10): 1578-1586.
- YAN S, LI Y Y, PENG Y K, et al. Rapid detection of quinolone antibiotics residues in chicken eggs by surface-enhanced Raman spectroscopy combined with chemometrics[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2022, 50(10): 1578-1586.
- [30] LI P, ZHOU B B, GE M H, et al. Metal coordination induced SERS nanoprobe for sensitive and selective detection of histamine in serum[J]. *Talanta*, 2022, 237: 122913.
- [31] TAN A, ZHAO Y, SIVASHANMUGAN K, et al. Quantitative TLC-SERS detection of histamine in seafood with support vector machine analysis *Food Control*, 2019, 103: 111-118.
- [32] CHEN W L, LONG F, SONG G F, et al. Rapid and sensitive detection of pesticide residues using dynamic surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Raman Spectroscopy*, 2020, 51(4): 611-618.

Rapid Determination of Histamine in Huangjiu by Surface-enhanced Raman Spectroscopy Combined with Chemometrics

Su Xinyue¹, Suo Ran¹, Zhai Chen², Ma Qianyun¹, Sun Jianfeng¹, Wang Wenxiu^{*}

¹College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

²Nutrition and Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing Key Laboratory of Nutrition and Health and Food Safety, Beijing 102209)

Abstract Histamine is a kind of biogenic amine, which is produced by decarboxylation of histamine acid. It is one of the by-products of Huangjiu fermentation and is closely related to human health. In this study, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and chemometrics were combined to detect histamine in Huangjiu quickly. SERS spectra of histamine were obtained by using silver nanoparticles (Ag NPs) as SERS substrate and NaCl solution as aggregating agent. Firstly, the SERS reaction conditions were optimized by using the concentration of histamine aqueous solution to NaCl solution, the mixing volume ratio of histamine to NaCl and Ag NPs, and the mixing time of the three. Then, based on the optimal conditions, the purification effects of C18 solid-phase extraction column and PXC strong cation exchange reversed-phase solid-phase extraction column on Huangjiu were further compared to quantitatively analyze histamine in Huangjiu. The results showed that when NaCl solution concentration 0.5 mol/L, histamine solution:NaCl solution:Ag NPs=2:1:3, and mixing time 15 s, the enhancement effect at the characteristic peak of histamine at 1 002 cm⁻¹ was the strongest. Under this condition, the detection limit of histamine solution was 1 mg/L. At the same time, under this condi-

tion, PXC strong cation exchange reversed-phase solid phase extraction column was determined as the pretreatment method of Huangjiu, and the detection limit of histamine in Huangjiu was 2 mg/L. Finally, multiple linear regression analysis and partial least squares regression (PLSR) prediction models of histamine content are established, and the effectiveness of competitive adaptive weighted sampling (CARS), Principal component analysis (PCA) and Successive projections algorithm (SPA) in screening characteristic variables of original spectrum was compared. Among them, the calibration set and verification set of PLSR model established by using 51 variables screened by CARS have obtained higher determination coefficients $R_c^2=0.9777$, $R_v^2=0.9604$, and lower root mean square error RMSEC=0.0712 mg/L and RMSEV=0.1405 mg/L. The results showed that the rapid quantitative detection of histamine in yellow rice wine could be realized based on SERS technology and chemometrics method, which provided a new idea for the on-site monitoring of histamine in fermented alcoholic beverage.

Keywords surface-enhanced raman spectroscopy; histamine detection; Huangjiu; chemometric analysis