

文章编号: 1004-7271(2007)04-0357-05

## 水产品中生物胺的测定方法

刘辰麒, 王锡昌, 丁卓平

(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

**摘要:**用高效液相色谱法同时分离检测水产品中的多组分生物胺。这些生物胺包括:色胺,章鱼胺,2-苯乙胺,腐胺,尸胺,组胺,5-羟色胺,酪胺,亚精胺和精胺。高氯酸溶液提取,丹酰氯衍生,再用氨水去除尸胺干扰峰。 $C_{18}$ 反相色谱柱,用醋酸胺和乙腈为流动相,梯度洗脱,流速为1.0 mL/min,柱温40℃;254 nm下紫外检测器检测。结果表明:平均回收率是79.59%~111.10%;相对标准偏差为2.6%~15.8%;方法检测限(信噪比S/N=3):腐胺、亚精胺0.8 μg/g;尸胺、组胺、酪胺、精胺1 μg/g;章鱼胺、5-羟色胺2 μg/g;2-苯乙胺3 μg/g;色胺5 μg/g。

**关键词:**高效液相色谱;生物胺;丹酰氯;梯度洗脱

**中图分类号:**O 657.7<sup>+</sup>2; O 623.731 **文献标识码:**A

## Determination of biogenic amines in aquatic products

LIU Chen-qi, WANG Xi-chang, DING Zhuo-ping

(College of Food Science & Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatographic method is described for the determination of ten biogenic amines found in aquatic products: tryptamine, octopamine, 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, 5-hydroxytryptamine, tyramine, spermidine, and spermine. Amines were extracted with perchloric acid solution and derived with dansyl chloride. After derivation, ammonia was added to remove an interfering peak near cadaverine. Liquid chromatographic separations were performed by using a Spherisorb ODS2 column and an ammonium acetate-acetonitrile gradient elution program with mixture of 0.1 mol/L ammonium acetate as solvent A and acetonitrile as solvent B. Flow rate is 1.0 mL/min and column temperature is 40 °C. UV detector is used to determine the biogenic amines at 254 nm wavelength. Average recovery of biogenic amines ranges from 79.59% to 111.10%. Relative standard deviations range from 2.6% to 15.8%. The limits of detection (S/N = 3) were: 0.8 μg/g for putrescine and spermidine; 1 μg/g for cadaverine, histamine, tyramine and spermine; 2 μg/g for octopamine and serotonin; 3 μg/g for 2-phenylethylamine; 5 μg/g for tryptamine.

**Key words:** high performance liquid chromatography; biogenic amines; dansyl chloride; gradient elution

生物胺是一类含氮的脂肪族或杂环类低分子化合物,适量的生物胺对动植物和微生物活性细胞有重要的生理作用。生物胺产生于食品腐烂或发酵过程中,它不仅是生成荷尔蒙、核酸、蛋白质等物质的

收稿日期:2006-09-29

基金项目:上海市重点学科建设项目资助(项目编号:T1102);上海市科委已批准建立科研计划项目(编号:04DZ05018)

作者简介:刘辰麒(1982-),男,硕士研究生,专业方向为食品卫生与检验,E-mail: cqliu@stmail.shfu.edu.cn

通讯作者:丁卓平,E-mail: zpding@shfu.edu.cn

前体,也是生成致癌物质和亚硝基类物质的前体<sup>[1-2]</sup>。生物胺中组胺对人类的健康的影 响最大,其次是酪胺。当食品中生物胺含量达到 1 000 mg/kg 时会对人体健康造成极大的危害<sup>[3]</sup>。本文以水产品为样品来研究生物胺的检测方法。国内外的文献显示,目前国内检测的项目以组胺和酪胺为主,但其他生物胺的存在也会增强组胺和酪胺的不良作用。因此,建立生物胺多组分同时检测对评定食品的安全(尤其是水产品)有着重要的、深远的意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 标准品

色胺、章鱼胺、2-苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、5-羟色胺、酪胺、亚精胺、精胺(Sigma 公司)。

#### 1.1.2 试剂与溶液

(1)试剂:醋酸胺,氨水(25%),碳酸氢钠,高氯酸,氢氧化钠、丹酰氯(分析纯);甲醇,丙酮,乙腈(HPLC 级);超纯水。(2)标准液:标准储备液:1 mg/mL 标准储备液,用纯水定容在 25 mL 棕色容量瓶中;标准使用液:1,10,100  $\mu\text{g/mL}$ ,定容于 25 mL 棕色容量瓶中,都保存于 4  $^{\circ}\text{C}$  下。

#### 1.1.3 仪器和设备

高效液相色谱仪:(Waters 510 泵、486 紫外可见光检测器、717 自动进样器、柱温箱)  $\text{C}_{18}$  反相色谱柱:150  $\times$  4.6 mm(Kromasil 公司)、涡旋混合器、均质机(Hoganas 瑞典)、超声装置、过滤设备、离心机(IEC Centra MP4)、SCAA-104 有机相针式滤器(13 mm  $\times$  0.20  $\mu\text{m}$ )。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 前处理

样品处理为取 2.0 g,加 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸<sup>[4]</sup>并用均质机捣碎混匀;放入离心机,在 3 000 r/min 的条件下离心 10 min;取上层清液,加入 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸;充分混匀,再在 3 000 r/min 的条件下离心 10 min;取出上层清液,合并两次清液,用 0.4 mol/L 的高氯酸定容到 25 mL;从中取出 1 mL,加入 100  $\mu\text{L}$  2 mol/L 的氢氧化钠调节 pH 值后,进入柱前衍生阶段,加入 300  $\mu\text{L}$  配制好的饱和碳酸氢钠溶液和 2 mL 的 10 mg/mL 丹酰氯<sup>[5-6]</sup>后,在 40  $^{\circ}\text{C}$  的条件下反应 45 min;反应毕,取出加入 100  $\mu\text{L}$  25% 的浓氨水,静置 30 min;用乙腈定容到 5 mL,振荡混匀,取适量的溶液过有机相针式滤器后,移入进样瓶待测。

添加样为取 2.0 g 样品时加入某一待分析浓度的十个生物胺混合的标准品,其余操作同上。

标准品是取 1 mL 某一待分析浓度的十个生物胺混合标准品直接进入衍生阶段,以下操作同样品。

#### 1.2.2 HPLC 的条件

(a)色谱柱: $\text{C}_{18}$ 反相色谱柱(150  $\times$  4.6 mm Kromasil 公司),柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ;(b)流动相:A 0.1 mol/L 醋酸胺溶液;B 100% 乙腈;流速都为 1.0 mL/min;(c)梯度线性程序为:在 18 min 内乙腈的比例由 50% 到 90%,恢复到初始状态后平衡 10 min。(d)进样量:10  $\mu\text{L}$ ;(e)紫外检测器:波长 254 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶剂的提取

Susanna Eerola 等<sup>[5]</sup>的实验表明用 0.4 mol/L 高氯酸提取生物胺的效果好,该文献还提到用高氯酸提取后需用滤纸过滤提取液,实验发现生物胺损失较大,本实验用有机相针式滤膜直接进样,减少了系统误差,提高了准确度。表 1 显示了在使用不同过滤方法提取后检测到为 2  $\mu\text{g/mL}$  生物胺标准品的峰面积,使用有机相针式滤膜过滤法时效果好,损失少。

### 2.2 衍生物的稳定性

通过衍生浓度为 2  $\mu\text{g/mL}$  的标准品稳定性实验发现:密封放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下,在一周内峰面积变

化不大,但是第二周开始部分生物胺峰面积下降明显。因此,生物胺衍生物在 4 ℃,避光条件下可保存一周。生物胺在水溶液中易水解,但本文实验所用的标准品均为购置 sigma 公司生物胺盐酸盐,易溶于水,但不易分解且稳定性高。

表 1 在使用不同过滤方法条件下,峰面积变化情况  
Tab.1 Variety of peak area of derivatives through different filtration ways

生物胺	滤纸过滤	有机相针式滤膜过滤
色胺	89075	104789
2-苯乙胺	109481	134567
腐胺	337485	369089
尸胺	234567	274656
组胺	224389	269893
章鱼胺	134873	176365
5-羟色胺	124983	159283
酪胺	194834	228473
亚精胺	279489	303728
精胺	258493	284949

表 2 丹酰氯衍生产物 ( 2 μg/mL ) 峰面积变化情况  
Tab.2 Variety of peak area of derivatives ( 2 μg/mL )

生物胺	一天	一周	二周
色胺	106540	106127	109406
2-苯乙胺	123421	122379	127157
腐胺	376124	376680	386086
尸胺	274754	274770	277750
组胺	273456	273263	270418
章鱼胺	174321	173163	166624
5-羟色胺	153432	153166	150864
酪胺	229456	229082	223680
亚精胺	301768	303896	259794
精胺	279615	279416	276951

### 2.3 十种生物胺出峰分析

在梯度洗脱的条件下,十个生物胺出峰图谱见图 1,2。图中显示无论标准品,还是样品分离效果都较好,能够达到定性定量分析的要求。且杂质峰(氨峰)远离十个生物胺的出峰位置,不会对分离形成干扰。

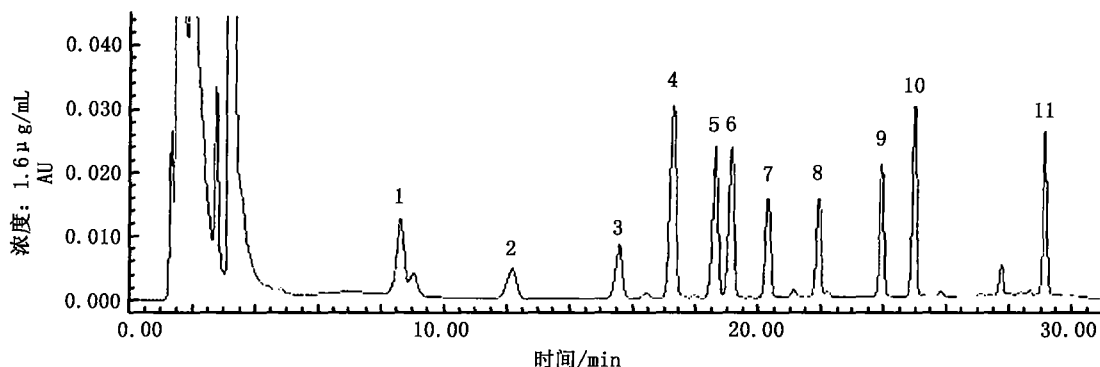


图 1 十个生物胺标准品色谱图

Fig.1 Chromatogram of the mixture of ten biogenic amines

1. 氨; 2. 色胺; 3. 2-苯乙胺; 4. 腐胺; 5. 尸胺; 6. 组胺; 7. 章鱼胺; 8. 5-羟色胺; 9. 酪胺; 10. 亚精胺; 11. 精胺

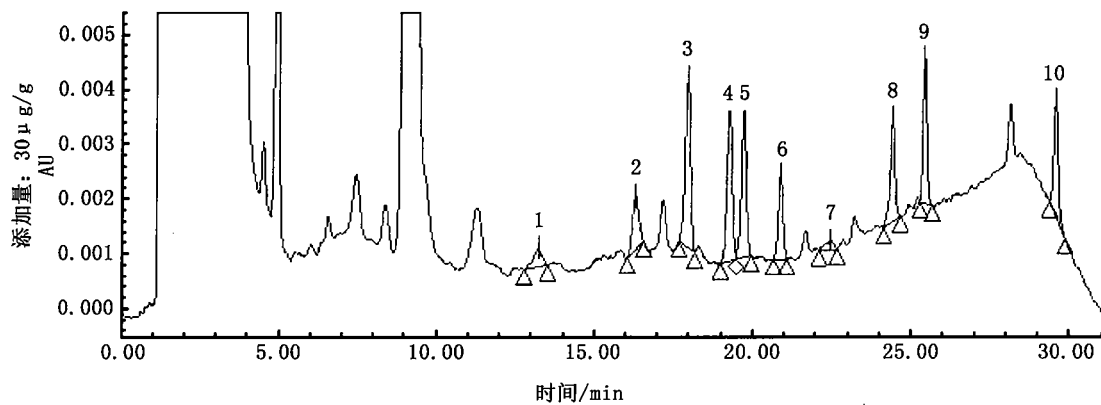


图2 标准添加

Fig.2 Sample added standard

1. 色胺; 2. 2-苯乙胺; 3. 腐胺; 4. 尸胺; 5. 组胺; 6. 章鱼胺; 7. 5-羟色胺; 8. 酪胺; 9. 亚精胺; 10. 精胺

## 2.4 线性范围与检测限

在浓度 0.2 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内, 峰面积与浓度成良好的线性关系, 其相关系数 ( $r^2$ ) 均大于 0.999。根据信噪比  $S/N = 3$  确定最低检测限: 腐胺、亚精胺 0.8  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 尸胺、组胺、酪胺、精胺 1  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 章鱼胺、5-羟色胺 2  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 2-苯乙胺 3  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 色胺 5  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

## 2.5 方法的回收率和精密度

本实验根据生物胺检测限选择最低的 30  $\mu\text{g}/\text{g}$  标准添加实验来计算回收率和检验精密度, 其对应的生物胺标准品浓度为: 0.48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。实验所用的样品是三文鱼, 样品称 2.0 g, 做三个平行。

结果表明(见表3): 样品加标的回收率是 79.59% ~ 111.10%, 相对标准偏差为 2.6% ~ 15.8%, 根据中国进出口商品检验行业标准(SN/T 0001-1995)的规定, 对于添加浓度大于 0.01  $\mu\text{g}/\text{g}$  的回收率应在 70% ~ 110% 之间; 精密度要求待测物浓度大于 0.1  $\mu\text{g}/\text{g}$  时, 精密度要小于 17%, 根据实验结果显示各生物胺回收率和精密度都达到了行业规定的规定。

表3 外标法测得 30  $\mu\text{g}/\text{g}$  样品添加的回收率及精密度Tab.3 Recovery and precision of sample added 30  $\mu\text{g}/\text{g}$  using external standard method

生物胺	空白样峰面积	添加样峰面积(除去空白样峰面积)			相应标准品峰面积	平均回收率 %	相对标准偏差 %
		1	2	3			
色胺	0	26635	26431	27012	27209	97.89	15.8
2-苯乙胺	0	30855	30754	30663	32692	94.38	7.7
腐胺	11741	94031	94123	93988	84636	111.10	6.3
尸胺	0	68688	68532	68712	68557	100.19	9.2
组胺	0	68364	68234	68412	66599	102.65	9.5
章鱼胺	3498	43580	43490	43612	53302	81.76	6.4
5-羟色胺	2535	38358	38412	38289	44104	86.97	4.2
酪胺	12713	57364	57431	57213	55655	103.07	2.6
亚精胺	13941	75442	75321	76098	80394	93.84	8.6
精胺	0	69903	70099	69321	82813	84.41	8.2

## 3 结论

用高氯酸提取生物胺, 实验显示其回收率(待测物浓度 > 0.01  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) 都达到并超过 70%, 且相对标准偏差(RSD)为 2.6% ~ 15.8%, 符合行业标准(SN/T 0001-1995)的规定, 重现性高, 精密度好。丹酰

氯作为衍生剂,衍生产物稳定。使用线性梯度洗脱能在较短时间内同时分离十种结构各异的生物胺。根据信噪比  $S/N=3$  确定最低检测限:腐胺、亚精胺  $0.8 \mu\text{g/g}$ ,尸胺、组胺、酪胺、精胺  $1 \mu\text{g/g}$ ,章鱼胺、5-羟色胺  $2 \mu\text{g/g}$ ,2-苯乙胺  $3 \mu\text{g/g}$ ,色胺  $5 \mu\text{g/g}$ 。由此可见,本方法简单、实用、可靠。可以用来检测各种水产品中的生物胺含量,及早发现问题,保证人们安全食用各类水产品。

#### 参考文献:

- [1] Eerola H S, Sagues A. Biogenic amines in Finish dry sausages[J]. *Journal of Food Safety*, 1998(18):127-138.
- [2] Nadon C A, Ismond M A, Holley R. Biogenic amines in vacuum-packaged and carbon dioxide controlled atmosphere packaged fresh pork stored at  $-1 \text{ }^\circ\text{C}$  [J]. *Food Protection*, 64(2):220-227.
- [3] 李志军. 生物胺与食品安全[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 7:84-91.
- [4] Julia Y H, Steve L T. High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods[J]. *Analysis Chemistry*. 1983, 66(4):P,853-P857.
- [5] Hwang D F, Chang S H, Shiu C Y, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning[J]. *Journal of Chromatography B*, 1997, 693:23-30.
- [6] Rosa M L, Juan H A, Ana M A, *et al.* Rapid microwave-assisted dansylation of biogenic amines: Analysis by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 808:87-93.

#### 新书介绍

### 《世界金枪鱼渔业渔获物物种原色图鉴》

由戴小杰、许柳雄等主编、海洋出版社出版的《世界金枪鱼渔业渔获物物种原色图鉴》一书,是在上海市重点学科建设项目和中国渔业协会远洋渔业分会的支持下,根据作者多年海上从事金枪鱼渔业实践期间拍摄的鱼类照片,并参照联合国粮农组织的鱼类学资料和其他资料编著的。本书收录了鱼类 124 种,其中鲭科鱼类 59 种、剑鱼科鱼类 1 种、旗鱼科鱼类 11 种,软骨鱼类 35 种、其他鱼类 28 种。这些鱼类主要分布在 300 米以内的大洋上层海域,是金枪鱼渔业的主要捕捞对象和兼捕品种。介绍的每一种鱼类包括其名称、外形特征、习性、分布和渔业状况,并配以彩图。同时,为适应金枪鱼生产和水产品贸易的需求,分别列出了学名、异名、日文名、英文名、法文名和西班牙文名,以便读者查阅。该图鉴可为从事金枪鱼生产、贸易和市场营销人员,科研人员、游钓爱好者提供有关金枪鱼和类金枪鱼的基础知识。

全书共 266 页,进口铜版纸彩色印刷,精装本,定价为 80 元,另加书价的 15% 为挂号邮资费。需要者可直接汇款到《水产学报》编辑部,地址:上海市军工路 334 号 48 信箱,邮编:200090。