

沈东旭, 张海红, 唐志海. 液相色谱-质谱联用法快速测定腌桂花中 6 种生物胺[J]. 环境化学, 2015, 34(10): 1969-1972

ThermoFisher
SCIENTIFIC

液相色谱-质谱联用法快速测定腌桂花中 6 种生物胺

沈东旭 张海红 唐志海

(苏州市吴江区疾病预防控制中心, 苏州, 215200)

摘 要 建立了腌桂花中腐胺、尸胺、组胺、苯乙胺、酪胺、色胺等 6 种生物胺含量的液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 检测方法. 样品用乙腈水溶液 (8:2, V/V) 提取, 经过 Carb 柱净化后采用 LC-MS/MS 进行分析. 选择 Thermo Synchronis HILIC (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 作为分析柱, 乙腈和水溶液 (10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵和 0.1% 甲酸) 作为流动相进行梯度洗脱. 结果显示, 腐胺的线性范围为 10—250 ng·mL⁻¹, 其余 5 种生物胺的线性范围为 5.0—250 ng·mL⁻¹, 相关系数 (r^2) 均大于 0.99. 6 种生物胺的检出限 (LODs) 范围为 20—40 μg·kg⁻¹, 定量 (LOQs) 范围为 50—100 μg·kg⁻¹. 在 200、500、800 μg·kg⁻¹ 的 3 个添加水平下, 6 种生物胺的回收率范围为 74.5%—121.5%, 相对标准偏差 (RSDs) 范围为 3.0%—8.2%. 此方法灵敏度高且前处理简单, 能满足腌桂花中生物胺的检测要求.

关键词 液相色谱-质谱, 腌桂花, 生物胺.

桂花历来是一些食品和菜肴的天然香料, 可以用来泡茶, 制桂花糖藕等, 但是桂花娇嫩, 不易储存, 采下时间长就变色变味. 在江浙一带, 通过将桂花浸润在一种植物的果实“长枳”的汁水中, 并加入少量糖或者盐, 做成腌桂花, 就能保持桂花的香气和色泽一年以上. 桂花营养价值丰富, 富含各种氨基酸, 其中必需氨基酸占 40% 左右^[1]. 但是, 在腌制过程中, 部分氨基酸容易脱羧或醛和酮的胺化和转氨基作用形成相应的生物胺. 常见的 6 种生物胺的结构特征及其前体见表 1.

表 1 6 种生物胺的前体物质

结构特征	生物胺	前体
杂环化合物	组胺	组氨酸
	色胺	色氨酸
芳香族化合物	苯乙胺	苯丙氨酸
	酪胺	酪氨酸
脂肪族化合物	尸胺	赖氨酸
	腐胺	鸟氨酸

生物胺是一类具有生物活性含氮的低分子量有机化合物的总称, 微量生物胺是生物体 (包括人体) 内的正常活性成分, 具有重要的生理功能, 如促进 DNA、RNA 和蛋白质的合成, 促进机体生长等, 但是当人体摄入过量生物胺时, 会引起诸如头痛、恶心、血压变化等过敏反应. 2011 年 9 月, 欧洲食品安全局 EFSA 发布了关于发酵食品中生物胺的研究报告, 其中对生物胺的毒性做出了明确的说明, 组胺一餐摄入 75—300 mg 时会导致头疼等中毒征兆, 摄入超 400 mg 会危及生命健康; 过多摄入酪胺、苯乙胺、色胺会导致高血压. 因此, 对食品中的生物胺进行风险监控十分必要.

目前, 生物胺检测方法主要有离子色谱法^[2]、高效液相色谱法^[3-5]、气相色谱-质谱法^[6-7]、液相色谱-质谱法^[8-10]、毛细管电泳法^[11-12]等. 离子色谱分析时间长; 高效液相色谱法和气相色谱法都需要柱前衍生, 衍生条件比较苛刻, 操作繁琐, 不利于样品的快速测定. 液相色谱-质谱法中, 生物胺可以不经衍生, 直接测定, 而且 MRM 模式抗干扰能力强, 灵敏度高.

腌桂花作为一种地方特色食品, 相关研究很少, 对其中生物胺的检测未见文献报道. 本实验中, 建立了腌桂花中 6 种生物胺 (腐胺、尸胺、组胺、苯乙胺、酪胺、色胺) 的检测方法. 用乙腈水溶液提取, 提取液通过 Carb 固相萃取小柱除去色素等杂质后, 使用 LC-MS/MS 分析, 无需衍生, 无需浓缩离心等操作, 实现了生物胺的快速测定.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Thermo TSQ Quantum Access MAX 串联三重四极杆质谱仪, 配 Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); IKA Lab Dancer S25 均质器 (德国 IKA 公司); Milli-Q 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司); Supelclean ENVI

Carb SPE 固相萃取小柱(0.5 g, 6 mL)(美国 Supelco 公司); 0.22 μm 有机滤膜(安谱公司)。

腐胺(Putrescine, PUT)、尸胺(Cadaverine, CAD)、组胺(Histamine, HIS)、苯乙胺(Phenylethylamine, PEA)、酪胺(Tyramine, TYR)、色胺(Tryptamine, TRP)均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度不小于 99%; 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 甲酸铵(色谱纯, 阿拉丁)。

1.2 标准溶液的配制

分别称取 6 种生物胺标准品各 10 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶解, 配成 1 g·L⁻¹ 的标准储备液, 密封保存于 4 °C 冰箱中。准确移取 1 g·L⁻¹ 的 6 种单标准储备液各 1 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸定容配制成 10 mg·L⁻¹ 的混合标准溶液。使用前用乙腈水(8:2, V/V) 将混合标准溶液稀释成系列浓度标准溶液。

1.3 样品前处理

准确称取 5.0 g 样品于 50 mL 高速离心管中, 加入 20 mL 乙腈-水溶液(8:2, V/V), 涡旋混匀 3 min, 取 6 mL 上层清液过 Carb SPE 固相萃取小柱, 前 4 mL 流出液作为小柱活化试剂并弃去, 保留剩余流出液。取流出液 1.0 mL 过 0.22 μm 有机滤膜至进样瓶中, 供仪器测定。

1.4 仪器条件

色谱柱: Thermo Synchronis HILIC(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈(A)-10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵和 0.1% 甲酸混合水溶液(B), 梯度洗脱, 洗脱程序为: 0—1.0 min, 80% A; 1.0—1.5 min, 80%—40% A; 1.5—6.0 min, 40% A; 6.0—6.5 min, 40%—80% A; 6.5—9.5 min, 80% A。进样体积: 5 μL ; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C

质谱条件: 离子源加热温度: 250 °C; 毛细管电压: 3500 V(正离子); 鞘气压力: 40 arb; 辅助气压力: 15 arb; 检测方式: 选择性离子扫描 SRM; 定量和定性离子对及碰撞能量等参数见表 2。

表 2 6 种生物胺的质谱检测参数

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	透镜电压/V	碰撞能量/eV
腐胺	89.2	72.4	50	6
尸胺	103.2	* 86.3/69.1	50	6/10
组胺	112.1	* 95.2/68.4	64	13/22
苯乙胺	122.2	* 105.2/79.4	55	11/23
酪胺	138.1	* 121.2/77.2	56	9/32
色胺	161.1	* 144.1/117.0	61	10/20

* 定量离子

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

生物胺是一类具有生物活性的小分子碱类化合物, 极性比较大, 需要使用离子对试剂如七氟正丁酸^[8]、全氟己酸^[13]等, 才能在 C18 固定相上形成保留, 但是离子对试剂的使用容易对仪器造成污染。实验中选用亲水作用色谱柱 HILIC 作为分离柱, 实现了 6 种化合物的分离和检测。不同于 C18 色谱柱, HILIC 的保留机理比较复杂, 包含氢键作用、偶极作用和静电作用等多种次级效应, 所流动相添加剂甲酸铵和甲酸的使用会对化合物的保留产生显著影响。当水相中不加入任何添加剂时, 6 种生物胺在 9.5 min 内没有明显的色谱峰出现; 当水相中加入 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵时, 腐胺和尸胺没有出峰, 其他 4 种生物胺在 9.5 min 内出现色谱峰; 当水相中加入 0.1% (V/V) 甲酸时, 6 种生物胺皆出峰, 并且信号强度提高了 3—10 倍, 但是没有在色谱柱形成有效保留; 当水相中同时加入 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵和 0.1% 甲酸时, 6 种生物胺在 1.5—3.9 min 内出峰, 并且信号强度与加入 0.1% 甲酸时接近, 部分化合物还有所提高。综合考虑, 实验中在流动相水中同时添加甲酸铵和甲酸, 既实现了生物胺在 HILIC 的保留, 又提高了检测灵敏度。

2.2 方法的线性范围和灵敏度

按“1.2”方法制备 10 mg·L⁻¹ 6 种生物胺标准储备液, 用乙腈-水(8:2, V/V) 稀释成 5、10、25、50、100、250 ng·mL⁻¹ 的系列标准溶液, 按“1.4”仪器条件进行测定, 外标法定量。以 6 种生物胺特征离子的质量色谱峰面积为纵坐标(y)、含量为横坐标(x), 权重 1/X, 绘制标准曲线。结果如表 3 显示, 腐胺的线性范围为 10—250 ng·mL⁻¹, 其余 5 种生物胺的线性范围为 5.0—250 ng·mL⁻¹, 相关系数(r^2) 均大于 0.99。

桂花由于富含氨基酸, 所以腌制过程中必然会产生生物胺, 但不是 6 种生物胺都含有。实验中通过两个样品对方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)进行评价, 其中样品 A(不含尸胺、组胺、苯乙胺、色胺)用于尸胺、组胺、苯乙胺、色胺的方法学验证, 样品 B(不含腐胺、酪胺)用于腐胺、酪胺的方法学验证。在样品中分别添加低浓度的标准溶液, 以信噪比(S/N) 大于 10 计算得到定量限(LOQ), 以信噪比(S/N) 大于 3 计算得到检出限(LOD), 结果见表 3, 6 种生物胺的 LODs 处于 20—40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间, LOQs 处于 50—100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间。

表 3 6 种生物胺的线性关系、检出限(LODs)和定量限(LOQs)

化合物	线性范围/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	线性方程	相关系数 r^2	LOD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
腐胺	10—250	$y = 1156x + 3048$	0.9962	40	100
尸胺	5—250	$y = 1394x - 4582$	0.9965	25	50
组胺	5—250	$y = 20992x - 76401$	0.9986	20	50
苯乙胺	5—250	$y = 18680x + 11301$	0.9979	20	50
酪胺	5—250	$y = 2182x + 512$	0.9976	25	50
色胺	5—250	$y = 12257x + 3901$	0.9972	20	50

2.3 方法的回收率与精密度

实验中分别在样品 A 和 B 中添加不同浓度的标准溶液(添加水平 200、500、800 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),按照“1.3”进行前处理,每个浓度重复 3 次.结果见表 4.从表 4 可看出,6 种生物胺在 200、500、800 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 3 种加标水平下的平均加标回收率分别为 74.5%—86.1%、84.3%—90.4%、80.2%—92.0%、86.4%—98.8%、95.1%—121.5%、102.3%—115.4%;相对标准偏差(RSD)分别为 3.5%—5.6%、4.5%—8.2%、3.0%—6.1%、4.2%—6.5%、3.5%—7.1%、4.5%—7.2%.方法的准确度与精密度可满足日常样品的分析要求.

表 4 6 种生物胺的平均加标回收率及相对标准偏差 RSD($n=3$)

化合物	加标 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		加标 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		加标 800 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
腐胺	74.5	5.6	84.8	4.1	86.1	3.5
尸胺	84.3	8.2	90.4	4.5	88.4	5.3
组胺	92.0	5.1	83.2	6.1	80.2	3.0
苯乙胺	86.4	4.2	98.8	6.5	90.5	4.8
酪胺	95.1	3.6	121.5	7.1	101.1	3.5
色胺	102.3	7.2	115.4	5.5	108.6	4.5

2.4 基质效应

基质效应在食品检测过程中普遍存在,当基质效应比较大时,需要使用同位素内标或者基质匹配曲线进行数据校正,其中同位素使用方便,校正效果好,但是价格昂贵,并且有相当一部分化合物没有同位素内标,需要专门定制,不易获得;基质匹配曲线校正效果也能符合方法确证要求,但是曲线绘制繁琐,需要处理大量阴性样品,而且当基质差别明显时,需要采用不同的基质匹配曲线才能得到满意的校正结果.因此,在日常检测中,我们尽可能通过提高样品前处理效率或者色谱分离效率来降低基质效应,从而采用标准溶液曲线进行校正,简便快捷.

通过在不同前处理阶段添加标准溶液来评价该方法的基质效应.样品 A 和 B 用于评价不同的生物胺.在 SPE 净化之后加标 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 得到样品 1,125 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合标准溶液为样品 2.样品 1 按照“1.3”进行前处理.样品 1 的响应除以样品 2 的响应得到的结果为基质效应.结果表明,基质效应数值在 85.1%—117.0%之间,说明基质效应比较小,样品前处理效率和色谱分离效率都比较高,可以采用标准溶液曲线.

2.5 实际样品的检测

在江浙农村地区收集了 15 份腌桂花样品进行分析.结果显示,6 种生物胺均有检出,其中腐胺和酪胺检出率最高,均为 86.7%,含量范围分别为 1.51—32.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 2.70—15.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;苯乙胺检出率为 53.3%,含量范围 0.07—1.25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;尸胺检出率为 40.0%,含量范围 0.20—2.50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;色胺检出率为 33.3%,含量范围为 0.11—1.55 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;危害性最大的组胺检出率最低,只有 1 个样品检出,且含量很低,为 0.12 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

3 结论

本文用乙腈水溶液作为提取试剂,经过 Carb 柱净化后采用 LC-MS/MS 分析,结果显示,6 种生物胺的检出限范围为 20—40 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,定量限范围为 50—100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.在 200、500、800 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 加标回收率为 74.5%—121.5%.相对标准偏差为 3.0%—8.2%.方法简便快捷,回收率稳定,基质效应小,可用于腌桂花中生物胺含量的日常检测.

参 考 文 献

- [1] 叶诚,张霖,王鹏,等.不同品种桂花氨基酸及微量元素含量比较研究[J].食品工业,2013,34(6):203-205
 [2] 李刚,方团团,胡忠阳,等.离子色谱法测定环境水样中腐胺、尸胺、组胺、精胺、亚精胺[J].环境化学,2014,33(5):868-869

- [3] 食品中生物胺含量的测定, GB/T 5009.208-2008
- [4] Chen G, Liu J, Liu M, et al. Sensitive, accurate and rapid detection of trace aliphatic amines in environmental samples with ultrasonic-assisted derivatization microextraction using a new fluorescent reagent for high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1352: 8-19
- [5] Aflaki F, Ghoulipour V, Saemian N, et al. A simple method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography [J]. *Anal Methods*, 2014, 6 (5): 1482-1487
- [6] Hong J Y, Park N H, Oh M S, et al. Profiling analysis of biogenic amines and their acidic metabolites in mouse brain tissue using gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 940: 94-103
- [7] Almeida C, Fernandes J O, Cunha S C. A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer [J]. *Food Control*, 2012, 25 (1): 380-388
- [8] 丁涛, 吕辰, 柳函, 等. 高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱检测葡萄酒中 8 种生物胺 [J]. *分析测试学报*, 2014, 33 (1): 27-32
- [9] 吴云辉, 周爽, 徐敬明. 非衍生化液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 8 种生物胺 [J]. *色谱*, 2013, 32 (2): 111-116
- [10] Kenichihiro T, Yasuhiro I, Chiemi M, et al. Simple and sensitive analysis of histamine and tyramine in japanese soy sauces and their intermediates using the stable isotope dilution HILIC-MS/MS method [J]. *J Agri Food Chem*, 2014, 62 (26): 6206-6211
- [11] Elbashir A A, Krieger S, Schmitz O J. Simultaneous determination of polyamines and acetylpolyamines in human urine by capillary electrophoresis with fluorescence detection [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35 (4): 570-576
- [12] Vitali L, Valse A C, Azevedo M S. Development of a fast and selective separation method to determine histamine in tuna fish samples using capillary zone electrophoresis [J]. *Talanta*, 2013, 106: 181-185
- [13] 孙骥, 施瑛, 陈树兵, 等. 液相色谱-串联质谱法测定葡萄酒中 7 种生物胺含量 [J]. *理化检验-化学分册*, 2013, 49 (6): 697-700