

## 非衍生化LC-MS/MS法分析食品中9种生物胺

Non-derivatation LC-MS/MS method for the analysis of nine biogenic amines in food

吴海军、程海燕、李立军、郭立海

SCIEX亚太应用支持中心，广州

### 引言

生物胺是一类低分子量的碱性含氮化合物，各种动植物组织中都含有少量的生物胺，对人体的调节核酸和蛋白质合成、生物膜稳定性方面有着非常重要作用。生物胺分为脂肪胺、芳香胺、杂环胺三大类。一般新鲜的非发酵制品生物胺含量较少，但发酵制品中，因不合理的环境卫生、食品加工工艺和食品储存手段导致生物胺含量非常高。食用高含量生物胺的制品会引起红疹、高血压、呕吐等过敏性中毒。常见生物胺引起食品安全问题主要发生在调味品、发酵香肠、米酒、啤酒、奶酪等发酵食品、肉类及其制品和水产品及其制品等中。因此，很多国家的标准把生物胺的含量作为食品新鲜程度的判断依据之一。



### 目前分析检测生物胺过程中的问题

1. 生物胺化合物缺少发色基团，本身既无紫外吸收又无荧光及电化学活性，使得常规分析测定比较困难。
2. 目前GB 5009.208-2016的液相色谱法和分光光度计法都须采用衍生化法完成。但是，衍生化常常操作繁琐复杂，衍生条件严格，衍生产物不稳定，方法重现性较差。
3. GB 5009.208-2016 方法分析检测时间较长，需要35 min，商业化时间成本较高。

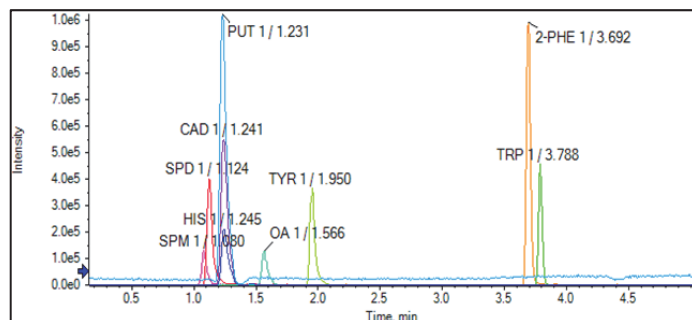


图1. 9种非衍生化生物胺的XIC图。

### 本文实验方法的优势和特点

1. 本方法无须衍生化，节省前处理的成本，方法重现性好，大大降低前处理的实验成本和实验误差；
2. 分析时间短、抗基质干扰能力强，5 min完成一次检测（见图1）；
3. 浓度范围为0.1-100  $\mu\text{g/L}$ ，具有良好的线性相关性， $r$ 均大于0.99，此实验方法检出限远远可以满足国家标准；
4. 在低、中、高三种浓度下，方法回收率均在82.5%~116%，CV（ $n=6$ ）均小于3.6%；
5. 提供一种快速简单、灵敏度高，重现性好的生物胺检测方法，该方法在食品检测领域有着重要的参考意义。

### 实验方法

#### 液相条件：

色谱柱：Waters UPLC HSS T3  $3.0 \times 100 \text{ mm } 1.8 \mu\text{m}$ ；

流动相：A相为0.5%的甲酸水，B相为0.1%的甲酸乙腈；

流速：0.3 mL/min；

柱温：40 °C；

进样量：5 µL；

洗脱程序：梯度洗脱；

- 称取0.5 g样本（酱、鱼类或肉），加入500 µL氨水，5 mL 去离子水，震荡30 s，再加入5 mL 乙腈和2 g NaCl。
- 震荡5 min，离心取上清液。加入400 mg C18、400 mg PSA，震荡、离心。
- 取1 mL上清液，加入100 µL甲酸，过膜上机。

### 质谱条件：

SCIEX Triple Quad™ 4500 离子源参数如表 1：

表 1. 正离子模式：ESI+

Parameter	Setting
Curtain Gas (CUR)	30
Ion Spray voltage (IS)	5500
Temperature (TEM)	550
Nebulizer Gas (GS1)	55
Heater Gas (GS2)	60

表 2 生物胺质谱参数

Compound	Abbr.	Q1	Q3	DP	CE
组胺	HIS	112.2	95.2	48	20
			68	48	30
尸胺	CAD	103.2	86	30	15
			69	30	22
精胺	SPM	203.1	129.1	55	25
			112.1	55	27
亚精胺	SPD	146	129.1	40	15
			112.1	40	19
苯乙胺	2-PHE	122.2	105.1	30	16
			77	30	35
酪胺	TYR	138	121	28	16
			77	28	34
色胺	TRP	161.2	144.1	50	18
			117.2	50	33
章鱼胺	OA	136	119	50	17
			91	50	44
腐胺	PUT	89	72.1	28	13

### 样品前处理过程

本实验前处理采用 QuEChERS 方法：

### 结果与讨论

#### 色谱条件的优化

采用不同色谱柱（Hilic、C18、T3）、不同流动相、定容液体系优化生物胺。实验发现生物胺中单胺（组胺、酪胺、苯乙胺、色胺）色谱行为良好，但是多胺类如精胺、亚精胺、腐胺、尸胺的色谱行为受酸度的影响较大（如图 2）。最终选用 T3 作为分析柱，流动相为 0.5% 甲酸水，0.1% 甲酸乙腈。且上机样本需保持一定的酸度。

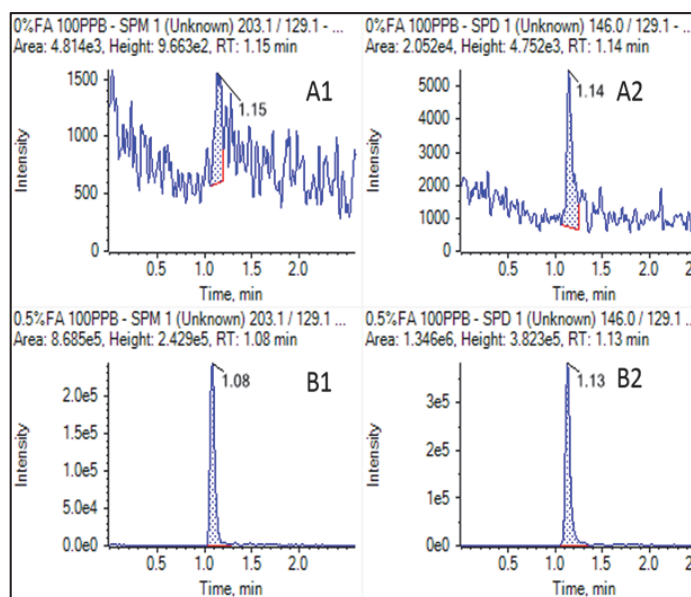


图2. T3色谱柱上精胺（SPM）、亚精胺（SPD）不同甲酸比列色谱图：A1为精胺纯水配置；B1为精胺0.5%甲酸水配置；A2为亚精胺纯水配置；B2为亚精胺0.5%甲酸水配置。

#### 线性范围

9 种生物胺在浓度为 0.1-100 µg/L 范围线性良好 ( $r > 0.99$ )，保证不同浓度水平样品的准确定量（见图 3）。

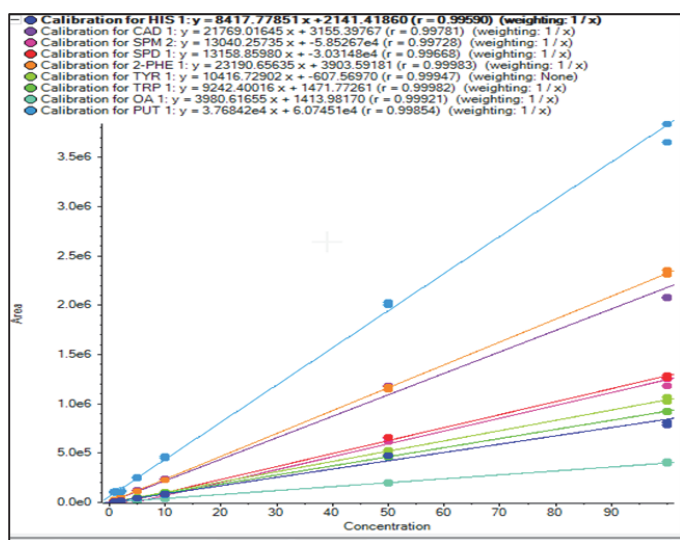
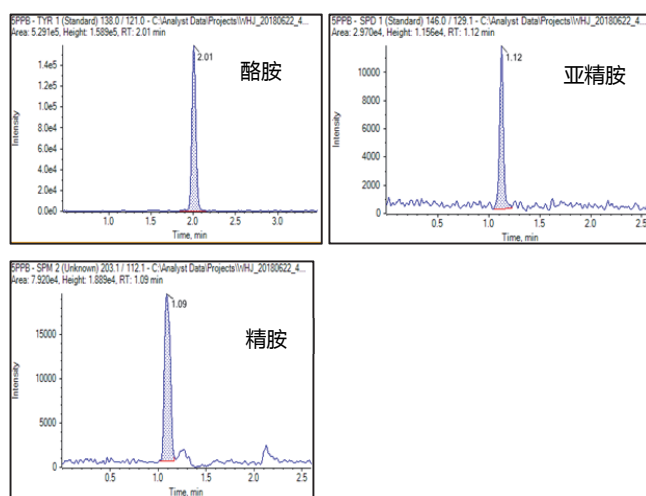
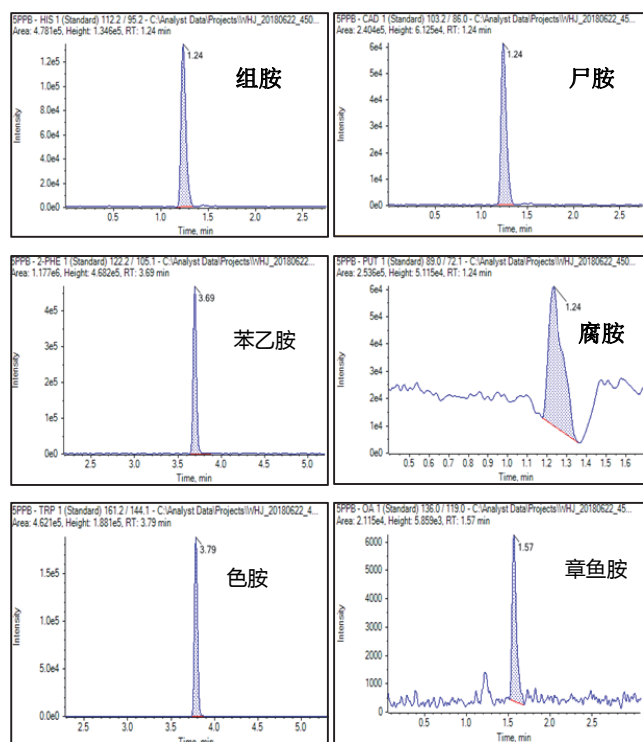


图3. 9种生物胺的标准工作曲线。

## 定量限

浓度为  $5 \mu\text{g/L}$  的 9 种生物胺化合物的色谱图 (见图 4)。目前在国标方法 GB 5009.208-2016 中生物胺最低检出限的要求  $20 \text{mg/kg}$ 。从下图 5 可以得出, 以  $5 \mu\text{g/L}$  检测浓度可折算成含量为  $0.1 \text{mg/kg}$ , 故此实验方法远远可以满足国家标准。

图4. 浓度为  $5 \mu\text{g/L}$  的 9 种生物胺的色谱图。

## 加标回收率和重现性

本实验在低、中、高三种浓度条件下测试回收率 (表 3), 结果显示在酱油样本中方法回收率均在  $82.5\% \sim 116\%$ , 相对标准偏差在  $3.6\%$  以内。因此, 该方法可用于监测生物胺含量。

表3. 9种生物胺的低、中、高添加水平实验。

	本底(mg/kg)	添加水平 (mg/kg)			回收率 (n=6, RSD%)		
HIS	1.67	1.5	3	15	82.5 (1.5)	96 (1.7)	91 (1.2)
CAD	3.75	4	8	40	83.7 (2.1)	85.6 (1.3)	98.6 (2.3)
SPM	0.32	0.5	1	5	114 (1.8)	90.6 (1.2)	107 (2.7)
SPD	3.34	3.5	7	35	108 (2.3)	94.7 (2.2)	89.8 (1.8)
2-PHE	5.12	5	10	50	95.6 (1.4)	105 (2.2)	94.7 (1.5)
TYR	4.25	4	8	40	98.5 (2.2)	93.7 (1.8)	116 (1.6)
TRP	2.34	2.5	5	25	91.3 (2.4)	105 (3.0)	93.8 (2.8)
OA	0.15	0.2	0.4	2	87.6 (2.2)	98.4 (1.8)	91.4 (1.9)
PUT	0.43	0.5	1	5	113 (3.6)	104 (3.1)	89.4 (2.6)

## 总结

1. 本文采用 SCIEX Triple Quad™ 4500 建立了非衍生化 LC-MS/MS 方法分析食品中的 9 种生物胺; 结果表明本实验方法分析速度快、检测灵敏度高、定量分析准确。
2. 本实验方法避免常用衍生化法的问题: 操作繁琐复杂, 衍生条件严格, 衍生产物不稳定, 方法重现性较差。大大降低前处理的实验成本和实验误差。
3. 本实验方法远远满足国标 GB 5009.208-2016 的最低检出限, 因此, 本实验方法在检测食品中生物胺方向有着重要的参考意义。

## 参考文献

1. Rahul S. Pawar, Erich Grundel, Ali Reza Fardin-Kia, Jeanne I. Rader; determination of selected biogenic amines in *Acacia rigidula* plant materials and dietary supplements using LC-MS/MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 457-466, 2014.
2. Christine M. Mayr and Peter Schieberle; Development of Stable Isotope Dilution Assays for the Simultaneous Quantitation of Biogenic Amines and Polyamines in Foods by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (12), 3026-3032, 2012.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8460-ZH-A



### SCIEX中国公司

#### 北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

#### 上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

#### 广州分公司

地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX