

## 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

吴云辉<sup>1</sup>, 周 爽<sup>2</sup>, 徐敦明<sup>2\*</sup>

(1. 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361100;

2. 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建 厦门 361026)

**摘要:** 采用液相色谱-串联质谱技术建立了同时测定动物源性食品中组胺(HIS)、色胺(TRP)、2-苯乙胺(2-PHE)、腐胺(PUT)、尸胺(CAD)、酪胺(TYR)、亚精胺(SPD)和精胺(SPM) 8 种生物胺(BAs)的分析方法。样品用乙腈-甲酸水溶液提取,用强阳离子交换柱(MCX)净化。在不进行衍生化的条件下,采用亲水作用色谱(HILIC)柱、以 5 mmol/L 的乙酸铵溶液和甲醇为流动相分离 8 种生物胺。结果表明 8 种生物胺的线性范围为 0.001 ~ 100  $\mu\text{g/L}$  相关系数( $r^2$ )均大于 0.99。方法的检出限(LODs, 信噪比为 3)在 0.001 ~ 1  $\mu\text{g/kg}$  之间,定量限(LOQs, 信噪比为 10)在 0.003 ~ 5  $\mu\text{g/kg}$  之间。在 8 种基质中 3 个加标水平的回收率都在 73.9% ~ 106.3% 之间,加标含量范围为 0.003 ~ 50  $\mu\text{g/kg}$  相对标准偏差(RSD,  $n=6$ ) 在 5.65% ~ 18.6% 之间。方法的灵敏度和回收率高,选择性好,能满足日常动物源性食品检测工作的要求。

**关键词:** 液相色谱-串联质谱; 强阳离子交换柱; 净化; 生物胺; 食品

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)02-0111-06

## Determination of eight biogenic amines in animal-derived foodstuffs by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization

WU Yunhui<sup>1</sup>, ZHOU Shuang<sup>2</sup>, XU Dunming<sup>2\*</sup>

(1. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China; 2. Inspection and Quarantine Technology Center,

Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China)

**Abstract:** A method for the determination of histamine (HIS), tryptamine (TRP), 2-phenylethylamine (2-PHE), putrescine (PUT), cadaverine (CAD), tyramine (TYR), spermidine (SPD), spermine (SPM) in animal-derived foodstuffs was established using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The samples were extracted with acetonitrile-formic acid aqueous solution, and purified with strong cationic exchange (MCX) cartridge. Without derivatization, the eight biogenic amines (BAs) were separated by hydrophilic interaction chromatographic (HILIC) column with the mobile phases of 5 mmol/L ammonium acetate and methanol. The linearities were excellent in the range of 0.001 - 100  $\mu\text{g/L}$  with the correlation coefficients above 0.99. The limits of detection (LODs,  $S/N=3$ ) of the method were between 0.001  $\mu\text{g/kg}$  and 1  $\mu\text{g/kg}$ , and the limits of quantification (LOQs,  $S/N=10$ ) were between 0.003  $\mu\text{g/kg}$  and 5  $\mu\text{g/kg}$ . The recoveries of BAs spiked in eight matrices were between 73.9% and 106.3% at the spiked levels ranged from 0.003  $\mu\text{g/kg}$  to 50  $\mu\text{g/kg}$ . The relative standard deviations (RSDs,  $n=6$ ) were in the ranges of 5.65% - 18.6%. The method can meet the requirements of the daily work for the determination of BAs in animal-derived foodstuffs.

**Key words:** liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); strong cationic exchange (MCX) cartridge; purification; biogenic amine; food

生物胺(BAs)是一类具有生物活性的小分子碱性化合物,主要是由相应的氨基酸通过微生物的脱

\* 通讯联系人. Tel: (0592) 3269935, E-mail: Xudm@xmciq.gov.cn.

基金项目: 厦门市科技计划项目(3502Z20092009 和 3502Z20102013).

收稿日期: 2012-09-25

胺作用形成或由醛、酮类物质在氨基酸转氨酶作用下产生。生物胺根据其结构可分为 3 类: 脂肪胺(腐胺、尸胺、精胺、亚精胺), 芳香胺(酪胺、 $\beta$ -苯乙胺)和杂环胺(组胺、色胺); 根据其组成可分为 2 类: 单胺(酪胺、组胺、尸胺、 $\beta$ -苯乙胺、色胺等)和多胺(主要有腐胺、精胺和亚精胺)<sup>[1-3]</sup>。BAs 具有重要的生理功能, 如促进机体生长, 增强代谢活力与肠道免疫能力, 促进脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)和蛋白质的合成, 在消除自由基方面也有一定的作用。但过量摄入 BAs 可引起食物中毒, 其主要症状为恶心、呼吸困难、发热、头痛、皮疹及血压发生变化等。此外, 如果体系中存在亚硝酸盐, 则有可能生成亚硝胺, 而亚硝胺已经被证实可引发肝癌。BAs 中的组胺对人类健康的影响最大, 其次是酪胺, 而其他 BAs 的存在会增强组胺和酪胺的不良作用<sup>[4-7]</sup>。目前很多国家对食品中的 BAs 做了限量要求, 我国 GB 2733-2005 规定鲑鱼中的组胺含量应低于 1 000 mg/kg, 其他鱼类中组胺含量应低于 300 mg/kg; 美国食品药品监督管理局(FDA)规定水产品中组胺含量应低于 50 mg/kg, 其他食品中组胺含量应低于 500 mg/kg, 酪胺含量应低于 100 mg/kg; 欧盟规定鲭科鱼中组胺含量应低于 100 mg/kg, 其他食品中组胺含量不得超过 100 mg/kg, 酪胺不得超过 100 ~ 800 mg/kg。

目前, BAs 的测定方法有离子色谱法(IC)<sup>[8]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)<sup>[9]</sup>和毛细管电泳法(CE)<sup>[10, 11]</sup>等。由于 HPLC 几乎可以分离所有的有机化合物, 具有柱效高、分离效率高、分析速度快、灵敏度高、定量分析准确等优点, 因此, HPLC 在 BAs 的检测中最为常用。Saaid 等<sup>[12]</sup>采用丹磺酰氯柱前衍生、紫外检测法检测了包括鱼类及其制品、肉类、果蔬、果汁和大豆制品等 62 种食品中酪胺、腐胺、组胺、色胺和亚精胺的含量; 刘振锋等<sup>[13]</sup>以苯甲酰氯为衍生剂, 于波长 254 nm 处检测发酵豆腐制品中的 10 种生物胺; Ozdestan 等<sup>[14]</sup>以苯甲酰氯为衍生剂, 建立了一种快速、简便、可靠的检测红酒中 10 种生物胺的 HPLC 法, 并比较了苯甲酰氯和邻苯二甲醛(OPA)的衍生效果, 发现苯甲酰氯的衍生物在 4 °C 甲醇溶液中可保存 3 天, 且不需要使用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)处理样品; 杨锐等<sup>[15]</sup>采用异硫氰酸荧光素(FITC)作为柱前衍生试剂, 对酱油中的生物胺衍生化, 采用 HPLC 与激光诱导荧光检测器(LIFD)联用技术, 对衍生产物进行了检测; 玉澜等<sup>[16]</sup>以丹磺酰氯为衍生剂, 采用室温离子液体作为萃取、富集、衍生介质来测定黄酒中生物胺

的含量; 最近, 杨贤庆等<sup>[17]</sup>用 HPLC 优化了 8 种生物胺的衍生条件。可见近几年来生物胺的研究方法基本上都需要进行衍生化。这些检测技术都是将目标物进行衍生之后再进行检测, 操作繁琐, 重复性较差, 质量控制相对较难, 因此, 建立简单快速的生物胺的检测方法十分必要。本文采用液相色谱-串联质谱联用技术(LC-MS/MS)建立了同时测定 8 种生物胺的分析方法, 无需衍生, 操作简便, 灵敏度高, 添加试验和实际样品的分析结果证实该方法可行。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

液相色谱-串联质谱系统: Agilent 6460 超高效质谱仪配 1290 液相色谱(美国 Agilent 公司); IKA T18 Basic 均质器(德国 IKA 公司); 离心机(上海安亭科学仪器厂)。强阳离子交换(MCX)固相萃取(SPE)小柱(60 mg, 3 mL)(Waters 公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司), 氨水(分析纯, 25% NH<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich 公司); 中性氧化铝(100 ~ 200 目)(国药集团), 其他试剂均为分析纯, 实验用水为去离子水。

组胺(histamine, HIS)、色胺(tryptamine, TRP)、2-苯乙胺(2-phenylethylamine, 2-PHE)、腐胺(putrescine, PUT)、尸胺(cadaverine, CAD)、酪胺(tyramine, TYR)、亚精胺(spermidine, SPD)和精胺(spermine, SPM)标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司), 纯度均大于 99%。分别准确称取 8 种生物胺标准品各 10 mg(精确至 0.01 mg), 以去离子水为溶剂, 配制成 100 mg/L 标准储备液, 于 0 ~ 4 °C 保存。实验中根据需要进行稀释配制。

### 1.2 提取与净化

提取方法: 准确称取样品 1 g(粉末状样品(鱼粉))或 2 g(碎猪肉样品)至 50 mL 离心管中, 准确加入 10 mL 0.1% (v/v) 甲酸水溶液-乙腈(80:20, v/v)均质后加入 10 g 中性氧化铝, 涡旋, 于 4 000 r/min 离心机离心 3 min, 取上清液, 待用。

净化方法: 用 2 mL 甲醇、2 mL 去离子水活化 MCX 小柱后, 以 1 mL 2% (v/v, 下同) 甲酸水溶液过柱, 弃去流出液。将上述离心后的样品加入小柱内, 等样品完全吸附后, 再以 1 mL 2% 甲酸水溶液过柱, 弃去流出液, 用 5 mL 2% 氨水甲醇洗脱, 收集洗脱液氮吹至干, 用甲醇定容至 1 mL, 过 0.22  $\mu$ m 滤膜, 待用。

### 1.3 仪器条件

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱:亲水作用色谱(HILIC)柱(50 mm×2.1 mm, 2.6 μm, Phenomenex 科技);流动相:5 mmol/L 乙酸铵水溶液-甲醇(体积比为80:20,等度洗脱);流速:0.4 mL/min;进样量:5 μL;柱温:35 °C。

### 1.3.2 质谱条件

扫描方式:电喷雾正离子(ESI+)扫描;检测方式:多反应监测(MRM);辅助加热气:氮气,11 L/min;加热温度:300 °C;喷雾电压:3 500 V;定量和定性离子对、碰撞能量等参数见表1。

表1 8种生物胺的质谱检测参数  
Table 1 Parameters of MS/MS for the eight biogenic amines (BAs)

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor voltage/V	CE/eV	Dwell time/ms
Histamine	112.2	95.2*	110	15	50
		83.2	110	15	50
Cadaverine	104.2	60.1*	105	15	50
		45.2	105	22	50
Putrescine	89.2	45.3*	203	5	50
Spermine	141.2	98.1*	160	10	50
		84.2	160	8	50
Spermidine	146.3	112.2*	100	10	50
		72.2	100	15	50
2-Phenylethyl-amine	122.2	105.1*	85	10	50
		79.1	85	25	50
Tyramine	138.1	121.1*	100	8	50
		93.2	100	18	50
Tryptamine	161.2	144.1*	90	10	50
		117.2	90	10	50

\* quantitative ion. CE: collision energy.

### 1.4 添加回收试验

准确添加标准溶液于空白样品中使其含量分别为 HIS 0.2、1、10 μg/kg, CAD 0.003、0.01、0.1 μg/kg, PUT 0.03、0.3、3 μg/kg, SPM 0.15、0.5、5 μg/kg, SPD 0.15、0.5、5 μg/kg, 2-PHE 5、10、50 μg/kg, TYR 5、10、50 μg/kg, TRP 5、10、50 μg/kg。均质5 min,备用。按1.2节和1.3节方法操作,测定回收率,每个添加水平设6次重复。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的确立

在电喷雾正离子方式下对8种生物胺进行一级质谱分析(Q1扫描),得到分子离子,即母离子;对化合物的分子离子进行二级质谱分析(子离子扫描)得到碎片离子信息,即子离子(见图1);然后优化8种生物胺的二级质谱参数,使得特征碎片离子强度达到最大时为最佳,得到每种化合物的二级质谱图;按照二级质谱图提供的碎片离子信息,选择8种生物胺的定性和定量离子,其多反应监测谱图见

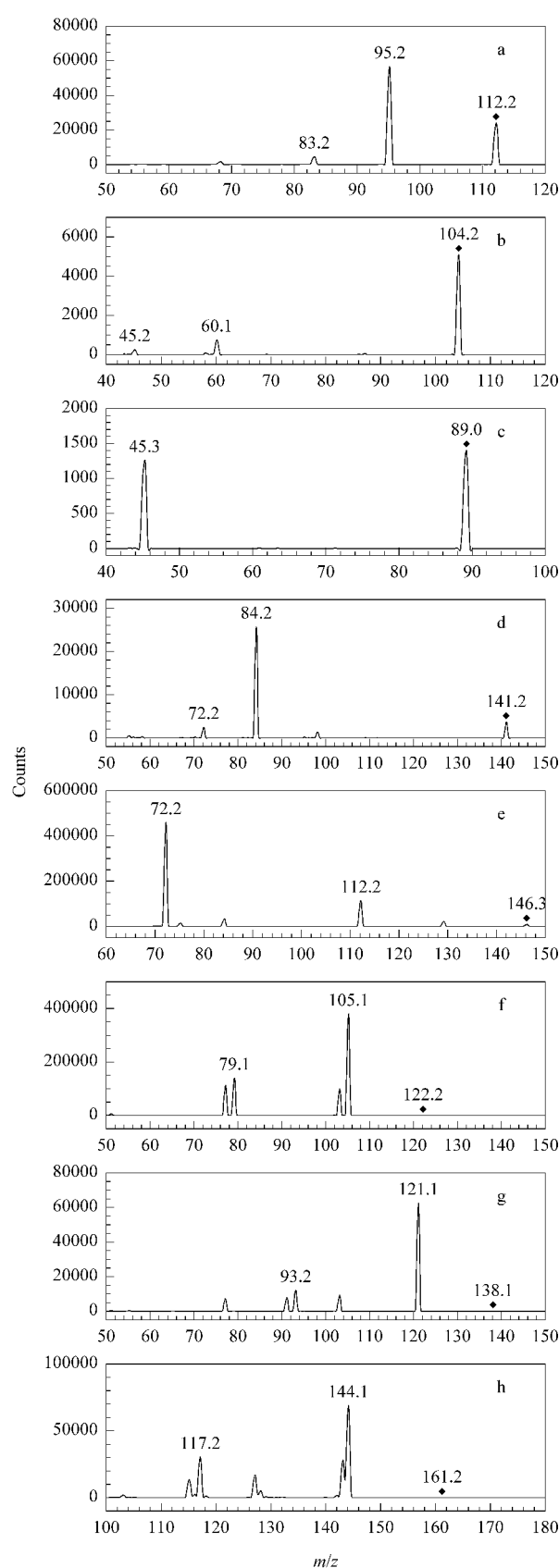


图1 8种生物胺的二级离子碎片扫描图

Fig. 1 Mass spectra of the eight BAs in product ion scan  
a. histamine; b. cadaverine; c. putrescine; d. spermine; e. spermidine; f. 2-phenylethylamine; g. tyramine; h. tryptamine.

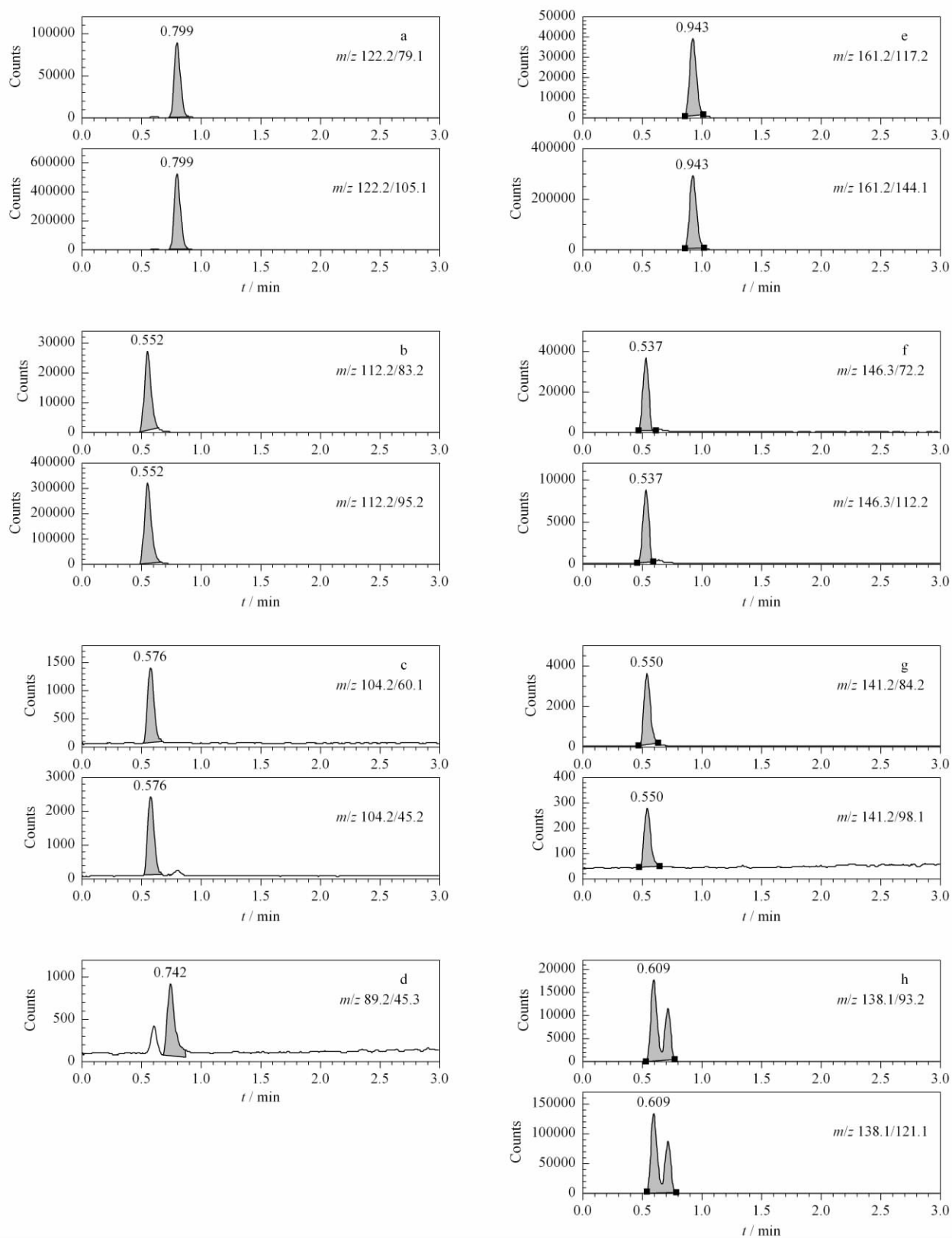


图 2 8 种生物胺的 MRM 色谱图(50 µg/L)

Fig. 2 Chromatograms of the eight BAs in MRM mode (50 µg/L)

a. 2-phenylethylamine; b. histamine; c. cadaverine; d. putrescine; e. tryptamine; f. spermidine; g. spermine; h. tyramine.

## 2.2 样品净化方法的选择

根据各种 SPE 小柱的特点和使用条件,对样品中的所有目标物进行净化。本文对比了弱阳离子交换柱 WCX, MCX 和 HLB 小柱的净化效果。净化方法为:用 2 mL 甲醇、2 mL 去离子水活化 SPE 小柱后,以 1 mL 2% 甲酸水溶液过柱,弃去流出液。将上述离心后的样品加入小柱内,等样品完全吸附后,再以 1 mL 2% 甲酸水溶液过柱,弃去流出液,并用吸耳球吹去剩余液体,再用 2.5 mL 2% 氨水甲醇洗脱两次,收集洗脱液氮吹至干,用甲醇定容至 1 mL,待用。

研究发现在猪肉、牛肉、鸭肉 3 种基质中,使用 MCX 小柱对 8 种生物胺的净化效果最好,空白加标回收率(8 种生物胺的平均值)在 95% 以上,WCX 柱次之,HLB 柱最差,见图 3。因此本文选择 MCX 小柱作为净化柱。

## 2.3 方法的线性关系及灵敏度

用标准溶液配制成工作液,使得各生物胺的质量浓度范围分别为:组胺 0.05 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,尸胺 0.001 ~ 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,腐胺 0.01 ~ 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,精胺 0.05 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,亚精胺 0.05 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,2-苯乙胺 1 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,酪胺 1 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,色胺 1 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。在 1.3.1 节色谱条件下,以质量浓度为横坐标,定量离

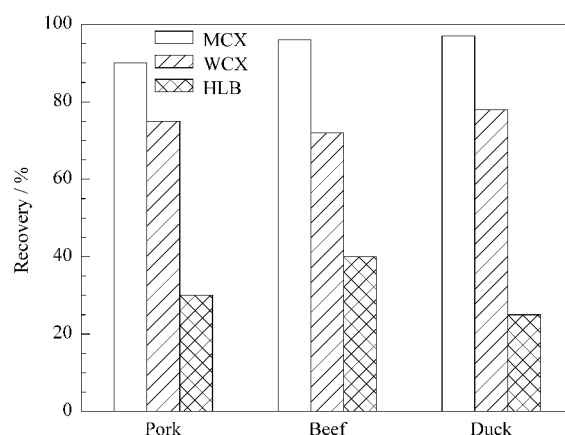


图 3 在 3 种不同的基质中生物胺分别用 WCX、MCX、HLB 小柱净化后的回收率

Fig. 3 Recoveries of the BAs in three different matrices purified with WCX, MCX, HLB cartridges separately

子对的峰面积为纵坐标建立标准曲线(见表 2)。由表 2 中数据可看出,各分析物的标准曲线的相关系数均大于 0.99,相关性好。

检出限(LOD)和定量限(LOQ)采用向空白样品中逐级降低加标浓度的方法来确定。以 3 倍信噪比( $S/N=3$ )对应的目标物含量作为检出限,以  $S/N=10$  对应的目标物含量作为定量限,获得目标物的检出限和定量限结果见表 2。

表 2 8 种生物胺的线性关系、检出限(LOD)和定量限(LOQ)

Table 2 Linear relationships, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) for the eight BAs

Compound	Linear range/( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	Linear equation	$r^2$	LOD/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Histamine	0.05 - 10	$Y = 49.32X + 17954$	0.9934	0.05	0.2
Cadaverine	0.001 - 1	$Y = 52.25X + 17171$	0.9944	0.001	0.003
Putrescine	0.01 - 1	$Y = 50.62X + 17833$	0.9962	0.01	0.03
Spermine	0.05 - 10	$Y = 47.60X + 18370$	0.9946	0.05	0.15
Spermidine	0.05 - 10	$Y = 47.28X + 18003$	0.9975	0.05	0.15
2-Phenylethylamine	1 - 100	$Y = 43.74X + 18507$	0.9922	1	5
Tyramine	1 - 100	$Y = 49.29X + 15605$	0.9982	1	5
Tryptamine	1 - 100	$Y = 51.08X + 14982$	0.9923	1	5

Y: peak area; X: mass concentration,  $\mu\text{g}/\text{L}$ .

## 2.4 方法的准确度和精密度

在猪肉、牛肉、章鱼、墨鱼、鲭鱼罐头、猪肉罐头、鸡肉、鸭肉等 8 种样品中进行 3 个水平的添加回收试验,每个浓度平行做 6 个重复试验。从空白样品与添加样品的谱图看,分析目标物与基体杂质分离很好,不受基体杂质干扰。在 8 种基质中每一种生物胺的回收率都在 73.9% ~ 106.3% 之间,相对标准偏差(RSD)在 5.65% ~ 18.6% 之间。该方法的回收率和 RSD 均符合残留分析要求。其中在猪肉中的

添加回收率及精密度结果见表 3,其他数据不一列出。

## 2.5 实际样品的检测

利用本研究建立的分析方法,对 100 个猪肉样品、50 个牛肉样品、40 个罐头样品和 10 个鱼类样品进行测定,其中有 28 个样品检出含有生物胺,其中罐头的检出率最高,检出含量为 1 ~ 50  $\text{mg}/\text{kg}$ ;新鲜猪肉和海鲜的检出率较低,检出含量为 0.01 ~ 5  $\text{mg}/\text{kg}$ 。

表 3 空白猪肉基质中 8 种生物胺的加标回收率和相对标准偏差 (n=6)  
Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the eight BAs spiked in pork matrix (n=6)

Compound	Spiked/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery/%	RSD/%	Compound	Spiked/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery/%	RSD/%
Histamine	0.2	81.2	15.2	Spermidine	0.15	87.3	14.2
	1	88.7	12.6		0.5	89.6	17.3
	2	95.2	11.5		1	91.3	8.96
Cadaverine	0.003	73.9	18.6	2-Phenylethylamine	5	88.4	8.77
	0.03	82.6	15.4		10	90.3	5.65
	0.3	88.7	8.62		50	95.1	7.63
Putrescine	0.03	85.6	17.3	Tyramine	5	90.3	10.3
	0.3	89.5	18.7		10	96.2	12.7
	3	96.3	12.6		50	95.3	8.93
Spermine	0.15	85.2	8.96	Tryptamine	5	88.5	18.3
	0.5	89.6	8.62		10	87.6	15.7
	1	90.3	7.25		50	106.3	10.4

### 3 结论

本文采用乙腈-甲酸水溶液提取,用强阳离子交换柱净化,建立了动物源性食品中生物胺的分析方法。利用建立的方法对 200 个样品进行了分析,各种生物胺检出率平均为 14%,新鲜动物食品的检出率较低,罐头等二次加工食品检出率较高,超标情况也较多。该法不需要衍生,灵敏度高,回收率良好,适用于动物源性食品中生物胺的测定。

#### 参考文献:

- [1] Li Z J, Wu Y N, Xue C H. Food and Fermentation Industries (李志军, 吴永宁, 薛长湖. 食品与发酵工业), 2004, 30(10): 84
- [2] Moret S, Smela D, Populin T, et al. Food Chem, 2005, 89: 355
- [3] Shalaby A R. Food Res Int, 1996, 29(7): 675
- [4] Onal A. Food Chem, 2007, 103: 1475
- [5] Feng Y R, Ma L Z. Meat Research (冯雅蓉, 马俪珍. 肉类研究), 2005(6): 25
- [6] Wang Y, Qiu F, Han B Z, et al. China Brewing (王颖, 邱璠, 韩北忠, 等. 中国酿造), 2011(10): 1
- [7] Zhang W, Li X Q, Lu R, et al. Food Engineering (张微, 李秀缺, 陆容, 等. 食品工程), 2007(4): 55
- [8] Jia L, Chen S C, Cao Y H, et al. Environmental Chemistry (贾丽, 陈舜琼, 曹英华, 等. 环境化学), 2008, 27(6): 823
- [9] Shakila R J, Vasundhara T S, Kumudavally K V. Food Chem, 2001, 75: 255
- [10] Qiao C D, Song P S, Yan X, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (乔成栋, 宋平顺, 严祥, 等. 分析化学), 2007, 35(1): 95
- [11] Sun X H, Yang X R, Wang E K. J Chromatogr A, 2003, 1005: 189
- [12] Saaïd M, Saad B, Hashim N H, et al. Food Chem, 2009, 113: 1356
- [13] Liu Z F, Wei Y X, Zhang J J, et al. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (刘振锋, 魏云潇, 张进杰, 等. 中国食品学报), 2010, 10(4): 253
- [14] Ozdestan O, Uren A. Talanta, 2009, 78: 1321
- [15] Yang R, Wang L, Liu X X, et al. Journal of Qiqihar University (杨锐, 王琳, 刘鑫鑫, 等. 齐齐哈尔大学学报), 2012, 28(2): 29
- [16] Yu L, Xie J Y, Lan J F. Journal of Anhui Agricultural Science (玉澜, 谢济运, 蓝峻峰. 安徽农业科学), 2012, 40(11): 6498
- [17] Yang X Q, Zhai H L, Hao S X, et al. South China Fisheries Science (杨贤庆, 翟红蕾, 郝淑贤, 等. 南方水产科学), 2012, 8(1): 49