

发酵肉制品中组胺含量测定方法的比较

Comparison of determination method for histamine content in fermented meat products

王新惠¹ 白婷¹ 李俊霞^{1,2} 罗静¹

WANG Xin-hui¹ BAI Ting¹ LI Jun-xia^{1,2} LUO Jing¹

(1. 成都大学生物产业学院肉类加工四川省重点实验室, 四川 成都 610106;

2. 西华大学生物工程学院, 四川 成都 611743)

(1. *Meat-processing Key Laboratory of Sichuan, Faculty of Biotechnology Industry, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106, China*; 2. *School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu, Sichuan 611743, China*)

摘要: 分别采用液相色谱法、中国国标法和中国国标改进法 3 种方法测定发酵肉制品中组胺含量, 并对检测结果进行比较, 旨在建立一种准确且适用于测定发酵肉制品中组胺含量的测定方法。结果表明, 3 种方法的标准曲线都呈现良好的线性关系; 液相色谱法的精密度最高, 相对标准偏差 $< 1\%$, 而中国国标法的精密度最差, 相对标准偏差接近 5% ; 液相色谱法和中国国标改进法加标回收率均高于 90% 以上, 优于中国国标法, 准确度满足试验要求。液相色谱法和中国国标改进法均能满足测定发酵肉制品中组胺含量的试验要求。

关键词: 发酵肉制品; 组胺; 液相色谱检测法

Abstract: In order to build a suitable method for determination of histamine content in fermented meat products, liquid chromatography (HPLC) method, the national standard method and the improved national standard method were used to determine histamine content in fermented meat products. It was shown that the standard curve of the three methods showed a good linear relationship. HPLC method presented the highest precision with a good relative standard deviation ($RSD < 1\%$), while the national standard method exhibited the worst precision and the relative standard deviation was close to 5% . The range of recovery rate of both HPLC method and the improved national standard method were higher than 90% and were better than that of the national standard method. The results revealed that HPLC method and the improved national standard method could meet the determination of histamine content in fermented meat products experimental requirements.

Keywords: fermented meat products; histamine; Liquid chromatography method

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31301552); 成都大学大学生创新性实验项目(编号: CDU-CX-2014133)

作者简介: 王新惠(1982—), 女, 成都大学副教授, 博士。

E-mail: wangxinhui19820319@163.com

收稿日期: 2015-04-03

发酵肉制品由于富含蛋白质和氨基酸, 在成熟、贮藏过程中, 游离组氨酸易在氨基酸脱羧酶的作用下生成组胺。组胺是生物胺中毒性最强, 对人体健康危害最大的一种生物胺。它是一种过敏物质, 会引起毛细血管扩张和支气管收缩, 导致患者头疼、头晕、胸闷、全身乏力和烦躁等。此外, 组胺与亚硝酸盐反应可能形成致癌物质 N-亚硝胺^[1]。研究^[2]表明, 发酵香肠、腊肉等发酵肉制品含有较高浓度的组胺, 随机抽检四川、重庆、江西、北京、江苏、浙江以及广东等不同地区的 42 个传统发酵香肠样品, 组胺均有不同程度的检出。据报道^[3], 2002~2012 年中国约发生 140 起食品组胺中毒事件。食品中组胺成为世界范围公认的、潜在的食品安全问题, 已成为食品安全研究的热点。目前, 发酵肉制品及其它种类肉制品中组胺的限量还没有明确的规定, 中国一般要求低于 100 mg/kg , FDA 规定食品中生物胺总量不得超过 1000 mg/kg , 其中组胺含量 $\leq 50 \text{ mg/kg}$, 欧盟对肉制品中组胺要求 $\leq 100 \text{ mg/kg}$ ^[4-7]。因此, 建立准确的测定发酵肉制品中组胺的分析方法有着非常重要的意义。

目前, 中国测定食品中的组胺, 主要采用中国 GB/T 5009.45—2003《水产品卫生标准的分析方法》(文中简称中国国标法), 而该法主要用于检测水产品中的组胺含量^[8,9]。发酵肉制品蛋白质、油脂含量较高, 中国国标法中规定的样品前处理方法对发酵肉制品已不适宜。本研究分别采用液相色谱法、中国国标法和中国国标改进法 3 种方法测定香肠、腊肉等传统发酵肉制品中的组胺, 比较这 3 种方法的精密度和准确度, 旨在探讨 3 种方法的优劣, 寻找一种较准确且适合测定发酵肉制品中组胺的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要试剂

正戊醇、三氯乙酸溶液、碳酸钠、盐酸、氢氧化钠、氨基苯胺、亚硝酸钠、酚酞、乙酸铵、高氯酸、碳酸氢钠:分析纯,北京化学试剂公司;

组胺标物:纯度 $\geq 97\%$,国药集团化学有限公司;

甲醇:色谱纯,天津康科德科技有限公司;

丹酰氯:纯度 $\geq 99.0\%$,上海沪鼎生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

可见紫外分光光度计:UV741型,惠普上海分析仪器有限公司;

电子天平:JA2003型,上海天平仪器厂;

高速冷冻离心机:CR22G型,日立工机株式会社;

超声波细胞破碎仪:JY92-11N型,宁波新芝生物技术股份有限公司;

高效液相色谱:Agilent1100型,安捷伦科技有限公司;

均质器:ZQ-II型,天津市东康科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 组胺标准储备液的制备 准确称取 (100 ± 5) °C干燥2 h的组胺磷酸盐0.2767 g溶于蒸馏水中,转入100 mL容量瓶中,定容,此溶液组胺浓度为1.0 mg/mL。组胺标准使用液配制:准确吸取1.0 mL组胺标准储备液置于50 mL容量瓶中定容,此溶液组胺浓度20.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2.2 中国国标法测定组胺 按GB/T 5009.45—2003《水产品卫生标准的分析方法》执行。

1.2.3 中国国标改进法测定组胺 根据GB/T 5009.45—2003修改如下:称取5.00 g样品,置于具塞锥形瓶中,加入三氯乙酸溶液20 mL,超声处理(功率300 W,温度45 °C)2 min后,于4 °C以6 000 r/min离心5 min。上清液稀释100倍后取2.0 mL于10 mL离心管中,加入1滴酚酞指示剂(10 g/L),逐滴滴加氢氧化钠溶液(250 mg/mL)呈碱性(溶液刚呈红色),每次加入正戊醇3 mL,旋涡振荡2 min后,于4 °C以2 000 r/min离心5 min,提取3次,合并正戊醇提取液并稀释至10.0 mL,备用。取1.0 mL盐酸提取液于10 mL比色管中,加3 mL碳酸钠溶液,3 mL偶氮试剂,加水至刻度,旋涡振荡2 min,静置10 min后,480 nm处测定吸光值并计算结果。

1.2.4 液相色谱法测定组胺 根据文献[10]和[11]修改如下:称取5.00 g样品,置于具塞50 mL离心管中,加入0.4 mol/L高氯酸溶液10 mL,均质1 min后,于4 °C以6 000 r/min离心5 min。上清液稀释100倍取2.0 mL置于10 mL离心管中,依次加入2 mol/L氢氧化钠100 μL ,饱和碳酸氢钠300 μL 和10 mg/mL丹酰氯溶液(溶于丙酮)1 mL,盖塞。40 °C避光反应45 min后,加入浓氨水100 μL

终止反应。加入乙腈使终体积为5 mL,0.20 μm 滤膜过滤,供高效液相色谱测定。色谱测定条件^[2]:检测波长254 nm,柱温35 °C,进样量50 μL ,流动相A为水,流动相B为乙腈,用30% A和70% B的混合液平衡、洗脱,流速0.3 mL/min。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

2.1.1 中国国标法和中国国标改进法的标准曲线 准确吸取0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL组胺标准使用液分别置于6支10 mL比色管中,加水至1 mL。再各加1 mL盐酸(1+11),3 mL碳酸钠溶液,3 mL偶氮试剂,加水至刻度,混匀,放置10 min,用1 cm比色杯以零管调节零点,480 nm测吸光值,绘制标准曲线见图1。

2.1.2 高效液相色谱法的标准曲线 准确吸取0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL组胺标准使用液,依次加入2 mol/L氢氧化钠溶液100 μL ,饱和碳酸氢钠溶液300 μL 和10 mg/mL丹酰氯溶液1 mL,盖塞。40 °C避光反应45 min后,定容至5 mL,振荡均匀,0.20 μm 滤膜过滤,液相色谱测定,绘制标准曲线见图2。

由图1、2可知,组胺浓度在0~20 $\mu\text{g/mL}$ 范围内中国国标法、中国国标改进法和液相色谱法都呈现良好的线性关系,曲线相关系数都在0.99以上,其中液相色谱法更为灵敏。

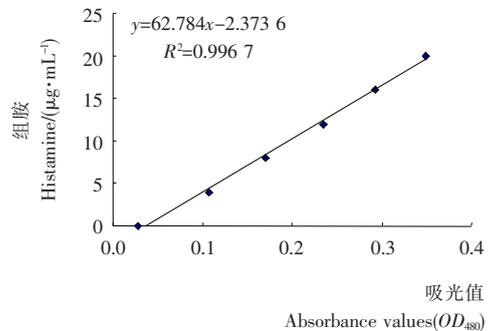


图1 分光光度法组胺标准曲线

Figure 1 Histamine standard curve of spectrophotometric method

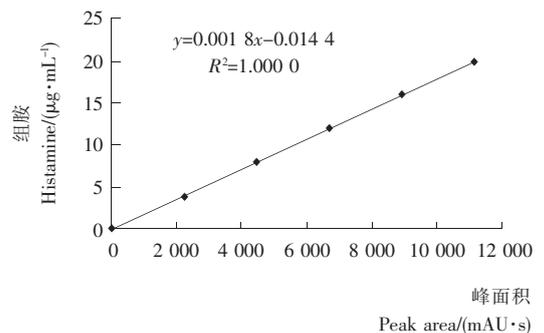


图2 液相色谱法组胺标准曲线

Figure 2 Histamine standard curve of liquid chromatography method

2.2 中国国标法、中国国标改进法和液相色谱法的精密度和准确度

以某品牌的鲜肉、川味发酵香肠、广味发酵香肠和发酵腊肉为试验材料,加入一定量的组胺标准品使加标值达到 20 mg/kg,分别采用中国国标法、中国国标改进法和液相色

谱法测定样品中的组胺含量,比较 3 种方法的精密度和准确度。每个试样做 6 次平行检测,数据采用 Matlab ver. 2006b(Mathworks Inc., Natick, MAUS) 和 Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, US) 分析,结果见表 1、2。

表 1 中国国标法、中国国标改进法和液相色谱法的精密度

Table 1 Results of precision test of liquid chromatography method, the national standard method and the improved national standard method ($n=6$)

样品	测的平均值/(mg·kg ⁻¹)			相对标准偏差(RSD)/%		
	国标法	改进法	色谱法	国标法	改进法	色谱法
鲜肉	17.63	18.47	19.21	4.56	1.93	0.89
川味发酵香肠	31.23	32.64	33.41	4.12	1.72	0.45
广味发酵香肠	68.46	72.12	73.12	3.27	1.32	0.18
发酵腊肉	27.81	29.53	30.21	3.67	1.45	0.31

表 2 中国国标法、中国国标改进法和液相色谱法的准确度

Table 2 Results of accuracy test of liquid chromatography method, the national standard method and the improved national standard method ($n=6$)

样品	本底值/ (mg·kg ⁻¹)	加标值/ (mg·kg ⁻¹)	测的值/(mg·kg ⁻¹)			回收率/%		
			国标法	改进法	色谱法	国标法	改进法	色谱法
鲜肉	0.02	20	17.63±0.81	18.47±0.36	19.21±0.17	88.1	92.2	95.9
川味发酵香肠	15.21	20	31.23±1.29	32.64±0.56	33.41±0.15	88.6	92.7	94.8
广味发酵香肠	55.23	20	68.46±2.24	72.12±0.95	73.12±0.13	91.0	95.8	97.1
发酵腊肉	11.42	20	27.81±1.02	29.53±0.43	30.21±0.09	88.5	93.9	96.1

由表 1、2 可知,高效液相色谱法的精密度最高,稳定性好,其相对标准偏差 $<1\%$,而中国国标法的精密度最差,重复性较差,波动较大,其相对标准偏差接近 5% 。液相色谱法和中国国标改进法测定肉制品中组胺的回收率均高于 90% 以上,优于中国国标法,准确度满足试验要求。卢士玲^[12]、张海萍^[13]等报道采用液相色谱法测定发酵肉制品中组胺,灵敏度高,重复性好,准确度高,优于中国国标法。液相色谱设备和耗材昂贵,且其前处理步骤比较繁琐,需要经过提取后才可衍生进样,因此,液相色谱法具有一定局限性。中国国标法中所需仪器设备一般实验室都具备,且测定费用比较低廉,因此,目前中国国标法仍是中国检测人员测定肉制品中组胺的主要方法之一。笔者在实际测定过程中发现,发酵肉制品蛋白质、油脂含量较高,中国国标法中采用提取剂常温浸泡处理样品,样品中的组胺未充分进入到提取剂中,提取率较低,导致测得数据比真实值偏小;中国国标法中采用分液漏斗分离提取液,样品中的蛋白质和油脂与提取液不易分层,分离提取液易混入肉泥、蛋白质等杂质影响样品吸光值准确度^[14]。笔者在中国国标法的基础上进行改进:采用超声波辅助萃取取代了中国国标法中室温浸泡 $2\sim 3$ h,改进

后回收率提高 5% ,耗时 2 min,大大缩短提取时间;正戊醇提取过程中,用离心方式取代了中国国标法中用分液漏斗振荡分离的方式,液相与固相实现良好分层,分离提取液无肉泥、蛋白质等杂质混入,增强了测定的稳定性。结果表明,中国国标改进法,呈现出较好的精密度和准确度,能满足测定发酵肉制品中组胺试验要求,是一种准确、经济测定发酵肉制品中组胺的方法。由此可见,试验人员可根据实际条件和需要选择液相色谱法或中国国标改进法对发酵肉制品中的组胺进行测定。

3 结论

分别采用液相色谱法、中国国标法和中国国标改进法等 3 种方法测定发酵肉制品中组胺,液相色谱法的精密度最高,相对标准偏差 $<1\%$,中国国标法的精密度最差,相对标准偏差接近 5% 。笔者采用超声波辅助萃取取代了中国国标法中室温浸泡 $2\sim 3$ h,用离心方式取代了中国国标法中用分液漏斗振荡提取的方式,改进后回收率提高 5% ,提取液中无肉泥、蛋白质等杂质增强测定的稳定性,呈现出较好的精密度和准确度。液相色谱法和中国国标改进法均能满足测定发酵肉制品中组胺的试验要求。

(下转第 92 页)

逐渐上升与内腔冷凝盘管进行换热;

(2) 与单面进风相比, 双面进风气流组织在长度方向上分布较为对称, 双面进风能够降低气流因管壁和壁面处热流扰动引起的涡流的数量和强度;

(3) 三面进风时, 冷凝器的内腔温度在三股气流共同作用下, 先后经历一个先下降再上升的过程, 贴近壁面处, 有空气流动死角存在, 部分点的局部温度较高;

随着 CFD 模拟技术在蒸发式冷凝器方面研究的深入, 在以后的计算模拟中, 可以尝试在特定喷淋水密度的条件下, 研究不同进风速度、进风角度以及进风面积对蒸发式冷凝器换热效果的影响。

参考文献

- 肖志英. 提高蒸发式冷凝器效率的途径[J]. 河北化工, 2007, 31(1): 31~33.
- Manske K A, Reindl D T, Klein S A. Evaporative condenser control in industrial refrigeration systems[J]. Refrigeration, 2001, 24(7): 676~691.
- 谢晶, 吴天. 小型冷库门开关过程温度场的数值模拟[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(3): 332~339.
- Nasr M M, Hassan M S. Experimental and theoretical investigation of an innovative evaporative condenser for residential refrigerator[J]. Renewable Energy, 2009(34): 2 447~2 454.
- Heyns J A, Kroger D G. Experimental investigation into the thermal-flow performance characteristics of an evaporative cooler[J]. Applied Thermal Engineering, 2010(30): 492~498.
- Jahangeer K A, Andrew A O T. Numerical investigation of transfer coefficients of an evaporatively-cooled condenser[J]. Applied Thermal Engineering, 2011(31): 1 655~1 663.
- 文娟. 基于数值模拟的风冷冷凝器速度场的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2005.

- 董俐言, 王宝龙, 石文星, 等. 板式蒸发式冷凝器传热传质的数值模拟[J]. 制冷学报, 2013, 34(1): 10~17.
- 郭常青, 朱冬生, 蒋翔, 等. 板式蒸发式冷凝器传热传质的数值模拟[J]. 华南理工大学学报, 2009, 37(3): 53~57.
- 梁治会. 空调用蒸发式冷凝器数值模拟与结构优化[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2013.
- 刘清明. 蒸发式冷凝器流场分析及其应用与空调节能研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- Gao Sheng-wei, Ren Jing-qi, Hong Wen-peng. Scheme design and analysis of variable condition of evaporative condenser for steam condensing of steam feeding water pump for 1 000 MW air-cooled unit[J]. Energy Procedia, 2012(17): 1 177~1 184.
- 钟振兴, 朱冬生, 刘清明, 等. 板式蒸发式冷凝器热性能试验研究[J]. 流体机械, 2011, 39(2): 39, 58~61.
- Foster A M, Swain M J, Barrett R. Experimental verification of analytical and CFD predictions of infiltration through cold store entrances[J]. International Journal of Refrigeration, 2003, 26(8): 918~925.
- 乔慧芳. 蒸发式冷凝器强化传热及强度分析[D]. 河南: 郑州大学, 2008.
- 唐家鹏. FLUENT14.0 超级学习手册[M]. 北京: 人民邮电出版社, 2013: 15~30.
- 陶文铨. 计算流体力学与传热学[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1991: 3~34.
- 陶文铨. 数值传热学[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2002: 10~40.
- 王新坤, 许文博, 赵坤, 等. 基于 CFD 的多孔管热风数值模拟与设计方法[J]. 排灌机械工程学报, 2011, 29(1): 82~86.
- 缪晨, 谢晶. 冷库空气幕流场的非稳态数值模拟及验证[J]. 农业工程学报, 2013, 29(7): 246~253.
- 汤毅, 谢晶, 王金锋, 等. CFD 预测风机摆设形式对冷库的影响[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 124~128.

(上接第 39 页)

参考文献

- 刘书臣, 廖明涛, 赵巧灵, 等. 不同贮藏温度下大目金枪鱼鲜度及组胺变化[J]. 食品发酵与工业, 2013, 39(5): 213~217.
- Lu Shi-ling, Xu Xing-lian, Shu Rui-hua, et al. Characterization of biogenic amines and factors influencing their formation in traditional Chinese sausages [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): 366~372.
- 夏威, 徐正龙, 于颖慧. 一起组胺中毒的调查报告[J]. 河南预防医学杂志, 2013, 24(2): 160~161.
- 周传云, 聂明, 万佳蓉. 发酵肉制品的研究进展[J]. 食品与机械, 2004, 20(2): 27~30.
- Lu Yong-mei, Chen Xiao-hong, Jiang Mei, et al. Biogenic amines in Chinese soy sauce [J]. Food Control, 2009, 20(6): 593~597.
- 姚水琼. 欧美国家食品安全检验检测与监管的特点与启示[J]. 食品与机械, 2011, 27(1): 67~70.
- 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.
- Armağan Önal, Armağan O. A review; Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods [J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1 475~1 486.
- 中华人民共和国卫生部, 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: 中国标准出版社, 2003.
- 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]. 安徽农业科学, 2011, 39(32): 20 033~20 034, 20 037.
- 肖琴, 王充, 郑琳, 等. 高效液相色谱法测定发酵食品中组胺的含量[J]. 粮油食品科技, 2012, 20(2): 31~33.
- 卢士玲, 徐幸莲, 舒蕊华, 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.
- 张海萍, 李开雄, 卢士玲, 等. 新疆熏马肠中生物胺含量的调查[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(11): 152~156.
- 王新惠, 白婷, 李俊霞, 等. 国标法测定发酵肉制品中组胺的方法改进[J]. 食品科技, 2014, 39(12): 142~145.