

非衍生化-PriME净化的超高效液相色谱-串联质谱法 检测黄酒9种生物胺

高何刚, 林益炜, 高源, 徐来潮

绍兴市疾病预防控制中心理化与毒理科, 浙江 绍兴 312071

摘要: **目的** 建立非衍生化-PriME净化超高效液相色谱-串联质谱法测定黄酒9种生物胺。**方法** 黄酒样品采用PriME HLB固相萃取柱净化, 采用Waters XSelect HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 3 μm) 色谱柱分离, 采用电喷雾正离子电离、多反应监测模式进行质谱分析, 外标法定量。**结果** 本方法测定9种生物胺在2.0~500.0 μg/L浓度范围内, 线性关系良好 ($r \geq 0.996$), 检出限为0.1~0.2 mg/L, 定量限为0.3~0.6 mg/L。在加标浓度0.1、1.0 mg/L下, 回收率为83.5%~108.6%, 相对标准偏差为2.8%~8.7%。**结论** 非衍生化-PriME净化超高效液相色谱-串联质谱法可以实现黄酒中生物胺的快速定量检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 生物胺; 黄酒

中图分类号: R994.4 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2024) 01-0086-04

Determination of 9 biogenic amines in yellow rice wine by non-derivatization-PriME-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

GAO Hegang, LIN Yiwei, GAO Yuan, XU Laichao

Department of Physicochemical and Toxicology, Shaoxing Center for Disease Control and Prevention,

Shaoxing, Zhejiang 312071, China

Abstract: Objective To establish a non-derivatization-PriME-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of 9 kinds of biogenic amines in yellow rice wine. **Methods** Yellow rice wine samples were purified by PriME HLB solid phase extraction column purification, separated using Waters XSelect HSS T3 column (150 mm×2.1 mm, 3 μm), and qualified using multiple reaction monitoring mode, electrospray ion source positive ion and external standard method. **Results** There was a good linear relationship for the 9 kinds of biogenic amines at 2.0 to 500.0 μg/L ($r \geq 0.996$). The limit of detection was 0.1 to 0.2 mg/L, and the limit of quantitation was 0.3 to 0.6 mg/L. The spike recovery rate of 9 kinds of biogenic amines ranged from 83.5% to 108.6% at 0.1 and 1.0 mg/L, with relative standard deviations of 2.8% to 8.7%. **Conclusion** Non-derivatization-prime ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry can be used for the rapid quantitative detection of biogenic amines in yellow rice wine.

Keywords: ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; biogenic amine; yellow rice wine

生物胺是一类具有生物活性的含氮的低分子量有机化合物, 广泛存在于富含氨基酸和蛋白质的发酵食品中^[1]。食品中大部分生物胺是在加工和贮藏过程

中, 微生物释放的脱羧酶催化氨基酸形成的^[2]。过量摄入生物胺会引起头痛、心悸、腹泻、呕吐和水肿等, 甚至危及生命^[3-4]。黄酒以谷物为原料, 应用多种微生物共同作用酿造而成, 含大量蛋白质和氨基酸, 在发酵过程中容易形成大量生物胺。

目前文献报道的生物胺样品前处理方法主要有固相萃取法^[5]和液相萃取法^[6], 但过程较为繁琐, 样品基质效应较大。生物胺检测方法主要有高效液相

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2024.01.022

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划 (2021KY1162); 绍兴市级医药卫生科技计划项目 (2020A13055)

作者简介: 高何刚, 硕士, 高级工程师, 主要从事理化检验工作

通信作者: 徐来潮, E-mail: ghg0575@163.com

色谱法^[7]、高效液相色谱-质谱法^[8]和气相色谱法^[9]等,大部分需要对生物胺进行衍生化处理,以减小极性,有利于在色谱柱上的分离,但操作繁琐耗时,且样品中的蛋白质、氨基酸会造成一定程度的干扰。本研究拟建立一种非衍生化方法检测黄酒中的9种生物胺,样品前处理采用PriME HLB小柱净化,步骤简单,再对净化液进行稀释以降低基质的影响,最后采用超高效液相色谱-串联质谱法检测待测物。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

色胺(纯度97.5%)、β-苯乙胺(99.5%)、腐胺(99.0%)、尸胺(98.0%)、组胺(99.44%)、章鱼胺(99.38%)、酪胺(99.5%)、亚精胺(98.9%)和精胺(98.9%)标准品均购于Dr.Ehrenstorfer GmbH;乙腈(色谱纯,德国Merck KGaK公司);乙酸(色谱纯,美国Anrqr Chemicals Supply公司);实验室用水为MilliQ超纯水。0.22 μm有机相针头式滤器(上海安谱实验科技股份有限公司);PriME HLB(美国沃特世公司);Q-Trap 6500+液质联用仪(美国SCIEX公司);振荡器(德国Heidolph公司);涡旋仪(JOANLAB公司);电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);离心机(美国Thermo Fisher公司);超声仪(浙江浙科仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

称取9种生物胺标准品各10 mg,置于10 mL容量瓶中,0.10 mol/L盐酸定容至刻度,得到1.00 g/L标准储备液,于4℃避光保存。分别取适量标准储备液于100 mL容量瓶中,0.1%乙酸溶液定容至刻度,稀释至浓度为1.0 mg/L的标准使用液。

1.2.2 样品前处理

吸取3.00 mL黄酒样品,过PriME HLB固相萃取柱,取1.00 mL滤出液,用0.1%乙酸溶液稀释至100 mL,取1.00 mL稀释液过0.22 μm滤膜后上机。

1.2.3 色谱条件

色谱柱为Waters XSelect HSS T3(150 mm×2.1 mm, 3 μm),流动相A:0.50%甲酸水溶液;流动相B:0.10%甲酸乙腈溶液,流速为0.30 mL/min,进样量为5.0 μL。梯度洗脱如下:0~1.0 min,10%B;1.0~4.0 min,10%B~90.0%B;5.0~6.0 min,100%B;5.0~6.0 min,100%B~10%B。

1.2.4 质谱条件

电喷雾正离子源(ESI⁺);多反应监测;离子源

电压:5 500 V;离子源温度:500℃;气帘气:35 psi;雾化气:65 psi;辅助加热气:55 psi。具体质谱参数见表1。

表1 多反应监测扫描模式的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters in multiple reaction monitoring mode

化合物	前体离子/ (m/z)	产物离子/ (m/z)	碰撞能量/ eV	去簇电压/ V
腐胺	89.2	72.3	23	12
		30.4	37	31
尸胺	103.1	86.2	14	27
		69.3	22	39
组胺	112.2	95.4	20	52
		68.7	30	52
苯乙胺	122.2	105.1	42	32
		77.1	30	19
酪胺	138.2	121.3	11	42
		77.3	38	42
亚精胺	146.3	112.1	11	56
		72.1	9	48
章鱼胺	154.2	91.4	27	8
		107.4	36	6
色胺	161.1	144.2	15	27
		115.1	43	27
精胺	203.2	129.1	16	78
		84.1	41	84

1.2.5 方法学指标评价

采用1.0 mg/L标准使用液配制2.0、4.0、10.0、50.0、500.0 μg/L浓度的系列标准溶液,上机检测。以目标化合物浓度为横坐标,峰面积为纵坐标建立标准工作曲线。分别以3倍和10倍的信噪比计算方法的检出限和定量限。黄酒样品分别加标0.1、1.0 mg/L生物胺做回收率试验,每个浓度进行6次平行试验,计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2 结 果

2.1 色谱条件优化

考察3种亲水性色谱柱Waters XSelect HILIC、Waters XSelect HSS T3和Dionex Acclaim Mixed Mode WCX的分离效果。9种生物胺通过Acclaim Mixed Mode WCX后的响应值偏低,不适合大比例稀释生物胺样本的检测;Waters XSelect HILIC上章鱼胺响应较差,亚精胺色谱峰前拖尾严重;Waters XSelect HSS T3可以较好地分离9种生物胺。见图1。

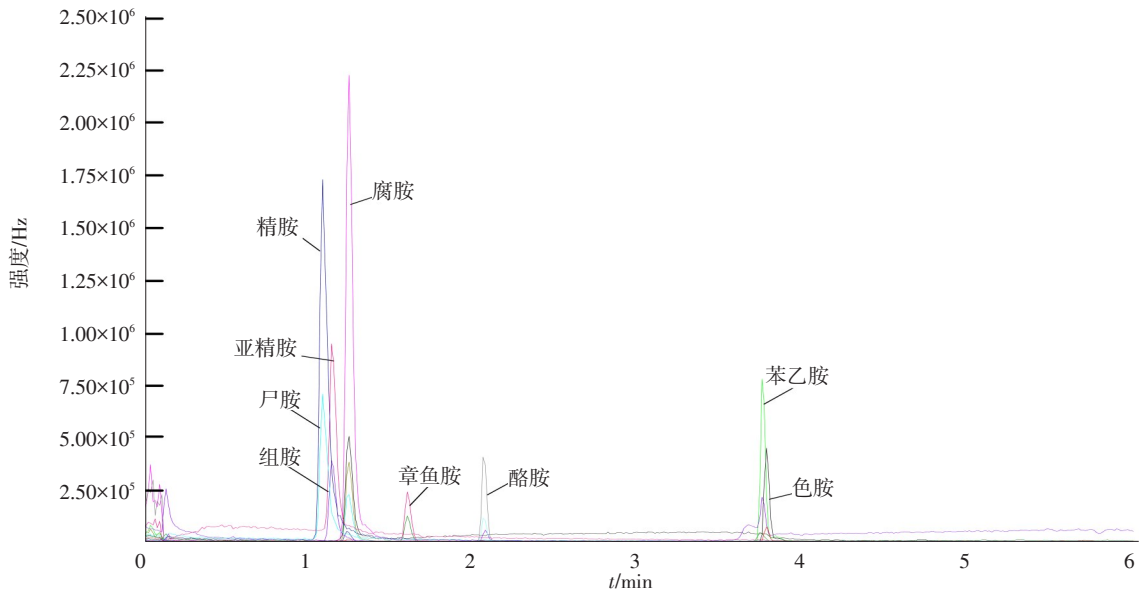


图 1 9 种生物胺标准品的色谱图

Figure 1 Chromatogram of standards of 9 biogenic amines

2.2 方法检出限和定量限

本方法测定 9 种生物胺在 2.0~500.0 μg/L 浓度范围内，线性关系良好 ($r \geq 0.996$)，检出限为 0.1~0.2 mg/L，定量限为 0.3~0.6 mg/L，满足黄酒中含量较低的生物胺的测定要求。见表 2。

表 2 9 种生物胺的线性关系、检出限和定量限

Table 2 Linearity, detection limit and quantification limit of 9 biogenic amines detected by this method

生物胺	线性方程	线性范围/ (μg/L)	r 值	检出限/ (mg/L)	定量限/ (mg/L)
腐胺	$y=21\ 303x+22\ 488$	2.0 ~ 500.0	0.996	0.2	0.6
尸胺	$y=9\ 658x+48\ 450$	2.0 ~ 500.0	0.998	0.2	0.6
组胺	$y=140\ 909x+360\ 178$	2.0 ~ 500.0	0.999	0.2	0.6
苯乙胺	$y=41\ 719x+54\ 558$	2.0 ~ 500.0	0.999	0.1	0.3
酪胺	$y=24\ 947x+8\ 189$	2.0 ~ 500.0	0.999	0.2	0.6
亚精胺	$y=97\ 262x+136\ 157$	2.0 ~ 500.0	0.996	0.2	0.6
章鱼胺	$y=17\ 487x+11\ 059$	2.0 ~ 500.0	0.999	0.2	0.6
色胺	$y=30\ 540x+33\ 852$	2.0 ~ 500.0	0.999	0.1	0.3
精胺	$y=112\ 069x-45\ 428$	2.0 ~ 500.0	0.997	0.2	0.6

2.3 方法回收率和精密度

9 种生物胺的回收率为 83.5%~108.6%，RSD 为 2.8%~8.7%，回收率和精密度良好。见表 3。

2.4 实际样品检测结果

按照本方法检测市售黄酒样品 20 份，均检出生物胺，其中酪胺和腐胺含量最高，腐胺为 0.6~27.7 mg/L，酪胺为 0.1~57.8 mg/L；色胺均未检出。

表 3 9 种生物胺加标回收率和精密度 (n=6)

Table 3 Spiked recoveries and precision of 9 biogenic amines (n=6)

生物胺	本底值/ (mg/L)	回收率/%		RSD/%	
		加标 0.1 mg/L	加标 1.0 mg/L	加标 0.1 mg/L	加标 1.0 mg/L
腐胺	11.4	83.5	92.1	6.7	8.2
尸胺	11.1	108.6	91.2	6.3	5.4
组胺	2.6	107.6	87.6	6.7	3.2
苯乙胺	0.8	106.9	91.2	5.6	8.7
酪胺	36.1	94.3	105.6	6.2	5.1
亚精胺	0.4	91.2	87.3	7.6	3.2
章鱼胺	0.6	92.3	105.6	4.6	5.7
色胺	—	94.5	87.9	8.2	2.9
精胺	0.3	95.2	106.3	3.1	2.8

3 讨论

本研究建立了同时检测黄酒中 9 种生物胺的超高效液相色谱-串联质谱法，生物胺不需要通过衍生，可直接检测。前处理固相萃取柱 PriME HLB 能吸附黄酒中的色素、氨基酸等杂质，既能去除干扰物，又能减少待测组分的损失，PriME HLB 将杂质吸附在柱子上，目标化合物通过柱子，避免上样、洗脱等繁琐操作步骤。采用液相色谱质谱联用法进行食品检测过程中，基质效应普遍存在^[10]。当基质效应较大时，需要使用同位素内标或基质匹配曲线进行数据校正，但生物胺的同位素内标不易获得，需要定制且价格昂贵，黄酒样品很难找到阴性样品，无法配制

(下转第 90 页)

```

end data .
compute p=1-CDF.CHISQ(x2,df).
format p (F8.3).
list.

```

表 3 χ^2 检验结果

项目	χ^2 值	ν	P值
Pearson χ^2	71.432	9	<0.001
似然比	73.739	9	<0.001
线性和线性组合	63.389	1	<0.001
有效案例中的 n	278		

表 4 相关分析结果

分析方法	r 值	渐进标准误差	近似 t 值	近似 P 值
Pearson	0.478	0.048	9.050	<0.001
Spearman	0.488	0.048	9.300	<0.001
n	278			

3 小结

卡方线性趋势检验除了上述介绍的方法外，常用的还有 Cochran-Armitage 检验和 Mantel-Haenszel χ^2

检验。Cochran-Armitage 检验是针对结局变量为二分类、分组变量为有序多分类变量资料的线性趋势分析方法，计算公式^[2]为 $Z = n^{1/2}r$ (n 为总例数， r 为 Pearson 相关系数)， $\nu=1$ ， Z 与 $\chi^2_{\text{回归}}$ 是等价的， $\chi^2_{\text{回归}} = Z^2$ 。Mantel-Haenszel χ^2 检验的计算公式^[1-2]为 $\chi^2_{\text{MH}} = (n-1)r^2$ ，与 $\chi^2_{\text{回归}}$ 的关系为 $\chi^2_{\text{MH}} = [(n-1)/n] \times \chi^2_{\text{回归}}$ ， χ^2_{MH} 比 $\chi^2_{\text{回归}}$ 略为保守， n 越大，两者越接近。Cochran-Armitage 检验和 Mantel-Haenszel 检验实际上只能分析列联表两分类变量的相关性，无法进一步分析是否为直线相关。双向有序、属性不同的 $R \times C$ 列联表资料的相关性分析还可采用 Spearman 秩相关分析方法，本文表 4 中给出了 Spearman 秩相关分析结果。

参考文献

[1] 孙振球, 徐勇勇. 医学统计学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016.

[2] 胡良平. 医学统计学: 运用三型理论分析定量与定性资料 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2009.

[3] 张文彤, 邝春伟. SPSS 统计分析基础教程 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2011.

(上接第 88 页)

基质匹配标准曲线。本研究采用过 PriME HLB，对滤出液稀释 100 倍后直接进样，降低了基质在单位体积内的含量，减少了基质对结果的影响，保证了检测结果的准确性。本方法操作简单，检测时间短，9 种生物胺检出限为 0.1~0.2 mg/L，检测的灵敏度和回收率均较高，能满足黄酒中生物胺的测定需求。

参考文献

[1] 邓浩, 尹青春, 谭高好, 等. 超高效液相色谱法 (UPLC) 测定猪肉中 9 种生物胺的高效液物胺含量 [J]. 食品工业科技, 2019, 40 (10): 253-257.

[2] TASSONI A, GERMANA M, BAGNI N. Free and conjugated polyamine content in Citrus sinensis Osbeck, cultivar Brasiliano N. L. 92, a Navel orange, at different maturation stages [J]. Food Chem, 2004, 87 (4): 537-541.

[3] 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.

[4] SPANO G, RUSSO P, LONVAUD-FUNEL A, et al. Biogenic

amines in fermented foods [J]. Eur J Clin Nutr, 2010, 64 (11): 95-100.

[5] 林瑶. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定食品中 5 种生物胺的方法建立 [J]. 预防医学论坛, 2022, 28 (11): 834-838.

[6] 张永茂, 唐会鑫, 李朔, 等. 酱油和醋中 8 种生物胺的高效液相色谱串联质谱法测定法 [J]. 职业与健康, 2022, 38 (14): 1898-1901.

[7] 闵盛, 孙群, 汪洋, 等. 高效液相色谱法测定畜禽肉中 8 种生物胺含量国家标准方法的改进 [J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58 (5): 607-611.

[8] 王璐, 孙小杰, 耿岳, 等. 非衍生化-QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鱼肉中 9 种生物胺 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14 (3): 269-276.

[9] 杨静, 王琨, 周元. 气相色谱-电子捕获检测器分析葡萄酒中的 8 种生物胺 [J]. 中国酿造, 2023, 42 (2): 228-234.

[10] 纪律, 李启, 李伟营, 等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定水中二氯喹啉酸残留 [J]. 预防医学, 2020, 32 (12): 1283-1286.

收稿日期: 2023-08-14 修回日期: 2023-11-30 本文编辑: 徐文璐