

高效液相色谱法测定酱油中组胺的含量

朱 帅, 张水锋*, 郑仕剑, 牛灿杰, 徐腾洋, 盛华栋

[浙江方圆检测集团股份有限公司, 国家预包装食品质量监督检验中心(浙江), 杭州 310018]

摘 要: **目的** 建立丹磺酰氯柱前衍生-高效液相色谱法测定酱油中组胺含量的方法。**方法** 样品酱油以 1,7-二氨基庚烷作为内标, 用正丁醇:三氯甲烷(1:1, V:V)萃取净化, 经丹磺酰氯衍生, 乙醚萃取后氮气吹干, 用乙腈定容, 高效液相色谱仪测定, 内标法定量。**结果** 组胺含量在 1~100 mg/L 线性关系良好, 线性相关系数 $r=0.9999$, 检出限为 0.5 mg/kg。在精密度实验中, 其相对标准偏差为 2.59%~6.48%, 在 1.0、10.0、50.0 mg/kg 的添加水平下, 加标回收率为 88.0%~104.2%。**结论** 该方法线性关系好、检出限低、稳定性好、回收率高、测定结果准确, 适合酱油中组胺的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 组胺; 酱油

Determination of histamine in soy sauce by high performance liquid chromatography

ZHU Shuai, ZHANG Shui-Feng*, ZHENG Shi-Jian, NIU Can-Jie, XU Teng-Yang, SHENG Hua-Dong

[Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., National Pre-packaged Food Quality Supervision and Inspection Center (Zhejiang), Hangzhou 310018, China]

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for the determination of histamine in soy sauce by high performance liquid chromatography with dansyl chloride pre-column derivatization. **Methods** The sample soy sauce was extracted and purified with 1,7-diamino heptane by n-butanol-chloroform (1:1, V:V). After derivated by dansulfonyl chloride and extracted with ether, the sample soy sauce was dried by nitrogen gas, then dissolved in acetonitrile, and the content was determined with high performance liquid chromatography internal standard method. **Results** There was a good linear relationship between histamine content at 1–100 mg/L, the linear correlation coefficient $r=0.9999$, and the limit of detection was 0.5 mg/kg. In the precision experiment, the relative standard deviation was 2.59%–6.48%. At the addition level of 1.0, 10.0 and 50.0 mg/kg, the standard recovery was 88.0%–104.2%. **Conclusion** This method has the advantages of good linearity, low detection limit, good stability, high recovery, accurate results, and is suitable for the determination of histamine in soy sauce.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; histamine; soy sauce

0 引 言

组胺是一种生物胺, 是由组氨酸在脱羧酶的作用下产生的^[1], 在食品和生物体内广泛存在^[2], 尤其在蛋白质

含量高的发酵食品中极易产生^[3-4]。组胺在生物活性细胞中发挥着重要的生理作用, 但是, 当摄入过量的组胺时, 会使人产生呼吸紊乱、心悸等过敏性反应, 严重时可引起大脑血管出血甚至死亡^[5-7]。酱油是传统的发酵食品^[8], 其安全性

*通信作者: 张水锋, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 65965996@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Shui-Feng, Ph.D, Senior Engineer, Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China. E-mail: 65965996@qq.com

与人们的健康息息相关, 组胺作为酱油发酵过程中产生的副产物, 其含量多少直接影响酱油的品质^[9]。因此, 准确检测酱油中组胺的含量具有重要意义。

目前, 用于测定组胺含量的方法主要为毛细管电泳法^[10]、离子色谱法^[11]、液相色谱串联质谱法^[12]、荧光分光光度法^[13]、高效液相色谱法^[1-2,5,8,14-17]。其中, 高效液相色谱法由于操作简单、分析准确等优点, 成为食品中组胺的常用检测方法之一^[16-17]。但与普通食品相比, 酱油样品基质较为复杂, 为样品的前处理和上机检测准确定量带来了较大的困难。现有的国家标准 GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》^[17]中对酒类、醋、酱油中组胺的测定采用直接用丹磺酰氯衍生, 但是实际操作中, 大多数酱油中含有的较大量谷氨酸钠参与丹磺酰氯衍生的反应, 很大程度影响到组胺和内标物与丹磺酰氯的衍生反应, 容易使目标物的衍生反应不完全。为了准确地测定酱油中组胺含量, 本研究对国家标准中的方法进行改进, 利用三氯甲烷-正丁醇(1:1, V:V)对酱油进行萃取与净化, 之后再对试样进行衍生, 优化色谱条件, 对组胺进行分离测定, 以期对酱油中组胺含量的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

1.1.1 实验仪器

LC-20AD 配二极管阵列检测器(日本岛津公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); MS 105 DU 电子天平(梅特勒-托利多集团); 电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司); 氮吹浓缩装置(天津恒奥科技有限公司); QT-1 涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司); ST 16R 高速离心机(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.1.2 实验试剂

三氯甲烷、乙醚、丙酮(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司); 正丁醇、盐酸、丙酮(分析纯, 杭州双林化工试剂有限公司); 氢氧化钠、碳酸氢钠、氯化钠(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 乙酸、乙酸铵(色谱纯, 麦克林公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 丹磺酰氯(色谱纯, 上海晶纯生化科技股份有限公司); 组胺标准物质(德国 Dr.公司)。

实验用水为一级水。实验用酱油购于杭州某超市。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

组胺标准储备液 1000 mg/L: 准确称取适量的组胺标准品, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并定容至 10 mL, 配制成 1000 mg/L 的储备液, 于 4 °C 避光保存。

组胺系列标准工作液: 分别准确吸取 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mL 的标准储备液于 6 支 10 mL 的容量瓶中,

用 0.1 mol/L 盐酸溶液定容至刻度, 得到的质量浓度分别为 1、5、10、20、50、100 mg/L。

内标标准储备液 10000 mg/L: 准确称取适量的 1,7-二氨基庚烷标准品, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并定容至 10 mL, 配制成 10000 mg/L 的储备液, 于 4 °C 避光保存。

内标标准使用液: 准确吸取 1.0 mL 的标准储备液于 100 mL 的容量瓶中, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液定容至刻度, 得到质量浓度为 100 mg/L 的内标使用液。

1.2.2 样品制备

萃取: 准确称取样品 2 g(准确至 0.01 g)于 15 mL 离心管中, 加入 500 μ L 内标使用液(100 mg/L), 用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 12.0 左右。加入 5 mL 的正丁醇/三氯甲烷(1:1, V:V)混合溶液, 涡旋振荡 5 min, 5000 r/min 离心 5 min, 转移下层有机相于另一 15 mL 离心管中, 上层样液再萃取 1 次, 合并萃取液, 用正丁醇/三氯甲烷(1:1, V:V)稀释至 10 mL。取 5 mL 萃取液加入 200 μ L 盐酸(1 mol/L), 涡旋混匀, 40 °C 水浴下氮气吹干, 加入 1 mL 盐酸(0.1 mol/L)涡旋使残渣完全溶解, 待衍生。

衍生: 于上述待衍生的试样中依次加入 1 mL 饱和碳酸氢钠溶液、100 μ L 氢氧化钠溶液(1 mol/L)、1 mL 丹磺酰氯-丙酮(20 mg/mL)衍生试剂, 涡旋混匀后于 60 °C 水浴中衍生 15 min, 取出, 冷却至室温后加入 1 mL 水, 涡旋混匀, 40 °C 水浴下氮气除去丙酮(约 1 mL), 加入 0.5 g 氯化钠涡旋至完全溶解, 加入 5 mL 乙醚, 涡旋振荡 5 min, 5000 r/min 离心 5 min, 吸出上层乙醚层, 下层再萃取一次, 合并 2 次萃取液, 40 °C 水浴下氮气吹干, 加入 1 mL 乙腈涡旋使残渣完全溶解, 过 0.22 μ m 滤膜, 待上机测定。

标准溶液的衍生: 分别移取 1 mL 组胺标准系列溶液于 15 mL 离心管中, 依次加入 250 μ L 内标使用液(100 mg/L), 以下操作同试样的衍生步骤。

1.2.3 色谱条件

色谱色柱为安捷伦 ZORBAX SB-Aq(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 流动相 A 为含 0.1%乙酸的 0.01 mol/L 乙酸铵溶液, B 为乙腈, 二者的梯度洗脱条件如表 1 所示; 流速为 0.8 mL/min; 进样体积为 20 μ L; 柱温为 35 °C; 检测波长为 254 nm^[17]。

表 1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of mobile phases

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	40	60
18.00	40	60
26.00	10	90
32.00	10	90
32.10	40	60
40.00	40	60

1.2.4 结果计算

样品中组胺的结果计算如公式(1):

$$X=\frac{C\times V\times f}{m}$$
 (1)

式中: X ——试样中组胺的含量, mg/kg;

C ——试样溶液中组胺的质量浓度, mg/L;

V ——定容体积, mL;

f ——稀释倍数;

m ——试样称样量, g。

2 结果与分析

2.1 组胺和内标的色谱图

组胺及内标没有紫外发色基团, 但是丹磺酰氯可以

与伯胺或仲胺基上的活泼氢反应, 脱掉一分子的 HCl 生成具有紫外吸收的衍生物, 反应式如图 1 所示。由衍生后的组胺和内标的标准溶液上机得到的保留时间分别为 26.562 和 30.474 min, 组胺和内标的标准色谱图如图 2 所示。本研究中标样品的色谱图如图 3 所示, GB 5009.208—2016^[17]方法中标样品的色谱图如图 4 所示。对比图 3 和图 4 可知 GB 5009.208—2016^[17]方法中组胺的色谱峰峰高明显小于本研究中组胺的色谱峰峰高, GB 5009.208—2016^[17]方法中内标 1,7-二氨基庚烷未检测到峰, 表明国标方法未经萃取净化的酱油样品中的组胺和内标在衍生反应中受到了抑制。

2.2 标准工作曲线及检出限、定量限

用本研究前处理得到的衍生后的组胺和内标的系列

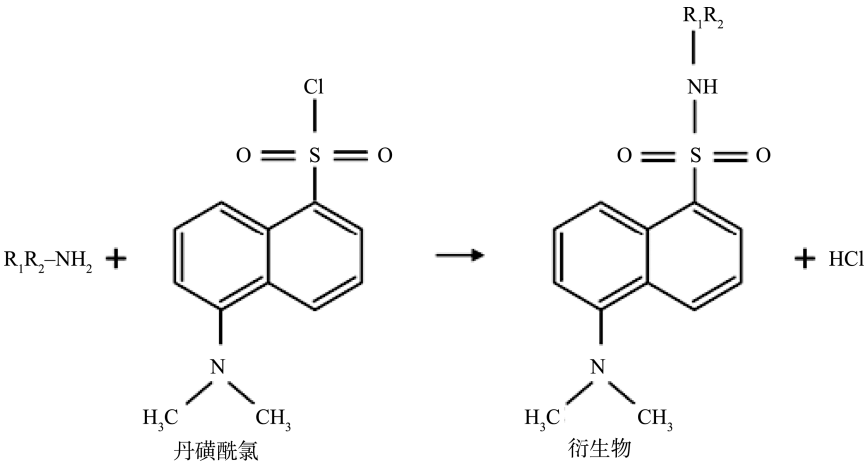


图 1 组胺及内标与丹磺酰氯的反应式

Fig.1 Reaction formula of histamine and internal standard with dansyl chloride

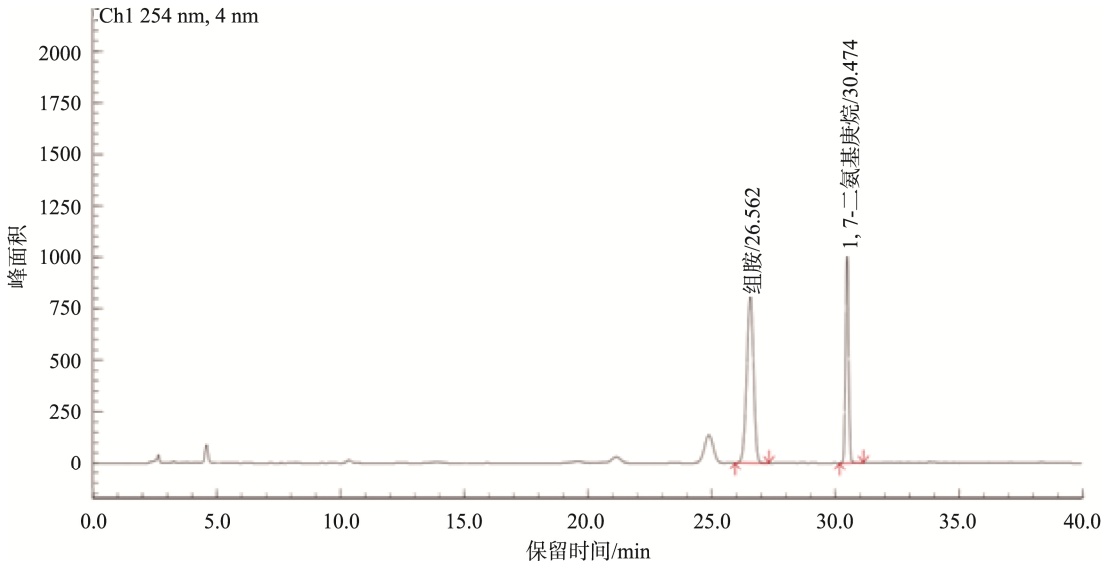


图 2 组胺和内标的标准色谱图

Fig.2 Standard chromatograms of histamine and internal standard

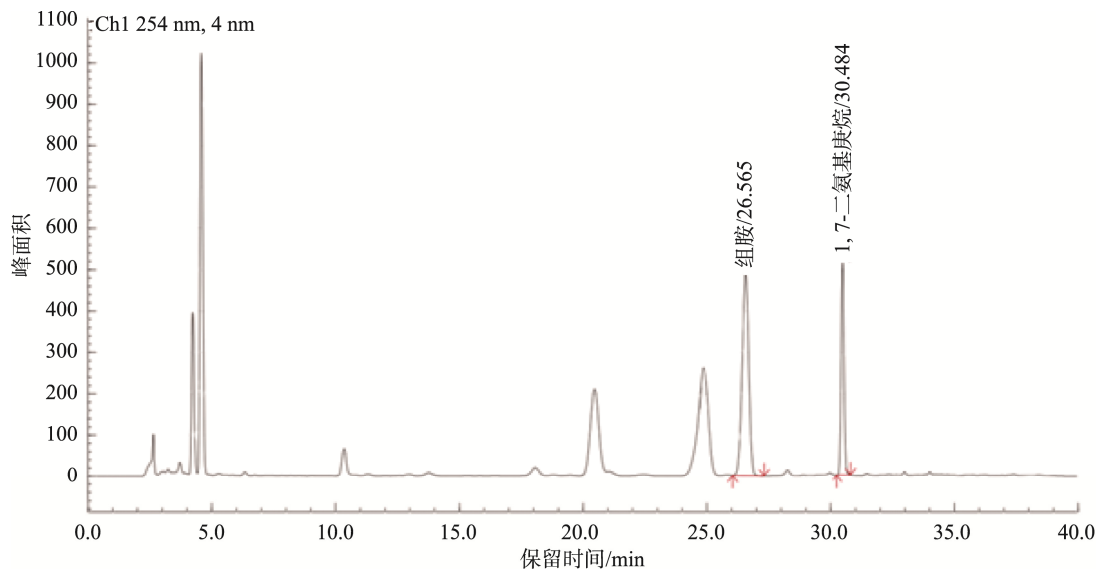


图 3 本研究中样品的色谱图
Fig.3 Chromatograms of the samples in this method

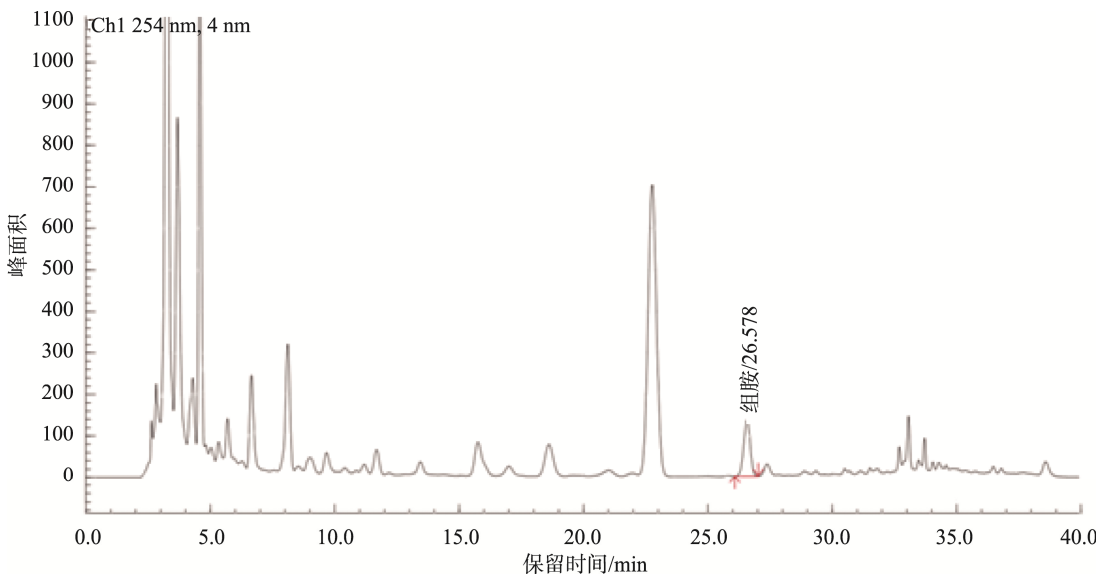


图 4 国标方法中的样品的色谱图
Fig.4 Chromatograms of samples in GB method

标准溶液上机测试,以组胺与内标的面积比对浓度比作线性回归方程,得到此标准曲线的线性回归方程为 $Y=1.13076X-0.00115989$,线性范围为1~100 mg/L,相关系数 $r=0.9999$,方法的检出限以信噪比(S/N)约为3来确定,方法的定量限以信噪比(S/N)约为10来确定,当组胺的添加浓度为0.5 mg/kg时,测得的色谱峰信噪比约为3,当组胺的添加浓度为1.5 mg/kg时,测得的色谱峰信噪比约为10,由此得出本研究中组胺的检出限为0.5 mg/kg,定量限为1.5 mg/kg。图5为组胺的标准曲线,其中横坐标为浓度比,纵坐标为面积比。

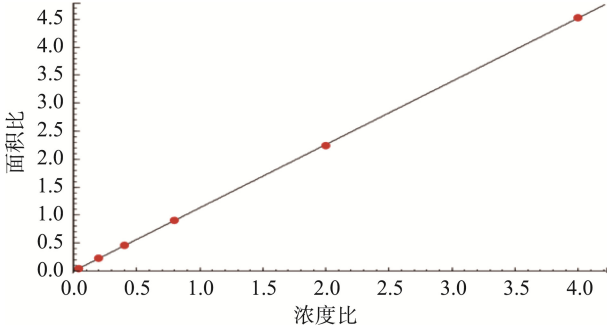


图 5 组胺的标准曲线
Fig.5 Standard curves of histamine

2.3 回收率和精密度

对空白酱油样品添加 3 个水平的不同含量的组胺分别重复测定 6 次, 加入空白酱油样品中组胺的含量分别为 1.0、10.0、50.0 mg/kg, 经前处理上机测试, 计算其回收率和相对标准偏差, 结果见表 2。由表 2 可知, 3 个水平的回收率在 88.0%~104.2% 之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 2.59%~6.48%之间, 每个水平的回收率和精密度均符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[18]的要求。

2.4 酱油样品中组胺的含量

对 11 种市售酱油样品中组胺的含量进行测定, 结果如表 3 所示。由表 3 可知, 11 种酱油中有 9 种检测出组胺, 并且各个样品中组胺的含量差异较大, 11 种酱油样品组胺含量范围为 0 ~ 147.1 mg/kg。

3 结 论

通过正丁醇/三氯甲烷(1:1, V:V)萃取净化, 丹磺酰氯柱前衍生-高效液相色谱法对酱油中的组胺进行测定, 与现有国标方法相比, 该方法很好的避免了酱油中一些干扰物质对衍生反应的影响, 具有线性范围宽、检出限低、精密度高、稳定性强等优点, 适用于酱油中组胺含量的测定。

表 2 回收率和精密度实验结果(n=6)
Table 2 Results of recovery rate and precision test (n=6)

样品	添加量/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
1	1.0	0.904	90.4	6.48
	1.0	0.963	96.3	
	1.0	0.937	93.7	
	1.0	0.880	88.0	
	1.0	1.010	101.0	
	1.0	1.042	104.2	
2	10.0	9.235	92.4	5.83
	10.0	9.404	94.0	
	10.0	10.181	101.8	
	10.0	8.907	89.1	
	10.0	9.149	91.5	
	10.0	10.224	102.2	
3	50.0	46.303	92.6	2.59
	50.0	47.231	94.5	
	50.0	46.543	93.1	
	50.0	48.885	97.8	
	50.0	47.701	95.4	
	50.0	45.390	90.8	

表 3 11 种酱油中组胺的含量
Table 3 Content of histamine in 11 kinds of soy sauce

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
组胺含量/(mg/kg)	17.4	56.8	未检出	25.4	147.1	12.8	120.6	55.5	89.2	12.1	未检出

参考文献

[1] 金高娃, 蔡友琼, 于慧娟, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定鱼罐头中的组胺[J]. 色谱, 2010, 28(11): 1099–1102.
JIN GW, CAI YQ, YU HJ, *et al.* Determination of histamine in canned fish by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(11): 1099–1102.

[2] 郭慧, 刘晓琴, 晁鲁平, 等. UPLC 柱前衍生法分析小黄鱼中生物胺[J]. 中国食品学报, 2017, 17(5): 194–199.
GUO H, LIU XQ, CHAO LP, *et al.* Determination of biogenic amines in small yellow croakers by UPLC with precolumn dansylations and analysis of the characteristic biogenic amines [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2017, 17(5): 194–199.

[3] 王新南. 发酵豆制品中生物胺含量研究进展[J]. 中国调味品, 2019, 44(9): 188–190.
WANG XN. Research progress of biogenic amines in fermented soybean products [J]. China Cond, 2019, 44(9): 188–190.

[4] 朱天傲, 刘春风, 王金晶, 等. 国产酱类产品中的生物胺[J]. 食品与发

酵工业, 2017, 43(10): 220–227.
ZHU TA, LIU CF, WANG JJ, *et al.* Biogenic amines in commercial sauce products in China [J]. Food Ferment Ind, 2017, 43(10): 220–227.

[5] 胡家伟, 高榕, 曹敏杰, 等. 水产食品中组胺的丹磺酰氯柱前衍生反相高效液相色谱测定方法的建立及应用[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 283–288.
HU JW, GAO R, CAO MJ, *et al.* Establishment and application of dansyl chloride precolumn derivatization RP-HPLC for determination of histamine in aquatic products [J]. Food Sci, 2014, 35(8): 283–288.

[6] TSAI YH, KUNG HF, LEE TM. *et al.* Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning [J]. Food Control, 2005, 16(7): 579–585.

[7] KUNG HF, LEE YH, CHANG SC, *et al.* Histamine contents and histamine-forming bacteria in sufu products in Taiwan [J]. Food Control, 2007, 18(5): 381–386.

[8] 邹阳, 赵谋明, 赵海峰. 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(5): 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(5): 570–573.
- [9] 于金芝, 徐峰, 徐莹. 高盐稀态酱油生产过程中的生物胺变化规律[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(10): 44–49.
- YU JZ, XU F, XU Y. Analysis on the change rule of biogenic amines during the process of high-salt diluted soy sauce [J]. *Food Ferment Ind*, 2016, 42(10): 44–49.
- [10] 朱丽丽, 汪云, 曹玉华. 柱前衍生毛细管电泳-电化学检测组胺[J]. *分析科学学报*, 2009, 25(3): 344–346.
- ZHU LL, WANG Y, CAO YH. Pre-column derivatization of capillary electrophoresis-electrochemical detection of histamine [J]. *J Anal Sci*, 2009, 25(3): 344–346.
- [11] SACCANI G, TANZI E, PASTORE P, *et al.* Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode [J]. *Food Chem*, 2007, 105(4): 1652–1658.
- [12] 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, 31(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, 31(2): 111–116.
- [13] 何功浩, 周四元, 胡静, 等. 荧光分光光度法检测组织中的组胺[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2007, 36(2): 275–278.
- HE GH, ZHOU SY, HU J, *et al.* Determination of histamine in tissues by fluorometric method [J]. *Acta Med Univ Scientiae Technol Huazhong (Med Ed)*, 2007, 36(2): 275–278.
- [14] 肖琴, 王允, 郑琳, 等. 高效液相色谱法测定发酵食品中组胺的含量[J]. *粮油食品科技*, 2012, 20(2): 31–33.
- XIAO Q, WANG Y, ZHENG L, *et al.* Determination of histamine in the fermented food by HPLC [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2012, 20(2): 31–33.
- [15] 刘冬妮, 符郁馥, 韦盈, 等. 国标法测定鱼肉中组胺的方法改进[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(6): 241–245.
- LIU DN, FU YF, WEI Y, *et al.* Improvement of the method in Chinese national standards for the determination of histamine in fish meat [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2019, 40(6): 241–245.
- [16] 金安宝. 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.
- JIN AB. Improvement of determination method of histamine in aquatic products [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, 17(1): 149–150.
- [17] GB 5009.208—2016 食品安全国家标准 食品中生物胺的测定[S].
- GB 5009.208—2016 National food safety standard-Determination of biogenic amines in food [S].
- [18] GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
- GB/T 27404—2008 Laboratory quality control specification-Food physical and chemical examination [S].

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



朱 帅, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 1040600611@qq.com

张水锋, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 65965996@qq.com