

胶体金修饰电极测定鱼样中组胺的方法研究

周婵媛¹, 赵晓娟^{1*}, 王春利², 曾晓房¹, 白卫东¹

(1. 仲恺农业工程学院 轻工食品学院, 广东 广州 510225; 2. 中华人民共和国江门海关, 广东 江门 529000)

摘要: 基于胶体金修饰的玻碳电极, 利用电流-时间曲线法建立了一种简便、灵敏的组胺检测方法。优化了底液的 pH 值和组胺的电化学测试方法及条件, 考察了修饰电极的电化学性能。结果表明, 组胺在胶体金修饰电极上的响应电流 ($-I$, μA) 与其浓度 (c , $\mu\text{mol/L}$) 在 $0.1 \sim 64 \mu\text{mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 检出限为 $0.033 \mu\text{mol/L}$, 在带鱼和黄花鱼样品中的加标回收率分别为 $94.4\% \sim 106\%$ 、 $91.8\% \sim 106\%$, 相对标准偏差分别为 3.2% 、 2.5% 。该法操作简单、检测速度快、成本低, 适用于带鱼和黄花鱼等鱼样中组胺的测定。

关键词: 组胺; 胶体金; 电流-时间曲线法; 鱼样

中图分类号: O657.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)02-0229-06

Determination of Histamine in Fish Samples Based on Colloidal Gold Modified Electrode

ZHOU Chan-yuan¹, ZHAO Xiao-juan^{1*}, WANG Chun-li², ZENG Xiao-fang¹, BAI Wei-dong¹

(1. College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Jiangmen Customs District People's Republic of China, Jiangmen 529000, China)

Abstract: A simple and sensitive method was established for the detection of histamine by using the current - time curve based on a colloidal gold modified glass carbon electrode (AuCS/GCE). The electrochemical properties of the modified electrode were investigated. The pH value of the base solution, and the electrochemical detection methods and conditions for histamine were optimized. Results showed that there was a good linear relationship for the response current ($-I$, μA) of histamine on the AuCS/GCE in the concentration (c , $\mu\text{mol/L}$) range of $0.1 - 64 \mu\text{mol/L}$, with the detection limit of $0.033 \mu\text{mol/L}$. The recoveries for histamine in the hairtail and yellow croaker samples were in the ranges of $94.4\% - 106\%$ and $91.8\% - 106\%$, respectively. The method was simple, rapid and low cost, and was suitable for the determination of histamine in food samples such as hairtail and yellow croaker.

Key words: histamine; colloidal gold; current - time curve method; fish samples

生物胺 (Biogenic amines, BAs) 是一种相对分子量较低的有机化合物, 其化学结构中至少含有一个氮原子, 主要由其前体氨基酸通过相应的氨基酸脱羧酶代谢^[1]生成, 广泛存在于食物^[2-3]和饮料中^[4-5]。生物胺通常被认为是鱼类及其产品或贝类中微生物衰变程度的关键性化合物^[6-7], 而组胺 (Histamine) 是这类化合物中生物化学活性最强的化合物之一^[8], 也是人体体液中重要的生物标志物^[9-10]。通常人们无法从鱼的颜色和气味观察到组胺的存在, 但是组胺会引起鲭鱼综合征: 人体摄入过量的组胺可引起特定的不良生理和毒性作用, 如对心脏、运动神经元、平滑肌和胃产生负面影响^[11], 组胺通常被认为是食品生产、储存和运输过程中用于质量控制监测的生物标志物之一^[12]。因此, 有必要建立一种快速、灵敏地测定组胺的分析方法。

胶体金 (AuCS) 又称纳米金溶胶, 是由氯金酸被还原成金后形成的颗粒悬浮液, 其分散相粒子直径多在 $1 \sim 100 \text{ nm}$, 且均匀、稳定、呈单一分散状悬浮在溶液中, 形成一种纳米金胶体溶液, 其颜色呈桔红色到紫红色^[13]。纳米金具有大的比表面积、表面等离子体共振特性、小尺寸效应、催化特性、光学

收稿日期: 2018-05-29; 修回日期: 2018-09-03

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A040403116); 广州市科技计划项目 (201604020021)

* 通讯作者: 赵晓娟, 博士, 副教授, 研究方向: 电分析化学与食品安全检测, E-mail: xiao0692@163.com

特性以及独特的生物亲和性等性能,在工业催化、生物医药、生物分析化学、食品安全快速检测等多个领域有着广泛的应用^[14-16]。

本文采用胶体金修饰的玻碳电极(AuCS/GCE),利用电流~时间曲线法($I\sim t$ 法)建立了一种简便、灵敏地检测组胺的分析方法,优化了底液的pH值和组胺的电化学测试方法及条件,考察了修饰电极的电化学性能,并对带鱼和黄花鱼样品中的组胺含量进行测定,以评价该法在实际应用中的适用性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

KQ118 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Vortex Mixer V6 漩涡混匀器(美国安胜科技有限公司); HR/T20M 台式高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); BSA124S 分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); QSJ-A01F2 切碎机(小熊电器股份有限公司)。采用玻碳电极测试组胺的实验均在 CHI660E 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)上连接三电极系统模式下进行:玻碳电极为工作电极,Ag/AgCl(饱和 KCl 溶液)电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,文中所有电势均以饱和 Ag/AgCl 电极为参比。

组胺二磷酸盐、苯乙胺、精胺、腐胺二盐酸盐、酪胺盐酸盐、亚精胺磷酸盐六水合物、尸胺二盐酸盐、色胺和氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)纯度均大约 99.8%,购于 Sigma-Aldrich 公司;硼氢化钠(NaBH_4)、乙酸(CH_3COOH)购于天津市福晨化学试剂厂;壳聚糖(CS)购于国药集团化学试剂有限公司;高氯酸(HClO_4)购于上海麦克林生化科技有限公司;正己烷(C_6H_{14})购于天津市永大化学试剂有限公司。0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(PBS, pH 7.0)由 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 储备液混合配制;带鱼和黄花鱼购于超市。所用试剂均为分析纯,实验用水为超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$),实验均在室温下进行。

1.2 玻碳电极的预处理

玻碳电极(GCE)依次在专用绒毛抛光垫上用 1.0、0.3、0.05 μm 的 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 粉抛光成镜面,用水洗净后,分别于 50% 硝酸溶液、无水乙醇和水中各超声 1 min,再将电极置于 0.5 mol/L 硫酸溶液中,于 -1.0~1.0 V 电位范围内以 50 mV/s 的扫描速率进行循环伏安扫描直至得到稳定的响应曲线。最后将处理好的电极放置于室温下晾干备用。

1.3 胶体金修饰电极(AuCS/GCE)的制备

1.3.1 AuCS 的制备 使用硼氢化钠为还原剂,CS 为保护剂,参考文献^[17]制备 AuCS:首先称取一定量 CS 充分溶解于 30 mL 1.0% 乙酸溶液中配成 2 mg/mL 溶液;在磁力搅拌下加入 15 mL 0.01 mol/L 的氯金酸溶液,继续搅拌 30 min 后,再逐滴加入 6 mL 0.1 mol/L 的硼氢化钠溶液,继续搅拌至溶液呈透明的酒红色。制备过程中所用玻璃仪器均需在王水($\text{HNO}_3\text{-HCl}$, 体积比 1:3)中洗净。

1.3.2 AuCS/GCE 的制备 在预处理好的 GCE 表面滴加 3 μL AuCS,确保 AuCS 完全覆盖电极表面,室温晾干后制得 AuCS/GCE。

1.4 样品前处理

本实验参考文献^[18]处理样品:精密称取 2.0 g 已粉碎带鱼或黄花鱼样品于 50 mL 离心管中,加入 8 mL 0.4 mol/L 高氯酸溶液,涡旋振荡混匀 1 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,重复提取一次,合并 2 次上清液于 25 mL 容量瓶中,用 0.4 mol/L 高氯酸溶液定容至刻度。准确移取 10.00 mL 样品提取液置于离心管中并加入 10 mL 正己烷,漩涡振荡 5 min,弃去上层有机相,重复提取 2 次,合并提取液,待测。

加标回收样品的前处理:精确称量 2.0 g 已粉碎样品于 50 mL 离心管中,加入组胺配成不同浓度(0.1、0.26、0.5 mmol/L)的加标溶液,在优化条件下测定,平行实验 3 次。

1.5 检测方法

采用三电极电化学测试系统,以 pH 12.0 PBS 为支持电解质。在初始电位 1.0 V 条件下,于匀速搅拌的 PBS 中,利用 $I\sim t$ 法扫描约 300 s 直至基线稳定,然后每隔 50 s 加入定量的组胺标准溶液或样品溶液。

2 结果与讨论

2.1 工作电极的选择

分别将金电极(GE)、铂电极(PE)和GCE置于1.0 mmol/L组胺的PBS溶液(pH 12.0)中,利用方波伏安法(SWV)在0.2~1.2 V电位范围内进行扫描。结果发现,与GE和PE相比,组胺在GCE上的氧化峰电流明显(图1),说明组胺在GCE表面发生氧化反应时具有较高的响应灵敏度,所以选用GCE为测定组胺的工作电极。

2.2 底液 pH 值的选择

采用 Tris - HCl (pH 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)和PBS(pH 4.0、7.0、10.0、12.0)分别配制1.0 mmol/L组胺溶液,考察各浓度组胺溶液在GCE上的响应电流值。发现在不同pH值的Tris - HCl底液中组胺均未产生氧化峰。在pH值为4.0、7.0、10.0的PBS底液中(图2A),1.0 mmol/L组胺未见明显的响应电流;而当PBS底液的pH值达12.0时,组胺出现明显的氧化峰,且峰形良好,这可能是由于组胺发生电子转移时伴随着质子的转移,从而使其电化学响应与底液的pH值具有依赖关系,随着底液pH值的升高,组胺的氧化峰电位负移至测试的电位范围内。进一步考察了不同浓度的组胺溶液(以pH 12.0 PBS为底液)在GCE上的电化学响应(图2B),发现响应峰电流随组胺浓度的增加而增大。因此,实验选择pH 12.0的PBS作为测试底液。

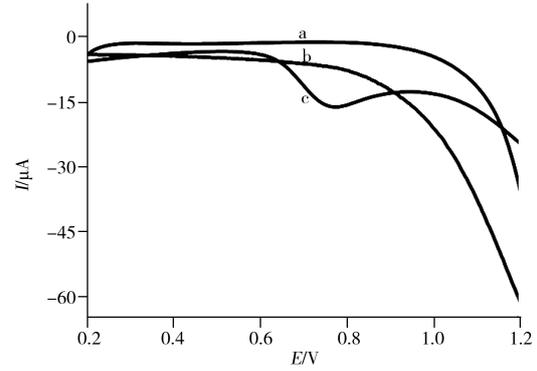


图1 1.0 mmol/L组胺在金电极(a)、铂电极(b)和玻碳电极(c)上的SWV图
Fig. 1 Square wave voltammetry for 1.0 mmol/L histamine on GE(a), PE(b) and GCE(c)

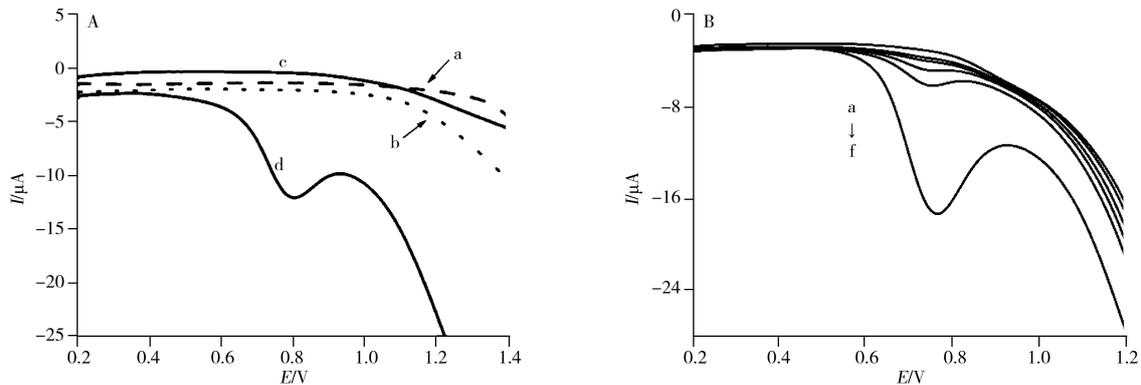


图2 组胺(1.0 mmol/L)在不同pH值的PBS底液(A)及不同浓度组胺(用pH 12.0 PBS配制)(B)的电化学响应图
Fig. 2 Electrochemical response of histamine(1.0 mmol/L) in different pH PBS solutions(A) and different concentrations of histamine(configured with pH 12.0 PBS)(B)

A: a-d: pH 4.0, 7.0, 10.0, 12.0 PBS; B: a-f: 0, 5.0, 10, 50, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$

2.3 电化学测试技术的选择

将GCE置于0、10.0、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 组胺溶液(用pH 12.0 PBS溶液配制)中进行循环伏安法(CV)、SWV、差分脉冲伏安法(DPV)和 $I-t$ 法扫描,结果见图3。由图3A、B和C可见,采用CV、SWV、DPV法测试10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组胺时,其电流值响应小,灵敏度低,无法在实际中应用。而采用 $I-t$ 法测试1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组胺(图3D中出现第1个阶梯时的组胺浓度)时具有明显的响应,表明在测定组胺时, $I-t$ 法比其他3种测试方法具有更高的测试灵敏度,故选择 $I-t$ 法对组胺进行后续测试。

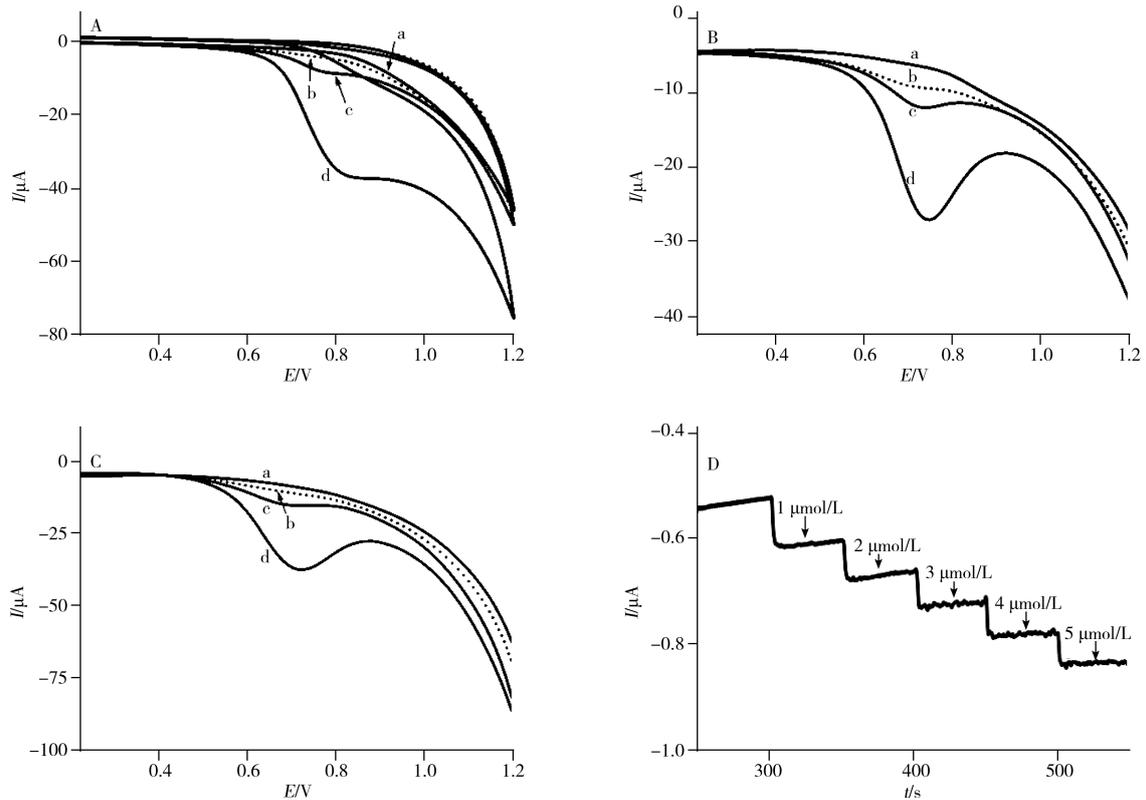


图3 不同浓度的组胺在 GCE 上的 CV(A)、SWV(B)、DPV(C)、 $I-t$ (D)图
Fig. 3 CV(A), SWV(B), DPV(C), $I-t$ (D) diagrams of different concentrations of histamine on GCE
a - d: 0, 10.0, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ histamine

2.4 电极修饰材料的选择

分别采用胶体金(AuCS)、粘土(Clay)和胶体金/粘土(AuCS/Clay)对 GCE 进行修饰,比较组胺在修饰电极上的响应电流值。结果发现,与 GCE 相比,在电极表面修饰粘土后,响应基线更加稳定平滑,但组胺的响应电流值未发生明显变化,且粘土修饰膜的稳定性较差,在淋洗和测定过程中易脱落。而 AuCS 中的壳聚糖具有良好的黏附性,可改善修饰电极的稳定性,使用 AuCS 和 AuCS/Clay 修饰电极时均能增加组胺的响应电流,且仅修饰 AuCS 的电极响应灵敏度增加更显著,因此,选用 AuCS 为 GCE 的修饰材料。实验进一步考察了 AuCS/GE、AuCS/PE 和 AuCS/GCE 3 种修饰电极在 1.0 mmol/L 组胺的 PBS 溶液(pH 12.0)中的氧化峰电流,利用 SWV 在 0.2~1.2 V 电压范围内进行扫描。结果发现,与 AuCS/GE 和 AuCS/PE 相比,组胺在 AuCS/GCE 上的氧化峰电流明显,且峰形较好,因此选用 AuCS/GCE 作为测定组胺的工作电极。

2.5 初始电位的选择

将 AuCS/GCE 放入 1.0 mmol/L 组胺溶液中,连接三电极系统,测得开路电位为 0.55 V。采用 SWV 法测定,发现组胺在 0.75 V 附近有一个明显的氧化峰。根据开路电位和氧化峰电位,设置 $I-t$ 法的初始电位分别为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 V,考察初始电位对不同浓度组胺在 AuCS/GCE 上电化学响应的影响。结果显示,初始电位为 0.5、0.6、0.7、0.8、1.2 V 时,组胺在 AuCS/GCE 表面均无明显响应。当初始电位为 0.9、1.0、1.1 V 时,组胺在 AuCS/GCE 上产生了明显响应,且 1.0 V 时组胺的响应电流值最大,因此,实验选择 $I-t$ 法测试组胺的初始电位为 1.0 V。

2.6 性能测试

2.6.1 重现性 在相同条件下制备 5 支 AuCS/GCE,分别测试浓度为 4.0、7.9 $\mu\text{mol/L}$ 的组胺溶液,得其响应电流的相对标准偏差(RSD)分别为 3.6% 和 4.8%,表明 AuCS/GCE 具有良好的重现性。

2.6.2 干扰实验 考察 10 倍于组胺浓度的腐胺、尸胺、精胺、亚精胺、苯乙胺、色胺和酪胺对测定结果的影响,结果显示,腐胺、尸胺、苯乙胺、精胺、亚精胺不干扰组胺的测定,而色胺和酪胺产生

了明显的电流响应。由于鱼样中色胺的含量极低^[19-21], 在实际应用中基本不干扰测定。而酪胺虽干扰测定, 但其在 SWV 上的氧化峰位于 0.45 V 左右, 与组胺(0.75 V)的氧化峰间隔较远, 采用本方法测定为阳性样品时可补充 SWV 实验进行区分。

2.7 组胺标准曲线的建立

在优化实验条件下, 使用 $I \sim t$ 法考察了不同浓度(0.1、0.35、0.59、0.98、5.8、9.7、14、28、64 $\mu\text{mol/L}$)组胺在 AuCS/GCE 上响应电流的变化(图4), 结果显示, 随着组胺浓度的增加, $I \sim t$ 曲线呈阶梯式下降, 其响应电流($-I$, μA)与其浓度(c , $\mu\text{mol/L}$)在 0.1 ~ 64 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 线性方程为: $-I = 0.05312c - 0.00717$ ($r = 0.997$, $n = 9$), 以 3 倍信噪比($S/N = 3$) 计算得到 AuCS/GCE 对组胺的检出限为 0.033 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.8 样品分析与回收率的测定

取带鱼和黄花鱼在优化条件下采用本方法检测, 结果显示, 带鱼中组胺的含量为 86.2 mg/kg, 在黄花鱼中的含量为 49.2 mg/kg。对带鱼和黄花鱼样品分别进行 0.1、0.26、0.5 mmol/L 3 个浓度水平的加标回收实验, 平行测定 3 次。结果显示, 组胺在带鱼和黄花鱼样品中的回收率分别为 94.4% ~ 106%、91.8% ~ 106%, 相对标准偏差(RSD)分别为 3.2%、2.5%, 表明方法具有良好的可靠性和准确度, 且实际样品测试时间小于 6 min。

3 结论

本文建立了一种快速检测食品中组胺的电化学分析方法, 采用 AuCS 修饰 GCE 电极, 制作简单、稳定性良好, 与未修饰的 GCE 相比, 组胺的电化学响应明显增强, 可用于市售带鱼和黄花鱼中组胺含量的测定。

参考文献:

- [1] Suzzi G, Torriani S. *Biogenic Amines in Fermented Foods*. Frontiers Media S A: Lausanne, Switzerland, **2015**.
- [2] Apetrei I M, Apetrei C. *Sens. Actuators B*, **2013**, 178: 40-46.
- [3] Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Alexandre H, Grandvalet C, Coton E, Coton M, Barnavon L, Bach B, Rattray F, Bunte A, Magni C, Ladero V, Alvarez M, Fernández M, Lopez P, Palencia P F, Corbi A, Trip H, Lolkema J S. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **2010**, 64: 95-100.
- [4] Preti R, Antonelli M L, Bernacchia R, Vinci G. *Food Chem.*, **2015**, 187: 555-562.
- [5] de Borja B M, Rohrer J S. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1155(1): 22-30.
- [6] Al Bulushi I, Poole S, Deeth H C, Dykes G A. *Crit. Rev. Food Sci.*, **2009**, 49: 369-377.
- [7] Apetrei I M, Apetrei C. *J. Food Eng.*, **2015**, 149: 1-8.
- [8] Lieberman P. *Ann. Allerg. Asthma Immunol.*, **2011**, 106(2): 2-5.
- [9] Takagi K, Shikata S. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 505(2): 189-193.
- [10] Panula P, Sundvik M, Karlstedt K. *Trends Neurosci.*, **2014**, 37(3): 195-168.
- [11] Feng C, Teuber S, Gershwin M E. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, **2016**, 50(1): 64-69.
- [12] Veseli A, Vasjari M, Arbneshi T, Hajrizi A, Svorc L, Samphao A, Kalcher K. *Sens. Actuators B*, **2016**, 228: 774-781.
- [13] Yan P P. *Fabrication and Application of Electrochemiluminescent Immunosensor Based on Quantum Dots and Gold Nanoparticles*. Suzhou: Soochow University(闫盼盼. 基于量子点和胶体金电化学发光免疫传感器的构建及应用. 苏州: 苏州大学), **2014**.
- [14] Wang Y, Jiao T F, Xie D Y, Wang F Y. *Inorg. Anal. Chem. Chin.* (王莹, 焦体峰, 谢丹阳, 王凤彦. 中国无机分析化学), **2012**, 2(4): 15-21.
- [15] Bai W Q, Huang H Y, Li Y, Zhang H Y, Liang B, Guo R, Du L L, Zhang Z W. *Electrochim. Acta*, **2014**, (117): 322-328.

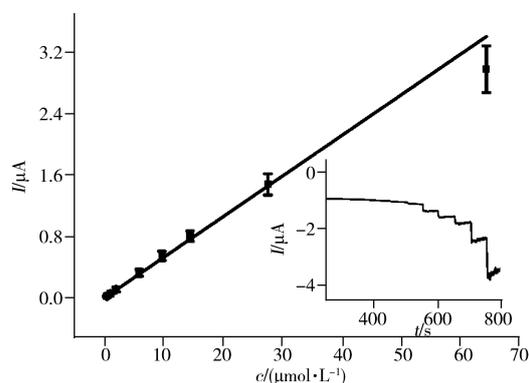


图4 组胺的电流响应值与其浓度的关系曲线
Fig. 4 Linear relationship of the current response of histamine with different concentrations
insert: calibration curve of the oxidation current vs the concentration of histamine

- [16] Wang Y S. *Design and Applications Research of Au Nanoparticles Composites*. Changchun: Jilin University(王英帅. 金纳米粒子复合材料的设计及应用研究. 长春: 吉林大学), 2017.
- [17] Yi L J. *Research and Application on the Electrochemical Detection Methods of Tyramine and Tryptamine in Fermented Foods*. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering(易丽娟. 发酵食品中酪胺和色胺的电化学检测方法研究与应用. 广州: 仲恺农业工程学院), 2017.
- [18] Zhang Y. *Ultra-high Performance Liquid Chromatography Detection Technology on the Variation of Biogenic Amines in Aquatic Products*. Nanjing: Nanjing Agricultural University(张阳. 水产品中生物胺含量检测方法的建立及其变化规律的研究. 南京: 南京农业大学), 2012.
- [19] Guo H. *Biogenic Amines Profile and Characteristic Amines Analysis at Different Storage Temperature in Marine Fishes*. Hangzhou: Zhejiang University(郭慧. 不同贮藏温度条件下海洋鱼类生物胺变化规律研究及特征生物胺分析. 杭州: 浙江大学), 2015.
- [20] Wu Y Y, Chen Y F, Li L H, Yang X Q, Lin W L, Yang S L, Wang J X. *J. Fish. Chin.* (吴燕燕, 陈玉峰, 李来好, 杨贤庆, 林婉玲, 杨少玲, 王锦旭. 水产学报), 2015, 39(10): 1577 - 1586.
- [21] Hu Y. *Determination of Biogenic Amines and Isolation of Histamine - producing Bacteria in Aquatic Foods*. Xiamen: Jimei University(胡月. 水产品中生物胺的测定及产组胺菌的分离与鉴定. 厦门: 集美大学), 2013.
- [22] Guo H, Liu X Q, Chao L P, Jiang Y H. *J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.* (郭慧, 刘晓琴, 晁鲁平, 蒋益虹. 中国食品学报), 2017, 17(5): 194 - 199.

(责任编辑: 周启动)

我国学者研制出可快速降解水中抗生素的新型催化剂

抗生素滥用导致的生态环境和生物安全问题, 已引起广泛关注。近期, 中科院合肥物质科学研究院智能机械研究所刘锦淮课题组孔令涛研究团队设计出一种新颖可控的催化剂, 实现了在宽酸碱度范围内对抗生素的高效降解。英国皇家化学会知名学术期刊《纳米尺度》日前发表了这一成果。

由于人和动物往往不能将服用的抗生素完全吸收, 大量的抗生素以代谢产物甚至原态形式排入环境中, 导致病原微生物产生耐药性, 进而使敏感菌耐药性增强。四环素作为一种典型的抗生素, 在被人体摄入后, 难以被肠胃彻底吸收, 约 75% 的剂量以母体化合物的形式被人体排出, 对生态环境和生物安全造成重大潜在威胁。

芬顿技术可以实现有机物的高效降解, 但常规的芬顿反应需要在强酸条件下才能发挥作用, 在实际应用中受到限制。近期, 孔令涛研究团队通过技术攻关, 成功制备出一种形貌可控的催化剂, 该催化剂对提高芬顿体系降解四环素的效率有显著作用, 还将反应的最优酸碱度范围拓宽至中性。

据介绍, 该项研究详细讨论了催化降解机理, 推测出可能的四环素降解路线, 解决了四环素的难降解问题, 拓宽了类芬顿反应的酸碱度应用范围, 具有广泛的应用前景。

(信息来源: 新华社)