

基于底物内标的蜂蜜中硝基呋喃妥因拉曼信号校正方法

闫 帅¹, 李永玉^{1*}, 彭彦昆¹, 刘亚超¹, 韩东海²

1. 中国农业大学工学院, 国家农产品加工技术装备研发分中心, 北京 100083

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083

摘 要 针对表面增强拉曼光谱信号重复性欠佳的问题, 利用实验室自行搭建的拉曼点检测系统, 以蜂蜜中硝基呋喃妥因兽药为检测对象, 探讨了基于蜂蜜固有内标的硝基呋喃妥因表面增强拉曼峰强校正方法。首先通过含不同浓度硝基呋喃妥因蜂蜜样品及硝基呋喃妥因标准品的拉曼光谱对比分析, 确定 739 cm^{-1} 处蜂蜜拉曼特征位移作为底物蜂蜜的内标峰, 用比值法校正硝基呋喃妥因 $1\ 353$ 和 $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ 处拉曼特征峰强用于蜂蜜中硝基呋喃妥因定量分析。相同条件下分别采集了浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的硝基呋喃妥因蜂蜜样品表面增强拉曼光谱 30 次, $1\ 353$ 和 $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ 处硝基呋喃妥因特征峰强相对标准偏差 (RSD) 分别为 $11.515\ 6\%$ 和 $11.162\ 5\%$, 利用 739 cm^{-1} 处蜂蜜拉曼特征峰强作为内标分别校正 $1\ 353$ 和 $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ 处硝基呋喃妥因拉曼特征峰强后相对标准偏差分别降为 $4.852\ 6\%$ 和 $4.733\ 2\%$, 显著提升了表面增强拉曼特征峰强的重复性和稳定性。因为仪器系统误差及表面增强过程中不可控因素引起的人为误差等对样品表面增强拉曼光谱中 739 cm^{-1} 处蜂蜜特征峰强和 $1\ 353$ 和 $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ 处硝基呋喃妥因特征峰强的影响是完全相同的, 所以通过内标比值法可以有效消除和减少拉曼信号稳定性和重复性差的问题。最后采集硝基呋喃妥因浓度范围为 $0.4\sim 20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 69 个蜂蜜样品, 基于硝基呋喃妥因 $1\ 353$ 和 $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ 处拉曼特征峰强和蜂蜜 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰强比值, 分别建立了一元线性回归预测模型和多元线性回归模型, 其中基于蜂蜜 739 cm^{-1} 处内标校正硝基呋喃妥因 $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ 处拉曼特征峰强的一元线性回归模型效果最佳, 与校正前相比具有更高的精度和预测能力。该模型校正集决定系数 (R_c^2) 和验证集决定系数 (R_v^2) 分别为 $0.971\ 2$ 和 $0.969\ 6$, 校正集均方根误差 (RMSEC) 和验证集均方根误差 (RMSEP) 分别为 $1.115\ 1$ 和 $1.242\ 2$, 相对分析误差 (RPD) 为 $4.306\ 0$ 。结果表明, 被测底物本身持有固有内标的样品可无需加入额外的内标物, 简单用内标比值法可以有效消除仪器的系统误差以及表面增强剂与样品的混合时间等对拉曼信号强度的影响, 显著提高了拉曼特征信号的重复性和稳定性, 为表面增强拉曼光谱定量分析提供了技术参考。

关键词 表面增强拉曼光谱; 蜂蜜; 硝基呋喃妥因; 快速检测

中图分类号: O657.37 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)02-0546-06

引 言

表面增强拉曼散射 (surface-enhancement of Raman scattering) 是某些物质分子吸附到特定的金属表面时, 该分子拉曼散射强度显著增强的一种现象^[1]。表面增强拉曼光谱可以快速提取样品的指纹特征信息, 无需制备特殊样品, 广泛应用于农产品、食品^[2-4]等安全、品质方面痕量甚至单分子的检测应用研究。但表面增强拉曼光谱信号重复性欠佳, 定量分析局限于实验室固定检测条件下的应用研究, 仍亟待发展

完善^[5]。

拉曼信号重复性受诸多因素的影响, 如检测环境温度、被测物质与探针之间相对位置、检测器件的暗电流噪声、光源的输出功率稳定性等^[6]。特别是表面增强拉曼信号重复性更差, 不同批次的表面增强剂以及表面增强剂与样品的混合时间等均对拉曼信号强度影响非常大。为消除或减少上述的影响, 诸多学者通过内标法进行了拉曼光谱定量分析研究, 旨在提高定量预测模型的精度。刘江美^[7]等通过加入硫氰化钾作为内标物对亚胺硫磷溶液进行表面增强拉曼光谱分析; 房晓倩^[8]等以硝酸钠 $1\ 053\text{ cm}^{-1}$ 处拉曼特征峰强作内标建立

收稿日期: 2019-09-16, 修订日期: 2020-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31671921) 和国家“十三五”重点研发计划项目 (2016YFD0101205) 资助

作者简介: 闫 帅, 1993 年生, 中国农业大学工学院博士研究生 e-mail: ys_0931@163.com

* 通讯作者 e-mail: yyli@cau.edu.cn

了山梨酸钾浓度预测模型并进行预测; Yu^[9]等以丙酮为诱导物浸渍样品皮提取农药分子,并将丙酮的拉曼特征峰作为内标校准了拉曼信号波动。除此之外还有以四氯化碳、高氯酸根离子^[10]、甲醇^[11]等为内标物的相关研究报道。以上研究一定程度上减小或消除拉曼信号稳定性差的问题,提高了定量分析模型精度,但均引入了额外的内标化学物质。如果被测底物本身持有固有的内标峰,无需加入额外的内标物,可避免引入新内标时的人为误差,也可消除或减少拉曼信号重复性差的问题。

蜂蜜作为传统的营养保健食品,其品质安全备受关注。硝基呋喃类抗生素应用于治疗或预防蜜蜂的胃肠道疾病具有潜在残留风险。本文以蜂蜜中硝基呋喃妥因兽药为检测对象,利用实验室自行搭建的拉曼点检测系统,确认作为底物蜂蜜的固有内标峰,分析硝基呋喃妥因拉曼特征峰的归属,研究基于蜂蜜固有内标的硝基呋喃妥因表面增强拉曼特征峰强校正方法,建立蜂蜜中硝基呋喃妥因兽药残留的定量预测模型,旨在消除和减少仪器系统误差及表面增强过程中不可控因素引起的人为误差,为蜂蜜中兽药残留定量分析提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

枣花蜂蜜购于北京市当地物美超市,用于制备含硝基呋喃妥因蜂蜜样品;硝基呋喃妥因(高纯,98%)购于上海源叶生物科技有限公司用于获取硝基呋喃妥因标准拉曼光谱和制备含硝基呋喃妥因蜂蜜样品;柠檬酸钠(分析纯,北京化工厂)和硝酸银(分析纯,广东光华科技股份有限公司)用于制备表面增强剂银溶胶。

拉曼光谱系统为实验室自行搭建的拉曼光谱点检测系统,包括 Andor CCD 相机(Andor Technology, Inc, South Windsor, Conn),光谱仪(Head Wall Photonics, Fitchburg, Mass):有效光谱范围 0~2 344 cm^{-1} ,分辨率为 2~3 cm^{-1} ,激光器波长 785 nm (Innovative Photonic Solution, Monmouth Junction, N. J.),计算机。

1.2 方法

银溶胶的制备:按照 Lee^[12]等的方法将 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸银溶液加热至沸腾,使用磁力搅拌器高速搅拌硝酸银溶液,并逐滴加入浓度为 1% 柠檬酸钠溶液,柠檬酸钠和硝酸银溶液体积比为 1:40,保持加热搅拌 1 h,反应完成后自然冷却至室温。上述银溶胶置于台式离心机以 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度离心 30 min,去除上清液获得浓缩银溶胶。将制备好的银溶胶放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中避光保存备用。

样品的制备:配制 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的硝基呋喃妥因水溶液,与蜂蜜混合制备含有不同浓度硝基呋喃妥因蜂蜜样品。制备硝基呋喃妥因浓度范围为 0.4~20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的蜂蜜样品共 69 个,每个样品利用旋涡混合器将蜂蜜和硝基呋喃妥因水溶液混合均匀,每个浓度梯度的蜂蜜样品制备 3 个,其中 2 个作为校正集样品,1 个作为验证集样品。为排除其他环境因素的干扰,所制备样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温冰箱中避光保存供

后续采集光谱使用。

光谱采集与预处理:拉曼光谱系统激光波长为 785 nm,设定激光功率 150 mW,积分时间为 1 s,用移液枪分别吸取 2.5 μL 蜂蜜样品和 1 μL 银溶胶,将两者充分混合后静置 30 s 采集光谱。所获光谱曲线数据利用 MATLAB R2016b 附带的 PLS Toolbox 数据库对其进行平滑降噪(Savitsky-Golay, Filter Width 5, polynomial order 1)和特征峰值提取,并利用 Origin 2018 进行标准曲线的绘制和计算分析。

2 结果与讨论

2.1 蜂蜜内标峰的确证及硝基呋喃妥因拉曼特征峰的归属分析

拉曼光谱是基于拉曼散射效应的一种分子振动与转动光谱,可以提供分子结构信息。硝基呋喃妥因标准品(分子式 $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_5$)的拉曼光谱曲线如图 1(a)所示,主要在 700~1 800 cm^{-1} 区域内出现了比较丰富的拉曼特征峰,其中 1 025, 1 356 和 1 614 cm^{-1} 处特征峰最显著,分别对应着 NO_2 的伸缩振动、 $\text{H}-\text{C}-\text{H}$ 的对称伸缩振动和呋喃环的拉伸和摇摆振动、 $\text{C}=\text{N}$ 面内对称伸缩振动^[13]。硝基呋喃妥因浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 蜂蜜的表面增强拉曼光谱曲线如图 1(b)所示,硝基呋喃妥因的拉曼特征峰出现于 1 033, 1 353 和 1 612 cm^{-1} 处,与硝基呋喃妥因标准品的拉曼特征峰基本一致,但因硝基呋喃妥因与银溶胶表面之间的相互作用,部分拉曼特征峰在拉曼位移上出现了小的偏移。除此之外,739 cm^{-1} 处出现了明显的拉曼特征峰,可能是蜂蜜的拉曼特征信号。

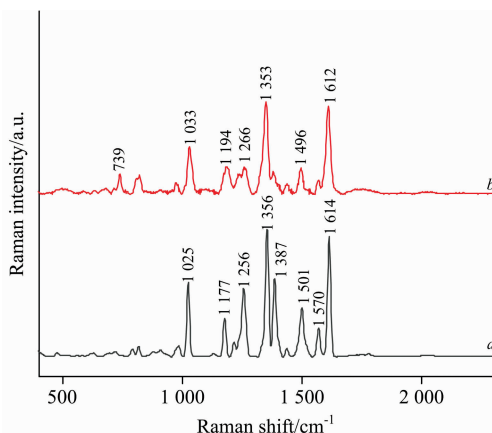


图 1 硝基呋喃妥因标准品拉曼光谱(a)和含有硝基呋喃妥因蜂蜜的 SERS 光谱(b)

Fig. 1 Raman spectrum of nitrofurantoin standard products (a) and honey SERS spectrum (b) containing nitrofurantoin

为进一步确认 739 cm^{-1} 拉曼特征位移处的拉曼特征信号,分别采集了含有不同浓度硝基呋喃妥因的蜂蜜样品的表面增强拉曼光谱。如图 2 所示,由于蜂蜜复杂的成分所造成的荧光背景,即使蜂蜜和纳米银颗粒接触吸附后,糖类物质的多数拉曼特征信号并没有得到增强,市售蜂蜜样品仅在

739, 1 033 和 1 399 cm^{-1} 处出现了拉曼特征峰。其中, 1 399 cm^{-1} 拉曼特征位移和硝基呋喃妥因 1 353 cm^{-1} 处拉曼特征位移非常相近, 随硝基呋喃妥因浓度的增加蜂蜜的 1 399 cm^{-1} 处特征峰越来越不明显。另外, 1 033 cm^{-1} 处蜂蜜和硝基呋喃妥因拉曼特征峰几乎重叠, 随硝基呋喃妥因浓度增加 1 033 cm^{-1} 处特征信号强度逐渐递增, 说明不便利用 1 025 cm^{-1} 处硝基呋喃妥因特征峰强进行定量分析。只有蜂蜜的 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰不受硝基呋喃妥因影响, 特征峰比较尖锐清晰。因此选定蜂蜜中 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰强作为内标, 校正蜂蜜中硝基呋喃妥因的特征峰强用于蜂蜜中硝基呋喃妥因定量分析。

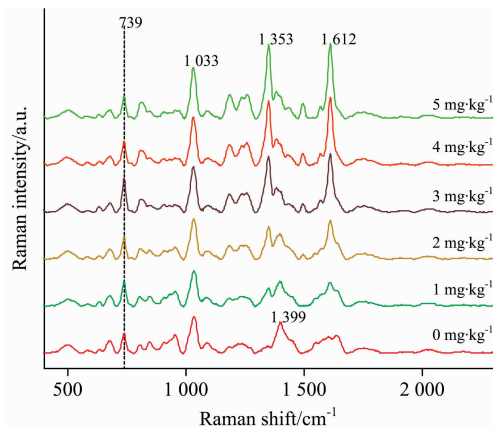


图 2 基线扣除后含硝基呋喃妥因蜂蜜表面增强拉曼光谱

Fig. 2 Surface enhanced Raman spectra of honey containing nitrofurantoin after baseline deduction

2.2 内标校正效果及稳定性分析

表面增强拉曼光谱的信号主要受操作者的操作误差、仪器波动和光源功率波动影响, 仪器波动变化难以预知, 而人为操作难以保证增强剂与蜂蜜样品混合均匀性与吸附时间的一致性, 同一样品所获取的拉曼特征峰强重复性和稳定性较差。相同条件下采集 30 次硝基呋喃妥因浓度为 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的蜂蜜样品表面增强拉曼光谱, 结果如图 3(a)所示。1 353 和 1 612 cm^{-1} 处硝基呋喃妥因特征峰强相对标准偏差(RSD)分别为 11.515 6%和 11.162 5%, 硝基呋喃妥因拉曼特征峰强波动显著。利用蜂蜜 739 cm^{-1} 处拉曼特征位移信号作为内标, 分别计算每个光谱 1 353 和 1 612 cm^{-1} 处的硝基呋喃妥因特征峰强与蜂蜜 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰强的比值($I_{1353/739}$, $I_{1612/739}$), 结果显示采集 30 次硝基呋喃妥因浓度为 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的蜂蜜样品表面增强拉曼光谱的 1 353 cm^{-1} 处硝基呋喃妥因拉曼特征峰强与 739 cm^{-1} 处蜂蜜拉曼特征峰强的比值相对标准偏差为 4.852 6%, 1 612 cm^{-1} 处的硝基呋喃妥因拉曼特征峰强与蜂蜜 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰强的比值的相对标准偏差为 4.733 2%, 显著提升了表面增强拉曼特征峰强的重复性和稳定性, 校准后的光谱如图 3(b)所示。因为仪器系统误差及表面增强过程中不可控因素引起的人为误差等对样品表面增强光谱中 739 cm^{-1} 处蜂蜜特征峰强和 1 353 和 1 612 cm^{-1} 处硝基呋喃妥因特征峰强的影响是

完全相同的, 所以通过内标比值法可以有效消除和减少拉曼信号稳定性和重复性差的问题, 可以提升定量分析模型精度。

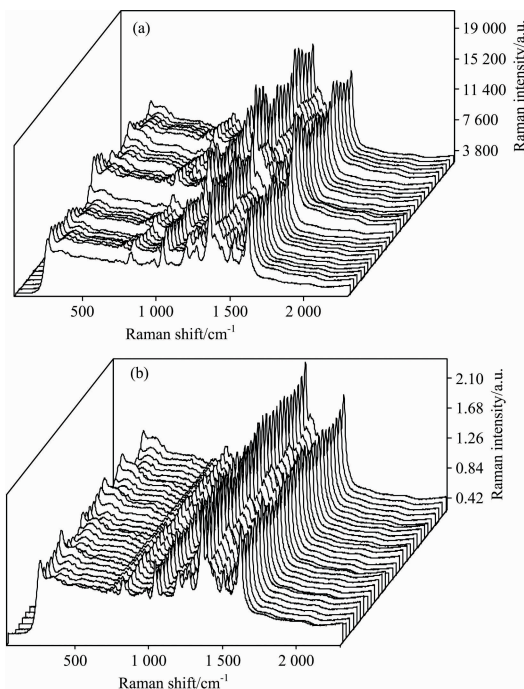


图 3 30 条 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硝基呋喃妥因蜂蜜的原始光谱 (a) 和使用 739 cm^{-1} 处蜂蜜拉曼特征峰校准后的光谱 (b)

Fig. 3 Raw spectra (a) of 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nitrofurantoin honey and spectra (b) calibrated with Raman characteristic peaks at 739 cm^{-1}

分别采集硝基呋喃妥因浓度为 1, 5, 10, 15 和 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的蜂蜜样品表面增强拉曼光谱, 每个浓度重复采集 5 次, 并利用蜂蜜中 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰值强度作为内标对硝基呋喃妥因拉曼特征峰强进行了校正。校正前所有样品在 1 353 和 1 612 cm^{-1} 处拉曼特征峰强平均相对标准偏差分别为 12.418%和 7.166%, 经内标比值校正后相对标准偏差分别降至 8.508%和 3.808%。1 353 cm^{-1} 拉曼特征峰强相比于 1 612 cm^{-1} 具有较大的相对标准偏差, 可能是 1 353 cm^{-1} 处硝基呋喃妥因拉曼特征峰比较接近蜂蜜本身 1 399 cm^{-1} 处拉曼特征峰, 加上受银溶胶中柠檬酸盐在 1 400 cm^{-1} 的拉曼特征峰影响, 但结果表明利用蜂蜜中 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰强校正后两拉曼特征峰强相对标准偏差显著减小。1 353 和 1 612 cm^{-1} 处硝基呋喃妥因拉曼特征峰强用内标比值法校正前后与蜂蜜中硝基呋喃妥因浓度的线性关系如图 4 所示。1 353 cm^{-1} 处拉曼特征峰强与硝基呋喃妥因浓度的决定系数 R^2 为 0.914, 比值校正后决定系数 R^2 为 0.965 3; 1 612 cm^{-1} 处拉曼特征峰强与硝基呋喃妥因浓度的决定系数为 0.904 2, 比值校正后决定系数为 0.962 1。结果表明, 内标比值校正法可以有效提高硝基呋喃妥因预测模型精度。

2.3 蜂蜜中硝基呋喃妥因定量预测模型的建立

制备硝基呋喃妥因浓度范围为 0.4~20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的蜂蜜样品 69 个, 分别采集了表面增强拉曼光谱, 如图 5(a)所

示。采集的每个光谱分别利用蜂蜜 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰强对硝基呋喃妥因 1 353 和 1 612 cm^{-1} 处拉曼特征峰强进行了比值校正, 结果如图 5(b) 所示。结果表明, 利用蜂蜜中 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰强作为内标, 校正硝基呋喃妥因拉曼特征峰强可以有效减小或消除因仪器波动、激光功率变化以及人为操作等因素差异对硝基呋喃妥因拉曼特征峰强的稳定性的影响。

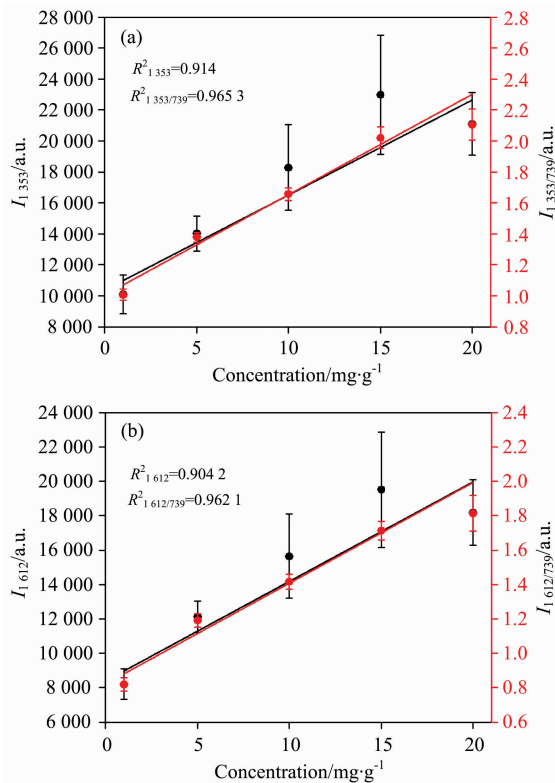


图 4 内标校准前后硝基呋喃妥因浓度和 1 353 cm^{-1} (a), 1 612 cm^{-1} (b) 处拉曼强度的线性关系

Fig. 4 Linear relationship between nitrofurantoin concentration and Raman strength at 1 353 cm^{-1} (a) and 1 612 cm^{-1} (b) before and after internal standard calibration

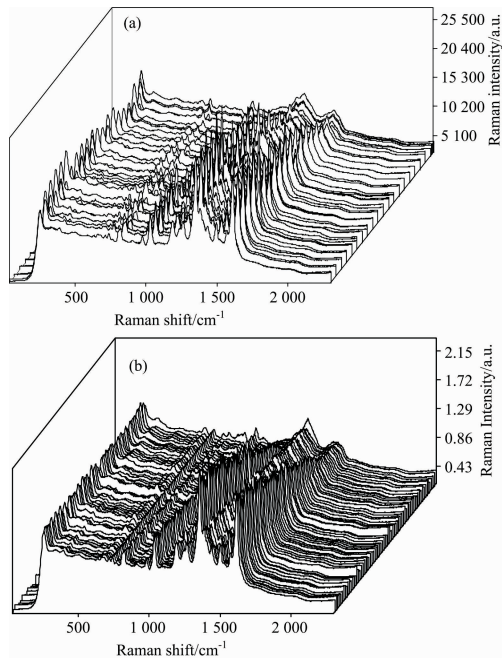


图 5 硝基呋喃妥因蜂蜜表面增强拉曼光谱 (a): 校正前; (b): 校正后

Fig. 5 Surface enhanced Raman spectra of nitrofurantoin honey (a): Before correction; (b): After correction

基于硝基呋喃妥因 1 353 和 1 612 cm^{-1} 处拉曼特征峰强和蜂蜜 739 cm^{-1} 处拉曼特征峰强比值, 分别建立了一元线性回归预测模型和多元线性回归模型。如表 1 所示, 基于蜂蜜 739 cm^{-1} 处内标比值建立的线性回归方程与校正前相比具有更高的精度和预测能力。简单用内标比值法就可有效消除了仪器系统误差和不同批次表面增强剂以及表面增强剂与样品的混合时间等对拉曼信号强度的影响, 显著提高了模型的预测精度。最佳预测模型为基于蜂蜜 739 cm^{-1} 处内标校正硝基呋喃妥因 1 612 cm^{-1} 处拉曼特征峰强的一元线性回归模型, 如图 6 所示。校正集决定系数 (R_c^2) 和验证集系数 (R_v^2) 分别为 0.971 2 和 0.969 6, 校正集均方根误差 (RMSEC) 和验证集均方根误差 (RMSEP) 分别为 1.115 1 和 1.242 2, 相对分析误差 (RPD) 为 4.306 0。

表 1 蜂蜜中硝基呋喃妥因定量预测模型

Table 1 Quantitative prediction model of nitrofurantoin in honey

Modeling methods	Raman shift	Calibration set		Prediction set		RPD
		R_c^2	RMSEC	R_v^2	RMSEP	
Linear regression analysis method	$I_{1\ 351}$	0.861 3	2.595 9	0.877 8	2.194 9	2.592 3
	$I_{1\ 351/739}$	0.974 5	1.046 8	0.968 1	1.293 6	4.172 2
	$I_{1\ 612}$	0.866 7	2.536 7	0.876 2	2.195 6	2.622 5
	$I_{1\ 612/739}$	0.971 2	1.115 1	0.969 6	1.242 2	4.306 0
Multiple Linear regression analysis method	$I_{1\ 351}$ & $I_{1\ 612}$	0.870 6	2.233 3	0.865 8	2.034 1	2.643 7
	$I_{1\ 351/739}$ & $I_{1\ 612/739}$	0.974 8	1.013 9	0.966 1	1.307 7	4.296 1

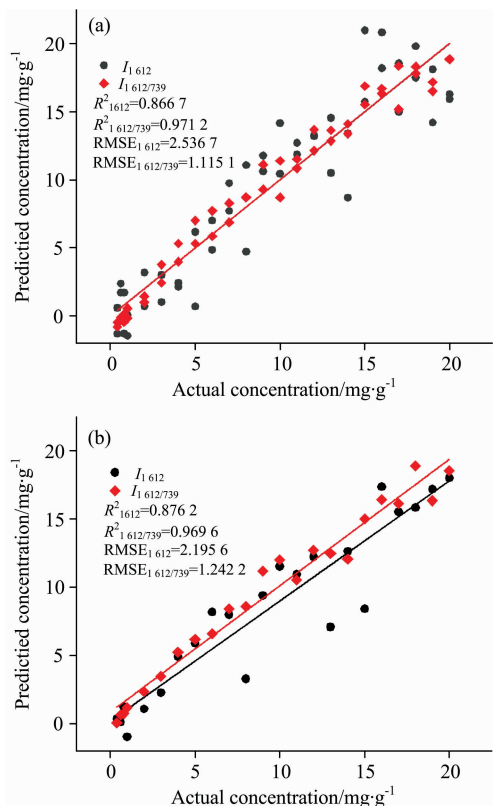


图 6 $1\ 612\ \text{cm}^{-1}$ 校正前和校正后模型对比

(a): 校正集; (b): 验证集

Fig. 6 Comparison of validation set models before and after correction of $1\ 612\ \text{cm}^{-1}$

(a): Calibration set; (b): Verification set

3 结论

利用实验室自行搭建的拉曼点检测系统,以蜂蜜中硝基呋喃妥因兽药为检测对象,探讨了基于蜂蜜固有内标的硝基呋喃妥因表面增强拉曼峰强校正方法。首先确认了作为底物的蜂蜜固有的内标峰,同时分析了硝基呋喃妥因拉曼特征峰的归属,并验证了内标校正效果及稳定性。最后基于内标比值校正法建立了蜂蜜中硝基呋喃妥因含量的定量预测模型。通过对含不同浓度硝基呋喃妥因蜂蜜样品及硝基呋喃妥因标准品的拉曼光谱对比分析,确定了 $739\ \text{cm}^{-1}$ 处蜂蜜拉曼特征峰强作为内标,校正 $1\ 353$ 和 $1\ 612\ \text{cm}^{-1}$ 处硝基呋喃妥因的特征峰强用于蜂蜜中硝基呋喃妥因定量分析。相同条件下分别采集了浓度为 $20\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的硝基呋喃妥因蜂蜜样品 30 次,发现 $1\ 353$ 和 $1\ 612\ \text{cm}^{-1}$ 处硝基呋喃妥因特征峰强相对标准偏差(RSD)分别为 $11.515\ 6\%$ 和 $11.162\ 5\%$,但是 $739\ \text{cm}^{-1}$ 处蜂蜜拉曼特征峰强作为内标分别校正 $1\ 353$ 和 $1\ 612\ \text{cm}^{-1}$ 处硝基呋喃妥因拉曼特征峰强后相对标准偏差分别为 $4.852\ 6\%$ 和 $4.733\ 2\%$,显著提升了表面增强拉曼特征峰强的重复性和稳定性。最后采集硝基呋喃妥因浓度范围为 $0.4\sim 20\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 69 个蜂蜜样品,基于硝基呋喃妥因 $1\ 353$ 和 $1\ 612\ \text{cm}^{-1}$ 处拉曼特征峰强和蜂蜜 $739\ \text{cm}^{-1}$ 处拉曼特征峰强比值,分别建立了一元线性回归预测模型和多元线性回归模型,与校正前相比具有更高的精度和预测能力。其中基于蜂蜜 $739\ \text{cm}^{-1}$ 处内标校正硝基呋喃妥因 $1\ 612\ \text{cm}^{-1}$ 处拉曼特征峰强的一元线性回归模型效果最佳,模型校正集决定系数(R_c^2)和验证集决定系数(R_v^2)分别为 $0.971\ 2$ 和 $0.969\ 6$,校正集均方根误差(RMSEC)和验证集均方根误差(RMSEP)分别为 $1.115\ 1$ 和 $1.242\ 2$,相对分析误差(RPD)为 $4.306\ 0$ 。结果表明,被测底物本身持有固有内标的样品可无需加入额外的内标物,简单用内标比值法可以有效消除仪器的系统误差和不同批次的表面增强剂以及表面增强剂与样品的混合时间等对拉曼信号强度的影响,显著提高了拉曼特征信号的重复性和稳定性。

References

- [1] Schlücker S. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(19): 4756.
- [2] Hu Y, Feng S, Gao F, et al. *Food Chemistry*, 2015, 176: 123.
- [3] Chen Y, Li X, Yang M, et al. *Talanta*, 2017, 167: 236.
- [4] Gillibert R, Huang J Q, Zhang Y, et al. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 105: 185.
- [5] Darby B L, Le Ru E C. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(31): 10965.
- [6] Kämmer E, Olschewski K, Bocklitz T, et al. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 2014, 16(19): 9056.
- [7] LIU Jiang-mei, YAN Li-ping, LIU Wen-han, et al(刘江美, 严丽萍, 刘文涵, 等). *Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报)*, 2016, (5): 605.
- [8] FANG Xiao-qian, LI Yong-yu, PENG Yan-kun, et al(房晓倩, 李永玉, 彭彦昆, 等). *Acta Optica Sinica(光学学报)*, 2018, (4): 377.
- [9] Yu F, Su M, Tian L, et al. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(8): 5232.
- [10] WU Xiao-qiong, ZHENG Jian-zhen, LIU Wen-han, et al(吴小琼, 郑建珍, 刘文涵, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(7): 1344.
- [11] WANG Wei, XI Xin-xin, WANG Bei, et al(王 玮, 席欣欣, 王 蓓, 等). *The Journal of Light Scattering(光散射学报)*, 2010, (4): 361.

[12] Lee P C, Meisel D. *Journal of Physical Chemistry*, 1982, 86(17): 3391.

[13] ZHU Xin-yu(竺芯宇). Master Dissertation(硕士论文). Jiangnan University(江南大学), 2013. 55.

A Method for Correcting Nitrofurantoin Raman Signal in Honey Based on Internal Standard of Substrate

YAN Shuai¹, LI Yong-yu^{1*}, PENG Yan-kun¹, LIU Ya-chao¹, HAN Dong-hai²

1. College of Engineering, China Agricultural University, National Research and Development Center for Agro-Processing Equipment, Beijing 100083, China

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract In order to solve the problem of poor reproducibility of surface-enhanced Raman spectroscopy signals, this paper explored the surface-enhanced Raman spectroscopy correction method based on internal honey standard using the Raman point detection system built by the laboratory. Firstly, the Raman characteristic displacement at 739 cm^{-1} was determined to be the standard internal peak of honey by surface enhanced Raman spectra of honey samples and Raman spectra of standard products of nitrofurantoin. The ratio method was used to correct the Raman characteristic peak strength of nitrofurantoin at $1\ 353$ and $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ for quantitative analysis in honey. The surface-enhanced Raman spectra of nitrofurantoin honey samples with a concentration of $20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ were collected for 30 times under the same conditions, and the peak intensity relative standard deviations of nitrofurantoin at $1\ 353$ and $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ was $11.515\ 6\%$ and $11.162\ 5\%$, respectively. However, after using the Raman characteristic peak intensity at 739 cm^{-1} as the internal standard to correct the peak intensity of nitrofurantoin at $1\ 353$ and $1\ 612\text{ cm}^{-1}$, the relative standard deviations were reduced to $4.852\ 6\%$ and $4.733\ 2\%$, respectively. The repeatability and stability of the surface-enhanced Raman characteristic peaks are significantly improved. Because the instrument system errors and surface enhanced during uncontrollable factors and errors human-induced surface of the sample enhanced 739 cm^{-1} honey characteristic peak intensity spectrum and at $1\ 353$ and $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ nitro nitrofurantoin characteristic peak intensity the effects are the same, it is possible to effectively eliminate the difference between the Raman signals and decrease the stability or poor repeatability problem by internal standard ratio method. Because the error of the instrument system and the artificial error caused by uncontrollable factors in the surface enhancement process have the same effect on the peak strength of 739 cm^{-1} honey characteristic peak and the peak strength of $1\ 353$ and $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ nitrofurantoin characteristic peak in the sample surface enhancement spectrum, therefore, the internal label ratio method can effectively eliminate or reduce the problem of Raman signal stability and poor repeatability. Finally, 69 honey samples with a nitrofurantoin concentration range of $0.4\sim 20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ were collected. Based on Raman characteristic peak intensity at $1\ 353$ and $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ of nitrofurantoin and Raman characteristics at 739 cm^{-1} of honey, The linear regression prediction model and the multi-linear regression model were established respectively, in which the unary linear regression model based on the internal standard of honey at 739 cm^{-1} to correct the Raman characteristic peak intensity at $1\ 612\text{ cm}^{-1}$ of nitrofurantoin with higher precision and predictability. In this model, the determination coefficient of the calibration set and validation set is $0.971\ 2$ and $0.969\ 6$ respectively, and the root means square error of calibration set and validation set are $1.115\ 1$ and $1.242\ 2$ respectively, and the relative analysis error is $4.306\ 0$. The results show that the sample of the underlying itself holds the inherent internal criteria without adding additional internal markers, and the simple internal standard ratio method can effectively eliminate the effect of the instrument's system error and the mixing time between surface enhancers and samples on the Raman signal strength, and significantly improve the repeatability and stability of the Raman characteristic signal. It provides a technical reference for the quantitative analysis of surface-enhanced Raman spectra.

Keywords Surface-enhanced Raman spectra; Honey; Nitrofurantoin; Rapid detection

(Received Sep. 16, 2019; accepted Feb. 4, 2020)

* Corresponding author