

实验技术与方法

偶氮染色-光谱法快速检测牛乳中组胺和酪胺含量

陈雪莹¹,樊静静¹,宋书锋²,高洁²,强维¹,蒋定国²,贺巍巍²,刘卿²,杨大进²,杨欣²

(1. 上海安谱实验科技股份有限公司,上海 201609;2. 国家食品安全风险评估中心,北京 100021)

摘要:目的 利用偶氮染色-光谱技术,研究并设计可满足牛乳中组胺、酪胺快速检测的方法。方法 样品经盐酸溶液提取,提取后的组胺、酪胺与偶氮试剂发生染色反应后 10~15 min 内使用光谱法检测。结果 组胺和酪胺的定量限均为 10 mg/kg,满足当前国内外标准通常规定组胺最低为 50 mg/kg 的限量要求,回收率在 90% 左右,相对标准偏差在 10% 左右,结果符合食品理化分析的相关要求。结论 研制的检测方法具有快速、稳定、节约成本等特点,适用于牛乳中组胺、酪胺的快速检测。

关键词:牛乳;组胺;酪胺;偶氮染色-光谱法;快速检测方法

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)05-0943-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.05.013

Rapid determination of histamine and tyramine content in milk by azo dye-spectroscopy

CHEN Xueying¹, FAN Jingjing¹, SONG Shufeng², GAO Jie², QIANG Wei¹, JIANG Dingguo²,
HE Weiwei², LIU Qing², YANG Dajin², YANG Xin²

(1. ANPEL Laboratory Technologies (Shanghai) Inc., Shanghai 201609, China;

2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective A rapid method for determination of histamine and tyramine in milk was designed and studied by azo dye-spectroscopy. **Methods** Histamine and tyramine in samples were extracted by hydrochloric acid solution, and dyed reaction was acted with azo reagent. Spectral method was used for detection within 10-15 min. External standard method was used for qualitative and quantitative analysis. **Results** The limits of quantification of histamine and tyramine were both 10 mg/kg, which met the minimum limit requirement of 50 mg/kg specified in the current domestic and foreign standards for histamine. The recovery rate was about 90% and the relative standard deviation was about 10%. The results met the relevant requirements of food physical and chemical analysis. **Conclusion** The detection method is fast, efficient, stable, reliable and cost saving. It is suitable for the rapid detection of histamine and tyramine in milk.

Key words: Milk; histamine; tyramine; azo dye-spectroscopy; rapid detection method

为完成对牛乳中生物胺开展在线检测的研究,研究并建立适用的快速检测技术,且检测装置要尽可能小型化、分析过程尽可能简便和快速,以适应现场检测的需要^[1-4]。生物胺(Biogenic amine, BA)是一类含氨基、具有生物活性的小分子有机化合物的总称^[5]。存在于多种食品尤其是发酵食品中,如奶酪、葡萄酒、啤酒、水产品及肉类产品等,主要由微生物氨基酸脱羧酶作用于氨基酸脱羧而生成^[6]。

当前国内外针对牛乳无生物胺的相应规定,乳

制品中生物胺的种类及总量可能与生长条件、保存天数、加工工艺以及与微生物水平密切相关,致使各类产品差别较大^[7]。参考干酪生物胺研究结果,组胺和酪胺无论从特异性降解成分还是从毒性角度均为最需关注的乳指示性生物胺^[8-10]。

目前,在快速检测方法方面主要是针对水产品、肉制品中组胺的快速检测试纸条、分子印迹技术以及表面拉曼光谱^[11-17]。为解决牛乳在线快速检测问题,本文针对性建立可在生产现场使用的牛乳基质的偶氮染色-光谱法快速检测技术,以期检测方法简便,检测速度快,适用于企业开展检测。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器和试剂

微型紫外-可见分光光度计(安谱公司),分析天

收稿日期:2021-12-02

基金项目:“十三五”国家重点研发计划(2018YFC1604304-02)

作者简介:陈雪莹 女 工程师 研究方向为食品快速检测技术研究 E-mail:675503198@qq.com

通信作者:杨欣 女 研究员 研究方向为食品化学监测和检测技术研究 E-mail:yangxin@cfsa.net.cn

平(0.001 g,瑞士梅特勒-托利多公司)。

盐酸(质量分数 37%,分析纯,国药试剂),碳酸钠(色谱纯,CNW),对硝基苯胺(分析纯,阿拉丁),亚硝酸钠(分析纯,CNW),组胺二盐酸盐(histamine dihydrochloride,纯度>99.0%)、酪胺(tyramine,纯度>98%)标准品(CNW)。

1.2 标准溶液及试剂的配制

1.2.1 组胺标准储备液(5 mg/mL)

准确称取组胺二盐酸盐标准品 8.372 g 于 1 000 mL 容量瓶中,加水定容至刻度。置于 4 °C 冰箱保存。有效期 6 个月。

1.2.2 酪胺标准储备液(2 mg/mL)

称取酪胺标准品 2.041 g 于 1 000 mL 容量瓶中,加水定容至刻度。置于 4 °C 冰箱保存。有效期 6 个月。

1.2.3 盐酸溶液(1:11)

将 10 mL 盐酸缓慢加入 110 mL 水中,混匀。可长期保存。

1.2.4 碳酸铵溶液(50 g/L)

称取 5 g 碳酸钠于 100 mL 烧杯中,用适量水完全溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,并定容至刻度。保存期 6 个月。

1.2.5 偶氮试剂

甲液(对硝基苯胺):称取 0.5 g 对硝基苯胺,加 5 mL 盐酸溶液溶解后转移至 200 mL 容量瓶中,再用水定容至刻度。置冰箱中,临用现配。

乙液(亚硝酸钠溶液):称取 0.5 g 亚硝酸钠,加入 100 mL 水溶解,临用现配。

实验前,吸取 5 mL 甲液、40 mL 乙液混合,即为偶氮试剂,临用现配。

1.2.6 标准曲线配制

取酪胺储备液(2 mg/mL) 50、100、250、375、500 μ L 置于 50 mL 离心管中,组胺标准品储备液(5 mg/mL) 20、40、100、150、200 μ L 置于另一组 50 mL 离心管中,各分别加入牛乳阴性样品至 10 mL,混匀,分别得到酪胺和组胺 10、20、50、75、100 μ g/mL 的标准曲线溶液。再加入 20 mL 盐酸溶液(1:11),在 60 °C 水浴中放置 30 min,其间不时取出混匀。5 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.45 μ m 滤膜。取滤液 1 mL 置于 15 mL 离心管中,加入 3 mL 50 g/L 碳酸铵溶液,3 mL 偶氮试剂,3 mL 水,在混匀后 10~15 min 间上机检测。

1.3 样品前处理

1.3.1 参比溶液

取 10 mL 无组胺和酪胺牛乳样品置于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 盐酸溶液,混匀后其余步骤

同 1.2.6。

1.3.2 样品溶液

取 10 mL 待测鲜牛乳样品置于 50 mL 离心管中,其余步骤同 1.3.1。

1.4 实验条件

采用可适用于现场检测的便携式小型快速紫外可见光谱仪,选择透射率模式,积分时间 8 ms。组胺的最大吸收波长(460 \pm 30) nm,酪胺的最大吸收波长(515 \pm 5) nm。

2 结果

2.1 技术条件的选择和方法的建立

目前无专门适用于牛乳检测的前处理方法。如参照 GB 5009.208—2016 中丹磺酰氯衍生的方法,衍生后 10 min 发现不同加标浓度的溶液颜色由浅黄色均变成棕红色,且不成线性;如参照 GB 5009.208—2016 中偶氮试剂衍生的方法,则存在样品轻微浑浊、基质标准曲线线性差、RSD 值偏大等问题,故目前最常见的这两种方法均不适用于牛乳样品前处理。

根据检测原理分析,偶氮试剂衍生方法更适合牛乳中生物胺的显色,但必须建立针对性前处理方法。为此,以 GB 5009.208—2016 为基础,分别进行酸化、提取、去除杂质等优化研究,优化前后前处理条件对比见表 1,改进后的牛乳样品前处理流程图见图 1。

表 1 前处理条件改进对比

Table 1 Comparison of pre-treatment improvement conditions

	GB 5009.208—2016	优化后的方法
酸化条件	20 mL 10% 三氯乙酸	20 mL 1:11 盐酸
提取条件	浸泡 2~3 h	60 °C 水浴,30 min
去除蛋白质等	振荡 2 min,滤纸过滤	离心 5 min
萃取条件	正戊醇提取 3 次,盐酸萃取	—

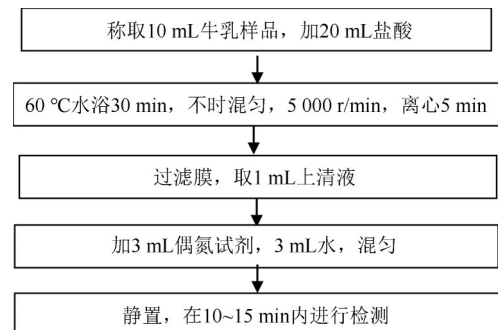


图 1 操作流程图

Figure 1 Operation flow chart

考虑到以往常用的三氯乙酸存在腐蚀性以及后续衍生化中使用盐酸的实际特点,故选择盐酸作为酸化试剂。按照后续确定的前处理步骤,选择 1:11 盐酸是最适合的,实际检测中在组胺和酪胺添加水

平 10 mg/kg 时回收率均可达 95% 左右,盐酸浓度过低时会影响去除蛋白的效果,但浓度过高时似乎会导致牛乳分解,存在干扰,致使结果异常高。

以添加水平为 10 mg/kg 进行提取效果比较,浸泡 2~3 h 的提取效率仅 70% 左右,当 60 °C 水浴放置 15 min 时提取效率接近 80%,但 60 °C 水浴放置 30 min 的提取效率则在 90% 以上,故选择后者。

在偶氮试剂衍生方法研究中,通过观测组胺、酪胺在偶氮染色过程中波长与所对应的吸光度随时间变化的三维图,如图 2 和图 3,可以发现在衍生反应后的 10~20 min 内有良好的稳定性,但反应本身仍然是一个动态变化的过程。为保证检测结果的稳定性与准确性,最好在染色后 10~15 min 内进行检测。

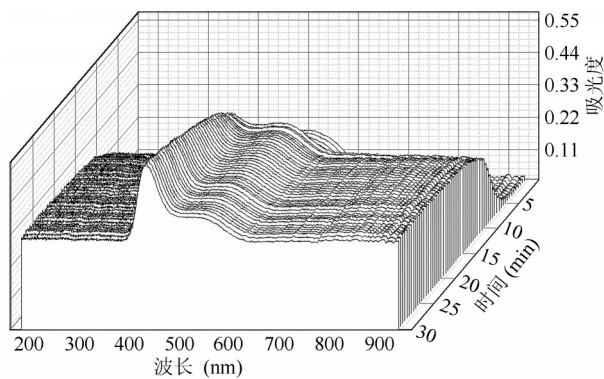


图2 组胺吸光度变化与时间关系图

Figure 2 Relationship between histamine absorbance change and time

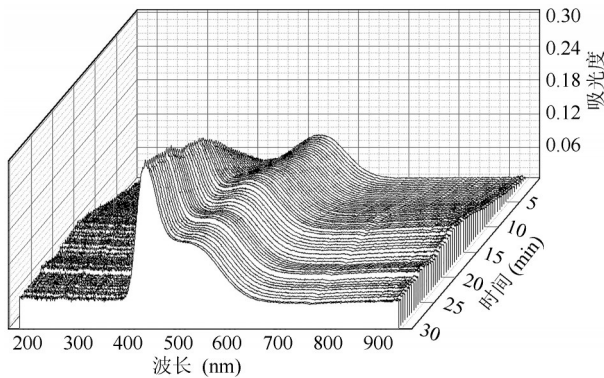


图3 酪胺吸光度变化与时间关系图

Figure 3 The relationship between tyramine absorbance change and time

2.2 定性和定量

定性由检测浓度对应的最大吸收波长决定,由于浓度变化而导致峰型有所变化,故最大吸收波长可能表观上存在差异。在浓度为 50 mg/kg 时,组胺的最大吸收波长在(460±30) nm 之间,酪胺的最大吸收波长在(515±5) nm 之间。通过使用标准品测试可以看到在此条件下可能产生干扰的生物胺有

苯乙胺、精胺、亚精胺,由于酪胺和组胺的吸收在可见光区显著优于其他生物胺、且实际牛乳筛查及文献报道中并未提及可能会存在这三种生物胺,故该波长下牛乳中其他生物胺等存在干扰的现象几乎不存在。定量采用标准曲线外标法定量。

2.3 方法的线性范围和定量限

取 3 种市场主流品牌牛乳样品,在确定其组胺和酪胺均低于检出限后添加组胺、酪胺标准溶液,使浓度分别为 10、20、50、75、100 mg/L,然后在完成前处理后进行检测,以分析物的浓度与对应的吸光度差值(最大吸光度与基线吸光度)比值绘制校正曲线,按外标法计算试样中组胺与酪胺的含量。如表 2 中 2 种目标物的线性回归方程的相关系数(R^2)均大于 0.99,表明各目标物在 10~100 mg/L 浓度范围内呈良好的线性关系。用基质溶液配制成浓度为 0、10、20 mg/L 的标准溶液,经前处理后进行分析,以信噪比为 10 时的空白样品基质加标的含量为定量限(Limit of quantity, LOQ),组胺、酪胺的定量限均为 10 mg/kg。针对组胺目前已制定最低限量为 50 mg/kg,因此,所研制的牛乳快速检测方法的定量限可完全满足要求。

表2 组胺、酪胺的线性方程、线性范围、相关系数、定量限

化合物	线性方程	线性范围/(mg/L)	R^2	LOQ/(mg/kg)
组胺	$y=0.0028x-0.0009$	10~100	0.9989	10
酪胺	$y=0.0017x-0.0004$	10~100	0.9953	10

2.4 方法的稳定性

由于鲜牛乳未经发酵,故组胺和酪胺本身含量很低,以限量值要求的 50 mg/kg 和定量限 10 mg/kg 分别作为加标浓度,通过向空白鲜牛乳样品基质中添加组胺和酪胺,以确定方法的准确度和精密度。结果见表 3。加标回收实验结果表明本方法的准确度与精密度基本良好,符合检测要求。

表3 组胺、酪胺的日间稳定性和日内稳定性

加标浓度		日内稳定性		日间稳定性	
		组胺	酪胺	组胺	酪胺
50 mg/kg	平均值/(mg/kg)	48.22	51.18	47.08	47.47
	精密度/%	2.48	2.03	4.34	4.28
10 mg/kg	平均值/(mg/kg)	9.73	9.67	9.54	9.66
	精密度/%	3.18	3.36	5.37	5.22

3 结论

本研究建立的方法组胺和酪胺的定量限均为 10 mg/kg,而当前国内外最低的限量要求为 50 mg/kg,

实现了牛乳组胺和酪胺的快速检测。本方法在节省时间的同时,也大大减少了过程中消耗的试剂,特别是避免了腐蚀性试剂的使用。

参考文献

- [1] 扶晓菲,游春苹.牛乳新鲜度评价及其检测方法的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(11):4319-4325.
FU X F, YOU C P. Research progress on evaluation and detection methods of milk freshness[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(11): 4319-4325.
- [2] 赵瑞.基于游离氨基酸和生物胺的牛乳腐败标示物的筛查[D].天津:天津农学院,2017.
ZHAO R. Screening of milk spoilage markers based on free amino acids and biogenic amines [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2017.
- [3] 郑静铃.牛乳品质检测方法与牛乳蛋白合成调控研究进展[J].湖北农业科学,2018,57(S2):1-5.
ZHENG J L. Research progress on detection method of milk quality and regulation of milk protein synthesis [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(S2): 1-5.
- [4] 徐楚璇.牛奶的变质与新鲜度检测探讨[J].现代商贸工业,2019,40(10):176-178.
XU C X. 牛奶的变质与新鲜度检测探讨[J]. Modern Business Trade Industry, 2019, 40(10): 176-178.
- [5] 杨熙,颜婷婷,殷丽君,等.腐乳中生物胺的产生及其控制研究进展[J].中国酿造,2021,40(10):1-6.
YANG X, YAN T T, YIN L J, et al. Research progress on production and control of biogenic amines in Sufu [J]. China Brewing, 2021, 40(10): 1-6.
- [6] 冯雅蓉,马丽珍.生物胺对食品安全和人类健康的重要性[J].肉类研究,2005,19(12):25-28.
FENG Y R, MA L Z. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Meat Research, 2005, 19(12): 25-28.
- [7] 刘继超,陈历俊,刘硕,等.高效液相色谱法测定不同乳制品中生物胺含量的研究[J].中国乳品工业,2018,46(5):43-45,48.
LIU J C, CHEN L J, LIU S, et al. Determination of biogenic amines in different dairy products by high performance liquid chromatography method [J]. China Dairy Industry, 2018, 46(5): 43-45, 48.
- [8] 李志军,吴永宁,薛长湖.食品中生物胺与人类健康[C]//中国生态学会.中国生态学会2006学术年会,2006.
LI Z J, WU Y N, XUE C H, et al. 食品中生物胺与人类健康 [C]//中国生态学会.中国生态学会2006学术年会,2006.
- [9] 刘景,任婧,孙克杰.食品中生物胺的安全性研究进展[J].食品科学,2013,34(5):322-326.
LIU J, REN J, SUN K J. Safety of biogenic amines in foods [J]. Food Science, 2013, 34(5): 322-326.
- [10] VALSAMAKI K, MICHAELIDOU A, POLYCHRONIADOU A. Biogenic amine production in Feta cheese [J]. Food Chemistry, 2000, 71(2): 259-266.
- [11] 潘秋红,段长青,田园,等.一种快速检测生物胺的方法:CN102650628B[P].2014-10-29.
PAN Q H, DUAN C Q, TIAN Y, et al. 一种快速检测生物胺的方法:CN102650628B[P].2014-10-29.
- [12] 干宁,黄洁,欧昌荣,等.一种水产品中生物胺的快速检测方法:CN105651890B[P].2017-12-12.
GAN N, HUANG J, OU C R, et al. 一种水产品中生物胺的快速检测方法:CN105651890B[P].2017-12-12.
- [13] 杨德志,李克相,李秋兰,等.一种表面增强拉曼散射快速检测食品中生物胺的方法:CN113075196B[P].2022-02-15.
YANG D Z, LI K X, LI Q L, et al. 一种表面增强拉曼散射快速检测食品中生物胺的方法:CN113075196B[P].2022-02-15.
- [14] 陈冲,任爽,秦志洋.肉制品中组胺快速检测方法:CN106442494A[P].2017-02-22.
CHEN C, REN S, QIN Z Y, et al. 肉制品中组胺快速检测方法:CN106442494A[P].2017-02-22.
- [15] 杨德志,李克相,李秋兰,等.一种双模式快速检测食品中组胺的方法:CN113049568B[P].2022-02-15.
YANG D Z, LI K X, LI Q L, et al. 一种双模式快速检测食品中组胺的方法:CN113049568B[P].2022-02-15.
- [16] 高志贤,宁保安,孙思明,等.用于组胺快速检测的分子印迹-SPR传感方法:CN105891159A[P].2016-08-24.
GAO Z X, NING B A, SUN S M, et al. 用于组胺快速检测的分子印迹-SPR传感方法:CN105891159A[P].2016-08-24.
- [17] 高志贤,韩殿鹏,彭媛,等.一种用于组胺快速检测的比色条、比色卡和检测方法:CN110672596A[P].2020-01-10.
GAO Z X, HAN D P, PENG Y, et al. 一种用于组胺快速检测的比色条、比色卡和检测方法:CN110672596A[P].2020-01-10.