

生物胺高效液相色谱法测定条件的选择与优化

翟红蕾^{1,2}, 杨贤庆^{1,*}, 郝淑贤¹, 岑剑伟¹, 魏涯¹, 石红¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 利用反相高效液相色谱、荧光/二极管阵列检测器对 8 种生物胺进行测定, 通过对流动相选择、流动相梯度洗脱设定、检测器比较、检测波长比较及其他条件的探讨, 得出高效液相色谱法测定生物胺的最佳色谱条件。结果确定, 采用乙腈-乙酸铵-超纯水作为流动相经梯度洗脱, 8 种生物胺在 30min 内全部被分离出且峰形对称无拖尾和前伸现象。改进后的色谱条件可节约样品分析时间, 荧光检测器的高选择性和灵敏性能够满足高精度生物胺检测分析的要求。

关键词: 高效液相色谱; 生物胺; 条件优化

Optimization of Operating Conditions for HPLC Determination of Biogenic Amines

ZHAI Hong-lei^{1,2}, YANG Xian-qing^{1,*}, HAO Shu-xian¹, CEN Jian-wei¹, WEI Ya¹, SHI Hong¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to establish a reversed-phase HPLC method for the determination of 8 biogenic amines, mobile phase composition, elution mode, detector type and detection wavelength were optimized. Gradient elution using a mobile phase composed of acetonitrile, ammonium acetate and ultra-pure water proved optimal, and 8 biogenic amines were completely separated within 30 min, showing symmetrical peak shapes without tails and extension. The optimization resulted in a time-saving analytical method. Moreover, fluorescence detector (FLD) presented higher selectivity and sensitivity when compared with diode array detector (DAD) so that it can meet the requirements for accurate determination of biogenic amines.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); biogenic amines; measurement conditions optimization

中图分类号: S912

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0180-05

生物胺是一类含氮的脂肪族、芳香族或杂环类有机化合物, 通常分单胺和多胺两大类。其广泛存在于水产品、肉制品、乳制品、葡萄酒、啤酒、蔬菜、水果、坚果及巧克力等食品中。在人和动物机体细胞中, 适当含量的生物胺(组胺、色胺、精胺、尸胺等)具有调节生长、增强代谢活力、控制血压和消除自由基等方面的作用^[1]。而当机体摄入大量生物胺后, 将产生一系列应激反应, 引起头痛、呼吸紊乱、心悸、血压变化等不良症状, 造成神经系统和心血管系统的损伤, 严重情况下, 可引起大脑出血, 甚至死亡^[2-3]。Askar 等^[4]指出, 当体内组胺量达到 500mg/kg 时可对人体健康

造成危害。还有研究指出, 食品中组胺含量达到 100 ~ 800mg/kg 的酪胺及 30mg/kg 的 2-苯乙胺均可致毒^[5]。动物机体内的二胺氧化酶及组胺转甲基酶都能够降解组胺, 而腐胺和尸胺可抑制这两种酶的代谢作用从而增强组胺的毒性^[6], 并且这两种胺能够与亚硝酸盐反应产生亚硝胺, 具有潜在的致癌性^[7-8]。因此, 监控食品中的生物胺水平, 控制食品中生物胺的形成, 有助于提高和改善食品的质量和安全性。

目前, 生物胺的检测方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[9-11]、气相色谱法(gas chromatography, GC)^[12]、离子色谱法(ion

收稿日期: 2011-06-16

基金项目: 国家农业产业技术体系项目(nycytx-48); 国家公益性行业(农业)科研专项(201003055-06);

国家农业科技成果转化项目(2010GB23260577; 2009GB2E200303; 2010GB2E000335);

“十一五”广东省科技计划项目(2009A020700004; 2008A020100006; 2009B020201003);

广东省海洋渔业科技推广项目(A200899B02; A200901C01)

作者简介: 翟红蕾(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: zhaizaizai@126.com

* 通信作者: 杨贤庆(1963—), 男, 研究员, 研究方向为水产品加工与质量安全。E-mail: yxqgd@163.com

chromatography, IC)^[13]、薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)^[14]、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)^[15]、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[16]等。其中, HPLC 具有分析速度快、柱效高、检测灵敏度高、定量分析准确的特点, 是食品中生物胺含量分析测定的主要手段。但是, 目前不同研究中采用 HPLC 进行生物胺分析时, 设定的色谱条件往往不相同。Marcobal 等^[17]利用 HPLC 对西班牙红酒进行测定, 每个样品的分析时间为 60min; Anli 等^[18]的样品分析时间为 40min, 但是其流动相的准备较为复杂。为此, 本实验从流动相选择、梯度洗脱设置、柱温、检测器选择、检测波长选择对色谱条件进行探讨和优化, 确立同时测定 8 种生物胺的最佳 HPLC 色谱条件, 以满足不同生物胺测定的要求。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

组胺(HIS, 97%)、色胺(TRP, 98%)、2- 苯乙胺(2-PHE, 99.5%)、尸胺(CAD, 97%)、腐胺盐酸盐(PUT, 99%)、亚精胺盐酸盐(SPM, 98%)、精胺(SPD, 97%)、酪胺(TYR, 99%)标准品 美国 Sigma 公司。

乙腈(色谱纯)、丹磺酰氯(99%)、1,7- 二氨基庚烷(98%) 美国 Sigma 公司; 甲醇(色谱纯)、丙酮(色谱纯) 美国 Burdick & Jackson 公司; 盐酸、氢氧化钠、乙酸铵、碳酸氢钠、氨水均为国产 AR 级; 超纯水。

1.2 仪器与设备

1100 高效液相色谱仪[配有 G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315B 二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)、G1321A 荧光检测器(fluorescence detector, FLD)、G1322A 真空脱气机、HP 化学工作站] 美国 Agilent 公司; Milli-Q Biocel 超纯水机 美国 Millipore 公司; DKN612C 恒温干燥箱 日本 Yamato 公司; 3K30 冷冻离心机 德国 Sigma 公司; GB204 电子分析天平 瑞士 Mettler Toledo 公司; PB-10 酸度计 德国 Sartorius 公司; TI-H10 超声波清洗机 德国 Elma 公司; MM-2 微量旋涡振荡器 江苏省沈高康健生化器具厂。

1.3 方 法

1.3.1 生物胺标准溶液及内标的配制

生物胺单标储备液: 精确称取组胺、色胺、2- 苯乙胺、酪胺、尸胺、精胺各 100 mg, 腐胺盐酸盐 182.72mg, 亚精胺盐酸盐 175.30mg 分别置于 100mL 容量瓶, 用 0.01mol/L 盐酸定容至刻度, 配制成 1mg/mL 标准储备溶液, 置 4℃ 冰箱储存。

生物胺混标工作液: 分别吸取 1.00mL 各生物胺单组分标准储备液, 置于同一个 10mL 容量瓶中, 用 0.01mol/L 盐酸定容至刻度, 配制成生物胺混标使用液(100 μg/mL)。

内标: 精确称取 1,7- 二氨基庚烷 100mg 置于 100mL 容量瓶, 用 0.1mol/L 盐酸定容至刻度, 配制成 1mg/mL 的内标使用液。

1.3.2 生物胺标准溶液的衍生化

吸取 1mL 生物胺混标工作液至 5mL 容量瓶, 加入内标使用液 0.1mL、加入 2mol/L 氢氧化钠溶液及饱和碳酸氢钠溶液调整溶液的 pH 值至 10.5、丹磺酰氯溶液(5mg/mL 溶于丙酮)2mL 于 40℃ 水浴锅中避光反应 45min, 加入 0.1mL 氨水(25%)于暗处静置以终止衍生反应, 30min 后用乙腈定容至刻度, 4℃、3000r/min 离心 5min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱测定。

1.3.3 色 谱 条 件

色谱柱: Grace Smart RP-18 色谱柱(250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.1mol/L 乙酸铵缓冲溶液, B 为乙腈, C 为超纯水; 柱温: 40℃; 流速: 1mL/min; 进样量: 10 μL; 检测器: 二极管阵列检测器, 荧光检测器。

2 结果与分 析

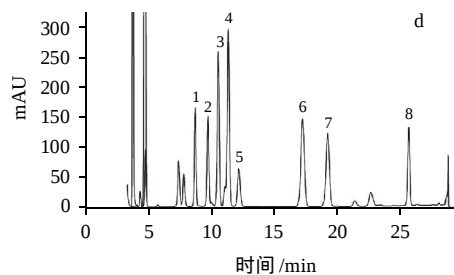
2.1 流动相的选择及梯度洗脱的程序设置

流动相的选择对于生物胺的测定非常重要。本实验在以往研究的基础上, 选择应用最广泛、制备过程相对简单的 3 种流动相, 流动相配比见表 1。为比较超纯水和缓冲液的洗脱效果, 设定 2 种流动相组合作对比, 包括乙腈和超纯水的梯度洗脱(洗脱程序 1)、乙腈和乙酸铵缓冲液的梯度洗脱(洗脱程序 2), 为比较流动相不同的梯度洗脱设定对洗脱效果的影响, 设定乙腈、乙酸铵、超纯水的 2 种不同的洗脱程序(洗脱程序 3、4)。关于洗脱时间, HPLC 法测定生物胺用时通常为 30~60min, 本实验在保证不损坏色谱柱并且所有生物胺均能得到分离的前提下, 将洗脱程序的时间控制在 30min, 以节省分析时间。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Four gradient elution programs designed in this study

时间/ min	洗脱程序 1						洗脱程序 2						洗脱程序 3				洗脱程序 4					
	0	5	23	24	25	30	0	15	19	22	25	30	0	25	25	30	0	6	15	25	25	30
流动相 A							65	30	0	0	65	65	10	10	10	10	15	20	17	10	15	15
体积分 B	65	70	100	100	65	65	35	70	100	100	35	35	50	85	50	50	50	65	68	90	50	50
数/% C	35	30	0	0	35	35							40	5	40	40	35	15	15	0	35	35

4种梯度洗脱程序对应的8种生物胺的色谱图见图1。可以看出,改变流动相和梯度洗脱程序,8种生物胺的出峰先后顺序并没有发生变化,出峰的时间及峰形受到了不同程度的影响而发生变化。图1a显示,第1个目标峰TRP在14min左右时被洗脱出来,前5个目标峰距离太近,分离度低且有杂峰,后面3个峰——TYR、SPD和SPM峰形较好,且没有受到杂峰影响;图1b显示,当使用缓冲溶液时,可以使前两个峰TRP和2-PHE的出峰时间提前,并且与超纯水相比提高了目标峰之间的分离度,但是前两个峰出峰时间过早,受到溶剂峰干扰;图1c显示,调整3种流动相的配比,使得大部分生物胺得到很好的分离且峰形良好,但是TRP和SPM两个目标峰受到杂峰干扰;图1d的流动相依然是乙腈、乙酸铵和超纯水3者的组合,但在第4种梯度洗脱程序中,但在0~25min之间增加了两个梯度,并且乙酸铵的比例有增加,得到的图谱中8种生物胺完全分离,TRP和SPM与杂峰分开,大部分生物胺峰形对称无拖尾,CAD峰形略有前伸。由此认为第4种洗脱程序最佳。



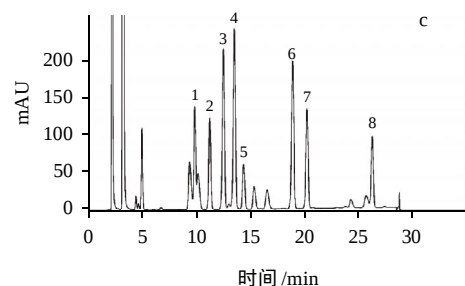
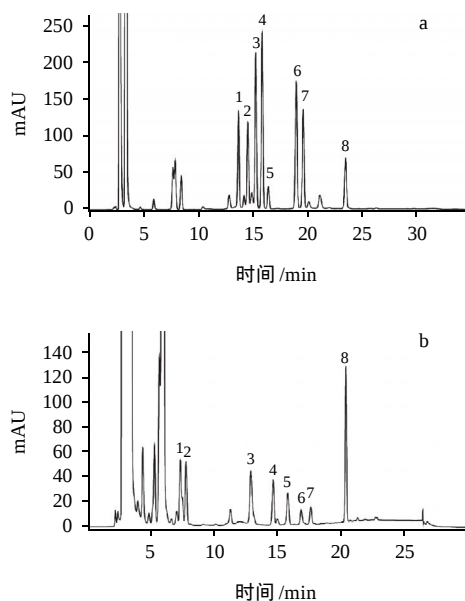
1.TRP; 2.2-PHE; 3.PUT; 4.CAD; 5.HIS; 6.TYR; 7.SPD; 8.SPM。下同。a~d为洗脱程序1~4。

图1 不同洗脱程序下8种生物胺的色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of biogenic amines using 4 different gradient elution programs

2.2 检测器的比较

检测器是HPLC测定生物胺的重要组成部分。DAD作为一种新型的紫外检测器是HPLC应用最多的一种检测器,其灵敏度较高,已见应用于生物胺的检测。生物胺经过丹磺酰氯衍生后,得到的衍生物具备荧光特性,可以使用FLD对其进行测定。本实验采用第4种洗脱程序对8种生物胺进行分析,比较DAD和FLD两种检测器对生物胺的检测,结果见图2。



a.DAD检测器; b.FLD检测器。

图2 第4种洗脱程序条件下两种检测器得到的生物胺色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of biogenic amines analyzed with FLD or DAD detection under the condition of No.4 gradient elution program

由图2可以看出,在第4种梯度洗脱程序下,两种检测器都可以分析到8种生物胺,其中由荧光检测器测得的图谱, TYR的峰形较小,但是8种生物胺的峰形都非常好。与DAD比较,不具备荧光特性的杂质峰在图谱中被去除,这说明荧光检测器对于生物胺的检测具有更高的选择性。为了对两种检测器做进一步的比较,得到两种检测器的检测限(limit of detection, LOD)

和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 以比较两种检测器的灵敏度和重复性(表 2)。其中, LOD 以 3 倍信噪比进行计算, RSD 以 4mg/L 的生物胺标准品连续进样 6 次进行计算。

表 2 两种检测器的检测限及相对标准偏差的比较
Table 2 Comparisons of LODs and RSDs of FLD and DAD for 8 biogenic amines

生物胺	DAD 检测器		FLD 检测器	
	LOD/(mg/kg)	RSD/%	LOD/(mg/kg)	RSD/%
TRP	1.20	2.36	0.03	1.33
2-PHE	0.60	2.01	0.02	0.93
PUT	0.80	2.34	0.01	1.22
CAD	0.80	1.98	0.01	0.54
HIS	1.80	3.26	0.06	2.96
TYR	1.20	3.20	0.10	2.74
SPD	0.80	1.89	0.02	0.97
SPM	0.80	1.24	0.01	0.73

由表 2 可知, 两种检测器的检测限均可以满足常规检测的要求。FLD 比 DAD 具有更低的检测限, 即对于生物胺的检测 FLD 具有更高的灵敏性, 当需要较高灵敏度的生物胺含量检测时, 使用 FLD 较为合适。两种检测器的 RSD 值均在 4% 以内, 且荧光检测器的 RSD 值较 DAD 检测器小, 为 0.54%~2.96%, 说明 FLD 具有更好的重复性, 测定结果稳定。

2.3 FLD 波长的比较

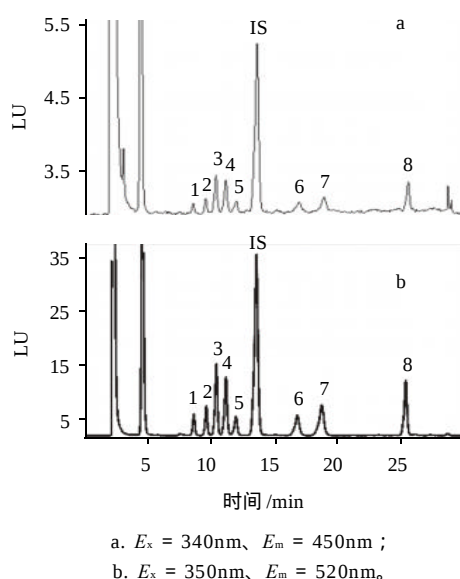


图 3 两种波长条件下 8 种生物胺的色谱图

Fig.3 HPLC chromatograms of 8 biogenic amines under different excitation and emission wavelengths

本实验利用荧光扫描仪进行光谱扫描, 提取 8 种生物胺衍生物对荧光的最大吸收峰, 在 300~400nm 范围内改变激发波长, 在 450~550 范围内改变发射波长, 根据峰值确定激发波长(E_x)和发射波长(E_m)。图 3 为选取的两种波长条件下生物胺的色谱图, 结果显示, 当发射波长小于 500nm 时, 测得生物胺荧光强度很弱, 最后确定的最佳波长分别是 $E_x = 350\text{nm}$ 、 $E_m = 520\text{nm}$, 这与李志军等^[19]的研究结果一致。

2.4 色谱条件的选择

柱温对生物胺出峰顺序没有影响, 但分析时间随柱温的升高而缩短。实验表明, 40℃ 时可使 8 种生物胺在 30min 内分析完毕。温度过高会造成色谱柱的损坏及生物胺衍生物峰形坍塌, 因此, 色谱柱温度设为 40℃。进样量常见的为 10、15、20 μL , 结果表明进样量对生物胺峰形基本没有影响, 出于保护色谱柱的需要, 进样量选择 10 μL , 流速设为 1mL/min。

2.5 最佳色谱条件下 8 种生物胺的定性分析

经过对色谱条件的选择和比较, 确定最佳的生物胺的 HPLC 测定条件, 即选择乙腈、乙酸铵、超纯水 3 种流动相, 根据表 1 中的梯度程序 4 进行梯度洗脱, 采用 FLD 对 8 种生物胺进行检测, 所选的波长为 $E_x = 350\text{nm}$ 、 $E_m = 520\text{nm}$, 柱温 40℃。由图 4 可知, 8 个目标峰在 8~26min 内依次洗脱出来, 峰形对称无拖尾和前伸现象, 由于 FLD 的高度选择性, 杂峰基本去除。

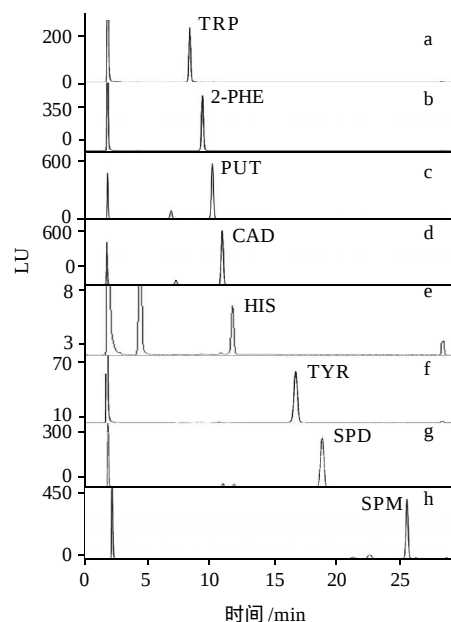


图 4 最佳色谱条件下 8 种生物胺单标的色谱图

Fig.4 HPLC chromatograms of 8 individual biogenic amines standards under optimized determination conditions

表4 几种鱼和鱼制品中的生物胺含量($n = 3$)Table 4 Biogenic amine contents in several fish and fish product samples (mg/kg) determined by the established method ($n=3$)

样品	TRP	2-PHE	PUT	CAD	HIS	TYR	SPD	SPM
金昌鱼	0.30 ± 0.25	ND	1.21 ± 0.49	1.04 ± 0.24	ND	ND	2.46 ± 0.33	6.01 ± 0.40
桂花鱼	ND	ND	21.25 ± 2.68	6.63 ± 0.50	ND	ND	0.49 ± 0.36	0.49 ± 0.36
凤尾鱼罐头	ND	1.32 ± 1.12	2.80 ± 0.78	23.89 ± 6.90	19.79 ± 6.68	3.03 ± 1.38	2.00 ± 1.02	1.22 ± 0.88
梅香马鲛	15.41 ± 1.03	57.61 ± 3.71	64.53 ± 4.07	244.41 ± 14.95	21.31 ± 6.67	62.85 ± 3.35	0.22 ± 0.19	ND
腊草鱼	ND	0.20 ± 0.11	11.38 ± 1.96	88.27 ± 7.58	2.63 ± 1.45	ND	3.77 ± 0.72	10.45 ± 1.01

注：“ND”表示未检测到。

2.6 方法评价

2.6.1 线性实验

以生物胺混标进行线性实验，配制1、2、4、8、10、20、40mg/L的生物胺混标液。以生物胺混标液的质量浓度为横坐标、生物胺与内标的面积比为纵坐标做标准曲线，计算标准曲线的回归方程及相关系数(R^2)见表3。

表3 生物胺标准曲线的回归方程与相关系数

Table 3 Regression equations and correlation coefficients of the standard curves of 8 biogenic amines

生物胺	回归方程	R^2
TRP	$Y = 0.0291X + 0.0084$	0.9986
2-PHE	$Y = 0.0371X + 0.0325$	0.9994
PUT	$Y = 0.1066X + 0.0571$	0.9988
CAD	$Y = 0.0801X + 0.1031$	0.9967
HIS	$Y = 0.0026X + 0.012$	0.9984
TYR	$Y = 0.0116X + 0.0411$	0.9977
SPD	$Y = 0.0717X + 0.1098$	0.9921
SPM	$Y = 0.0801X + 0.0984$	0.9981

2.6.2 精密度实验

制备8mg/L生物胺混标液，平行衍生2次，连续进样3次，计算6次测定所得质量浓度的均值、标准偏差和相对标准偏差，检测结果 $RSD \leq 3$ ，表现出良好的重现性，仪器检测过程具有较好的精密度，可以满足测定的要求。

2.6.3 样品测定

采用本方法测定鲜活淡水鱼(金昌鱼、桂花鱼)、罐头鱼制品(凤尾鱼罐头)及发酵鱼制品(梅香马鲛、腊草鱼)共5个样品，结果见表4。所测定样品的组胺含量均未超出50mg/kg，其中梅香马鲛样品中生物胺含量偏高。

3 结论

本实验以丹磺酰氯作为衍生剂对生物胺进行柱前衍生，探讨了HPLC法测定生物胺的色谱条件。结果当乙腈、乙酸铵、超纯水3者组合作为流动相时，经过本实验中设定的梯度洗脱程序4进行洗脱，生物胺可以在30min内全部分离出来。与李志军等^[19]的研究结果相比，样品的分析时间由45min缩减到30min，为大批量的样品检测节约了时间。采用FLD对生物胺进行检测，所选的波长为 $E_x = 350\text{nm}$ 、 $E_m = 520\text{nm}$ 。FLD的高灵

敏性和高选择性，可以使得杂质峰从图谱中基本去除，目标峰不受杂峰的干扰，更适合较高灵敏度要求的生物胺检测。在最佳色谱条件下，8种生物胺在1~40mg/L范围内呈现良好的线性相关($R^2 > 0.99$)，精密度实验表明该方法的重现性较好。本实验改进的柱前衍生HPLC-FLD法测定生物胺能够满足高灵敏度要求的生物胺检测，为快速准确的测定食品中生物胺提供技术保证。

参考文献：

- [1] TABOR C W, TABOR H. Polyamines[J]. Annual Review Biochemistry, 1976, 53: 749-790.
- [2] SHALABYA R. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. Food Chemistry, 2007, 103(7): 1475-1486.
- [3] BODMER S, IMARK C, KNUBUHL M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing[J]. Inflammation Research, 1999, 48(6): 296-300.
- [4] ASKAR A, TREPTOW H. Amines in encyclopedia of food science, food technology and nutrition[M]. New York: Academic Press, 1993.
- [5] BRINK B, DAMIRIK C, JOOSTEN H M L J, et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 1990, 11(1): 73-84.
- [6] STRATTON J E, HUTKINS R W, TALOR S L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review[J]. Journal of Food Protection, 1991, 54(6): 460-470.
- [7] BILLS D D, HILDRUM K I, SCANLAN R A, et al. Potential precursors of *N*-nitrosopyrrolidine in bacon[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1973, 21(5): 876-877.
- [8] WARTHESEN J J, SCANLAN R A, BILLS D D, et al. Formation of heterocyclic *N*-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1975, 23(5): 898-902.
- [9] ANDERSON A K. Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold at Kuwait fish markets[J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 761-767.
- [10] PARK J S, LEE C H, KWON E Y, et al. Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea[J]. Food Control, 2010, 21(9): 1219-1226.
- [11] 蔡秋杏, 李来好, 陈胜军, 等. 液熏罗非鱼片在25℃贮藏过程中生物胺的变化[J]. 南方水产, 2010, 6(5): 1-6.
- [12] HWANG B S, WANG J T, CHOONG Y M. A rapid gas chromatographic method for determination of histamine in fish and fish products[J]. Food Chemistry, 2003, 82(2): 329-334.
- [13] BRIAN M, DE BORBA, ROHRER J S. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1155(1): 22-30.
- [14] SHALABYA A R. Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods[J]. Food Chemistry, 1999, 65(1): 117-121.
- [15] SWANN L M, FORBES S L, LEWIS S W. A capillary electrophoresis method for the determination of selected biogenic amines and amino acids in mammalian decomposition fluid[J]. Talanta, 2010, 81(4/5): 1697-1702.
- [16] 张国农, 顾敏峰. 干酪中的生物胺[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(1): 38-42.
- [17] MARCOBAL A, POLOM C, MARTIN-ALVAREZ P J, et al. Biogenic amine content of red Spanish wines: Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines[J]. Food Research International, 2005, 38(4): 387-394.
- [18] ANLIR E, VURAL N, YILMAZ S, et al. The determination of biogenic amines in Turkish red wines[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2004, 17(1): 53-62.
- [19] 李志军, 薛长湖, 封锦芳, 等. 柱前衍生-RP-HPLC方法测定水产品中生物胺[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(3): 427-431.