

## 实验技术与方法

## 纳米金复合材料涂层毛细管电泳法快速测定鱼肉中的组胺

赵凌国<sup>1</sup>,李学云<sup>1</sup>,申红卫<sup>1</sup>,张金金<sup>1</sup>,尤俊<sup>2</sup>,梁肇海<sup>1</sup>

(1. 深圳市福田区疾病预防控制中心,广东 深圳 518040;

2. 武汉大学化学与分子科学学院,湖北 武汉 430072)

**摘要:**目的 建立高效毛细管电泳法快速检测鱼肉中组胺含量的方法。方法 鱼肉样品经100 g/L的三氯乙酸溶液超声萃取20 min,萃取液经离心和过滤后进行毛细管电泳分离检测。采用季铵化纤维素负载的纳米金复合材料(QC-Au NPs)对毛细管内壁进行动态涂层,以抑制管壁对组胺的吸附。电泳条件:毛细管为熔融石英毛细管(75/365  $\mu\text{m}$ ,40/47 cm),运行缓冲液为500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  QC-Au NPs 磷酸缓冲液(pH = 6.0),反向电压-12 kV,柱温20  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长211 nm。结果 在涂层毛细管中,组胺的吸附被抑制,峰拖尾现象消除,并在4 min内出峰。组胺在0.05~0.80 mg/ml浓度范围内线性关系良好( $r^2 = 0.9987$ ),检出限( $S/N = 3$ )为0.002 mg/ml,定量限( $S/N = 10$ )为0.007 mg/ml。鱼肉中组胺加标回收率为94%~105%,RSD为3.1%~7.2%。结论 该方法具有快速,简便,准确度和精密度高等特点,适用于鱼肉中组胺的快速检测。

**关键词:** 鱼肉;组胺;毛细管电泳;涂层;食品安全

中图分类号:R155.5;O157 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0575-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.015

### Rapid determination of histamine in fish by gold nanoparticles composite coated capillary electrophoresis

ZHAO Ling-guo, LI Xue-yun, SHEN Hong-wei, ZHANG Jin-jin, YOU Jun, LIANG Zhao-hai

(Center for Disease Prevention and Control of Futian District, Guangdong Shenzhen 518040, China)

**Abstract: Objective** To develop a new method for the rapid determination of histamine by capillary electrophoresis. **Methods** Trichloroacetic acid solution (100 g/L) combined with ultrasonic extraction was used to elute histamine from fish sample for 20 minutes. Then the solution was injected for capillary electrophoresis after centrifugation and filtration. The quaternized cellulose supported Au nanoparticles (QC-Au NPs) were used to coat the capillary inner surface and inhibit the adsorption of histamine. The capillary was fused silica capillary with id/od of 75/365  $\mu\text{m}$  and effective/total length of 40/47 cm. Running buffer was 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  QC-Au NPs phosphate buffer. Separation voltage was -12 kV. Temperature was 20  $^{\circ}\text{C}$ . Detection wavelength was set at 211 nm. **Results** The adsorption of histamine has been inhibited in the capillary coated by QC-Au NPs and the peak tailing was eliminated, the analysis of histamine could be completed within 4 minutes with satisfied accuracy and precision. Good linearity was found for histamine within the range of 0.05-0.80 mg/ml, and the  $r^2$  was 0.9987. The limit of detection ( $S/N = 3$ ) and the limit of quantification ( $S/N = 10$ ) were 0.002  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 0.007 mg/ml, respectively. The recoveries of histamine in fish at three spiked levels ranged from 94% to 105%, and the relative standard deviations (RSD) ranged from 3.1%-7.2%. **Conclusion** This method is fast, simple, precise and it is feasible for the determination of histamine in fish samples.

**Key words:** Fish; histamine; capillary electrophoresis; coat; food safety

组胺(histamine, HA),分子式 $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$ ,化学名4(5)-(2-氨基乙基)咪唑,是组氨酸在富含组氨酸脱羧酶的细菌(如摩根变形杆菌、组胺无色杆菌、埃希大肠杆菌、链球菌、葡萄球菌等)作用下,发生氨基酸脱羧

反应产生的一种胺类物质。组胺是生物胺中对人体健康影响最大的物质<sup>[1]</sup>,水产品尤其是一些青皮红肉鱼中,其产品腐败或放置时间较长容易产生组胺。组胺可引起头痛、反胃呕吐、腹泻、瘙痒性皮炎、低血压以及休克等一系列症状,是过敏反应中最主要的活性致敏介质之一<sup>[2-3]</sup>。当人体摄取过高组胺含量食物可引起过敏性食物中毒现象<sup>[4-5]</sup>。2006年春,中国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1 000 mg/kg的组胺<sup>[6]</sup>。组胺中

收稿日期:2014-08-17

基金项目:深圳市科技研发基础项目(JCYJ20140414100411116)

作者简介:赵凌国 男 主管技师 研究方向为卫生检验

E-mail:zhaolingguo2008@163.com

毒也是水产食品存在的主要安全问题之一<sup>[7]</sup>。一些国家的政府建议用组胺作为鱼和水产品中微生物腐败的指标。我国现行水产品中组胺标准检验方法是GB/T 5009.45—2003《水产品卫生标准的分析方法》<sup>[8]</sup>,该方法存在操作繁琐、重复性差等缺陷<sup>[9-11]</sup>。毛细管电泳(CE)作为一种现代分析技术,具有分离效率高、分析速度快、样品用量少等许多优点<sup>[12]</sup>。但是,由于组胺与毛细管壁带相反电荷,其在毛细管壁的吸附现象是一个需要考虑的问题<sup>[13]</sup>,吸附会导致峰展宽,峰拖尾,样品回收率降低,影响电泳分离效果。

在前面的工作中,我们成功开发出季铵化纤维素负载的纳米金等多种毛细管涂层材料<sup>[14-16]</sup>,均能有效抑制碱性蛋白质吸附。在此基础上,考虑使用季铵化纤维素负载的纳米金复合材料对毛细管内壁进行动态涂层,以抑制管壁对组胺的吸附,建立组胺的动态涂层毛细管电泳检测方法。此外,国标法采用浸泡法,耗时较长需2~3 h,且需要反复提取以及使用有致癌性的偶氮试剂衍生化处理。因此,不经富集和预分离等处理,直接对组胺提取液进行快速检测也是本方法考察的重点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

P/ACE MDQ 毛细管电泳仪(配备二极管阵列检测器、32Karat 7.0 工作站,美国 Beckman)、UV-6100 双光束扫描型紫外/可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),熔融石英毛细管(内径 75  $\mu\text{m}$ ,外径 365  $\mu\text{m}$ ,河北永年光纤厂)。

超纯水(18.2 M $\Omega$ ),氢氧化钠、盐酸、十水磷酸氢二钠、二水磷酸二氢钠、三氯乙酸均购自国药集团化学试剂有限公司,磷酸组胺对照品(中国药品生物制品检定所)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 季铵化纤维素负载的纳米金复合材料的合成

季铵化纤维素负载纳米金复合材料(QC-Au NPs)的合成方法按文献<sup>[14,16]</sup>操作,主要步骤如下:将 100 ml 的 7% NaOH-12% 尿素水溶液预冷至 -12.3  $^{\circ}\text{C}$  后加入 4 g 纤维素,室温机械搅拌 3~5 min 后,10 000 r/min 离心 10 min 得到澄清透亮的纤维素溶液。滴加 55.8 g 的 3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵水溶液,30  $^{\circ}\text{C}$  下搅拌 24 h,反应液用 HCl 中和并用蒸馏水透析 7 d,最后经过冷冻干燥得到季铵化纤维素(QC)。

将 0.5 ml 的  $2.428 \times 10^{-2}$  mol/L HAuCl<sub>4</sub> 溶液逐滴加入到 10 ml 的 QC(3 mg/ml)溶液中,25  $^{\circ}\text{C}$  下搅拌 10 min 迅速加入 0.375 ml NaBH<sub>4</sub> 溶液(0.1 mol/L)

并持续搅拌 1 h,反应液用蒸馏水透析 5 d,经过冷冻干燥得到 QC-Au NPs。

#### 1.2.2 样品制备及毛细管电泳缓冲液的配置

缓冲液配置方法如下:配制 pH = 6.0 的 25 mmol/L 磷酸缓冲液,将一定量的 QC-Au NPs 溶解于上述缓冲液中,配置成 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的运行缓冲液,用于毛细管涂层以及毛细管电泳分离分析。组胺对照品在试验前用纯水配置成不同的浓度。

鱼肉样品中组胺提取和样品制备方法如下:称取 10.00 g 绞碎并混合均匀的池鱼鱼肉样品,置于塑料管中,加入 20 ml 三氯乙酸溶液(100 g/L),超声萃取 20 min 后,10 000 r/min 低温离心 5 min,取上清过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜后进样分析。

#### 1.2.3 毛细管电泳分析方法的建立

组胺紫外吸收光谱扫描:配制 0.05 mg/ml 组胺的磷酸盐溶液,使用 UV-6100 双光束扫描型紫外/可见分光光度计对溶液进行扫描,确定组胺的吸收曲线。利用毛细管电泳的光电二极管阵列检测器(DAD)的光谱扫描功能,对组胺对照品目标峰进行分析,与紫外扫描结果比对,确定组胺对照品的最大吸收波长。

毛细管电泳分析条件如下:20 psi 压力下,用 0.1 mol/L HCl 水、0.1 mol/L NaOH 水、含 QC-Au NPs 缓冲液冲洗毛细管各 5 min,然后 -12 kV 电压下(反相电极模式),预电泳平衡 5 min。样品在 0.5 psi 压力下进行 3 s,然后在 -12 kV 电压下进行分离,柱温 20  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 211 nm。

方法准确性考察:取 10.00 g 鱼肉样品,分别添加 0.06、0.28、0.75 mg/ml 浓度水平的组胺对照品,每个浓度水平平行萃取测定 5 次,考察低、中、高 3 个浓度组的平均加样回收率。

方法精密度考察:取 10.00 g 鱼肉样品,分别添加 0.06、0.28、0.75 mg/ml 浓度水平的组胺对照品,在 1 d 之内,每个浓度水平平行萃取测定 10 次,计算各浓度组的日内精密度。在不同天( $n=5$ )重复上述试验,计算低、中、高浓度水平的日间精密度。

## 2 结果与分析

### 2.1 组胺检测波长的优化

组胺的检测多采用衍生化方法,且关于组胺的紫外吸收特征有不同的报道<sup>[17-21]</sup>。为了建立毛细管电泳直接测定组胺含量的方法,首先以组胺对照品为研究对象,对组胺的紫外吸收光谱进行了考察。如图 1 中 A 所示,利用毛细管电泳 DAD 的光谱扫描功能,确定组胺对照品的最大吸收波长为 211 nm。进一步对组胺的紫外吸收曲线进行确证,

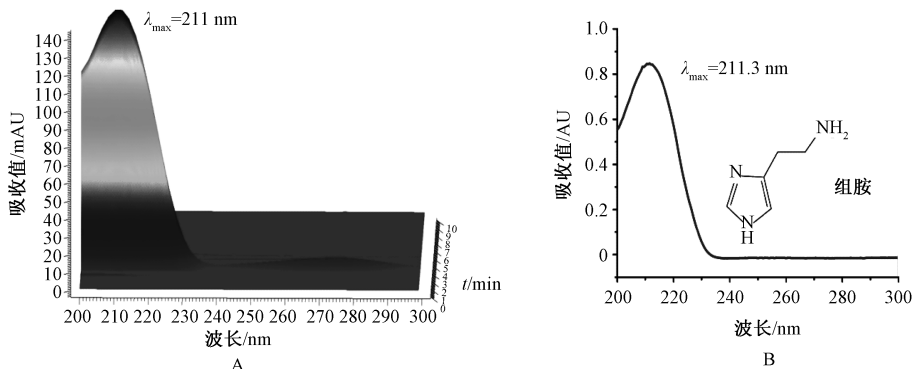


图1 组胺标准品的 CE/DAD 光谱图(A)及紫外吸收光谱图(B)

Figure 1 CE/DAD spectra(A) and UV-Vis absorption spectra(B) of histamine

如图1中B所示,紫外/可见分光光度计与光电二极管阵列检测器光谱扫描结果一致,说明组胺在211 nm有较强的紫外吸收,可以使用CE/DAD对其进行分离检测。

毛细管电泳缓冲液为磷酸盐,有必要考察其紫外吸收特征。如图2所示,磷酸盐在200 nm处有较强的末端吸收,随波长增加,其吸收迅速下降,在检测波长211 nm处,磷酸盐缓冲溶液吸收值为0.190 8,远小于组胺溶液的吸收值0.844 7,其差值为0.653 9。如果为了完全避开磷酸盐的干扰,选择220 nm的波长(磷酸盐吸收约为0)作为检测波长,此时组胺的吸收为0.602 3,其与磷酸盐吸收差值 $0.602 3 < 0.653 9$ (211 nm处),为了最大的灵敏度,因此选择211 nm作为检测波长。

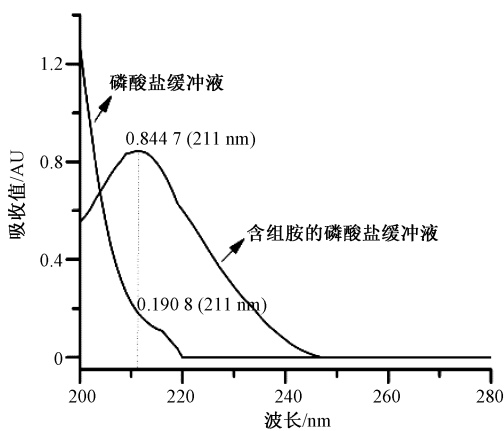


图2 磷酸盐缓冲液及含组胺的磷酸缓冲液紫外吸收光谱图

Figure 2 UV-Vis absorption spectra of phosphate buffer with and without histamine

### 2.2 QC-Au NPs 涂层效果考察

毛细管内壁由于硅羟基的解离带有负电荷,而组胺在背景电解质中带正电荷,在静电引力的作用下,组胺在毛细管内壁会产生吸附。此外,组胺的氨基与毛细管内壁硅羟基之间的氢键等作用力可能也会对吸附产生影响。考虑使用QC-Au NPs对毛细管进行动态涂层,QC-Au NPs不仅可以通过静

电作用吸附在毛细管内壁,覆盖带负电的硅羟基吸附位点,而且会静电排斥靠近毛细管壁的组胺,减少组胺与管壁接触的可能性,起到抑制组胺吸附的效果。对QC-Au NPs的动态涂层效果进行考察,结果如图3所示,在裸露的毛细管中(运行缓冲液中不含QC-Au NPs),组胺产生吸附,出现峰拖尾现象。使用500 μg/ml QC-Au NPs对管壁动态涂层后,峰拖尾现象消除,说明QC-Au NPs能够有效抑制组胺在毛细管内壁的吸附。

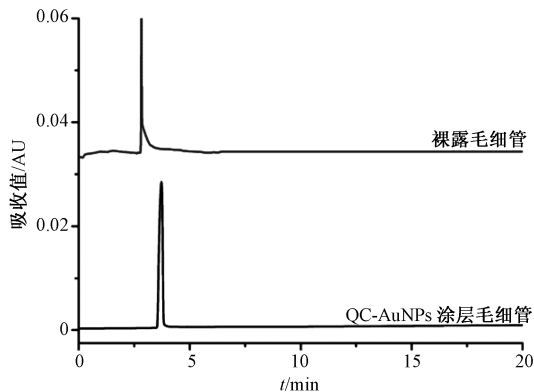


图3 QC-Au NPs 动态涂层对组胺电泳分离的影响

Figure 3 Influence of QC-Au NPs dynamic coating on CE separation of histamine

### 2.3 方法学评价

对不同浓度的组胺对照品进行分析,绘制标准曲线,结果如图4所示。在0.05~0.8 mg/ml浓度范围内,以浓度对峰面积进行线性回归,线性方程为 $y = 2 \times 10^6 x - 13422$ ,线性关系良好( $r^2 = 0.998 7$ )。以3倍信噪比(S/N)对应分析物浓度作为检出限(LOD),10倍信噪比对应分析物浓度作为定量限(LOQ),组胺的LOD和LOQ分别为0.002和0.007 mg/ml。

方法准确性的考察结果如表1所示,低、中、高3个浓度组的平均加样回收率分别为105%,97%和94%,结果显示方法的准确性良好,明显高于GB/T 5009.45—2003中的数值。

精密度考察结果如表2所示,低、中、高浓度

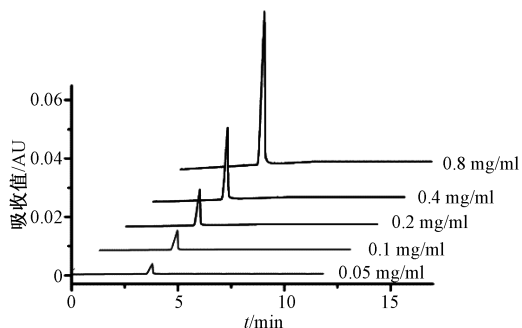


图4 不同浓度组胺的电泳分离图谱及标准曲线  
Figure 4 Calibration curve and electropherograms of histamine using QC-Au NPs coated capillary

表1 组胺的加标回收率(n=5)

Table 1 Recoveries of histamine spiked into fish at three different concentrations

检测方法	加标回收率/%		
	低浓度 <sup>1</sup>	中浓度 <sup>2</sup>	高浓度 <sup>3</sup>
超声萃取	105	97	94
毛细管电泳法	61	73	67

注:1. 0.06 mg/ml; 2. 0.28 mg/ml; 3. 0.75 mg/ml

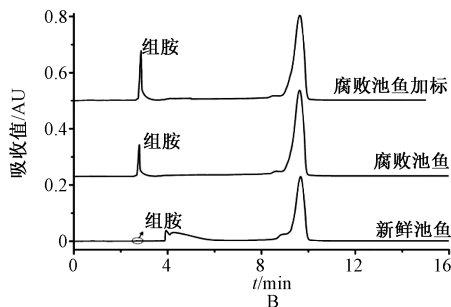
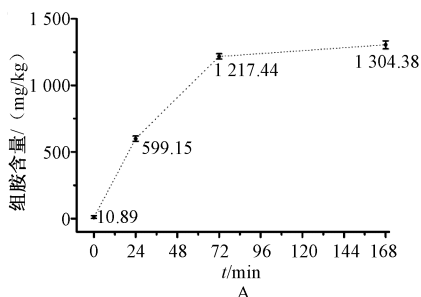


图5 室温下池鱼肉中组胺含量随时间变化曲线图(A)及电泳图(B)

Figure 5 Timely varying curve of histamine content in fish (A) and the electropherograms (B)

### 3 讨论

本文建立了一种测定鱼肉中组胺含量的新方法。目前,我国采用测定水产品中的组胺,在实际测定过程中发现存在操作繁琐、重复性差等问题<sup>[9]</sup>。GB/T 5009.45—2003 仅浸泡这一步骤就需耗时2~3 h,无法满足食物中毒样品快速出具检测结果的要求。国标法将滤液使用正戊醇提取稀盐酸反萃取,用分液漏斗振摇提取多次,过程繁琐,且溶液易在分液漏斗壁上粘连,损耗偏大<sup>[10]</sup>。本方法采用超声波萃取以提高组胺提取率,大大缩短提取时间。提取液经高速离心和过滤后直接进样,进行毛细管电泳分离分析,4分钟内出峰。避免了反复的萃取以及衍生化过程,同时运用 QC-Au NPs 对毛细管壁进行涂层,抑制组胺在毛细管内壁的吸附,使样品处理过程简单、快速,并保证方法的准确度

表2 方法的精密度考察(%)

Table 2 Method precisions of histamine spiked into fish at three different concentrations

样品	日内精密度(n=10)			日间精密度(n=5)		
	低浓度 <sup>1</sup>	中浓度 <sup>2</sup>	高浓度 <sup>3</sup>	低浓度 <sup>1</sup>	中浓度 <sup>2</sup>	高浓度 <sup>3</sup>
组胺	4.4	3.1	6.3	4.9	5.7	7.2

注:1. 0.06 mg/ml; 2. 0.28 mg/ml; 3. 0.75 mg/ml

水平的日内精密度分别为4.4%、3.1%和6.3%。日间精密度分别为4.9%、5.7%和7.2%,结果显示方法精密度良好。

### 2.4 样品测定

为了考察方法在实际检测中的应用,将某大型连锁超市购买的冰鲜池鱼于20℃密封放置0、24、72、168 h,每次分别取10份样品进行平行检测,结果如图5所示。冰鲜保存的池鱼鱼肉中组胺含量约为10.89 mg/kg。20℃放置24 h,其组胺含量迅速上升,达到599.15 mg/kg。20℃放置3 d,组胺含量达到1217.44 mg/kg。20℃放置7 d,组胺含量达到1304 mg/kg。

和精密度,适用于鱼肉中组胺的快速检测。

### 参考文献

- [1] 赵利,苏伟,刘建涛,等.水产品中生物胺的研究进展[J].水产学报,2006,30(2):272-276.
- [2] 欧远,周童童,徐琴琴.离子交换树脂在水产品组胺检测中的应用[J].食品科技,2012,37(1):272-274.
- [3] 肖贵南,程朝辉,陈浩桢.中药注射剂引起的过敏反应及其检测技术[J].广东药学院学报,2009,25(6):636-639.
- [4] TAO Z H, Nakano T, Yamaguchi T, et al. Production and diffusion of histamine in the muscle of scombroid fishes [J]. Fisheries Science, 2002, 68 (suppl): 1394-1397.
- [5] 徐金德.一起秋刀鱼引起组胺食物中毒事件的调查[J].海峡预防医学杂志,2004,10(5):41.
- [6] CHEN H C, Kung H F, CHEN W C, et al. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2):612-618.

- [7] 梁剑,江一帆,叶海峰.水产品中组胺含量测定方法的比较研究[J].安徽农业科技,2011,39(32):20033-20034.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 5009.45—2003 水产品卫生标准的分析方法[S].北京:标准出版社,2003.
- [9] 朱文慧,周德庆.分光光度法测定鱼罐头中组胺的方法改进[J].食品科技,2008,1(1):223-225.
- [10] 张继红,马俊华,刘平.分光光度法测定鱼类产品中组胺[J].医学动物防制,2013,29(9):1060-1061.
- [11] 胡红美.青条鱼中组胺检测方法探讨[J].安徽预防医学杂志,2011,17(6):468-469.
- [12] 刘阳,张石宁,张颖冬.毛细管区带电泳测定血浆中丙戊酸钠浓度[J].中华检验医学杂志,2006,29(2):164-166.
- [13] 张丽瑶,黄卫华,王宗礼,等.NDA柱前衍生毛细管电泳高灵敏安培检测组胺[J].分析科学学报,2004,20(1):1-4.
- [14] ZHAO L G, ZHOU J P, XIE H, et al. Quaternized celluloses as new dynamic coatings in capillary electrophoresis for basic protein separation[J]. Electrophoresis, 2012, 33(12):1703-1708.
- [15] ZHAO L G, ZHOU J P, ZHOU H T, et al. Hydrophobically modified quaternized celluloses as new dynamic coatings in CE for basic protein separation[J]. Electrophoresis, 2013, 34(11):1593-1599.
- [16] YOU J, ZHAO L G, WANG G W, et al. Quaternized cellulose-supported gold nanoparticles as capillary coatings to enhance protein separation by capillary electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 2014(1343):160-166.
- [17] 朱丽丽,汪云,曹玉华.柱前衍生毛细管电泳-电化学检测组胺[J].分析科学学报,2009,25(3):344-346.
- [18] 徐学平,李琳,丁莉芳,等.柱前衍生法测定胸腺中组胺的含量[J].中国药物警戒,2013,10(1):22-24.
- [19] 房科腾,谢东华,丁斌,等.在线自动化柱前衍生-高效液相色谱法测定食品中组胺的研究[J].分析试验室,2008,27(12):66-68.
- [20] 黄新华.高效液相色谱柱后衍生法测定豚鼠鼻粘膜中组胺[J].湖南医科大学学报,2000,25(3):294-296.
- [21] 梅光明,郭远明,陈雪昌.高效液相色谱法测定鱼粉中组胺含量[J].浙江海洋学院学报,2011,30(5):397-400.

## 实验技术与方法

# 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测面粉及面制品中的氨基脒

王丹,陈颖,宋书锋,高洁,梁江,赵云峰

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 10021)

**摘要:**目的 建立面粉及面制品中氨基脒的超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱方法。方法 在样品中加入同位素取代的氨基脒,以0.2 mol/L HCl提取后,与衍生剂邻硝基苯甲醛反应。衍生产物在中性条件下经HLB柱净化,乙酸乙酯洗脱,吹干复溶后,以超高效液相色谱的C<sub>18</sub>柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm)分离,质谱法检测。以保留时间与质谱离子对定性,内标法定量。结果 氨基脒在0.5~100 μg/kg范围内呈线性相关。方法精密度良好(RSD<20%,n=6),回收率在60%~120%之间,定量限为0.5 μg/kg(S/N=10)。结论 本方法特异性强,灵敏度高,适合于面粉及面制品中的氨基脒检测。

**关键词:**氨基脒;SPE纯化;超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法;面粉与面制品;食品污染物;食品安全  
中图分类号:R155;O657.7;TS213.2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0579-05  
DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.016

## Determination of semicarbazide in flour and flour products by SPE purification ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry

WANG Dan, CHEN Ying, SONG Shu-feng, GAO Jie, LIANG Jiang, ZHAO Yun-feng  
(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center For Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** An ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed for the determination of emicarbazide (SEM) in flour and flour products. **Methods**

收稿日期:2014-6-30

基金项目:973“食品加工过程安全性评价及危害物风险评估”(2012CB720804)

作者简介:王丹 男 助理研究员 研究方向为食品安全 E-mail:wangdan@cfsa.net.cn

通讯作者:赵云峰 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail:zhaoyf@cfsa.net.cn