

组胺胶体金免疫快速检测试纸条研制及其在水产品检测中的应用

王炳志¹, 骆和东^{2*}, 叶雅真², 严义勇¹, 袁克湖¹, 杨星星¹, 许稳健¹, 颜文豪¹

(1. 深圳市易瑞生物技术股份有限公司, 深圳 518101; 2. 厦门市食品药品质量检验研究院, 厦门 361012)

摘要: **目的** 研制基于胶体金免疫层析法的组胺快速检测试纸条, 并探究其在水产品中的应用。**方法** 以组胺为原料, 采用琥珀酸酐对其衍生化合成半抗原; 活泼酯法将半抗原与白蛋白偶联得到人工抗原; 用人工抗原免疫小鼠获得单克隆抗体。采用上述原料制备出本研究试纸条, 依据国家《食品快速检测方法评价技术规范》进行评价。**结果** 所研制试纸条对水产品中组胺检出限为高组胺鱼类 400 mg/kg、一般海水鱼类及虾 200 mg/kg。可特异性地检测残留组胺, 而对其他与组胺结构或功能相似的生物胺无交叉反应。**结论** 本研究提供的试纸条操作简便, 具有较高的灵敏度和特异性, 可广泛应用于水产品中组胺的现场筛查和快速检测。

关键词: 组胺; 胶体金免疫层析法; 水产品; 快速检测

Development of histamine colloidal gold immune rapid detection test strip and its application in aquatic products

WANG Bing-Zhi¹, LUO He-Dong^{2*}, YE Ya-Zhen², YAN Yi-Yong¹, YUAN Ke-Hu¹,
YANG Xing-Xing¹, XU Wen-Jian¹, YAN Wen-Hao¹

(1. Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518101, China; 2. Xiamen Institute for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361012, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid test strip for histamine detection based on colloidal gold immunochromatography, and explore its application in aquatic products. **Methods** Histamine was used as starting material and succinic anhydride was used to derivatize it to synthesize the hapten; activated ester method was used to couple the hapten with albumin to obtain artificial antigen; mice were immunized with artificial antigen to obtain monoclonal antibody. The test strip for this study was prepared as described above, the strip was evaluated according to the national "Food rapid detection method evaluation technical specification". **Results** The detection limits of the strip for high histamine fish and common fish and shrimp were 400 and 200 mg/kg respectively. The residue of histamine could be specifically detected with no obvious cross reaction to other biogenic amines with similar structure or function to histamine. **Conclusion** The test strip provided in this study is easy to operate, with high sensitivity and specificity, and can be widely used in the field screening and rapid detection of histamine in aquatic products.

基金项目: 国家市场监督管理总局项目(KJ202102)、深圳市科创委项目(JSGG20180508152235868)、广东省科技厅项目(2014ZT05S123)

Fund: Supported by the Project of State Administration for Market Regulation (KJ202102), the Project of Shenzhen Science and Technology Commission (JSGG20180508152235868), and the Project of Guangdong Province Scientific and Technological Department (2014ZT05S123)

*通信作者: 骆和东, 硕士生导师, 主任技师, 主要研究方向为食品卫生与安全。E-mail: luohedong@126.com

*Corresponding author: LUO He-Dong, Chief Technician, Xiamen Institute for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361012, China. E-mail: luohedong@126.com

KEY WORDS: histamine; colloidal gold immunochromatography; aquatic products; rapid detection

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],特别是水产品中。组胺是由鱼体内的游离组氨酸在鱼的存放过程中经脱羧而形成的腐败性胺类物质,是毒性最强的生物胺之一^[3]。因此组胺含量的高低不仅是判断食品新鲜度和腐败程度的一项重要指标,也是引发水产品食物中毒的关键因素之一。

组胺中毒事件国内外均有报道,大多是由于食用不新鲜或腐败的鱼类引起的。一般认为,成人摄入 100 mg 组胺时就有可能引起中毒症状^[4],严重时可引起大脑出血甚至死亡^[5-7]。据统计,1998—2018 年我国水产品组胺中毒报道案例共 18 例,其中鲐鱼(青占鱼、油筒鱼、鲐鲅鱼)引起的组胺中毒事件最多,为 13 例^[8],检出的组胺含量范围为 120~3820 mg/kg。在欧盟,2015 年组胺中毒占总食品中毒案例比重高达 22.5%^[9]。GB 2733—2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》中规定了组胺的限量,其中高组胺鱼类 ≤ 40 mg/100 g,其他海水鱼类 ≤ 20 mg/100 g。

目前组胺的检测方法主要有液相色谱法^[10-13]、毛细管电泳法^[14]、离子色谱法^[15]、分光光度法^[16-17]、荧光分光光度法^[18]、液相色谱-质谱联用法^[19-20]、酶联免疫法^[21]等。液相色谱法具有线性关系好、定量分析准确等优点,但检测周期长、操作复杂。组胺本身在可见和紫外区域都没有吸收,也没有荧光发射基团,所以采用液相色谱法或分光光度法测定时,需要对组胺进行衍生化处理或偶氮化反应,操作烦琐,不适用于基层现场的快速检测。液质联用法虽然方法准确,不需衍生就可直接测定,但设备昂贵,对人员和环境要求很高。酶联免疫法虽灵敏度高,样品前处理较为简单,但检测过程易出现交叉反应,造成假阳性^[22],耗时长,操作要求高且烦琐,在现场快速筛查的应用推广上具有一定的难度。要实现对水产品进行现场快速便捷、低成本筛选,还需要建立一种快速、高效的组胺胶体金免疫层析的快速检测方法。

现有的国内外组胺胶体金免疫层析快速检测方法主要为直接测定法,即所采用的抗体是直接针对组胺本身。但是由于组胺分子量太小,检测灵敏度存在一定的局限性。本研究参考 GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》(液相色谱法)测定组胺的原理,通过组胺与衍生剂反应后,生成分子量增大的衍

生物,再利用该衍生物的抗体,开发了一种新的组胺试纸条衍生测定法,从而提高检测灵敏度,实现对组胺的快速检测。

本研究基于胶体金免疫层析法的组胺快速检测试纸条,并根据《食品快速检测方法评价技术规范》(食药监办科[2017]43号)进行方法性能评价,以期满足监管部门及基层人员现场快速筛查水产品中组胺含量的需求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

组胺、色胺、腐胺、尸胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺标准品(纯度 99.0%)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 纯度 98.0%)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA, 纯度 95.0%)、弗氏佐剂(纯度 99.0%)、弗氏不完全佐剂(纯度 99.0%)(美国 Sigma 公司);羊抗鼠 IgG(纯度 95.0%,南京京达生物技术有限公司);3-羟基-4 硝基苯甲酸、N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethyl formamide, DMF)、溴丁酸叔丁酯、羰基二咪唑(carbonyl diimidazole, CDI)、三乙胺(triethylamine, TEA)、对硝基苯甲酰氯、二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)(纯度 95%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);碳酸钾(K_2CO_3 , 分析纯)、无水甲醇(分析纯)、氢氧化锂(LiOH, 分析纯)、乙酸乙酯(色谱纯)(国药集团化学试剂有限公司)。

昆明小鼠、Balb/C 小鼠(广东医学实验动物中心)。

硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC 膜)(美国 Millipore 公司);吸收垫、吸水纸、聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)衬板(上海金标生物科技有限公司)。

SY-2000 旋转蒸发器(上海贤德实验仪器有限公司);CR21N 高速冷冻离心机[日立(中国)有限公司];Lyo-3 真空冷冻干燥机(上海东富龙科技股份有限公司);ZQ 4000 数控高速斩切机、HM 3260 XYZ 三维大平台感应喷金划膜仪(上海金标生物科技有限公司)。

试样样品(鲐鱼、明虾、马鲛鱼等)(厦门本地水产批发市场采购)。

1.2 实验方法

1.2.1 组胺半抗原的制备

称取 3-羟基-4 硝基苯甲酸 2.0 g,用 30 mL 无水甲醇溶解后,缓慢加入浓硫酸 2 mL,回流反应 5 h,蒸干溶剂,加少量水有黄色固体析出,抽滤,用水洗涤黄色固体,50 ℃左右烘干得到中间体 1。称取中间体 1 1.9 g,

碳酸钾 2.5 g, 加入 30 mL DMF 溶解后 80 °C 反应 10 min, 加入 2.5 g 溴丁酸叔丁酯, 60 °C 搅拌过夜, 反应结束后旋转蒸发仪蒸干溶剂, 加水溶解并用乙酸乙酯萃取 2~3 遍, 乙酸乙酯相蒸干即得比较纯的产物中间体 2。称取中间体 2 3.5 g 溶于 30 mL 无水甲醇中, 将 260 mg LiOH 溶于 15 mL 蒸馏水, 缓慢滴加至甲醇溶液中, 搅拌过夜反应, 反应结束后, 加 1 mol/L 盐酸将反应液 pH 调为微酸性, 旋转蒸发除去甲醇, 有大量浅黄色固体析出, 将固体抽滤, 水洗, 烘干即得中间体 3。称取中间体 3 325 mg, CDI 180 mg, 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 室温下反应 3 h 后, 加入组胺 130 mg 以及 10 mL 左右 DMF, 室温下过夜搅拌反应, 蒸干溶剂即得中间体 4。将中间体 4 中直接加入二氯甲烷 20 mL, 冰浴下加入三氟乙酸 5 mL, 搅拌反应 3 h 后蒸干加入三乙胺 5 mL 中和酸, 再次蒸干得到黄色油状物, 直接过柱纯化到最终产物。组胺半抗原合成路线见图 1。

1.2.2 组胺半抗原与蛋白偶联物的制备

采用活泼酯法^[23]进行半抗原与载体的偶联, 免疫原采用 BSA 为载体, 包被抗原采用 OVA 为载体。取半

抗原 0.1 mmol 溶于 0.5 mL DMF 中, 搅拌加入 DCC 和 NHS 各 0.2 mmol, 4 °C 下磁力搅拌反应 12 h, 离心取上清记为 A 液; 称取载体蛋白 BSA(或 OVA)溶于 4 mL 质量浓度为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS, pH=8.0)中, 记为 B 液; 搅拌下将 A 液缓慢滴入 B 液, 4 °C 搅拌过夜; 离心取上清后于 4 °C 下用 PBS 透析 3 d, 每天换液 4 次, 得到的人工抗原分装冻存于 -20 °C 备用^[24]。分别将偶联物、载体蛋白、半抗原溶液在 200~400 nm 波长间进行紫外吸收光谱分析鉴定。

1.2.3 组胺单克隆抗体的制备

(1) 动物免疫

利用得到的组胺免疫抗原, 免疫 4 只 6 周龄 Balb/C 小鼠, 免疫剂量为 200 µg/只, 加强免疫 3 次后, 使其产生抗血清。

(2) 细胞融合和克隆化

在无菌条件下, 取免疫 Balb/C 小鼠脾脏制备脾细胞, 细胞数量配比按脾细胞:骨髓瘤细胞(SP2/0)=9:1 进行融合, 经 3 次以上的克隆培养和检测, 筛选得到稳定分泌抗组胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

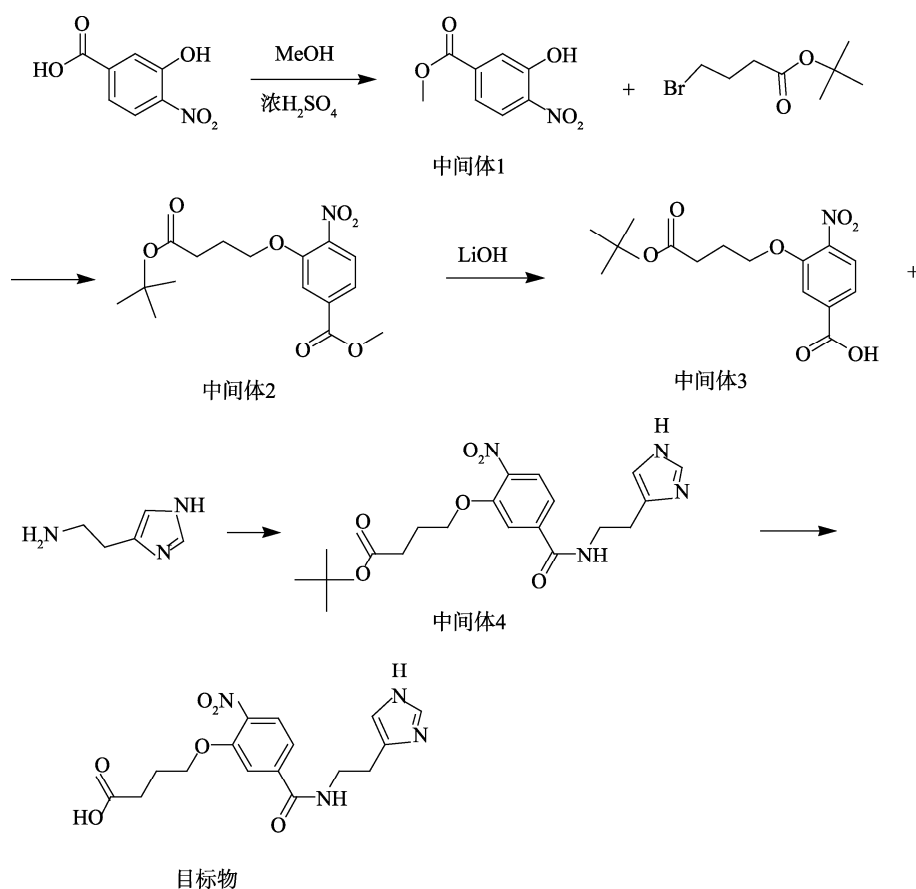


图 1 组胺半抗原合成路线

Fig.1 Synthetic route of histamine hapten

(3) 细胞冻存和复苏

将杂交瘤细胞用冻存液制成 5×10^6 个/mL 的细胞悬液, 在液氮中长期保存。复苏时从液氮罐中取出冻存管, 快速放入 37°C 温水浴中, 并轻轻摇动使其尽快融化, 离心去除冻存液后, 移入细胞培养瓶内培养。

(4) 单克隆抗体的制备与纯化

将杂交瘤细胞扩大培养以备单克隆抗体的制备。采用体内诱生腹水法生产抗组胺单克隆抗体。选 4 只昆明小鼠, 腹腔注射液体石蜡 0.5 mL/只, 7 d 后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^6 个/只, 10 d 后, 待小鼠腹部明显膨大时收集腹水。

将腹水 12000 r/min, 4°C 离心 15 min, 吸弃上层脂类物质, 去沉淀, 收集腹水上清液。边搅拌边加入 5~10 倍体积的 pH 7.4 0.01 mol PBS, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤器过滤, 放置 4°C 备用。再用 Protein A 亲和层析纯化, 得抗组胺单克隆抗体, -20°C 保存^[25]。

1.2.4 组胺免疫层析试纸条的制备与组装

组胺免疫层析试纸条由 PVC 衬板、样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成(图 2)。

将玻璃纤维膜裁成宽度 15 mm 的长条作为样品垫, 经垫处理液浸泡, 37°C 烘干; 将玻璃纤维膜切成宽度 6 mm 的长条作为结合垫, 将金标抗体喷涂在结合垫于 37°C 烘箱烘干 1 h 后备用。用划膜机将包被抗原与二抗分别划膜固定在 NC 膜上分别作为 T 线与 C 线, 两线间距 6 mm, 37°C 烘 1 h; 将吸水纸烘干, 裁成 10 mm 宽的长条。按图 2 所示将准备好的材料组装, 用切条机切成 4 mm 宽的试纸条, 将制备好的试纸条装入卡壳中, 与干燥剂一起密封, 常温保存^[26]。

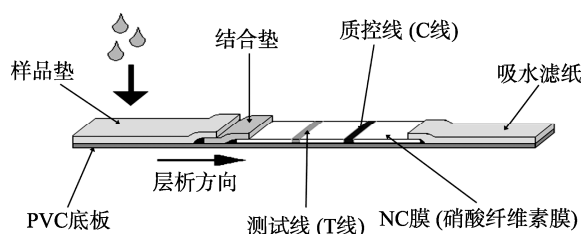


图 2 免疫层析试纸条结构示意图

Fig.2 Schematic illustration of immunochromatographic test strip

1.2.5 水产品样品处理及检测

(1) 试样制备

去头、骨、内脏、鱼皮, 取约 100 g 肌肉, 用组织粉碎机充分粉碎混匀, 均分成 2 份, 分别装入洁净容器作为试样和留样, 密封, 标记, 于 -20°C 保存。

(2) 试样提取

称取试样 $2 \pm 0.02 \text{ g}$ 于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 样品提取液, 涡旋或剧烈振荡 3 min, 4000 r/min 离心 3 min,

取 30 μL 离心后的上清液, 依次加入 1.0 mL 样品提取液、50 μL 样品衍生剂, 充分混匀后, 室温下静置 1 min, 即为样品处理液, 按以下稀释操作, 获取待测液:

高组胺鱼类[指鲐鱼、竹荚鱼、鲭鱼、鲉鱼、金枪鱼、秋刀鱼、马鲛鱼、鲈鱼(青占鱼)、沙丁鱼等青皮红肉海水鱼]: 取 40 μL 样品处理液, 加入 2.0 mL 样品稀释液, 混匀, 即为待测液。

其他海水鱼类: 取 40 μL 样品处理液, 加入 1.0 mL 样品稀释液, 混匀, 即为待测液。

(3) 样品测定及结果判定

测试前, 将未开封的检测卡恢复至室温。吸取 60 μL 样品待测液于检测卡的加样孔中, 室温温育 5~8 min, 直接通过对比控制线(C线)和检测线(T线)的颜色深浅进行结果判定。结果判定示意图见图 3。

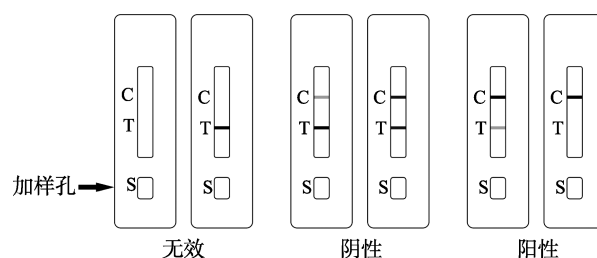


图 3 结果判定示意图

Fig.3 Schematic diagram of result determination

无效: 控制线(C线)不显色, 无论检测线(T线)是否显色, 均表示实验结果无效。

阴性结果: 控制线(C线)显色, 若检测线(T线)颜色深于或等于控制线(C线), 表示试样中不含待测组分或其含量低于方法检出限, 判为阴性。

阳性结果: 控制线(C线)显色, 若检测线(T线)不显色或颜色浅于控制线(C线), 表示试样中含有待测组分且其含量高于方法检出限, 判为阳性。

2 结果与分析

2.1 空白基质的选择

根据组胺在实际水产品中的检出情况及国内外不同鱼种限量规定的适用范围, 本研究首先在厦门本地水产批发市场采购不同产地来源的鱼类和虾样本, 经液相色谱法测试确认其均不含组胺, 为空白样本。

2.2 加标样品的均一性验证

采用液相色谱法确认后的空白样品加标制备验证用样品, 参照 CNAS-GL003—2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》中均匀性检验单因子方差分析评价样品的均匀性。

对制取的水产品加标样品进行均一性验证, 方法采

用 GB 5009.208—2016。2 次平行测定结果: 鲈鱼中组胺在 200 和 400 mg/kg 的方差分析(F 值)分别为 1.27 和 2.40, 明虾中组胺在 200 和 400 mg/kg 的 F 值分别为 0.84 和 1.50, 马鲛鱼中组胺在 400 和 800 mg/kg 的 F 值分别为 1.57 和 1.34, 均小于 $F_{0.05}(9,10)=3.02$, 这表明在显著性水平 $\alpha=0.05$ 时, 鲈鱼、明虾和马鲛鱼中组胺含量没有差异, 样品都是均匀的, 可用于盲样验证。

2.3 试纸条检出限测试

GB 2733—2015 规定高组胺鱼类组胺 ≤ 40 mg/100 g, 在其他海水鱼类中 ≤ 20 mg/100 g。测试过程中取高组胺鱼类秋刀鱼、马鲛鱼、竹荚鱼、巴浪鱼(鲹鱼)的空白样品基质和空白基质溶液配制浓度水平为 200、400、800 mg/kg 的组胺基质标准溶液, 每个浓度水平各 50 份(其中秋刀鱼、

马鲛鱼各 15 份, 竹荚鱼、巴浪鱼各 10 份)。取一般海水鱼虾类鲈鱼、黄花鱼、黄翅鱼、白鲳鱼、明虾的空白样品基质和空白基质溶液配制浓度水平为 100、200、400 mg/kg 的组胺基质标准溶液, 每个浓度水平各 50 份(其中鲈鱼、黄花鱼、白鲳鱼、黄翅鱼、明虾各 10 份), 按上述方法对本研究开发的试纸条进行检出限实验, 结果见表 1~3。由表 1~3 可见, 对于本研究开发的组胺快速检测试纸条, 高组胺基质鱼类在组胺浓度为 0、200 mg/kg 时均呈阴性, 在组胺浓度为 400、800 mg/kg 时均呈阳性。一般鱼虾类在组胺浓度为 0、100 mg/kg 时均呈阴性, 在组胺浓度为 200、400 mg/kg 时均呈阳性。因此确定组胺快速检测试纸条在高组胺和一般鱼虾类样品中检出限分别为 400、200 mg/kg, 符合要求。

表 1 产品检出限测试结果(高组胺鱼类)($n=50$)
Table 1 Detection limit test results (high histamine fish) ($n=50$)

添加水平	0 mg/kg		200 mg/kg		400 mg/kg		800 mg/kg	
结果	阳	阴	阳	阴	阳	阴	阳	阴
马鲛鱼	0	15	0	15	15	0	15	0
秋刀鱼	0	15	0	15	15	0	15	0
竹荚鱼	0	10	0	10	10	0	10	0
巴浪鱼	0	10	0	10	10	0	10	0
合计	0	50	0	50	50	0	50	0

表 2 产品检出限测试结果(一般鱼虾类)($n=50$)
Table 2 Detection limit test results (common fishes and shrimps) ($n=50$)

添加水平	0 mg/kg		100 mg/kg		200 mg/kg		400 mg/kg	
结果	阳	阴	阳	阴	阳	阴	阳	阴
鲈鱼	0	10	0	10	10	0	10	0
黄花鱼	0	10	0	10	10	0	10	0
白鲳鱼	0	10	0	10	10	0	10	0
黄翅鱼	0	10	0	10	10	0	10	0
明虾	0	10	0	10	10	0	10	0
合计	0	50	0	50	50	0	50	0

表 3 检出限测试结果统计
Table 3 Statistics of detection limit test results

样品检测情况	高组胺鱼类		总数	一般鱼虾类		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性	
阳性	100	0	100	100	0	100
阴性	0	100	100	0	100	100
总数	100	100	200	100	100	200
灵敏度($p+$)	$p+=100/100=100\%$			$p+=100/100=100\%$		
特异性($p-$)	$p-=100/100=100\%$			$p-=100/100=100\%$		
假阳性率($pf+$)	$pf+=0/100=0\%$			$pf+=0/100=0\%$		
假阴性率($pf-$)	$pf-=0/100=0\%$			$pf-=0/100=0\%$		

2.4 交叉反应实验

取 7 份空白鲈鱼基质样品, 每份分别加入色胺、腐胺、尸胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺 7 种不同的生物胺单标, 制备成各自含有不同单组分生物胺浓度水平为 5000 mg/kg 的 7 份样品。另取鲈鱼、明虾、马鲛鱼空白基质, 分别加入这 7 种生物胺的混合标准溶液, 制备成 7 种生物胺各组份浓度水平分别为 5000、5000、10000 mg/kg 的样品, 按产品说明书进行 3 次重复实验, 考察组胺试纸条与上述化合物的交叉反应, 结果如表 4 所示, 表明试纸条与相似生物胺在 5000 mg/kg 浓度下无交叉反应。

表 4 交叉反应实验结果
Table 4 Experimental results of cross reaction test

基质	生物胺	添加浓度/(mg/kg)	试纸条结果
鲈鱼	色胺	5000	-
	腐胺	5000	-
	尸胺	5000	-
	章鱼胺	5000	-
	酪胺	5000	-
	亚精胺	5000	-
	精胺	5000	-
	7 种混合胺	5000	-
明虾	7 种混合胺	5000	-
马鲛鱼	7 种混合胺	10000	-

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性, 下同; 7 种混合胺为色胺、腐胺、尸胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺。

2.5 有证参考物质验证

有证参考物质为鱼肉粉中组胺残留量检测质控样品(编号: CFAPA-QC056B-1), 购自大连中食国实检测技术有限公司, 浓度为 452.8 mg/kg, 标准差 64.9 mg/kg。经液相色谱法定量确认组胺含量为 450.2 mg/kg, 用组胺快速检测试纸条进行验证, 组胺验证结果均为阳性,

结果满足要求。

2.6 真实性样品验证

由于不同水产品在腐败变质过程中会自身产生不同生物胺, 从市场购买了巴浪鱼(学名蓝圆鲹)、黄鱼、基围虾放置室温任其自然腐败后, 用参比方法 GB 5009.208—2016 检测生物胺含量, 同时采用本研究制备的组胺胶体金试纸条进行比对验证。

3 种基质腐败前用液相色谱法检测组胺及色胺、腐胺、尸胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺生物胺, 均未检出。用本研究制备的组胺胶体金试纸条检测均呈阴性。样品放置室温自然腐败 5 d 后, 用液相色谱法测得巴浪鱼组胺高达 4289.6 mg/kg, 同时检出了色胺、腐胺、尸胺、酪胺。黄鱼和基围虾未检出组胺, 但检出腐胺、尸胺、酪胺。腐败后的样品用本研究制备的组胺胶体金试纸条进行验证, 组胺验证结果巴浪鱼为阳性, 基围虾、黄鱼为阴性, 与参比方法一致, 也说明其他生物胺的存在对本方法不会产生交叉反应。测试结果如表 5 所示。

3 结论与讨论

本研究通过制备组胺半抗原, 分别与 BSA 和 OVA 偶联得到免疫抗原和包被抗原, 并用免疫抗原制备出组胺单克隆抗体, 最终制备出应用于一种快速检测水产品中组胺的胶体金免疫层析快速检测试纸条。在试样提取过程中, 通过不同缓冲液的稀释, 解决了高组胺鱼类和其他海水鱼类等水产品限量标准不同的问题, 使得方法的检出限能够直接满足国家对不同鱼类组胺的限量要求。

根据《食品快速检测方法评价技术规范》, 本研究对组胺试纸条进行方法性能指标评价, 结果表明方法性能指标符合国家食品快速检测方法要求: 灵敏度 $\geq 95\%$, 特异性 $\geq 85\%$; 假阳性率 $\leq 5\%$, 假阴性率 $\leq 15\%$ 。

本研究研制的试纸条操作简单, 易于现场直接判定, 不需要昂贵的仪器设备, 经过验证本试纸条各项性能指标符合要求, 与参比方法 GB 5009.208—2016 的比对结果满意, 建立方法可行, 可以应用于水产品中组胺的快速检测。

表 5 真实性样品验证结果
Table 5 Validation results of true positive samples

方法 样品	液相色谱法/(mg/kg)								试纸条
	组胺	色胺	腐胺	尸胺	章鱼胺	酪胺	亚精胺	精胺	
巴浪鱼	4289.6	94.5	402.9	592.4	ND	249.9	ND	ND	+
基围虾	ND	ND	544.0	514.1	ND	348.9	ND	ND	-
黄鱼	ND	ND	127.5	373.2	ND	228.6	ND	ND	-

注: “ND”表示未检出。

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] 王光强, 俞剑葵, 胡健, 等. 食品中生物胺的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 269–278.
WANG GQ, YU JS, HU J, *et al.* Progress in research on biogenic amines in foods [J]. Food Sci, 2016, 37(1): 269–278.
- [4] SANTOS MHS. Biogenic amines: Their importance in foods [J]. Int J Food Microbiol, 1996, 29(4): 213–231.
- [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] 谭彦君, 彭接文, 陈子慧, 等. 鱼类罐头相关食品标准法规中组胺指标探讨[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 3(4): 389–393.
TAN YJ, PENG JW, CHEN ZH, *et al.* Discussion on the index of histamine for canned fish in relative food standards and regulations [J]. Chin J Food Hyg, 2019, 3(4): 389–393.
- [9] 王杨. HPTLC-FLD-SERS 快速定量筛选、分子确证鱼肉中组胺残留[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
WANG Y. HPTLC-FLD-SERS for rapid quantitative screening and molecular conformation of histamine residues in fish [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [10] 黄新华, 陈本美, 梁绍先, 等. 高效液相色谱法测定生物组织中的组胺[J]. 分析化学, 2000, 28(7): 865–867.
HUANG XH, CHEN BM, LIANG SX, *et al.* Determination of histamine in biological sample by high performance liquid chromatography with fluorescence detection after post column-derivatization [J]. Chin J Anal Chem, 2000, 28(7): 865–867.
- [11] 梅光明, 郭远明, 陈雪昌, 等. 高效液相色谱法测定鱼粉中组胺含量[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2011, 30(5): 397–400.
MEI GM, GUO YM, CHEN XC, *et al.* Determination of histamine in fish meal by HPLC [J]. J Zhejiang Ocean Univ (Nat Sci Ed), 2011, 30(5): 397–400.
- [12] LIU SJ, XU JJ, MA CL, *et al.* A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC [J]. Food Chem, 2018, 266(6): 275–283.
- [13] MICHIKAZU T, NAKAMURA T, KUSUNOKI H, *et al.* Validation of HPLC method for determination of histamine in human immunoglobulin formulations [J]. J AOAC Int, 2020, 103(5): 1223–1229.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 赵宇明. 分光光度法快速测定水产品中组胺的含量[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(8): 94–96.
ZHAO YM. Rapid detection histamine content in aquatic product using spectrophotometry [J]. Food Res Dev, 2014, 35(8): 94–96.
- [17] 张继红, 马俊华, 刘平. 分光光度法测定鱼类产品中组胺[J]. 医学动物防制, 2013, 29(9): 1060–1061.
ZHANG JH, MA JH, LIU P. Spectrophotometric method for the determination of histamine in fish products [J]. J Med Pest Control, 2013, 29(9): 1060–1061.
- [18] 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 Sci Technol Huazhong (Med Ed), 2007, 36(2): 275–278.
- [19] 彭祺, 边威, 王芳, 等. 液质联用法测定黄酒中生物胺含量[J]. 酿酒科技, 2014, (2): 79–82.
PENG Q, BIAN W, WANG F, *et al.* Determination of biogenic amines in yellow rice wine by HPLC-MS/MS [J]. Liquor-Mak Sci Technol, 2014, (2): 79–82.
- [20] 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.
- [21] 麻丽丹, 巴中华. 酶联免疫吸附试验法检测盐渍鲢鱼中的组胺[J]. 中国酿造, 2008, (14): 85–86.
MA LD, BA ZH. Histamine in pickled *Engraulis japonicus* detection by ELISA [J]. China Brew, 2008, (14): 85–86.
- [22] 刘光明, 刘红, 闵娟, 等. 海产食品中生物胺的分析评价及控制策略[J]. 中国食品学报, 2017, 17(8): 1–11.
LIU GM, LIU H, MIN J, *et al.* Evaluation methods and control measures of biogenic amines in seafood [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2017,

- 17(8): 1–11.
- [23] SINGH KV, KAUR J, VARSHNEY GC, *et al.* Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules [J]. *Bioconjugate Chem*, 2003, 15(1): 168–173.
- [24] 袁利鹏, 刘波. 间接竞争酶联免疫吸附测定水产品中的组胺残留[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(7): 291–295.
- YUAN LP, LIU B. Determination of histamine residues in aquatic products by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2019, 35(7): 291–295.
- [25] 徐振林, 孙远明, 罗林, 等. 一种组胺半抗原、人工抗原、抗体及其制备方法与应用: 中国, CN 103288741 B [P]. 2015-09-30.
- XU ZL, SUN YM, LUO L, *et al.* The invention relates to a histamine hapten, an artificial antigen and an antibody, and a preparation method and application thereof: China, CN 103288741 B [P]. 2015-09-30.
- [26] 徐振林, 罗林, 周泳麒, 等. 胶体金免疫层析法测定酸奶中组胺含量及教学应用[J]. *分析试验室*, 2018, 37(7): 769–773.
- XU ZL, LUO L, ZHOU YQ, *et al.* Determination of histamine in yogurt

by colloidal gold immunochromatography and its application on teaching [J]. *Chin J Anal Lab*, 2018, 37(7): 769–773.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



王炳志, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全快速检测。

E-mail: wangbz@bioeasy.com



骆和东, 硕士生导师, 主任技师, 主要研究方向为食品卫生与安全。

E-mail: luohedong@126.com