

高效液相色谱法测定大豆发酵制品中的生物胺

王充*, 易少凌

(广东食品药品职业学院, 广州 510520)

摘要: **目的** 从生物胺角度初步探讨大豆发酵制品的食用安全性, 为确定大豆发酵制品的推荐安全摄入量提供初步参考。 **方法** 采用柱前衍生高效液相色谱法检测大豆发酵制品中生物胺的含量, 以 0.4 mol/L 高氯酸为提取液, 以丹酰氯为衍生试剂, 紫外检测波长 254 nm。 **结果** 样品组分分离及测定结果重现性较好, 豆豉、豆酱、酱油 3 种大豆发酵制品均有部分品牌组胺含量超过危害作用水平(即 500 mg/kg), 8 个样品中有 7 种超过 100 mg/kg, 同类不同品牌大豆发酵制品间组胺含量没有明显差别; 色胺均未检出; 除组胺外, 3 种大豆发酵制品中尚可能存在 2-苯乙胺、腐胺及尸胺。 **结论** 大豆发酵制品的色胺未检出, 组胺含量较高, 大量食用可能影响人体健康。

关键词: 大豆发酵制品; 生物胺; 高效液相色谱法

Determination of biogenic amines in fermented product from soya beans by high performance liquid chromatography

WANG Chong*, YI Shao-Ling

(Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

ABSTRACT: Objective To assess the security of fermented product from soya beans, and give a reference for their reference intakes. **Methods** To determine biogenic amines in lobster sauce, soy sauce and soybean paste by high performance liquid chromatography (HPLC), the biogenic amines were extracted with 0.4 mol/L perchloric acid solution, the pre-column derivatising agent was dansyl chloride, the mobile phase was acetonitrile and water (V:V=60:40), and the flow rate was 1.0 mL/min. UV detector was used to determine the biogenic amines, and the wavelength was 254 nm. **Results** Histamine was found in every kind of the fermented product with soya beans, and the concentration was higher than 500 mg/kg, which was the level in food that would cause harm to human body made by the Food and Drug Administration (FDA) in America. The average concentration of histamine in the fermented product with soya beans determined was 469.19 mg/kg, and different kinds of fermented products with soya beans had almost the same concentration of histamine. While no tryptamine was found in these samples, there were 2-phenylethylamine, putrescine and cadaverine in these fermented product from soya beans probably besides histamine. **Conclusion** There is a high concentration of histamine in the fermented product from soya beans, and it will probably cause harm to human body for a lot of intakes.

KEY WORDS: fermented product from soya beans; biogenic amines; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 王充, 主任药师, 主要研究方向为卫生检验。E-mail: 935928741@qq.com

*Corresponding author: WANG Chong, Senior Pharmacist, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China. E-mail: 935928741@qq.com

1 引言

豆豉、豆酱、酱油是我国常见的发酵豆制品,含有多种营养成分,市场广阔,食用人群众多。然而,近几年关于生物胺方面的研究表明,在发酵制品中容易产生生物胺,存在潜在的食品安全隐患,比如,纳豆在发酵过程中可产生亚精胺、精胺、腐胺和酪胺^[1]。豆豉、豆酱、酱油等和纳豆同为大豆的发酵制品,其在发酵过程也会产生类似的生物胺^[2-4]。

生物胺对人体有较强的毒性作用^[5],是一类主要由氨基酸脱羧或醛和酮,氨基化形成的低分子量含氮化合物,而食品中生物胺主要是由氨基酸经乳酸菌脱羧形成,而且高浓度的生物胺往往出现在发酵食品中,因为发酵食品更容易污染具有高活性氨基酸脱羧酶的微生物^[6]。

高浓度的生物胺不仅会严重影响食品风味甚至改变其成分,还对人体有着严重的毒害作用,引起食品安全问题,其中组胺对人类健康的影响最大。口服8~40 mg 组胺产生轻微中毒症状,超过40 mg 产生中等中毒症状,超过100 mg 产生严重中毒症状^[7]。欧盟食品中组胺最大允许水平为100 mg/kg。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)通过对爆发组胺中毒的大量数据进行研究,确定组胺的危害作用水平为500 mg/kg(食品)^[8]。

国内外文献报导的生物胺的检测方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、毛细管电泳、生物传感器、薄层色谱^[9],其中以高效液相色谱法使用较多,常见的有:丹酰氯(dansyl chloride)柱前衍生高效液相色谱法、苯甲酰氯(benzoyl chloride)柱前衍生高效液相色谱法、邻苯二醛(o-phthalaldehyde)柱后衍生高效液相色谱法、荧光胺(fluorescamine)柱后衍生高效液相色谱法^[10]。

高效液相色谱法中又以丹酰氯柱前衍生高效液相色谱法使用最多,其特点是简便、快速、灵敏、稳定,能同时处理大量样品,用紫外检测器进行检测,可靠性、成熟性、可操作性较强^[11]。欧盟食品微生物法规(EC) No 2073/2005中生物胺含量亦采用此法。

目前,国内对大豆发酵制品卫生指标的研究多限于感官指标、理化指标、微生物指标,生物胺含量测定的研究较少,也没有相关的生物胺卫生标准,因此测定大豆发酵制品中生物胺的含量具有重要的食

品卫生学意义。本研究的目的在于,测定并比较豆豉、大豆发酵酱油、豆豉中生物胺的含量,与国家相关卫生标准^[12,13]进行比较,从生物胺角度初步探讨大豆发酵制品的食用安全性,为制定大豆发酵制品的推荐安全摄入水平提供初步参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

液相色谱仪(BIO-RAD, Biologic Duo Flow, 美国伯乐公司);紫外检测器(BIO-RAD, MODEL 1706UVIVIS MONITOR, 美国伯乐公司);移液枪(20~200 μL 、100~1000 μL);2 mL ED管;微孔滤膜(孔径0.45 μm)。

2.2 材料与试剂

2.2.1 标准品

组胺(由广东省疾病预防控制中心提供,纯度>99.9%);色胺(国药集团化学试剂有限公司生产,纯度>99.9%)。

2.2.2 试剂

甲醇、乙腈、丙酮、 NaHCO_3 均为分析纯,购自广州化学试剂厂;高纯水、浓氨水25%~28%购自广州化学试剂厂;丹酰氯(广东省疾病预防控制中心提供,纯度>99.9%)。

2.2.3 实验材料

广州市超市中购买具有相近生产日期、不同品牌的大豆发酵酱油、豆酱各三种,每种一瓶,包装及散装豆豉各一种。

2.2.4 溶液配制

丹酰氯溶液(10 mg/mL):称取0.25 g丹酰氯用丙酮溶解,定容到25 mL。

高氯酸溶液(0.4 mol/L):量取24 mL高氯酸加高纯水定容到1 L。

NaOH溶液(2 mol/L):称取4 g NaOH加高纯水定容到50 mL。

饱和 NaHCO_3 :于50 mL水加入 NaHCO_3 至不再溶解。

标准储备液:准确称取10.000 mg组胺和色胺,混合加入10 mL容量瓶,用0.4 mol/L高氯酸定容,配成1.0 mg/mL溶液作为混标;称取10.000 mg组胺和色胺,分别加入10 mL容量瓶,用0.4 mol/L高氯酸定容,配成1.0 mg/mL溶液作为单标。

标准应用液: 将混标储备液稀释成 10、20、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 将单标储备液稀释成 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

标准系: 分别取 250 μL 0.4 mol/L 高氯酸及各浓度标准应用液按样品方法进行衍生、过滤, 得到空白标准、10、20、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准系及 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的色胺、组胺单一标准, 每个标准样本设一个平行样。

2.3 实验方法

2.3.1 样品处理

每个样品通过均质、提取、衍生、过滤等处理, 每样品各准备 2 个平行样品。具体处理过程如下:

均质: 豆豉和豆酱分别取出适量, 于研钵中捣碎、混匀; 酱油振摇。

提取: 准确称取 2.0 g 样品(酱油 2.0 mL)加入 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸, 并用均质机捣碎、混匀; 放入离心机, 在 3 000 r/min 的条件下离心 10 min; 取出上层清液, 再次加入 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸, 充分混匀, 在 3 000 r/min 的条件下离心 10 min; 取出上层清液, 合并两次清液, 用化学滤纸过滤于 25 mL 容量瓶, 用 0.4 mol/L 的高氯酸定容到 25 mL。

衍生: 取出 250 μL 上述提取液, 加入 2 mL ED 管中, 加入 25 μL 2 mol/L 的氢氧化钠调节 pH 值, 加入 75 μL 饱和碳酸氢钠溶液和 500 μL 的 10 mg/mL 丹酰氯, 摇匀, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下避光反应 45 min; 反应毕, 取出加入 25 μL 25% 的浓氨水, 静置 30 min; 加入 375 μL 乙腈, 振荡混匀。

过滤: 将衍生后溶液用微孔滤膜过滤至 2 mL ED 管, 待测。

2.3.2 测定条件

采用 C_{18} 反相色谱柱(Hypersil 公司, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 柱温为室温, 流动相为水和乙腈 ($V:V=40:60$), 进样量 20 μL , 采样时间 30 min, 紫外检测波长为 254 nm。

3 结果与讨论

3.1 保留时间的确定

通过标准样品的测定确定了色胺的平均保留时间为 11.58 min, 组胺的平均保留时间为 21.51 min, 色胺与组胺的色谱峰无重叠, 分离效果好, 如图 1 所示。

3.2 标准系列测定结果

设生物胺峰面积为 s , 对应的衍生前溶液中生物胺浓度为 c , 由色胺及组胺峰面积对浓度作线性曲线并线性回归分析, 得到回归曲线(图 2)及回归方程。

色胺的回归方程为: $s=10207.29c-13147.30$;

组胺的回归方程为: $s=8944.04c-39530.79$ 。

标准系列测定结果显示, 平行样测定结果与均值的偏差较小, 平行样的重现性较好。回归曲线图中各点偏离回归曲线的幅度很小, 回归分析结果显示相关系数 R 均大于 0.99, 回归模型方差分析结果 P 均小于 0.001, 可以认为峰面积和生物胺浓度间的线性相关性很好, 回归模型能够很好地描述峰面积与生物胺浓度间的关系, 衍生方法及测定结果可靠。

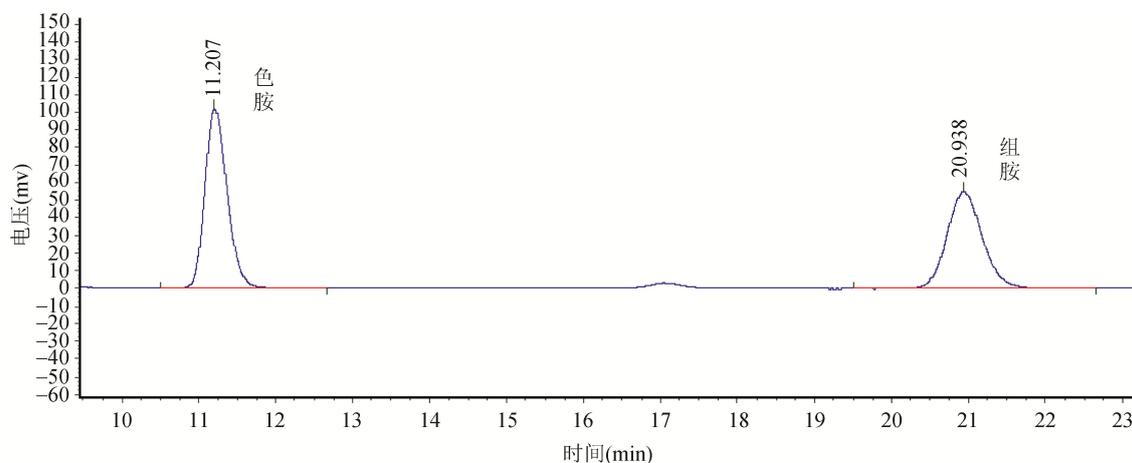


图 1 混合标准色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed standard

3.3 样品测定结果

豆豉、酱油、豆酱样品测定各组分之间分离效果较好,无重叠峰。平行样间亦有很好的重现性。结果表明,样品中色胺均未检出,组胺均可检出。三种大豆发酵制品的色谱图如图3~图5所示。

设样品未处理前组胺含量为 C (豆豉和豆酱的单位为 mg/kg , 酱油为 mg/L), 测定峰面积为 s , 由回归模型及样品处理过程推算出样品组胺含量计算公式为: $C=(0.00011179 \times s + 4.433) \times 25/2$, 将峰面积代入公式计算得到样品中组胺含量, 详细结果见表1。

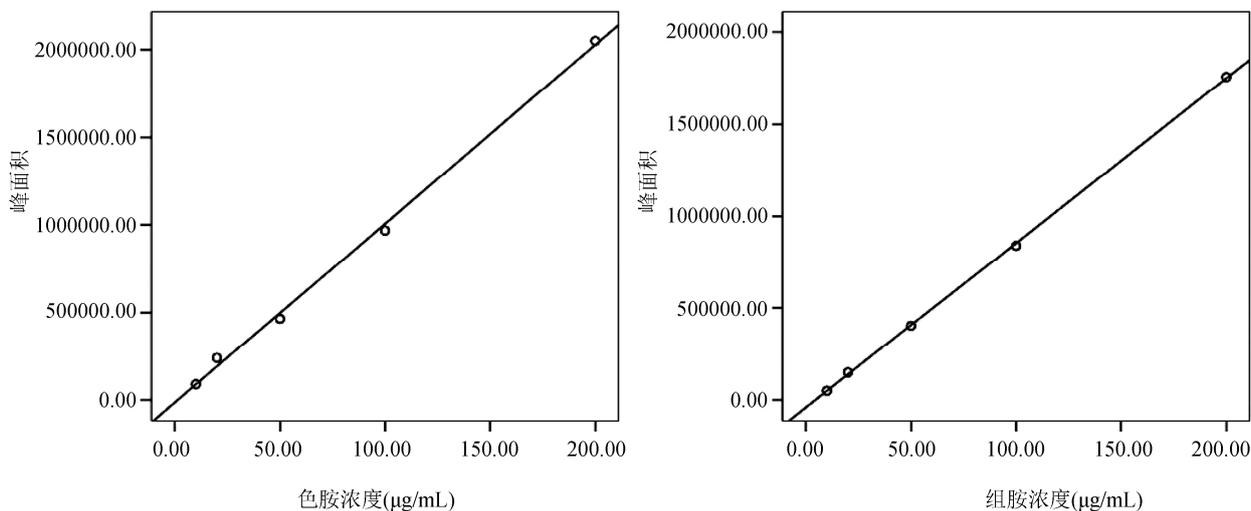


图2 色胺及组胺峰面积对浓度线性回归曲线图

Fig. 2 Calibration curve of histamine and tryptamine

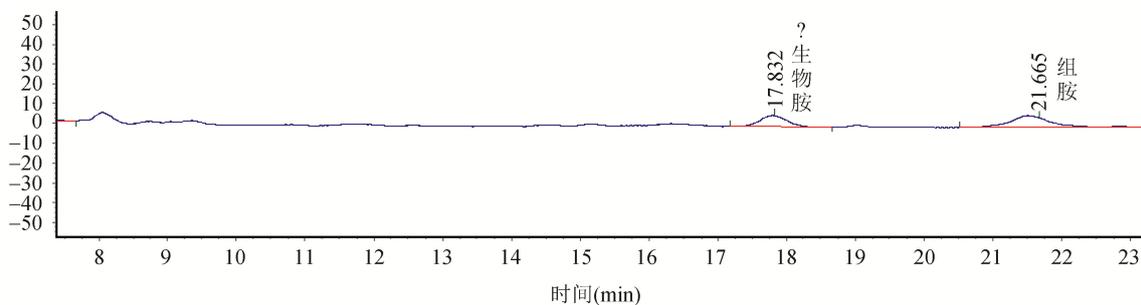


图3 豆豉样品(豆豉2)生物胺测定色谱图

Fig. 3 Chromatogram of biogenic amines in lobster sauce (lobster sauce 2)

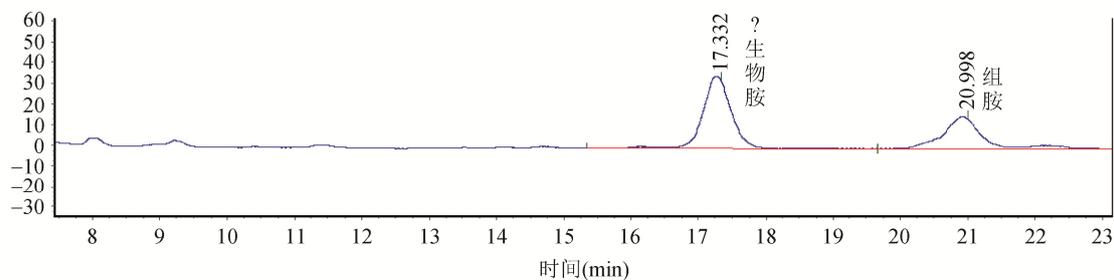


图4 酱油样品(酱油1)生物胺测定色谱图

Fig. 4 Chromatogram of biogenic amines in soy sauce (soy sauce 1)

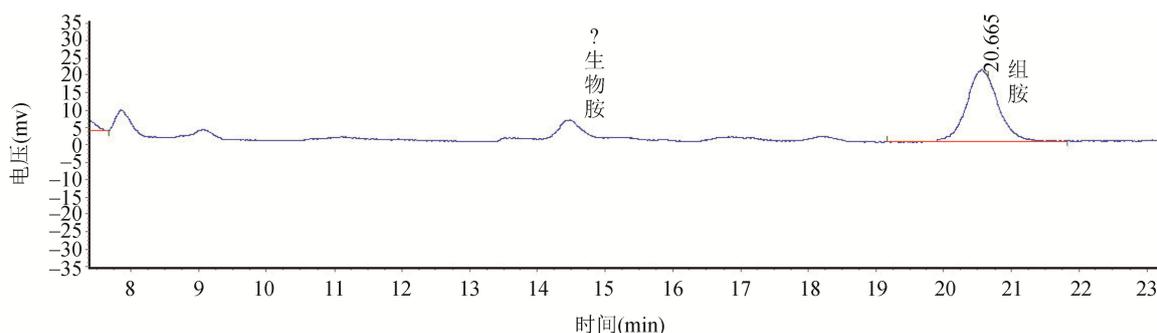


图 5 豆酱样品(豆酱 3)生物胺测定色谱图

Fig. 5 Chromatogram of biogenic amines in soybean paste (soybean paste 3)

表 1 样品组胺测定结果

Table 1 Results of histamine in sample groups

样品	峰面积	组胺浓度(mg/kg)	平均值±标准差(mg/kg)
豆豉 1	405384	621.87	464.28±222.85
豆豉 2	179833.9	306.70	
酱油 1	479979.6	726.10	461.78±320.79(mg/L)
酱油 2	35396.55	104.88	
酱油 3	357072.1	554.36	
豆酱 1	271749.7	435.14	481.50±506.28
豆酱 2	未检出	未检出	
豆酱 3	682702.3	1009.37	

由表 1 可见, 在 3 类共 8 种大豆发酵制品中有 4 种组胺浓度超过 500 mg/kg, 占有种类的一半, 有 7 种超过 100 mg/kg, 占 87.5%。豆豉中组胺平均浓度为 464.28 mg/kg, 酱油为 461.78 mg/L, 豆酱为 481.50 mg/kg, 总平均浓度为 469.19 mg/kg, 3 类大豆发酵制品组胺浓度平均值没有明显区别, 标准差 10.74。可能由于影响生物胺生成的因素众多, 大豆发酵制品即使是同一种类不同品牌间, 制作工艺亦各不相同, 由于多种影响因素的结果, 使 3 类大豆发酵制品间组胺含量没有显示出明显差别。

同类不同品牌大豆发酵制品间, 组胺含量则相差较大。由于一般盒装豆豉的制作工艺要求可能比散装豆豉高, 在生产过程过受到可产生组氨酸代谢酶的细菌相对较少, 散装豆豉(豆豉 1)的组胺含量是盒

装豆豉(豆豉 2)含量的 2 倍。豆酱 2 未检出组胺, 而豆酱 3 中组胺含量则高达 1009 mg/kg, 为所测全部大豆发酵制品中含量最高者。

除组胺外, 在豆豉、酱油、豆酱中均发现其他的吸收峰。图 6 所示为酱油的生物胺色谱图。

这几个吸收峰可能为除色胺及组胺外其他类型的生物胺。参照刘辰麒等^[8]报道的 10 个生物胺标准品色谱图, 在色胺与组胺之间有 3 种生物胺, 依次为 2-苯乙胺、腐胺、尸胺; 有关纳豆中生物胺含量的研究亦显示同为大豆发酵制品的纳豆中存在腐胺。本实验中的这 3 种可能生物胺可能即为 2-苯乙胺、腐胺、尸胺。此外, 有关纳豆中生物胺含量的研究表明纳豆在发酵过程中还可产生亚精胺、精胺和酪胺, 但本实验在延长采样时间的情况下亦未发现在组胺之后出现其他吸收峰。

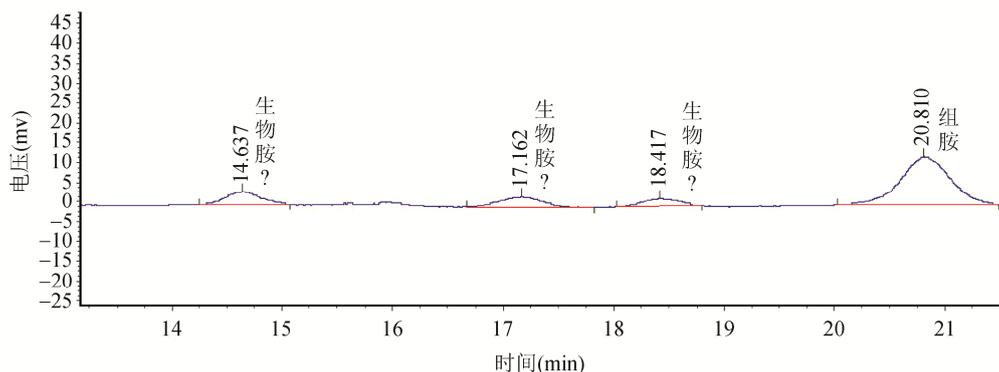


图6 酱油3生物胺色谱图

Fig. 6 Chromatogram of biogenic amines in soy sauce (soy sauce 3)

4 结论

本研究确认了大豆发酵制品中多组分生物胺的高效液相色谱-柱前衍生紫外检测的测定方法,并探索了使色胺和组胺在30 min内较好分离的检测条件,确定色胺的保留时间为11.58 min、组胺的保留时间为21.51 min。

美国食品药品监督管理局(FDA)通过对组胺中毒爆发的大量数据的研究,确定了组胺的危害作用水平为500 mg/kg食品^[12]。50%的样品中组胺浓度超过美国食品药品监督管理局确定的危害水平。样品组胺的总平均浓度为469.19 mg/kg,大量食用可能影响人体健康。同类不同品牌大豆发酵制品组胺含量有明显区别,散装豆豉样品的组胺含量高于盒装豆豉样品的含量。实验中样品均未检出色胺。除组胺外,三种大豆发酵制品中尚可能存在2-苯乙胺、腐胺及尸胺,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张建华, 沈翔, 于湘莉. 纳豆发酵过程中的生物胺[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2007, 25(1): 670-674.
Zhang JH, Shen X, Yu XL. Biogenic amines during the fermentation in natto [J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci), 2007, 25(1): 670-674.
- [2] 钱雨林, 闫寅卓, 李兆杰, 等. 两种发酵工艺下低盐固态酱油中生物胺的变化[J]. 中国酿造, 2012, 31(06): 115-118.
Qian YL, Yan YZ, Li ZJ, et al. Changes in biogenic amines during low-salt solid-state fermentation of soy sauce by different technologies [J]. China Brewing, 2012, 31(06): 115-118.
- [3] 苏悟, 郑小芬, 徐睿烜, 等. 1种细菌型豆豉自然发酵过程中生物胺的变化[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(7): 40-45.
Su W, Zheng XF, Xu RX, et al. Study of biogenic amines changes during natural fermentation of abacteria-fermented type Douchi [J]. Food Ferment Ind, 2014, 40(7): 40-45.
- [4] 胡鹏, 索化夷, 阚建全, 等. 中国传统发酵豆豉中生物胺含量[J]. 食品科学, 2013, 20(34): 108-112.
Hu P, Suo HY, Kan JQ, et al. Biogenic amine content of traditionally fermented douche [J]. Food Sci, 2013, 20(34): 108-112.
- [5] 何庆华, 吴永宁, 印遇龙. 食品中生物胺研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(5): 451-454.
He QH, Wu YN, Yin YL. Advance on study of biogenic amines in food [J]. Chin J Food Hyg, 2007, 19(5): 451-454.
- [6] Suzzi G, Gardini F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review [J]. Int J Food Microbiol, 2003, 88: 41-54.
- [7] 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): 84-90.
Li ZJ, Wu YN, Xue CH. Effects of biogenic amines on food safety and human health [J]. Food Ferment Ind, 2004, 30(10): 84-90.
- [8] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Res Inter, 1996, 29(7): 675-690.
- [9] 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.
Li ZJ, Wu YN, Xue CH. Simultaneous determination methods of biogenic amines in food [J]. J Hyg Res, 2006, 35(5): 670-674.
- [10] 刘辰麒, 丁卓平, 王锡昌. 生物胺的检测方法评价[J]. 现代科学仪器, 2006, 4: 89-91.
Liu CQ, Ding ZP, Wang XC. Appraisal of biogenic amines determination [J]. Mod Sci Instrum, 2006, 4: 89-91.
- [11] 刘辰麒, 丁卓平, 王锡昌. 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.
Liu CQ, Wand XC, Ding ZP. Determination of biogenic amines in aquatic products [J]. J Shanghai Fish Univ, 2007, 16(4):

- 357-361.
- [12] GB/T 20768-2006 鱼和虾中有毒生物胺的测定[S].
GB/T 20768-2006 Determination of toxic biogenic amines in fish and shrimp [S].
- [13] 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 amines in food [S].
- [14] 胡鹏, 胡国洲, 陈光静, 等. 永川豆豉制曲过程中基本成分及生物胺含量变化[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(03): 163-166.
Hu P, Hu GZ, Chen GJ, *et al.* Changes of basal components and biogenic amines in the preparation of Yongchuan Douchi koji [J]. Food Ferment Ind, 2013, 39(03): 163-166.
- [15] 邹阳, 赵谋明, 赵海锋. 高效液相色谱法同时测定酱油中的 8

种生物胺[J]. 现代食品科技, 2012, 28(05): 570-573.

Zou Y, Zhao MM, Zhao HF. Simultaneous determination of 8 kinds of biogenic amines in soy sauce by HPLC [J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(05): 570-573.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



王 充, 硕士研究生, 主任药师, 药学院副院长, 主要研究方向为卫生检验。
E-mail: 935928741@qq.com