一种新的柱前衍生 RP-HPLC 法分析酱腌菜中的生物胺

郭晓丽[1]，李二虎[1]，王鲁峰[1]，刘齐[2]，李芯郁[1]，余佳[1]，钟武[1]，宋雅东[3]，潘思轶[1]
（1.华中农业大学食品科学技术学院，湖北武汉 430070）
（2.湖北大学知行学院粮食与食品工程系，湖北武汉 430011）（3.武汉食品化妆品检验所，湖北武汉 430012）

摘要：以 4-fluoro-3-nitrobenzo-trifluoride(FNBT)为衍生剂，N,N-diisopropylethyl-amine(DIPEA)为催化剂，建立了一种新的柱前衍生-反高效液相色谱检测法（RP-HPLC）同时测定酱腌菜中的 8 种生物胺(组胺、色胺、β-苯乙胺、腐胺、酪胺、尸胺、亚精胺及精胺)。采用硼酸盐缓冲溶液为衍生介质，在 60 ℃下衍生反应 30 min，使用 C18 色谱柱分离，以乙腈和超纯水为流动相梯度洗脱，流速 1.00 mL/min，紫外检测波长 242 nm。在 0.5~100 mg/L 浓度范围内，8 种生物胺呈现良好的线性相关（r^2≥0.999），方法的检出限(LODs)为 0.013~0.053 mg/L，定量限(LOQs)为 0.044~0.176 mg/L，加标平均回收率为 93.47%~99.87%，相对标准偏差(RSD)为 0.47%~3.67%。采用该方法对 26 种市售酱腌菜中的生物胺进行了分析，发酵型酱腌菜中的生物胺总量范围为 40.57~692.82 mg/kg，非发酵型酱腌菜中的生物胺总量范围为 9.86~270.93 mg/kg。发酵型酱腌菜中 8 种生物胺单体的平均含量均高于非发酵型酱腌菜。该方法简单、准确和可靠，可适用于酱腌菜中生物胺的快速分析。

关键词：4-fluoro-3-nitrobenzo-trifluoride(FNBT)；反相高效液相色谱(RP-HPLC)；生物胺；酱腌菜
文章篇号：1673-9078(2017)10-237-244 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.10.033

Analysis of Biogenic Amines in Pickled Vegetable by a New Pre-column Derivatization of RP-HPLC

GUO Xiao-li[1], LI Er-hu[1], WANG Lu-feng[1], LIU Qi[2], LI Xin-yu[1], YU Jia[1], ZHONG Wu[1], SONG Ya-dong[3], PAN Si-yi[1]
(1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)
(2.Department of Food Engineering, ZhiXing College of HuBei University, Wuhan 430011, China)
(3.WuHan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430012, China)

Abstract: A new pre-column derivatization of reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for the determination of eight biogenic amines (histamine, tryptamine, β-phenylethylamine, tyramine, putrescine, cadaverine, spermidine and spermine) in pickled vegetable was established using 4-fluoro-3-nitrobenzo-trifluoride (FNBT) as the derivatizing agent and N,N-diisopropylethyl-amine (DIPEA) as the catalyst. The derivatization of biogenic amines was conducted by FNBT and DIPEA with borate buffer solution at 60 ℃ for 30 min, and then the resultant mixture was separated on a C18 column with mobile phase (acetonitrile and ultrapure water) at a flow rate of 1.00 mL/min. The UV detection wavelength was 242 nm. Eight biogenic amines showed a good linear correlation (r^2≥0.999) in the concentration range of 0.5~50 mg/L with the limits of detection (LODs) of 0.013~0.053 mg/L and the limits of quantification (LOQs) of 0.044~0.176 mg/L. The mean recovery was in the range of 93.47%~99.87%, and the relative standard deviations (RSDs) were 0.47%~3.67%. This method was used to analyze the biogenic amines in the 26 commercial pickled vegetable, and the results showed that the total content of biogenic amine in fermented and non-fermented pickled vegetable samples were 40.57~692.82 mg/kg and 9.86~270.93 mg/kg, respectively; the average content of eight monomer biogenic amines in fermented pickled vegetable samples were higher than those of non fermented pickled vegetable samples. This developed method was simple, sensitive and reliable, and it was suitable for the rapid analysis of biogenic amines in pickled vegetable.

Key words: 4-fluoro-3-nitrobenzo-trifluoride; reversed-phase high performance liquid chromatography; biogenic amine; pickled vegetables

收稿日期：2017-05-13
项目基金：国家自然科学基金青年科学基金项目（31201414）
作者简介：郭晓丽（1993-），女，硕士，研究方向：食品质量与安全
通讯作者：李二虎（1982-），男，博士，副教授，研究方向：食品生物技术

生物胺是一类含氨基、具有生物活性的低分子有机化合物，主要是由微生物分泌的氨基酸脱羧酶催化特定的氨基酸脱羧而形成，少数由醛或酮氨基化形成[1,2]。适量的生物胺在体内具有特定的生理活性[3~5]。过量的生物胺会引起头疼、低/高血压、腹泻和呕吐等毒害作用，严重时可导致颅内出血而死亡[6~8]。尤其是在服用了某些抗氨基氧化酶药物、患有肠道疾病或高敏人群中，因为体内代谢酶耗竭或失活，导致体内高浓度生物胺的积累[9,10]。此外，生物胺易与亚硝酸盐反应，形成具有强致癌作用的亚硝胺[11]。因此，近年来各类食品中生物胺的研究越来越受到国内外研究者的关注，比如鱼及鱼肉制品、肉及其肉制品、酒类、奶酪、酱油和泡菜等[12~17]。而国内外对酱腌菜中生物胺的检验方法与安全评价研究较少，酱腌菜是我国具有传统特色的辅佐佳品，其在生产过程中，生产环境易污染、生鲜原料品质差以及腌制工艺不规范，易导致酱腌菜中生物胺的产生[18~20]。因此，建立酱腌菜中生物胺的测定方法为酱腌菜的质量安全控制具有重要的意义。

目前国内外食品中生物胺检测的主要方法是反高效液相色谱法（RP-HPLC）[21,22]。由于大多数生物胺缺乏紫外和荧光发色基团，需要采用衍生处理才能检测[21,22]。常用的衍生剂有邻苯二甲醛（OPA）[14,23]、丹磺酰氯(DNS-Cl)[15,17,18,24]、磺酰氯(DABS-Cl)[25]、苯甲酰氯[26]、9-芴甲氧羰酰琥珀酰亚胺(Fmoc-OSu)[27]、4-氯-3,5-二硝基三氟甲苯(CNBF)[28]和 1,2-萘醌-4-磺酸钠[29]等。这些衍生剂存在价格昂贵、衍生过程复杂、试剂消耗大、衍生产物的稳定性低等缺点使其应用受到限制。因此，选择经济低耗、操作简单、衍生反应快及衍生产物稳定的衍生剂是食品中生物胺色谱分析的关键。

4-氟-3-硝基三氟甲苯（FNBT）作为衍生剂具有经济易获得、试剂消耗少、衍生反应快及衍生产物稳定的特点已被应用于小鼠大脑组织中多胺[30]（腐胺、亚精胺、精胺）和葡萄酒中 4 种生物胺[31]（组胺、色胺、*β*-苯乙胺、酪胺）的测定。但现有的生物胺检测方法（FNBT 作为衍生剂）存在衍生过程复杂、耗时长等缺点而未被应用于其它食品中生物胺的检测，尤其是利用 FNBT 作为衍生剂同时测定食品中的 8 种主要生物胺目前国内外也尚未见相关报道。本研究利用 FNBT 作为衍生剂，对衍生条件进行优化，建立一种新的柱前衍生 RP-HPLC 检测法，该方法可快速、简单、准确测定酱腌菜中的 8 种生物胺。利用该方法进一步分析 26 种市售酱腌菜中生物胺的种类和含量，对了解市场上酱腌菜产品的生物胺污染现状及潜在风险具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

市售酱腌菜样品，购自武汉各超市。

1.2 试剂和仪器

组胺、酪胺、尸胺、腐胺、苯乙胺、色胺、精胺、亚精胺（纯度 98%以上），美国 Sigma 公司；4-氟-3-硝基三氟甲苯（FNBT）(纯度为 99%)，N,N-二异丙基乙胺（DIPEA)(纯度为 99%)，上海麦克林生化科技有限公司；乙腈、甲醇：色谱纯，德国 Merck 公司；H_3BO_3、$Na_2B_4O_7.10HO_4$ 和乙酸乙酯等试剂：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

高效液相色谱仪 Dionex Ultimate 3000，戴安公司；Milli-Q 超纯水处理器，美国 Millipore 公司；微型旋蜗混合仪器，沪西分析仪器厂；3-18K 型高速冷冻离心机，德国 sigma 公司；24 孔可调式氮吹仪，上海泉岛科贸有限公司；PHS-3E 酸度计，上海雷磁仪器厂；恒温震荡水浴锅。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液和试剂的配制

标准生物胺溶液：准确称取各标准品 100 mg（精确到 0.001 g），用 0.1 mol/L 盐酸溶解，并定容至 100 mL 得标准储备液(1 mg/mL)。分别准确取以上 8 种标准储备液 1 mL 混合均匀，用 0.1 mol/L 盐酸定容到 10 mL，再用 0.1 mol/L 盐酸稀释成终浓度分别为 100、50、20、10、5、2、0.5 mg/L 的标准混合溶液，4 ℃避光保存。

4-氟-3-硝基三氟甲苯（FNBT）衍生剂：用甲醇稀释 20 倍，室温储藏。

1.3.2 样品提取

称取 5.0 g 搅碎酱腌菜样品于 50 mL 离心管中，加 20 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液，超声提取 30 min，离心（6000 r/min，10 min，4 ℃），收集上层清液，加入 20 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液重复提取 1 次，合并上清液，用 0.1 mol/L 盐酸溶液定容至 50 mL。

1.3.3 衍生条件

衍生过程参考 Tang[28]和 Jastrzębska[31]的方法，并作探索和优化。0.5 mL 生物胺标准混合溶液或样品提取液，用 0.1 mol/L $Na_2B_4O_7$ 缓冲液调节 pH=9.5，加入 1.0 mL 4-氟-3-硝基三氟甲苯（FNBT）、20 μL N,N-二异丙基乙胺（DIPEA），置于恒温震荡水浴锅（60 ℃、

30 min），取出后加 20 μL HCL(2 mol/L)中断反应，室温反应 5 min，用 5 mL 乙酸乙酯提取，涡旋振荡后离心（6000 r/min，10 min，4 ℃），收集上层有机相，重复提取 3 次，合并提取液，40 ℃下氮气吹干，1.0 mL 甲醇溶解残留物，过 0.45 μm 滤膜，进行 HPLC 测定。

1.3.4 色谱条件

采用 Agilent TC-C18 色谱柱(4.6×250 mm×5 μm)，紫外检测波长 242 nm，柱温为 35 ℃，进样量 20 μL。流动相 A 为超纯水，流动相 B 为乙腈，流速为 1.00 mL/min，梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution program

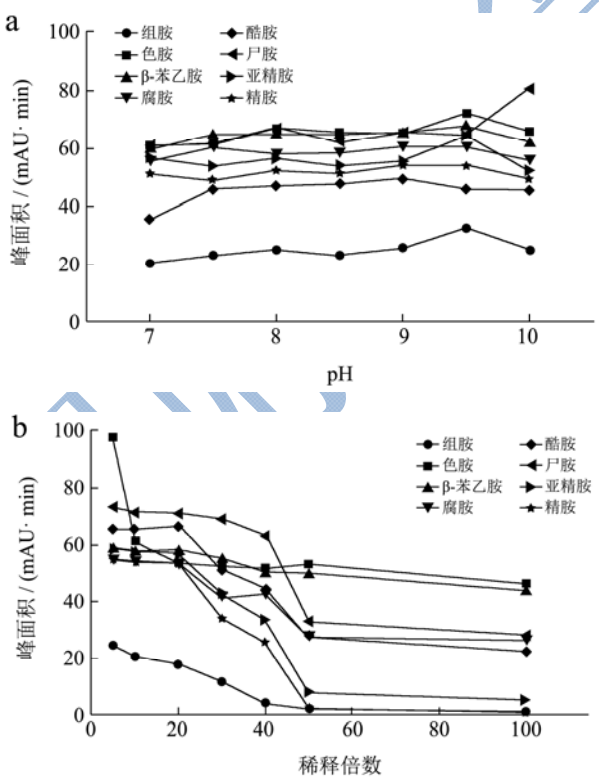
Time/min	A%	B%
0	65	35
21	8	92
31	22	78
36	65	35

1.3.5 数据处理与统计分析

用 Excel 2007、SPSS 21.0 和 Graphpad Prism 5.01 软件对数据进行处理分析以及作图。

2 结果与分析

2.1 衍生条件的确定



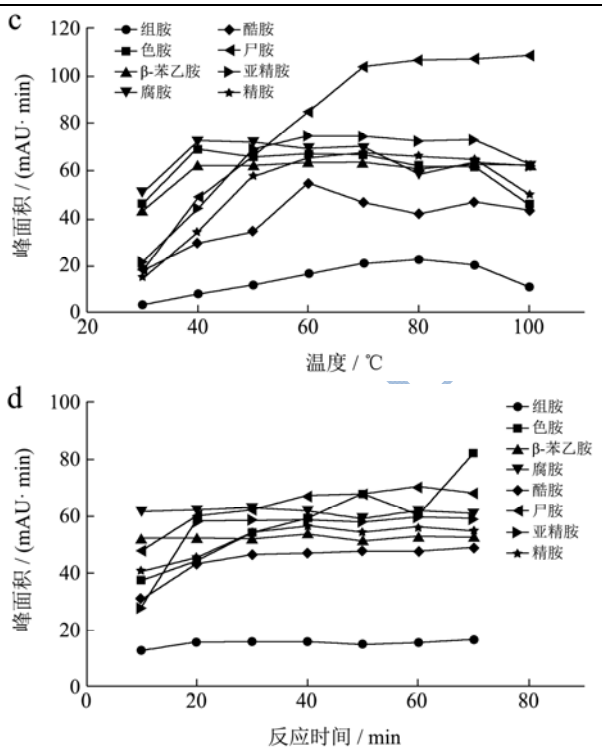


图 1 衍生条件的优化

Fig.1 Optimization of the derived conditions

注：a，衍生反应的 pH 值；b，衍生剂的剂量；c，衍生反应的温度；d，衍生反应的时间。

2.1.1 衍生介质与 pH 值的选择

考虑了不同碱性衍生介质(碳酸氢钠缓冲液和硼酸盐缓冲液）对生物胺衍生反应的影响。结果表明，以碳酸氢钠缓冲液为衍生介质时只有 6 种生物胺(组胺、*β*-苯乙胺、腐胺、酪胺、亚精胺和精胺)衍生效果好，以硼酸盐缓冲液为衍生介质时，8 种生物胺衍生效果都较好，故选择硼酸盐缓冲液作为衍生介质。

进一步考察了衍生介质的 pH 值（7.0~10.0）对衍生反应的影响。25 mg/L 标准生物胺溶液，以硼酸盐缓冲液为衍生介质，pH 值（7.0~10.0），FNBT 为衍生剂，在 60 ℃下衍生反应 60 min。结果见图 1a，8 种生物胺衍生产物的峰面积随着衍生介质 pH 值的升高先逐渐增大后呈略下降趋势，在 pH=9.5 时 8 种生物胺衍生产物的峰面积达到最大值，当 pH 大于 9.5 时，除尸胺外，其它七种生物胺衍生产物的峰面积均呈减小的趋势，因此选择衍生介质的 pH 值为 9.5。

2.1.2 衍生剂剂量的选择

考虑了不同剂量衍生剂 FNBT（稀释 100、50、40、30、20、10 和 5 倍）对衍生反应的影响。25 mg/L 标准生物胺溶液，以硼酸盐缓冲液为衍生介质，pH=9.5，FNBT（稀释 100、50、40、30、20、10 和 5

倍）为衍生剂，在 60 ℃下衍生反应 60 min。结果见图 1b，8 种生物胺衍生产物的峰面积随着衍生剂稀释倍数的增大先呈平缓趋势减小，当稀释倍数大于 20 倍时，8 种生物胺衍生产物的峰面积呈大幅度减少，使用稀释 20 倍的 FNBT 为衍生剂时，8 种生物胺衍生产物的峰面积基本可以达到最大值，为避免衍生剂的浪费。因此选择稀释 20 倍的 FNBT。

2.1.3 衍生反应温度、时间的选择

衍生反应的完成程度，影响衍生物的产率。考察了衍生反应温度（30~100 ℃）对生物胺衍生产物转化速度的影响。对 25 mg/L 生物胺标准溶液，以硼酸盐缓冲液为衍生介质，pH=9.5，FNBT（稀释 20 倍），温度（30~100 ℃），衍生反应 60 min。结果见图 1c，随着衍生反应温度的升高，衍生产物的生成速率越快，当衍生反应温度大于 60 ℃时，酪胺衍生产物的峰面积开始减少。当衍生反应温度大于 70 ℃时，色胺、*β*-苯乙胺，亚精胺和精胺衍生产物的峰面积也开始减少。因此选择衍生反应温度为 60 ℃。

进一步考察了衍生反应时间（10~60 min）对衍生产物产率的影响。对 25 mg/L 生物胺标准溶液，以硼酸盐缓冲液为衍生介质，pH=9.5，FNBT（稀释 20 倍），在 60 ℃下衍生反应（10~60 min）。结果见图 1d，10~30 min 内，8 种生物胺衍生产物的峰面积随衍生反应时间的增加而增加，在 30 min 之后，衍生产物的峰面积基本保持不变，说明衍生反应基本达到完全。因此选择衍生反应时间为 30 min。

2.2 标准品与实际样品图谱

以乙腈－超纯水作为流动相进行梯度洗脱，标准品衍生物和实际样品中生物胺衍生物色谱图分别见图 2。结果显示溶剂峰在 18 min 内全部流出，8 种生物胺衍生物能在 30 min 内有效分离，各生物胺衍生物峰形对称，杂质干扰少，因此该流动相洗脱梯度能满足实际样品中生物胺的测定要求。

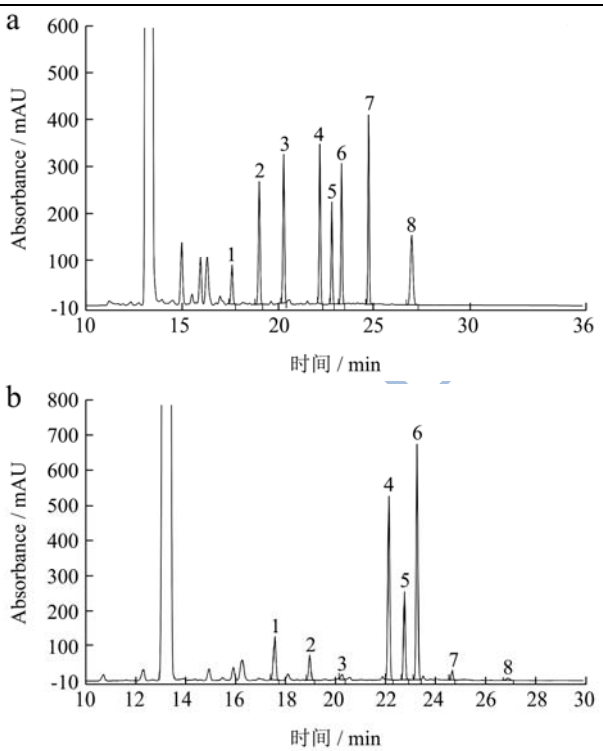


图 2 标准品和酱腌菜样品生物胺衍生物 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of biogenic amines derivatives in standard and pickled vegetable sample

注：a.标准品，b.酱腌菜样品；1.组胺，2.色胺，3.*β*-苯乙胺，4.腐胺，5.酪胺，6.尸胺，7.亚精胺，8.精胺。

2.3 方法学评价

2.3.1 标准曲线、检出限和定量限

取样品滤液衍生物用乙腈适当稀释，以信噪比(S/N)大于 3 作为检出限的判断标准，以信噪比大于 10 作为定量限的判断标准。8 种生物胺的线性范围、标准曲线的回归方程、检出限及定量限见表 2，在 0.5~100 mg/L 浓度范围内，8 种生物胺呈现良好的线性相关（r^2≥0.999）。方法的检出限为 0.013~0.053 mg/L，定量限为 0.044~0.176 mg/L，说明该检测方法的灵敏度高。

表 2 8 种生物胺的线性范围、回归方程、相关系数（r^2）及检测限

Table 2 Linear range, regression equation, correlation coefficient (r^2) and detection limits of eight biogenic amines

生物胺	线性范围/(mg/L)	回归方程	r^2	检出限/(mg/L)	定量限/(mg/L)
组胺	0.5~100	y=0.907x-0.524	0.9994	0.053	0.176
色胺	0.5~100	y=2.457x+0.657	0.9999	0.020	0.065
β-苯乙胺	0.5~100	y=2.723x+1.133	0.9994	0.013	0.044
腐胺	0.5~100	y=2.496x+1.568	0.9993	0.019	0.064
酪胺	0.5~100	y=1.787x-0.668	0.9998	0.027	0.090
尸胺	0.5~100	y=2.146x+1.140	0.9996	0.024	0.079
亚精胺	0.5~100	y=2.467x+2.180	0.9991	0.015	0.049
精胺	0.5~100	y=2.915x-4.210	0.9995	0.017	0.058

2.3.2 精密度、稳定性及加标回收率

对 10 mg/L 标准品生物胺衍生物连续进样 7 次的 HPLC 试验中，组胺、色胺、β-苯乙胺、腐胺、酪胺、尸胺、亚精胺和精胺峰面积的 RSD 分别为：0.422%、1.507%、0.619%、2.702%、0.324%、2.193%、1.392%和 0.657%，RSD≤3%。同一样品连续进样 7 次的 HPLC 试验中，组胺、色胺、尸胺、腐胺、酪胺、β-苯乙胺、亚精胺和精胺峰面积的 RSD 分别为：1.690%、2.201%、1.612%、2.402%、1.324%、2.193%、0.920%和 1.457%，RSD≤3%。将同一样品的生物胺衍生物于 4 ℃下保存，连续测定 3 d，每天进样 3 次，测得 8 种生物胺衍生物峰面积的日内 RSD 和日间 RSD 分别为 0.78%~2.15%和 2.32%~6.43%。结果表明：该仪器及方法的精密度良好，生物胺衍生产物的稳定性高。在线性范围内选取 5.0、10、20 mg/kg 三个质量浓度做加标回收实验。8 种生物胺的加标回收率为 93.47%~99.87%，RSD 为 0.47%~3.67%，RSD 小于 5%，说明该方法检测酱腌菜样品中生物胺的含量是可靠的。

2.4 市售酱腌菜样品中生物胺的种类和含量

利用该方法对 26 种市售酱腌菜样品中生物胺的种类和含量进行检测，结果见表 4。

表 3 酱腌菜样品中 8 种生物胺加标回收率试验结果

Table 3 Recoveries of eight biogenic amines in pickled vegetable (n=6)

生物胺	本底值/(mg/kg)	加标后测定值/(mg/kg)			平均回收率	RSD%
		5.0	10.0	20.0		
组胺	10.89±0.35	15.64±0.43	20.07±0.36	29.60±0.32	93.47	1.66
色胺	ND	4.71±0.17	9.68±0.12	19.56±0.60	94.02	1.60
β-苯乙胺	3.06±0.12	7.96±0.41	12.97±0.52	23.26±0.20	98.68	1.77
腐胺	9.32±0.28	14.37±0.27	18.87±0.69	28.91±0.24	97.58	3.01
酪胺	4.89±0.23	9.91±0.37	14.36±0.20	25.19±0.40	98.85	3.67
尸胺	5.77±0.42	10.69±0.41	15.66±0.41	24.81±0.84	97.51	2.04
亚精胺	10.60±0.33	15.69±0.27	20.50±0.37	30.33±0.33	99.87	1.75
精胺	1.97±0.19	6.81±0.28	11.70±0.35	21.26±0.68	96.84	0.47

表 4 酱腌菜中生物胺的含量(mg/kg)

Table 4 Content of biogenic amines in pickled vegetable samples (mg/kg)

样品	组胺	色胺	β-苯乙胺	腐胺	酪胺	尸胺	亚精胺	精胺	总生物胺	类型
1	66.92±2.31	14.61±0.78	2.89±0.35	90.10±0.47	41.46±0.56	126.30±1.67	3.78±0.17	1.85±0.06	347.92±6.38^{e}	F
2	6.01±0.11	130.11±0.57	30.75±1.06	74.78±1.68	278.01±2.50	6.09±0.59	36.18±1.05	3.66±0.30	565.75±7.86^{c}	F
3	ND	1.57±0.09	2.27±0.23	8.47±1.58	1.66±0.18	2.74±0.22	7.07±0.73	14.29±1.62	40.57±5.28^{m,n}	F
4	19.99±0.12	5.86±0.14	6.69±0.85	54.55±0.38	58.30±0.05	9.98±0.12	9.81±0.03	1.45±0.16	166.62±1.86^{h}	F
5	24.96±0.33	1.51±0.11	1.44±0.10	64.14±0.74	13.81±0.67	39.07±1.03	5.14±0.64	0.24±0.03	166.79±3.97^{h}	F
6	1.82±0.28	2.95±0.51	4.52±0.28	2.98±0.63	64.16±1.15	7.64±0.97	8.87±0.76	0.71±0.27	112.57±5.76^{i}	F
7	60.44±0.25	2.17±0.38	0.90±0.10	9.33±1.15	45.72±2.00	13.27±1.21	9.59±1.71	4.23±0.72	162.55±9.00^{h}	F
8	88.20±2.09	8.32±0.96	9.84±0.96	198.97±1.06	100.63±0.80	269.19±2.39	16.34±1.32	1.33±0.09	692.82±9.68^{a}	F
9	32.33±1.15	8.10±1.32	4.16±0.17	73.71±1.32	54.19±0.95	128.02±0.53	14.61±0.41	2.33±0.71	317.65±6.02^{f}	F
10	1.39±0.21	3.01±0.58	4.75±0.75	3.53±0.26	66.82±1.78	8.23±0.52	9.27±0.43	0.71±0.04	97.71±4.56^{j}	F
11	71.58±0.57	18.66±0.71	12.04±0.24	199.75±2.58	65.86±2.40	202.16±2.37	21.57±1.56	1.05±0.11	592.66±10.55^{b}	F
12	71.00±0.74	0.89±0.11	1.31±0.18	353.88±1.99	41.59±0.45	56.35±1.73	7.93±0.61	0.57±0.09	536.51±5.98^{d}	F
13	1.56±0.05	1.31±0.08	2.41±0.27	9.78±0.78	0.44±0.03	ND	7.82±0.48	19.19±0.11	50.63±2.26^{l}	F
14	3.93±0.48	1.49±0.13	1.87±0.21	4.32±0.23	0.48±0.03	4.36±0.36	6.89±0.29	1.44±0.10	24.75±1.83^{o,p}	N
15	ND	0.92±0.11	0.78±0.11	2.40±0.25	1.38±0.07	ND	2.28±0.22	2.09±0.19	9.86±0.87^{q}	N
16	ND	5.14±0.56	4.22±0.41	9.91±0.38	0.20±0.03	1.42±0.22	5.79±0.44	1.53±0.10	28.21±2.14^{o}	N
17	4.20±0.19	1.28±0.15	0.53±0.13	31.17±0.46	19.62±0.35	5.82±0.75	2.43±0.08	2.08±0.12	67.12±2.23^{k}	N
18	1.05±0.06	1.31±0.20	0.10±0.05	4.81±0.14	9.25±0.44	0.87±0.09	5.43±0.71	0.76±0.13	23.57±1.82^{o,p}	N

转下页

接上页

19	23.57±1.82	1.37±0.17	1.31±0.18	10.96±0.91	4.01±0.26	3.83±0.17	12.60±0.40	3.54±0.45	37.61±2.54^{n}	N
20	67.86±1.63	2.29±0.07	3.38±0.25	72.64±1.13	35.95±0.70	47.56±0.69	6.73±0.39	0.73±0.06	270.93±5.67^{g}	N
21	20.20±0.33	3.75±0.52	ND	80.75±0.43	18.83±0.42	45.50±1.23	0.56±0.08	0.57±0.09	170.17±3.09^{h}	N
22	ND	1.27±0.08	0.59±0.16	12.14±1.98	1.86±0.40	3.49±0.71	11.28±1.28	3.18±0.75	40.33±6.42^{m,n}	N
23	ND	1.34±0.06	1.30±0.12	5.83±0.38	0.24±0.04	1.42±0.10	11.96±0.48	3.08±0.09	25.16±1.25^{o,p}	N
24	1.09±0.09	1.46±0.18	0.35±0.02	5.08±0.72	1.16±0.11	3.24±0.46	10.34±0.44	2.15±0.65	24.87±2.68^{o,p}	N
25	1.65±0.10	1.58±0.25	ND	3.66±0.18	1.73±0.07	3.47±0.39	3.60±0.31	0.25±0.02	17.05±1.40^{p,q}	N
26	10.89±0.35	ND	3.06±0.12	9.32±0.28	4.89±0.23	5.77±0.42	10.60±0.33	1.97±0.19	46.5±1.92^{l,m}	N

注：F 表示发酵型酱腌菜，N 表示非发酵型酱腌菜；ND 表示未检测出。不同字母间有显著性差异(p<0.05)。

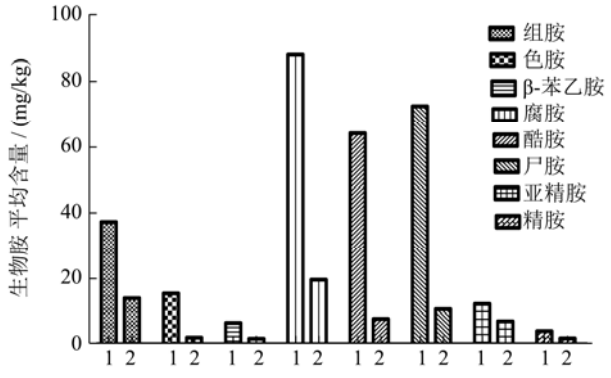


图 3 酱腌菜单体生物胺平均含量比较

Fig.3 Comparison of the average content of monomer biogenic amines in pickled vegetable samples

注：1.发酵型酱腌菜；2.非发酵型酱腌菜。

由表 4 可知，13 种发酵型酱腌菜样品中的生物胺总量范围为 40.57~692.82 mg/kg，平均含量为 296.21 mg/kg，组胺和尸胺检出率均为 92.3%，其它 6 种生物胺检出率均为 100%。13 种非发酵型酱腌菜样品中的生物胺总量范围为 9.86~270.93 mg/kg，平均含量为 60.47 mg/kg，组胺、色胺、β-苯乙胺和尸胺检出率分别为 69.2%、92.3%、84.6%和 92.3%，其它 4 种生物胺检出率均为 100%。

在所检测的单体生物胺中，发酵型酱腌菜中组胺的含量为 0~88.20 mg/kg、色胺的含量为 0.89~130.11 mg/kg、β-苯乙胺的含量为 0.90~30.75 mg/kg、腐胺的含量为 2.98~353.88 mg/kg、酪胺的含量为 0.44~278.01 mg/kg、尸胺的含量为 0~269.19 mg/kg、亚精胺的含量为 3.78~21.57 mg/kg、精胺的含量为 0.24~19.19 mg/kg。非发酵型酱腌菜中组胺的含量为 0~67.86 mg/kg、色胺的含量为 0~5.14 mg/kg、β-苯乙胺的含量为 0~4.22 mg/kg、腐胺的含量为 2.40~80.75 mg/kg、酪胺的含量为 0.20~35.95 mg/kg、尸胺的含量为 0~47.56 mg/kg、亚精胺的含量为 0.56~12.60 mg/kg、精胺的含量为 0.25~3.54 mg/kg。发酵型和非发酵型酱腌菜中 8 种单体生物胺的平均含量比较如图 3 所示，发酵型酱腌菜中 8 种生物胺单体的平均含量均高于非发酵型酱腌菜。腐胺、尸胺和酪胺是发酵型酱腌菜中的主要生物胺，平均含量分别为 88.00 mg/kg、72.42 mg/kg 和 64.05 mg/kg，腐胺和尸胺是非发酵型酱腌菜中的主要生物胺，平均含量分别为 13.86 mg/kg 和 10.56 mg/kg，此结果与邢茜和瞿凤梅等[19,20]人研究一致。按 FDA 规定食品中组胺的含量不得超过 500 mg/kg，26 个样品中组胺的含量都在安全范围内。根据研究，尸胺、组胺、腐胺及酪胺对人体有直接的毒害作用外，腐胺、尸胺可以增加组胺和酪胺的毒性，也可以与亚硝酸盐反应形成强致癌物亚硝胺[6~11]。因此，Kuensh[32]等人建议泡菜中腐胺的限量为 50 mg/kg，在所检测的 26 个样品中，有 10 个样品中腐胺的含量超出 50 mg/kg，8、11、12 号样品中腐胺的含量分别达到了 198.97 mg/kg、199.75 mg/kg 和 353.88 mg/kg。根据欧盟的规定酪胺含量不得超过 100~800 mg/kg，在所检测的 26 个样品中，2、8 号样品中酪胺的含量分别为 278.01 mg/kg 和 100.63 mg/kg。在所检测的 26 个样品中，8 号样品中尸胺的含量最高达到了 269.19 mg/kg，β-苯乙胺、色胺、亚精胺和精胺的含量较少。

3 结论

本文以 4-fluoro-3-nitrobenzo-trifluoride(FNBT)为衍生剂，N,N-diisopropylethyl-amine(DIPEA)为催化剂，建立了一种新的柱前衍生 RP-HPLC 同时测定酱腌菜中 8 种生物胺的方法。该方法经济、低耗、操作简便，可准确、快速实现对酱腌菜中 8 种生物胺的测定。对 26 种市售酱腌菜样品中 8 种生物胺的种类和含量进行了分析，发酵型酱腌菜中的生物胺总量范围为 40.57~692.82 mg/kg，腐胺、尸胺和酪胺是发酵型酱腌菜中的主要生物胺，平均含量分别为 88.00 mg/kg、72.42 mg/kg 和 64.05 mg/kg，非发酵型酱腌菜中的生物胺总量范围为 9.86~270.93 mg/kg，腐胺和尸胺是非发酵型酱腌菜腐胺的主要生物胺，平均含量分别为 13.8 mg/kg 和 10.56 mg/kg。发酵型酱腌菜中 8 种生物

胺单体的平均含量均高于非发酵型酱腌菜。目前，我国对酱腌菜中生物胺的监测未引起足够的重视，也未制定相应的限量标准。从本文及其他研究结果表明，市售酱腌菜中的生物胺存在安全隐患，有必要加大对市售酱腌菜中生物胺含量的调查和安全性评价。

参考文献

[1] Silla Santos M H. Biogenic amines: their importance in foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 29(2/3): 213-231

[2] Blenau W, Baumann A. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera* [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2001, 48(1): 13-38

[3] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Research International, 1996, 29(7): 675-6 90

[4] Benetti F, Furini C R, de Carvalho Myskiw J, et al. Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 12(9): 2536-2542

[5] Falus A, Gilicze A. Tumor formation and antitumor immunity the overlooked significance of histamine [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2014, 96(2): 225-231

[6] Sandler M, Youdim M B H, Hanington E. A phenylethyl amine oxidising defect in migraine [J]. Nature, 1974, 250(464): 335-337

[7] Caston J C, Eaton C L, Gheorghui B P, et al. Tyramine induced hypertensive episodes, panic attacks in hereditary deficient monoamine oxidase patients: case reports [J]. JSC Medical Association, 2002, 98(4): 187-192

[8] Del-Rio B, Redruello B, Linares D M, et al. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture [J]. Food Chemistry, 2017, 218: 249-255

[9] Linares D M, Del-Rio B, Redruello B, et al. Comparative analysis of the *in vitro* cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine [J]. Food Chemistry, 2016, 197: 658-663

[10] Russo P, Spano G, Arena M P, et al. Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food? [C]// MENDEZ-VILSA. Current research, technology and education topics n applied microbiology and microbial biotechnology, Spain, 2010: 1087-1095

[11] Sen N P, Seaman S W, Baddoo P A, et al. Formation of N-nitroso-N-methylurea in various samples of smoked dried fish, fish sauce, seafoods, and ethnic fermented/pickled vegetables following incubation with nitrite under acidic conditions [J]. J Agric. Food Chem., 2001, 49(4): 2096-2103

[12] Zare D, Ghazali H M. Assessing the quality of sardine based on biogenic amines using a fuzzy logic model [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 936-943

[13] Hoa V B, Hyun-Woo S, Jin-Hyoung K, et al. The effects of starter culture types on the technological quality, lipid oxidation and biogenic amines in fermented sausages [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 74: 191-198

[14] 陈霞,胡月,李璐,等.水产品中生物胺的两种衍生测定方法比较[J].中国食品学报,2015,15(8):211-217
CHEN Xia, HU Yue, LI Lu, et al. Comparison of the determination of biogenic amines in fish by two pre-column derivatization methods [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(8): 211-217

[15] 曹利瑞,朱松,俞剑燊,等.黄酒中 9 种生物胺的高效液相色谱分析法[J].食品科学,2016,37(4):103-107
CAO Li-rui, ZHU Song, YU Jian-shen, et al. Development of an analytical method for nine biogenic amines in Chinese yellow wine by HPLC [J]. Food Science, 2016, 37(4): 103-107

[16] 杨姗姗,杨亚楠,李雪霖,等.固相萃取-毛细管高效液相色谱联用测定奶酪中的生物胺[J].分析化学,2016,44(3):396-402
YANG Shan-shan, YANG Ya-nan, LI Xue-lin, et al. Determination of biogenic amines in cheese by on-line solid phase extraction coupled with capillary high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(3): 396-402

[17] 邹阳,赵谋明,赵海锋.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 Yang, ZHAO Mou-ming, ZHAO Hai-feng. Simultaneous determination of 8 kinds of biogenic amines in soy sauce by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(5): 570-573

[18] Cvetkovic B R, Pezo L L, Tasic T, et al. The optimisation of traditional fermentation process of white cabbage (in relation to biogenic amines and polyamines content and microbiological profile) [J]. Food Chemistry, 2015, 168: 471-477

[19] 邢茜,陈浩,曲桂芹,等.高效液相法测定市售腌制蔬菜商品中 8 种生物胺的含量[J].食品与发酵工业,2013,39(5):161-165
XING Qian, CHEN Hao, QU Gui-qin, et al. Determination of

eight biogenic amines in merchant pickles by high performance liquid chromatography [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(5): 161-165

[20] 瞿凤梅,丁晓雯,王瑜.市售泡菜中生物胺含量的比较分析[J].食品工业科技,2014,5(21):316-319,323
QU Feng-mei, DING Xiao-wen, WANG Yu. Comparative analysis of the content of biogenic amines in merchant Sichuan pickles [J]. Science & Technology of Food Industry, 2014, 35(21): 316-319, 323

[21] 王光强,俞剑燊,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 Guang-qiang, YU Jian-shen, HU Jian, et al. Progress in research on biogenic amines in foods [J]. Food Science, 2016, 37(1): 269-278

[22] Önal A, Tekkeli S E K, Önal C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 509-515

[23] 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]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(47): 7385-7392

[24] Sun X, Zhou K, Gong Y, et al. Determination of biogenic amines in Sichuan-style spontaneously fermented sausages [J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(8): 2299-2307

[25] Guo X, Guan X, Wang Y, et al. Reduction of biogenic amines production by eliminating the PEP4 gene in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of Chinese rice wine [J]. Food Chemistry, 2015, 178: 208-211

[26] Fu Y, Zhou Z, Li Y, et al. High-sensitivity detection of biogenic amines with multiple reaction monitoring in fish based on benzoyl chloride derivatization [J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1465: 30-37

[27] Wei F, Xu X, Zhou G, et al. Irradiated Chinese Rugao ham: changes in volatile N-nitrosamine, biogenic amine and residual nitrite during ripening and post-ripening [J]. Meat Science, 2009, 81(3): 451-455

[28] Tang T, Qian K, Shi T, et al. Monitoring the contents of biogenic amines in sufu by HPLC with SPE and pre-column derivatization [J]. Food Control, 2011, 22(8): 1203-1208

[29] Hernandez-Cassou S, Saurina J. Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques [J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011, 879(17-18): 1270-1281

[30] Sohn H S, Park Y N, Lee S R. Effect of immobilization stress, on brain polyamine levels in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats [J]. Brain Research Bulletin, 2002, 57(5): 575-579

[31] Jastrzębska A, Piasta A, Kowalska S, et al. A new derivatization reagent for determination of biogenic amines in wines [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2016, 48: 111-119

[32] Kuensh U, Schaerer H, Temperli A. Study on the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation, in International Conference on Biotechnology and Food [C]// Stuttgart: Holienheim University, 1989: 20-24