

抑制性电导检测-离子色谱法快速测定 水产品中的生物胺

孙永, 刘楠, 李智慧, 刘申申, 周德庆*
(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要: **目的** 建立抑制性电导检测-离子色谱法快速测定水产品中常见的几种生物胺。**方法** 以甲基磺酸(MSA)为淋洗液通过梯度洗脱分离目标生物胺, 采用 Ionpac CS17(4 mm×250 mm)分析柱和电导检测器进行分析。进样体积为 25 μL, 采用峰面积定量。通过比较不同的提取剂(TCA(三氯乙酸)、HClO₄、MSA)和提取方式(振荡、超声)的提取效果优化前处理方法。**结果** 使用 MSA 超声提取效果较好, 该方法测定生物胺的线性范围为 0.02 mg~10.0 mg, 检出限在 0.5 mg/kg 以下, 加标回收率分别为 85.2%~106.9%。**结论** 该方法前处理简单快捷, 结果灵敏、准确, 适用于水产品中常见生物胺的快速检测。

关键词: 离子色谱法; 抑制性电导检测; 生物胺; 水产品

Determination of biogenic amines in seafood by suppressed conductance detection ion chromatography

SUN Yong, LIU Nan, LI Zhi-Hui, LIU Shen-Shen, ZHOU De-Qing*

(Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of common biogenic amines in seafood by ion chromatography method with suppressed conductance detection. **Methods** The samples were analyzed by Ionpac CS17(4 mm×250 mm) column and a conductance detector, with methylsulphonic acid (MSA) as the eluent to separate the amines in a gradient elution procedure. The injection loop was 25μL, and peak area was used for quantification. In this paper, different extracting agents (TCA (trichloroacetic acid), HClO₄ and MSA) and methods (shaking and sonication) were applied for the biogenic amine extraction, and the outcomes were compared and optimized. **Results** The sonication operation with MSA as extracting solution was proved to be the optimal pretreatment way. The linear range of the method was 0.02 mg~10.0 mg, the detection limit was below the 0.5 mg/kg, and the recovery of the amines ranged from 85.2%~106.9%. **Conclusion** The pretreatment of this method is simple and rapid, and the result is sensitive and precise, which makes it suitable for the application in biogenic amines determination in seafood.

KEY WORDS: ion chromatography; suppressed conductance detection; biogenic amines; seafood

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(20603022013018)

Fund: Supported by the Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes (20603022013018)

*通讯作者: 周德庆, 博士, 研究员, 主要研究方向为水产品质量与安全。E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

*Corresponding author: Zhou De-Qing, Professor, Yellow Sea Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, No.106, Nanjing Road, Qingdao 266071, China. E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn

1 引言

生物胺(biogenic amines)是一大类具有生物活性的含氮低分子量有机化合物的总称, 食品中的生物胺主要由对应氨基酸在微生物脱羧基作用, 或者对应的醛、酮通过转氨基作用生成^[1]。微量生物胺是生物体(包括人体)内的正常活性成分, 在生物代谢中起着重要作用, 但当人体摄入过量的生物胺(尤其是同时摄入多种生物胺)时, 会引起诸如头痛、恶心、心悸、血压变化、呼吸紊乱等过敏反应, 严重的还会危及生命^[2]。生物胺导致的食物中毒的事件时有发生, 最常见的是由食用鲐鱼、金枪鱼等青皮红肉鱼导致的组胺中毒, 又称“青花鱼中毒”(scombroid fish poisoning), 这些鱼类的肌肉中含有丰富的组氨酸, 在微生物作用下脱羧生成大量组胺。尸胺和腐胺等仲胺由蛋白质分解产生, 虽然鲜有文献报道尸胺和腐胺导致的食物中毒事件, 但它们能够显著增强组胺的毒性^[3], 另外尸胺、腐胺及亚精胺还能与亚硝酸盐反应生成能够致癌的亚硝胺^[4]。三甲胺由氧化三甲胺在微生物作用下还原产生, 被认为是导致水产品 TVB-N 值升高的主要原因^[5], 是水产品表征新鲜程度的重要指标。因此分析测定水产品中的生物胺具有非常重要的意义。

目前, 检测生物胺的仪器分析方法主要有气相色谱法^[6]、液相色谱法^[7]、液质联用法^[8-11]和离子色谱法^[12,13]等。但液相色谱方法大多都需要进行柱前衍生处理, 操作繁琐, 检出限较高。离子色谱主要利用离子之间对离子交换树脂的亲合力差异进行分离, 不需要衍生化等前处理, 减少了衍生化带来的干扰和不稳定性, 提高了分析方法的重现性和稳定性, 操作简便, 缩短了测定时间。离子色谱法测定生物胺使用的检测器有电导检测器和脉冲安培检测器两种。由于酸性环境下生物胺在安培检测器金电极上的响应微弱, 需要进行柱后加碱操作, 对仪器配置和人员操作要求较高。另外, 安培检测器的峰形较电导检测器略差^[14]。因此本文探讨使用抑制性电导检测-离子色谱法测定水产品中的生物胺, 特别是组胺和三甲胺的含量, 对快速检测判定水产品品质, 保障消费安全具有重要意义。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

ICS3000 离子色谱仪, 配有电导检测器, 抑制器,

Ionpac CS17(4 mm×250 mm)分离柱、 Ionpac GS17(4 mm×50 mm)保护柱(Thermo 公司); BSA124S-CW 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); Sigma 1-14 冷冻离心机(Sigma 公司); KQ-300VDE 型三频数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司); DW-86L626A 超低温保存箱(中国海尔集团); Milli-Q 超纯水系统(Millipore 公司); T18 Basic 高速匀浆机, 德国 IKA 公司。

甲基磺酸(MSA, 99%, Sigma-Aldrich 公司), 高氯酸(优级纯, 天津政成化学制品有限公司), 实验用水均为超纯水(电阻率大于 18.2 MΩ·cm)。

标准品: 三甲胺盐酸盐, 腐胺二盐酸盐, 尸胺二盐酸盐, 组胺二盐酸盐, 亚精胺三盐酸盐(均为 Sigma-Aldrich 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的配制

(1)标准储备液的配制

准确称量标准品, 用超纯水分别定容于 25 mL 容量瓶中, 得到 1000 mg/L 的不同标准品的标准储备液, 4 °C 保存备用, 标准储备溶液可以使用 6 个月。

(2)单标标准溶液和混合标准溶液的配制

取适量的标准储备溶液, 经超纯水稀释配制成合适浓度的单标使用溶液和系列浓度的混合标准使用溶液。

(3)其他溶液的浓度

MSA 淋洗液(30 mmol/L), MSA 提取溶液(0.5 mol/L), 三氯乙酸(TCA)溶液(10%), 高氯酸(HClO₄)溶液(0.5 mol/L)。

2.2.2 样品前处理方法

取水产品样品, 用组织匀浆机捣碎后分装备用。生物胺提取方法如下:

称取 2 g 样品置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 提取剂后迅速涡旋振荡 1 min, 然后通过不同的提取方式提取, 得到的悬浊液经 4 °C 条件下 10000 r/min 离心 10 min, 去除沉淀和脂肪, 吸取 1 mL 上清液置于 10 mL 容量瓶中, 加超纯水定容至刻度, 0.22 μm 水性滤膜过滤后上机。

本文使用了国内外文献报道的 3 种常用的生物胺提取剂: 高氯酸^[15,16], 三氯乙酸^[17]和甲基磺酸^[18,19], 同时比较了不同提取剂和提取方式对检测结果的影响。

具体的提取试剂、提取方式和提取时间如表 1 所示:

表 1 生物胺的提取
Table 1 The distillations of biogenic amines

提取试剂	提取方式	处理时间/min
0.5 mol/L HClO ₄	超声	30
0.5 mol/L HClO ₄	振荡	30
10% TCA	超声	30
10% TCA	振荡	30
0.5 mol/L MSA	超声	30
0.5 mol/L MSA	振荡	30

2.2.3 色谱条件

采用抑制性离子色谱梯度洗脱法, 抑制器电流为 74 mA; 检测器为电导检测器, 电导池温度 35 ℃。分离柱为 Dionex Ionpac CS17(4 mm×250 mm), 柱温 30 ℃, 保护柱为 Dionex Ionpac GS17(4 mm×50 mm); 淋洗液梯度变化如表 2 所示, 流速为 1 mL/min, 进样体积为 25 μL, 以峰面积定量。

表 2 淋洗液浓度梯度变化

Table 2 The concentration gradient change of the eluent

时间 <i>t</i> /min	淋洗液浓度 <i>c</i> /(mmol/L)
0	3
10	18
14	18
19	30
19	3
22	3

3 结果与讨论

3.1 淋洗液浓度梯度的优化

本文测定的生物胺与色谱柱固定相亲和力差异较大, 采用等浓度淋洗会导致多组分共淋洗以及强保留组分洗脱时间过长的的问题。要将几种生物胺在较短时间内完全淋洗出来, 必须采用梯度洗脱(见表 2)。本文参考了 De Borba 等^[20]的方法并根据实际情况作了优化。图 1 为待测生物胺标准色谱图。色谱峰 1 到 10 分别代表的是钠、氨、钾、三甲胺、镁、钙、腐胺、尸胺、组胺和亚精胺。尸胺和腐胺的分离度稍差, 但不影响定量。

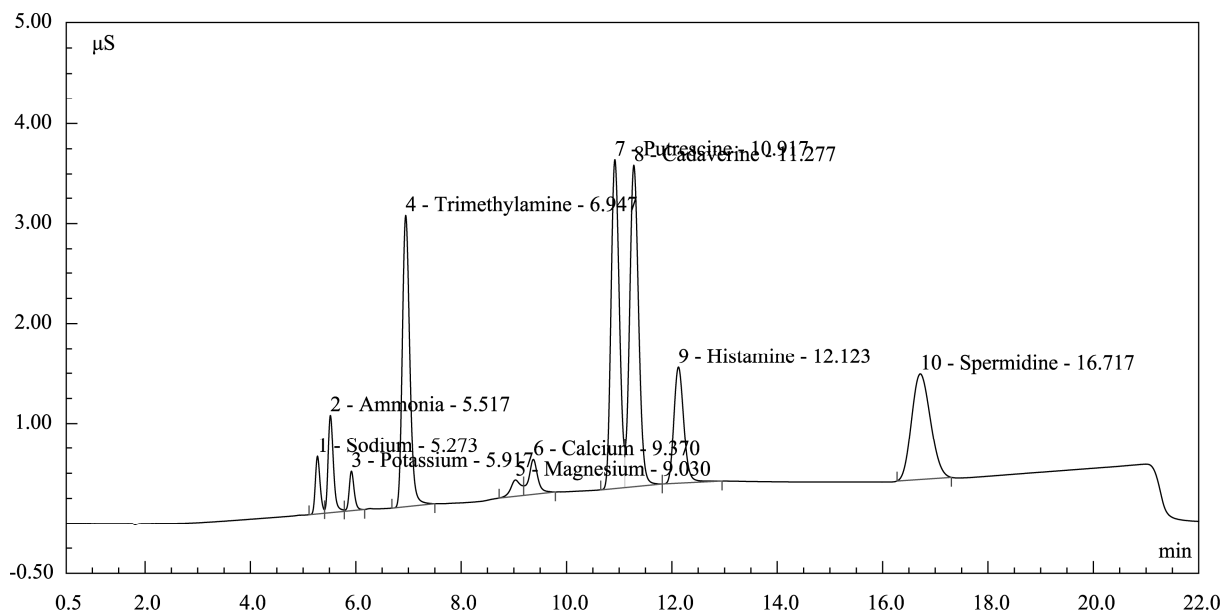


图 1 生物胺标准色谱图

Fig. 1 Chromatorgram of biogenic amine standards

3.2 方法的线性范围和检出限

根据色谱图中各种生物胺响应值的大小配制一系列浓度标准溶液, 并对每种浓度测定三次, 通过峰面积定量取平均值, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标建立标准工作曲线。方法的线性范围、线性方程、相关系数和检出限($S/N=3$)如表 3 所示。结果表明, 待测生物胺的峰面积和浓度存在良好的线性关系, 线性范围较宽, 检测限低, 表明该方法适用于生物胺的检测。

3.3 不同前处理方法的精密度和回收率

在同一样品中加入定量的混合标准溶液, 加标量 50 mg/kg, 重复测定 6 次, 进行回收率实验(结果如表 4 所示)。

生物胺呈碱性, 在水溶液以阳离子形式存在, 需要使用酸性提取剂提取。同时水产品肌肉的提取液中含有大量的蛋白质分子, 需要进行沉淀处理。本文

通过直接使用较高浓度的提取液(0.5 mol/L HClO_4 , 10% TCA 和 0.5 mol/L MSA)在提取生物胺的同时达到沉淀蛋白的目的, 以简化操作。

表 4 结果表明, 使用 0.5 mol/L MSA 超声提取的前处理方式得到的回收率效果相对较好, 为 85.2%~106.9%。同时因为 MSA 也是用于梯度洗脱的淋洗液成分, 相对其它高浓度的提取剂, 选用 MSA 更容易得到良好的对称峰形, 提高分辨率。

3.4 样品测定结果

图 2 是使用 0.5 mol/L MSA 超声提取的水产品样品的色谱图, 该样品是室温条件下放置 2 天轻度腐败的秋刀鱼(*Cololabis saira*)。通过图 2 可以看出, 经 10 倍稀释, 提取液的离子强度并未对各待测生物胺组分产生明显干扰, 各组分峰形和分离度均较好, 该方法适用于快速测定水产品中常见的生物胺。

表 3 方法的线性范围和检出限

Table 3 The linear range and detection limit of the method

目标物	线性范围 ρ /(mg/L)	线性方程	r^2	LOD($S/N=3$)/(mg/kg)
三甲胺	0.02~20.0	$Y=0.0517*X+0.0631$	0.9956	0.23
腐胺	0.02~20.0	$Y=0.0848*X+0.0401$	0.9973	0.27
尸胺	0.02~20.0	$Y=0.0958*X+0.0238$	0.9980	0.29
组胺	0.05~20.0	$Y=0.0351*X+0.0346$	0.9988	0.41
亚精胺	0.05~20.0	$Y=0.0788*X+0.0078$	0.9983	0.35

表 4 回收率实验*($n=6$, 加标量 10 mg/kg)

Table 4 The determination results of recovery test ($n=6$)

提取方式	三甲胺		腐胺		尸胺		组胺		亚精胺	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
0.5 mol/L HClO_4 +振荡	73.5	5.2	86.7	4.4	87.4	4.7	83.6	5.9	104.7	5.6
0.5 mol/L HClO_4 +超声	78.6	3.7	92.5	6.1	93.4	3.5	83.8	5.2	114.0	4.9
10% TCA+振荡	73.7	5.5	87.7	5.0	88.0	2.9	86.4	5.1	116.0	4.5
10% TCA+超声	83.9	3.1	86.4	4.8	87.9	4.6	83.7	6.2	121.5	4.3
0.5 mol/L MSA+振荡	72.3	4.3	88.9	3.9	90.7	3.3	87.0	5.6	117.6	5.0
0.5 mol/L MSA+超声	85.2	2.1	91.0	3.5	93.3	3.7	85.3	5.3	106.9	4.7

注: *空白对照各组分均未检出

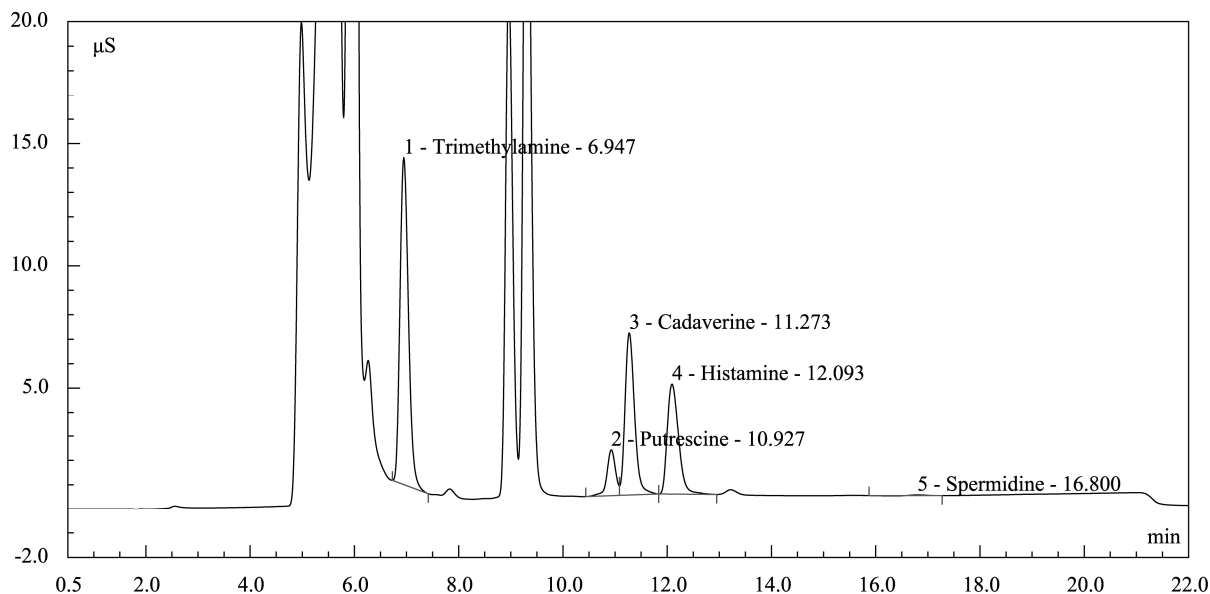


图 2 秋刀鱼样品生物胺色谱图

Fig. 2 Chromatorgram of biogenic amines of saira (*Cololabis saira*) sample

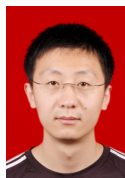
参考文献

- [1] Santos MHS. Biogenic amines: their importance in foods [J]. Int J Food Microbiol, 1996, 29(2-3): 213-231.
- [2] Rawles DD, Flick GJ, Martin RE. Biogenic Amines in Fish and Shellfish [M]. Advances in Food and Nutrition Research. Academic Press, 1996: 329-365.
- [3] Bjeldanes LF, Schutz DE, Morris MM. On the aetiology of scombroid poisoning: Cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig [J]. Food Cosmet Toxicol, 1978, 16(2): 157-159.
- [4] Eerola S, Sagués A R, Lilleberg L, *et al.* Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage [J]. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1997, 205(5): 351-355.
- [5] Howgate P. A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 1. determination [J]. Electronic J Environ, Agric Food Chem, 2010, 9: 29-57.
- [6] 王颖, 邱璠, 韩北忠, 等. 食品中的生物胺及其检测方法[J]. 中国酿造, 2011, (10): 1-5.
Wang Y, Qiu F, Han BZ, *et al.* Biogenic amines in food and their determination methods [J]. Chin Brew, 2011, (10): 1-5.
- [7] 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, (4): 357-361.
- [8] Liu CL, Wang XC, Ding ZP. Determination of biogenic amines in aquatic products [J]. J Shanghai Fisheries Univ, 2007, (4): 357-361.
- [9] 吴云辉, 周爽, 徐敦明. 非衍生化液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 8 种生物胺[J]. 色谱, 2013, (2): 111-116.
Wu YH, Zhou S, Xu DM. Determination of eight biogenic amines in animal-derived foodstuffs by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization [J]. Chin J Chromatogr, 2013, (2): 111-116.
- [10] 丁涛, 吕辰, 柳菡, 等. 高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱检测葡萄酒中 8 种生物胺[J]. 分析测试学报, 2014, (1): 27-32.
Ding T, Lv C, Liu H, *et al.* Determination of eight biogenic amines in red wines by liquid chromatography - quadrupole/electrostatic field orbit trap mass spectrometry [J]. Chin J Instrum Anal, 2014, (1): 27-32.
- [11] 崔晓美, 陈树兵, 陈杰, 等. 基质分散固相萃取-亲水作用色谱-串联质谱法测定鲣鱼中 5 种生物胺的含量[J]. 分析化学, 2013, (12): 1869-1874.
Cui XM, Chen SB, Chen J, *et al.* Determination of 5 kinds of biogenic amines in bonito by matrix solid phase dispersion extraction with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2013, (12): 1869-1874.
- [12] 孙亚军, 廖建萌, 雷晓凌, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测

- 定虾仁中八种生物胺[J]. 食品工业, 2015(03):273-277.
- Sun YJ, Liao JM, Lei XL, *et al.* Simultaneous determination of eight biogenic amines in shrimp by LC-MS/MS [J]. Chin Food Ind, 2015, (3): 273-277.
- [12] 周勇, 王萍亚, 赵华, 等. 离子色谱法测定冷冻海产品中的生物胺[J]. 食品工业, 2014, (5): 238-241.
- Zhou Y, Wang PY, Zhao H, *et al.* Determination fo biogenic amines in frozen meat products by high performance ion-exchange chromatography-electrochemical [J]. Chin Food Ind, 2014, (5): 138-241.
- [13] 姜荷, 王红青, 范文佳, 等. 柱后加碱脉冲积分安培检测-离子色谱法测定水产品中十种生物胺[J]. 分析试验室, 2012, (2): 90-94.
- Jiang H, Wang HQ, Fan WJ, *et al.* Simultaneous determination of biogenic amines in aquatic products by ion exchange chromatography coupled with IPAD [J]. Chin J Anal Lab, 2012, (2): 90-94.
- [14] 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, (5): 670-674.
- Li ZJ, Wu YN, Xue CH. Simultaneous determination methods of biogenic amines in food [J]. Chin J Hyg Res, 2006, (5): 670-674.
- [15] 刘振锋, 魏云潇, 张进杰, 等. 高效液相色谱法检测中国传统发酵豆腐制品中的生物胺[J]. 中国食品学报, 2010, (4): 253-259.
- Liu ZF, Wei YX, Zhang JJ, *et al.* Determination of biogenic amines in Chinese traditional fermented Tofu by a high performance liquid chromatography method [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2010, (4): 253-259.
- [16] 郭雯, 郑冬梅, 李晓东, 等. RP-HPLC 柱后衍生法检测干酪中 6 种生物胺[J]. 中国食品学报, 2015, (5): 213-218.
- Guo W, Zheng DM, Li XD, *et al.* Simultaneous determination of six biogenic amines in cheese by RP-HPLC coupled to On-line post column derivatization [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2015, (5): 213-218.
- [17] 郑捷, 李素, 赵冰, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定羊肉风干肠中生物胺[J]. 食品工业, 2015, (3): 286-289.
- Zheng J, Li S, Zhao B, *et al.* Determination of biogenic amines in mutton dried sausage by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. Chin Food Ind, 2015, (3): 286-289.
- [18] Palermo C, Muscarella M, Nardiello D, *et al.* A multiresidual method based on ion-exchange chromatography with conductivity detection for the determination of biogenic amines in food and beverages [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(2-3): 1015-1023.
- [19] Saccani G, Tanzi E, Pastore P, *et al.* Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry using a cation-exchange column [J]. J Chromatogr A, 2005, 1082(1): 43-50.
- [20] De Borba BM, Rohrer JS. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection [J]. J Chromatogr A, 2007, 1155(1): 22-30.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



孙 永, 助理研究员, 主要研究方向为水产品质量与安全。

E-mail: sunyong@ysfri.ac.cn



周德庆, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为水产品加工与质量安全。

E-mail: zhoudq@ysfri.ac.cn