

文章编号:1673-1689(2007)03-0014-06

反相高效液相色谱-柱后衍生法 分析检测鱿鱼中的生物胺

赵庆喜, 薛长湖, 徐杰, 盛文静, 薛勇, 李兆杰

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要:建立了水产品中多组分生物胺的反相高效液相色谱-柱后衍生-荧光检测方法。采用荧光试剂邻苯二甲醛(OPA)为柱后衍生试剂,在 Capcell Pak MG-C18 色谱柱上,通过梯度洗脱使酪胺、腐胺、尸胺、组胺、胍丁胺、精胺和亚精胺等 7 种生物胺得到良好分离,在给定的浓度范围内,各组分生物胺呈现良好线性相关($R^2 > 0.999$)。在水产品中添加生物胺混合标准溶液,平均回收率为 88.3%~110.1%,相对标准偏差 RSD 小于 10%。结合水产品的感官鉴定、pH 值和 TVBN 值测定等方法检测水产食品的新鲜程度,分析了鱿鱼在不同保藏温度、保藏时间下的生物胺种类及含量的变化。其中胍丁胺和尸胺在鱿鱼的保藏过程中发生最显著变化,可以作为其质量变化的参考指标。

关键词: 高效液相色谱;柱后衍生;生物胺;鱿鱼

中图分类号: TS 254

文献标识码: A

Determination of Biogenic Amines in Squid by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography and Post-Column Derivatization

ZHAO Qing-xi, XUE Chang-hu, XU Jie, SHENG Wen-jing,
XUE Yong, LI Zhao-jie

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A post-column derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography method was developed to the determination of biogenic amines in aquatic products with fluorescence detector (FLD). Seven biogenic amines (tyramine, putrescine, cadaverine, histamine, agmatine, spermidine and spermine) were separated well. The method was linear for the amines studied at given concentrations ($R^2 > 0.999$). The average recoveries ranged from 88.3% to 110.1% for all amines samples. The RSDs were less than 10%. Sensory analysis, pH value and TVBN value were combined to detect the freshness of aquatic products. With this method, agmatine and cadaverine in squid were the most obviously changing biogenic amines during the storage at different temperatures, and these biogenic amines could be the potential index for the freshness of these raw aquatic materials. In conclusion, the method could be applied

收稿日期:2006-08-22.

基金项目:国家 863 计划项目(2005AA625010).

作者简介:赵庆喜(1981-),男,山东新泰人,水产品加工与贮藏工程专业硕士研究生.

通讯作者:薛长湖(1964-),男,江苏兴化人,教授,博导,主要从事水产品加工与贮藏研究. Email: xuech@ouc.edu.cn

for determination of biogenic amines in aquatic products.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); post-column derivatization; biogenic amine; squid

生物胺是一类含氮的脂肪族或杂环类低分子化合物,对动植物和微生物活性细胞有重要的生理作用。适量的生物胺有助于人体正常的生理功能,过量则会引起不良的生理反应。食品中毒的发作和某些毒理学特性与组胺和酪胺有密切联系^[1]。除了组胺、酪胺本身的作用外,其它生物胺的存在会增强组胺和酪胺的不良作用。欧美及我国已经对部分食品中的组胺的含量做了限量的要求,因此,对生物胺进行研究可以提高和改善食品的质量及安全性^[2]。

各种动植物的组织中都含有少量的生物胺,多种食品和含酒精的发酵饮料中也普遍存在,如干酪、肉制品、水产品、酒类等^[3]。研究表明,生物胺往往是在食品腐烂或发酵过程中产生。生物胺在生物体内最重要的生物合成途径是氨基酸的脱羧反应,也有部分生物胺是通过醛的胺化作用形成的。鲑鱼、鲱鱼、沙丁鱼、金枪鱼等海洋鱼类体内含有多种生物胺,如组胺、腐胺、尸胺、酪胺、胍丁胺、精胺和亚精胺等,而发酵的水产制品中生物胺的含量更高^[4]。有研究指出,组胺虽常被用来作为判断金枪鱼腐败程度的指标,通过观察分析金枪鱼在不断腐败过程中腐胺、尸胺、组胺的形成和精胺、亚精胺的损失,都可以作为金枪鱼的质量指标^[5]。

鱿鱼作为重要的经济水产品,其加工利用日趋广泛^[6]。有研究表明鱿鱼肌肉部分在贮藏过程中的感官变化、化学及微生物学变化可以作为鱿鱼质量变化的评价指标^[7]。鱿鱼中含有大量的精氨酸(Arginine),在微生物和酶的作用下脱去羧基而生成胍丁胺,因此探究鱿鱼在不同保藏条件下的生物胺变化可以作为评价其鲜度质量的良好指标^[8]。

目前已经有多种方法应用于食品中的生物胺的测定,如离子色谱法(IC)^[9]、高效液相色谱法(HPLC)^[10]、毛细管电泳法(CE)^[11]、薄层色谱法(TLC)^[12]等,其中以高效液相色谱荧光法最为常用。由于生物胺分子中缺乏发色基团,为了提高检测的灵敏度,需要采用柱前或柱后衍生技术^[13-14]。作者综合比较各种方法,采用高效液相色谱-柱后衍生-荧光检测法分析和测定了鱿鱼中的生物胺组分,基本满足了鱿鱼中不同种类生物胺检测的需要。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂

生物胺标准品 酪胺、尸胺、组胺、精胺:购于日本 Nacalai tesque 公司;亚精胺、胍丁胺、腐胺:购于 Sigma 公司;内标:1,6-二氨基己烷,购于 Fluka 公司;辛烷磺酸钠:购于 DIMA 公司;2-巯基乙醇、邻苯二甲醛(OPA):购于 Fluka 公司;表面活性剂 Brij 35:购于 Sigma 公司;甲醇、乙腈:色谱纯,购于美国 Burdick&Jackson 公司;超纯水:Milli-Q 超纯水系统生产。

1.2 试剂配制

1.2.1 标准品及内标储备溶液 分别准确称取酪胺(Tyramine,简称 Tyr),组胺(Histamine,简称 His),尸胺(Cadaverine,简称 Cad),精胺(Spermine,简称 Spe),亚精胺(Spermidine,简称 Spd),腐胺(Putrescine,简称 Put),胍丁胺(Agmatine,简称 Agm),共7种生物胺标准品及内标(1,6-二氨基己烷,简称 IS)各25 mg,溶于25 mL 0.1 mol/L的HCl中,得到1 000 mg/L的储备液。所有溶液保存于4℃冰箱中,避光放置。

1.2.2 混合标准溶液 分别吸取各生物胺标准储备溶液,用0.1 mol/L HCl溶液稀释,得到不同浓度的使用液,保存于4℃冰箱中,避光放置。所有溶液使用前均用0.45 μm的微孔滤膜过滤。

1.2.3 流动相配制

1) 流动相 A 分别准确称取配制成0.1 mol/L NaAc和10 mmol/L的辛烷磺酸钠,用冰乙酸调pH值为5.3。

2) 流动相 B 分别准确称取配制0.2 mol/L NaAc和10 mmol/L的辛烷磺酸钠,用冰乙酸调pH值至4.5,按体积比6:4加入乙腈。两种流动相在使用前均用0.45 μm的微孔滤膜过滤除去杂质,再用超声波脱气15 min。

1.2.4 衍生剂配制 准确称取15.5 g硼酸、13.0 g KOH溶于500 mL超纯水中,加入1.5 mL质量分数30%的Brij 35和1.5 mL的2-巯基乙醇溶液;将0.1 g OPA溶于2.5 mL的甲醇中,最后加入上述溶液。衍生剂在使用前使用0.45 μm的微孔滤膜过滤除去杂质,再用超声波脱气。整个配制过程

要求避光,试剂当天配制,避光保存^[15]。

1.3 仪器

高效液相色谱仪:Agilent 1100,Agilent 公司产品,配备四元梯度泵,在线真空脱气机,100位自动进样器,荧光检测器,柱后衍生系统:Pickering PCX5200。

1.4 高效液相色谱及柱后衍生条件

液相色谱柱:Capcell Pak MG-C18柱(150 mm × 4.6 mm × 5 μm),日本资生堂产品。流动相体积流量:1.0 mL/min;进样量:20 μL;荧光检测器条件:激发波长 λ_{EX} = 330 nm,发射波长 λ_{EM} = 465 nm;衍生剂流速:0.3 mL/min;柱温:40 °C;衍生反应池温度:45 °C。

梯度洗脱及流动相比比例条件如下表:

表1 梯度洗脱及流动相比比例

Tab.1 Gradient elution program for biogenic amines analysis

时间/min	流动相	
	A/mL	B/mL
0	80	20
40	50	50
42	40	60
46	20	80
50	40	60
55	80	20

1.5 实验材料

鲜活鱿鱼,购于青岛市南山水产品市场。

1.6 实验方法

1.6.1 pH的测定 取少量鱿鱼肌肉,放入搅拌机

中搅拌切碎,然后分别准确称取3.0 g放入离心管中,加入15 mL蒸馏水,于10 000 r/min匀浆机中匀浆30 s后测定。

1.6.2 TVBN值的测定 采用微量扩散法,按照GB/T5009.44方法测定。

1.6.3 感官评价分析 鱿鱼感官评价的指标主要为色泽、色素斑点、黏液亮度、肌肉柔软度、有无异味等。将鱿鱼的质量分为3个等级:可接受级(记为1,无异味,色泽鲜亮,肉质坚实);初期腐败级(记为2,有轻微腐败气味,肉质开始软化,肉表面有黏液);腐败级(记为3,明显异味,肉质明显变软,黏液浑浊)。

1.6.4 样品处理 准确称量样品3.0 g,加入15 mL冰高氯酸溶液及一定量的内标,10 000 r/min高速匀浆30 s,4 °C,10 000 r/min离心10 min,取出上清液,再加入10 mL冰高氯酸溶液淋洗,合并淋洗液,定容至25 mL。0.45 μm的微孔滤膜过滤后待衍生分析。整个过程避光操作。

2 结果与讨论

2.1 各种生物胺保留时间的确定

如图1所示,利用HPLC柱后衍生反应,7种生物胺标准品(5 mg/L)在较短时间内实现较好分离。为有效的避免了样品基质中氨基酸的干扰,7种生物胺在20 min以后被梯度洗脱检测。为了精确定量,所选用的内标1,6-二氨基己烷在色谱图中分离位置合理,可以满足定量要求。

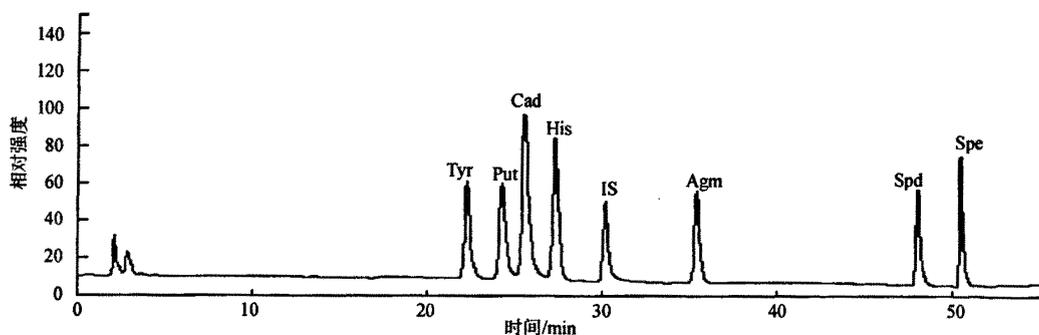


图1 生物胺标准品检测图(5 mg/L)

Fig.1 Chromatogram of biogenic amines standard solution by HPLC-FLD (5 mg/L)

2.2 线性实验

分别从生物胺混合标准溶液中准确量取一定量的标准品,配制成0.005,0.01,0.1,0.5,2.5,10,15,20,25,30,50 mg/L等一系列质量浓度的使用液,采用上述方法衍生,每个质量浓度重复测定3

次。采用内标法以各生物胺平均峰面积与内标峰面积之比(y)对其相应质量浓度(x)进行线性回归计算,得到线性回归方程,进行线性范围的确定。按照不同质量浓度的使用液的信噪比确定每种生物胺的检测限(S/N=3)和定量限(S/N=10)。线

性实验结果如下表 2 所示:

表 2 线性实验结果

Tab. 2 Correlation coefficients, linearity range and LODs

生物胺	线性相关系数 (R^2)	线性范围/(mg/L)	检测限 (S/N=3)/($\mu\text{g/L}$)	定量限 (S/N=10)/($\mu\text{g/L}$)
Tyr	0.9999	0.01~30.0	2.00	6.50
Put	0.9999	0.01~30.0	0.45	1.50
Cad	0.9998	0.01~30.0	0.20	0.65
His	0.9999	0.01~30.0	0.75	2.50
Agm	0.9999	0.01~30.0	0.50	1.65
Spd	0.9998	0.01~25.0	0.65	2.10
Spe	0.9998	0.01~25.0	0.80	2.80

结果表明,通过加入内标,校正各种生物胺的相应面积后,除 Spd 和 Spe(0.01~25 mg/L)外,另外 5 种生物胺标准品在 0.01~30 mg/L 的质量浓

表 3 鱿鱼回收率实验结果

Tab. 3 Analytical recovery of FLD($x \pm s$)

生物胺	样品基质 质量浓度/(mg/L)	标准液质量浓度/(mL/L)			平均回收率 ($n=18$)	RSD ($n=18$)
		0.5	2.0	10.0		
Tyr	0.05 \pm 0.01	2.58 \pm 0.10	11.20 \pm 0.25	51.90 \pm 0.50	105.3	5.5
Put	0.13 \pm 0.02	1.28 \pm 0.15	6.94 \pm 0.40	32.20 \pm 0.32	88.3	6.1
Cad	0.63 \pm 0.01	1.02 \pm 0.24	5.35 \pm 0.61	32.3 \pm 0.42	89.5	8.3
His	0.15 \pm 0.03	3.38 \pm 0.12	11.80 \pm 0.35	56.50 \pm 0.20	110.1	7.5
Agm	0.05 \pm 0.05	2.45 \pm 0.10	10.57 \pm 0.21	50.40 \pm 0.25	99.2	5.3
Spd	0.81 \pm 0.04	2.70 \pm 0.18	10.50 \pm 0.43	43.70 \pm 0.14	89.8	6.8
Spe	5.75 \pm 0.06	8.79 \pm 0.15	15.50 \pm 0.22	47.90 \pm 0.38	98.6	8.2

7 种生物胺在不同的 3 个加标水平($n=6$)上,鱿鱼的平均回收率达到 88.3%~110.1%,RSD 在 5.3%~8.3%。表明该方法可以满足鱿鱼的检测要求。

2.5 样品测定

结合感官分析、pH 值和 TVBN 测定,确定样

品范围内具有良好的线性关系。各种生物胺的线性相关系数均达到 0.999 以上。

2.3 精密度实验

取 10 mg/L 的生物胺标准品混合溶液,连续进样 6 次,利用内标校正,分别得到 7 种生物胺的 RSD<2.0%,其中 RSD(Tyr)=0.774%,RSD(Put)=0.381% RSD(Cad)=0.686%,RSD(His)=1.96%,RSD(Agm)=1.54%,RSD(Spd)=1.55%,RSD(Spe)=1.72%。表明仪器精密度良好,方法精密度符合实验要求。

2.4 样品回收实验

向 3 种样品中添加不同质量浓度(0.5,20,10 mg/L)的生物胺混合标准液及一定量内标,按测定方法要求进行回收试验,基质及各加标水平样品平行测定 6 份,计算 3 个加标水平的平均回收率和相对标准差,分析不同添加条件下的回收率变化,结果见表 3。

品在不同贮藏条件下分析的时间,以此分析不同贮藏时间的鱿鱼样品在不同温度条件下的生物胺种类和含量的变化。

图 2 为鱿鱼肌肉部分(第 8 天)的检测图,根据保留时间确定各个峰对应的生物胺种类。

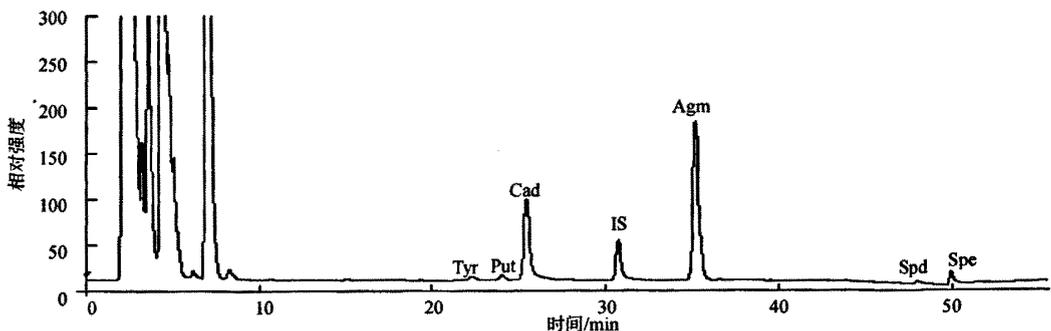


图 2 鱿鱼生物胺检测图(第 8 天)

Fig. 2 Chromatogram of biogenic amines of squid by HPLC-FLD(8 days)

根据鱿鱼感观评价的指标,在0℃保藏条件下,鱿鱼感观可以接受的时间为7~8d;4℃保藏时为5~6d。到第6天,无论是0℃还是4℃,鱿鱼质量均已明显劣变(表4)。鱿鱼的TVBN值在检测期间逐渐升高,在0℃和4℃两种条件下差别明显。以30mg/hg为限量,0℃条件下7~8d质量劣变,而在4℃条件下为5~6d,与感观分析有较好的一致性。鱿鱼肌肉部分的pH值在检测时间内始终保持升高的趋势。在0℃和4℃两种条件下差别明显。同一时间的4℃保藏条件下,鱿鱼的pH值比0℃高。腐败后的鱿鱼pH值达到7.0以上。因此pH值变化可以作为鱿鱼质量变化的参考指标。

表4 不同贮藏条件下鱿鱼pH, TVBN和感官鉴定结果

Tab.4 Changes of pH, TVBN and sensory rating of squid during storage at 0℃ and 4℃

贮藏 时间/d	0℃			4℃		
	TVBN ^a	pH	感官等级 ^b	TVBN ^a	pH	感官等级 ^b
0	6.25	6.66	1	6.25	6.66	1
2	8.45	6.64	1	8.91	6.74	1
4	18.8	6.71	1	22.80	6.78	1
6	25.7	6.75	1	39.22	6.94	2
8	37.6	6.91	2	53.02	7.12	3

a. TVBN—mg/100g, b1—可接受级;2—初期腐败级;3—腐败级。

两种贮藏条件下,生物胺的含量变化如图3和图4所示,Agm和Cad是两种变化最明显的胺类。实验开始时鱿鱼肌肉部分生物胺值较低。在0℃条件下,Agm的含量从第5天开始增长迅速,直至第8天达到100mg/kg;Cad的含量在6~8d变化较为明显。其他几种胺含量相对较低,在整个贮藏过程中无明显变化。相比之下,在4℃条件下肌肉部分变质相对较快,Agm的含量在第4天就开始显著增加,比0℃条件提前一天,并在第8天达到接近200mg/kg。在此条件下Cad、Put和Tyr也从第4天开始显著增加,其含量远大于0℃条件下的测定值。结合感观分析,鱿鱼肌肉中生物胺的变化和TVBN值变化有较好的相关一致性,Agm和Cad

的含量变化可以作为鱿鱼贮藏变化的鲜度指标,同时肌肉部分的pH值变化可以作为鱿鱼质量变化的辅助参考指标。

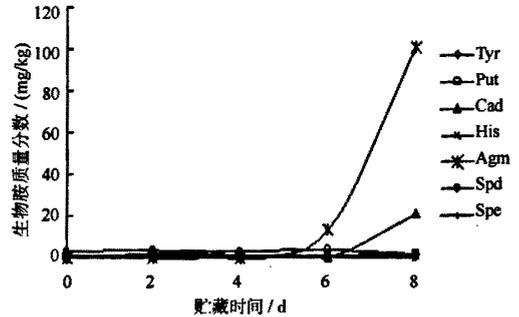


图3 鱿鱼0℃生物胺变化

Fig.3 Changes of biogenic amines of squid at 0℃

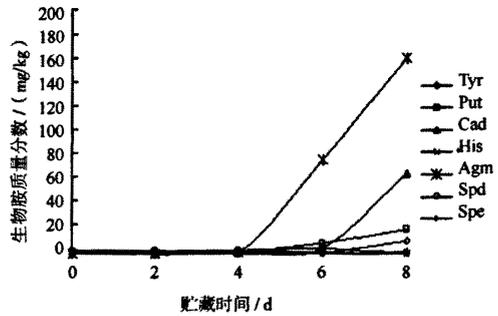


图4 鱿鱼4℃生物胺变化

Fig.4 Changes of biogenic amines of squid at 4℃

3 结论

作者建立了水产品中多组分生物胺的反相高效液相色谱-柱后衍生荧光检测的测定方法。在较短时间内,酪胺、腐胺、尸胺、组胺、胍丁胺、精胺和亚精胺等7种水产品相关的生物胺得到良好分离。选取鱿鱼测定各种生物胺在不同保藏过程中的含量变化。样品经过简单前处理后,采用反相高效液相色谱-柱后衍生荧光法检测,结果胍丁胺Agm和尸胺Cad的含量在两种温度条件下发生显著的变化,可以作为鱿鱼鲜度变化的参考指标。该方法还可以应用于其他水产品中多组分生物胺检测。

参考文献(References):

- [1] Bodmer S, Imark C, Kneubühl M. Biogenic amines in foods; Histamine and food processing[J]. *Inflammation Research*, 1999, 48(2): 296-300.
- [2] 李志军, 吴永宁, 薛长湖. 生物胺与食品安全[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(10): 84-91.
LI Zhi-jun, WU Yong-nin, XUE Chang-hu. Effect of biogenic amines of food safety and human health[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2004, 30(10): 84-91. (in Chinese)

- [3] Silla Santos M H. Biogenic amines; their importance in foods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29: 213-231.
- [4] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. *Food Research International*, 1996, 29(7): 675-690.
- [5] Vincia G, Antonelli M L. Biogenic amines; quality index of freshness in red and white meat[J]. *Food Control*, 2002, (13): 519-524.
- [6] 章军锋. 加强鱿鱼资源的综合利用技术研究[J]. *肉类工业*, 2001, 5: 34-36.
ZHANG Jun-feng. Research on processing and comprehensive utilization of squid resource[J]. *Meat Industry*, 2001, 5: 34-36. (in Chinese)
- [7] Judite Lapa-Guimara'es, Pedro Eduardo de Fe'cio, Em'lio Segundo Contreras Guzmán. Chemical and microbial analyses of squid muscle (*Loligo plei*) during storage in ice[J]. *Food Chem*, 2005, 91: 477-483.
- [8] Yamanaka H, Shiomi K, Kikuchi T. Agmatine as a potential index for freshness of common squid[J]. *J Food Sci*, 1987, 52(4): 936-938.
- [9] Jean D C, Caterina C, Fabiano T, et al. Production of biogenic amines in "salami italiani alla cacciatore"[J]. *Meat Sci*, 2004, 67: 343.
- [10] Tamim N M, Bennett LW, Shellem TA, et al. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in poultry carcasses [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 5012-5015.
- [11] Lin W C, Lin C E, Lin E C. Capillary zone electrophoretic separation of biogenic amines; influence of organic modifier[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 55: 142-146.
- [12] Shalaby A R. Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods[J]. *Food Chem*, 1995, 52: 367-372.
- [13] Laurence Coppex, Diploma Thesis; Derivatives for HPLC Analysis[D]. Genf: Faculty of Chemistry and Pharmacy University of Genf, 1999.
- [14] Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods; An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics[J]. *J Chromatogr A*, 1996, 729: 363-369.
- [15] M Carmen Vidal-Carou, Fedra Lahoz-Portole s, Sara Bover-Cid, et al. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages[J]. *J Chromatogr A*, 2003, 998: 235-241.

(责任编辑:朱明)