

# 两种柱前衍生 RP-HPLC 法测定酱腌菜中生物胺的比较

郭晓丽<sup>1</sup>, 李二虎<sup>1</sup>, 宋雅东<sup>2</sup>, 钟武<sup>1</sup>, 王美玉<sup>1</sup>, 郭小<sup>1</sup>, 潘思轶<sup>1</sup>

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070) (2. 武汉食品化妆品检验所, 湖北武汉 430012)

**摘要:** 本研究分别采用 4-氟-3-硝基三氟甲苯(FNBT)柱前衍生 RP-HPLC 紫外检测分析方法(简称 FNBT 衍生法)和丹磺酰氯柱前衍生 RP-HPLC 紫外检测分析方法(简称 DNS-Cl 衍生法)测定酱腌菜中生物胺含量, 并比较这两种方法对酱腌菜中 8 种生物胺(组胺、色胺、 $\beta$ -苯乙胺、腐胺、酪胺、尸胺、亚精胺及精胺)检测的差异。结果表明, 在浓度范围 1~100 mg/L 内, 两种方法对 8 种生物胺的检测呈现良好的线性相关性, 相关系数  $R^2$  均大于 0.999, FNBT 衍生法的检出限(0.016~0.071 mg/L)优于 DNS-Cl 衍生法(0.066~0.191 mg/L)。方法的精确度试验表明: FNBT 衍生法的加标平均回收率(92.87%~100.18%)略优于 DNS-Cl 衍生法的加标平均回收率(83.52%~102.33%), 两种方法的测量精密性 RSD% 均小于 5%。DNS-Cl 衍生法衍生试剂消耗大、操作繁琐, 对生物胺检测的灵敏度低, 而 FNBT 衍生法衍生试剂消耗少、操作简便、快速、灵敏度及准确性更高, 适用于大批量食品中微量生物胺的快速、准确分析。用两种方法检测酱腌菜中 8 种生物胺的含量存在显著差异( $p < 0.05$ )。

**关键词:** 反高效液相色谱法(RP-HPLC); 生物胺; 酱腌菜; FNBT 衍生法; DNS-Cl 衍生法

文章编号: 1673-9078(2018)09-215-221

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.9.030

## Comparison on Two Pre-column Derivatization Methods for RP-HPLC

### Determination of Biogenic Amines in Pickled Vegetable

GUO Xiao-li<sup>1</sup>, LI Er-hu<sup>1</sup>, SONG Ya-dong<sup>2</sup>, ZHONG Wu<sup>1</sup>, WANG Mei-yu<sup>1</sup>, GUO Xiao<sup>1</sup>, PAN Si-yi<sup>1</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2.Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430012, China)

**Abstract:** This study used the 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoride (FNBT) pre-column derivatization RP-HPLC analysis method with UV detector (abbreviated as FNBT method) and the dansyl chloride pre-column RP-HPLC analysis method with UV detector (abbreviated as DNS-Cl method) to determine biogenic amines in pickled vegetable, and compared the differences between the two methods in 8 types of biogenic amines in pickled vegetable (histamine, tryptamine, guanidine-phenylethylamine, putrescine, tyramine, cadaverine, spermidine and spermine). Results showed that in the concentration range of 1~100 mg/L, the two methods showed a good linear with the detection of the eight biogenic amines with the correlation coefficient  $R^2$  greater than 0.999 and detection limit of the FNBT derivatization method (0.016~0.071 mg/L) lower than that of DNS-Cl derivatization method (0.066~0.191 mg/L). The accuracy test of the methods showed that the average recovery of the FNBT derivatization method (92.87%~100.18%) were slightly better than that of DNS-Cl derivatization method (83.52%~102.33%), with the precision (RSD%) of the two different methods less than 5%. DNS-Cl derivatization method requires a large amount of expensive reagents and cumbersome operation with low sensitivity to biogenic amines analysed, whilst the FNBT derivatization method allows simple, rapid and accurate analyses of eight biogenic amines with low consumption of derivatization reagents and higher sensitivity for biogenic amines. FNBT derivatization method is more suitable for rapid and accurate analysis of trace biogenic amines in large quantities of food. There were significant differences in the levels of eight biogenic amines in pickled vegetables analyzed by two methods ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); biogenic amine; pickled vegetable; FNBT derivatization method; DNS-Cl derivatization method

生物胺是一类含氨基的芳香族、脂肪族及杂环类的低分子有机化合物, 广泛存在于发酵和腐败食品中,

收稿日期: 2018-05-15

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

大多数生物胺是通过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, 少数是通过醛或酮氨基化形成<sup>[1~3]</sup>。低浓度的生物胺是生物体内不可缺少的生理活性物质<sup>[2,4]</sup>, 然而摄入高浓度的生物胺可损害人的神经系统和肠道, 引起头疼、腹泻及呕吐等中毒症状, 严重时甚至会危及生命<sup>[5~7]</sup>。此外, 腐胺和尸胺能抑制

组胺和酪胺相关代谢酶的活性, 而增加组胺和酪胺的毒性, 尸胺、腐胺、亚精胺及精胺也易与亚硝酸盐反应生成强致癌物质亚硝基胺<sup>[8~11]</sup>。食品中的生物胺含量也可以作为食品的新鲜或腐败程度的评价指标<sup>[12]</sup>。因此, 食品中生物胺的定量测定对于有效监控食品的质量安全起到重要作用。

酱腌菜是以新鲜蔬菜为主要原料, 经不同腌渍工艺制作而成的各种蔬菜制品的总称<sup>[13]</sup>。按传统分类方法酱腌菜可分为发酵型酱腌菜和非发酵型酱腌菜<sup>[14]</sup>。但这两类蔬菜腌渍品在腌渍过程中都存在着不同程度的发酵, 可生成高浓度的生物胺<sup>[15~17]</sup>。目前国内外已有不少研究发现腌制蔬菜中存在高浓度的生物胺<sup>[16~20]</sup>。

目前食品中生物胺的检测方法很多, 如离子色谱法(IC)<sup>[21]</sup>、气相-质谱串联色谱法(GC)<sup>[22]</sup>、薄层色谱法(TLC)<sup>[23]</sup>、毛细管电泳法(CSE)<sup>[24]</sup>、液相-质谱串联色谱法(LC-MS)<sup>[25]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)等, 其中 HPLC 因其独特的优势而应用最广<sup>[26,27]</sup>。由于大多数生物胺是缺乏紫外或荧光发色基团的极性分子, 衍生化反应是其进行色谱分析的关键, 衍生剂不仅可以标示出生物胺分子的氨基基团, 还可以降低其极性而增大其在色谱柱中的分离效果, 提高检测的灵敏度<sup>[28]</sup>。丹磺酰氯(DNS-Cl)作为衍生剂能与单、多胺反应, 衍生产物稳定的特点而被广泛应用于测定食品中的生物胺, 但 DNS-Cl 衍生法存在试剂消耗大、耗时长和操作复杂等缺点<sup>[17~19]</sup>。根据文献报道<sup>[29,30]</sup>, 4-氟-3-硝基-三氟甲苯(FNBT)作为衍生剂除能与单、多胺反应, 衍生产物稳定外, FNBT 衍生法还具有高灵敏度等优点。然而该方法存在试剂消耗大、操作复杂、耗时长等问题, 限制了在食品中生物胺的高效准确测定。而经优化建立的 FNBT 衍生法具有简单、快速、准确等优点, 具有测定食品中生物胺的广泛应用前景<sup>[20]</sup>。但 FNBT 衍生法和 DNS-Cl 衍生法测定生物胺比较的研究尚未见相关报道。因此, 本文在 FNBT 衍生法研究的基础上<sup>[20,30]</sup>, 分别用 FNBT 衍生法和 DNS-Cl 衍生法测定酱腌菜中的 8 种生物胺(组胺、色胺、 $\beta$ -苯乙胺、腐胺、酪胺、尸胺、亚精胺及精胺), 比较这两种检测方法的差异性, 完善 FNBT 衍生法的不足, 以期获得更高效的酱腌菜中生物胺的测定方法。

## 1 材料与方

### 1.1 试剂和仪器

组胺、酪胺、尸胺、腐胺、 $\beta$ -苯乙胺、色胺、精胺、亚精胺(纯度 98% 以上), 丹磺酰氯(DNS-Cl),

纯度为 99%, 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、丙酮和甲醇为色谱纯, 德国 Merck 公司;  $H_3BO_3$ ,  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ,  $Na_2CO_3$ 、NaOH、氨水和乙酸乙酯等试剂均为分析纯, 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; 3-18K 型高速冷冻离心机, 德国 sigma 公司; 微型旋涡混合仪器, 沪西分析仪器厂; 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。

### 1.2 材料

市售酱腌菜样品, 购自于武汉市东西湖区超市。

### 1.3 实验部分

#### 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 得标准生物胺储备液(1 mg/mL)。分别准确移取 8 种生物胺标准储备液混合均匀, 再用 0.1 mol/L 盐酸稀释成终浓度分别为 100、50、20、10、5、2、1 mg/L 的标准混合溶液, 4 °C 避光保存。

丹磺酰氯(DNS-Cl)衍生剂: 称取 1 g DNS-Cl, 加入 100 mL 丙酮配制质量浓度为 10 mg/mL 的溶液, 4 °C 冰箱贮藏。

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

称取搅碎的酱腌菜样品 5.0 g 于 50 mL 的离心管中, 加入 20 mL、0.1 mol/L 盐酸溶液超声 30 min, 离心(6000 r/min, 10 min, 4 °C), 移取上清液, 再加入 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 FNBT 衍生法

##### 1.3.3.1 色谱条件

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

Time/min	A%	B%
0	65	35
18	8	92
25	25	75
30	65	35
35	65	35

采用 Agilent TC-C18 色谱柱(4.6×250 mm×5 μm), 紫外检测波长为 242 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。流动相 A: 超纯水, 流动相 B: 乙腈, 流速为 1.0 mL/min, 梯度洗脱程序见表 1。

### 1.3.3.2 FNBT 衍生条件

在 Tang<sup>[31]</sup>和 Jastrzębska<sup>[30]</sup>的研究方法上改进, 具体衍生过程参考<sup>[20]</sup>。

0.5 mL 生物胺标准混合溶液或样品提取液, 用 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 缓冲液调节 pH 为 9.5, 加入 1 mL FNBT (稀释 20 倍) 和 20 μL DIPEA, 置于 60 °C 恒温震荡水浴锅, 30 min 后取出加入 20 μL HCL(2 mol/L) 终止反应, 去除多余的 FNBT, 混合均匀, 静置反应 5 min, 用 5 mL 乙酸乙酯提取, 离心 (6000 r/min, 10 min, 4 °C), 收集上层有机相, 重复提取 3 次, 合并提取液, 40 °C 下氮气吹干, 用 1.0 mL 甲醇溶解残留物, 过 0.22 μm 有机滤膜, 进行 HPLC 测定。

### 1.3.4 DNS-Cl 衍生法

#### 1.3.4.1 色谱条件

采用 Agilent TC-C18(色谱柱 (4.6×250 mm×5 μm)), 紫外检测波长为 254 nm, 柱温为 30 °C, 进样量 20 μL。流动相 A: 超纯水, 流动相 B: 乙腈, 流速为 1.0 mL/min, 梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution program		
Time/min	A%	B%
0	65	35
10	8	80
15	25	90
25	10	90
30	65	35

#### 1.3.4.2 DNS-Cl 衍生条件

在参考瞿凤梅等人<sup>[19]</sup>的研究方法上稍作修改, 0.5 mL 生物胺标准混合溶液或样品提取液, 加 300 μL 饱和 Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液, 200 μL NaOH 溶液(2 mol/L), 1 mL DNS-Cl(10 mg/L), 置于 60 °C 恒温震荡水浴锅(避光), 30 min 后取出加入 200 μL 氨水 (1:1) 终止反应, 暗室下静置反应 30 min(避光), 用 5 mL 乙酸乙酯提取, 离心 (6000 r/min, 10 min, 4 °C), 收集上层有机相, 重复提取 3 次, 合并提取液, 40 °C 下氮气吹干, 用 1.0 mL 甲醇溶解残留物, 过 0.22 μm 有机滤膜, 进行 HPLC 测定。

### 1.4 数据处理

用 Excel 2007 和 SPSS 21.0 软件对样品中生物胺的两种检测方法的结果进行数据处理, 并比较分析两

种检测方法的差异性, 重复 6 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物胺的色谱分离效果

图 1 和图 2 分别为 FNBT 衍生法和 DNS-Cl 衍生法检测生物胺的 HPLC 色谱图, 生物胺标准品的 HPLC 色谱图分别见图 1 (a) 和图 2 (a)。结果显示: 8 种生物胺在 30 min 内色谱峰完全分离, 峰形对称, 杂质干扰少。FNBT 衍生法检测 8 种生物胺的出峰顺序依次为组胺, 色胺, β-苯乙胺, 腐胺, 酪胺, 尸胺, 亚精胺, 精胺。

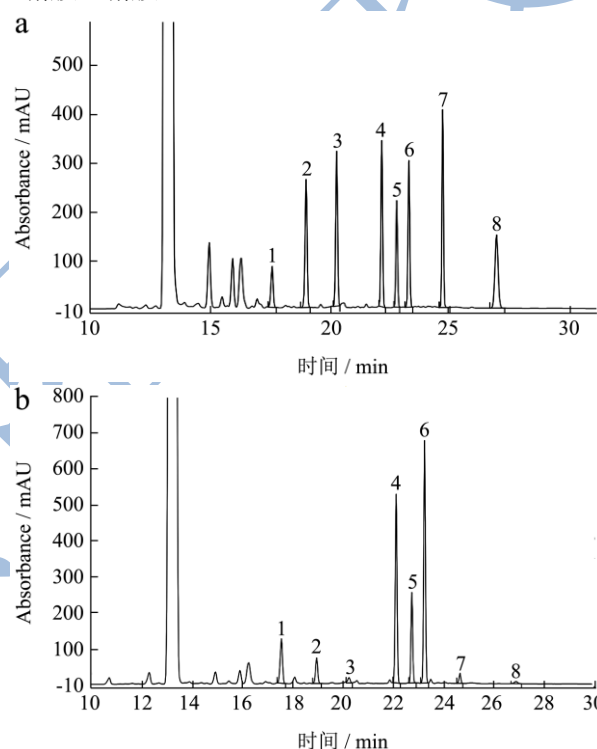
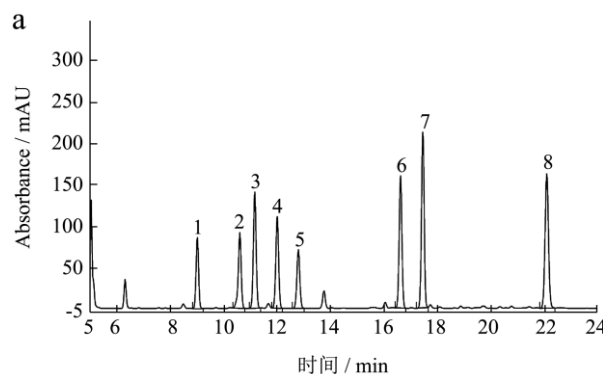
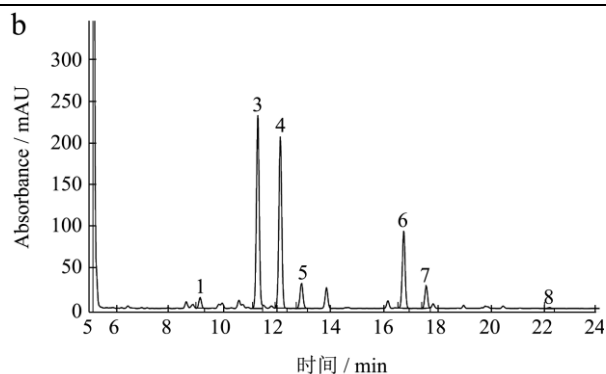


图 1 FNBT 柱前衍生 RP-HPLC 检测生物胺的 HPLC 色谱图

Fig.1 The HPLC chromatograms of biogenic amines by RP-HPLC with FNBT derivatization

注: a、b 分别表示生物胺标准品 (20 mg/L)、酱腌菜样品中生物胺的色谱图; 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。





(b) 酱腌菜样品中生物胺的色谱图

图2 DNS-Cl 柱前衍生 RP-HPLC 检测生物胺的 HPLC 色谱图

Fig.2 The HPLC chromatograms of biogenic amines by RP-HPLC with DNS-Cl derivatization

注: a、b 分别表示生物胺标准品 (20 mg/L)、酱腌菜样品中生物胺的色谱图

DNS-Cl 衍生法检测 8 种生物胺的出峰顺序依次为色胺,  $\beta$ -苯乙胺, 腐胺, 尸胺, 组胺, 酪胺, 亚精胺, 精胺。酱腌菜样品中生物胺的 HPLC 色谱图分别见图 1 (b) 和图 2 (b)。

表 3 8 种生物胺的回归方程和检测限

Table 3 The regression equations and detection limits of eight biogenic amines

生物胺	FNBT 衍生法				DNS-Cl 衍生法			
	回归方程	R <sup>2</sup>	检出限 /(mg/L)	定量限 /(mg/L)	回归方程	R <sup>2</sup>	检出限 /(mg/L)	定量限 /(mg/L)
组胺	y=0.851x-0.226	0.9994	0.071	0.236	Y=0.489x-0.108	0.9997	0.144	0.478
色胺	y=2.454x+0.824	0.9996	0.024	0.081	Y=0.567x-0.061	0.9993	0.184	0.613
$\beta$ -苯乙胺	y=2.745x+1.568	0.9994	0.016	0.053	Y=0.913x+0.215	0.9991	0.106	0.353
腐胺	y=2.419x+2.198	0.9993	0.025	0.083	Y=1.258x-0.073	0.9995	0.066	0.219
酪胺	y=1.789x-0.815	0.9998	0.032	0.107	Y=0.627x+0.141	0.9993	0.191	0.637
尸胺	y=2.147x+1.707	0.9994	0.028	0.093	Y=0.994x-0.041	0.9996	0.072	0.238
亚精胺	y=2.480x+1.302	0.9991	0.018	0.060	Y=1.197x+0.456	0.9995	0.075	0.251
精胺	y=2.898x-4.750	0.9992	0.021	0.069	Y=1.116x+0.928	0.9994	0.081	0.269

### 2.3 两种方法的精密度和加标回收率的比较

选择空白酱腌菜样品, 添加 4、15、25 mg/L 三个水平质量浓度, 分别按 DNS-Cl 衍生法和 FNBT 衍生法做加标回收试验, 每个水平平行测定 6 次。DNS-Cl 衍生法和 FNBT 衍生法的加标平均回收率和相对标准偏差 (RSD) 如表 4 和表 5 所示。

FNBT 衍生法和 DNS-Cl 衍生法测定酱腌菜中 8 种生物胺的平均回收率分别为 92.87%~100.18% 和 83.52%~102.33%, 其中 FNBT 衍生法测定精胺的准确性 (精胺的加标平均回收率为 93.87%) 优于 DNS-Cl 衍生法 (精胺的加标平均回收率为 83.52%), FNBT 衍生法测定精胺的加标回收率比 DNS-Cl 衍生法提高

结果显示: 同一样品, FNBT 衍生法检测到样品中的 8 种生物胺, DNS-Cl 衍生法只检测到样品中的 7 种生物胺,  $\beta$ -苯乙胺未被检出。说明 FNBT 衍生法对  $\beta$ -苯乙胺检测的灵敏度更高。

注: 1.色胺; 2. $\beta$ -苯乙胺; 3.腐胺; 4.尸胺; 5.组胺; 6.酪胺; 7.亚精胺; 8.精胺。

### 2.2 两种方法的回归方程和检测限

由表 3 可知, FNBT 和 DNS-Cl 衍生法检测 8 种生物胺时, 8 种生物胺在质量浓度为 1.0~100 mg/L 范围内具有显著的线性相关性, 相关系数 R<sup>2</sup> 均大于 0.999。样品滤液衍生生物用乙腈适当稀释, 以信噪比 (S/N) 大于 3 和信噪比 (S/N) 大于 10 作为检出限和定量限的判断标准, 结果见表 3。8 种生物胺的 FNBT 衍生法的检出限 (0.016~0.071 mg/L) 和定量限 (0.053~0.236 mg/L) 比 DNS-Cl 衍生法的检出限 (0.066~0.191 mg/L) 和定量限 (0.219~0.637 mg/L) 低。说明 FNBT 衍生法对 8 种生物胺检测的灵敏度高于 DNS-Cl 衍生法。

了 10.35%。

两种方法的精密度由 RSD 表示, 分别为 0.78%~4.27% 和 0.41%~4.16%, RSD 均小于 5%, 说明两种方法均符合酱腌菜中生物胺的定量要求。

### 2.4 两种方法测定市售酱腌菜中生物胺种类和含量的比较

为了考察 FNBT 衍生法和 DNS-Cl 衍生法对实际样品中生物胺含量检测结果的差异性, 分别用已建立并优化的 FNBT 衍生法<sup>[20]</sup>和 DNS-Cl 衍生法, 对采集的 7 个酱腌菜样品的生物胺含量和种类进行测定和分析, 结果见表 6。

表 4 FNBT 衍生法加标回收率试验结果

Table 4 Results of the recovery testes by FNBT derivative method(n=6)

生物胺	样品基质 质量浓度/(mg/L)	标准液质量浓度/(mg/L)			平均回收率/%	RSD/%
		4	15	25		
组胺	2.18±0.22	5.86±0.90	16.17±0.21	25.50±0.19	92.87	0.78
色胺	0.09±0.04	3.86±0.10	13.91±0.55	24.04±0.88	94.16	1.94
β-苯乙胺	1.15±0.37	4.96±0.04	15.69±0.59	25.78±0.42	96.82	1.76
腐胺	10.86±1.29	14.88±0.19	25.92±0.12	34.83±0.05	98.92	2.67
酪胺	0.98±0.08	4.79±0.20	15.52±0.46	24.53±1.09	95.49	1.44
尸胺	5.61±0.26	9.65±0.16	20.87±1.10	30.10±0.23	100.18	1.96
亚精胺	2.12±0.11	5.98±0.65	16.87±0.23	27.28±0.16	98.49	2.09
精胺	0.39±0.05	3.97±0.28	14.73±0.15	24.58±0.86	93.87	4.27

表 5 DNS-Cl 衍生法加标回收率试验结果

Table 5 Results of the recovery testes by DNS-Cl derivative method (n=6)

生物胺	样品基质 质量浓度/(mg/L)	标准液质量浓度/(mg/L)			平均回收率/%	RSD/%
		4	15	25		
组胺	2.74±0.23	6.49±0.30	17.10±0.38	26.10±0.33	94.27	1.35
色胺	0	3.73±0.46	14.18±0.16	24.28±0.30	94.99	2.03
β-苯乙胺	0.72±0.07	4.53±0.42	14.87±0.13	24.71±0.32	95.16	0.84
腐胺	8.88±0.45	12.62±0.20	24.23±0.41	34.56±0.51	102.33	0.41
酪胺	1.40±0.17	5.20±0.35	14.91±0.28	24.91±0.28	93.05	2.84
尸胺	4.55±0.24	8.43±0.22	19.30±0.44	28.74±0.57	97.33	0.9
亚精胺	2.32±0.19	6.25±0.46	16.85±0.18	26.20±0.43	96.85	1.37
精胺	0.17±0.09	3.36±0.20	12.86±0.73	21.76±0.52	83.52	4.16

表 6 DNS-Cl 衍生法和 FNBT 衍生法测定酱腌菜中生物胺的含量 (mg/kg)

Table 6 Contents of biogenic amines in pickled vegetable samples measured with FNBT and DNS-Cl derivative methods(mg/kg)

项目	名称	组胺/(mg/kg)	色胺/(mg/kg)	β-苯乙胺/(mg/kg)	腐胺/(mg/kg)	酪胺/(mg/kg)
样 1	DNS-Cl	28.88±1.72 <sup>a</sup>	10.23±1.02 <sup>a</sup>	1.33±0.22 <sup>a</sup>	66.07±1.87 <sup>a</sup>	28.51±0.63 <sup>a</sup>
	FNBT	53.46±2.31 <sup>b</sup>	11.15±0.78 <sup>a</sup>	2.25±0.35 <sup>a</sup>	73.80±0.47 <sup>b</sup>	33.80±0.56 <sup>b</sup>
样 2	DNS-Cl	4.52±0.17 <sup>a</sup>	92.52±0.66 <sup>a</sup>	23.28±0.36 <sup>a</sup>	62.58±1.01 <sup>a</sup>	221.84±2.33 <sup>a</sup>
	FNBT	5.47±0.25 <sup>a</sup>	104.40±0.57 <sup>b</sup>	24.27±0.46 <sup>a</sup>	59.42±1.68 <sup>a</sup>	220.57±2.50 <sup>a</sup>
样 3	DNS-Cl	43.50±1.75 <sup>a</sup>	ND	2.09±0.28 <sup>a</sup>	356.92±2.23 <sup>a</sup>	33.97±1.68 <sup>a</sup>
	FNBT	56.60±0.74 <sup>b</sup>	0.72±0.11	2.78±0.18 <sup>a</sup>	356.20±1.99 <sup>a</sup>	42.46±1.45 <sup>a</sup>
样 4	DNS-Cl	49.40±1.33 <sup>a</sup>	4.66±0.28 <sup>a</sup>	6.96±0.24 <sup>a</sup>	166.58±2.31 <sup>a</sup>	83.11±1.33 <sup>a</sup>
	FNBT	72.82±2.09 <sup>b</sup>	6.88±0.96 <sup>b</sup>	8.12±0.96 <sup>a</sup>	163.72±1.06 <sup>a</sup>	83.79±1.80 <sup>a</sup>
样 5	DNS-Cl	16.78±1.03 <sup>a</sup>	5.27±0.69 <sup>a</sup>	2.60±0.44 <sup>a</sup>	58.00±1.22 <sup>a</sup>	40.60±0.96 <sup>a</sup>
	FNBT	24.46±1.65 <sup>b</sup>	6.13±1.32 <sup>a</sup>	3.16±0.17 <sup>a</sup>	55.78±1.32 <sup>a</sup>	41.30±0.95 <sup>a</sup>
样 6	DNS-Cl	37.20±1.56 <sup>a</sup>	12.62±0.78 <sup>a</sup>	3.13±0.37 <sup>a</sup>	133.91±2.18 <sup>a</sup>	46.98±1.35 <sup>a</sup>
	FNBT	56.68±0.57 <sup>b</sup>	14.78±0.71 <sup>a</sup>	9.55±0.24 <sup>b</sup>	139.18±2.58 <sup>b</sup>	52.16±2.40 <sup>a</sup>
样 7	DNS-Cl	8.23±0.33 <sup>a</sup>	ND	3.60±0.18 <sup>a</sup>	44.39±2.10 <sup>a</sup>	5.61±1.01 <sup>a</sup>
	FNBT	10.89±1.45 <sup>a</sup>	0.45±0.09	5.77±0.54 <sup>b</sup>	44.32±2.75 <sup>a</sup>	4.89±0.88 <sup>a</sup>
项目	名称	尸胺/(mg/kg)	亚精胺 (mg/kg)	精胺/(mg/kg)	总生物胺含量/(mg/kg)	

转下页

接上页					
样 1	DNS-Cl	92.75±2.21 <sup>a</sup>	2.12±0.21 <sup>a</sup>	0.87±0.11 <sup>a</sup>	230.77±7.99 <sup>a</sup>
	FNBT	103.21±2.67 <sup>b</sup>	3.08±0.17 <sup>b</sup>	0.84±0.06 <sup>a</sup>	281.60±7.37 <sup>b</sup>
样 2	DNS-Cl	2.61±0.51 <sup>a</sup>	24.63±0.42 <sup>a</sup>	2.62±0.25 <sup>a</sup>	443.59±5.71 <sup>a</sup>
	FNBT	4.73±0.59 <sup>b</sup>	28.04±1.05 <sup>a</sup>	2.72±0.30 <sup>a</sup>	449.60±7.40 <sup>a</sup>
样 3	DNS-Cl	41.91±0.45 <sup>a</sup>	4.58±0.39 <sup>a</sup>	0.24±0.09 <sup>a</sup>	482.33±6.87 <sup>a</sup>
	FNBT	47.04±1.73 <sup>a</sup>	6.90±0.61 <sup>a</sup>	0.45±0.23 <sup>a</sup>	504.68±7.04 <sup>b</sup>
样 4	DNS-Cl	222.43±2.47 <sup>a</sup>	9.71±0.88 <sup>a</sup>	0.64±0.16 <sup>a</sup>	543.47±9.0 <sup>a</sup>
	FNBT	220.96±3.39 <sup>a</sup>	13.49±1.32 <sup>b</sup>	1.11±0.09 <sup>a</sup>	570.87±10.68 <sup>b</sup>
样 5	DNS-Cl	96.34±2.53 <sup>a</sup>	8.15±0.23 <sup>a</sup>	1.15±0.31 <sup>a</sup>	228.90±7.41 <sup>a</sup>
	FNBT	97.22±0.53 <sup>a</sup>	11.06±0.41 <sup>b</sup>	1.78±0.71 <sup>a</sup>	240.90±7.06 <sup>b</sup>
样 6	DNS-Cl	150.75±2.44 <sup>a</sup>	10.26±0.61 <sup>a</sup>	0.52±0.27 <sup>a</sup>	395.35±9.56 <sup>a</sup>
	FNBT	160.45±2.37 <sup>b</sup>	17.03±1.56 <sup>b</sup>	0.48±0.11 <sup>a</sup>	450.31±10.54 <sup>b</sup>
样 7	DNS-Cl	22.77±0.76 <sup>a</sup>	9.29±0.67 <sup>a</sup>	0.86±0.08 <sup>a</sup>	94.76±5.13 <sup>a</sup>
	FNBT	28.06±0.82 <sup>b</sup>	10.26±1.23 <sup>a</sup>	1.97±0.27 <sup>a</sup>	116.93±8.03 <sup>b</sup>

注: ND 表示未检出; 表中同一种酱腌菜样品中某一生物胺含量的不同字母代表这两种方法的检测结果存在显著差异 ( $p<0.05$ )。

对相同样品中同一生物胺 FNBT 和 DNS-Cl 衍生法的检测结果进行配对样本分析, 结果发现两种方法均能满足酱腌菜中 8 种生物胺的检测, 但这两种方法检测酱腌菜样品中总生物胺的含量存在显著差异 ( $p<0.05$ )。由样品 3, 6 可知, 对于色胺含量较低的酱腌菜样品 FNBT 衍生法能检测出, 而 DNS-Cl 衍生法未检出, 说明 FNBT 衍生法对色胺检测的灵敏度高于 DNS-Cl 衍生法。对 7 种酱腌菜样品中精胺及样品 2、3、4、5 酱腌菜样品中  $\beta$ -苯乙胺、腐胺及酪胺的检测分析, 发现两种方法的检测结果差异性不显著。对相同酱腌菜样品中组胺、色胺、 $\beta$ -苯乙胺、腐胺、酪胺、尸胺和亚精胺的检测, 发现两种方法的检测结果存在显著差异 ( $p<0.05$ ), FNBT 衍生法检测组胺、色胺、 $\beta$ -苯乙胺、酪胺、腐胺、尸胺、亚精胺和精胺的含量均高于 DNS-Cl 衍生法。说明 FNBT 衍生法较 DNS-Cl 衍生法衍生效果更好, FNBT 衍生法检测结果的准确性更可靠。

### 3 结论

3.1 本文比较了 FNBT 和 DNS-Cl 衍生法这两种方法的方法学参数, 结果表明: 两种方法均在 30 min 内完成 8 种生物胺的良好分离, 各生物胺衍生物线性关系良好, FNBT 衍生法的检出限 (0.016~0.071 mg/L) 优于 DNS-Cl 衍生法 (0.066~0.191 mg/L), FNBT 衍生法的加标平均回收率 (92.87%~100.18%) 略优于 DNS-Cl 衍生法的加标平均回收率 (83.52%~102.33%), FNBT 衍生法对 8 种生物胺检测的灵敏度高于 DNS-Cl 衍生法。

3.2 利用 FNBT 和 DNS-Cl 衍生法测定了 7 种不同市

售酱腌菜样品中 8 种生物胺的含量, 结果进行配对分析发现: 对于色胺含量较低的酱腌菜样品 FNBT 衍生法能检测出, 而 DNS-Cl 衍生法未检出。FNBT 衍生法检测组胺、色胺、 $\beta$ -苯乙胺、酪胺、尸胺、腐胺、亚精胺和精胺的含量均高于 DNS-Cl 衍生法。两种方法检测酱腌菜样品中的 8 种生物胺存在显著差异 ( $p<0.05$ )。FNBT 衍生法, 衍生试剂消耗少、操作简便、快速、检出限低及灵敏度高优于 DNS-Cl 衍生法, 具有测定食品中生物胺的广泛应用前景。

### 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] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Research International, 1996, 29(7): 675-690
- [3] Ten Brink, B, Damink, C, Joosten, H M L J, et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods [J]. International Journal Food Microbiology, 1990, 11: 73-84
- [4] Teti D, Visalli M, McNair H. Analysis of polyamines as markers of (patho) physiological conditions [J]. Journal of Chromatography B, 2002, 781: 107-149
- [5] Rodriguez M B R, da Silva Carneiro C, da Silva Feijó M B, et al. Bioactive amines: aspects of quality and safety in food [J]. Food and Nutrition Science, 2014, 5: 138-146
- [6] 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
- [7] Mohammed G I, Bashammakh A S, Alsibaai A A, et al. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in food stuffs [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 78(40): 84-94
- [8] 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]. *Journal of the South Carolina Medical Association*, 2002, 98(4): 187-192
- [9] 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
- [10] European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods [J]. *European Food Safety Authority Journal*, 2011, 9(10): 2393-2486
- [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]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(4): 2096-2103
- [12] Eerola S, Maijala R, Roig-Sagues A X, et al. Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant *aminepositive Lactobacillus* [J]. *Journal of Food Science*, 1996, 61(6): 1243-1246
- [13] 宋碧君. 酱腌菜食品安全与质量控制[J]. 现代食品, 2016, 20: 20-23  
SONG Bi-jun. The safety and quality control of pickles food [J]. *Modern Food*, 2016, 20: 20-23
- [14] 曹宝忠. 影响酱腌菜质量的因素及防腐应注意的问题探讨 [J]. 中国酿造, 2011, 30(3): 145-149  
CAO Bao-zhong. Investigation on factors affecting the quality of pickles and the main issues for corrosion [J]. *China Brewing*, 2011, 30(3): 145-149
- [15] 霍娇, 陈锦瑶, 张立实. 生物胺与泡菜的食用安全性 [J]. 预防医学情报杂志, 2014, 30(2): 156-160  
HUO Jiao, CHEN Jin-yao, ZHANG Li-shi. Safety of biogenic amines in Chinese pickles [J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2014, 30(2): 156-160
- [16] Penas E, Frias J, Sidro B, et al. Impact of fermentation conditions and refrigerated storage on microbial quality and biogenic amine content of sauerkraut [J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(1): 143-150
- [17] 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
- [18] 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
- [19] 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, 35(21): 316-319, 323  
QU Feng-mei, DING Xiao-wen, WANG Yu, et al. Comparative analysis of the content of biogenic amines in merchant Sichuan pickles [J]. *Science & Technology of Food Industry*, 2014, 35(21): 316-319, 323
- [20] 郭晓丽, 李二虎, 王鲁峰. 一种新的柱前衍生 RP-HPLC 法分析酱腌菜中的生物胺 [J]. 现代食品科技, 2017, 10: 1-7  
GUO Xiao-li, LI Er-hu, WANG Lu-feng. Determination of biogenic amines in pickled vegetable with a new pre-column derivatization by RP-HPLC [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 10: 1-7
- [21] Parchami R, Kamalabadi M, Alizadeh N, et al. Determination of biogenic amines in canned fish samples using head-space solid phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled to modified ionization region ion mobility spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1481: 37-43
- [22] Huang J, Gan N, Lv FY, et al. Environmentally friendly solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of biogenic amines in fish samples [J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(22): 4384-4390
- [23] Romano A, Klebanowski H, La Guerche S, et al. Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/ densitometry [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1392-1396
- [24] He L L, Xu ZQ, Hirokawa T, et al. Simultaneous determination of aliphatic, aromatic and heterocyclic biogenic amines without derivatization by capillary electrophoresis and application in beer analysis [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1482: 109-114

- [25] Dong H, Xiao, KJ. Modified QuEChERS combined with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce [J]. Food Chemistry, 2017, 229: 502-508
- [26] 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
- [27] 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
- [28] 杨乐乐.高效液相色谱技术在食品生物胺检测中的研究[J]. 技术与市场,2017,24(7):152-153
- [29] Sohn H S, Park Y N, Lee SR Effect of immobilization stress, on brain polyamine levels in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats [J]. Brain Research Bulletin, 2002, 57(5): 575-579
- [30] 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
- [31] 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