

高效液相色谱 – 紫外检测法测定水产品中组胺的含量

邢丽红, 冷凯良, 孙伟红, 李兆新, 苗钧魁, 翟毓秀* (中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

摘要 [目的]建立1种测定水产品中组胺含量的高效液相色谱 – 紫外检测法。[方法]用高氯酸提取水产品中的组胺, 丹磺酰氯衍生后, 用配有紫外检测器的高效液相色谱仪进行测定, 外标法定量。[结果]组胺在 0.5~20.0 μg/ml 范围内线性关系良好, 相关系数 $r>0.999$ 。空白样品中组胺添加浓度在 50~1 000 mg/kg 时, 平均回收率在 81.0%~94.8%, 批次内和批次间相对标准偏差均 $<10\%$ 。组胺的检出限为 25 mg/kg, 定量限为 50 mg/kg。[结论]该方法操作简便, 能够满足水产品中组胺含量的测定要求。

关键词 水产品; 组胺; 高效液相色谱; 紫外检测

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 0517- 6611(2011) 13- 07832- 02

Determination of Histamine in Fishery Products by HPLC-UV Method
XING Li-hong et al (Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071)
Abstract [Objective] The aim was to construct a method for the determination of histamine in fishery products by HPLC-UV. [Method] Histamine in the test sample was extracted with perchloric acid, and then derived by dansyl chloride, and nextly determined by high performance liquid chromatograph with UV detector, at last quantified by an external standard mode. [Result] The histamine showed a good linear relationship with in the range of 0.5–20 μg/ml with the correlation coefficient $r>0.999$. The average recoveries ranged from 81.0% to 94.8% and the relative standard deviation was all below 10% when the addition concentration of histamine in the blank sample was within 50–1 000 mg/kg. The detection limit of histamine was 25 mg/kg and the limit of quantification was 50 mg/kg. [Conclusion] The sample was easy to operate, which could satisfy the requirements of the determination of histamine in fishery products.
Key words Fishery products; Histamine; HPLC; UV detection

组胺是一种生理活性物质, 是组胺酸在莫根氏变形杆菌、组胺无色杆菌等细菌存在和组氨酸脱羧酶的作用下, 脱去羧基后形成的一种胺类物质, 是生物胺中对人体健康影响最大的物质^[1], 可引起过敏性食物中毒。水产品尤其是一些青皮红肉鱼中, 其产品腐败或放置时间较长更易产生组胺, 当人食用时会发生中毒现象^[2]。因此, 组胺的卫生学毒性问题已受到广泛重视。在出口贸易中, 许多外商对水产品中的组胺含量提出了严格要求, 澳大利亚和欧盟规定水产品及其制品中组胺限量标准不得高于 100 mg/kg。美国 FDA 规定进出口水产品中组胺含量不得高于 50 mg/kg^[3], 我国规定鲑鱼中组胺含量 ≤ 100 mg/100 g, 其他红肉鱼类中组胺含量 ≤ 30 mg/100 g^[4]。

目前的检测方法主要有分光光度法^[5-7]、液相色谱柱前衍生 – 紫外检测法^[8-13]、液相色谱柱前衍生 – 荧光检测法^[3, 14-15]、液相色谱 – 柱后衍生荧光法^[16-17]。现有的国标方法(分光光度法)存在较大缺陷, 柱后衍生需要专门的装置, 其应用受到限制。笔者建立了一种水产品中组胺含量的柱前衍生紫外检测法, 该方法操作简便、准确, 能够满足水产品中组胺含量的检测要求。

1 材料与方法

1.1 试剂 乙腈, 甲醇, 丙酮均为色谱纯; 高氯酸, NaHCO_3 , 氨水均为分析纯; 丹磺酰氯, 纯度 $\geq 99\%$ 。组胺标准物质, 纯度 $>99\%$ (sigma 公司)。

1.2 仪器及设备 Agilent 1100 液相色谱仪; 配紫外检测器 (Agilent 公司); 超声波清洗仪 (昆山市超声波仪器有限公司); 涡旋混合器 (美国 TaBoys 公司); 高速离心机 (日立)

1.3 方法

1.3.1 样品提取。称取 5 g 试样, 置于 50 ml 离心管中, 加入 10 ml 0.4 mol/L 高氯酸溶液, 超声提取 20 min, 6 000 r/min 离心 5 min, 上清液移入 25 ml 棕色容量瓶中。沉淀物用 10 ml 0.4 mol/L 高氯酸溶液重复提取 1 次, 6 000 r/min 离心 5 min, 合并上清液于上述容量瓶中, 用 0.4 mol/L 高氯酸溶液定容至刻度。

1.3.2 衍生化。

1.3.2.1 样品衍生。移取上述提取液 100 μl 于 5 ml 玻璃离心管中, 依次加入饱和 NaHCO_3 溶液 200 μl, 10 mg/ml 丹磺酰氯溶液 400 μl, 盖塞涡旋混合均匀, 于室温下避光反应 60 min, 反应完毕后, 加入 20% 氨水 – 乙腈溶液 100 μl, 静置 30 min, 用乙腈定容至 1.0 ml, 涡旋混合均匀, 过 0.45 μm 滤膜, 进行高效液相色谱分析。

1.3.2.2 标准工作溶液衍生。取适量标准储备液, 分别配制成浓度为 5, 10, 20, 50, 100, 200 μg/ml 标准工作溶液, 取 100 μl 于 5 ml 玻璃离心管中, 衍生化反应同上。

1.3.3 色谱条件。色谱柱: Agilent SB C₁₈ 反相色谱柱, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 流动相: 乙腈: 0.1 mol/L 乙酸铵 = 80: 20 (V/V); 流速: 1 ml/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μl; 紫外检测器: 波长 254 nm。

2 结果与分析

2.1 标准曲线和检出限 在该试验建立的色谱条件下, 以组胺色谱峰面积 (Y) 为纵坐标, 以相应的浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 组胺标准工作液在 0.5~20.0 μg/ml 浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好的线性关系, 其线性回归方程为: $Y=25\,707.8X-0\,987.7$, $r=0.999\,96$ 。组胺标准溶液色谱图见图 1。

测定检出限是采用添加法进行实测情况确定的。在空白样品中添加水平为 25 mg/kg 时, 信噪比 (S/N) ≥ 3 , 由此可以确定该方法组胺的检出限为 25 mg/kg, 添加水平为 50

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (2009-CB-02); 公益性行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07-046); 国家鲜果类产业技术体系项目 (nycytx-50-G09)。

作者简介 邢丽红 (1981-), 女, 山东青岛人, 助理研究员, 硕士, 从事水产品质量安全检测及研究。* 通讯作者。

收稿日期 2011-02-14

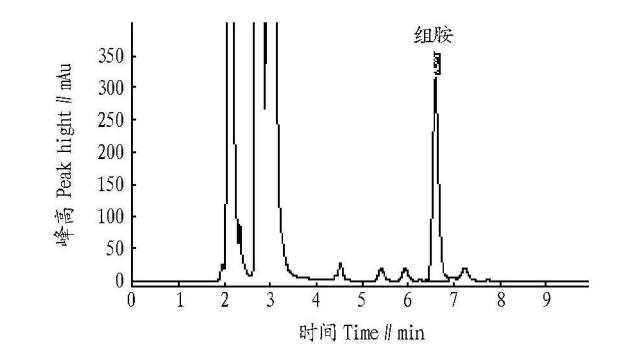


图 1 组胺标准溶液色谱图

Fig 1 Chromatogram of histamine standard solution
mg/kg时,其信噪比 > 10 因此该方法的定量限为 50 mg/kg (图 2)。空白样品色谱图见图 3。

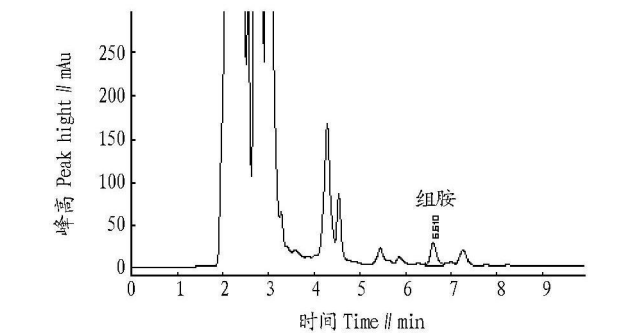


图 2 空白样品中添加 50 mg/kg组胺的色谱图

Fig 3 Chromatogram of the blank sample with 50 mg/kg histamine

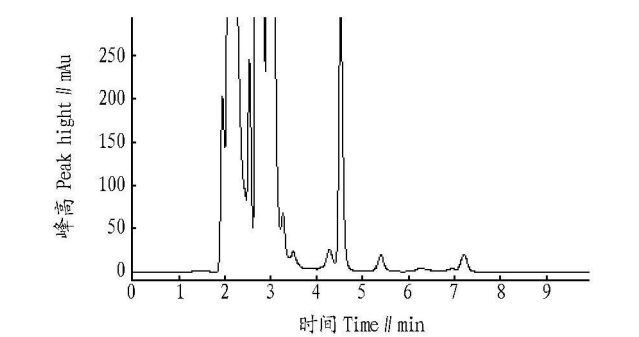


图 3 空白样品色谱图

Fig 3 Chromatogram of blank sample

2.2 准确度和精密度 分别以鲭鱼、南美白对虾、鲤鱼、鲑鱼、菲律宾蛤仔样品为测试对象,在空白样品中添加组胺标准溶液,制成添加浓度分别为 50、250和 1 000 mg/kg的加标样品,按照 1.3方法对样品进行处理并测定其含量,并计算平均回收率。同一加标水平平行测定 6份样品,计算组胺含量的 RSD (表 1)。

2.3 样品提取方法的选择 组胺常用的提取溶剂有三氯乙酸^[3-6,7,18]、高氯酸^[10-17]和盐酸溶液^[19]等。该研究对提取溶剂进行了选择,先后比较了盐酸水溶液、高氯酸、三氯乙酸作为提取溶剂的效果。采用盐酸提取,沉淀蛋白的效果较差,提取液比较浑浊,杂质干扰多;三氯乙酸和高氯酸均有沉淀蛋白的作用,试验证实使用高氯酸提取,杂质干扰少,回收率高,峰形尖锐,因此该试验采用高氯酸溶液作为提取溶剂,提取方式采用超声提取,取代传统的匀浆均质的方法,减少了

前处理过程中目标物的损失,提高了回收率。

表 1 组胺回收率和精密度

Table 1 Recoveries and precisions of histamine					
样品名称 Sample name	添加浓度 mg/kg Added level	批次 Batch	平均回收率 % Average recoveries	批次内相对标准偏差 /% RSD within the batch	批次间相对标准偏差 /% RSD among the batches
鲭鱼 Spanish mackerel	50	1	88.0	8.4	8.3
		2	89.3	9.9	
		3	87.3	7.8	
	250	1	92.1	7.9	7.2
		2	92.6	6.8	
		3	89.7	7.8	
	1 000	1	90.9	3.1	4.3
		2	92.0	4.2	
		3	94.1	5.2	
南美白对虾 <i>Penaeus vannamei</i> Boone	50	1	83.0	8.3	8.2
		2	85.3	8.8	
		3	85.2	8.7	
	250	1	89.2	6.4	6.1
		2	88.2	7.5	
		3	89.2	5.3	
	1 000	1	90.8	3.8	3.8
		2	91.3	3.4	
		3	90.0	4.8	
鲤鱼 Carp	50	1	89.8	8.8	8.4
		2	87.5	9.0	
		3	87.2	8.8	
	250	1	91.6	6.8	6.6
		2	89.1	6.2	
		3	87.2	6.9	
	1 000	1	94.4	4.0	4.8
		2	89.8	5.1	
		3	93.3	4.7	
鱿鱼 Squid	50	1	81.8	8.8	7.5
		2	81.0	9.1	
		3	82.0	7.5	
	250	1	81.7	7.8	7.0
		2	86.8	5.8	
		3	85.0	7.2	
	1 000	1	85.9	5.6	6.2
		2	84.3	6.8	
		3	82.3	6.6	
菲律宾蛤仔 <i>Ruditapes philippinarum</i>	50	1	86.7	9.0	8.0
		2	86.2	7.9	
		3	86.3	8.7	
	250	1	90.7	7.2	5.9
		2	88.7	5.5	
		3	88.4	5.6	
	1 000	1	93.3	5.3	5.2
		2	94.8	4.8	
		3	93.9	6.4	

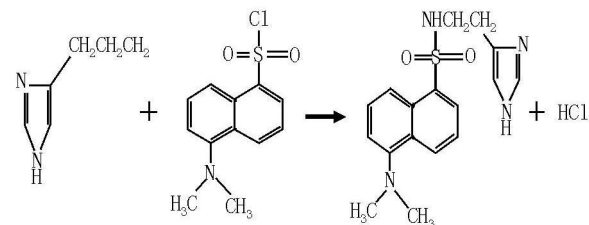
2.4 色谱条件的选择 水产品肌肉组织中的氨基酸类物质是柱前衍生法测定组胺的最大干扰,流动相的 pH 和离子强度均会影响目标峰与干扰峰的分离。由于衍生化反应后溶液的 pH 呈碱性,需采用具有一定缓冲能力的溶液作为流动相。参照文献[3,9-10],分别比较了不同比例的乙酸铵/乙腈溶液,最终确定流动相为乙腈:0.1 mol/L 乙酸铵溶液 = 80:20(V/V)。

通过对 Agilent SB C₁₈柱和 Agilent XDB C₁₈色谱分离柱的效果进行评估,发现 2款柱子均可实现基质和分析物的分离,但 Agilent XDB C₁₈柱的峰形较宽,而 Agilent SB C₁₈柱的峰形尖锐,分离度较好,Agilent SB C₁₈柱比 Agilent XDB C₁₈柱的效果要好一些,因此该研究采用 Agilent SB C₁₈柱作为分离柱。

柱温是一个重要的色谱操作参数,它直接影响分离效能

和分析速度。柱温不能高于固定液的最高使用温度,否则会造成固定液大量挥发流失。该研究对柱温的影响进行了考察,确定最佳柱温为 35℃。

2.5 衍生化条件的选择 组胺既没有荧光发色基团也没有紫外发色基团,但是丹磺酰氯可以同伯胺或仲胺基上的活泼氢反应^[15 20],脱掉一分子的 HCl 生成具有荧光和紫外光的衍生物,反应式如下:



在该反应过程中,衍生化试剂的浓度、缓冲溶液、衍生化温度和衍生化时间是衍生化反应的关键影响因素。

2.5.1 丹磺酰氯浓度的选择。该研究探讨了不同浓度的衍生化试剂对衍生化效果的影响,取一定量的组胺标准储备液,加入 200 μl 饱和 NaHCO₃,再分别加入 400 μl 浓度分别为 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 mg/ml 的丹磺酰氯,每个浓度点做 3 次重复,以 3 次测量的平均值计算,研究衍生化试剂的浓度对组胺衍生物生成量的影响,结果见图 4。

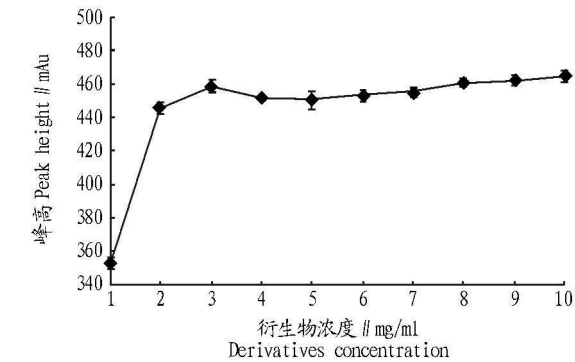


图 4 衍生剂浓度 - 峰高曲线

Fig 4 Concentration-peak height curve of dansyl derivative

由图 4 可知,随着衍生化试剂浓度的增加,组胺衍生物的生成量趋于稳定,继续增加丹磺酰氯的浓度,衍生化产物的生成量不再增加。为了保证衍生化反应的顺利进行,既要使衍生化试剂足量,又要减少不必要的浪费,该研究选用 10 mg/ml 作为丹磺酰氯的衍生化浓度。

2.5.2 衍生化温度和衍生化时间的选择。试验分别考察了衍生化温度和衍生化时间对衍生化产物生成量的影响,在常温、40℃ 60℃ 80℃ 条件下分别衍生 5 10 15 30 45 60 75 min,其衍生产物生成量见图 5。

由图 5 可知,在常温下或是在加热条件下,均能够发生衍生化反应。随着衍生化反应时间的增加,衍生化产物的生成量均随之增加,衍生化时间超过 45 min,生成量趋于稳定。随着衍生化温度的升高,衍生化产物也呈增加趋势,但当温度达到 80℃ 时,衍生化产物的生成量有下降趋势,这与 Zou 等报道相类似^[21]。经过反复试验验证,在既能保证衍生化效果和检出限、又节约能源的前提下,该试验选取常温下反应 60 min 作为衍生化温度和衍生化时间。

2.5.3 缓冲溶液的 pH 选择。组胺和衍生剂要在碱性条件

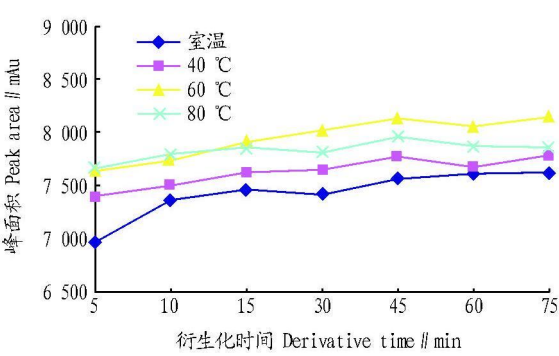


图 5 衍生化反应时间 - 温度曲线

Fig 5 Derivative reaction time-temperature curve

下才能发生衍生化反应,选择一个合适的 pH 缓冲液至关重要。该研究选取了饱和 NaHCO₃ 缓冲溶液体系、NaH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ pH 分别为 9.0 9.5 10 10.5 11.0 11.5 12.0 的缓冲溶液,结果发现采用饱和 NaHCO₃ 缓冲溶液衍生化产物生成量高于 NaH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ 缓冲溶液,且饱和 NaHCO₃ 配制也较简单,因此该试验采用饱和 NaHCO₃ 作为缓冲溶液。

3 结论

该研究建立了高氯酸提取、液相色谱紫外检测器对水产品中组胺含量进行测定的方法。该方法操作简便,能够满足水产品中组胺含量测定的分析要求。

参考文献

[1] 赵利,苏伟,刘建涛,等.水产品中生物胺的研究进展[J].水产学报,2006 30(2): 272-276

[2] 王丽玲,白艳玲.水产品中组胺测定方法的改进[J].中国卫生检验杂志,1997 7(1): 53-55

[3] 李志军,薛长湖,封锦芳,等.柱前衍生-RP-HPLC 方法测定水产品中生物胺[J].中国海洋大学学报,2007 37(3): 427-431

[4] 王正,刘军伟,张红,等. GB2733-2005 鲜、冻动物性水产品卫生标准[S].北京:中国标准出版社,2005

[5] 江苏省卫生防疫站,上海市食品卫生监督检验所,杭州市卫生防疫站. GB/T 5009 45-2003 水产品卫生标准的分析方法[S].北京:中国标准出版社,2003

[6] 郝宏兰.水产品中组胺的测定方法研究[J].食品科学,2000 21(8): 46-48

[7] 金宝安.水产品中组胺测定方法的改进[J].中国卫生检验杂志,2007 17(1): 149-150

[8] 国家标准化管理委员会. GB/T 20768-2006 鱼和虾中有毒生物胺的测定液相色谱——紫外检测法[S].北京:中国标准出版社,2006

[9] 丁卓平,刘辰麒,陈迪,等.高效液相色谱法同时测定水产品中 10 种生物胺的研究[J].分析测试学报,2006 25(4): 59-62

[10] 刘辰麒,王锡昌,丁卓平.水产品中生物胺的测定方法[J].上海水产大学学报,2007 16(4): 357-361

[11] ROMERO R, BAGUR M G, SANCHEZ-VIASMA, et al. Optimization of Experimental Variables in the Dansyl Chloride Derivatization of Biogenic Amines for their Determination by RP-HPLC[J]. Chromatographia, 2000 51(7): 404-410

[12] CASTILLO M A, CASTELLER C. Procedure for the Determination of Biogenic Amines by Derivatization with Dansyl Chloride and Reversed Phase Liquid Chromatography[J]. Chromatographia, 2001 54(11): 711-716

[13] BOCKHARDT A, KRAUSE J, KLOSTERMEYER H. Determination of Biogenic Amines by RP-HPLC of the Dansyl Derivates[J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1996 203 65-70

[14] 李佐卿,谢东华,王宇,等.高效液相色谱荧光检测器快速测定水产品中的组胺[J].光谱实验室,2000 17(5): 592-595

[15] 董伟峰,李亮臻,林维宜.丹磺酰氯作为生物胺柱前衍生化试剂衍生化条件的研究[J].大连轻工业学院学报,2005 24(2): 115-118

[16] BUSTO Q, MESTRES M, GUASCH J, et al. Determination of Biogenic Amines in Wine after Clean-Up by Solid-Phase Extraction[J]. Chromatographia, 1995 40(7): 404-410

[17] 黄新华,陈本美,梁绍先,等.高效液相色谱柱后衍生法测定豚鼠鼻粘膜中组胺[J].湖南医科大学学报,2000 25(3): 294-296

(下转第 7863 页)

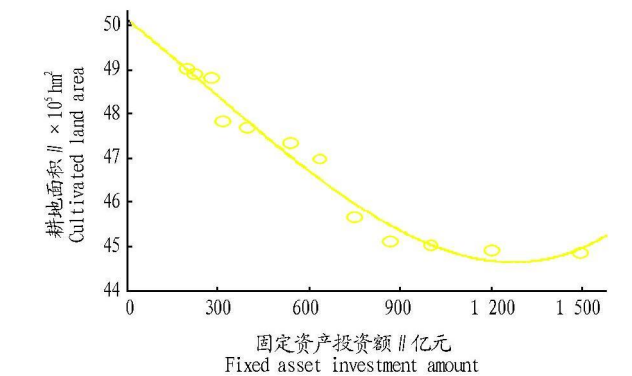


图 7 固定资产投资与耕地面积拟合

Fig 7 Fitting chart of fixed asset investment and cultivated land area

(x_2)之间的拟合模型分别为:

$$Y_2 = -0.088 - 1.0E-007x_1^2 + 1.79E-001x_1^3 \quad (R^2 = 0.345, F = 1.230)$$
$$Y_2 = -0.015 - 1.2E-007x_2^2 + 3.81E-001x_2^3 \quad (R^2 = 0.242, F = 0.744)$$

从图 8 9可以看出, 1996~ 2007年, 贵州省耕地损失率与 GDP 固定资产投资额之间出现波浪形起伏变化的关系, 虽然一定时段内呈现出倒 U 型, 但由于时段较短, 不能反映区域的整个发展趋势。目前, 经济发展增长与耕地减少率之间正处在新的上升阶段, 可以预计, 未来贵州经济发展对耕地占用的需求很大, 经济发展和耕地保护之间的矛盾尖锐, 单纯依靠强制性的行政手段难以实现耕地保有量平衡, 耕地面积的减少在当前的经济发展阶段具有其合理性。

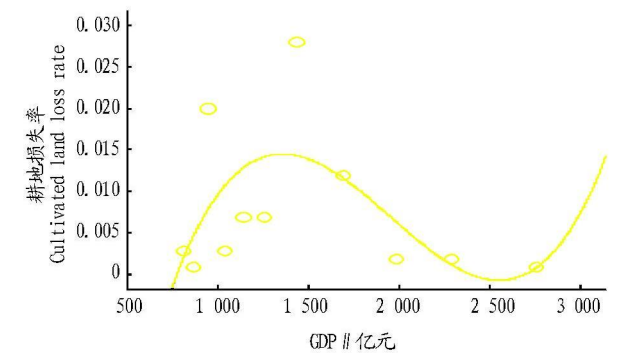


图 8 GDP与耕地损失率拟合

Fig 8 Fitting chart of GDP and cultivated land loss rate

3 结论

从耕地面积的变化、经济发展水平的提高以及耕地面

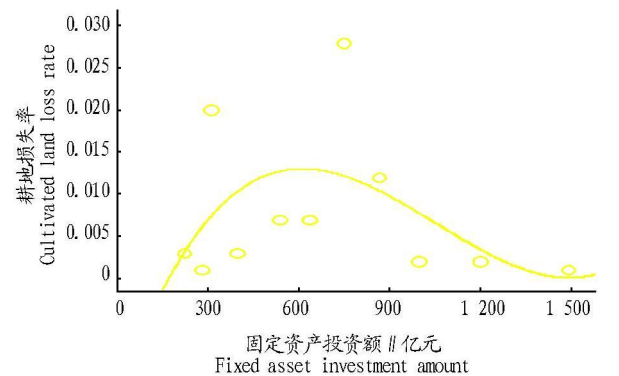


图 9 固定资产投资额与耕地损失率拟合

Fig 9 Fitting chart of fixed asset investment amount and cultivated land loss rate

积、耕地损失率与 GDP、固定资产投资额关系入手, 采取定量、定性相结合的研究方法对贵州省耕地变化与经济发展的关系进行了研究。结果表明, 1996~ 2007年, 贵州省经济发展水平得到较大提高, 表现为 GDP 的增长和固定资产投资规模的扩大, 同时建设用地面积增加, 耕地面积不断减少, 耕地面积与经济发展之间呈负相关的关系; 贵州省耕地面积递减率与 GDP 递增率不同步, 受退耕还林和西部大开发的影响, 耕地面积的减少在 1999年和 2003年出现了峰值; 贵州省耕地损失率与 GDP、固定资产投资额的关系呈波状起伏, 正处于上升阶段。这与贵州经济发展水平还比较落后, 经济增长主要依靠规模扩大和要素投入, 耕地非农化与现行的经济发展阶段相一致, 耕地保护难度较大。

参考文献

[1] MEYER W B, TURNER I B L. Changes in Land Use and Land Cover: A Global Perspective [C]. New York and London: Cambridge University Press, 1994.

[2] 曲福田, 陈江龙, 陈雯. 农地非农化经济驱动机制的理论分析与实证研究 [J]. 自然资源学报, 2005, 20(5): 231-242.

[3] 赵翠薇, 濮励杰. 基于经济发展阶段的土地利用变化研究 [J]. 自然资源学报, 2006, 21(2): 172-179.

[4] 陈百明. 中国土地资源现状、未来变化趋势与粮食生产潜力 [J]. AM-BD-人类环境杂志, 1999, 28(8): 682-686.

[5] 贾生华, 张宏斌. 中国农地非农化过程与机制实证研究 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2002.

[6] 曲福田, 吴丽梅. 经济增长与耕地非农化的库兹涅茨曲线假说及验证 [J]. 资源科学, 2004, 26(5): 61-68.

[7] 张健, 陈逸, 濮励杰, 等. 区域经济不同发展阶段的合理判定——以广西崇左市、安徽滁州市、江苏南通市为例 [J]. 经济地理, 2007(9): 714-718.

[8] 刘燕. 贵州省土地资源可持续利用研究 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2002.

[9] 杨桂山. 土地利用/覆被变化与区域经济发展——长江三角洲近 50 年耕地数量变化研究的启示 [J]. 地理学报, 2004(10): 41-46.

(上接第 7834 页)

[18] ADAMO R, COLY A, DOUBALE S E. Fluorimetric Determination of Histamine in Fish Using Micellar Media and Fluorescence as Labelling Reagent [J]. Journal of Fluorescence, 2005, 15(5): 679-688.

[19] 李志军, 吴永宁, 薛长湖. 食品中多种生物胺同时测定方法研究进展 [J]. 卫生研究, 2006, 35(5): 670-674.

[20] 朱爱芝, 王燕桓, 傅承光. 丹酰氯柱前衍生仲胺的高效液相色谱-电化学检测法的研究 [J]. 色谱, 1997, 15(5): 381-383.

[21] ZOTOU A, LOUKOU Z, SOULIEROS E, et al. Determination of Biogenic Amines in Wines and Beers by High Performance Liquid Chromatography with Pre-column Dansylation and Ultraviolet Detection [J]. Chromatographia, 2003, 57: 429-439.