

# 高效液相色谱-紫外检测法测定水产品中组胺含量

徐丽\*, 刘琳, 王宗奇, 孟慧琴, 张雪琰

(山东出入境检验检疫局, 青岛 266001)

**摘要:** **目的** 对高效液相色谱法测定水产品(鲭鱼)中组胺含量的试验方法进行改进, 建立一种提取方法简单、衍生物稳定、操作方便的检测方法。**方法** 用 0.4 mol/L 高氯酸溶液提取水产品中的组胺, 采用 10 mg/mL 丹磺酰氯溶液作为衍生剂进行衍生, 用甲醇、水的流动相梯度洗脱, 高效液相色谱-紫外检测法测定水产品中的组胺含量。**结果** 该方法提取完全、操作简单、峰型理想、组胺出峰干扰少, 回收率大于 90%, 方法检出限为 50 mg/kg。**结论** 该方法能够满足水产品中组胺含量的测定要求, 是一种理想的组胺检测方法。

**关键词:** 水产品; 组胺含量; 高效液相色谱法; 紫外检测法; 甲醇

## Determination of histamine content in aquatic products by high performance liquid chromatography with ultraviolet detector

XU Li\*, LIU Lin, WANG Zong-Qi, MENG Hui-Qin, ZHANG Xue-Yan

(Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China)

**ABSTRACT: Objective** To improve the method of high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of histamine in aquatic product (mackerel fish), and to develop a method with simple extraction, stable derivatives, and easy to operate. **Method** The perchloric acid solution 0.4 mol/L was used to extract histamine of aquatic products, dansyl chloride solution 10 mg/mL as derivative agent, methanol and water as the HPLC flow phase to gradient elution. The histamine content was detected by high performance liquid chromatography with ultraviolet detector. **Results** The method had the advantages of complete extraction, simple operation, ideal peak, less interference of histamine peak. The recovery rate was more than 90%, and the detection limit was 50 mg/kg. **Conclusion** It can meet the requirements of determination of histamine in aquatic products, and is an ideal method for detection of histamine.

**KEY WORDS:** aquatic products; the content of histamine; high performance liquid chromatography; ultraviolet detector; methanol

## 1 引言

生物胺是一类含氮的有机化合物, 主要有脂肪类、芳香类或杂环类。其中脂肪族生物胺包括腐胺、尸胺、精胺、亚精胺等, 芳香族包括酪胺、苯乙胺等, 杂环类包括组胺、色胺等。在人和动物身体细胞中,

存在适量的生物胺比如组胺、色胺、精胺等, 在调节机体生长、增强机体新陈代谢活力、控制血压、消除自由基等方面具有明显作用<sup>[1,2]</sup>。生物胺在很多食品中都存在, 尤其是蛋白质含量丰富的食品<sup>[3]</sup>, 主要包括动物源食品和发酵类食品。生物胺具有一定的毒性作用, 各种胺类毒性大小不同, 其中组胺对人体健康

\*通讯作者: 徐丽, 助理工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: sdxuli@sina.com.cn

\*Corresponding author: XU Li, Assistant Engineer, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China. E-mail: sdxuli@sina.com.cn

的影响最大<sup>[4,5]</sup>。

组胺又称组织胺, 是一种过敏性毒物, 化学式是  $C_5H_9N_3$ , 分子量是 111, 大量食用后会引发不良反应<sup>[6]</sup>。水产品中的组胺主要是鱼肉在腐败过程中其机体中的组胺酸通过其中存在的微生物所产生的组氨酸脱羧酶的脱羧作用而生成<sup>[7]</sup>。组胺中毒是水产食品存在的主要安全问题之一, 全国各地尤其是沿海地区组胺中毒事件时有发生。当有机体摄入组胺超过 100 mg(或每千克体质量 1.5 mg)时, 即可引起过敏性食物中毒<sup>[8]</sup>, 口服 8~40 mg 组胺将引起轻微中毒症状, 超过 40 mg 产生中等中毒症状, 如果超过 100 mg 将产生严重中毒症状。美国食品药品监督管理局(FDA)通过对爆发组胺中毒的大量数据的研究, 确定组胺的危害作用水平为 500 mg/kg(食品)。欧盟规定鲭科鱼类中组胺含量不得超过 100 mg/kg, 其他食品中组胺不得超过 100 mg/kg, 酪胺不得超过 100~800 mg/kg<sup>[9]</sup>。

目前组胺的测定方法有很多, GB/T 5009.45—2003 中的水产品卫生标准的分析方法、GB/T 5009.208-2008 中的食品中生物胺含量的测定和 GB/T 20768-2006 中的鱼和虾中有毒生物胺的测定、液相色谱-紫外检测法等方法以及相关的文献<sup>[10-15]</sup>中提到了偶氮显色法、苯甲酰氯衍生高效液相色谱法、丹磺酰衍生高效液相色谱法、毛细管电泳法、离子色谱法、薄层色谱法和生物电化学法。高效液相色谱法由于其具有分析速度快、柱效高、检测灵敏度高、定量分析准确等特点, 基本取代了其他方法, 是目前生物胺含量分析测定的主要手段。衍生方法主要有柱前衍生和柱后衍生, 常用的衍生化试剂有邻苯二甲醛、丹磺酰氯、偶氮试剂和苯甲酰氯等, 邻苯二甲醛存在衍生物不稳定等不足, 苯甲酰氯不溶于水, 衍生效果差, 偶氮显色法容易受到基质中杂质的干扰, 影响测定结果。丹磺酰氯具有较理想的衍生效果和稳定时间。而有些标准中用盐溶液作为流动相, 会对分析柱造成损害。本研究综合了相关的标准和文献, 以鲭鱼为代表对高效液相色谱法测定水产中组胺含量进行了方法改进。

## 2 材料和方法

### 2.1 仪器和设备

安捷伦高效液相色谱仪 1200(美国安捷伦公司), 水浴锅(国华电器公司), 离心机(日本日立公司), 电子分析天平 X205(梅特勒-托利多), 涡旋振荡器(德

国 IKA 公司)。移液枪: 10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、1000  $\mu$ L。

### 2.2 试剂

除特殊说明外, 试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。甲醇: 色谱纯; 丙酮: 分析纯; 浓氨水: 分析纯; 0.4 mol/L 高氯酸溶液: 取 24 mL 高氯酸, 用水稀释至 1 L; 2 mol/L 氢氧化钠溶液: 取 4.0 g 氢氧化钠, 用水溶解并定容至 50 mL; 饱和碳酸氢钠溶液; 10 mg/mL 丹磺酰氯溶液: 称取 0.1 g 丹磺酰氯, 用丙酮溶解并定容至 10 mL; 盐酸组胺标准品(美国 Sigma 公司), 纯度大于 99.0%。

### 2.3 试验方法

#### 2.3.1 样品提取

称取 2 g(精确至 0.001 g)已粉碎的样品于 50 mL 刻度离心管中, 用移液枪加入 10 mL 的 0.4 mol/L 高氯酸溶液, 涡旋提取 2 min, 上离心机于 4000 r/min 离心 5 min, 将上清液移入 25 mL 棕色容量瓶中。在下层的残渣中再加入 10 mL 的 0.4 mol/L 的高氯酸溶液, 涡旋提取 2 min, 离心后转移上清液于容量瓶中, 用 0.4 mol/L 高氯酸溶液将其定容至刻度。

#### 2.3.2 样品衍生

量取 1 mL 样品溶液于 5 mL 离心管中, 依次加入 2 mol/L 氢氧化钠溶液 100  $\mu$ L、饱和碳酸氢钠溶液 300  $\mu$ L 和 10 mg/mL 丹磺酰氯溶液 2 mL, 盖紧盖子, 在 40  $^{\circ}$ C 下避光反应 40 min, 每 5 min 振荡 1 次。反应完毕后, 加入浓氨水 100  $\mu$ L 终止衍生化反应, 放置 30 min。用甲醇将其定容至刻度 5 mL, 混合均匀, 过 0.45  $\mu$ m 的有机滤膜, 待测。

#### 2.3.3 标准曲线

标准储备液(1 mg/mL): 准确称取 41.5 mg 的标准品于 25 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度。避光 4  $^{\circ}$ C 可冷藏保存 6 个月。

标准工作液: 准确移取组胺标准储备液 50、100、200、500 和 800  $\mu$ L, 用水定容至 10 mL, 配制成浓度分别为 5、10、20、50 和 80  $\mu$ g/mL 的标准工作液。量取各浓度标准工作液 1 mL, 然后按照本文“3.2 样品衍生”步骤与样品溶液同时衍生, 过 0.45  $\mu$ m 的有机滤膜, 待测。同时做空白。以峰面积为纵坐标, 组胺浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

#### 2.3.4 添加回收

在空白中添加一定量的不同浓度的组胺标准溶液, 按照样品处理的方法进行提取、衍生。

表 1 梯度洗脱程序表  
Table 1 Gradient elution program

组成	时间(min)					
	0	7	14	27	30	36
A:甲醇	55	65	70	90	100	55
B:水	45	35	30	10	0	45

### 2.3.5 色谱条件

色谱柱: Waters C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 254 nm; 流动相: A: 甲醇, B: 水; 梯度洗脱。

## 3 结果与讨论

### 3.1 前处理条件的选择

目前常用的衍生化试剂主要有丹磺酰氯、苯甲酰氯、邻苯二甲醛、偶氮试剂等。邻苯二甲醛试剂易失效, 产生的衍生物不稳定; 苯甲酰氯不能与水互溶, 衍生过程中易产生分层, 影响衍生化效果; 本方法采用丙酮溶解的丹磺酰氯作为衍生化试剂, 与样品溶液互溶良好, 很好的保证了衍生化效率, 衍生物稳定时间可达 6~8 h, 方便进行检测。

### 3.2 流动相选择

本方法选用甲醇、水作为流动相进行梯度洗脱, 相比较用乙酸铵溶液、乙腈作为流动相梯度洗脱的方法, 本流动相无需另外配制, 组胺出峰时间在 20 min 左右, 基质对组胺峰的干扰较少, 峰型理想。避免乙酸铵缓冲盐溶液析出引起组胺峰保留时间的变化, 防止缓冲盐溶液颗粒对色谱柱的损害。

### 3.3 色谱图

组胺标准品、空白、空白添加、样品色谱图如图 1~4 所示。由图可见, 本实验方法的色谱图峰型理想, 且无干扰杂峰, 说明此方法的提取和衍生化反应良好, 分离效果好。

### 3.4 检出限

图 3 为 50 mg/kg 组胺加标衍生化反应后的色谱图, 目标峰信噪比大于 10, 方法回收率大于 90%, 由此可知 50 mg/kg 作为方法的定量检出限可以满足样品中组胺的检测需要。

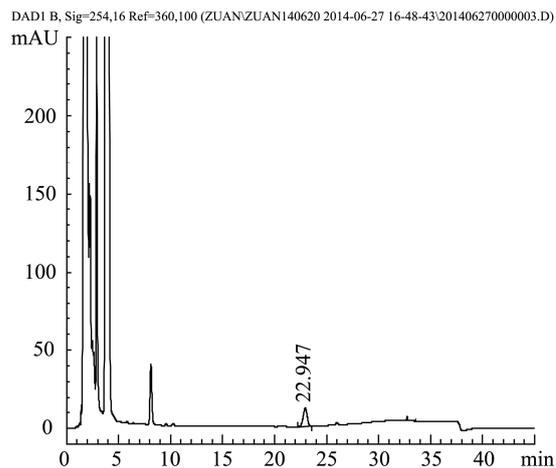


图 1 组胺标准品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of histamine standard

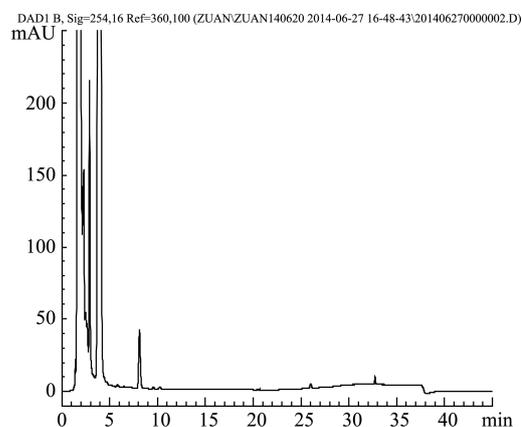


图 2 空白色谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank

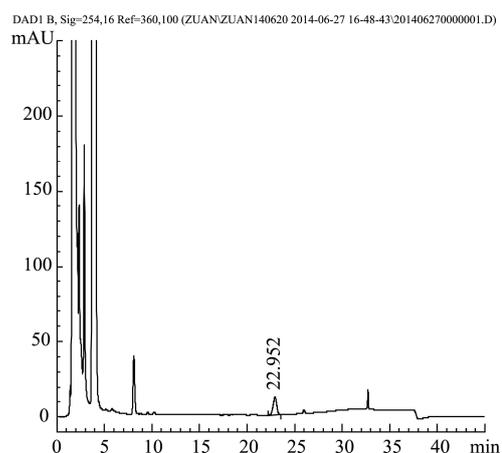


图 3 空白添加 50 mg/kg 组胺色谱图

Fig. 3 Chromatogram of blank after derivatization spiked at 50 mg/kg histamine

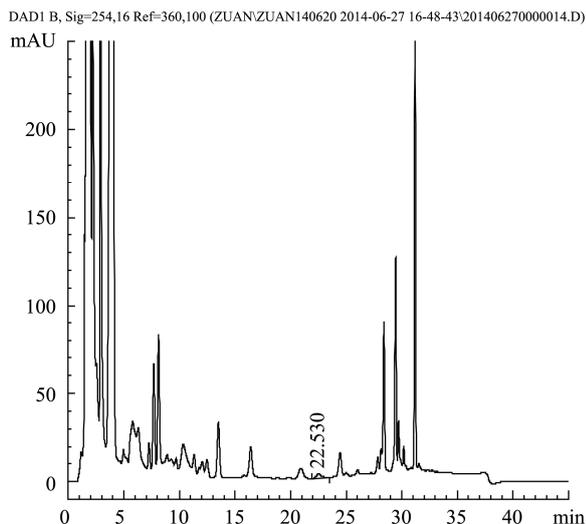


图 4 样品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of sample

### 3.5 回收率和精密度

本方法 50、200、500 mg/kg 3 个等级的空白加标回收率均大于 90%，相对标准偏差小于 1.5%，可以满足检测要求。

表 2 不同加标浓度下的回收率和精密度实验

Table 2 Results of recovery and precision of spiked samples

添加水平 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	精密度 (%)
50	91.7/93.8/94.2	93.2	1.44
200	96.3/95.1/94.4	95.3	1.01
500	95.9/96.3/98.1	96.8	1.21

## 4 结 论

本实验方法对以往的测定方法进行了改进, 采用高氯酸溶液提取, 用丹磺酰氯作为衍生化试剂进行衍生, 用甲醇、水作为流动相进行梯度洗脱, 建立了高效液相色谱-紫外检测法。本实验方法操作简单, 得到了良好的峰型和回收率, 能够避免复杂基质的干扰, 准确测定水产品中的组胺含量。

### 参考文献

- [1] Silla Santos MH. Biogenic amines: their importance in foods [J]. *Int J Food Microbiol*, 1996, 29(2-3): 213-231.
- [2] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. *Food Res Int*, 1996, 29(7): 675-690.
- [3] 蒋倩倩, 戴志远, 赵巧灵, 等. 冰藏鲱鱼中组胺的产生及腐败微生物的变化[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(8): 219-224.  
Zhu QQ, Dai ZY, Zhao QL, *et al*. Histamine production and spoilage microorganisms variation of the ice-stored mackerel [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2013, 13(8): 219-224
- [4] Bodmer S, Imark C, Kneubhl M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing [J]. *Inflamm Res*, 1999, 48(6): 296-300.
- [5] Tabor H, Tabor CW. Spermidine, spermine and related amines [J]. *Pharmacol Rev*, 1964, 16: 245-300.
- [6] 谢超, 王阳光, 邓尚贵. 水产品中组胺控制降解技术研究概述 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30: 414-417.  
Xie C, Wang YG, Deng SG. Review on controlled decomposition of histamine in aquatic product [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, 30: 414-417.
- [7] 谢超, 王阳光, 邓尚贵. 水产品中组胺产生机制及影响因素研究概述[J]. *肉类研究*, 2009, 4: 74-78.  
Xie C, Wang YG, Deng SG. Histamine in fish production mechanism and influencing factors outlined [J]. *Meat Res*, 2009, 4: 74-78.
- [8] 杨文军, 马丹, 张丽英, 等. 鱼粉中的有毒有害物质组胺 HPLC 检测方法初探[J]. *饲料广角*, 2004, 4: 28-32.  
Yang WJ, Ma D, Zhang LY, *et al*. Fish meal in the toxic and harmful substances histamine HPLC detection method [J]. *Feed Angle*, 2004, 4: 28-32.
- [9] 李志军, 薛长湖, 吴永宁. 反相高效液相色谱法测定食品中生物胺[J]. *食品工业科技*, 2005, 26(4): 175-178.  
Li ZJ, Xue CH, Wu YJ. Reversed phase HPLC determination of biogenic amines in food [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2005, 26(4): 175-178.
- [10] Smit AY, Du Toit WJ, Du Toit M. Biogenic amines in wine: understanding the headache [J]. *S Afr J Enol Vitic*, 2008, 29(2): 109-127.
- [11] Li ZJ, Wu YN, Zhang G, *et al*. A survey of biogenic amines in Chinese red wines [J]. *Food Chem*, 2007, 105: 1530-1535.
- [12] 沈念原, 王秀芹. 高效液相色谱法测定葡萄酒中生物胺的含量[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(4): 394-396.  
Shen NY, Wang XQ. Determination of biogenic amines in wine method of high performance liquid chromatography [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, 32(4): 394-396.
- [13] GB/T20768—2006 鱼和虾中有毒生物胺的测定 液相色谱-紫外检测法[S].  
GB/T20768—2006 Method for the determination of biogenic amines in fish and shrimp-LC-UV detection method [S].
- [14] GB/T 5009.208—2008 食品中生物胺含量的测定[S].

GB/T 5009.208—2008 Determination of biogenic amine in foods[S].

[15] GB/T 5009.45—2008 水产品卫生标准的分析方法 [S].

GB/T 5009.45—2008 Method for analysis of hygienic standard of fish and other aquatic products [S].

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



徐 丽, 助理工程师, 主要研究方向为食品检测。  
E-mail: sdxuli@sina.com.cn

~~~~~

“肉制品加工与贮藏”专题征稿

随着生活质量的提高和人们饮食需求的多样化发展, 作为主要蛋白质来源的肉制品的需求量将会越来越大, 到 2015 年, 我国肉类产量将达到 8500 万吨, 同时国内外对肉制品加工技术研究的也在不断深入, 区别于传统肉制品的新型肉制品的研发使得肉制品具有更好的风味、更高的营养价值。但是在肉制品的加工及贮藏过程中也存在着诸如有害物质的产生、致病菌的存在等食品安全问题。

鉴于此, 本刊特别策划了“肉制品加工与贮藏”专题, 由东北农业大学的孔保华教授担任专题主编。孔保华教授现任东北农业大学食品学院副院长, 同时兼任中国畜产品加工常务理事, 肉品加工分会副主任, 中国农学会农产品加工分会常务理事, 黑龙江省食品科学学会常务理事, 中国农业机械学会农副产品加工分会副理事长, 黑龙江省天然产物工程学会副理事长, 黑龙江省发酵工程学会理事, 全国屠宰加工标准化技术委员会委员, 国家农产品加工技术研发体系畜产品加工专业委员会常务理事, 主要从事肉品科学、水产品科学和技术的研究。本专题主要围绕肉制品加工关键技术、肉制品加工副产物综合利用、新型肉制品研究开发(低盐、低脂、功能性肉制品等)、加工过程中有害物质的产生规律、调控机理和检测技术、肉制品中致病微生物的检测及防控措施、加工高新技术的应用、肉制品的质量安全研究和风险评估等方面或您认为领域内的有意义的内容进行论述, 计划在 2015 年 1 月出版。

本刊编辑部及孔保华教授特邀请各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑