

高效液相色谱法同时测定酱油中的 8 种生物胺

邹阳, 赵谋明, 赵海锋

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文建立了高效液相色谱法同时检测酱油中色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺和精胺的方法。采用 5% 三氯乙酸溶液为样品提取溶剂, 提取液经丹磺酰氯柱前衍生 30 min, 最终 HPLC 进行定性和定量分析。本方法中 8 种生物胺的线性范围为 1.0~50 $\mu\text{g/mL}$, 相关系数 R^2 大于 0.99, 检出限 ($S/N=3$) 为 0.075~0.3 $\mu\text{g/mL}$ 。在添加水平为 1.00 和 5.00 $\mu\text{g/mL}$ 时, 样品的平均回收率在 83%~111% 之间, 相对标准偏差为 0.43%~19.0%。本方法具有线性范围广, 灵敏度和准确度高等优点, 适用于酱油中生物胺的检测。采用本方法对市售 10 种酱油进行检测, 总生物胺含量的范围为 50.82~1898.17 $\mu\text{g/mL}$, 其中酪胺、腐胺和苯乙胺是酱油样品中含量最多的生物胺。

关键词: 生物胺; 酱油; 高效液相色谱法(HPLC)

文章编号: 1673-9078(2012)5-570-573

Simultaneous Determination of 8 kinds of Biogenic Amines in Soy Sauce by HPLC

ZOU Yang, ZHAO Mou-ming, ZHAO Hai-feng

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: An analytical method for simultaneous determination of tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine and spermine in soy sauce by HPLC was developed. Biogenic amines in soy sauce were extracted with a mixture of 5% TCA, and then derived with dansyl chloride for 30 min, HPLC was used to qualitative and quantitative analysis. Under the optimal conditions, linear range was 1.0~50 $\mu\text{g/mL}$ for biogenic amines and the correlation coefficient (R^2) was greater than 0.99. The limits of detection were in the range of 0.075~0.3 $\mu\text{g/mL}$. At the spiked levels of 1.00 and 5.00 $\mu\text{g/mL}$, the average recoveries were 83%~111% with the relative standard deviations of 0.43%~19%. The results showed that the proposed method has a good linearity and sensitivity which is suitable to detect biogenic amines in soy sauce. The established method has been successfully applied to determine biogenic amines in 10 commercial soy sauce samples, and the values of total biogenic amines were in the range of 50.82~1898.17 $\mu\text{g/mL}$. Tyramine, putrescin and phenylethylamine were found to be predominant amines in soy sauce samples.

Key words: biogenic amine; soy sauce; high-performance liquid chromatography

生物胺是一类含氮的低分子量有机化合物的总称, 根据结构可分为脂肪族、芳香族和杂环族。生物胺在人和动物活性细胞中发挥着重要生理作用, 但当摄入过量时, 会引起人头痛、呼吸紊乱、血压变化、心悸等过敏反应和症状, 严重时可引起大脑出血, 甚至死亡。此外, 生物胺也是生成致癌物质和亚硝基化合物的前体物质^[1]。生物胺主要存在于发酵食品中, 特别是蛋白质含量高且易变质的食品中, 是由原料中

收稿日期: 2012-01-09

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2012BAK17B11); 粤港关键领域重点突破项目 (佛山专项) (2009Z52); 广东省科技计划项目 (2011A020102001)

作者简介: 邹阳 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 赵海锋 (1977-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 发酵工程

的酶或者微生物代谢产生的氨基酸脱羧酶作用产生的。检测食品中生物胺的污染水平, 也可以作为评价食品新鲜度的指标^[2]。酱油是传统的发酵食品, 主要采用大豆 (脱脂大豆)、小麦 (麸皮) 为原料, 经过微生物发酵作用以及酶促和非酶促化学作用酿制而成^[3], 是我国以及亚洲人民饮食中重要的调味品, 其安全性与人们的健康密切相关。酱油的发酵过程主要是制曲过程中产生的蛋白酶水解蛋白质释放氨基酸, 以及多种微生物共同作用的过程。由于含有相对高含量的氨基酸以及多种微生物的发酵作用, 因此, 酱油在长期发酵过程中很容易产生生物胺, 导致酱油潜在的不安全性。

目前, 食品中生物胺的检测和分析方法主要包括毛细管电泳法^[4]、生物传感器法^[5]、薄层色谱法^[6]、气

相色谱法^[7]、离子色谱法^[6]和反相高效液相色谱法^[8],其中高效液相色谱法由于具有灵敏度高、选择性好和分析准确等优点,成为食品中生物胺的重要检测方法之一。但与其他食品不同,酱油成分复杂,蛋白质及油脂含量高,样品基质复杂,为样品的前处理和准确定量带来了困难。目前,国内外并未提出酱油中生物胺具体的限量标准,且关于采用 HPLC 同时检测酱油中 8 种生物胺的研究鲜有报道。因此,本文建立了一种柱前衍生-高效液相色谱法测定酱油中 8 种生物胺的方法,该方法不仅操作简便,而且稳定性和重现性好,准确度和灵敏度高,能为酱油质量安全控制提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 材料

10 种市售酱油样品,购自广州及天津各超市。其中高盐稀态发酵(HLF)酱油和低盐固态发酵(LSF)酱油各 5 种。

1.2 试剂和仪器

组胺、酪胺、尸胺、腐胺、苯乙胺、色胺、精胺、亚精胺和丹磺酰氯(纯度 98%以上),美国 Sigma 公司;甲醇、丙酮为色谱纯,德国 Merck 公司;其余试剂均为分析纯。高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;微型旋涡混合器,沪西分析仪器厂;3-18K 型高速冷冻离心机,德国 sigma 公司;12 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。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

标准生物胺溶液:各标准品用 0.1 mol/L 的 HCl 溶液配制成质量浓度为 1 mg/mL 的生物胺标准溶液(以生物胺单体计);分别取相同体积的 8 种生物胺储备液(腐胺、尸胺、精胺、亚精胺、色胺、苯乙胺、组胺、酪胺),混匀得到质量浓度为 100 μg/mL 的混合标准品工作液。

1.3.2 样品提取及衍生^[9]

准确量取酱油样品 5.00 mL,加到 10 mL 5% (m/V) TCA 溶液中,混匀,振荡提取 60 min,3600 r/min 离心 20 min,取上清液,连续提取两次,合并上清液,定容至 25 mL,滤纸过滤。

吸取酱油样品提取液 5 mL 于 10 mL 离心管中,加入 2.5 mL 正己烷,振荡 2 min,静置分层,3600 r/min 离心 5 min 吸去有机层,剩余倒入盛有 1.5 g NaCl 的烧杯中,调节 pH 至 12 左右。

吸取 1 mL 于 5 mL 离心管中,加入 1 mL 正丁醇

/氯仿(1:1, V/V)萃取,涡旋振荡后离心,取出上层有机相,再次加入 1 mL 正丁醇/氯仿(1:1, V/V)萃取,混合振荡后离心,合并萃取液,于萃取液中加入 3 滴 1 mol/L 的 HCl 溶液,40 °C 下氮气吹干,1 mL 0.1 mol/L HCl 溶解残留物,待衍生。

取 0.5 mL 标准生物胺溶液于 10 mL 离心管中,依次加入 1.5 mL 饱和碳酸氢钠,振荡数秒,加入 1 mL 衍生剂(5 mg/mL),振荡混匀,60 °C 下保温 30 min,隔 10 min 振荡一次,加入 100 μL 的谷氨酸钠,在 60 °C 下保温 15 min(其间取出振荡一次)。取出加入 1 mL 超纯水,振荡,40 °C 下氮气吹至 3 mL,加入 3 mL 无水乙醚,振荡 1 min,静置分层,吸出上层清液于 5 mL 离心管中,再次加入 3 mL 无水乙醚,振荡 1 min,重复上述操作,合并萃取液,40 °C 下氮气吹干,加入 1 mL 甲醇,振荡混匀,过膜,进行 HPLC 测定。样品净化溶液的衍生与标准生物胺溶液衍生条件及方法相同。

1.3.3 色谱条件

参考李志军的方法并稍加修改,采用 C18 色谱柱(4.6×250 mm×5 μm),紫外检测波长 254 nm,柱温为 30 °C,进样量 20 μL。流动相 A 为甲醇,流动相 B 为水,梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,梯度洗脱程度见表 1。

表 1 生物胺衍生样品的分离洗脱梯度

Table 1 Elution gradient of mobile phase for separation of benzyl derivatives of biogenic amines

时间/min	0	10	15	20	27	30	35	40	45
A/%	65	65	75	80	85	90	95	65	65
B/%	35	35	25	20	15	10	5	35	35

2 结果与讨论

2.1 标准样品图谱

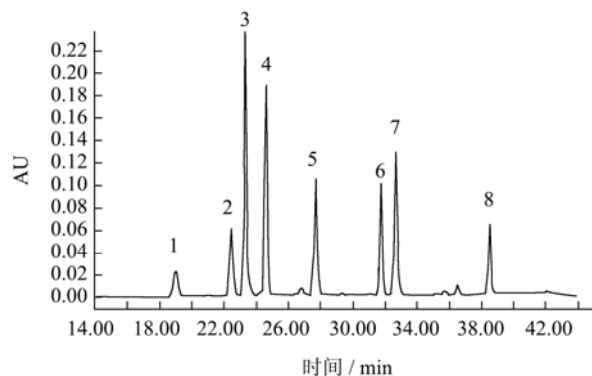


图 1 生物胺标准品色谱图

Fig.1 Typical chromatogram of biogenic amine standards

注: 1.色胺, 2.苯乙胺, 3.腐胺, 4.尸胺, 5.组胺, 6.酪胺, 7.亚精胺, 8.精胺。

以丹磺酰氯为衍生剂, 经过反复的试验比较, 最终选择甲醇-水体系作为流动相进行梯度程序洗脱, 标准品衍生物图谱见图 1。由图 1 可以看出, 8 种生物胺衍生物分离效果好, 峰形对称, 且无杂质干扰, 说明该流动相梯度选择合适。

2.2 标准曲线的回归方程

按 1.3.1 中方法配制混合标准溶液进行线性试验, 浓度分别为 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$, 每个浓度作三个平行。按照上述方法进行衍生、进样、定量, 得到每种生物胺的线性回归方程及其线性相关系数, 结果见表 2。

表 2 HPLC 法测定生物胺的回归方程及相关系数

Table 2 R^2 and detection limits of biogenic amines detected by HPLC

生物胺	回归方程	R^2	LOD(S/N=3)($\mu\text{g/mL}$)
色胺	$Y=49726x-375$	0.9975	0.3
苯乙胺	$Y=73225x+41473$	0.9924	0.1
腐胺	$Y=57950x+76450$	0.9970	0.075
尸胺	$Y=178983x+162616$	0.9943	0.1
组胺	$Y=126204x-45116$	0.9904	0.15
酪胺	$Y=121125x+4649$	0.9999	0.1
亚精胺	$Y=155309x-28291$	0.9925	0.1
精胺	$Y=62337x+7220$	0.9997	0.15

由表 2 可知, 8 种生物胺的峰面积与其相应浓度呈现线性关系, 相关系数大于 0.99, 其中酪胺的相关系数为 0.9999, 精胺的相关系数为 0.9997, 线性范围为 1.0~50 $\mu\text{g/mL}$ 。方法的检出限以信噪比 (S/N) 为 3 来确定, 据此得出本方法腐胺的检测限为 0.075 $\mu\text{g/mL}$, 苯乙胺、尸胺、酪胺、亚精胺的检测限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 组胺、精胺的检测限为 0.15 $\mu\text{g/mL}$, 色胺的检测限为 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 精密度试验

表 3 精密度实验 (n=5)

Table 3 The precision tests of the method (n=5)

生物胺	峰面积平均值	标准偏差	RSD/%
色胺	129983.3	6995.243	5.38
苯乙胺	166360.6	3319.68	1.99
腐胺	780281.1	11616.12	1.48
尸胺	585686.6	5815.43	0.99
组胺	500222.7	10122.43	2.02
酪胺	419369	10739.21	2.56
亚精胺	408028.4	5057.815	1.24
精胺	118525.5	3625.433	3.06

制备 10 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准样品, 衍生后连续进样 5

次, 采用上述建立的方法进行处理和测定, 计算相对标准偏差, 结果如表 3 所示。由表 3 可知, 8 种生物胺的 $RSD \leq 5\%$, 表明检测仪器具有较好的精密度, 检测方法适用。

2.3 加标回收率

选取市售酱油样品, 在其线性范围内选取 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 两个水平添加标准溶液, 每组平行样品 5 个, 采用上述建立的方法进行处理和测定, 计算回收率和相对标准偏差, 结果如表 4 所示。

表 4 8 种生物胺的回收率 (n=5)

Table 4 Recovery tests for eight kinds of biogenic amines

样品	未加标		加标		平均回收率/%	RSD/%
			1 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$		
色胺	6.94±0.37		7.48±0.74	8.58±0.72	83	19.03
苯乙胺	16.53±1.17		19.04±0.3	20.39±2.63	101	9.67
腐胺	59.31±0.53		64.69±3.01	73.84±3.32	111	4.80
尸胺	7.76±0.53		8.46±0.62	10.46±0.22	89	11.58
组胺	103.25±9.77		107.08±8.79	116.91±7.55	105	3.54
酪胺	234.93±19.41		254.97±14.73	260.85±5.55	108	0.43
亚精胺	11.17±1.33		12.39±0.85	14.08±1.20	95	11.24
精胺	2.99±1.48		3.53±1.72	6.52±0.01	85	5.71

表 4 结果表明商品酱油的加标回收率较好, 8 种生物胺的平均回收率在 83%~111%之间。除色胺平均回收率的 RSD 为 19.03%外, 其他 7 种生物胺平均回收率的 RSD 在 0.43~11.58%之间, 因此, 回收率和精密度均满足检测要求。

2.4 市售酱油样品中生物胺的种类及含量

按上述检测方法对 10 种市售酱油 (高盐稀态、低盐固态) 样品进行了检测, 8 种生物胺含量及总生物胺含量如表 5 所示。

由表 5 可知, 不同酱油样品中, 生物胺的含量和种类差异较大, 其中组胺和亚精胺在所有 10 种样品中都能检测到。10 种酱油样品中, 其酪胺含量为 0~650.14 $\mu\text{g/mL}$, 组胺含量为 2.23~228.79 $\mu\text{g/mL}$, 腐胺含量为 0~555.51 $\mu\text{g/mL}$, 苯乙胺含量为 0~340.05 $\mu\text{g/mL}$, 尸胺含量为 0~109.22 $\mu\text{g/mL}$, 色胺含量为 0~25.79 $\mu\text{g/mL}$, 亚精胺含量为 2.31~34.87 $\mu\text{g/mL}$, 精胺含量为 0~31.28 $\mu\text{g/mL}$, 结果与李志军^[9], 卢永梅^[10]和 Mower^[11]等的报道一致。由结果可知, 酪胺、腐胺和苯乙胺是酱油中主要的生物胺, 而 Stute 等^[12] 研究报道酪胺主要是在发酵前期由肠球菌 *Enterococcus faecum* 形成的。也有研究报道高含量的酪胺含量与腐胺和尸胺的高含量有关, 可能是与酱油生产过程中的卫生状况较差有关^[13]。

表5 市售酱油样品的生物胺含量 ($\mu\text{g/mL}$)

Table 5 Biogenic amine contents in tested samples

样品代号	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总胺含量	发酵方式
1	ND	28.46	21.05	7.87	42.54	122.75	3.7	ND	226.37	HLF
2	ND	ND	112.06	ND	110.55	256.54	12.16	ND	491.31	HLF
3	ND	ND	260.18	ND	54.14	199.74	10.83	31.28	556.17	HLF
4	25.79	97.83	340.12	8.14	124.87	348.19	5.71	0.86	951.5	HLF
5	2.25	340.05	555.51	109.22	228.79	650.14	9.07	3.68	1898.71	HLF
6	9.35	9.94	2.31	2.54	2.71	12.28	34.87	11.92	85.93	LSF
7	2.56	9.9	1.76	ND	9.79	9.45	15.6	8.58	57.64	LSF
8	2.38	16.15	ND	ND	2.23	ND	27.21	2.84	50.82	LSF
9	2.29	20.73	25.12	12.61	26.88	272.93	12.25	1.46	374.27	LSF
10	2.29	11.29	20.97	12.33	27.35	184.67	5.61	1.91	266.42	LSF

注：“ND”表示未检出。

3 结论

本文以甲醇-水作为流动相,丹磺酰氯为衍生剂进行柱前衍生,采用梯度洗脱的高效液相色谱法可以在40 min内使8种生物胺达到完全分离。该方法回收率高,重现性好,可以准确测定成品酱油中生物胺的种类和含量,为酱油质量安全控制提供可靠依据。10种市售酱油的总生物胺含量在50.82~1898.17 $\mu\text{g/mL}$,其中酪胺、腐胺和苯乙胺是酱油中含量最多的生物胺。酱油中生物胺含量和种类的差异是否与原料的加工处理方式、酱油的发酵工艺等因素有关尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Research International, 1996, 29(7): 675-690
- [2] Ten Brink B, Damink C, Joosten HM, et al. Occurrence and formation of biologically amines in food [J]. International Journal of Food Microbiology, 1990, 11: 73-84
- [3] 黄持都,鲁绯,纪凤娣.酱油研究进展[J].中国酿造,2009,10: 7-9
- [4] Křížek M, Pelikánová T. Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 815: 243-250
- [5] Draisci R, Volpe G, Lucentini L, et al. Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies [J]. Food Chemistry, 1998, 62: 225-232
- [6] Shalaby A R. Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods [J]. Food Chemistry, 1995, 52(2): 367-372
- [7] Ruiz-Capillas C, Moral A. Effect of controlled atmospheres enriched with O_2 in formation of biogenic amines in chilled hake (*Merluccius merluccius* L.) [J]. European Food Research and Technology, 2001, 212: 546-550
- [8] Moret S, Conte L S. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics [J]. Journal of Chromatography A, 1996, 76: 575-577
- [9] 李志军.食品中生物胺及其产生菌株检测方法研究[D].青岛:中国海洋大学,2007
- [10] Lu Y, Chen X, Jiang M. Biogenic amines in Chinese soy sauce [J]. Food Control, 2009, 20: 593-597
- [11] Mower HF, Bhagavan NV. Tyramine content of Asian and Pacific foods determined by high performance liquid chromatography [J]. Food Chemistry, 1989, 31: 251-257
- [12] Stute R, Petridis K, Steinhart H, et al. Biogenic amines in fish and soy sauces [J]. European Food Research and Technology, 2002, 215: 101-107
- [13] Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausage [J]. Journal of Food Protection, 2000, 63, 1544-1550