

柱前衍生高效液相色谱法测定鱼罐头中的组胺

金高娃*, 蔡友琼, 于慧娟, 钱蓓蕾

(中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部水产品质量监督检验测试中心(上海), 上海 200090)

摘要 :建立了一种测定鱼罐头中组胺含量的柱前衍生高效液相色谱(HPLC)方法。样品匀浆后采用高氯酸水溶液超声提取,提取液经丹酰氯衍生后,采用HPLC分离,紫外检测器检测,外标法定量。采用粒径为1.8 μm固定相填料的C18色谱柱,在0.3 mL/min的流速下,样品的分析时间小于5 min,并可有效地减少流动相消耗,节约成本。组胺在0.08~8.00 mg/L内线性关系良好,相关系数为0.999 98;酱煮鲐鱼罐头中组胺在不同浓度水平的平均加标回收率均大于96%,相对标准偏差(RSD)小于2.5%;鱼罐头中组胺的定量限可达5.00 mg/kg。所建立的HPLC方法快速、灵敏度高、重复性好,前处理方法简单,可用于鱼罐头中组胺的测定。

关键词 :高效液相色谱;柱前衍生;组胺;鱼罐头

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)11-1099-04

Determination of histamine in canned fish by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization

JIN Gaowa*, CAI Youqiong, YU Huijuan, QIAN Beilei

(East China Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Fishery Products Quality Inspection and Test Center (Shanghai), Ministry of Agriculture of China, Shanghai 200090, China)

Abstract : A pre-column derivatization-high performance liquid chromatographic (HPLC) method has been developed for the determination of histamine in canned fish. The homogenated samples were ultrasonically extracted with perchloric acid aqueous solution, derivatized with dansyl chloride and diluted with acetonitrile to a desired volume. The samples were determined by HPLC with ultraviolet detector and quantified by external standard method. Adopting a C18 column with 1.8 μm stationary phase particles, the analysis time for each sample was smaller than 5 min with the flow rate of 0.3 mL/min. It can decrease the consumption of the mobile phase and save the cost. The linear range was 0.08–8.00 mg/L for histamine. The correlation coefficient was 0.999 98. The average recoveries of histamine at different concentration levels in spiked samples were greater than 96% and the relative standard deviations (RSDs) were smaller than 2.5%. The quantitation limit was 5.00 mg/kg for histamine in canned fish by HPLC. The results indicated that this HPLC method is fast, sensitive, reproducible and practical for the routine analysis of histamine in canned fish.

Key words : high performance liquid chromatography; pre-column derivatization; histamine; canned fish

组胺属于生物胺中的单胺类神经递质,参与多种生理病理活动过程,如对睡眠、摄食、体温、精神敏感性疾病的调节。它不仅是炎症反应和免疫损伤的重要介质之一,而且对应答和炎症反应有着重要的调节作用^[1]。作为人体内源活性物质,微量组胺在

生物细胞中具有重要的生理功能,但是当人体摄入过量的组胺时,会引起食物中毒,严重的还会危及生命^[2]。因为金枪鱼、鲭鱼等青皮红肉鱼类的肌肉中血红蛋白含量较高,组氨酸含量也较高,当受到含高活性组氨酸脱羧酶的细菌污染后,鱼肉中的游离组

* 通讯联系人:金高娃,博士。Tel:(021)65680121, E-mail:jgw200406@126.com.

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(No. 2009M02).

收稿日期:2010-08-09

氨酸会脱羧基而形成组胺,所以组胺常被作为产品质量的重要指示因子,用于监测食品生产和运输过程中产品质量的变化^[3]。因此建立快速、准确的测定样品中组胺的分析方法具有十分重要的意义。目前组胺主要采用毛细管电泳法^[4,5]、离子色谱法^[6,7]、酶联免疫法^[8]、薄层色谱法^[9]等检测。近年来,高效液相色谱法(HPLC)由于操作简便、准确度高、重现性好,在生物样品、黄酒、猪肉、水产品等的组胺检测中获得了较多的应用^[10-13]。组胺在化学上属咪唑类,作为原始态的胺,不能直接进行荧光、紫外或电化学检测,必须经衍生化反应以后,才能在荧光、紫外或电化学检测器上有响应,而衍生方法又分为柱前衍生^[14,15]和柱后衍生^[16,17]等。柱前衍生由于无需专门的反应装置,应用更为广泛。在组胺测定过程中较常采用的衍生试剂是邻苯二甲醛(OPA),但是存在衍生试剂易失效、衍生产物不稳定等不足之处,有文献报道组胺的 OPA-亚硫酸钠衍生物的稳定性仅为 20 min^[18]。丁卓平等^[12]测定水产品中的生物胺时,采用了丹酰氯作为衍生试剂,效果较好。本文采用丹酰氯对鱼罐头中的组胺进行柱前衍生后,采用 HPLC-紫外检测器测定,具有快速、简便、低耗、低检出限等优点,可为鱼罐头的质量安全控制提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(1200 系列,美国 Agilent 公司),由二元高压泵、柱温箱、二极管阵列检测器及自动进样器组成;均质机(PRO 200,美国 PRO 科学公司);高速离心机(RX II 系列, HITACHI);旋涡混合器(MS 3 digital,德国 IKA);往复式恒温水浴振荡器(SHZ-88A,太仓市实验设备厂)。

乙腈、丙酮、正己烷、醋酸铵为色谱纯;水为 Millipore 高纯水;高氯酸、氢氧化钠、碳酸氢钠、氨水为优级纯。丹酰氯(纯度 > 99%, Sigma 公司):称取 1.00 g 丹酰氯,用丙酮溶解并定容至 100 mL。组胺对照品(纯度 > 97%, Sigma 公司):准确称取组胺对照品适量,用水溶解并定容,再用水逐级稀释配成一系列浓度的对照品溶液。鱼罐头样品购于上海欧尚超市。

1.2 样品前处理

1.2.1 提取

鱼罐头匀浆后,称取 2 g 试样,精确至 0.01 g,置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸溶液,振荡旋涡 60 s,超声 10 min 后,在 10 000

r/min 下离心 10 min,上清液移入带刻度的玻璃管中,再向残渣中加入 10 mL 高氯酸溶液,重复上述操作一次,合并上清液;用 0.4 mol/L 高氯酸溶液定容至 25 mL,混匀。

1.2.2 衍生

移取上述提取液 1 mL 至带刻度的玻璃管中,加入 100 μ L 2 mol/L 氢氧化钠溶液,使之呈碱性,然后加入 300 μ L 饱和碳酸氢钠溶液进行缓冲,再加入 2 mL 丹酰氯溶液,盖塞混匀后,于 40 $^{\circ}$ C 恒温水浴振荡器内避光反应 45 min。反应完毕后,加入 100 μ L 氨水,静置 30 min,最后用乙腈定容至 5 mL,振荡混匀后,取适量溶液,用 0.45 μ m 的有机滤膜过滤后待测。

组胺对照品溶液的衍生方法同上。

1.3 色谱条件

色谱柱:XDB C18(50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m);流动相:乙腈-10 mmol/L 醋酸铵水溶液(体积比 72:28);检测器:紫外检测器,波长 254 nm;柱温 35 $^{\circ}$ C;流速 0.3 mL/min;进样量:10 μ L。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

组胺水溶性好,通常采用三氯乙酸溶液或高氯酸溶液提取,但是某些种类鱼罐头中含有少量的油,因此,本实验中的样品经高氯酸水溶液提取定容后,与正己烷的去脂效果进行了比较。测定结果表明,去脂前后的样品中组胺含量无明显变化,且色谱图中没有色谱峰的增减,主要原因为样品为水溶液提取,脂肪含量较低,因此,本实验确定前处理过程中无需正己烷去脂步骤。

2.2 色谱方法的建立

采用 ZORBAX SB-C18(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱分析经丹酰氯衍生的组胺样品,通过优化流动相比,乙腈-10 mmol/L 醋酸铵水溶液(体积比为 75:25)能使样品获得较好分离,目标峰附近无干扰峰,定量结果准确。在 1.0 mL/min 流速下,组胺衍生物的保留时间为 8.59 min,如图 1a 所示。当采用 1.8 μ m 粒径填料的 XDB C18(50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)色谱柱时,在乙腈-10 mmol/L 醋酸铵水溶液(体积比为 72:28)流动相下,流速为 0.3 mL/min 时,组胺衍生物保留时间为 4.14 min,且分离效果良好,无干扰峰影响目标峰的分离分析,如图 1b 所示。采用小粒径填料的短色谱柱有利于减少流动相消耗,节约成本,因此,选用 1.8 μ m 粒径填料的 XDB C18 作为分离色谱柱。

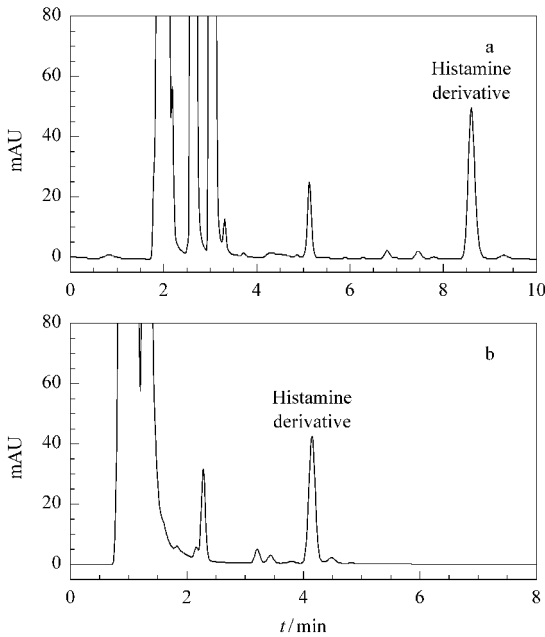


图 1 组胺对照品经衍生后的高效液相色谱图
Fig. 1 High performance liquid chromatograms of histamine derivative

a. ZORBAX SB-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase: acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate (75:25); flow rate: 1.0 mL/min. b. XDB C18 column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); mobile phase: acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate (72:28); flow rate: 0.3 mL/min.

Other conditions: column temperature: 35 °C; wavelength: 254 nm; histamine mass concentration: 5.0 mg/L.

2.3 方法的线性范围及定量限

以峰面积(Y)对质量浓度(X , mg/L)绘制标准曲线,组胺的质量浓度在 0.08 ~ 8.00 mg/L 时,回归方程为 $Y = 106.72X - 1.80$, $r^2 = 0.99998$ 。以 3 倍信噪比确定组胺的检出限为 1.5 mg/kg,因此在空白样品(酱煮鲑鱼罐头)中添加 5.00 mg/kg 的组胺标准溶液,按 1.2 节方法处理后,经测定 6 个平行样品中组胺衍生物的信噪比均大于 10,平均回收率大于 95%,RSD 低于 1%,因此将 5.00 mg/kg 定为组胺在此 HPLC 系统的定量限。

2.4 不同添加水平的加标回收率和精密度

在酱煮鲑鱼罐头空白样品中添加不同浓度的组胺对照品溶液,按照 1.2 节方法进行回收率实验,每种浓度的加标样品平行操作 6 份,结果见表 1,组胺的平均加标回收率为 96.57% ~ 103.88%,RSD 小于 2.5%,由此可以看出本方法准确度高,重现性好。

2.5 方法的精密度和稳定性实验

取对照品衍生溶液重复进样 5 次,峰面积积分值的 RSD 为 0.64%;金枪鱼罐头样品称取 5 份,分别按 1.2 节制备成供试品溶液,测定组胺含量,其 RSD 为 0.70%。将供试品溶液在室温条件下放置,

表 1 鲑鱼罐头样品中组胺在 4 个添加水平下的回收率及精密度($n = 6$)

Table 1 Recovery and precision of histamine at four spiked levels in canned mackerel samples ($n = 6$)

| Added/(mg/kg) | Recovery/% | RSD/% |
|---------------|------------|-------|
| 5.00 | 103.88 | 0.80 |
| 6.25 | 97.81 | 0.36 |
| 50.0 | 96.79 | 2.4 |
| 250.0 | 96.57 | 0.92 |

分别在 0、2、4、6、8、12 h 时测定组胺含量,结果表明供试品溶液的稳定性在 12 h 以上,RSD 为 1.76%。

2.6 实际样品的检测

我国的食品卫生标准明确规定鲑鱼罐头中组胺的允许摄入量不超过 1 000 mg/kg,而欧盟则规定水产品中组胺含量要小于 200 mg/kg。本文按照上述方法处理分析,共检测了金枪鱼、鲑鱼、黄花鱼、鲳鱼等罐头产品,在鲑鱼和黄花鱼罐头中未检测出组胺,而在金枪鱼罐头中检测出 53.13 mg/kg 的组胺,鲳鱼罐头中检测出组胺含量为 25.63 mg/kg,均未超过我国及欧盟的限量要求。

2.7 不同储存条件下金枪鱼罐头中组胺的变化

金枪鱼罐头在 -20 °C 冷冻条件下,每天测定其组胺的含量,经过 10 d 后,组胺的含量无变化。金枪鱼罐头密封储存在 23 °C 室温条件下时,在 24 h 后,组胺的含量也仅增加了 1 mg/kg,而在室温非密封情况下,可闻到鱼罐头有异味,组胺的含量大幅增长到 267.32 mg/kg。因此,为控制组胺含量,鱼罐头应妥善贮藏,避免变质。

3 结论

本文建立了一种测定鱼罐头中组胺的高效液相色谱方法。该方法用于测定样品时,采用 1.8 μm 粒径填料的色谱柱,在 0.3 mL/min 流速下,每个样品的运行时间小于 5 min,方法的定量限可低至 5.00 mg/kg。前处理过程中无需正己烷去脂步骤,实际空白样品中对照品物质不同添加水平的平均回收率均大于 96%。该方法快速、简单、准确、灵敏,应用于实际样品的检测效果理想,可用于进一步研究鱼罐头及水产品中组胺的变化,确保其安全食用。

参考文献:

- [1] Huang X H, Chen B M, Liang S X, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (黄新华,陈本美,梁绍先,等.分析化学), 2000, 28(7): 865
- [2] Li W R, Yao L M, Wang N S. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease (李伟荣,姚丽梅,王宁生.中西医结合心脑血管病杂志), 2003, 1(7):

409

- [3] Lai X L, He Z Q, Chen H X, et al. Food Science (赖小玲, 何志权, 陈华絮, 等. 食品科学), 2007, 28(1): 333
- [4] Gan N, Li T H, Wang L Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (干宁, 李天华, 王鲁雁, 等. 色谱), 2007, 25(6): 934
- [5] Zhang G S, Chen S, Xu Y Z, et al. Acta Photonica Sinica (张桂森, 陈胜, 徐友志, 等. 光子学报), 2008, 37(5): 1006
- [6] Jia L, Chen S C, Cao Y H, et al. Environmental Chemistry (贾丽, 陈舜琮, 曹英华, 等. 环境化学), 2008, 27(6): 823
- [7] Zhao X Y, Jiao X, Xia M, et al. Chinese Journal of Chromatography (赵新颖, 焦霞, 夏敏, 等. 色谱), 2009, 27(4): 505
- [8] Ma L D, Ba Z H. China Brewing (麻丽丹, 巴中华. 中国酿造), 2008(14): 85
- [9] Zhang W, Li X Q, Lu R, et al. Food Engineering (张微, 李秀缺, 陆容, 等. 食品工程), 2007(4): 55
- [10] Wang W, Zhao D Z, Wang W X, et al. Chinese Pharmacological Bulletin (王巍, 赵德忠, 王卫霞, 等. 中国药理学通报), 2004, 20(1): 119
- [11] Lu Y M, Dong M S, Lü X, et al. Food Science (陆永梅, 董明盛, 吕欣, 等. 食品科学), 2006, 27(1): 196
- [12] Ding Z P, Liu C Q, Chen D, et al. Journal of Instrumental Analysis (丁卓平, 刘辰麒, 陈迪, 等. 分析测试学报), 2006, 25(4): 59
- [13] Xu Z, Meng Y, Zhu Z Y, et al. Acta Agriculturae Jiangxi (徐振, 孟勇, 朱志远, 等. 江西农业学报), 2008, 20(8): 82
- [14] Pan H Y, Wang S Y, Ma D S, et al. Food Science (潘红阳, 王树英, 马德胜, 等. 食品科学), 2007, 28(4): 255
- [15] Fang K T, Xie D H, Ding B, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (房科腾, 谢东华, 丁斌, 等. 分析试验室), 2008, 27(12): 66
- [16] Huang X H, Chen B M, Liang S X, et al. Bulletin of Hunan Medical University (黄新华, 陈本美, 梁绍先, 等. 湖南医科大学学报), 2000, 25(3): 294
- [17] Zhao Q X, Xue C H, Xu J, et al. Journal of Food Science and Biotechnology (赵庆喜, 薛长湖, 徐杰, 等. 食品与生物技术学报), 2007, 26(3): 14
- [18] Li W R, Huang T L, Wang N S. Journal of Instrumental Analysis (李伟荣, 黄天来, 王宁生. 分析测试学报), 2004, 23(6): 36