

## HPTLC 检测鱼类制品中组胺及其他生物胺



▲ 位于德国德累斯顿 (Dresden) 的LUA (从左到右)  
Sevr Kretzschmar, Sibylle Neugebauer和Dieter Hübner博士



▲ Karl Speer教授

在CAMAG CBS 83 (1999年9月) 中我们报道过瑞士伯尔尼的兽药和毒物学研究所采用薄层色谱定量测定组胺, 分离使用碳18反相薄层, 保利试剂用作色谱后衍生。

以下是分析鱼肉中7种生物胺的方法和其他分析方法比较, 试验是在德国德累斯顿食品化学部门Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits und Veterinärwesen Saxony (LUA) 进行的。色谱前的丹磺酰氯衍生化是基于埃及Dokki食品技术与奶制品科学部门的论著<sup>[1]</sup>。Kretzschmar的毕业论文<sup>[2]</sup>由德累斯顿技术大学食品化学学院的Speer教授指导。

### 介绍

鱼和鱼类制品在不适当的保存过程中会增加生物胺类的形成, 尤其是组胺。为了保护消费者远离生物胺的毒害, 关于鱼类卫生的16种法令设定了有关物质的限量(目前仅为组胺)。

由于其他的生物胺也具有生理学活性, 也应当同样被分析。为此, 必须建立一个筛选方法能够在短时间内处理大批量的样品。薄层色谱的方法正好适合于检测胺的允许限量。并且因为减少了分析的干扰, 结果可以媲美HPLC、ELISA 和荧光分析方法。

首先, 样品用10%的三氯乙酸(TCA)萃取。萃取液用丹磺酰氯处理。混合物衍生化后, 胺被萃取出来并在硅胶薄层上分离。可在紫外365 nm下通过目视进行半定量检测或用光密度计在UV 365/>400 nm下定量分析。

### 供试品溶液的制备

取鱼类样品10 g，制成匀浆，加入80 mL 10%的三氯醋酸 (TCA)。混合物在9000 G下均质90 秒。用10%三氯醋酸定容到100 mL并过滤，滤液立即分析或在-20 °C下保存备用。

### 色谱前的衍生化

取1 mL滤液，缓慢滴入4 mol/L的 NaOH 溶液至pH值 8。再加入1 mL硼酸盐缓冲液 (pH 8.8) 和2 mL 0.5%丹磺酰氯丙酮溶液，振摇30秒，置于40 °C水浴中培养1小时。取出，放冷，加水稀释至10 mL，加入5 mL 的二乙醚，剧烈振摇，离心。除去有机相，水溶性残渣加二乙醚再同法提取两次，合并提取液，蒸干，残渣加乙腈定溶至5 mL。同法取各标准溶液1 mL进行衍生化。

### 标准品溶液

盐酸化后的腐胺、尸胺、亚精胺、精胺、组胺、酪胺和β-苯乙胺等生物胺的水溶液 (0.5 mg/mL) 在冰箱内可存放2周，冷冻下可至少存放6个月。取5 mL各种生物胺储备液用三氯醋酸稀释到100mL (25 µg/mL)。按前述方法进行色谱前衍生化用于校正的标准品必须新鲜制备，分别取200、400、600 或 800 µL，加三氯醋酸稀释至1 mL。

### 薄层板

硅胶60 的薄层板， 20x10 cm，厚度 0.25 mm，用展开剂先预洗一遍。

### 点样

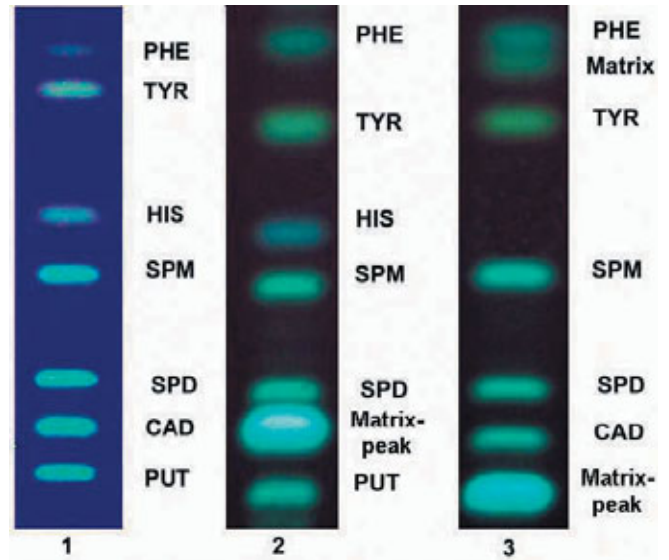
使用ATS全自动点样仪条带点样，15 轨道，点样量 10 µL，条带宽6 mm，距离底边8 mm，轨道离边沿距离至少15 mm，轨道间距 12 mm。

### 色谱展开

使用水平展开缸，展开剂：甲苯-氯仿-三乙胺 (10: 6: 7)。展开到距离底边90 mm。在一些鱼类的样品中尸胺斑点分离不佳，可将展开剂比例调整为10: 6: 2， 尸胺也就能检测。

### 光密度测量评价

在紫外灯箱下，成分10 ng点样量仍然可以在365 nm下观察得到。定量评估可通过TLC扫描仪在UV365/>400 nm下进行荧光检测，以峰面积为计算单位。

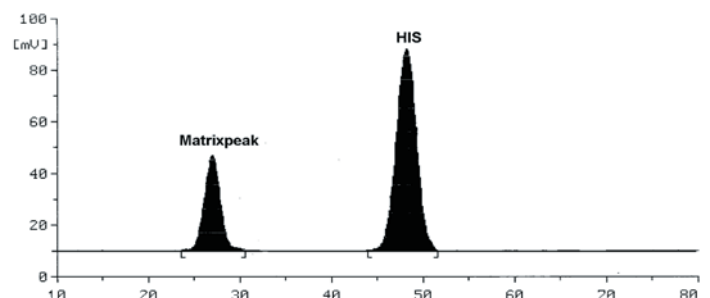


▲选取的轨道在UV 365/>400 nm下检测：轨道1(7种生物胺混合标准品：β-苯乙胺、酪胺、组胺、精胺、亚精胺、尸胺、腐胺；轨道2(没有污染的鱼类样品加入标准品混合物)；轨道3(如轨道2,但展开溶剂使用比例为10: 6: 2)。

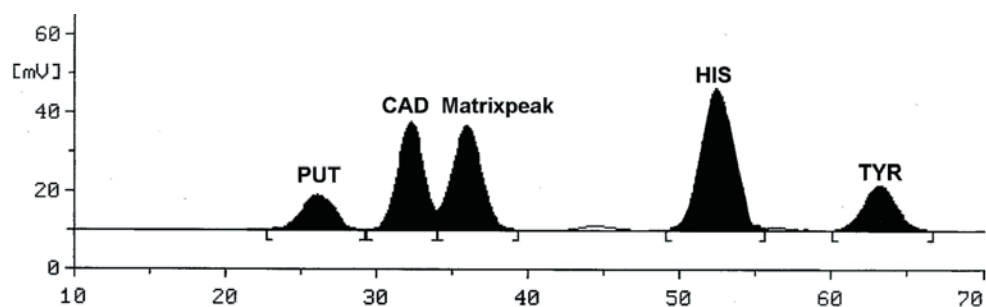
### 结果和讨论

使用该方法，组胺含量在50-250 mg/kg能够检测出来。如含量更高，可减少样品量或稀释萃取液，以下是组胺的验证数据：

线性范围	50-250 mg/kg
LOD <sub>DIN 32645</sub>	17.5 mg/kg
LOQ <sub>DIN 32645</sub>	56 mg/kg
回收率 (200 mg/kg)	108 %
置信区间	± 9.9 mg



▲鱼类样品“油浸的金枪鱼”在365/>400 nm下的光密度分析图。



▲鱼类样品“烟制鲭鱼”在365/400 nm下的光密度分析图。

上面所提到的鱼类样品在德国萨克森的LUA采用新的TLC筛选方法以及HPLC、ELISA 和荧光分析方法，结果的比较见下表。很明显薄层色谱适合于检测鱼类样品中组胺的含量，其结果与其它方法相近，而且减少了工作量。

#### 使用不同方法测得的金枪鱼、 鲭鱼样品中生物胺的含量

方法	样品	组胺 [mg/kg]	腐胺 [mg/kg]	尸胺 [mg/kg]	精胺 [mg/kg]	亚精胺 [mg/kg]	酪胺 [mg/kg]
TLC	鲭鱼	180	( 20 )	60	未检出	未检出	( 30 )
	金枪鱼	2805	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
HPLC	鲭鱼	175	10	70	<5	<5	40
	金枪鱼	2540	25	75	<5	<5	35
ELISA	鲭鱼	250					
	金枪鱼	2895					
荧光分析	鲭鱼	170					
	金枪鱼	3100					

\*括号内低于定量限

#### 参考文献

- [1] A. R. SHALABY, Food Chemistry 65(1999) 117-121.
- [2] S. Kretzschmar: Entwicklung enier dünn-schicht-Chromatographoschen

#### 更详细的信息可向作者索取。

Screening-Methode für Histamin und weitere biogene Amine in Fisch, Diploma thesis, TU Dresden 2004.

\*Prof. Dr. Karl Speer, Institute of Food Chemistry, TU Dresden, Bergstr. 66, D-01062 Dresden (Germany), Tel. +49-351-463-33603, Karl.Speer@chenie.tu-dresden.de.