

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定鲭鱼罐头中 9 种生物胺

LCMSMS-370

摘要： 本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用技术测定鲭鱼罐头中 9 种生物胺的方法。通过深度的方法优化，使用该方法分析 9 种生物胺，8 种生物胺线性相关系数均大于 0.9950，仅精胺因碱性过大，其线性相关系数为 0.9920。该方法测试的灵敏度高，各化合物仪器定量限在 1.01 $\mu\text{g/L}$ ~7.52 $\mu\text{g/L}$ 之间，大大高于常规液相色谱法的灵敏度。各化合物的峰形良好，精密度高，不同浓度水平的标准溶液连续进样 7 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.18% 和 5.76% 以下。本测试方法灵敏度高、分析简单、快速，可满足食品类样品中生物胺的检测需求。

关键词： 生物胺 三重四极杆质谱

生物胺 (Biogenic Amines, 简称 BAs) 是一类含氮碱性化合物，主要是由相应的氨基酸通过微生物的脱羧作用形成或由醛、酮类物质在氨基酸转氨酶作用下产生。根据其结构可分为脂肪胺 (腐胺、尸胺、精胺、亚精胺)、芳香胺 (酪胺、 β -苯乙胺) 和杂环胺 (组胺、色胺)。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 DNA、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。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。目前很多国家对食品中的 BAs 都有限量要求，我国 GB 2733-2005 规定鲑鱼中的组胺含量应低于 1000 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规定水产品中组胺含量应低 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。

目前，食品中 BAs 的检测方法主要有液相色谱法、毛细管电泳法、离子色谱法等，其中液相色谱是最常用的方法，但因该方法需要衍生处理，致使测试过程繁琐，灵敏度差，因此，建立一种准确、快速检测生物胺含量的方法具有重要意义。目前国家还没有使用液质联用系统测试生物胺的标准方法，本文使用岛津三重四极杆液质联用系统 LCMS-8045 建立测定鲭鱼罐头中 9 种生物胺的方法，该方法灵敏度高、简单、快速，能满足食品类生物胺的检测要求，可供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统，包括 LC-30AD \times 2(输液泵)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-20AC (柱温箱)，CBM-20A(系统控制器)，DGU-20A₅(在线脱气机)，LCMS-8045 (三重四极杆液质) 和 LabSolutions Ver 5.91。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH HILIC 2.1 mm I.D. \times 100 mm L., 1.7 μm

流动相：A 相 - 50 mM 乙酸铵水溶液 (乙酸调 pH=3)；B 相 - 乙腈 (0.5% 乙酸)

流速：0.40 mL/min

柱温：30 $^{\circ}\text{C}$

进样量：15 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始 B 为 60%。具体见下程序表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	55
0.80	Pumps	Pump T Flow.	0.40
0.90	Pumps	Pump T Flow.	0.60
1.00	Pumps	Pump B Conc.	15
1.15	Pumps	Pump T Flow.	0.60
1.20	Pumps	Pump T Flow.	0.70
2.00	Pumps	Pump T Flow.	0.70
2.05	Pumps	Pump T Flow.	0.60
2.80	Pumps	Pump B Conc.	15
2.85	Pumps	Pump B Conc.	60
3.00	Pumps	Pump T Flow.	0.60
3.10	Pumps	Pump T Flow.	0.40
5.00	Controller	Stop	

* 注：本梯度程序是在测试含有精胺的 9 种生物胺时使用，当生物胺中不含精胺时，建议提高有机相初始比例至 75%，提高 1.0-2.8 min 时间段有机相比例至 30%，降低最大流速至 0.6 mL/min，在保证灵敏度前提下，延长色谱柱的使用寿命。

质谱条件

离子化模式：APCI (+)

电晕针电压：见表 2

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 5.0 L/min

接口温度：350°C

碰撞气：氩气

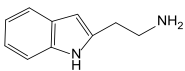
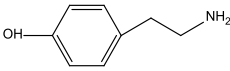
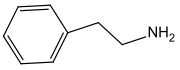
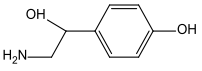
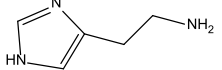
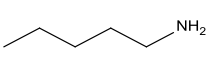
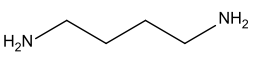
DL 温度：100°C

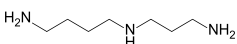
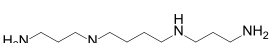
加热模块温度：300°C

驻留时间：12.0 msec

MRM 参数：见表 2

表2 BAs 质谱参数

No.	化合物 (简称)	CAS No.	结构式	前体 离子	产物 离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	电晕针 电压 (KV)
1	色胺 (TRP)	61-54-1		161.00	144.15* 117.15	-18 -26	-11 -24	-13 -28	3.0
2	酪胺 (TYR)	51-67-2		138.10	121.10* 77.10	-15 -20	-13 -29	-30 -28	3.0
3	苯乙胺 (PEA)	64-04-0		122.00	105.10* 77.10	-13 -22	-14 -30	-10 -28	3.0
4	章鱼胺 (OA)	104-14-3		136.10	91.10* 119.15	-15 -15	-18 -15	-16 -12	3.0
5	组胺 (HIS)	51-45-6		112.00	95.10* 68.15	-11 -19	-18 -22	-15 -24	0.2
6	尸胺 (CAD)	462-94-2		103.10	86.20* 69.20	-12 -11	-13 -16	-29 -11	3.0
7	腐胺 (PUT)	333-93-7		89.10	72.20* 30.20	-10 -11	-15 -22	-12 -29	0.2

8	亚精胺 (SPD)	124-20-9		146.10	72.15*	-10	-18	-11	3.0
					112.15	-16	-17	-25	
9	精胺 (SPM)	71-44-3		203.20	112.20*	-10	-18	-10	3.0
					129.20	-10	-14	-28	

备注：* 表示定量离子

1.3 标准配制及样品前处理

储备溶液：分别将浓度为 1000 µg/L 的各单标溶液 CAD、TYR、PUT、SPD、TRP、HIS、OA、SPM 和 PEA 混合，获得 100 µg/L 的生物胺混合储备溶液。

标准曲线：使用 95% 乙腈水溶液（含 1% 乙酸），将混合储备溶液逐级稀释，分别稀释成 2.0 µg/L、5.0 µg/L、10.0 µg/L、20.0 µg/L、50.0 µg/L、100 µg/L、200 µg/L、500 µg/L 的标准溶液。

样品前处理：将罐头中的鲭鱼肉粉末化，称取 0.5 g 于 15.0 mL 离心管中，加入 10.0 mL 0.1% 乙酸的乙腈水（V/V=50:50）溶液，涡旋振荡 1.0 min，然后加入 2.0 g 氯化钠，涡旋振荡 1.0 min，3500 r/min 离心 3.0 min，取上层清液于 10.0 mL 玻璃比色管，重复萃取 1 次，萃取液合并于比色管中，用乙腈定容至 10.0 mL，混匀。吸取 2.0 mL 萃取液于预先装有 100 mg PSA 和 100 mg C18 吸附剂的 2.5 mL 高速离心管中，涡旋 1.0 min，12000 r/min 离心 5.0 min，吸取 1.0 mL 上清液于 10.0 mL 玻璃氮吹管中，加入 100 µL 乙酸混匀，氮吹近干，加入 1.0 mL 95% 乙腈水溶液（含 1% 乙酸）溶解，过 0.22 µm PTFE 滤膜后上样测试。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

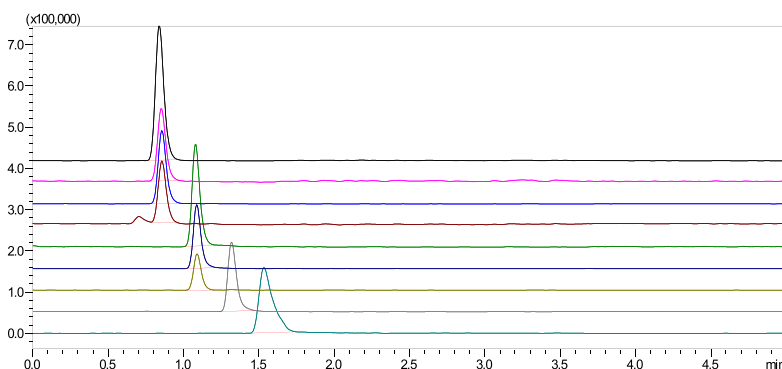


图 1 9 种生物胺 MRM 色谱图 (50.0 g/L)

2.2 线性关系

将浓度为 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 和 500.0 µg/L 校准溶液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线。在 9 种生物胺中，其中 8 种生物胺，在其相应浓度范围内线性良好，各化合物的线性相关系数均大于 0.995，线性回读准确度为 86.9%~115.5% 之间，仅有精胺因碱性过大的影响，在 10.0 µg/L~500.0 µg/L 线性范围内，线性相关系数为 0.9920，线性如图 2 所示。以 S/N=3 时对应的目标物含量为仪器检出限，以 S/N=10 时对应的目标物含量为仪器定量限，各化合物仪器定量限在 1.01 µg/L~7.52 µg/L 之间，校准曲线参数及仪器限值见表 3。

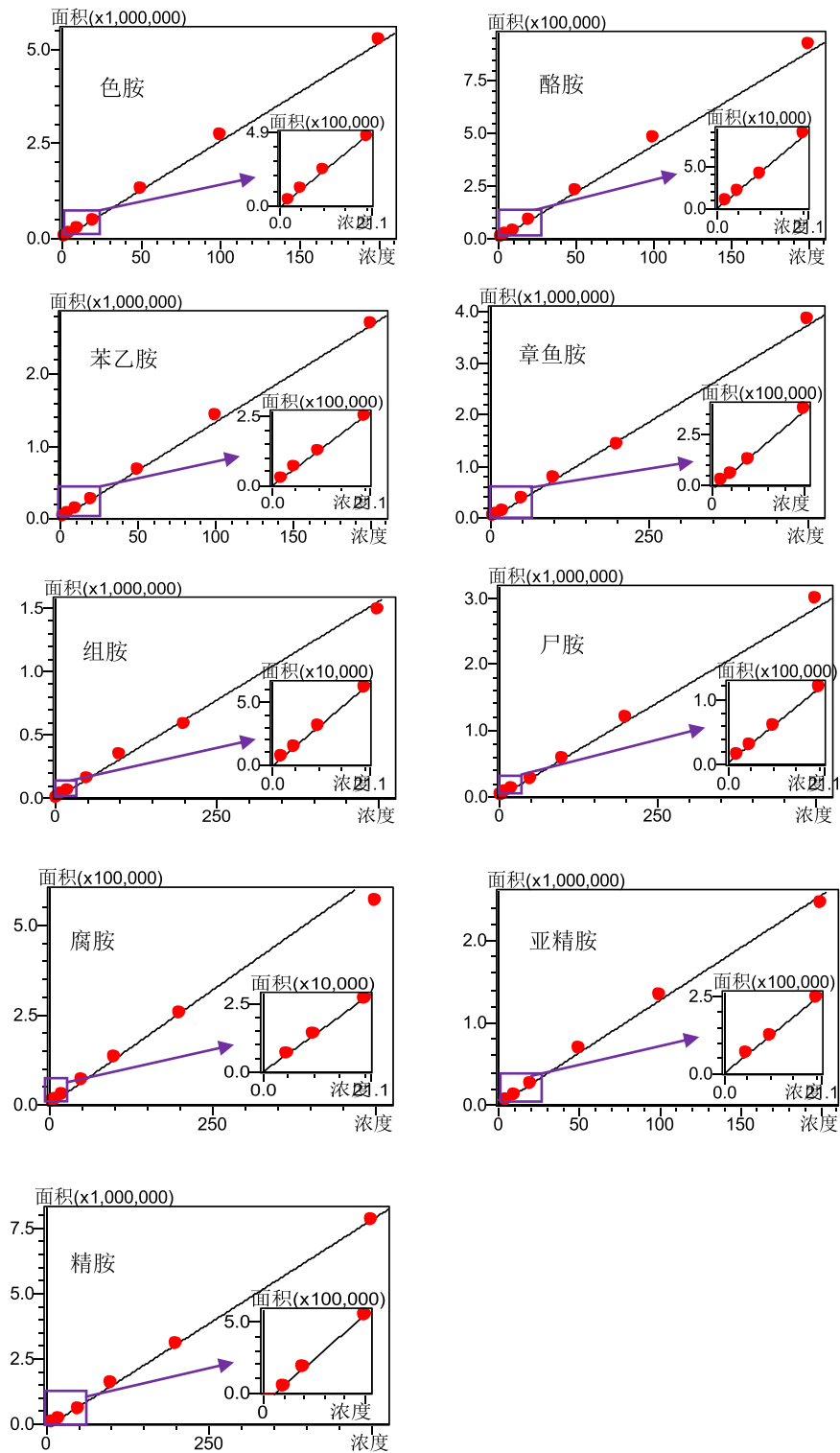


图 2 9 种生物胺校准曲线图

表 3 9 种生物胺校准曲线参数与仪器限值

No.	名称	校准曲线	线性范围 (mg/L)	准确度 (%)	相关系数 r	检出限 (g/L)	定量限 (g/L)
1	色胺	$Y = (4619.70)X + (-1123.95)$	2-200	91.5-104.8	0.9989	0.52	1.58
2	酪胺	$Y = (26499.6)X + (-17726.4)$	5-200	92.7-105.6	0.9991	1.41	4.23
3	苯乙胺	$Y = (13492.9)X + (-2996.04)$	2-200	92.2-104.8	0.9990	0.33	1.01
4	章鱼胺	$Y = (7906.64)X + (-15275.2)$	5-500	91.5-101.5	0.9990	1.61	4.90
5	组胺	$Y = (3104.47)X + (-820.781)$	2-500	95.5-112.6	0.9980	0.64	1.92
6	尸胺	$Y = (6703.41)X + (1564.09)$	2-500	87.0-115.5	0.9950	0.31	0.93
7	腐胺	$Y = (1342.63)X + (749.868)$	5-500	86.9-107.9	0.9960	0.22	0.66
8	亚精胺	$Y = (13589.2)X + (-12411.6)$	5-200	92.1-107.3	0.9980	0.61	1.83
9	精胺	$Y = (14151.6)X + (-59243.3)$	10-500	80.1-114.1	0.9920	2.48	7.52

2.3 柱头残留和 Carryover 考察

生物胺属碱性化合物，pKa 值大多大于 8.5，特别是精胺的 pKa 值更是达到了 9.5-11.6 之间，碱性化合物在金属或玻璃表面较容易发生吸附，因此很有必要对其进行残留考察。实验中发现，在梯度初始水相为 30% 时，精胺仍有柱头吸附残留，在调整梯度初始水相比比例为 40% 之后，有效地去除了柱头吸附残留。具体考察流程是：分析线性最高浓度（简称 ULOQ）后，再进“-1”（不进样，只走流动相），以验证是否有柱头残留；分析 ULOQ，并再次分析空白溶剂考察 Carryover。如图 3-5 所示，无柱头残留，无 Carryover。

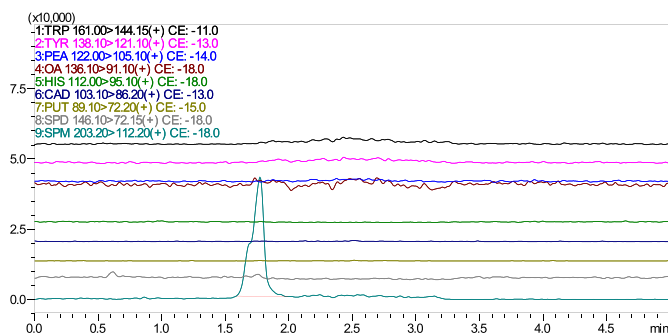


图 3 精胺柱头残留（初始水相为 30%）

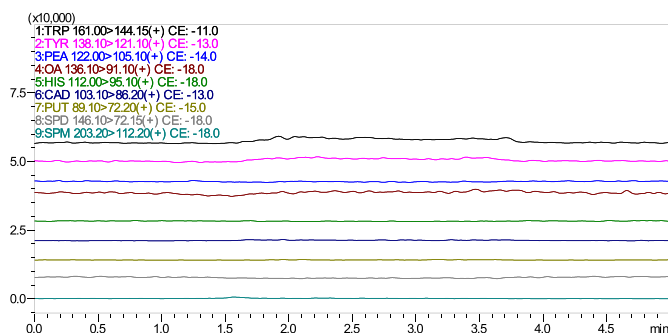


图 4 精胺无柱头残留（最终方法的初始水相为 40%）

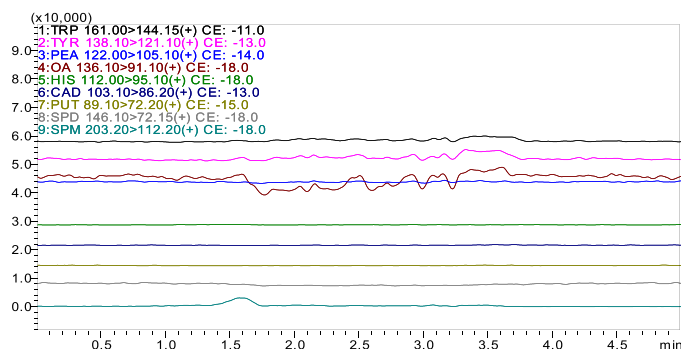


图5 Carryover 考察 (空白溶剂 MRM 色谱图)

2.4 精密密度

配制 9 种生物胺化合物的校准溶液，浓度分别为 20.0 mg/L、50.0 mg/L 和 200.0 mg/L，平行测试 7 次，考察仪器精密密度。结果显示，9 种生物胺化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02 ~ 0.18% 和 1.22 ~ 5.76% 之间，仪器精密密度良好。结果见表 4。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=7)

样品名称	RSD% (20.0 mg/L)		RSD% (50.0 mg/L)		RSD% (200.0 mg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
色胺	0.06	1.62	0.05	1.22	0.02	1.97
酪胺	0.10	3.43	0.08	2.84	0.04	1.46
苯乙胺	0.08	1.79	0.06	1.28	0.02	1.46
章鱼胺	0.05	3.44	0.06	1.39	0.04	1.66
组胺	0.11	3.85	0.11	3.37	0.13	3.13
尸胺	0.06	2.85	0.11	4.63	0.06	4.06
腐胺	0.09	4.06	0.07	4.82	0.07	2.35
亚精胺	0.06	4.24	0.12	4.04	0.07	3.83
精胺	0.19	5.76	0.18	5.12	0.18	3.15

2.5 样品测试

在按照 1.3 中的制样方法处理两个不同品牌 (简称 A 厂家和 B 厂家) 的鲭鱼罐头样品，获得样品溶液，按 1.2 分析条件上机测试，其测试色谱图如下图 6 和 7 所示，从分析色谱图上看，在鲭鱼罐头中，9 种生物胺中的色胺、酪胺、苯乙胺、尸胺、亚精胺和精胺都有所检出。

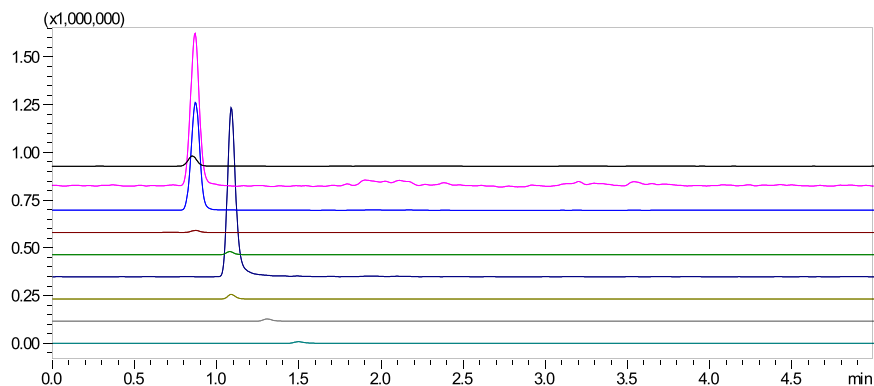


图 6A A 厂家鲭鱼罐头中的生物胺测试色谱图

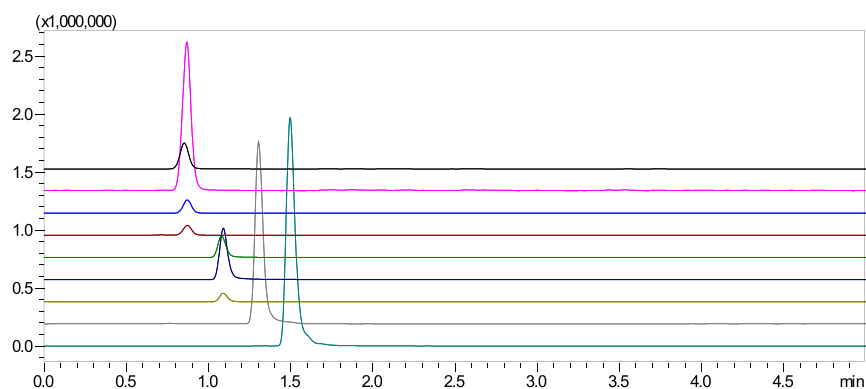


图 7 B 厂家鲮鱼罐头中的生物胺测试色谱图

■ 总结

建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定鲮鱼罐头中 9 种生物胺的分析方法。使用该方法分析 9 种生物胺，其中 8 种生物胺，在其相应浓度范围内线性良好，各化合物的线性相关系数均大于 0.9950，线性回读准确度在 86.9%~115.5% 之间，仅精胺因受其碱性过大的影响，在其线性范围内，线性相关系数为 0.9920。该方法分析生物胺峰形好、灵敏度高，各化合物仪器定量限在 1.01 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~7.52 $\mu\text{g}/\text{L}$ 之间，大大高于常规液相色谱法的灵敏度。同时仪器精密度也高，不同浓度水平的标准溶液连续进样 7 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.18% 和 5.76% 以下。本测试方法灵敏度高，测试简单、快速，可满足食品类样品中生物胺的检测需求。

■ 致谢

深圳质检院食品所为本应用的合作单位，在实验过程中提供了标准品溶液和前处理样品，在此表示感谢。

岛津应用云

