

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2012.01.008

高效液相色谱法测定生物胺衍生条件的优化研究

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

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室, 国家水产品加工技术研发中心, 广东广州 510300; 2. 上海海洋大学, 上海 201306)

摘要: 利用荧光检测器(FLD), 采用柱前衍生高效液相色谱法(HPLC)对组胺(HIS)、色胺(TRP)、2-苯乙胺(2-PHE)、腐胺(PUT)、尸胺(CAD)、酪胺(TYR)、亚精胺(SPD)和精胺(SPM) 8种生物胺(BA)进行测定分析。通过探究丹酰氯(Dns-Cl)质量浓度、反应体系的pH、衍生时间及衍生温度对生物胺衍生反应的影响, 确定最优的衍生条件。结果显示, 当Dns-Cl的质量浓度为BA质量浓度的10倍、pH 11.0、40℃下避光反应45 min, 所有BA均能有效分离。BA的相对标准偏差(RSD)在3%以内, 能够满足分析要求。

关键词: 生物胺; 丹酰氯; 柱前衍生; 高效液相色谱法

中国分类号: TS 254.7

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2012)01-0049-05

Optimization for determining derivative conditions of biogenic amines by HPLC

YANG Xianqing¹, ZHAI Honglei^{1,2}, HAO Shuxian¹, CEN Jianwei¹,
WEI Ya¹, SHI Hong¹, HUANG Hui¹, ZHOU Juanjuan^{1,2}

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Lab. of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture; National R&D Center for Aquatic Product Processing, Guangzhou 510641, China;
2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Using high performance liquid chromatography with fluorescence detector and pre-column derivatization, we determined 8 biogenic amines (histamine, trptamine, 2-phenylethylamine, putrescine, cadaverine, tyramine, spermidine and spermine). The optimal derivative conditions are determined by investigating the effects of dansyl chloride concentration, pH, reaction time and reaction temperature on the derivatization of biogenic amines. The result shows that all amines are well resolved with dansyl chloride whose concentration is 10 times of that of biogenic amines at pH 11.0 and 40℃ in darkness for 45 min. The good repeatability of all biogenic amines with relative standard deviation $\leq 3\%$ is considered acceptable.

Key words: biogenic amines; dansyl chloride; pre-column derivatization; HPLC

生物胺(BA)是一类具有生物活性的低分子量碱性化合物, 主要是由相应的氨基酸通过微生物的

脱羧作用形成或由醛、酮类物质在氨基酸转氨酶作用下产生^[1]。BA具有重要的生理功能, 如促进机

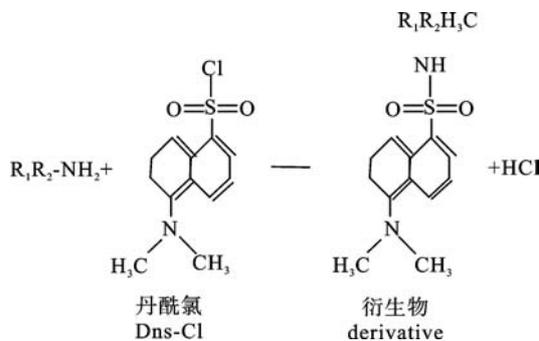
收稿日期: 2011-07-08; 修回日期: 2011-08-02

资助项目: 农业产业技术体系项目(CARS-49); 国家农业科技成果转化资金项目(2010GB23260577, 2009GB2E200303, 2010GB2E000335); 广东省科技计划项目(2011A020102005, 2009A020700004, 2008A020100006, 2009B020201003); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)资助项目(2010YD07); 广西科学研究与技术开发计划项目(11107005-2); 广东省水产品质量安全专项资金项目(2130109A-2-2)

作者简介: 杨贤庆(1963-), 男, 研究员, 从事水产品加工与质量安全研究。E-mail: yxqgd@163.com

体生长, 增强代谢活力与肠道免疫能力, 促进 DNA、RNA 和蛋白质的合成, 在消除自由基方面也有一定的作用^[2]。但过量摄入 BA 可引起食物中毒, 其主要症状为恶心、呼吸困难、发热、头痛、皮疹及血压发生变化等。此外, 如果体系中存在亚硝酸盐, 则有可能生成亚硝胺, 而亚硝胺已经被证实可引发肝癌^[3]。BA 按其结构主要分为 3 大类: 脂肪族、芳香族和杂环族。BA 中的组胺 (HIS) 对人类健康的影响最大, 其次是酪胺 (TYR), 而其他 BA 的存在会增强 HIS 和 TYR 的不良作用。目前很多国家对食品中的 BA 做了限量要求^[4], 因此, 对 BA 的研究对提高和改善食品的质量及安全性有着重要意义。

目前, BA 的测定方法有离子色谱法 (IC)^[5-6]、高效液相色谱法 (HPLC)^[7-8]、薄层色谱法 (TLC)^[9] 和毛细管电泳法 (CE)^[10] 等。随着填料技术的发展, HPLC 在检测方面显示了其特有的优越性, 是目前食品中 BA 含量分析测定的主要手段。BA 与氨基酸类似, 本身无紫外吸收和荧光发射特性, 因此需要衍生化处理。常用的衍生试剂有丹酰氯 (Dns-Cl)、邻苯二甲醛 (OPA)、苯甲酰氯和荧光胺 (FA) 等。Dns-Cl 作为目前使用最广泛的液相色谱柱前衍生试剂, 具有衍生操作简单、衍生物稳定性好、较强的紫外和荧光吸收等优点。Dns-Cl 与单胺和二胺都可以发生反应, 脱掉一分子的 HCl, 生成具有荧光和紫外光的衍生物, 反应式为^[11]:



该反应过程中起重要作用的有 4 个因素: 衍生剂质量浓度、缓冲液 pH、衍生时间和衍生温度。该研究以 Dns-Cl 为 BA 的衍生试剂, 以荧光检测器 (FLD) 为检测手段, 利用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 对常见的 8 种 BA 进行分离分析, 探讨了 Dns-Cl 质量浓度等 4 个因素对衍生反应程度的影响, 确定最佳的衍生条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

BA 标准品。组胺 (HIS, 97%; CAS 51-46-5)、色胺 (TRP, 98%; CAS 61-54-1)、2-苯乙胺 (2-PHE, 99.5%; CAS 64-04-0)、腐胺盐酸盐 (PUT, 99%; CAS 333-93-7)、尸胺 (CAD, 97%; CAS 462-94-2)、亚精胺盐酸盐 (SPD, 98%; CAS 334-50-9)、精胺 (SPE, 97%; CAS 71-44-3) 和酪胺 (TYR, 99%; CAS 51-67-2) 均购自 Sigma 公司。

试剂。乙腈 (色谱纯)、Dns-Cl (99%, CAS 605-65-2)、1,7 二氨基庚烷 (98%, CAS 646-19-51) 购自 Sigma 公司; 甲醇 (色谱纯) 和丙酮 (色谱纯) 购自 Burdick&Jackson 公司; 盐酸 (HCl)、氢氧化钠 (NaOH)、乙酸铵、碳酸氢钠 (NaHCO₃) 和氨水均为国产分析纯试剂; 水为超纯水。

Agilent 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 荧光检测器、G1322A 真空脱气机、HP 化学工作站 (美国 Agilent 公司出品); Milli-Q Biocel 超纯水机 (美国 Millipore 公司出品); DKN612C 恒温干燥箱 (日本 Yamato 公司出品); 3K30 冷冻离心机 (德国 Sigma 公司出品); GB204 电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司出品); PB-10 酸度计 (德国 Sartorius 公司出品); TI-H10 超声波清洗机 (德国 Elma 公司出品); MM-2 微量漩涡振荡器 (江苏省沈高康健生化器具厂出品)。

1.2 试验方法

1.2.1 BA 标准溶液及内标的配制 1) BA 单标储备液。精确称取 HIS、TRP、2-PHE、TYR、CAD 和 SPM 各 100 mg, PUT 182.72 mg, SPD 175.30 mg 分别置于 10 mL 容量瓶, 用 0.01 mol·L⁻¹ HCl 定容至刻度, 配制成质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的标准储备液, 置 4 °C 冰箱储存, 保存期限为 3 个月。2) BA 混标工作液。分别吸取 1.00 mL 各 BA 单组分标准储备液, 置于 10 mL 容量瓶中, 用 0.01 mol·L⁻¹ HCl 定容至刻度, 配制成 BA 混标工作液 (1 mg·mL⁻¹), 置 4 °C 冰箱储存, 保存期限为 3 个月。3) 内标 (IS) 储备液。精确称取 1,7 二氨基庚烷 100 mg 置于 100 mL 容量瓶, 用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 定容至刻度, 配制成质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的内标使用液。

1.2.2 色谱条件 Grace Smart RP-18 色谱柱 (5

μm , 250 mm \times 4.6 mm); 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 10 μL ; 荧光激发波长为 350 nm, 发射波长为 520 nm。流动相 A 为 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液, 流动相 B 为乙腈, 流动相 C 为超纯水。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序表

Tab.1 HPLC gradient elution program for biogenic amines

时间/min time	流动相/% mobile phase		
	A	B	C
0.00	15	50	35
6.00	20	65	15
15.00	17	68	15
25.00	10	90	0
25.10	15	50	35
30.00	15	50	35

1.2.3 BA 标准溶液的衍生化 用移液枪吸取 1 mL BA 混标工作液于 10 mL 容量瓶, 加入内标使用液 0.1 mL、2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液 0.2 mL、饱和 NaHCO_3 溶液 0.3 mL、1 mL Dns-Cl 溶液(溶于丙酮)避光反应 45 min 后, 加入 0.1 mL 氨水(25%)避光静置以终止衍生反应, 30 min 后用乙腈定容至刻度, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱测定。

2 结果与分析

2.1 BA 检测方法的适用性分析

采用乙酸铵、乙腈、超纯水为流动相, 通过对色谱分离条件的优化, 确立了如表 1 所示的梯度。结果显示, 8 种 BA 能在 30 min 内得到有效的分离, 且峰形对称无拖尾现象。对于 BA, 在选定的衍生条件下进行 2 次平行衍生, 每次衍生收集色谱数据 3 次, 得到的 6 组色谱峰面积数据重复性较好, BA 的相对标准偏差(RSD)在 3% 以内, 结果见表 2。

2.2 Dns-Cl 质量浓度对衍生反应的影响

Dns-Cl 用量是影响衍生反应的重要因素。用量过少不能保证整个衍生反应的进行, 用量过多造成试剂浪费并且增加杂峰, 影响图谱的质量。为了寻找合适的 Dns-Cl 质量浓度, 该试验测定了当添加 1 mL Dns-Cl 溶液, 质量浓度分别为 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

表 2 生物胺衍生峰面积的相对标准偏差

Tab.2 RSD of peak area of derivatized biogenic amines

生物胺 BA	相对标准偏差/% RSD
色胺 TRP	1.33
2-苯乙胺 2-PHE	0.93
腐胺 PUT	1.22
尸胺 CAD	0.54
组胺 HIS	2.96
酪胺 TYR	2.74
亚精胺 SPD	0.97
精胺 SPM	0.73

和 12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 与 1 mL BA 混标液(1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)衍生反应的完全程度。每组做 3 次平行试验, 取 3 次测量的平均值。图 1-a 显示 BA 衍生物的峰面积 A_i 随着 Dns-Cl 用量的改变而变化的情况。

Dns-Cl 对 HIS 的衍生物生成量影响并不明显, TRP、2-PHE、TYR 和 CAD 衍生物随着 Dns-Cl 用量的增加而增加, 在 Dns-Cl 质量浓度为 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 8 种 BA 衍生物的生成量均达到最大, 继续增加 Dns-Cl 的量, 衍生物生成量趋于平缓且无明显变化。因此, 当添加的 $\rho(\text{Dns-Cl})$ 为 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即添加的 $\rho(\text{Dns-Cl})$ 为 $\rho(\text{BA})$ 的 10 倍时, 可以保证衍生反应的完全进行。

2.3 反应体系的 pH 对衍生反应的影响

Dns-Cl 与 BA 的衍生反应需在碱性条件下进行, 反应体系的 pH 也是影响衍生反应完全程度的一个重要因素。在目前的研究中, 有采用 NaOH 和碱性缓冲溶液^[12]调节反应体系的 pH, 也有采用 NaOH 和饱和 NaHCO_3 溶液^[13-15]调节反应体系的 pH。笔者对 2 种方法做了对比试验发现, 在衍生反应结束后加入缓冲溶液的衍生反应体系, 其 pH 变化不大, 仍维持在反应前的碱性, 加入饱和 NaHCO_3 溶液的衍生反应体系, 其 pH 降低至中性或微碱性, 为保护反相色谱柱的需要, 该试验选择添加 NaOH 和 NaHCO_3 来控制衍生反应体系的 pH。调整碱液的添加量, 将衍生体系的 pH 分别调整到 8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 和 13.0。每组做 3 次平行试验, 取 3 次测量的平均值。图 1-b 显示 BA 衍生物的峰面积 A_i 随着衍生体系 pH 的改变而变化的情况。

碱性条件下大部分 BA 衍生物随着 pH 的增加

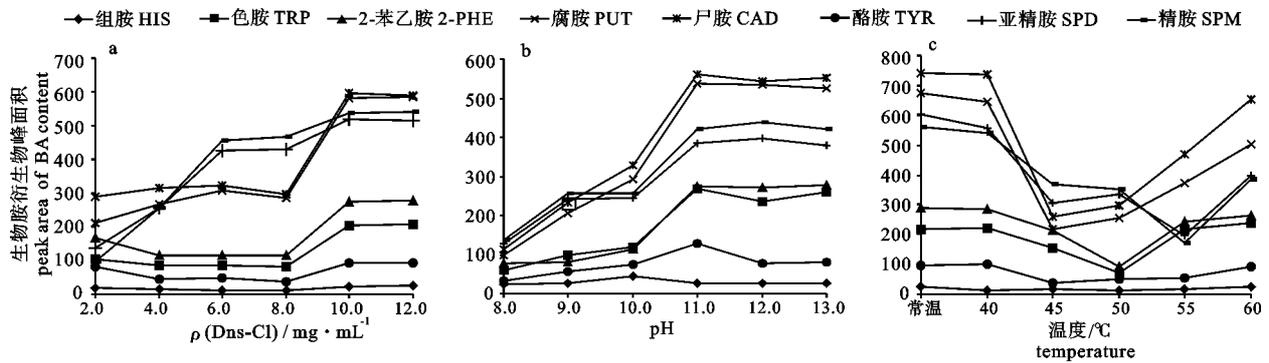


图1 Dns-Cl用量、pH和温度对衍生反应的影响

Fig. 1 Effect of Dns-Cl, pH and temperature on derivatization

而增加,当pH增加到11.0时,所有BA衍生物基本都达到最大值。随着pH的继续增加,PUT、CAD和2-PHE的衍生物基本上没有变化,SPD和SPM的衍生物略有增加,考虑到HIS在pH 10.0的时候衍生物略高,衍生条件的最佳pH定为11.0。

2.4 衍生温度与衍生时间对衍生反应的影响

关于衍生温度和衍生时间,很多研究者进行试验研究时选取的条件不统一^[16-17]。一些研究人员倾向于采用较高的温度,温度越高,衍生反应所需的时间越短。DUGO等^[18]使用的衍生条件是55 $^{\circ}\text{C}$ 下反应1 h,还有学者^[19-20]设定65 $^{\circ}\text{C}$ 反应25 min。高温虽然能够缩短衍生时间,但是过高的温度会造成衍生产物的分解从而导致峰形塌陷。为了选择合适的衍生温度和时间,该研究在以往试验的基础上设计了6种温度条件,分别为常温反应24 h,40 $^{\circ}\text{C}$ 反应45 min,45 $^{\circ}\text{C}$ 反应40 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 反应20 min。所得BA衍生物的结果见图1-c。

大部分BA在常温反应24 h及在40 $^{\circ}\text{C}$ 反应45 min都可以得到最大程度的衍生化,在60 $^{\circ}\text{C}$ 时也能得到较好的衍生,但是HIS的衍生物已经受到高温的影响,峰形出现拖尾及对称性降低。根据试验的实际进行,该试验确定衍生反应的最佳温度和时间组合为40 $^{\circ}\text{C}$ 下衍生45 min。

2.5 最佳衍生条件的确定

优化的衍生条件为 ρ (Dns-Cl) 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、pH 11.0、衍生温度40 $^{\circ}\text{C}$ 和衍生时间45 min。图2为最佳衍生条件下的8种BA及IS的色谱图。

2.6 样品测定

采用确定的最佳衍生条件对鲜活淡水鱼(金昌

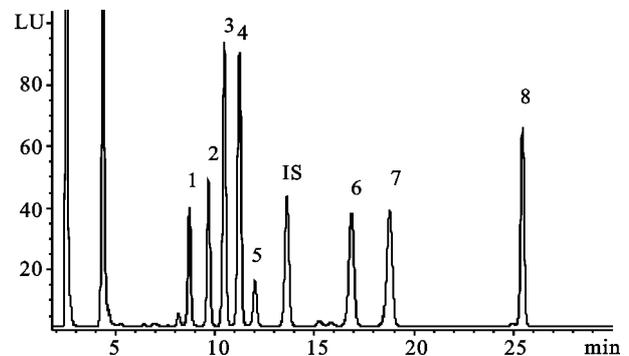


图2 生物胺标准品的色谱图

1. 色胺; 2. 2-苯乙胺; 3. 腐胺; 4. 尸胺; 5. 组胺;
6. 酪胺; 7. 亚精胺; 8. 精胺

Fig. 2 HPLC chromatogram of standard solutions of biogenic amines

1. TRP; 2. 2-PHE; 3. PUT; 4. CAD; 5. HIS;
6. TYR; 7. SPD; 8. SPM

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)5个样品衍生处理后进行色谱分析,所有生物胺都能得到有效分离(表3)。所测定样品的组胺质量分数均未超出50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中梅香马鲛样品中生物胺质量分数偏高。

3 结论

该研究对影响BA衍生反应的4个重要因素进行了研究,从而优化出BA衍生化的最佳条件,分别为Dns-Cl的质量浓度为所测BA质量浓度的10倍,pH 11.0,衍生温度为40 $^{\circ}\text{C}$,衍生时间为45 min。BA在此条件下得到最大程度的衍生化。选用FLD为检测手段,8种BA均能在30 min内得到有效分离且峰形良好。

表 3 几种鱼和鱼制品中的生物胺质量分数 ($n=3$)

Tab. 3 Biogenic amine contents in fish and fish product samples

mg·kg⁻¹

样品 sample	w (色胺) TRP	w (2-苯乙胺) 2-PHE	w (腐胺) PUT	w (尸胺) CAD	w (组胺) HIS	w (酪胺) TYR	w (亚精胺) SPD	w (精胺) SPM
金昌鱼 golden pompano	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 Chinese perch	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 canned anchovy	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 light cured spanish mackerel	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 fermented grass carp	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. 未检测到

Note: ND. not detected

参考文献:

- [1] SHALABY A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. Food Res Int, 1996, 29(7): 675 - 690.
- [2] KLAUSEN N K, HUSS H H. Rapid method for detection of histamine-producing bacteria[J]. Int J Food Microbiol, 1987, 5(2): 137 - 146.
- [3] SILLA SANTOS M H. Biogenic amines; their importance in foods [J]. Int J Food Microbiol, 1996, 29(2): 213 - 231.
- [4] 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 - 91.
LI Zhijun, WU Yongning, XUE Changhu. Biogenic amines and food safety[J]. Food Ferment Ind, 2004, 30(10): 84 - 91. (in Chinese)
- [5] FAVARO G, PASTORE P, SACCANI G, 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.
- [6] De BORBA B M, ROHRER J S. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection [J]. J Chromatogr A, 2007, 1155(1): 22 - 30.
- [7] PROESTOS C, LOUKATOS P, KOMAITIS M. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection[J]. Food Chem, 2008, 106(3): 1218 - 1224.
- [8] KELLY M T, BLAISE A, LARROQUE M. Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(47): 7385 - 7392.
- [9] CELANO G V, CAFARCHIA C, BUJA F, et al. Biogenic amines determination in cheese[J]. Industrie Alimentari, 1992, 31(3): 764 - 768.
- [10] 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): 1697 - 1702.
- [11] PALEOL GOS E K. On-line SPE with surfactant accelerated on-column derivatization and MLC separation as a tool for the determination of biogenic amines in various food substrates [J]. Anal Chem, 2004, 76(5): 1289 - 1294.
- [12] 董伟峰, 林维宣, 田苗, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定七种痕量生物胺[J]. 食品研究与开发, 2006, 127(1): 107 - 111.
DONG Weifeng, LIN Weixuan, TIAN Miao, et al. Determination of seven minim biogenic amines by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Food Res Exploitat, 2006, 127(1): 107 - 111. (in Chinese)
- [13] 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.
- [14] KIM M K, MAH J H, HWANG H J. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish [J]. Food Chem, 2009, 116(1): 87 - 95.
- [15] 蔡秋杏, 李来好, 陈胜军, 等. 液熏罗非鱼片在 25 °C 贮藏过程中生物胺的变化[J]. 南方水产, 2010, 6(5): 1 - 6.
CAI Qiuxing, LI Laihao, CHEN Shengjun, et al. Changes of biogenic amines in liquid-smoked tilapia stored at 25 °C [J]. South China Fish Sci, 2010, 6(5): 1 - 6. (in Chinese)
- [16] CHEN H C, HUANG Y R, HSU H H, et al. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning [J]. Food Control, 2010, 21(1): 13 - 18.
- [17] ANLI R E, VURAL N, YILMAZ S, et al. The determination of biogenic amines in Turkish red wines [J]. J Food Compos Anal, 2004, 17(1): 53 - 62.
- [18] DUGO G, VILASI F, TORRE L. Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines [J]. Food Chem, 2006, 95(4): 672 - 676.
- [19] HERNANDEZ-BORGES J, D'ORAZIO G, ATURKI Z, et al. Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines [J]. J Chromatogr A, 2007, 1147(2): 192 - 199.
- [20] YEGIN S, UREN A. Biogenic amine content of boza: a traditional cereal-based, fermented Turkish beverage [J]. Food Chem, 2008, 111(4): 983 - 987.