

# 鲑鱼等在贮藏期间组胺的形成及其测定法的探讨

俞鲁礼 黄金陵 张利民

(上海水产大学)

**提 要** 本文研究了鲑鱼在贮藏期间组胺的形成,并探索了不同鱼种在不同贮藏条件下组胺形成的规律。采用离子交换树脂进行前处理,以偶氮试剂为显色剂进行比色测定。该方法具有前处理效果好、回收率高、操作简便的优点。实验结果表明,温度升高会加快组胺的形成速度,鲑鱼在0°C条件下贮藏可大大降低组胺的形成。鲜度好的则其组胺形成较慢。根据贮藏的温度和时间等条件可推算出其组胺的含量,这对于判断鱼品质量和防止组胺中毒有一定的实用价值。

**主题词** 组胺,鲑鱼,偶氮试剂

组胺(Histamine)是鱼体中的游离组氨酸,它是在组氨酸脱羧酶的催化下发生脱羧反应形成的一种胺类。食用时会引起中毒现象。目前越来越多的人认为组胺有必要作为鱼类质量鉴定指标,特别对于一些青皮红肉鱼类(如鲭科),往往在未达到腐败(以挥发性盐基氮为鲜度指标)时其组胺含量已超出规定范围。同时又因组胺在新鲜鱼肉中几乎没有痕迹,对热的稳定性好,不易挥发,故用于某些鱼类以定量组胺作为质量检查,具有一定的可靠性和实用意义。

组胺在贮藏期间的形成与鱼种、温度、时间有关。这对于合理选择易产生组胺的鱼类的贮藏温度和时间,据此推测其组胺含量,都具有一定的实用性。目前国内在这方面的的工作基本上还是空白。最近英国人 A. H. Ritchie 等已成功地应用 Locarte 氨基酸自动分析仪对大西洋鲑鱼的非挥发性的二胺和多胺的形成进行了研究。在此资料的基础上,作者试图用常规方法对我国多获性的鲑鱼在贮藏期间组胺的形成进行了一些探讨。采用离子交换树脂柱进行前处理,以偶氮试剂为显色剂进行比色测定。该方法的特点是:前处理效果好,回收率接近100%,比目前国内应用最多的有机溶剂进行前处理优越得多(有机溶剂的回收率仅70%左右),另外操作简便易行。为了说明问题,作者还用同法对马鲛鱼和鳗鱼在贮藏期间组胺的形成进行对比检测。

## 材 料 与 方 法

### 实验用鱼

鲑鱼、马鲛鱼、海鳗取于上海鱼市场的冰鲜货,鲜度较好。

## 试剂

组胺标准液浓度为 1mg/ml, 2N, 0.4N, 0.2N 的醋酸缓冲液(pH=4.6), 0.2N, 1N 盐酸, 10% NaOH 溶液, 1.5N 碳酸钠溶液, 偶氮试剂甲液(0.5g 对硝基苯胺, 加浓盐酸 5ml, 加水至 200ml, 微热溶解。)偶氮试剂乙液(0.5g 亚硝酸钠加水溶解至 100ml, 需新鲜配制。)使用前准确将 5ml 甲液缓慢加入置于冰浴中的 40ml 乙液中。

## 仪器设备

电冰箱(LBJ<sub>2</sub>-5型), 烘箱(101-1型), 恒温箱(JT7<sub>5</sub>-型), 匀浆机(OY-300型), 分光光度计(72型)离子交换柱(10×200mm)。

## 树脂柱的准备

以 Zerolit-226 型(羧酸型)100-200 目的树脂, 置于烧杯中加入约五倍的 1N 盐酸搅拌 10 分钟, 静止后弃去上清液, 反复二、三次, 再用去离子水洗至中性, 湿法装柱(高度 5.5cm)。交换前用 0.2N 的醋酸缓冲液平衡。

## 鱼肉 TCA 提取液的制备

采取 20g 鱼肉加 40ml 去离子水, 用匀浆机匀浆 5 分钟, 再加 40ml 10% TCA 溶液匀浆 1 分钟, 静止 2 小时后过滤(鱼肉水分在 80% 时则滤液 1ml 相当于 0.203g 鱼肉)。

## 应用树脂柱分离组胺

取鱼肉 TCA 提取液 10ml, 用 10% 的 NaOH 溶液调至中性, 加 10ml 0.4N 醋酸缓冲液混合上柱后用 0.2N 醋酸缓冲液洗去杂质, 再用 0.2N 盐酸将交换上去的组胺洗脱下来, 用 1.5N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调至中性, 定容为 25ml 待测。

## 标准曲线的绘制

将标准组胺液(1mg/1ml)用去离子水准确稀释 100 倍至组胺浓度为 10μg/ml, 分别取 0, 1, 2, 3, 4, 5, ml 的量加入 6 支 25ml 比色管中(此时各比色管中的组胺含量分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50μg), 同时在各管中再加入 2.5ml, 7.5ml 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 7.5ml 偶氮试剂, 并定容摇匀后于 480mμ 的波长下进行比色。绘制标准曲线如图 1。

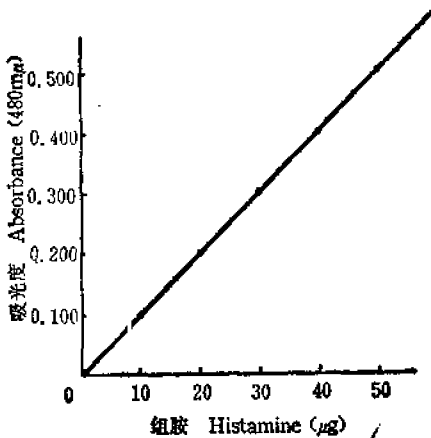


图 1 组胺的标准曲线

Fig 1 Standard curve of Histamine

波长(wave length): 480 mμ;

比色皿(colour dish): 2cm

y——比色测定时所取的经上柱处理的 TCA 提取液的 ml 数。(1.2 为校正值)

## 检查

(a) 回收率的测定

## 组胺含量的显色测定

取 y ml (y 值视组胺含量而定) 经上柱处理的鱼肉 TCA 提取液于 25ml 比色管中, 其他步骤同前, 同时做一平行实验, 并用去离子水做一空白, 据所得值从标准曲线上查出 W 值, 代入公式计算之。

鱼肉中组胺含量的计算公式:

$$x(\text{mg}/100\text{g}) = 1.2 \frac{W(\mu\text{g})}{y(\text{ml})} \quad (\text{A})$$

式中: x——每 100g 鱼肉所含组胺的 mg 数。

W——比色测定的 W 值对应于标准曲线上的组胺量。

在 25ml 比色管中加入  $y$  ml, 经上柱处理加有标准组胺液的鳗鱼 TCA 提取液(浓度为  $C$ ), 显色比色步骤同前。同时做一平行实验, 以经过上柱处理未加标准组胺液的鳗鱼 TCA 提取液  $y$  ml 做一空白。所得消光值查标准曲线得  $W$  值, 根据公式(A)和(B)可得其回收率(结果见表1)。

表1 标准组胺的回收率

**Table 1. Rate of recovery of standard histamine**

$y$ (ml)	2	1
$c$ ( $\mu$ g/ml)	5.707	40
$W$ ( $\mu$ g)	11.4	40.1
$\eta$ (%)	99.5	100.25

$$\eta = \frac{W}{y \cdot C} > 100\% \quad (B)$$

由此结果可以看出: 在较高或较低含量时, 组胺的回收率都较好, 基本上接近 100%。在这两者浓度之间进行测定是比较可靠的。但是在此需指出: 当上柱鱼肉 TCA 提取液中的组胺含量大于或接近本树脂柱的交换容量时, 以及在显色时含量太低, 都会引起检

测的准确度的降低。

#### (b) 组胺与其它偶氮反应的阳性物质分离情况

在新鲜鱼肉中的偶氮反应阳性物质有组氨酸与酪氨酸及其类似物等, 随着腐败而形成的酪胺及其类似物也是偶氮反应的阳性物质。前人用纸层析证明在此 pH 下, 酪胺和酪氨酸及其它类似物不会被交换, 其它杂质影响也极小。为了进一步证实组胺与组氨酸在此 pH 下能得到彻底分离, 进行了如下实验。

在 25ml 比色管中加入 1ml 经上柱处理加有组胺和组氨酸的标准鳗鱼 TCA 提取液 ( $C$  为 40 $\mu$ g 组胺加 40 $\mu$ g 组氨酸/ml) 进行测定, 并做平行实验和回收率测定的空白实验。得吸光度查得其  $W$  为 40.2, 回收率为  $\eta = 100.5\%$ , 由此可见组氨酸的去除是彻底的。

#### (c) 与其它方法比较

为了进一步证实本方法可靠性, 将所得结果与采用的对氨基苯磺酸法的结果进行了比较和验证, 两种方法基本符合。

## 实 验 结 果

鲱鱼在 25°C(烘箱)贮藏中组胺的变化结果列于表 2 中, 由于所用鱼样不够新鲜, 故基点已有组胺出现。从表中我们可以看出, 前 20 小时组胺形成不是太快, 其数量只增加了 3 倍左右; 而 20 小时后组胺形成加速, 到 40 小时比基点高出近 100 倍, 故曲线陡峭。见图 2。

鲱鱼在 0°C 贮藏中组胺的变化结果列于表 3 中, 与 25°C(烘箱)贮藏的鲱鱼采用同一基点, 但与其相比组胺的形成较慢, 无突变。见图 3。

表 2 鲱鱼、马鲛鱼 25°C 烘箱贮藏组胺的形成

**Table 2 The formed histamine as mackerel and scomberomorous nipponia kept in 25°C oven**

时间(小时) Time(hours)	0	20	40	48
鲱鱼(mg/100 g) (mackerel)	2.80	9.60	262	324
马鲛鱼(mg/100 g) (scomberomorous nipponia)	1.60	1.80	23.40	59.3

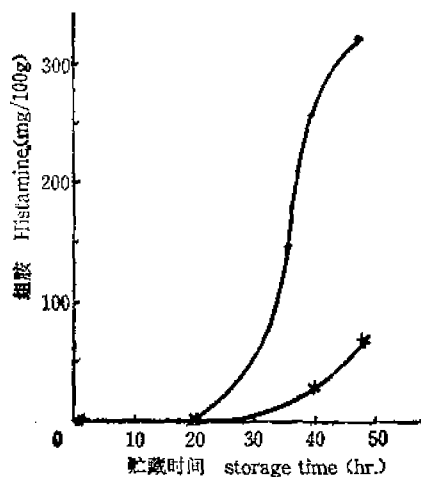


图2 鲈鱼、马鲛鱼在25°C(烘箱)贮藏组胺形成曲线  
Fig 2 Forming curves of histamine as mackerel and scomberomorus niphonia kept in 25°C oven

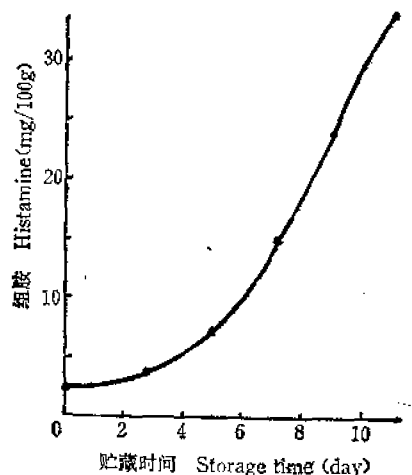


图3 鲈鱼0°C贮藏中组胺的形成曲线  
Fig 3 Forming curve of histamine as mackerel kept in 0°C

〔表3 鲈鱼0°C(冰箱)贮藏组胺的形成

Table 3 The formed Histamine as mackerel kept in 0°C ice-box

时间(日) Time (day)	0	3	5	7	9	11
鲈鱼 mg/100 g mackerel	2.8	3.4	7.0	15.2	24.0	33.9

马鲛鱼在25°C(烘箱)贮藏中组胺的变化结果列于表2中,其基点由于鲜度的影响也含有微量的组胺,但其变化与鲈鱼相比要缓慢得多,40小时只增加了12倍(相当于基点)。见图2。

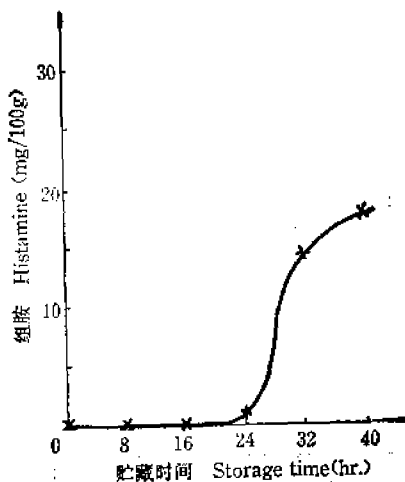


图4 马鲛鱼25°C(恒温箱)贮藏组胺的形成曲线  
Fig 4 Forming curve of histamine as scomberomorus niphonia kept in 25°C thermostat

马鲛鱼在 25°C(恒温箱)贮藏中组胺变化结果列于表 4 中, 由于鲜度较好基点无组胺检出, 而且组胺的形成也不是太快; 同样条件下贮藏的鳗鱼变化也较缓慢。

马鲛鱼在 0°C 贮藏中组胺变化结果, 由于鲜度较好, 基点几乎不含组胺, 11 天后其组胺变化也是很微小。

表 4 马鲛鱼 25°C(恒温箱)贮藏组胺的形成

Table 4 The formed histamine as scomberomorous niphonia kept in 25° thermostat

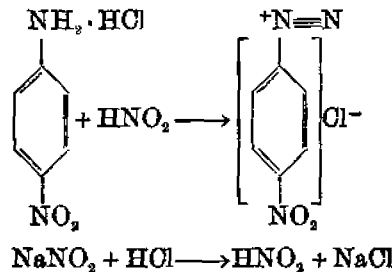
时间(小时)	0	8	16	24	32	40
马鲛鱼(mg/100 g)	0	0	0.56	0.60	13.9	17.8

## 讨 论

### 一、测定法的条件控制

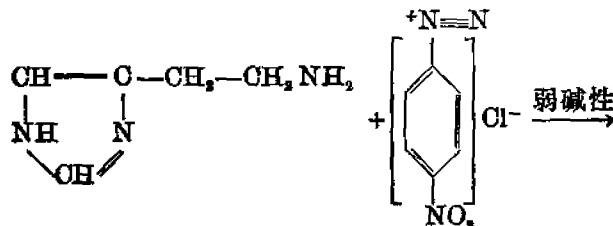
(a) 柱分离的条件: 根据离子交换树脂的分离原理, 即在一定的 pH 条件下, 对物质的交换能力的强弱有一定的选择性。在 pH = 4.6 情况下, 仅有组胺以阳离子形式参与交换的能力最强, 所以在上柱及交换的过程中都需严格控制 pH; 否则会引起交换过程中组胺的交换能力降低。同时在使用 pH 为 4.6 的 0.2 N 醋酸缓冲液洗涤柱子时, 应控制好其流速及用量, 一般流速在 3 ml/min, 用量在 100—120 ml 较佳。流速太大用量太少都不易将杂质除去; 流速太小, 用量太大则易将组胺洗下, 且时间也加长。

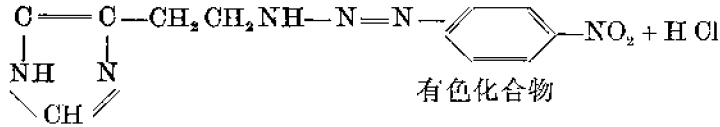
(b) 显色剂的配制条件: 当甲液和乙液混合时会发生下列反应:



这里应强调指出: 第一, 亚硝酸不能过量, 否则过剩的亚硝酸在显色时易与组胺作用, 发生放氮反应。第二, 盐酸要稍过量, 可防止重氮盐与未作用的对硝基苯胺产生偶合作用。为了防止亚硝酸钠的过量, 在配制时可用淀粉—KI 试纸测定。另外, 重氮盐不稳定, 必须置于冰浴中配制。

(c) 组胺显色时间的控制: 显色的过程实际是组胺与重氮盐的偶合过程。





由于生成的有色化合物要经过一段时间才能达到完全,而且该物质不稳定,为此,我们绘制了发色时间变化的动态曲线,实验结果如下:

表 5 E 与时间的变化

Table 5 The changes of E related to time

T(min)	3	5	9	13	15	20
E	0.425	0.455	0.465	0.465	0.460	0.457

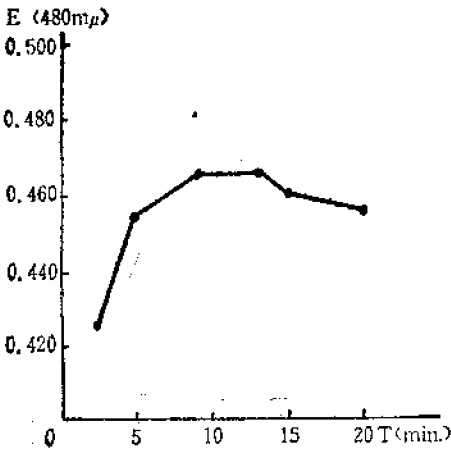


图 5 发色的动态曲线

Fig 5 Dynamic curve of color development

组胺量 (H) = 30 μg

波长 (wave length): 480 mμ

比色皿 (colour dish): 2 cm

从图 5 曲线中可以看出: 比色测定的最佳时间为 9~13 分。

## 二、贮藏实验的推论

(a) 我们从图 2 曲线可以看出: 在 25°C (烘箱) 较高温度贮藏下, 红色肉的鲐鱼其组胺的变化速度要比白色肉的马鲛鱼快得多, 白色肉的鳗鱼贮藏试验结果也表明组胺变化速度较慢。马鲛鱼贮藏于 25°C (烘箱) 条件下 48 小时以后其组胺的含量仅为 59.3 mg/100 g, 故不必担心其组胺的形成速度是否大于鱼肉的腐败速度。而同样温度下贮藏的鲐鱼 48 小时后其组胺含量竟高达 324 mg/100 g, 这说明在较高温度下贮藏红色肉鱼类, 以组胺含量作为质量指标比以其他指标来评价质量更为合理。目前国内这类问题并没有得到重视, 故引起中毒的事故常有发生。

(b) 鲐鱼在 0°C 温度下贮藏的组胺形成速度较慢, 贮藏 11 天后其含量才达到 33.9 mg/100 g。故无须考虑其组胺的形成速度是否会超过腐败的速度。与 25°C (烘箱) 较高温度下贮藏的鲐鱼组胺形成速度相比要小得多。见图 2、3。因此, 在较低温度下保藏红色肉鱼类来防止组胺形成是确实可行的。贮藏温度的差异, 可以增减组胺的形成量。在较高温度下贮藏的红色肉鱼类的组胺形成必须引起高度重视。原因我们可以这样认为: 红色肉鱼类的肌肉较脆弱, 细菌易侵入, 且血红蛋白含量高, 以及嗜温性微生物比嗜冷性微生物对组氨酸的作用能力强, 微生物本身的组氨酸脱羧酶在较适宜的温度下活力较强而造成的。另外, 白色肉鱼类的实验结果也表明: 温度的差异也会引起贮藏中组胺形成量的增减。

(c) 从图 2 和图 4 可以看出, 不同鲜度的同一种鱼类, 在相近的温度下贮藏, 由于鱼体污染程度及组胺含量的基点不同, 组胺的形成情况也有区别。在 25°C (恒温箱) 贮藏的马鲛鱼较为新鲜, 组胺形成较慢, 在 25°C (烘箱) 贮藏的马鲛鱼, 由于鲜度的影响, 组胺的形

成相对较快。它的规律是鱼类鲜度的降低会导致组胺形成的加速。这是与鱼体中易产生组胺微生物的污染程度有关。

通过这些实验我们认识到：在生产实际中，对于红色肉鱼类来说，根据其贮藏温度及时间条件，可以推算出组胺含量，判断质量情况，以及尽快诊断组胺中毒，有着一定的实用价值。

### 参 考 文 献

- [1] 辽宁省卫生防疫站, 1978. 常见毒物分析. 辽宁人民出版社.
- [2] 伍汉霖等, 1978. 中国有毒鱼类和药用鱼类. 上海科学技术出版社.
- [3] 河端俊治等, 1960. イオン交換樹脂 (Amberlite CG-50) によるヒスタミンの簡易定量法. 日本水产学会志, 26(12):1188-1191.
- [4] 清水亘、日引重幸, 1955. 水产物の腐敗に関する研究—XX, 魚種による腐敗の相違についての考察(3), 自己消化の影響. 日本水产学会志, 21(4):267-270.
- [5] Ritchie, A. H. and I. M., Mackie, 1980. The formation of diamines and polyamines during storage of mackerel (*Scomber scombrus*). Torry Institute, England.

## FORMATION OF HISTAMINE IN STORED MACKERELS AND THE METHOD OF MEASUREMENT

Yu Luli, Huang Jinling and Zhang Limin

(Shanghai Fisheries University)

**ABSTRACT** The formation of histamine in mackerel and other species of fish during different conditions of storage was studied. The content of histamine in fish was measured colorimetrically by using azo-reagent as colour developer after samples were pretreated with iron exchange resin. The pretreatment possesses the advantages of high recovery and easy operation. The experimental results showed that the formation rate of histamine increased with the rise of storage temperature. At 0°C storage the rate of formation greatly slowed down. Based on the temperature of storage and time, the histamine content can be computed. It is therefore applicable to evaluate the quality of fish, and the accidental toxication by histamine might be avoided accordingly.

**KEYWORDS** histamine, mackerel, Azo-reagent