

以高效能液相層析法分析魚肉中生物胺的含量

危貴金 陳桐榮* 方佳雯

中華醫專食品營養科

*國立嘉義農專食品工業科

摘要

本研究利用高效能液相層析法探討魚肉中七種生物胺之分析方法，其分析條件：逆相層析管柱以Inertsil 5 ODS-2 (250mm×4.6mm, 5μm)，移動相是氯甲烷：甲醇：水=3:10:3 (V/V/V)，流速 1.2ml/min，檢測波長為254nm，能將不易分離的putrescine、cadaverine及spermine三種生物胺完全分離，由此使七種生物胺達到最大的分離效果，且於30分鐘內即可完成。七種生物胺濃度標準曲線都呈線性關係($r > 0.90$ 以上)。偵測極限spermine 在0.6μg外，其餘六種生物胺則達0.3μg。添加於旗魚及秋刀魚的回收率大於89%以上。

分析由超市中所購得的生魚肉中，鮪魚含有cadaverine，旗魚則測得cadaverine及spermine，草魚中僅spermine 含量高於其它魚種；魷魚的putrescine、cadaverine及spermine含量均低於 6.54mg/100g，土魷魚亦含此三種生物胺，但spermine 含量較多13.10mg/100g；而秋刀魚及鮭魚則含較多種且多量的生物胺。旗魚的室溫貯藏試驗中發現，生鮮階段的旗魚只含單一生物胺spermine 或少量的cadaverine，隨貯藏時間越長putrescine、cadaverine、histamine及spermidine 等四種生物胺產生的量越多，產生速度以 histamine > cadaverine > spermidine > putrescine。

前言

生物胺是一些具有生物活性的胺類，如色胺(tryptamine; tryp)、腐屍胺(putrescine; put)、屍胺(cadaverine; cad)、精胺(spermin; spm)、組織胺(histamine; his)、酪胺(tyramine; tyr)及精胺質(spermidine; spd) 等⁽¹⁾。一般食品中生物胺的產生，主要是來自微生物的酵素對特定的胺基酸進行脫羧反應(decarboxylation)後形成相對的生物胺⁽²⁾。

食品中的生物胺在正常代謝過程中可經由肝或腸壁的單或雙胺類氧化酶(mono- or diamine oxidase; MAO or DAO)作用而分解，對人體具有psychoactive及vasoactive等生理效應⁽³⁾。但在食品中生物胺含量過高或人體代謝不正常即會引起人體食物中毒、過敏症、偏頭

痛甚至高血壓等症狀，如組織胺引起的組織胺中毒(histamine poisoning; scombroid fish poisoning)⁽⁴⁾或因大量酪胺存在而形成cheese effect，導致腦出血及心臟衰竭等疾病⁽⁵⁾。

高效能液相層析法是目前應用很廣泛的分析方法，不僅簡單、快速、準確性高且能分析許多種化合物，故利用此方法分析同時測定魚肉中色胺(tryp)、腐屍胺(put)、屍胺(cad)、精胺(spm)、組織胺(his)、酪胺(tyr)及精胺質(spd)等七種生物胺的含量。

有關於分析魚肉中的生物胺，如曾測定沙丁魚、針魚及貝類於貯藏時胺類含量的變化⁽⁶⁻⁷⁾；亦曾探討冰藏中鱈魚之胺類含量⁽⁸⁾；分析魚類罐頭所含的生物胺⁽⁹⁾。綜合許多結果可知，魚肉的腐敗與生物胺的形成確有相當大的關係。而目前國人日常購買生食的地點，除傳統市場外生鮮超市則是另一新興的消費場所，

超市所購買的魚肉都是經加工及包裝處理後銷售，其鮮度如何？生物胺含量如何？仍沒有一相關的報導可供參考。故本文針對日常超市中所購買的數種生魚肉之生物胺的含量加以分析；另外將一般時常以生鮮的方式食用的旗魚置於室溫下經貯藏後，探討魚肉腐敗過程生物胺變化的情形。

材料與方法

一、材料及試藥

(一)材料

鮪魚(tuna)、旗魚(swordfish)、土魷魚(barred spanish mackerel)、秋刀魚(pacific saury)、鮭魚(salmon)、魷魚(ray fish)及草魚(grass carp)之生魚肉片購自台南生鮮超級市場。

(二)試藥

生物胺標準品：色胺(tryptamine; tryp)、腐屍胺(putrescine; put)、屍胺(cadaverine; cad)、精胺(spermine; spm)、組織胺(histamine; his)、酪胺(tyramine; tyr)及精胺質(spermidine; spd)。及dansyl chloride購自Sigma公司，丙酮、乙酸乙酯、甲醇及氰甲烷等為LC級溶劑，其它試劑都是試藥級。

二、方法

(一)PH值的測定

取5g的樣品於250ml的燒杯中，加入100ml的去二氧化碳的水均質後，測定pH值。

(二)揮發性鹽基態氮(Volatile basic nitrogen; VBN)的測定⁽¹⁰⁾

取5g的樣品於100ml燒杯中，加入2.2% TCA 45ml，經均質後，於4°C下靜置10min，過濾，以康威氏皿法測定。

(三)Sensory rating⁽¹¹⁾

以研究室中8位品評員，以臭味為主的官能評品加以判定，以可食用階段(acceptable stage)為(1)；初期腐敗階段(stage of initial decomposition)為(2)；腐敗的階段(stage of advanced decomposition)為(3)。

(四)生物胺的測定⁽¹²⁾

1. 生物胺的萃取

取樣品20g於100ml的燒杯中，加6% HClO₄ 60ml以均質機(Polytron, PT3000)均質2-

3分鐘，在4°C中靜置16小時，抽氣過濾後，以6% HClO₄ 15ml洗。所得濾液用30% KOH調整至pH6.5，在4°C靜置2小時後過濾，定容至100ml，以備分析用。

2. 衍生反應

取萃取液2ml於有蓋試管中，加dansyl chloride溶液(10mg dansyl chloride/1ml acetone) 1.5ml及4% Na₂CO₃溶液3ml，混合均勻，置於40°C水浴振盪2小時，以氮氣吹約10min，加1.5ml乙酸乙酯萃取，於3000rpm 5min離心，並取上層液。重覆以上乙酸乙酯萃取步驟兩次後，定容至5ml，經0.45μm之過濾膜過濾，進行HPLC分析。

3. HPLC的配備及生物胺分析條件

利用液相層析儀(GASUKURO KOGYO, Janpan)，配備包括有Model 576幫浦，Rheodyne Model 7125注射器，Model 502U偵測器及SIC Model 12積分儀。分析管柱為Inertsil 5 ODS-2(250mm × 4.6mm, 5μm，建吾公司)，移動相為氰甲烷：甲醇：水=3：10：3(v/v/v)，流速1.2ml/min，偵測波長254nm。

4. 標準曲線的製作

取tryptamine hydrochlorides 122.8mg、putrescine dihydrochloride 186.5mg、cadaverine dihydrochloride 171.4mg、spermine tert-hydrochloride 181.2mg、histamine dihydrochloride 165.7mg及tyramine hydrochloride 126.6mg等7種生物胺溶於去離子水，定量至10ml，使每一生物胺的含量都為10mg/ml。取25μl進行(四)2.的衍生反應後，取5μl注入HPLC。

結果與討論

一、高效能液相層析條件的探討

依顏⁽¹²⁾曾同時分析七種生物胺的條件加以修改，以Inertsil 5 ODS-2 (250mm × 4.6mm, 5μm)為層析管柱，以氰甲烷：甲醇：水=1：2：1(V/V/V)混合溶液為移動相分析色胺(tryp)、腐屍胺(put)、屍胺(cad)、精胺(spm)、組織胺(his)、酪胺(tyr)及精胺質(spd)等七種生物胺，結果發現put、cad及spm三種生物胺無法達到很好分離效果。為將七種生物胺能完全分離，分別改變此三種溶劑的比例以探討對其分析物的影響。首先增加水含量，以延長生物胺在管柱的滯留時間，此雖有助於分離效

果，但卻使分析時間相對增加許多；而提高氰甲烷的含量，對生物胺的溶出相當有益而縮短分析時間，但卻無法使此七種生物胺達到最大的分離效果；至增加甲醇的含量雖亦延滯生物胺的溶出，但其滯留的效應低於水，而混合溶液在氰甲烷：甲醇：水(3：10：3)時，則使原不易分離的put、cad及spm三種生物胺能完全分開，由此使七種生物胺達到良好的分離效果，且整個分析時間於30分鐘內即可完成，如圖一。

二、標準曲線的製作

將生物胺分別配製成30ppm、50ppm、80ppm及100ppm 四種不同濃度的標準溶液為橫軸，而分析圖的波峰面積為縱軸所製得標準

曲線圖於圖二。而由表一是七個標準曲線可看出都具有相當良好線性關係，以tryp、put及tyr等三種生物胺達到 $r=0.99$ 以上，其次是cad及spd有0.98，及his 亦達0.95，以線性較差的spm也可達0.90。由以上可知，利用此分析條件應用於分析七種生物胺能得到相當好的結果。

三、偵測限量及樣品的回收率

此分析條件除spm 之偵測限量為 $0.6\mu\text{g}$ 外，其它六種生物胺達 $0.3\mu\text{g}$ 。將標準生物胺添加於旗魚及秋刀魚平均的回收率，以 tryp、put、cad、spm、his、tyr及spd 分別是105%、93%、95%、89%、94%、99%及94%。由以上結果可知，七種生物胺在此方法都可得相當高的回收率，且較顏⁽⁹⁾之應用於魚罐的回收率

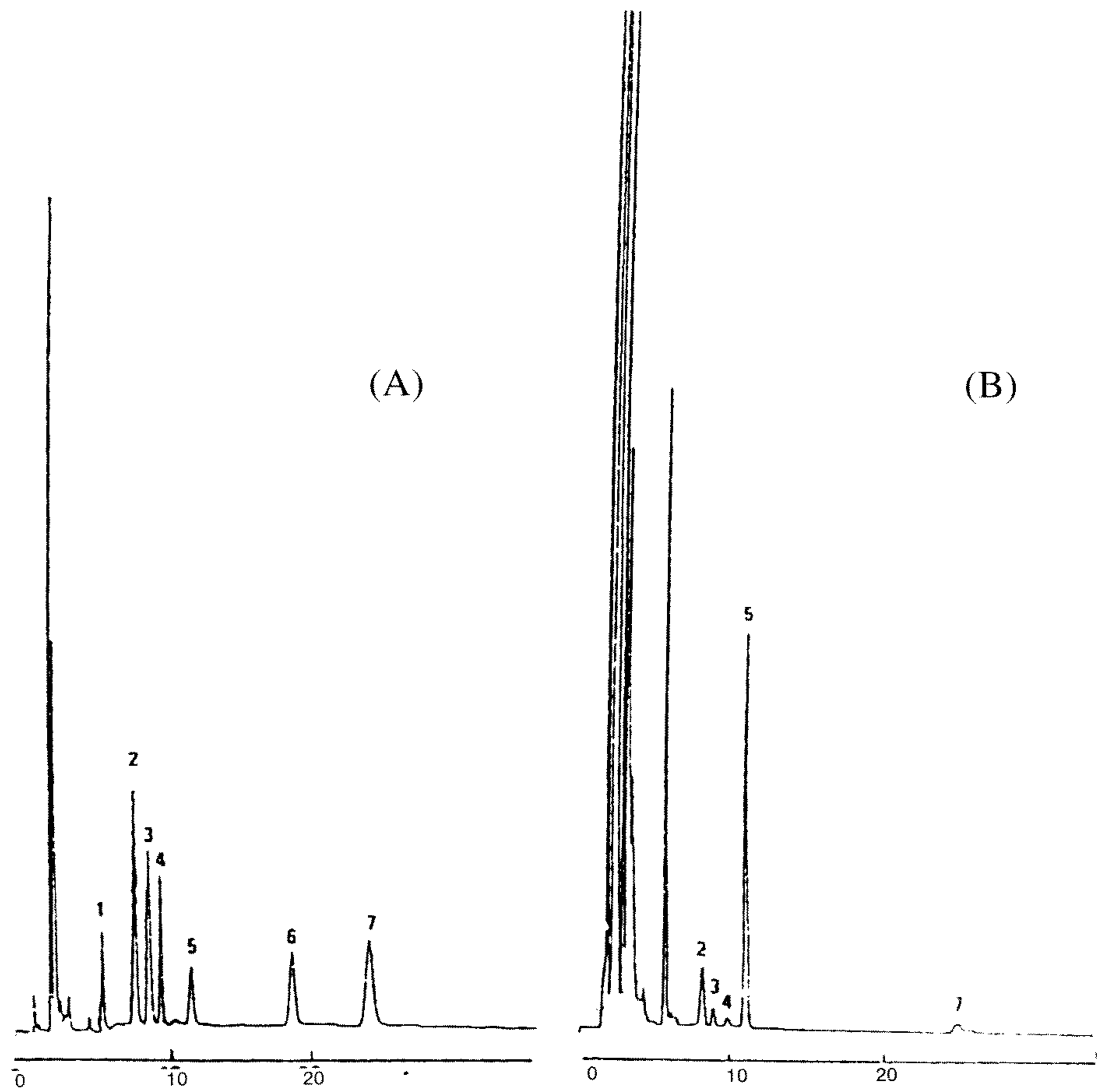


Figure 1. HPLC elution profile of biogenic amines of (A). Standards (B). Pacific saury.
Condition:
Biogenic amines was separated on Inertsil 5 ODS-2(250mm × 4.6mm, 5 μm) with CH₃CN:C₂H₅OH:H₂O=3:10:3.
flow rate, 1.2ml/min; UV detector, 254nm.
Retention time:
(1)tryptamine, 6.3min (2)putrescine, 8.5min (3)cadaverine, 9.5min (4)spermine, 10.5min
(5)histamine, 12.6min (6)tyramine, 19.5min (7)spermidine, 24.6min

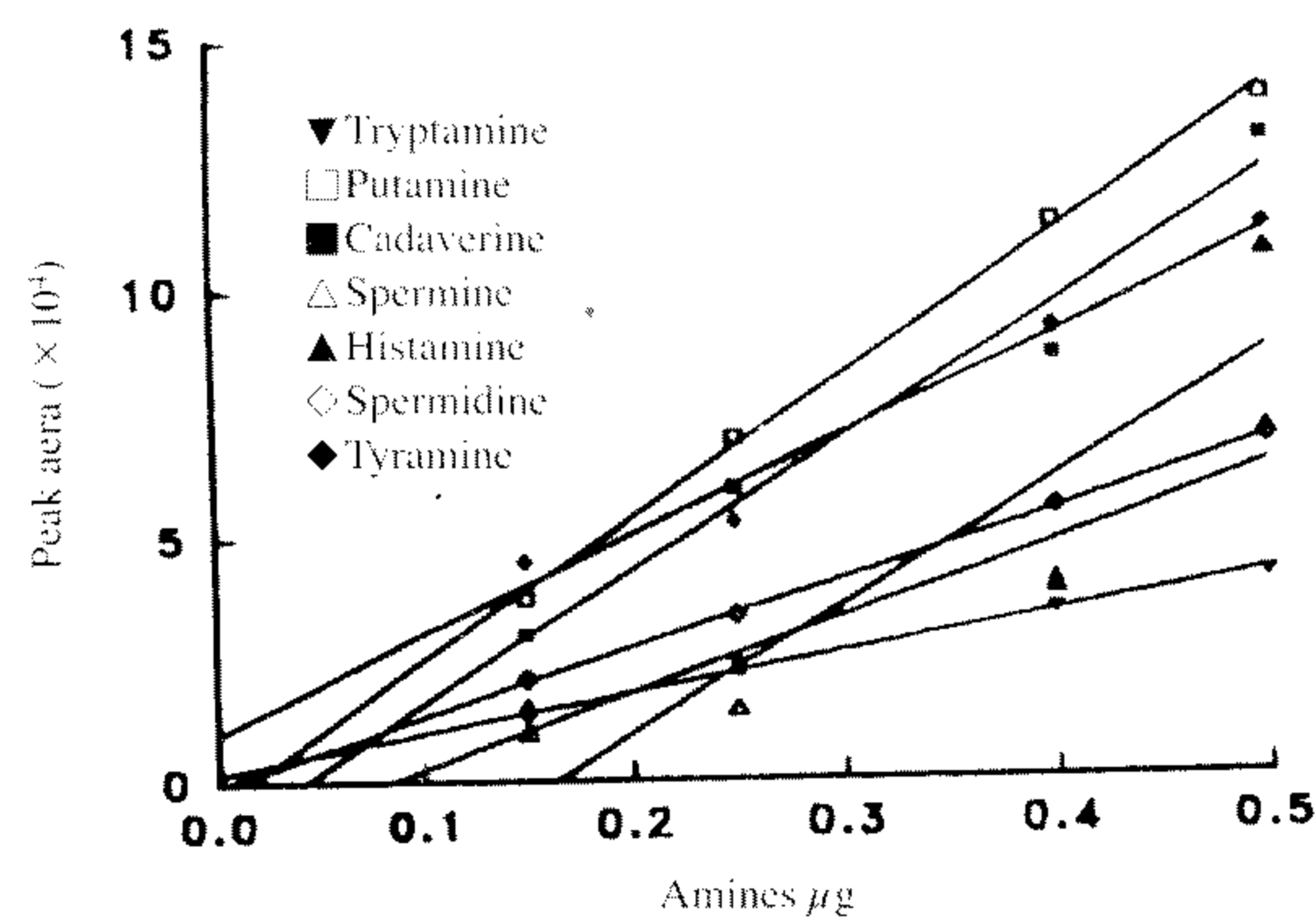


Figure 2. Calibration curves of seven biogenic amines.

高，其可能是由於魚罐是經進一步加工過後的干擾因子較多。

四、市售生魚肉之生物胺的種類及含量

分析購買於超市中的數種生魚肉所測得的七種生物胺含量如表二。由表中的結果可知，鮪魚僅含有6.75mg/100g 的cad；而旗魚測出5.98、0.53mg/100g 的cad 及spm；土魷魚及魷魚則都含有put、cad及spm，其中土魷魚的含量只有少量0.16、0.58及 0.60/100g，及生物胺含量較多的魷魚則分別有0.16、3.01 及6.54mg/100g；另外秋刀魚除含較多的spm 有13.10mg/100g 外，其餘 put、cad及spd 分別有0.44、0.42及0.46 mg/100g；鮭魚則是所測的數種魚肉中含生物胺種類及含量最多的一種，包括put、cad、spm、his及spd的五種生物胺的含量分別0.16、0.04、0.10、0.25及0.15/100g；草

魚雖含有微量的cad及his，但spm 的含量有32.01mg/100g。由以上的結果可知，七種的生魚肉未測得含有tyr及tryp兩種生物胺；另外鮪魚所含cad、旗魚的cad、spm及草魚中spm等三種生魚肉都測得出只含單一或兩種少量的生物胺，而土魷魚及魷魚雖含三種生物胺(put、cad及spm)，但所存在的量亦相當低。另外鮭魚則又比秋刀魚所含put、cad、spm及spd 四種生物胺以外，多含有 his。由此可發現不同魚肉於生鮮狀態所含的生物胺不儘相同，而本實驗所測得鮭魚及秋刀魚肉含多種且多量的生物胺，可能是魚肉於運輸過程中貯藏的不當或時間較長等因子有關⁽¹³⁾，導致其鮮度較前五種魚肉差。

五、旗魚貯藏中生物胺的變化

表三是將旗魚置於室溫下貯藏3天中魚肉品質的變化。由表中可顯示出，魚肉pH 的變化由貯藏第1 天下降後，第2及3 天逐漸上昇。揮發性鹽基態氮亦隨貯藏時間越長含量越高。新鮮旗魚的生物胺只有spm，且在0 天的含有8.24mg/100g，而貯藏1 天時含量下降至5.65mg/100g，並產生cad 2.33mg/100g。第2天的旗魚已有些異味，所測得put、cad、his及spd 分別有0.34、10.39、75.62 及0.91mg/100g。當貯藏3天已完全腐敗，生物胺的含量更高，有put(0.91mg/100g)、cad(17.95mg/100g)、his(131.28mg/100g) 及 spd (3.89mg/100g)。由此結果可知，生鮮時的旗魚只含生物胺spm或少量的cad，而隨貯藏時間越長 put、cad、his及

Table 1. Linear regression equation and correlation coefficients for biogenic amines

Amines	Linear equation coefficient		Correlation coefficients
	a	b	
Tryp	836212	565.96	0.998
Put	2879619	-40849.77	0.998
Cad	2782517	-161875.30	0.987
Spm	2602285	-852147.70	0.900
His	1531222	-126207.30	0.957
Tyr	1390688	-6151.68	0.999
Spd	2024455	97811.56	0.986

Y=aX + b, where Y = relative peak area and X = concentration of biogenic amines in μg

Table 2. Contents of biogenic amines in fish (mg/100g)

Samples	N ^a	Tryp	Put	Cad	Spm	His	tyr	spd
Tuna (鮪魚)	3	NDC	ND	1.76-10.46 (6.75) ^b	ND	ND	ND	ND
Swordfish (旗魚)	5	ND	ND	ND -15.92 (5.98)	ND- 0.86 (0.53)	ND	ND	ND
Barred spanish mackerel 土魷魚	3	ND	ND - 0.26 (0.16)	0.41- 0.75 (0.58)	0.48- 0.71 (0.60)	ND	ND	ND
Pacific saury (秋刀魚)	3	ND	0.38-0.49 (0.44)	0.27- 0.58 (0.42)	12.99-13.12 (13.10)	ND (0.46)	ND	0.45-0.46
Salmon (鮭魚)	3	ND	0.14-0.18 (0.16)	ND - 0.09 (0.04)	15.33-20.77 (18.10)	0.19-0.31 (0.25)	ND (0.15)	0.14- 0.15
Rayfish (魷魚)	3	ND	0.14-0.17 (0.16)	2.21- 3.82 (3.01)	3.62- 9.45 (6.54)	ND	ND	ND
Grass carp (草魚)	3	ND	ND	ND - 0.01 (0.01)	28.07-34.54 (32.01)	ND -0.29 (0.18)	ND	ND

^a Numbers of sample
^b Data are mean triplicate determinations.
^c ND = not detected

Table 3. Changes in biogenic amines 、pH and sensory rating of swordfish during storage at room temperature (mg/100g)

Storage time(day)	Tryp	Put	Cad	Spm (mg/100g)	His	Tyr	Spd	VBN	pH	Sensory rating
0	ND ^a	ND	ND	8.24	ND	ND	ND	8.44	6.12	1 ^b
1	ND	ND	2.33	5.65	ND	ND	ND	16.2	6.01	1
2	ND	0.34	10.39	ND	75.62	ND	0.91	30.0	6.20	2
3	ND	0.91	17.95	ND	131.28	ND	3.89	48.1	6.23	3

^a ND = not detected
^b 1:Acceptable, 2:Initial decomposition, 3:Advanced decomposition.

spd 等四種生物胺產生的量越多，腐敗的程度越嚴重，其中產生速度又以 his >cad >spd>put。

結 論

生物胺主要是由胺基酸經微生物的酵素進行脫羧作用而產生，許多學者曾探討利用生物胺產生情形作為魚肉腐敗的指標，如Mietz及Karmas⁽¹⁴⁾指出put、cad及his 的形成可作為鮪

魚腐敗的判定的方法；Yamanaka⁽¹⁵⁾指出以cad可作為新鮮魚肉鮮度的指標。由以上結果可知，所分析魚肉於新鮮狀態只含少量生物胺，且所含種類亦不相同。魚肉雖都隨貯藏時間越長生物胺產生的種類越多，而含量亦都有明顯增加的趨勢，但實際上不同魚肉導致腐敗的影響因子⁽¹¹⁾(如溫度、微生物及污染來源等) 不盡相同，產生生物胺的情形亦可能不完全一樣，故欲找出各種魚肉腐敗的指標，則有待對每一種魚肉都加以進一步分析及探討。

參考文獻

1. Pegg, A.E. 1986. Recent Advances in the Biochemistry of Polyamines in Eukaryotes. *Biochem. J.* 234:240-262.
2. Rice, S., Eitenmiller, R.R. and Koehler, P.E. 1976. Biologically Active Amines in Foods : a Reivew. *J. Milk Food Technol.* 39(5): 353-358.
3. Lovenberg, W. 1974. Psycho and Vasoactive Compounds in Food Substances. *J. Agric. Food Chem.* 22:23-26.
4. Bardocz, A., Grant, G., Brown, D.S. Ralph, A. and Pusztai, A. 1993. Polyamines in Food- Implications for Growth and Health. *J. Nutr. Biochem.* 4:66-71.
5. Stration, J.E., Hutkins, R.W. and Taylor, S.L. 1991. Biogenic Amines in Cheese and Other Fermented Foods: a Review. *J. Food Prot.* 54: 460-469.
6. Yamanaka, H., Shimakura, K., Shiomi, K. and Kikuchi, T. 1986. Change in Non-volatile Amine Contenets of the Meats of Sardine and Saury Pike During Storage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 52(1):127-130
7. Yamanaka, H. 1989. Change in Polyamines and Amino Acids in Scallop Abductor Muscle During Storage. *J. Food Sci.* 54 (5):1133-1135.
8. Dawood, A.A. 1988. The Occurence of Non-volatile Amines in Chilled-stored Rainbow Trout (*Salmo irideus*). *Food Chem.* 27:33-45.
9. Yen, G.C. and Hsieh, C.L. 1991. Simultaneous Analysis of Biogenic Amines in Canned Fish by HPLC. *J. Food Sci.* 256(1):158-160.
10. Conway, E.J. 1950. Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 3rd ed., pp. 87-107 Crosby Lockwood and Son Ltd., London.
11. 山中英明, 松本美鈴, 矢野幸男. 1989. 食肉の鮮度判定指標としてのポリアミンに する研究. *食衛誌.* 30(5):158-160.
12. 顏國欽. 1986. 食品中生物胺的研究 “1. 利用高效能液相層析儀分析大豆發酵食品中生物胺之含量”. *中國農化會誌* 24 : 211-227.
13. Maga, J.A. 1978. Amines in Foods. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 10:373-403.
14. Mietz, J.L. and Karmas, E. 1978. Polyamine and Histamine Content of Rockfish, Salmon, Lobster and Shrimp as an Indicator of Decomposition. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61: 139-145.
15. Yamanaka, H. 1990. Polyamines as Potential Indexes for Freshness of Fish and Squid. *Food Rev. Inter.* 6(4):591-602.

Analysis of biogenic amines in fish muscles by High Performance Liquid Chromatography

QUE-KING WEI TONG-RONG CHEN* CHIA-WEN FANG

*Department of Food Nutrition , China Junior College of
Medical Technology, Tainan, Taiwan, R.O.C.*

**Department of Food Industry, National Chia-Yi Institute
of Agriculture, Chia-Yi, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

A HPLC procedure has been developed for the analysis of seven biogenic amines in fish. Inertsil 5 ODS-2 column with UV detection at 254nm and acetonitrile-methanol-water (3:10:3,V/V/V) were used. The method is applicable to the quantification of amines with satisfactory sensitivity, selectivity and precision.

It was found that tuna contains cadaverine ;grasscarp contains spermine ; swordfish contains cadaverine and spermine; barred spanish macker-

el and rayfish each contain putrescine, cadaverine and spermine. Biogenic amines contents of pacific saury and salmon were higher than other fishes.

In storage tests, fresh swordfish was shown to contain spermine and the longer the storage, the higher in the amount of putrescine, cadaverine, histamine and spermidine. The order of producing rate of biogenic amine is histamine >cadaverine > spermidine > putrescine.

Key words: HPLC, biogenic amines, fish muscles.

