

TLC 和 HPLC 法相结合分析盐水鸭中的生物胺

王凤芹¹, 刘芳¹, 孟勇², 王道营¹, 诸永志¹, 徐为民^{1,*}

(1.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014;

2.农业部渔业产品质量监督检验测试中心(南京), 江苏 南京 210017)

摘要:应用薄层层析(TLC)和高效液相色谱(HPLC)两种方法分析盐水鸭中生物胺的组成及含量。薄层层析结果显示, 盐水鸭样品中存在着腐胺、尸胺、亚精胺、精胺、酪胺和 2-苯乙胺; 利用高效液相色谱法也检测到了以上 6 种生物胺, 且各生物胺的含量均在 204 $\mu\text{g/g}$ 以下。两种方法结果相吻合, TLC 法可以作为肉制品中生物胺定性分析的一种经济便捷的方法。

关键词:盐水鸭; 生物胺; 薄层层析(TLC); 高效液相色谱(HPLC)

Biogenic Amines in Salted Duck Analyzed by TLC Combined with HPLC

WANG Feng-qin¹, LIU Fang¹, MENG Yong², WANG Dao-ying¹, ZHU Yong-zhi¹, XU Wei-min^{1,*}

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Quality Supervision and Testing Center for Fishery Products (Nanjing), Ministry of Agriculture, Nanjing 210017, China)

Abstract: The composition and contents of biogenic amines in salted duck were analyzed by thin layer chromatography (TLC) combined with high performance liquid chromatography (HPLC). Six biogenic amines including putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, tyramine and 2-phenylethylamine were detected in salted duck samples by TLC. Similarly, six biogenic amines were also detected by HPLC, and the concentration of each biogenic amine was less than 204 $\mu\text{g/g}$. The analytical results obtained by both methods were consistent. Therefore, TLC can be used as an economic and rapid method for the qualitative analysis of biogenic amines in meat products.

Key words: salted duck; biogenic amines; thin layer chromatography (TLC); high performance liquid chromatography (HPLC)

中图分类号: TS251.68

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)14-0273-04

生物胺是一类低分子质量的含氮化合物, 通常存在于动植物体及食品中, 主要有组胺、腐胺、尸胺、色胺、精胺、亚精胺、酪胺及 2-苯乙胺 8 种。食品中的生物胺主要通过具有脱羧酶活性的微生物的脱羧作用形成, 当以食品为介质被人体过量摄入后, 会引起一系列不良症状^[1]。对食品中生物胺的含量进行检测, 确定生物胺来源的具体微生物, 将为产品的安全控制提供重要的理论基础。

盐水鸭独特的感官特性决定其熟化和杀菌温度不能超过 90 $^{\circ}\text{C}$ ^[2], 因此产品中必然残存些微生物。这些残存的微生物不仅使得盐水鸭腐败变质^[3], 也可能产生多种胺类物质。目前食品中生物胺的研究多集中在发酵类肉制品上^[4], 而有关低温禽肉制品中生物胺的研究报道较少。本实验采用薄层层析(TLC)与高效液相色谱(HPLC)

相结合, 定性定量分析盐水鸭中生物胺的组成及含量, 从而为预防和控制生物胺的形成和累积提供重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

盐水鸭样品于 2010 年 8 月购自南京某盐水鸭专卖店。随机取 2 只, 托盘包装后于冰盒中携至实验室(2h 内), 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 16 h 后取腿、腹、背、翅及颈肉, 剪碎混合作为样品。

色胺(Try)、2-苯乙胺(Phe)、腐胺(Put)、尸胺(Cad)、组胺(His)、酪胺(Tyr)、亚精胺(Spd)、精胺(Spm)标准品 美国 Sigma 公司; 衍生剂丹酰氯 日本 TCI 公司; 乙腈、丙酮(色谱纯); 其余试剂均为分析纯。

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2010469); 江苏省农业自主创新基金项目(CX(10)440)

作者简介: 王凤芹(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量安全。E-mail: lfklds@yahoo.com.cn

*通信作者: 徐为民(1969—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品加工与质量控制。E-mail: weiminxu2002@yahoo.com.cn

1.2 仪器与设备

2695型高效液相色谱系统 美国 Waters 公司; Utlea-turrax T25 匀浆器 德国 IKA 公司; 台式高速冷冻离心机 德国 Herolab 公司; JS-680C 全自动凝胶成像分析仪 上海培清科技有限公司。

1.3 TLC 法实验方法

1.3.1 标准溶液的配制^[5]

用 50g/L 三氯乙酸(TCA)配成 5.0mg/mL 的各生物胺标准储备液; 用储备液配制各单标的质量浓度为 50 μ g/mL, 混合标准溶液质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 μ g/mL。

1.3.2 样品处理^[6]

取 10g 样品, 加入 20mL 50g/L 的 TCA, 匀浆, 18℃, 3000r/min 离心 10min, 沉淀用 2 \times 10mL 50g/L TCA 洗涤, 收集 3 次上清液, 定容到 50mL, 0.22 μ m 有机膜过滤, 避光冷藏。

1.3.3 衍生^[7]

取 5mL 滤液和 1mL 标液, 用 3 \times 2mL 乙醚洗涤, 弃去醚相, 沸水浴蒸干水相; 加 1mL 饱和 NaHCO₃ 溶液和丹酰氯(5mg/mL 溶剂为丙酮), 塞紧混匀, 40℃水浴避光反应 1h, 加 0.5mL 0.1g/mL 甘氨酸(除去残留丹酰氯)混合, 塞子打开(挥发丙酮), 40℃避光反应 20min; 加 3mL 水, 用 3 \times 2mL 乙醚洗涤, 收集 3 次醚相; 待乙醚挥发完毕, 加入 1mL 乙酸乙酯, 置冰箱保存待检。

1.3.4 展开及显色

展开剂组分为氯仿、乙醚、三乙胺, 体积比依次为 4:1:1、8:1:2 和 4:0:1; 展开前加入 25mL 预饱和 30min, 通过分离效果确定最佳配比^[5]。

点样台点样, 样量 2 μ L, 间隔 1.5cm, 待样点干燥后, 置入展开槽内, 待展开剂扩展到距样点 17cm 处取出, 通风橱内干燥, 自动凝胶成像分析系统紫外灯下显色, 拍照。

1.4 HPLC 法实验方法

1.4.1 标准溶液的配制

准确称取色胺、2-苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺和精胺各 50mg, 用 0.4mol/L 的高氯酸(HClO₄)定容到 50mL, 配成 1mg/mL 储备液备用。分别取以上标准品储备液, 用 0.4mol/L HClO₄ 配制成质量浓度分别为 2.5、5.0、10.0、25.0、50、100 μ g/mL 的混合标准溶液, 铝箔避光、4℃冰箱保存备用。

1.4.2 样品处理

取 10g 待测样品加入 20mL 0.4mol/L HClO₄ 匀浆, 冷冻离心机 4℃, 2500r/min 离心 10min, 沉淀部分如上述方法再提取一次, 收集两次上清液用 0.4mol/L HClO₄ 定

容到 50mL, 0.22 μ m 有机膜过滤, 避光冷藏^[8]。

1.4.3 标准溶液及样品的衍生化

分别取上述 1mL 标准及样品溶液, 加入 200 μ L 2mol/L NaOH 溶液使之呈碱性, 然后加入 300 μ L 的饱和 NaHCO₃ 溶液进行缓冲, 再加入 2mL 丹酰氯溶液(10mg/mL 丙酮为溶剂), 混匀, 置于 40℃水浴避光反应 30min, 结束后加入 100 μ L 的氨水中止反应, 去除残留的丹酰氯, 最后用乙腈定容到 5mL。检测前用 0.22 μ m 的有机滤膜过滤。

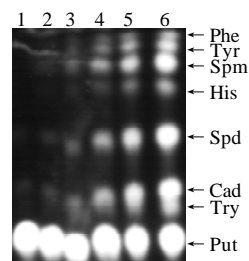
1.4.4 色谱分析

采用液相色谱系统, 色谱柱为 C₁₈ 柱, 紫外检测波长为 254nm, 流速为 1mL/min, 流动相 A 为水, B 为乙腈, 采用梯度洗脱程序, 进样量 20 μ L。

2 结果与分析

2.1 TLC 法对盐水鸭中生物胺的分析检测结果

为了获得较好的分离效果, 本实验选取 4:1:1、8:1:2 和 4:0:1 三个不同体积比的展开剂, 结果发现当氯仿、乙醚、三乙胺配比为 4:1:1 时, 各生物胺拖尾较严重, 分离效果不好; 而当配比为 4:0:1 时, 展开剂极性太强, 各生物胺分布比较集中, 分离效果同样不佳; 当配比为 8:1:2 时, 解决了上述问题, 分离效果较好。



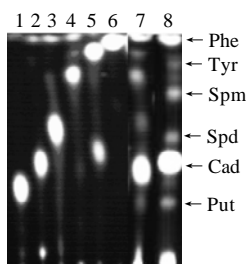
泳道 1~6 代表混合标样中各生物胺质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μ g/mL。

图 1 不同质量浓度的生物胺混合标样的 TLC 检测结果

Fig.1 TLC patterns of mixed biogenic amine standards at different concentrations

图 1 是 8 种生物胺标样 6 个质量浓度梯度的 TLC 分析结果, 点样量为 2 μ L。当混标中各生物胺的质量浓度为 0.5 μ g/mL 时, 腐胺斑点亮度最强, 但亮度随着质量浓度增加变化不明显; 尸胺及亚精胺有微弱斑点, 其他生物胺未检出。质量浓度为 1 μ g/mL 时, 除检出前三种生物胺外, 还检出精胺, 并且亮度随着质量浓度增加而增加, 其他生物胺未检出。质量浓度为 2 μ g/mL 时, 共 6 种生物胺被检出, 除前 4 种生物胺外新检出组胺及

酪胺; 质量浓度为 $5\mu\text{g/mL}$ 时, 共 7 种生物胺检出, 新检出苯乙胺; 质量浓度为 $20\mu\text{g/mL}$ 时, 色胺被检出, 此时 8 种生物胺全部被检出。由上分析得出 8 种生物胺检出次序为腐胺、尸胺及亚精胺、精胺、组胺及酪胺、苯乙胺和色胺; 表明 TLC 对腐胺的检测限值最低, 尸胺及亚精胺次之, 色胺最高; 可见 TLC 对生物胺的检出限会因胺物质的种类不同而有所差异, 这与 Shalaby 等^[7]的研究结果基本一致。



1. 腐胺(Put); 2. 尸胺(Cad); 3. 亚精胺(Spd); 4. 精胺(Spm); 5. 酪胺(Tyr); 6. 2- 苯乙胺(Phe); 7. 样品 2; 8. 样品 1。各单标质量浓度为 $50\mu\text{g/mL}$ 。

图2 标样及样品中生物胺的 TLC 分析结果

Fig.2 TLC patterns of single biogenic standards ($50\mu\text{g/mL}$) and samples

图 2 是标样及样品中生物胺的检测结果, 其中泳道 1 到 6 分别是各个生物胺标准样品, 而泳道 7 和 8 对应两个样品。在该分离条件下, 6 种标样获得了相对较好的分离效果; 同时, 发现在酪胺对应的泳道上有两个点, 这与 Costantini 等^[9]的实验结果一致。样品中由于酪胺的含量较低, 其低点未能检测出; 由图 2 可见, 从两个盐水鸭样品中分别都检测到 6 种生物胺, 按分离次序, 从下到上依次为腐胺、尸胺、亚精胺、精胺、酪胺和 2- 苯乙胺; 但在水平方向上与样品中斑点存在微小差异, 这可能与样品中杂质较多, 分子间发生作用有关。样品 1 中腐胺对应的斑点较样品 2 的亮度大, 表明样品 1 中腐胺含量多于样品 2, 这与 HPLC 的检测结果一致, HPLC 检测到样品 1 中腐胺含量为 $11.85\mu\text{g/g}$, 而样品 2 中未检出; 这表明 TLC 法对腐胺检测限值较低, 与上述结果吻合; 同理, 对于尸胺的分析, 样品 1 较样品 2 中斑点亮度大, 而 HPLC 对两样品的检测值分别为 $55.20\mu\text{g/g}$ 和 $14.90\mu\text{g/g}$, 两种方法结果吻合; 而亚精胺、精胺、酪胺及 2- 苯乙胺由于含量差别不大, 斑点亮度几乎一致; 这表明 TLC 分析结果可靠度较高, 可在样品进行 HPLC 分析之前, 先用 TLC 进行定性分析。

2.2 HPLC 法对盐水鸭中生物胺的分析检测结果

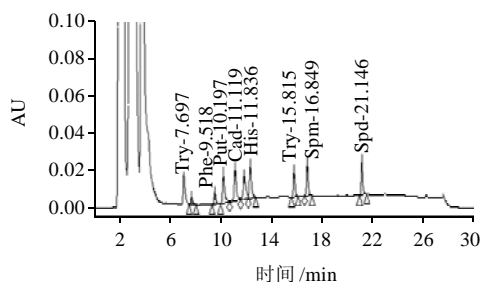


图3 生物胺混标的标准色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of mixed biogenic amine standards

如图 3 所示, 在实验选取的色谱条件下, 各生物胺能有效分离, 且峰形对称, 没有拖尾等现象, 因此可以采用此条件对样品中的生物胺进行分析。图 4、5 是样品 1 和样品 2 中生物胺的检测结果, 表 1 所示的是样品中各生物胺的含量。各生物胺的含量均在 $204\mu\text{g/g}$ 以下, 从样品 1 中依次检测出 2- 苯乙胺、腐胺、尸胺、酪胺、精胺及亚精胺共 6 种生物胺; 其中亚精胺的含量最大, 达 $203.72\mu\text{g/g}$, 腐胺的含量最小为 $11.15\mu\text{g/g}$; 从样品 2 中依次检测出 2- 苯乙胺、尸胺、酪胺、精胺及亚精胺等共 5 种生物胺, 其中亚精胺的含量最大达 $200.67\mu\text{g/g}$, 酪胺的含量最小为 $11.27\mu\text{g/g}$, 腐胺未检出。

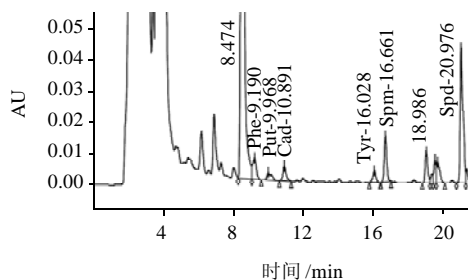


图4 样品 1 的 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of sample 1

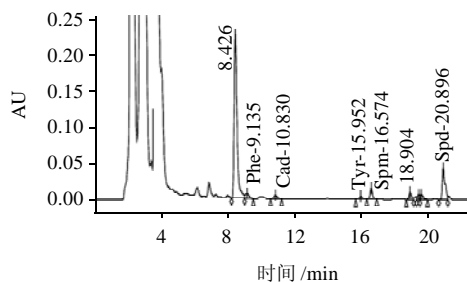


图5 样品 2 的 HPLC 色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of sample 2

表1 样品中各生物胺的含量
Table 1 Contents of biogenic amines in samples 1 and 2

生物胺	μg/g	
	样品1	样品2
色胺	ND	ND
2-苯乙胺	78.92	81.72
腐胺	11.15	ND
尸胺	55.20	14.90
组胺	ND	ND
酪胺	11.85	11.27
精胺	42.05	41.40
亚精胺	203.72	200.67
总量	402.89	349.96

注: ND. 未检出。

3 讨 论

利用 TLC 与 HPLC 法均从盐水鸭样品中检测到了酪胺、腐胺、精胺、尸胺、2-苯乙胺及亚精胺共 6 种生物胺, 并且研究发现 TLC 对各种生物胺的检测限值较低, 故 TLC 可以作为一种便捷、经济的定性分析食品中生物胺的方法。

托盘包装盐水鸭在 4℃ 冰箱贮藏 16h 后, 由于加工及贮藏过程中污染的微生物的生长, 使得产品中生成了多种生物胺。由于污染的微生物种类和数量不同, 盐水鸭样品中存在的生物胺种类及含量可能存在差异。两个样品均未检出色胺与组胺, 表明该样品在加工和贮藏过程中, 未污染具有色氨酸和组氨酸这两种脱羧酶活性的微生物。前人研究发现不同菌株在产生生物胺的种类及含量上存在着较大差异, Durlu-Özkaya 等^[10]研究发现肠杆菌科主要产腐胺、尸胺、酪胺和组胺, 其中弗氏柠檬酸杆菌属产酪胺能力最强, 此外乳杆菌中的一些菌株也呈酪胺阳性; Rivas 等^[11]研究了从高压处理过的西班牙香肠 chorizo 中分离出来的 200 株乳酸菌和葡萄球菌在冷藏过程中的生物胺产生情况, 结果发现产生的最主要的生物胺为 2-苯乙胺, 其次为酪胺。在乳酸菌中, 酪胺的产生主要与弯曲乳杆菌有关, 而多数弯曲乳杆菌也是产生 2-苯乙胺的阳性菌株; 而在葡萄球菌中, 肉糖葡萄球菌产 2-苯乙胺或同时产 2-苯乙胺和酪胺; 阴沟肠杆菌和沙门氏亚种产腐胺和尸胺能力较强^[12]。

Komprda 等^[13]在研究发酵剂对香肠中生物胺含量的影响中发现, 精胺源于原料肉, 且含量不会受到菌种的影响, 因此推断盐水鸭样品中较高浓度的亚精胺及精胺可能来源于鸭肉本身。

参考文献:

- [1] SHALABY A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. Food Research International, 1996, 29(7): 675-690.
- [2] 刘汉文, 颜秀花, 杨文平. 盐水鸭生产工艺的研究[J]. 食品科技, 2008 (8): 81-83.
- [3] LI Yanliang, YAO Dongrui, WANG Daoying, et al. Sensory, physico-chemical and microbiological changes in water-cooked salted duck during storage at 4 °C[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 2010, 23(7): 960-964.
- [4] 卢士玲, 徐幸莲, 周光宏, 等. 传统中式香肠中生物胺调查研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(10): 141-146.
- [5] LAPA-GUIMARÃES J, PICKOVA J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1045(1/2): 223-232.
- [6] SHAKILA R J, VASUNDHARA T S, KUMUDAVALLY K V. A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products[J]. Food Chemistry, 2001, 75(2): 255-259.
- [7] SHALABY A R. Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for determining biogenic amines in foods[J]. Food Chemistry, 1999, 65(1): 117-121.
- [8] 徐振. 冷却猪肉贮藏过程中生物胺种类及含量变化的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [9] COSTANTINI A, VAUDANO E, PRETE D P, et al. Biogenic amine production by contaminating bacteria found in starter preparations used in winemaking[J]. Agric Food Chem, 2009, 57(22): 10664-10669.
- [10] DURLU-ÖZKAYA F, AYHAN K, VURAL N, et al. Biogenic amines produced by *Enterobacteriaceae* isolated from meat products[J]. Meat Science, 2001, 58(2): 163-166.
- [11] RIVAS B, RUIZ-CAPILLAS C, CARRASCOSA A V, et al. Biogenic amine production by bacteria isolated from Spanish dry-cured "chorizo" sausage treated with high pressure and kept in chilled storage[J]. Meat Science, 2008, 80(2): 271-277.
- [12] BOVÉR-CÍD S, HUGAS M, IZQUIERDO-PULIDO M, et al. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 66(3): 185-189.
- [13] KOMPRDA T, SMELÍ D, PECHOVA P, et al. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages[J]. Meat Science, 2004, 67(4): 607-616.