

# 低盐即食虾皮氨含量的高效液相色谱分析方法

柳晓萍, 郝更新, 杨 燊, 孙乐常, 石林凡, 任中阳, 邱绪建

(集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 建立低盐即食虾皮中氨含量的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析方法。样品粉碎经三氯乙酸提取后, 用丹磺酰氯衍生并用甲苯净化提取, 然后采用乙腈和水梯度洗脱, 254 nm 紫外检测。结果表明, 内标法的线性范围是0.000 5~0.2 g/L, 回收率为84%~105%, 检测限约为0.7 mg/L。本方法的稳定性和精密度良好, 并且可同时分析其他生物胺物质。

[关键词] 虾皮; 生物胺; 氨; 低盐; 高效液相色谱

[中图分类号] TS 201.6

## Determination of Ammonia in Low Salt Ready-to-Eat Dried Shrimp (*Acetes chinensis*) by HPLC Method

LIU Xiaoping, HAO Gengxin, YANG Shen, SUN Lechang, SHI Linfan, REN Zhongyang, QIU Xujian

(College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatography(HPLC) method for determination of biogenic amines was developed and validated to determine ammonia content in low salt ready-to-eat dried shrimp samples. Samples were ground and mixed with trichloroacetic acid to extract ammonia. Then the extract was derivatized by dansyl chloride and extracted by toluene before analysis by HPLC. The results showed good linearity and repeatability in the range of 0.000 5-0.2 g/L. The recovery rate was 84%-105%. The detection limit in samples was approximately 0.7 mg/L. The HPLC method could also simultaneously analyze the possible biogenic amines generated in the samples.

**Keywords:** dried shrimp; biogenic amine; ammonia; low salt; high performance liquid chromatography(HPLC)

## 0 引言

虾皮是以中国毛虾(*Aectes chinensis*)或日本毛虾(*Acetes japonicus*)为原料经干制加工而成的中国传统特色水产加工制品。虾皮富含钙, 是深受消费者喜爱的补钙营养佳品<sup>[1]</sup>。传统虾皮加工通常是采用高浓度盐水将毛虾蒸煮晒干或烘干而成, 这种产品盐分含量高、水分含量低, 失去了原有的鲜美滋味和营养价值。此外, 膳食中盐食用过多易导致高血压及患心脏病、肾病及中风的风险增加<sup>[2]</sup>。近年来, 不添加或少量添加食盐的含水量较高的自动化生产线加工的熟半干低盐即食虾皮(含水量可高于35%), 因其鲜度足、口感好而日益受到消费者的青睐。但是, 该类虾皮在冷藏或室温贮藏过程中随着时间的延长易产生显著氨异味, 降低了产品的感官品质和商业价值<sup>[3-4]</sup>。虾皮贮藏过程中产生的氨物质, 不仅严重影响产品风味, 还对人体健康产生不利影响。

[收稿日期] 2021-01-18

[作者简介] 柳晓萍(1995—), 女, 硕士生, 从事水产品质量研究。通信作者: 邱绪建(1974—), 男, 副教授, 博士, 从事水产品贮藏与加工研究。E-mail: xjqiu@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

挥发性盐基氮法是一种常用的分析水产品挥发性胺类物质的方法，但是该方法不能对氨单独定量。气相色谱法如果采用火焰离子化检测器，则无法分析非含碳物质；采用质谱作为检测器则因氨分子质量小、极易挥发而导致分析困难。电介质阻挡放电离子化检测器结合气相色谱仪器可以实现对氨的分析检测，但是该检测器较为少见<sup>[5]</sup>。此外，毛细管电泳法也可用来分析海产品中氨的含量，但是不如高效液相色谱仪器那么普及。国内外有大量研究报道用丹磺酰氯或苯甲酰氯衍生法分析鱼体内生物胺含量<sup>[6-7]</sup>，但是采用此方法分析氨的研究较为少见<sup>[8-9]</sup>，目前尚没有应用此方法在虾皮中分析氨的报道。虾皮中氨物质含量可对产品感官品质有重要影响，因此，探究一种可以分析氨含量的方法很有必要。本研究旨在研究一种可以分析虾皮中氨含量的高效液相色谱方法，该方法建立在生物胺分析方法的基础上，利用丹磺酰氯柱前衍生然后用 HPLC 分析。而且，此方法可以同时分析生物胺类物质。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LXJ-IIB 型离心机，上海安亭科学仪器厂；AR1530 型电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；恒温水浴锅，上海精宏实验设备有限公司；液相色谱仪，美国 Waters 公司；KQ-500 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器公司；粉碎机，德国 IKA 集团。

氯化胺、二甲胺、色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺、精胺及 1,7-二氨基庚烷（纯度>98%）均购自上海麦克林生化科技有限公司。甲苯、三氯乙酸、碳酸钠等购自国药集团化学试剂有限公司。色谱纯乙腈购自默克公司。实验用水为超纯水，由 Millipore Simplicity 制备。低盐虾皮购自集美农贸市场。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

虾皮经粉碎机粉碎后，取 2 g 样品置于离心管内，然后加入 0.5 mL 5 g/L 内标物质 1, 7-二氨基庚烷及 15 mL 冰的质量分数为 5% 三氯乙酸溶液，混合后振荡并超声 5 min，4 000 r/min 离心 5 min。取上清液放置于 25 mL 容量瓶中，剩余滤渣加入 8 mL 冰的质量分数为 5% 三氯乙酸溶液，再次振荡超声离心后，将上清液移入之前的 25 mL 容量瓶中，并用质量分数为 5% 三氯乙酸溶液定容。取 1 mL 该溶液置于 1.5 mL 离心管中，15 000 r/min 离心 5 min，再取 100  $\mu$ L 进行衍生化处理。

1.2.2 样品衍生化

将上述处理的衍生试样与 200  $\mu$ L 饱和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液和 400  $\mu$ L 的 10 g/L 丹磺酰氯（丙酮配制）混合以进行衍生化。使用振荡器将整个混合物混合均匀，在 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅内保温 5 min。最后加入 100  $\mu$ L L-脯氨酸溶液终止反应，室温避光存放 15 min。加入 500  $\mu$ L 甲苯振荡，取 300  $\mu$ L 上层有机溶液，氮气吹干后加入 1 mL 乙腈，过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后进行 HPLC 分析。HPLC 色谱分析条件：色谱柱为 Alltima C18（250 mm  $\times$  4.6 mm，5  $\mu\text{m}$ ）；柱温为 35  $^{\circ}\text{C}$ ；流速为 1 mL/min；进样量为 20  $\mu$ L；检测波长为 254 nm。流动相及梯度洗脱程序见表 1。

表 1 样品 HPLC 梯度洗脱程序		
Tab. 1 Gradient elution program for HPLC samples		
$t/\text{min}$	$\Phi(\text{水 Water})/\%$	$\Phi(\text{乙腈 Acetonitrile})/\%$
0	45	55
3	36	64
5	32	68
9	24	76
11	15	85
13	13	87
15	0	100
17	45	55
25	45	55

1.2.3 标准曲线绘制

将 0.1 mL 0.000 5 ~ 0.2 g/L 的系列浓度的氨溶液按照 1.2.2 步骤进行衍生化处理后上机分析, 以峰面积为纵坐标, 以氨浓度为横坐标绘制外标标准曲线。含 0.1 g/L 内标 1,7-二氨基庚烷的氨系列标准溶液也按同样方法衍生化并上机分析, 以氨与内标的峰面积之比为纵坐标, 以氨浓度为横坐标绘制内标标准曲线。

1.2.4 精密度及稳定性实验

将样品溶液 0.1 g/L 衍生化后连续进样测定精密度, 同一样品在 3 d 进行相同方法分析, 计算比较分析结果。

1.2.5 加标回收率实验

在样品中按低、中、高 3 个添加量进行加标回收率实验, 分别平行测定 3 次, 在扣除本底虾皮氨含量后, 按外标法和内标法分别计算回收率。

2 实验结果与分析

2.1 样品前处理及衍生化方法的确定

在水产样品生物胺分析过程中, 三氯乙酸或高氯酸是最常用的去除蛋白质并提取胺类物质的溶剂。研究表明<sup>[10]</sup>, 三氯乙酸的净化效果要优于高氯酸, 且高氯酸为危险化学品管控试剂。因此, 本实验采用三氯乙酸作为样品前处理的试剂。

氨或生物胺因为没有特征的光谱吸收基团, 因此需要衍生化处理, 衍生化试剂一般为丹磺酰氯或苯甲酰氯。但有研究报道<sup>[11]</sup>, 苯甲酰氯衍生化过程中可能形成杂质峰而干扰分析, 因此, 本实验选用较为常用的丹磺酰氯作为柱前衍生剂。

文献中关于丹磺酰氯衍生化的温度 (25 ~ 60 ℃) 和时间 (5 ~ 60 min) 都有差异<sup>[12-13]</sup>。本实验采用 60 ℃ 对加热 5, 15, 30 min 的样品溶液峰面积进行比较, 发现峰面积没有随时间延长而增加, 说明 5 min 加热时间已经达到较优的衍生化效果。因此, 采用 5 min 作为加热时间 (见图 1)。目前生物胺分析方法较多, 很多提取衍生步骤繁琐而且不统一, 这可能与样品种类、分析目的等有关。本实验采用的衍生化方法较为简便, 洗脱溶剂不含盐类物质, 分析结果表明, 本方法可以使 10 种胺类物质实现良好分离, 峰形较好, 无拖尾现象 (见图 2)。

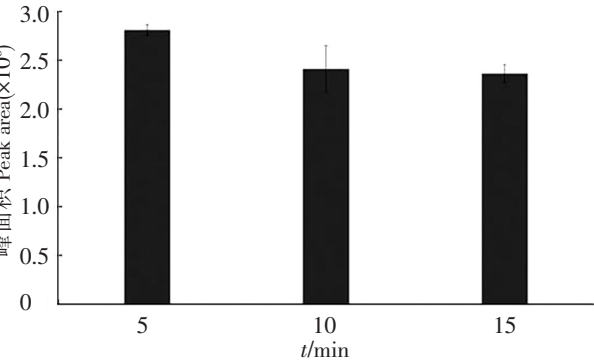
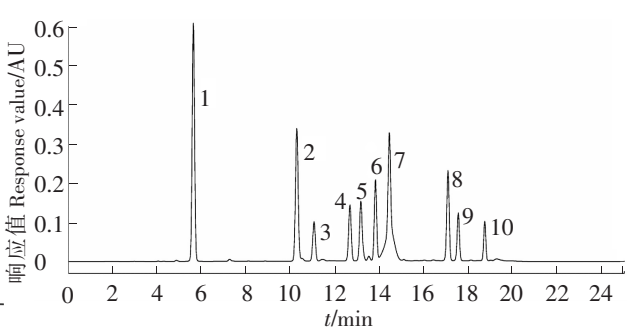


图 1 60 ℃条件下不同加热时间对丹磺酰氯衍生化的氨峰面积的影响

Fig.1 Comparison of peak areas of ammonia derivatized by dansyl chloride at different heating time at 60 ℃



1—氨;2—二甲胺;3—色胺;4—苯乙胺;5—腐胺;6—尸胺;7—组胺;8—酪胺;9—亚精胺;10—精胺  
1—ammonia;2—dimethylamine;3—tryptamine;4—phenethylamine;5—putrescine;6—cadaverine;7—histamine;8—tyramine;9—spermidine;10—spermine

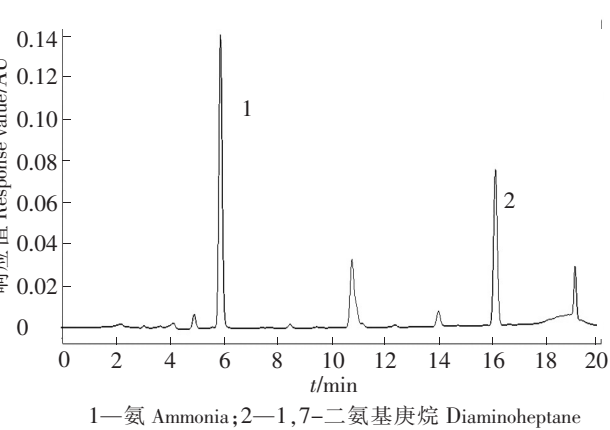
图 2 氨及生物胺的 HPLC 分析色谱图  
Fig.2 HPLC chromatography of ammonia and biogenic amines

2.2 标准曲线、精密度及稳定性实验

外标标准曲线和内标标准曲线在一个相对较宽的范围内都有很好的线性关系， $R^2$ 值均大于 0.99（见表 2）。内标法分析图谱见图 3。按照 3 倍信噪比计算，样品的检测限约为 0.7 mg/L。通过外标法和内标法计算得到的样品值均相对稳定，但是外标法得到的含量明显偏低。衍生后溶液连续进样后的峰面积相差不大，相对标准偏差为 0.79%，说明仪器系统分析稳定可靠。衍生化的标液贮藏在 4℃、48 h 内峰面积变化不大，相对标准偏差为 0.45%。对同一冷冻样品在 3 d 分别按内标法处理分析，样品氨含量基本保持稳定（见图 4）。

表 2 低盐即食虾皮中氨加标回收率不同定量方法的比较 ( $n=3$ )  
Tab.2 Results of recovery rate tests of ammonia content in dried shrimp  
using different quantification methods ( $n=3$ )

定量方法 Quantification method	$\rho(\text{氨 Ammonia})/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$		回收率 Recovery rate/%	RSD/%	回归方程 Regression equation	$R^2$
	添加量 Addition amount	测定值 Measured value				
内标法 Internal standard method	0.5	0.42	84	10.75	$y = 72.108x - 0.0589$	0.9989
	1.0	0.94	94	9.10		
	2.0	2.10	105	8.19		
外标法 External standard method	0.5	0.29	58	15.31	$y = 7 \times 10^7x - 224664$	0.9988
	1.0	0.70	70	9.79		
	2.0	1.56	78	5.41		



1—氨 Ammonia; 2—1,7-二氨基庚烷 Diaminoheptane  
图 3 氨及内标 1,7-二氨基庚烷的 HPLC 分析色谱图  
Fig.3 HPLC chromatography of ammonia and  
internal standard 1,7-diaminoheptane

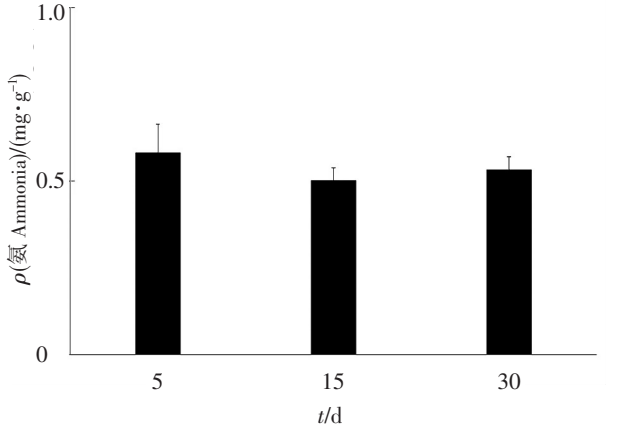


图 4 内标法分析的低盐虾皮氨含量 ( $n=3$ )  
Fig.4 Ammonia content in low-salt dried shrimp  
by internal standard analysis method ( $n=3$ )

2.3 回收率实验

外标法计算得到的回收率在 55% ~ 71%，远低于内标法计算得到的回收率（见表 2）。内标法可以部分消除提取衍生等步骤过程中的分析目标物的损失，因此，本实验氨的分析宜采用内标法。

3 结论

本实验应用丹磺酰氯柱前衍生法来分析低盐虾皮氨物质含量，并分析了其可行性。结果表明，氨标准液在 0.0005 ~ 0.2 g/L 质量浓度范围内具有良好的线性关系，精密度和稳定性良好，内标法定量分析较外标法有更高的回收率。该方法亦可同时分析样品中可能存在的生物胺如组胺、腐胺等。



## [ 参考文献 ]

- [1] 郭莹莹,王联珠,朱文嘉,等. 虾皮行业标准的修订内容解读 [J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(1): 8-15.
- [2] HENDRIKSEN M A H, HOOGENVEEN R T, HOEKSTRA J, et al. Potential effect of salt reduction in processed foods on health [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2013, 99(3): 446-453. DOI:10.3945/ajcn.113.062018.
- [3] 邱绪建,陈申如,郝更新,等. 淡干虾皮在4℃及25℃贮藏条件下的品质变化 [J]. 集美大学学报(自然科学版), 2018, 23(4): 265-271.
- [4] 李馥君,翁佩芳,朱亚珠,等. 中国毛虾(*Acetes chinensis*)虾皮复合保鲜剂筛选及保鲜效果的研究 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(6): 333-338.
- [5] UETA I, NAKAMURA Y, FUJIKAWA H, et al. Determination of volatile amines using needle-type extraction coupled with gas chromatography-barrier discharge ionization detection [J]. Chromatographia, 2019, 82(1): 317-323. DOI:10.1007/s10337-018-3653-7.
- [6] WANG Y B, BAO X Y, WANG F F, et al. Dynamic detection of biogenic amines as a quality indicator and their relationship with free amino acids profiles in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(2): 254-260. DOI:10.1111/1750-3841.14425.
- [7] DEHAUT A, HIMBER C, MULAK V, et al. Evolution of volatile compounds and biogenic amines throughout the shelf life of marinated and salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*) [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 62(32): 8014-8022.
- [8] ÖZOGUL F, ÖZTEKIN R, KULAWIK P. Biogenic amine formation and microbiological quality of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) treated with lavender and lemon balm ethanol extracts [J]. Journal of Food Science, 2017, 82(5): 1278-1284. DOI:10.1111/1750-3841.13704.
- [9] VALLE M, MALLE P. Liquid chromatographic determination of fish decomposition index from analyses of plaice, whiting and herring [J]. Journal of AOAC International, 1996, 79(5): 1134-1140. DOI:10.1093/jaoac/79.5.1134.
- [10] 董伟峰,林维宣,赵彤彤,等. 柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱法测定黄油中七种生物胺 [J]. 食品科技, 2005, 8(8): 74.
- [11] 钟建军. 食品生物胺高效液相色谱分析技术的系统研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2015.
- [12] 牛天娇,郭永杰,孙二娜,等. 高效液相色谱法测定黄酒发酵醪液中生物胺含量 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(5): 184-188.
- [13] 胡月,黄志勇. 柱前衍生 HPLC 同时测定鱼中多种生物胺及其变化规律 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(11): 142-147.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)