

柱前衍生 – 超快速液相色谱法测定水产品中组胺的含量

LC-143

摘要： 本文使用岛津 UFLCXR 超快速液相色谱仪，建立了水产品中组胺含量测定的方法。本方法采用 C18 超快速液相色谱柱进行分离，紫外检测器进行检测。组胺在 0.8~200 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数为 0.9999。对组胺浓度为 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品进行六次平行分析，重复性结果 (RSD % 表示)：组胺在三个不同浓度下的保留时间 RSD% 范围为 0.02 %~0.21 %，峰面积 RSD % 范围为 1.56 %~2.89 %，仪器精密度良好。实际样品加标浓度 50、125 和 500 mg/kg，回收率范围为 96.4 %~116.7 %，方法检出限为 4.3 mg/kg，定量限为 14.2 mg/kg，结果表明方法准确可靠。

关键词： 水产品组胺超快速液相色谱紫外检测

生物胺是一类具有生物活性含氮的低分子量有机化合物的总称，可以看作是氨分子中 1~3 个氢原子被烷基或芳基取代后而生成的物质，是脂肪族、酯环族或杂环族的低分子量有机碱，常存在于动植物体内及食品中。生物胺引起的食品安全问题，其中组胺对人类健康的影响最大。组胺是组胺酸的降解产物，在黑皮红肉类鱼如金枪鱼的组织中易检测到该类物质的存在。一般来说，新鲜鱼中组胺的浓度水平不超过 50 mg/kg，但在变质的鱼肉中可检测到较高浓度。因此，组胺常被作为产品质量的重要指示因子，用于监测食品生产和运输过程中产品质量的变化。研究表明，一次性摄入含有大量组胺的食品可引起过敏反应。2006 年春，台湾曾发生过食用鱼中毒事件，分析人员在死者食用的鱼肉里检测到超过 1000 mg/kg 的组胺。因此，水产品种组胺的检测日益受到重视，高效液相色谱具有分析速度快、柱效高、检测

灵敏度高、定量分析准确的特点，是目前水产品中生物胺含量分析测定的主要手段。生物胺分子中缺少发色基团，本身既无紫外吸收、又无荧光及电化学活性。为了提高检测的灵敏度及其响应，必须衍生后才能检测。邻苯二甲醛和丹酰氯是目前最常用的生物胺衍生试剂。邻苯二甲醛常被作为柱后衍生试剂。丹酰氯作为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、可定量完成磺酰化反应、有较强的荧光和紫外吸收、灵敏度高、反应范围宽、基体干扰不明显等优点，所以成为了生物胺高效液相色谱检测中应用最多的柱前衍生试剂。

本文参考 GB/T 20768-2006 《鱼和虾中有毒生物胺的测定液相色谱 – 紫外检测法》以丹酰氯为衍生试剂，采用柱前衍生 – 超快速液相色谱法来检测水产品中组胺的含量。

实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂：

乙腈：HPLC 级；水：超纯水；乙酸铵：分析纯；

高氯酸溶液：量取 24 mL 高氯酸，用水稀释至 1 L，即为 0.4 mol/L；

氢氧化钠溶液：称取 4.0 g 氢氧化钠，用水溶解并定容至 50 mL，即为 2 mol/L；

丹酰氯溶液：称取 0.20 g 丹酰氯，用丙酮溶解并定容至 20 mL，即为 10 mg/mL；

盐酸组胺储备液：精密称取盐酸组胺 16.57 mg，置于 10 mL 容量瓶中，超纯水稀释至刻度，得到游离型组胺标准储备溶液 1.0 mg/mL。标准储备液于 4℃ 保存，可以使用 3 个月。

1.1.2 仪器：

岛津 UFLCXR 超快速液相色谱仪：包括 CBM-20A 系统控制器，LC-20ADXR×2 高压输液泵，SIL-20ACXR 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，SPD-20A 紫外检测器，LabSolutions Ver. 5.53 SP2 软件。

1.2 分析条件

色谱柱：Shim pack XR-ODS II(3.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μm)；

流动相：A-10 mM 乙酸铵，B-乙腈和 10 mM 乙酸铵 (v/v, 9:1)，A/B=30/70(v/v)；

流速：0.9 mL/min；洗脱方式：等度洗脱；

柱温：40℃；

紫外检测波长：254 nm；进样量：10 μL ；

1.3 组胺标准溶液的配制

取不同量的组胺储备液，用超纯水稀释，配制浓度为 2、5、20、50、100 及 500 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液，储存在棕色小瓶中，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放。

1.4 样品处理

1.4.1 提取

称取 2 g 试样，精确至 0.01g，置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸溶液，匀质 5 min，于 10000 r/min 离心 5 min，上清液移入 25 mL 棕色容量瓶中。沉淀物用 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸溶液重复提取一次，于 10000 r/min 离心 5 min，合并上清液于 25 mL 容量瓶中，用 0.4 mol/L 高氯酸溶液定容至刻度。

1.4.2 衍生

提取上述提取液 1.0 mL，放入 5 mL 容量瓶中，依次加入 100 μL 2 mol/L 氢氧化钠溶液、300 μL 饱和碳酸钠溶液和 2 mL 10 mg/mL 丹酰氯溶液，盖塞，于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴避光反应 45 min。反应完毕后，加入 100 μL 氨水，静置 30 min，用乙腈定容至刻度，振荡混匀，取适量的溶液通过有机系滤膜后，供液相色谱测定。混合标准工作溶液衍生：取上述组胺标准溶液适量于 5 mL 容量瓶中，加入 300 μL 饱和碳酸钠溶液和 2 mL 10 mg/mL 丹酰氯溶液，盖塞，于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴避光反应 45 min。反应完毕后，加入 100 μL 氨水，静置 30 min，用乙腈定容至 5.0 mL，振荡混匀，配制浓度为 0.8、2、8、20、40、200 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液，取适量的溶液通过滤膜后，供液相色谱测定。

结果讨论

2.1 组胺标准谱图及标准曲线

组胺衍生后标准溶液色谱图如图 1 所示，由图 2 可以看出在 0.8~200 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内，组胺线性相关性良好，相关系数为 0.9999，线性方程为 $Y = (63401.0)X + (5988.59)$ ，准确度为 96.7%~103.1%。

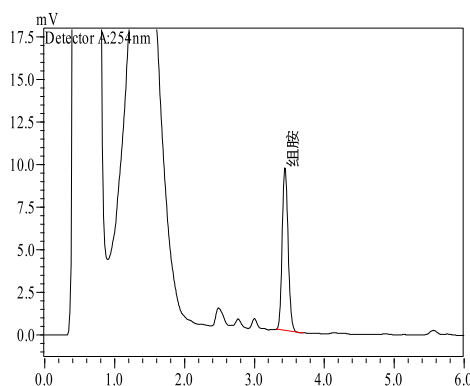


图1 组胺标准溶液 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 衍生后色谱图

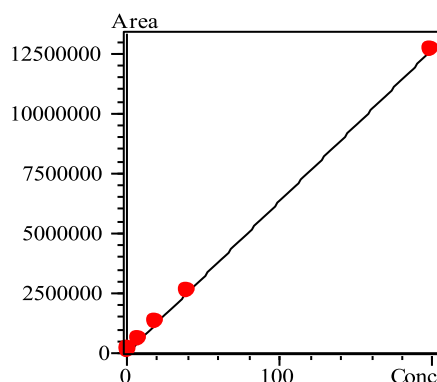


图2 组胺的校准曲线

2.2 精密度实验

为了进一步考察仪器的重复性，本文分别对组胺浓度为 0.8、20、200 $\mu\text{g/mL}$ 标准样品进行了六次重复实验，重复性结果用 RSD % 表示。实验结果表明组胺在不同浓度下保留时间 RSD % 范围为 0.02%~0.21%，峰面积 RSD % 范围为 1.56%~2.89%，结果汇总如表 1 所示。

表1 组胺在不同浓度下 保留时间和峰面积的重复性

NO.	0.8 $\mu\text{g/mL}$		20 $\mu\text{g/mL}$		200 $\mu\text{g/mL}$	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	3.422	57,325	3.420	1,331,013	3.427	13,485,737
2	3.423	58,625	3.421	1,348,043	3.424	13,377,952
3	3.425	59,638	3.421	1,329,200	3.426	13,412,142
4	3.422	58,577	3.421	1,366,180	3.425	13,338,129
5	3.436	55,103	3.420	1,345,567	3.427	13,460,168
6	3.437	56,416	3.419	1,355,428	3.427	13,347,479
RSD (%)	0.21	2.89	0.02	1.05	0.04	0.45

2.3 基质加标实验

按照 1.4.2 所述步骤处理水产品，检测水产品中的组胺含量。图 3 为水产品空白色谱图，可以看出该样品并未检出组胺；图 4 为空白样品加标 50 mg/kg 的色谱图，可见基质并未干扰到目标峰，目标物具有较好的信号响应。实际样品加标不同浓度标样计算样品回收率结果见表 2，由表 2 可知加标三个不同浓度的标准品，所得回收率范围为 96.4 %~116.7 %。由 LabSolutions 软件自动计算信噪比，信噪比结果为 35.2，按照三倍信噪比和十倍信噪比分别计算方法检出限和定量限，检出限为 4.3 mg/kg，定量限为 14.2 mg/kg。

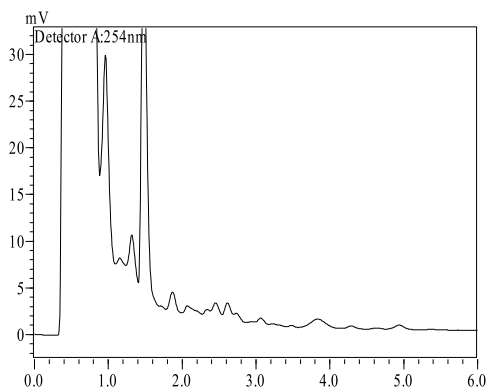


图 3 空白样品色谱图

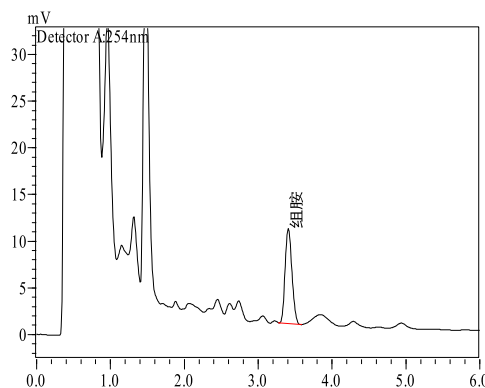


图 4 空白样品加标 50 mg/kg 色谱图

表 2 实际样品加标不同浓度组胺回收率结果 (%)

编号	加标 50 mg/kg	加标 125 mg/kg	加标 500 mg/kg
1	102.0	108.4	96.4
2	116.7	108.7	115.2
3	107.6	99.2	98.6
RSD%	6.82	5.12	9.94

结论

本实验中使用岛津超快速液相色谱仪，建立了水产品中组胺含量测定的方法。组胺在 0.8~200 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数为 0.9999，方法检出限为 4.3 mg/kg，定量限为 14.2 mg/kg。实际样品加标浓度 50、125 和 500 mg/kg 的标准溶液，回收率范围为 96.4 %~116.7 %。本方法具有简便、快速、灵敏度高和重复性好等优点，方法检出限低于 GB/T 20768-2006《鱼和虾中有毒生物胺的测定液相色谱-紫外检测法》，适合于水产品中组胺含量的常规检测。