

## 胶束电动毛细管色谱检测鱼肉中的七种生物胺

干 宁<sup>1</sup>, 李天华<sup>1</sup>, 王鲁雁<sup>1</sup>, 江千里<sup>2</sup>

(1. 宁波大学材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 南方医院血液科, 广东 广州 51000)

**摘要**: 建立了一种利用胶束电动毛细管色谱同时检测鱼肉中组胺、腐胺、2-苯乙基胺、尸胺、色胺、亚精胺及精胺 7 种生物胺的方法。样品经 6% 过氯酸萃取后, 由苯甲酰氯衍生化, 以含 0.06 mol/L 脱氧胆酸钠的 0.02 mol/L 硼酸 (pH 9.2)-甲醇 (体积比为 95:5) 混合液为电泳介质, 电泳电压 25 kV, 温度 25 °C, 检测波长 214 nm, 在 12 min 内实现了 7 种生物胺的完全分离。7 种生物胺的浓度与其峰面积在一定的范围呈良好的线性关系, 检出限除组胺为 15 μg/g 外, 其余均为 5 μg/g。迁移时间和峰面积的日内、日间相对标准偏差均小于 5%。该法用于海鱼中 7 种胺类物质含量的测定, 结果令人满意。

**关键词**: 胶束电动毛细管色谱法; 生物胺; 鱼肉

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)06-0934-05 栏目类别: 研究论文

## Determination of Seven Biogenic Amines in Fish Using Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

GAN Ning<sup>1</sup>, LI Tianhua<sup>1</sup>, WANG Luyan<sup>1</sup>, JIANG Qianli<sup>2</sup>

(1. Faculty of Material Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Blood Department, South Hospital, Guangzhou 510000, China)

**Abstract**: A method for the determination of histamine, 2-phenylethylamine, tryptamine, putrescine, cadaverine, spermidine and spermine in fish using micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) was developed. Seven biogenic amines (BAs) were extracted from a sample with 6% perchloric acid, then derivatized with benzoyl chloride. 0.02 mol/L borate buffer (pH 9.2) containing 0.06 mol/L sodium deoxycholate-methanol (95:5, v/v) was used as a running buffer. The detection wavelength was set at 214 nm. The separation was achieved within 12 min. Good linearities were observed from the calibration plots in the concentration ranges. The detection limit of histamine was 15 μg/g and those of the other amines were 5 μg/g. The developed method was successfully employed for the simultaneous determination of 7 BAs in fish sample with satisfactory results.

**Key words**: micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC); biogenic amines; fish

生物胺(BAs)是一类具有生物活性的低分子有机碱<sup>[1]</sup>,广泛存在于各种食品及生物体中<sup>[2]</sup>。食品中存在的生物胺主要经游离氨基酸分解产生<sup>[3,4]</sup>。低品质的生鲜原料及不良加工处理是产生高含量生物胺的主要原因。摄食大量该类食品可能导致头痛、呕吐等中毒症状<sup>[5]</sup>。因此食品中各种生物胺的检测非常重要,也是反映食品品质的重要指标<sup>[6,7]</sup>。生物胺的分析方法有荧光光度法<sup>[8]</sup>、薄层色谱法<sup>[9]</sup>、离子交换色谱法<sup>[10]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[11]</sup>、气相色谱法<sup>[12]</sup>、酶联免疫分析法<sup>[13]</sup>及

毛细管电泳法<sup>[14]</sup>等。目前国家标准采用荧光光度法检测组胺,操作相当繁琐费时。HPLC应用最为广泛,但该方法存在样品和溶剂消耗大、平衡时间长、费用高、分离效果差及峰容易拖尾等缺点。胶束电动毛细管色谱法(MECC)分辨率高,分析速度快,易于自动化操作,且几乎不消耗溶剂,已被应用于氨基酸等的检测。本实验建立了以胶束电动毛细管色谱法检测鱼肉中组胺等7种生物胺的快速简便分析方法,对分析条件进行了优化,并利用所建立的方法进行鱼样品中生物胺含量的检测。

收稿日期: 2007-06-12

通讯联系人: 干宁,男,博士,副教授, E-mail: ganning@nbu.edu.cn.

基金项目: 浙江省科技攻关项目(2006C31040)、浙江省自然科学基金(Y106725)、浙江省教育厅基金(20061697)和宁波市自然科学基金(2006A610048)资助。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE MDQ 毛细管电泳系统(配紫外检测器)(Beckman 公司, USA)。毛细管柱:50 cm × 75 μm。Hitachi 1160 高效液相色谱仪(日立公司, 日本), 包括 L-6200 泵和 L-4000 UV-Vis 检测器。Polytron PT-3100 搅拌均质机(Kinematica AG Co., 瑞典)。生物胺标准品:色胺(Tpm)、2-苯乙基胺(Phe)、腐胺(Put)、尸胺(Cad)、组胺(Him)、亚精胺(Spd)及精胺(Spm)(Sigma 公司, USA)。四硼酸钠、磷酸二氢钠、牛磺胆酸钠(SC)、十二烷基硫酸钠(SDS)、脱氧胆酸钠(SDC)、苯甲酰氯、氢氧化钠、过氯酸(PCA)、甲醇及乙醚均为色谱纯(Fluka 公司, 美国)。

生物胺标准溶液:精确称取 Tpm 61.4 mg、Phe 65.1 mg、Put 91.5 mg、Cad 85.7 mg、Spd 87.7 mg、Spm 86.0 mg 及 Him 82.8 mg, 以去离子水溶解并定容至 50 mL, 每种生物胺的质量浓度为 1.0 g/L, 得到混合标准贮备液。实验时再以 6% 过氯酸稀释成各种不同浓度的混合标准溶液。

缓冲液:含 0.05 mol/L 或 0.06 mol/L SDC 的 0.02 mol/L 硼酸缓冲液(pH 9.2);含 0.06 mol/L SDC 的 0.02 mol/L 硼酸/磷酸缓冲液(pH 7.0, 8.0, 9.2);含 0.05 mol/L SDS 的 0.02 mol/L 硼酸缓冲液(pH 9.2);含 0.05 mol/L SC 的 0.02 mol/L 硼酸缓冲液(pH 9.2)。

### 1.2 实验方法

生物胺的苯甲酰化:参考 Hwang 等<sup>[13]</sup>的衍生化方法:取混合标准溶液 2 mL, 加入 2 mol/L 氢氧化钠 1 mL 及苯甲酰氯 10 μL, 搅拌混合 30 s, 于 30 °C 下反应 40 min, 加入饱和食盐水 2 mL, 再以每次 3 mL 乙醚萃取两次, 合并乙醚层, 以氮气吹干, 残留物中加入含 0.05 mol/L SDC 的 0.02 mol/L 硼酸(pH 9.2)-甲醇(体积比为 70:30)运行缓冲液 1 mL 溶解, 经 0.45 μm 过滤膜过滤, 待 MECC 分析。

MECC 分离测定生物胺:每次分析前, 先以缓冲液清洗毛细管 2.5 min, 分析后再分别以 0.1 mol/L 氢氧化钠及去离子水清洗毛细管 2.5 min。检测波长 214 nm, 操作温度 25 °C, 电泳电压 25 kV, 进样时间 5 s, 进样量 25 nL。取生物胺混合标准贮备液配制 2.5, 5, 10, 20 及 50 mg/L 的混合标准溶液, 每一浓度各取 2 mL 进行苯甲酰化, 再进行 3 次 MECC 分析。以 7 种生物胺的峰面积对质量浓度作图, 做标准曲线。

HPLC 分离测定生物胺:参考 Hwang 等<sup>[13]</sup>的

HPLC 方法并稍加改动, 样品制备所用萃取溶剂由 6% 三氯醋酸改为 6% PCA, 经苯甲酰氯衍生化后进行生物胺分析。

### 1.3 样品制备

取油炸小黄鱼、腌渍大黄鱼罐头各 2 个(购自当地超市)。所有检测样品取得后于 -20 °C 下保存, 分析时取出使用。采用文献[13]方法, 先将罐头样品油滴清除, 以刀片刮去表面油脂。取切碎并均质后的样品 5 g, 加入 10 mL 6% PCA 溶液均质 1 min, 离心(3 500 r/min)10 min, 上层液经 Whatman No. 2 滤纸(Whatman Co., 英国)过滤, 残渣再以 10 mL 6% PCA 溶液重复萃取一次, 收集滤液至 50 mL 容量瓶中, 再以 6% PCA 溶液定容, 作为试样溶液。

### 1.4 回收率和检出限测定

取鱼肉 5 g, 分别加入 7 种生物胺含量均为 50, 200 及 500 μg/g 的标准溶液, 重复测定 3 次, 扣除样品基质中的生物胺含量, 求其添加回收率。将检测样品分别添加各种浓度的标准溶液, 依本实验建立的方法进行测试, 以信噪比(S/N > 3)作为判定标准, 测定最低检出限。

## 2 结果与讨论

### 2.1 毛细管电泳分析条件

将 Him, Phe, Cad, Put, Spd, Spm 及 Tpm 7 种生物胺用苯甲酰氯衍生化, 考察各种分析条件对其分离效果的影响。

硼酸缓冲液具有较高的电渗流, 故选其作为缓冲液。比较了不同表面活性剂对生物胺衍生物分离的影响。于 0.02 mol/L 硼酸(pH 9.2)中分别添加 0.05 mol/L SDC、0.05 mol/L SC 及 0.05 mol/L SDS, 图 1 显示以 0.05 mol/L SDC 的分离效果最佳, 除 Him(峰 7)与衍生试剂苯甲酰氯(峰 8)重叠外, 其余 6 种生物胺衍生物的分离效果均良好。以 SDS 为添加剂, 生物胺的迁移时间较长且分离效果差, 可能是因为长链 SDS 的极性基团与生物胺衍生物产生了强的离子作用, 而 SDC 极性较 SDS 强, 因而减少了容积效应<sup>[12]</sup>。此外 SDC 形成螺旋胶束, 对于 SDS 系统分离不佳的疏水性化合物, SDC 有改进效果<sup>[14]</sup>。SDC 与 SC 的区别在于 SDC 中的 C-7 羟基以氢原子取代, 仅有两个羟基, 其选择性较 SC 为佳(见图 1), 可能是氢原子取代增加了 SDC 对分析物质的溶解能力<sup>[14]</sup>。

为了改善 Him 及苯甲酰氯的分离效果, 探讨了 SDC 浓度、缓冲液 pH 值及有机溶剂改性剂的影响。SDC 浓度对生物胺衍生物迁移时间的影响如图 2

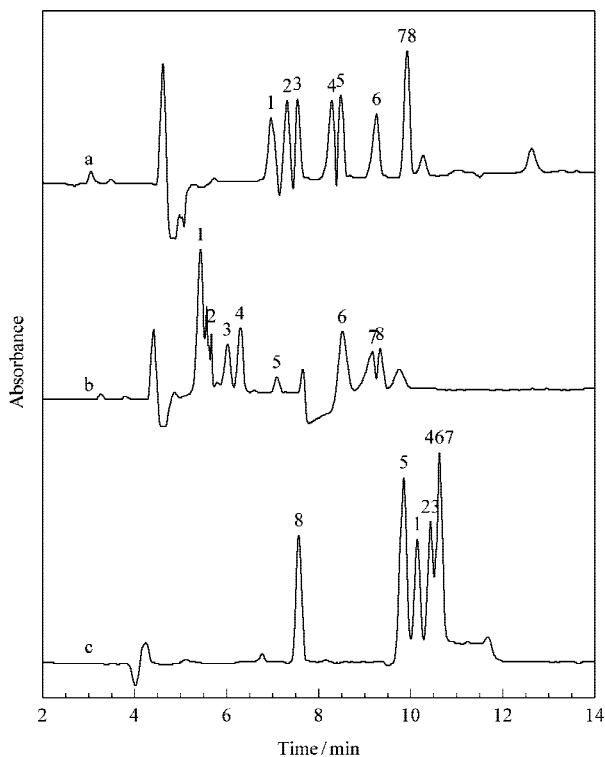


图 1 表面活性剂对生物胺衍生物分离度的影响  
**Fig. 1 Effects of surfactant reagents on the resolution of biogenic amine derivatives**

Capillary : fused silica , 75  $\mu\text{m}$  , length to detector , 50 cm ; injection time : 5 s ; voltage : 25 kV. Buffer : pH 9.2 , 0.02 mol/L borate with ( a ) 0.05 mol/L sodium deoxycholate , ( b ) 0.05 mol/L sodium cholate , and ( c ) 0.05 mol/L SDS .

1. Phe ; 2. Put ; 3. Cad ; 4. Spd ; 5. Tpm ; 6. Spm ; 7. Him ; 8. benzoyl chloride.

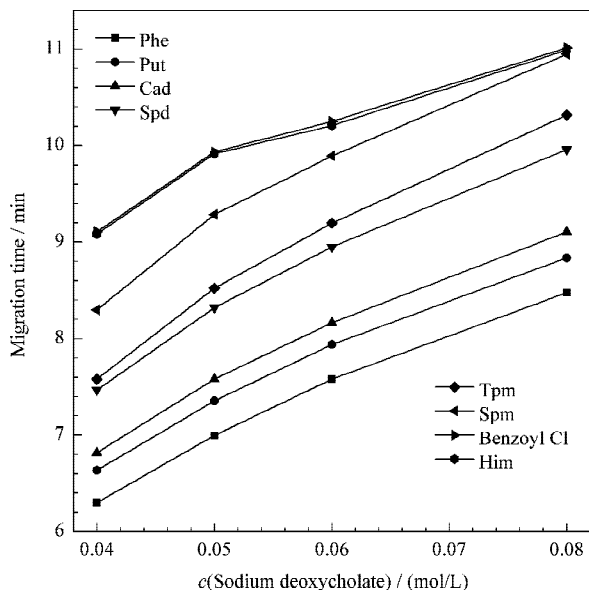


图 2 SDC 浓度对生物胺衍生物迁移时间的影响  
**Fig. 2 Effect of the concentration of sodium deoxycholate on the migration time of biogenic amine derivatives**

Buffer : 0.02 mol/L borate ( pH 9.2 ) ; capillary : fused silica , 75  $\mu\text{m}$   $\times$  50 cm ; injection time : 5 s ; voltage : 25 kV.

所示 ,实验所用 SDC 浓度高于可形成胶束的临界胶束浓度( 4 ~ 6 mmol/L )<sup>[13]</sup>。随着 SDC 浓度的增加 ,形成胶束的数目增多 ,生物胺衍生物对胶束的溶解性也增加 ,因而迁移时间也随着增加。但 Him 及苯甲酰氯仍无法分离且峰的迁移时间增加较为缓慢 ,以致 0.08 mol/L SDC 时 ,Him、苯甲酰氯及 Spm 3 个成分同时出峰。其浓度为 0.06 mol/L 时 ,Put 与 Cad ,Spd 与 Tpm 分离较佳 ,因此选用 0.06 mol/L SDC。含 0.06 mol/L SDC 的 0.02 mol/L 硼酸缓冲液 ,其不同 pH 值对迁移时间的影响如图 3 所示。生物胺衍生物的迁移时间均随 pH 值增加而增长 ,迁移顺序并无改变 ,结果显示含 0.06 mol/L SDC 的 0.02 mol/L 硼酸缓冲液( pH 9.2 )的分离效果最佳。

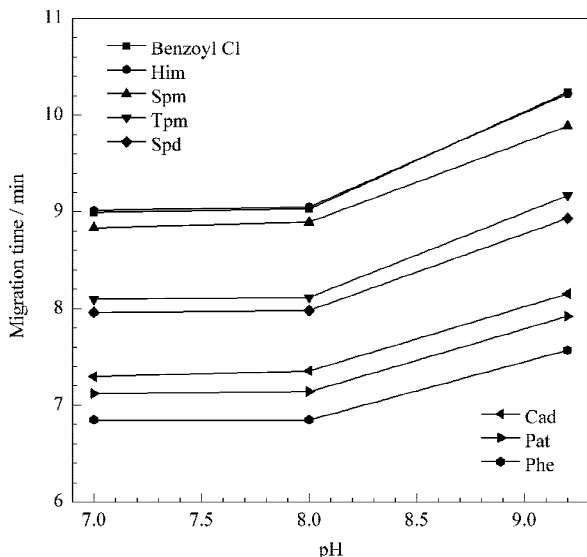


图 3 pH 值对生物胺衍生物迁移时间的影响  
**Fig. 3 Effect of the pH value on the migration time of biogenic amine derivatives**

Buffer : 0.06 mol/L sodium deoxycholate in 0.02 mol/L borate. The other experimental conditions are the same as in Fig. 2.

对于疏水性较强的物质 ,往往需要在缓冲液中添加有机溶剂以提高分离度<sup>[12]</sup>。原因在于有机溶剂与毛细管壁作用而减缓电渗流( EOF ) ,可延长胶束的迁移时间 ,减少缓冲液极性 ,增加分析物选择性<sup>[14]</sup>。在缓冲液中分别加入 5% 乙醇及 5% 甲醇均可将 Him 及苯甲酰氯峰分开 ,但乙醇对 Phe 及 Put 的分离不佳 ,因此选用甲醇。考察了 0.5% 及 10% 甲醇对迁移时间的影响 ,生物胺衍生物的迁移时间均随甲醇含量增加而递增 ,当增为 10% 时 ,Phe ,Put 及 Cad 3 种成分的分度反而较低 ,可能是三者的疏水性较弱所致<sup>[12]</sup>。测定结果显示以添加 5% 甲醇最理想。添加 5% 甲醇同时降低了 EOF ,电流由 125  $\mu\text{A}$  降为 110  $\mu\text{A}$  ,减少了焦耳热 ,也有利于分

离。最常使用于毛细管电泳的电压为 15 ~ 30 kV , 因而考察了电压为 15 , 20 及 25 kV 时对生物胺衍生物迁移时间的影响。随着电压的逐渐增加 , 分析时间逐渐缩短。考虑分析时间及各成分峰的分离效果 , 选择分离电压为 25 kV。分别以 214 , 254 及 280 nm 波长进行检测 , 虽然在 254 及 280 nm 波长下检测干扰小 , 但因 Phe , Put 及 Cad 3 个成分的信号都过强 , 峰重叠无法达到基线分离 , 因此采用 214 nm。另外比较了 50 及 75 μm 两种内径的毛细管柱的分离效果 , 75 μm 的灵敏度约为 50 μm 的 4 倍。故选用 75 μm 的毛细管柱分离。

在优化的条件下 , 7 种生物胺苯甲酰氯衍生物的 MECC 分离如图 4 所示。由图 4 可见 , 12 min 内完成分析 , 峰形对称 , 且分离效果良好。迁移顺序为 Phe , Put , Cad , Spd , Tpm , Spm 及 Him , 最后的峰为衍生过剩的苯甲酰氯 , 出现于 12.5 min 附近 , 完全干扰分析。但以 HPLC 分析时 , 苯甲酰氯会干扰 Tpm 或 Him 的检测<sup>[13]</sup>。

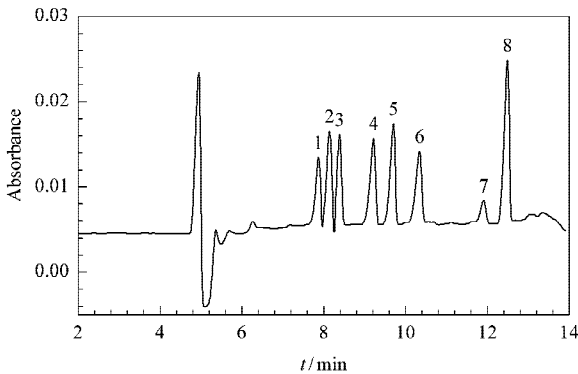


图 4 7 种生物胺衍生物的 MECC 图

Fig. 4 Electropherogram of seven biogenic amine derivatives by MECC

Concentrations of biogenic amines , 20 mg/L ; buffer : 0.06 mol/L sodium deoxycholate in 0.02 mol/L borate ( pH 9.2 ) - methanol ( 95 : 5 , v/v ) ; capillary : fused silica , 75 μm , length to detector 50 cm ; injection time : 5 s ; voltage : 25 kV.

Peak identifications : 1. Phe ; 2. Put ; 3. Cad ; 4. Spd ; 5. Tpm ; 6. Spm ; 7. Him ; 8. benzoyl chloride.

2.2 精密度、重现性和线性关系

采用该方法对 7 种生物胺( 20 mg/L )苯甲酰氯衍生物测定了 10 次 , 迁移时间的相对标准偏差 ( RSD ) 介于 1.02% ~ 2.33% 之间 , 峰面积的 RSD 均小于 5% , 说明该方法有较好的精密度和重现性。7 种 BAs 混合标准溶液的线性回归方程及相关系数见表 1。

表 1 生物胺标准曲线的线性回归方程及相关系数  
Table 1 Linear regression equations and correlation coefficients of calibration curves for BAs

Analyte	Linear equation	Correlation coefficient ( R <sup>2</sup> )
Phe	Y = 3458X + 5647	0.9975
Put	Y = 4977X + 12710	0.9941
Cad	Y = 4249X + 6440	0.9981
Spd	Y = 4053X + 10636	0.9955
Tpm	Y = 5019X + 10298	0.9930
Spm	Y = 3854X + 12420	0.9965
Him	Y = 1968X + 1030	0.9936

Y : peak area ; X : concentration , mg/L ; linear ranges : 2.5 - 50 μg/L.

2.3 回收率及最低检出限

在某海鱼肉中分别添加 50 , 200 及 500 μg/g 的 7 种生物胺 , 测定各生物胺的添加回收率 , 各种生物胺的平均加标回收率分别为 Phe 87.1% , Put 98.4% , Cad 98.9% , Spd 92.9% , Tpm 85.7% , Spm 93.1% 及 Him 89.3% , RSD 均小于 5%。最低检出限( 以 S/N > 3 计 ) : Him 为 15 μg/g , 其余 6 种均为 5 μg/g。Him 的灵敏度高于 Nakashima 等报道的 50 μg/g<sup>[10]</sup>。

2.4 本法与规定的标准方法灵敏度的比较

在灵敏度比较上 , 利用 MECC 法测定鱼肉中的 7 种生物胺的线性范围为 0.096 ~ 50 mg/g , 标准 HPLC 方法分析检测线性范围为 0.004 ~ 1.018 mg/g。以 MECC 法分析 7 种生物胺的最低检出限为 5 ~ 15 μg/g , 比 HPLC 法分析的最低检出限( 1.5 ~ 2.8 mg/g<sup>[15]</sup> ) 更为灵敏。

2.5 实际样品测定

利用本方法分析市售腌渍大黄鱼和油炸小黄鱼罐头各 2 个( 见表 2 ) , 并与标准 HPLC 法比较。油

表 2 油炸小黄鱼及腌渍大黄鱼中的生物胺含量

Table 2 Contents of biogenic amines in the fried and salted yellow croaker

Sample	Mass/g	Detection method	Amine content/( μg/g )						
			Phe	Put	Cad	Spd	Tpm	Spm	Him
Fried little yellow croaker 1 ( 油炸小黄鱼 1 )	245	MECC	ND	3.9	38.9	3.0	3.0	3.8	538
		HPLC	ND	4.0	40.1	2.5	2.6	2.8	543
Fried little yellow croaker 2 ( 油炸小黄鱼 2 )	220	MECC	ND	5.2	42.1	3.8	1.9	2.0	562
		HPLC	ND	5.9	41.8	3.6	1.8	2.1	559
Salted large yellow croaker 1 ( 腌渍大黄鱼 1 )	230	MECC	2.6	114.2	388.6	3.2	7.5	9.7	1044
		HPLC	2.4	120.8	372.5	3.2	7.5	9.5	1032
Salted large yellow croaker 2 ( 腌渍大黄鱼 2 )	240	MECC	2.1	72.0	353.4	3.6	5.5	6.9	1044
		HPLC	2.0	71.5	362.0	4.0	5.4	7.9	1032

炸小黄鱼 1 的检测图谱见图 5。该法和标准 HPLC 方法测定结果基本一致。

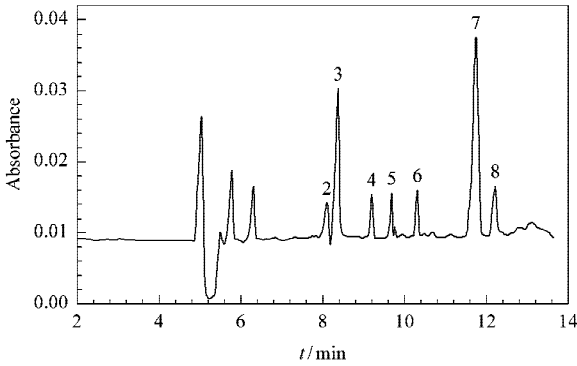


图 5 油炸小黄鱼的 MECC 图谱

Fig. 5 Electropherogram of biogenic amine derivatives from a fried little yellow croaker

The conditions and peak identifications are the same as in Fig. 4.

### 3 结论

本文基于苯甲酰氯衍生化,建立了 MECC 分离 Phe,Put,Cad,Spd,Tpm,Spm 及 Him 7 种生物胺的分析方法,可于 12 min 内完成检测,分离效果及重现性均佳。本方法应用于实际鱼肉中生物胺分析,结果与 HPLC 方法相当近似。且与 HPLC 方法<sup>[14]</sup>比较,该法具有以下优点(1)苯甲酰氯会产生苯甲酸等衍生物而干扰 HPLC 图谱<sup>[14]</sup>,MECC 方法

则不受干扰。(2)相比于 HPLC,MECC 的分辨率佳,分析时间短,检测限低,且消耗溶剂少,成本低。

### 参考文献:

[ 1 ] Antoine F R , Wei C I , Littell R C , Quinn B P , Hogle A D , Marshall M R. J Food Sci , 2001 , 66( 1 ) : 72

[ 2 ] Zhao J C , Guo Z A , Chang J H , Wang W J. Chinese Journal of Chromatography ( 赵景蝉 , 郭治安 , 常建华 , 王文君. 色谱 ) , 2001 , 19( 3 ) : 260

[ 3 ] Rey M , Pohl C. J Chromatogr A , 2003 , 997( 1 ) : 199

[ 4 ] Liu Y M , Cheng J K. J Chromatogr A , 2003 , 1 003 : 211

[ 5 ] Anli R E , Vural N , Yilmaz S , Vural Y H. J Food Compos Anal , 2004 , 17( 1 ) : 53

[ 6 ] Lange L , Thomas K , Wittmann C. J Chromatogr B , 2002 , 779 : 229

[ 7 ] Kovacs A , Simon-Sarkadi L , Ganzler K. J Chromatogr A , 1999 , 836 : 305

[ 8 ] Krizek M , Pelikanova T. J Chromatogr A , 1998 , 812 : 243

[ 9 ] Lin W C , Lin C E , Lin E C. J Chromatogr A , 1996 , 755 : 142

[ 10 ] Nakashima M , Sugiyama A. J Food Hyg Soc JPN , 1999 , 40 : 285

[ 11 ] Oguri S , Watanabe S , Abe S. J Chromatogr A , 1997 , 790 : 177

[ 12 ] Valle M , Malle P , Bouquelet S. J AOAC Int , 1997 , 80 : 49

[ 13 ] Hwang D F , Changa S H , Shiuu C Y , Chai T J. J Chromatogr B , 1997 , 693 : 23

[ 14 ] Qiao C D , Song P S , Yan X , Jiang S X. Chinese Journal of Analytical Chemistry ( 乔成栋 , 宋平顺 , 严祥 , 蒋生祥. 分析化学 ) , 2007 , 35( 1 ) : 95

[ 15 ] Valle M , Malle P , Bouquelet S. J AOAC Int , 1997 , 80 : 49

## 《中国药学文摘》2008 年征订启事

《中国药学文摘》( ISSN 1003-3521/CN 11-2529/R )是由国家食品药品监督管理局主管,国家食品药品监督管理局信息中心主办,国内外公开发行的医药科技性专业期刊。月刊,16 开本,每期 220 页左右,每期约 60 万字。读者对象:医药生产、科研、教学、流通、医院、药店、药检、情报和监管单位和个人。

### 银行汇款

帐 号 :11001016700056002517  
开户行 :建设银行北京展览路支行

户 名 :国家食品药品监督管理局信息中心  
单位名称 :国家食品药品监督管理局信息中心期刊处

### 联系方式

联系电话 010-62214715 ,62214665 ,88330061  
传 真 010-62214866 ; E-mail zgyxwz@163.com  
联系地址 :北京市西城区北礼士路甲 38 号 邮编 100810