

高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱法同时测定液态发酵食品中14种生物胺及其代谢物

蔡琼¹, 余文琴^{1*}, 李小琴¹, 阮燕¹, 李珊¹, 史沁芳¹, 程龙²

(1. 重庆市计量质量检测研究院, 重庆 401121; 2. 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司, 上海 200335)

摘要: **目的** 基于高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱法(high performance liquid chromatography-triple quadrupole/composite linear ion trap mass spectrometry, HPLC-QTRAP MS)建立同时测定液态发酵食品中14种生物胺及其代谢物的分析方法。**方法** 采用 Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以 0.025% (V/V)甲酸水和 0.1% (V/V)甲酸乙腈进行梯度洗脱, 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)正离子模式、多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)离子扫描模式、信息依赖性采集(information dependent acquisition, IDA)、增强离子扫描(enhanced ion scanning, EPI)和 EPI 谱库搜索的复合模式进行测定。**结果** 在 0.05~200.00 μg/L 质量浓度范围内, 14 种生物胺及其代谢物的线性关系良好, 相关系数均大于 0.99; 方法检出限(S/N=3)为 0.15~6.00 μg/L; 在不同添加质量浓度(2.0、10.0、50.0 μg/L)下, 其回收率为 75.2%~107.9%, 相对标准偏差在 1.98%~9.07%之间。**结论** 该方法具有操作简便、快速、准确、灵敏等优点, 可满足液态类发酵食品中 14 种生物胺的定性定量分析需要, 为液态发酵类食品中生物胺的检测分析奠定基础。

关键词: 生物胺; 代谢产物; 高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱法; 液态发酵食品

Simultaneous determination of 14 kinds of biogenic amines and their metabolites in liquid fermented food by high performance liquid chromatography-triple quadrupole/composite linear ion trap mass spectrometry

CAI Qiong¹, YU Wen-Qin^{1*}, LI Xiao-Qin¹, RUAN Yan¹, LI Shan¹, SHI Qin-Fang¹, CHENG Long²

(1. Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing 401121, China; 2. SCIEX, Shanghai 200335, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 14 kinds of biogenic amines and their metabolites in liquid fermented food by high performance liquid chromatography-triple quadrupole/composite linear ion trap mass spectrometry (HPLC-QTRAP MS). **Methods** Using 0.025% (V/V) formic acid/water solution and 0.1% (V/V) formic acid/acetonitrile as mobile phase, the mixture was separated on

基金项目: 重庆市计量质量检测研究院科研计划项目(2022 研-14、2022 研-15)

Fund: Supported by the Research Project of Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection (2022(Yan)-14、2022(Yan)-15)

*通信作者: 余文琴, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: kathy198813@126.com

*Corresponding author: YU Wen-Qin, Master, Senior Engineer, Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, No.3, North Yangliu Road, Yubei District, Chongqing 401121, China. E-mail: kathy198813@126.com

Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC Column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm). The target compounds were analyzed using electrospray ionization (ESI) positive ion mode, multiple reaction monitoring (MRM), information dependent acquisition (IDA), enhanced ion scanning (EPI), and multi-step mode analysis combined with EPI library retrieval of 14 kinds of biogenic amines and their metabolites. **Results** The results showed that the linearity of 14 kinds of biogenic amines and their metabolites were pretty good when the mass concentration was from 0.05–200.00 μg/L. The correlation coefficients were all above 0.99. The limits of detection ($S/N=3$) were 0.15–6.00 μg/L. The mean recoveries at 2.0, 10.0, 50.0 μg/L were 75.2%–107.9% and the relative standard deviations were 1.98%–9.07%. **Conclusion** The established method is convenient to operate, has short analysis time, high accuracy and sensitivity, which can meet the qualitative and quantitative needs of 14 kinds of biogenic amines in liquid fermented food, and provide strong technical support for the detection of biogenic amines in liquid fermented food.

KEY WORDS: biogenic amines; metabolites; high performance liquid chromatography-triple quadrupole/composite linear ion trap mass spectrometry; liquid fermented food

0 引言

生物胺是一类存在于碱性环境中, 含氮且具有生理活性的有机小分子化合物总称^[1-2], 一般是通过机体自身细胞代谢、游离氨基酸在脱羧酶的催化下由微生物脱羧而成, 或是由醛、酮类化合物经氨基酸转氨酶催化而生成^[3-5]。常见的生物胺可按照化学结构的不同分为三类(即脂肪族生物胺、芳香族生物胺、杂环类生物胺); 按所含氨基的数量还可分为单胺和多胺^[1,4-7]。生物胺在植物和动物组织中普遍存在, 对生物体具有不可替代的功能。例如, 精胺和亚精胺可以抑制不饱和脂肪酸氧化, 尸胺和腐胺具有抗氧化活性, 可清除自由基。适量的生物胺是生物体所必需的, 然而, 过量摄取会引起一系列的毒性反应, 如呼吸困难、恶心呕吐、血压升高, 严重时可能引发休克甚至危及生命^[1,4-5,8-10]。

发酵食品是指将谷物、果汁等作为生产原料, 在有益微生物作用下发生期望的生化 and 物理变化后产生的食品, 其中常见的液态类发酵食品有葡萄酒、啤酒、酱油、醋等, 其含有丰富的蛋白质和氨基酸, 具备生物胺生成的有利条件。生物胺含量的高低决定了发酵食品的卫生质量以及新鲜程度。例如, 美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)、澳大利亚和欧盟规定水产品中组胺含量分别不得高于 50、200 和 100 mg/kg, 我国 GB 2733—2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》规定高组胺鱼类组胺含量不得超过 400 mg/kg, 其他鱼类不得超过 200 mg/kg, 澳大利亚、瑞士、法国、荷兰和德国对葡萄酒中组胺限量规定分别为 10、10、8、3.5、2 mg/L, 而我国并未规定酒类中的生物胺含量的限量标准^[1,7-8,11-13]。因此, 开展液态类发酵食品中残留生物胺及其代谢物的分离与检测技术研究, 对于液态类发酵食品中残留生物胺及其代谢物的快速分析与液态类发酵食品的质量安全标准的制订具有重要现实意义。

目前, 生物胺分析方法包括高效液相色谱法^[14-15]、气相色谱法^[16-17]、毛细管电泳法^[18-19]、分光光度法^[20]、离子色谱法^[21-23]、薄层层析法^[24-25]等, 其中, 我国 GB 5009.208—2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》中采用液相色谱法和分光光度法。但是, 以上方法均具有一定局限性, 如高效液相色谱法所需的衍生操作烦琐、耗时较长、衍生产物不稳定, 重现性较差^[14-15]; 气相色谱法由于检测机制的限制, 常用于分析挥发性生物胺, 而非挥发性生物胺则需要通过衍生化来降低其极性, 进而改善化合物在色谱柱中的驻留, 操作费时且不适合大批量样品检测^[1,17]; 毛细管电泳法和分光光度法对含量低的生物胺不敏感、重现性和稳定性较差^[5,18]; 离子色谱法的检测结果易受样品中其他金属阳离子的干扰^[21-22]; 薄层层析法仅为定性、半定量的分析方法, 结果准确度、精密度、重复性较差^[8-9,25]; 总的来说, 生物胺检测方法存在灵敏度不够、分析时间较长、选择性差、无法实现高通量的筛查等问题, 因此开发具有高灵敏度、高选择性、高稳定性、快速的检测方法尤为必要。

高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱法(high performance liquid chromatography-triple quadrupole/composite linear ion trap mass spectrometry, HPLC-QTRAP MS)是在 LC-MS 基础上将三重四极杆的最后一极四极杆变为线性离子阱的混合型串联质谱技术, 其多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)-信息依赖性采集(information dependent acquisition, IDA)-增强离子扫描(enhanced ion scanning, EPI)模式除可获得 MRM 离子对色谱图外, 还可以提供快速扫描速度以及获得高于传统质谱仪的全质量范围的二级质谱图。首先, MRM-IDA-EPI 扫描模式利用 MRM 的高选择性和高灵敏度用来准确定量。其次, 系统通过 IDA 对 14 种生物胺及其代谢物母离子进行 EPI 扫描, EPI 的数据可用于数据库的检索, 对筛查出的目标化合物进行二级全谱的二次确证。最后, 根据标准品的 EPI 二级碎片数据建立生物胺的二级标准谱库, 从而进行

谱库匹配,用于样品中生物胺的快速筛查以及定性确证检测结果,消除假阳性干扰,从而得到准确可靠的检测结论^[26-29]。如此不仅将标准三重四极杆的功能保留从而实现快速定量检测,还可以通过线性离子阱提高全扫描方式的灵敏度及保留待测物所有色谱峰的二级质谱碎片信息从而实现准确定性检测;同时 HPLC-QTRAP MS 具有分析速度快、高灵敏度、强选择性、高通量筛选、分离效果好、前处理无需衍生等特点,可实现快速定性定量分析,是可靠的液态发酵食品内在质量综合评价的检测方法。

本研究拟采用 QTRAPLC-MS/MS 构建“MRM-IDA-EPI-图谱检索”的复合分析检测模式,实现对液态发酵复杂样品中 14 种生物胺及其代谢物生物胺的快速、准确分析,获得 MRM 离子对色谱图的同时,通过 EPI 得到的高灵敏度二级质谱碎片信息建立 14 种生物胺及其代谢物的 LC-MS/MS 质谱库,建立可同时定性和定量分析的检测方法,以期解决液态发酵类食品中 14 种生物胺及其代谢物定性定量难、检测时间长且成本高等问题,为液态类发酵食品的品质调控提供技术支持和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

酱油、醋、啤酒、葡萄酒均为市售。

色胺(纯度 99.7%)、2-苯乙胺(纯度 98.5%)、腐胺盐酸盐(纯度 99.5%)、尸胺盐酸盐(纯度 98.6%)、章鱼胺盐酸盐(纯度 99.9%)、酪胺盐酸盐(纯度 98.0%)、肾上腺素(纯度 98.7%)、多巴胺盐酸盐(纯度 98.6%)、四盐酸精胺(纯度 99.9%)标准品(上海安谱瑞世标准技术服务有限公司); 亚精胺三盐酸盐(纯度 99.5%)、L-去甲基肾上腺素(纯度 98.0%)(坛墨质检科技股份有限公司); 5-羟基色胺盐酸盐(纯度 99.8%)、硫酸弧基丁胺(纯度 99.1%)(北京曼哈格生物科技有限公司); 组胺(纯度 98.8%)(广州佳途科技股份有限公司); 甲酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,北京百灵威科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

Exion LC-Triple QuadTM 5500⁺液相色谱-串联质谱仪(上海爱博才思分析仪器贸易有限公司); 3K15 台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司); KQ-500DE 数控超声清洗器(中国昆山市超声仪器有限公司); SECURA225D-1CN 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司,感量为 0.01 g); Vortex 3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Waters CORTECS® T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm)、Waters XBridge Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)、Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司); GL Sciences Inertsil HILIC 色

柱(100 mm×2.1 mm, 3.0 μm, 上海技尔商贸有限公司); Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 美国 Agilent 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

单一标准储备液:称取各种生物胺标准品适量,用 0.1 mol/L HCl 配制成质量浓度为 1000 mg/L 的标准储备液,置于-20℃冰箱储存备用,保存期为 6 个月。

生物胺混合标准溶液:分别吸取 0.1 mL 各生物胺单组分标准储备液,用 0.1 mol/L HCl 配制成 10 mg/L 的标准中间液,置于-20℃冰箱储存备用,保存期为 3 个月。

生物胺标准系列溶液:准确量取适量混合标准工作液,用 5%甲酸甲醇溶液稀释成浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100.00、200.0 μg/L 的混合标准溶液,临用现配。

1.3.2 样品前处理

准确称取 2 g 液态发酵样品于 15 mL 塑料离心管中,加入 5 mL 5%甲酸甲醇,涡旋混匀后超声提取 30 min,用 5%甲酸甲醇定容至 10 mL,经 0.22 μm 的有机滤膜过滤后直接进样分析。

1.3.3 色谱条件

色谱柱:Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A:0.025%甲酸水; 流动相 B:0.1%甲酸乙腈; 流速:0.3 mL/min; 柱温:40℃; 进样量 2 μL; 梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Procedures of gradient elution

时间/min	A%	B%
0.00	8	92
1.00	8	92
2.50	15	85
4.00	55	45
6.00	55	45
6.50	8	92
8.00	8	92

1.3.4 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)正离子模式; 扫描模式:MRM-IDA-EPI; 电喷雾电压:5500 V; 雾化气:50 psi; 辅助气:55 psi; 气帘气:30 psi; 碰撞气:9 psi; 离子源温度:500℃; MRM 模式,MRM 参数见表 2。定量分析采用外标法。

1.3.5 LC-MS/MS 谱库

利用针泵直接泵入适当浓度的标准溶液,分别采用合适的碰撞能量对 14 种生物胺及其代谢物标准品进行 EPI 扫描,建立 EPI 谱库,用于谱库搜索,以此来确证目标物。

表 2 14 种生物胺的 MRM 参数
Table 2 Optimized MRM parameters for 14 kinds of biogenic amines

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	DP/V	CE/eV
组胺	112.2	95.2*	48	20
	112.2	68.0		30
酪胺	138.1	121.0*	40	16
	138.1	77.1		34
腐胺	89.1	72.1*	30	14
	89.1	30.0		22
章鱼胺	136.0	91.0*	70	26
	136.0	119.0		19
尸胺	103.0	86.1*	40	13
	103.0	69.0		21
苯乙胺	122.1	105.0*	50	17
	122.1	77.0		40
多巴胺	154.1	137.0*	50	15
	154.1	91.0		32
亚精胺	146.2	72.1*	80	20
	146.2	112.2		19
肾上腺素	184.1	166.0*	50	15
	184.1	107.0		31
	184.1	123.0		40
胍基丁胺	131.1	114.1*	60	15
	131.1	60.0		16
5-羟基色胺	177.1	160.0*	30	17
	177.1	115.0		38
	177.1	132.0		30
色胺	161.2	144.1*	50	18
	161.2	117.2		33
L-去甲基肾上腺素	170.1	152.0*	40	13
	170.1	107.0		28
	170.1	135.0		21
精胺	203.2	112.1*	20	18
	203.2	129.1		15

注: *代表定量离子; 去簇电压(decustering potential, DP); 碰撞能量(collision energy, CE)。

1.4 数据处理

采集的数据经 SIEX OS 软件处理获得生物胺的定量结果, 再采用 Excel 2016 和 Origin 8.0 对实验数据进行整理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 仪器条件优化

2.1.1 质谱条件选择

多数文献^[10,30-33]表明, 在 ESI 源正离子模式下, 14 种

生物胺及其代谢物电离均可轻松获取 H^+ , 形成 $[M+H]^+$ 。将 14 种生物胺及其代谢物标准溶液分别配制成为质量浓度为 1.0 mg/L 的中间液, 利用针泵直接注入质谱仪中, 通过将高强度的一级离子作为母离子, 经过二级质谱扫描, 筛选出丰度高、干扰小的子离子, 其中响应较高的 m/z 作为定量离子对, 响应相对较弱的 m/z 作为定性离子对, 并对 CE、DP 等参数进行优化, 从而建立 14 种生物胺及其代谢物的 MRM 方法(表 2)。

2.1.2 色谱柱选择

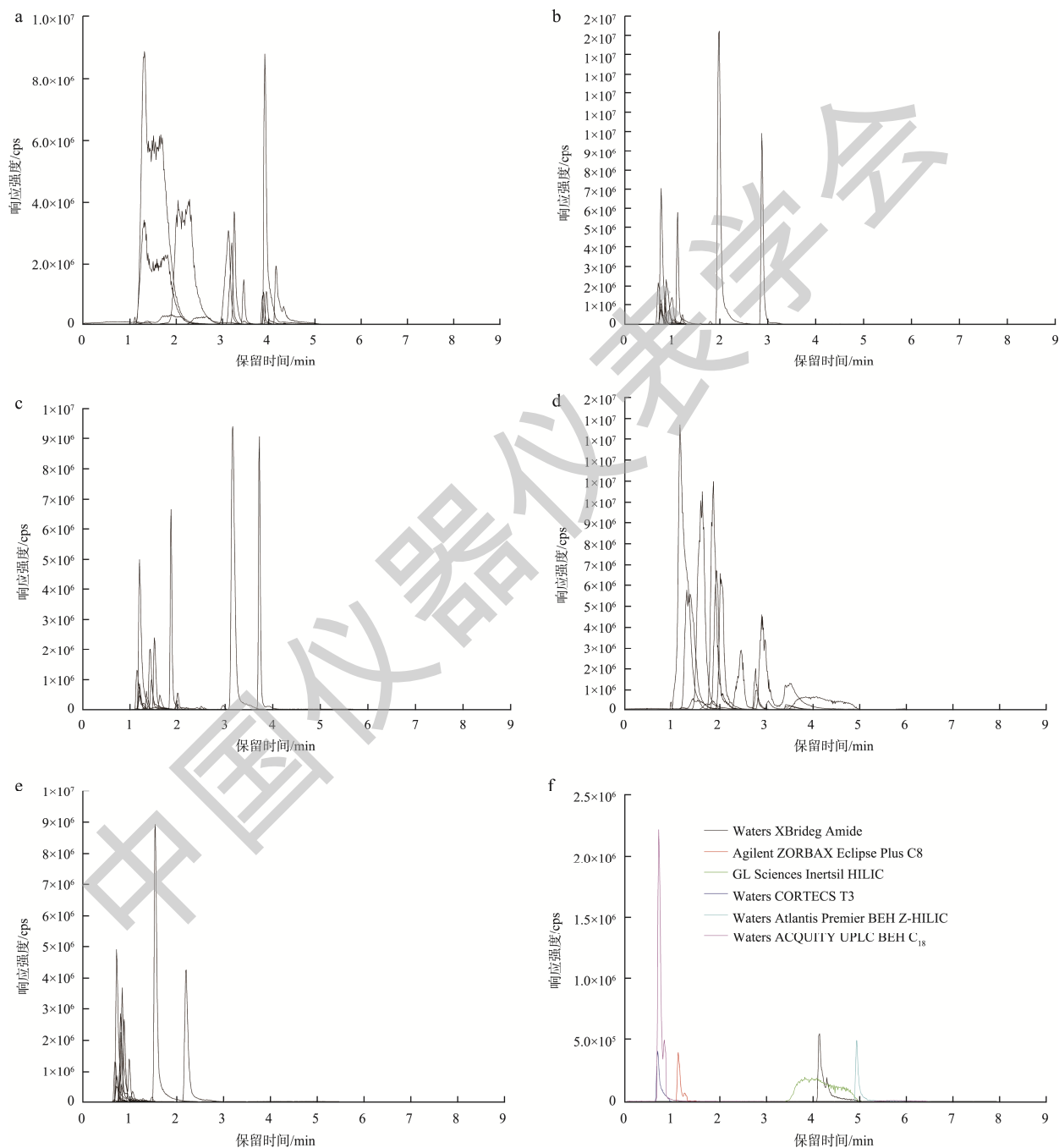
生物胺是一类碱性的含氮化合物, 具有生物活性, 极性或半极性, 分子量小等特点^[13,34], 因 14 种生物胺及其代谢物的结构类型和化学性质各异, 因此需对色谱柱进行优化选择, 从而确保各个化合物既有良好的色谱行为和峰形表现, 又具有较好的分离效果。本研究分别考察 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 、GL Sciences Inertsil HILIC、Waters CORTECS[®] T3、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8、Waters XBridge Amide、Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC 6 种色谱柱对目标物分离效果的影响, 结果见图 1。结果显示, BEH C_{18} 柱对大多数生物胺响应较好, 但亚精胺、肾上腺素的峰形拖尾严重, 多巴胺出现前沿峰并且未能找到精胺的色谱峰; HILIC 柱对 14 种生物胺分离效果均较差且具有峰形较宽、拖尾严重、有明显毛刺等现象; 使用 T3 柱与 C8 柱时, 酪胺、精胺、多巴胺、亚精胺、5-羟基色胺均出现分岔、拖尾、前沿峰等现象; 在 BEH Amid 柱上, 由于生物胺是极性较大的水溶性化合物, 需溶解在一定比例的水溶液中, 而 BEH Amid 柱对含水量敏感, 被测化合物推荐溶解于不含水的纯有机溶剂中^[6], 因此导致大多数生物胺出现平顶、拖尾、宽胖等现象; 而采用亚乙基桥杂化颗粒技术的 BEH Z-HILIC 柱分离 14 种生物胺及其代谢物, 其各个化合物均有较好的色谱保留, 且具有良好的分离效果(图 2)。因此本研究最终选择 Waters Atlantis Premier BEH Z-HILIC 色谱柱。

2.1.3 流动相选择

基于生物胺化合物的理化性质, 结合文献资料^[10-11,35], 首先, 以乙腈-水体系作为液相流动相体系, 结果显示, 苯乙胺、酪胺、色胺等色谱行为良好, 但其余目标物的色谱峰拖尾、分岔、响应弱, 其中亚精胺、精胺未出现色谱峰。其次, 考虑到质谱在正离子扫描模式下, 加入甲酸可使化合物形成 $[M+H]^+$ 峰, 有助于正离子质子化及促进离子化, 在流动相中维持目标物的电离状态, 提高分析灵敏度^[35]。本研究在流动相中加入甲酸, 将 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈体系作为流动相, 结果表明, 苯乙胺、酪胺出现分岔且峰形变宽等现象, 而亚精胺、精胺出现色谱峰, 但具有拖尾且响应低的现象。再次, 为了提高目标化合物的响应并改善峰形和目标物的分离效果, 本研究考虑在 0.1% 甲酸水

的基础上加入 2 mmol/L 的甲酸铵缓冲盐, 结果发现, 各个目标物的色谱峰与未加缓冲盐的并无太大区别, 因此为了保护色谱柱, 本研究在流动相中未加入缓冲盐。最后, 由于其中酪胺、亚精胺、精胺的色谱行为受流动相酸度的影响较大, 因此以 0.1%甲酸乙腈作为有机相, 比较了 0.05%甲酸水、0.025%甲酸水、0.015%甲酸水这三个不同浓度的

甲酸溶液对目标化合物灵敏度的影响。结果发现, 14 种生物胺及其代谢物的峰形尖锐、对称, 分离效果较好, 各组分的响应值、分离度均能满足检测要求, 最终确定 0.025%甲酸水-0.1%甲酸乙腈为流动相进行梯度洗脱, 优化后梯度洗脱程序见表 1, 14 种生物胺及其代谢物混合标准溶液 MRM 色谱图见图 2~3。



注: a 为 Waters XBridge Amide; b 为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈; c 为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C8; d 为 GL Sciences Inertsil HILIC; e 为 Waters CORTECS[®] T3; f 为亚精胺不同色谱柱的 MRM 色谱图。

图 1 不同色谱柱的提取离子流图

Fig.1 Extracted ion chromatograms of different column

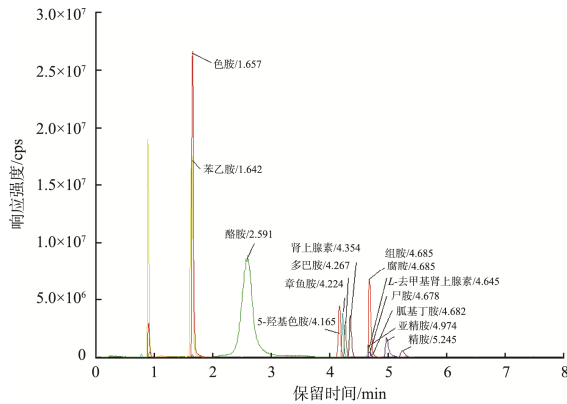


图 2 14 种生物胺及其代谢物的提取离子流图

Fig.2 Extracted ion chromatogram of 14 kinds of biogenic amines and metabolites

2.2 EPI 数据库建立及二级质谱裂解方式推断

首先, 由于生物胺的种类繁多, 并且可以相互转化, 在人体内代谢途径复杂, 代谢产物众多; 其次, 发酵食品中的基质成分复杂, 使用传统的 MRM 质谱分析可能造成

响应较低, 基质对目标物的干扰导致定性离子与定量离子丰度比出现偏差, 从而影响定性结论并导致假阳性或假阴性的误判。因此本研究通过 14 种生物胺及其代谢物标准品在合适的碰撞能量下获得 EPI 二级碎片全谱, 利用标准物质自行建立增强子离子扫描谱库, 再通过可疑样品的子离子谱库检索和匹配进行对比获得 Fit 值、RevFit 值以及 Purity 值, 从而提高目标物确证的灵敏度、可靠性、准确性和精确性。

通过对 14 种生物胺及其代谢物标准品的质谱裂解规律进行总结和探讨有利于更加快速有效的去系统鉴别各个基质中所存在的生物胺种类。综合比较 14 个标准品的二级质谱图(图 4), 发现生物胺类化合物均表现出相似的质谱裂解行为, 无论是脂肪族生物胺(尸胺、腐胺、精胺、亚精胺、胍基丁胺)、还是芳香族生物胺(酪胺、2-苯乙胺、章鱼胺、多巴胺、肾上腺素、L-去甲基肾上腺素), 亦或是杂环类生物胺(组胺、色胺、5-羟基色胺), 它们都是通过脱氨基、脱羟基、脱烷基进行裂解。因此通过比较阳性样品与标准品的二级碎片图以此来提高液态类发酵食品中生物胺及其代谢物检测的灵敏度、确认度和可靠性。

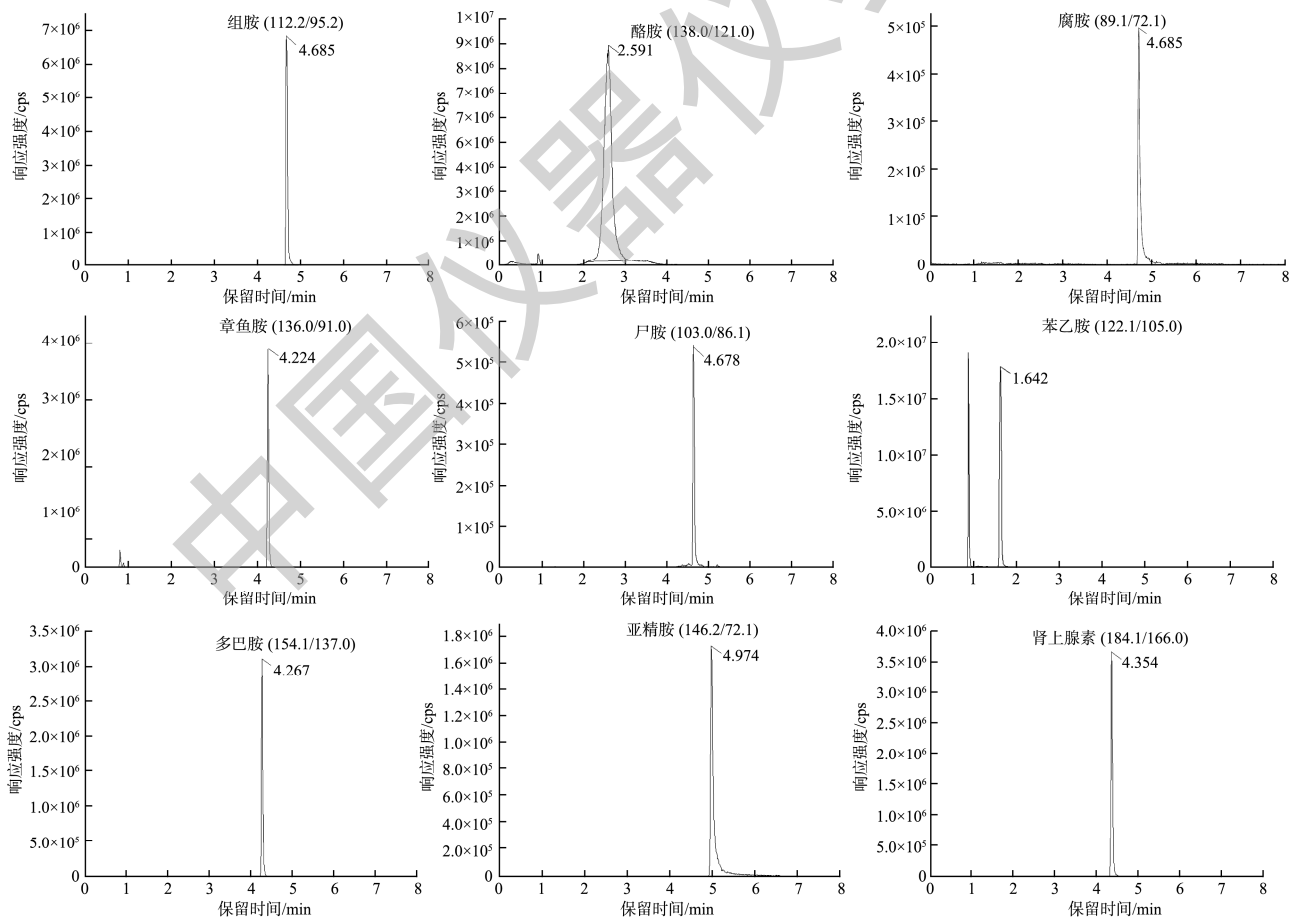


图 3 14 种生物胺及其代谢物的 MRM 色谱图

Fig.3 MRM chromatograms of 14 kinds of biogenic amines and metabolites

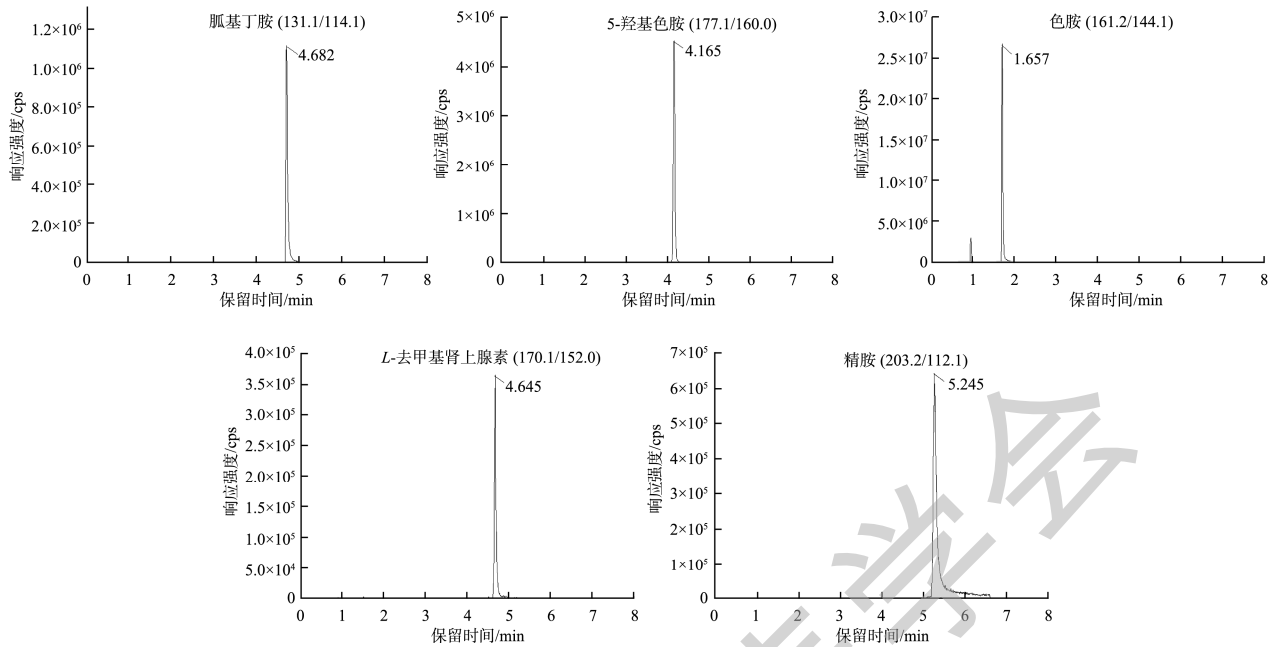


图 3(续) 14 种生物胺及其代谢物的 MRM 色谱图
Fig.3 MRM chromatograms of 14 kinds of biogenic amines and metabolites

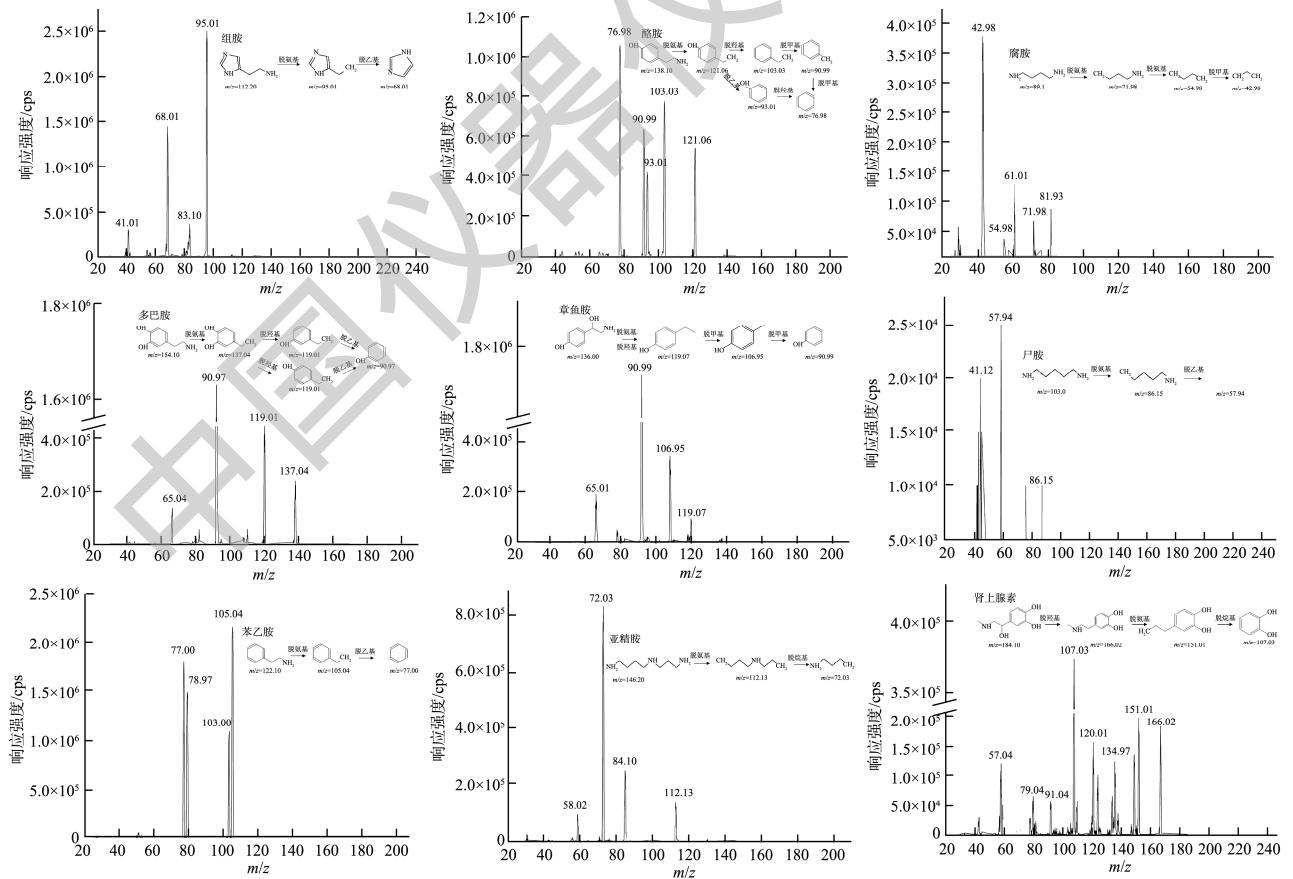


图 4 14 种生物胺及其代谢物的二级碎片质谱图
Fig.4 Fragment mass spectra of 14 kinds of biogenic amines and metabolites

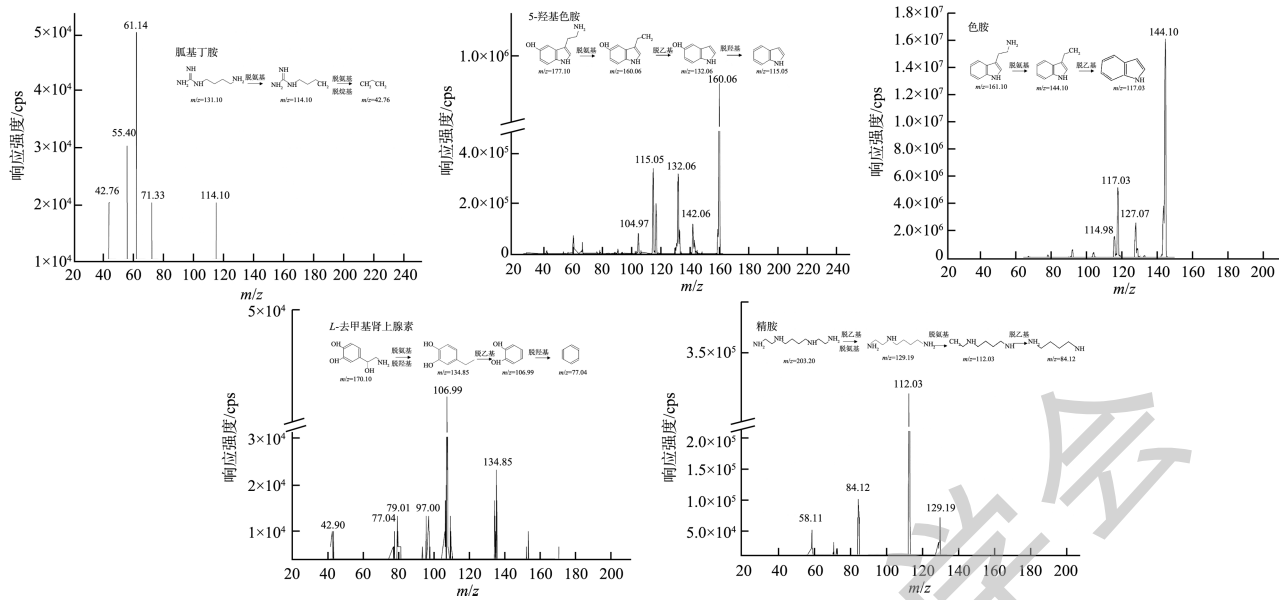


图 4(续) 14 种生物胺及其代谢物的二级碎片质谱图
Fig.4 Fragment mass spectra of 14 kinds of biogenic amines and metabolites

2.3 方法验证

2.3.1 方法的线性范围、检出限和定量限

按照各目标组分的质谱响应特性, 制备 14 种生物胺及其代谢物的混合标准溶液, 并以其质量浓度作为横坐标, 以各组分及其代谢物的峰面积作为纵坐标绘制标准曲线, 14 种生物胺及其代谢物的线性范围、线性方程和相关系数见表 3。由表 3 中数据可看出, 各分析物在各自的质量浓

度范围内, 其标准曲线的相关系数在 0.99 以上, 且线性良好。参考文献方法^[35-36], 结合样品的前处理过程, 以标准曲线最低点的 3 倍信噪比($S/N=3$)计算检出限(limit of detection, LOD), 10 倍信噪比($S/N=10$)计算定量限(limit of quantitation, LOQ), 结果见表 3。该方法的 LODs 和 LOQs 远低于 GB 5009.208—2016 方法中的 LODs (2 mg/L 或 5 mg/L) 和 LOQs (5 mg/L 或 10 mg/L)要求, 表明该方法具有较高的灵敏度, 能够准确测定大多数样品中的生物胺含量。

表 3 14 种生物胺的线性范围、标准曲线、检出限及定量限

Table 3 Linear ranges, standard curves, limits of detection and limits of quantification for 14 kinds of biogenic amines

化合物	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	线性方程	相关系数	检出限/($\mu\text{g/L}$)	定量限/($\mu\text{g/L}$)
组胺	0.20~50.00	$Y=9.96025e^4X+4.43464e^4$	0.99479	0.60	1.80
酪胺	2.00~200.00	$Y=2.64069e^5X+4.03432e^4$	0.99605	6.00	18.00
腐胺	0.50~50.00	$Y=8.91494e^3X+2.69301e^5$	0.99882	1.50	4.50
章鱼胺	0.20~200.00	$Y=1.82137e^4X+2.17689e^3$	0.99877	0.60	1.80
苯乙胺	0.05~50.00	$Y=1.69719e^5X+1.08761e^4$	0.99786	0.15	0.45
多巴胺	0.10~200.00	$Y=1.27678e^4X+2.01423e^3$	0.99932	0.30	0.90
亚精胺	0.20~50.00	$Y=4.23479e^4X+1.52187e^4$	0.99639	0.60	1.80
肾上腺素	0.10~200.00	$Y=1.58496e^4X+1.66271e^3$	0.99750	0.30	0.90
胍基丁胺	0.10~20.00	$Y=3.85395e^4X+6.92534e^3$	0.99944	0.30	0.90
5-羟基色胺	0.05~200.00	$Y=2.04929e^4X-88.59512$	0.99879	0.15	0.45
色胺	0.05~100.00	$Y=1.66076e^5X+1.23715e^4$	0.99373	0.15	0.45
L-去甲基肾上腺素	2.00~200.00	$Y=2.44584e^3X+8.80742e^2$	0.99926	6.00	18.00
精胺	0.20~200.00	$Y=8.18740e^3X+6.68623e^3$	0.99301	0.60	1.80
尸胺	2.00~200.00	$Y=3.10048e^2X+2.82858e^3$	0.99630	6.00	18.00

2.3.2 方法回收率及重现性

分别在空白液态类发酵食品中添加 2.0、10.0、50.0 $\mu\text{g/L}$ 的 14 种生物胺及其代谢物混合标准品,开展低、中、高 3 个浓度水平的 6 平行样品添加回收实验,计算其加标回收率及相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。在不同添加浓度水平(2.0、10.0、50.0 $\mu\text{g/L}$)下,回收率为 75.2%~107.9%, RSDs 为 1.98%~9.07%,测定结果表明,各目标物的回收率均在 75%以上, RSDs 均小于 10%,因此本研究正确度和精密度满足液态食品中生物胺及其代谢物测定要求。

2.4 实际样本检测

在市场上随机购买不同品牌的液态类发酵食品,包括啤酒、葡萄酒、酱油、醋等常见典型样品,采用上述模

式对实际样品进行检测,获得其 MRM 谱图及 EPI 谱图,将样品的 EPI 谱图与建立的谱库进行搜索比对。结果见表 4,液态类发酵食品中,无论是啤酒、葡萄酒还是酱油、醋都有不同种类生物胺的检出,生物胺的检出含量分别在 ND~4065.70 $\mu\text{g/L}$ 之间,且不同的液态类发酵食品中生物胺含量存在较大差异。一般 Purity 值 $\geq 60\%$ 为阳性结果认定条件^[26-27,37],以此排除假阳性结果。例如酱油该样本匹配结果信息中苯乙胺的 Fit 值、RevFit 值、Purity 值较高,其中 Purity 值为 99.93%,达到目标物认定要求,搜索结果显示该样品中苯乙胺阳性,其含量分别为 1421.80 $\mu\text{g/L}$ 。说明样品存在生物胺的污染,同时表明该方法满足我国对液态类发酵食品中生物胺污染进行监控的需要,可为生物胺检测提供有力的技术支撑。

表 4 实际样品的检出结果及 Fit 值
Table 4 Detection results and Fit values of the actual sample

化合物	啤酒		葡萄酒		酱油		醋	
	含量/ $\mu\text{g/L}$	Purity 值/%	含量/ $\mu\text{g/L}$	Purity 值/%	含量/ $\mu\text{g/L}$	Purity 值/%	含量/ $\mu\text{g/L}$	Purity 值/%
组胺	5.80	*32.28	ND		ND		17.80	98.58
酪胺	ND		ND		767.70	93.66	ND	
腐胺	166.20	63.17	ND		ND		ND	
章鱼胺	74.60	64.74	ND		186.40	97.93	72.60	91.08
尸胺	189.90	*12.58	ND		1.86	*0.49	34.700	*2.67
苯乙胺	ND		ND		1421.80	99.93	4065.70	99.90
多巴胺	26.30	*56.74	22.10	*10.13	97.70	*8.91	66.10	66.51
亚精胺	62.10	61.73	11.70	*19.74	374.10	82.63	202.50	67.11
肾上腺素	ND	*3.38	ND		ND		ND	
胍基丁胺	ND		15.00	*2.00	9.57	*3.17	7.70	*0.21
5-羟基色胺	20.18	*48.31	ND		ND		ND	
色胺	2.93	88.56	ND		ND		ND	
L-去甲基肾上腺素	ND		ND		ND		ND	
精胺	ND		ND		0.92	*0.54	0.24	*12.20

注: ND 表示该样品未检出该化合物; *代表假阳性。

3 结论

本研究基于 HPLC-QTRAP MS 建立了液态类发酵食品中 14 种生物胺及其代谢物的分析方法,结合自建的 14 种生物胺及其代谢物 LC-MS/MS 标准谱库,采用 MRM-IDA-EPI-谱库检索的多步模式,针对目标物进行正离子扫描,成功实现了 14 种生物胺及其代谢物的快速定性和定量分析。该方法在分析时间和准确性等方面优于传统衍生化或已报道的检测方法^[15-17,31-33],具有简便、快捷、科学、高可靠性、高准确度、高稳定性,适用于生物胺及其代谢物在液态类发酵食品中的残留量分析、检验、鉴定,为液态类发酵食品的质量安全工作提供了技术支持以及数据支撑。

参考文献

- [1] 张立飞,孙明浩,华成黎,等. 发酵食品中生物胺的形成、检测及其防控策略的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 329-339.
ZHANG LF, SUN MH, HUA CL, et al. Research progress on the production, detection and prevention of biogenic amine in fermented food [J]. Food Ferment Ind, 2023, 49(3): 329-339.
- [2] LIU YN, HE YQ, LI H, et al. Biogenic amines detection in meat and meat products: The mechanisms, applications, and future trends [J]. J Future Foods, 2024, 4(1): 21-36.
- [3] 王光强,俞剑荣,胡健,等. 食品中生物胺的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 269-278.
WANG GQ, YU JS, HU J, et al. Progress in research on biogenic amines in foods [J]. Food Sci, 2016, 37(1): 269-278.

- [4] 冉春霞, 陈光静. 我国传统发酵肉制品中生物胺的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(3): 285–294.
RAN CX, CHEN GJ. Research progress of biogenic amines in Chinese traditional fermented meat products [J]. Food Ferment Ind, 2017, 43(3): 285–294.
- [5] 戴莹, 宋海勇, 吴曦, 等. 肉制品中生物胺的形成、检测和控制研究进展[J]. 肉类研究, 2020, 34(11): 89–97.
DAI Y, SONG HY, WU X, *et al.* Recent progress in the formation, detection and control of biogenic amines in meat products [J]. Meat Res, 2020, 34(11): 89–97.
- [6] 李丽萍, 范赛, 张楠, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定红酒中 4 种生物胺含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(12): 4883–4888.
LI LP, FAN S, ZHANG N, *et al.* Determination of 4 kinds of biogenic amines in wine by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(12): 4883–4888.
- [7] 张颖, 张蕴, 赵永纳. 分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定红酒中 14 种生物胺及其代谢产物[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(9): 1025–1029.
ZHANG Y, ZHANG Y, ZHAO YG. Detection of 14 biogenic amines and their metabolites in red wine by dispersive solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2022, 32(9): 1025–1029.
- [8] 肖洪, 丁晓雯, 梁菡韵, 等. 发酵食品中的生物胺及其控制研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 346–350.
XIAO H, DING XX, LIANG HY, *et al.* Research progress in the biogenic amines and its control measures in fermented food [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(20): 346–350.
- [9] 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.
LIU J, REN J, SUN KJ. Safety of biogenic amines in foods [J]. Food Sci, 2013, 34(5): 322–326.
- [10] LEE S, YOO M, SHIN D. The identification and quantification of biogenic amines in Korean turbid rice wine, Makgeolli by HPLC with mass spectrometry detection [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 62(1): 350–356.
- [11] 王可利, 叶泰, 徐斐, 等. UPLC-MS/MS 法测定黄酒中 8 种生物胺[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 281–285.
WANG KL, YE T, XU F, *et al.* Determination of eight biogenic amines in Huangjiu (rice wine) by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2021, 42(16): 281–285.
- [12] 张雅卿, 叶书建, 周睿, 等. 发酵食品风味物质及其相关微生物[J]. 酿酒科技, 2021, 320(2): 85–96.
ZHANG YQ, YE SJ, ZHOU R, *et al.* Flavoring substances and related microorganisms of fermented food [J]. Liquor-Making Sci Technol, 2021, 320(2): 85–96.
- [13] ZHU ZY, SONG XY, JIANG YZ, *et al.* Determination of biogenic amines in wine from Chinese markets using ion chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Foods (Basel, Switzerland), 2023, 12(11): 2262.
- [14] 林波, 赵书媛, 王雪. 高效液相色谱串联质谱检测地表水中五种生物胺[J]. 环境与发展, 2020, 8(68): 118–119.
LIN B, ZHAO SY, WANG X. Determination of five biogenic amines in surface water by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Environ Dep, 2020, 8(68): 118–119.
- [15] 董孝元, 冯小进, 李斯琳, 等. 高效液相色谱法测定白酒中 6 种生物胺的含量[J]. 酿酒, 2023, 50(3): 106–109.
DONG XY, FENG XJ, LI SL, *et al.* Determination of six biogenic amines in light flavor and luzhou flavor baijiu by high performance liquid chromatography [J]. Liquor Mak, 2023, 50(3): 106–109.
- [16] KAMANKESH M, ABDORREZA M, KIANDOKHT G. Determination of biogenic amines in Lighvan cheese using a novel hollow-fibre electromembrane-microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. Int J Dairy Technol, 2021, 74(4): 759–767.
- [17] 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.
YANG J, WANG K, ZHOU Y. Analysis of 8 kinds of biogenic amines in wine by gas chromatography-electron capture detector method [J]. China Brew, 2023, 42(2): 228–234.
- [18] APINYA O, PATTAMAPORN H, SITTISAK P, *et al.* Silica nanolayer coated capillary by hydrothermal sol-gel process for amines separation and detection of tyramine in food products [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 7460.
- [19] AN D, CHEN ZQ, ZHENG JC, *et al.* Determination of biogenic amines in oysters by capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence [J]. Food Chem, 2015, 168: 1–6.
- [20] 丁海燕, 王联珠, 盛晓风, 等. 非挥发性生物胺对组胺的可见分光光度法检测结果的影响[J]. 中国渔业质量与标准, 2015, 5(4): 17–22.
DING HY, WANG LZ, SHENG XF, *et al.* Study on the effects of other non-volatile biogenic amines on the histamine value by visible spectrophotometer detection [J]. Chin Fishery Qual Stand, 2015, 5(4): 17–22.
- [21] 孙永, 刘楠, 李智慧, 等. 抑制性电导检测-离子色谱法快速测定水产品中的生物胺[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 3992–3997.
SUN Y, LIU N, LI ZH, *et al.* Determination of biogenic amines in seafood by suppressed conductance detection ion chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(10): 3992–3997.
- [22] 宋卫得, 许美玲, 高尧华, 等. 离子色谱法同时测定果汁中 20 种有机胺、生物胺和阳离子[J]. 分析试验室, 2020, 39(5): 590–595.
SONG WD, XU ML, GAO YH, *et al.* Simultaneous determination of twenty organic amine, biogenic amines and cations in fruit juice by ion chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2020, 39(5): 590–595.
- [23] 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.
LI G, FANG TT, HU ZY, *et al.* Determination of putrescine, cadaverine, histamine, spermidine in environmental water samples by ion chromatography [J]. Environ Chem, 2014, 33(5): 868–869.
- [24] DERGAL NB, DOUNY C, GUSTIN P, *et al.* Monitoring of biogenic amines in tilapia flesh (*Oreochromis niloticus*) by a simple and rapid high-performance thin-layer chromatography method [J]. J Aquat Food Prod Technol, 2023, 32(1): 23–37.
- [25] ZHANG YM, YU JS, LAI SY, *et al.* Rapid determination of histamine level in seafood using read-out strips based on high-performance thin layer chromatography modified with self-visualization nanomaterials [J]. Food Control, 2021, 122: 107816–107823.
- [26] 杨乔, 吴波, 田冰冰, 等. QTRAP LC-MS/MS 同时测定毛发中 20 种毒品及代谢物[J]. 中国法医学杂志, 2020, 35(3): 283–288.
YANG Q, WU B, TIAN BB, *et al.* Simultaneous determination of 20 illicit

- drugs and metabolites in hair by QTRAP LC-MS/MS [J]. *Chin J Forensic Med*, 2020, 35(3): 283–288.
- [27] 邱玉敏, 肖楠, 王瑞花, 等. QTRAP LC-MS/MS 法检测血、尿中莫达非尼[J]. *刑事技术*, 2023, 48(6): 610–615.
DI YM, XIAO N, WANG RH, *et al.* Determination of modafinil in blood and Urine by QTRAP LC-MS/MS [J]. *Forensic Sci Technol*, 2023, 48(6): 610–615.
- [28] ZHANG T, CHEN L, DING H, *et al.* Identification of metabolite biomarkers in *Salmonella enteritidis*-contaminated chickens using UHPLC-QTRAP-MS-based targeted metabolomics [J]. *Food Chem: X*, 2023, 20: 100966.
- [29] MEKAWI EAN, EBRAHIM AAM, SALIM NS, *et al.* QTRAP LC/MS/MS of garlic nanoparticles and improving sunflower oil stabilization during accelerated shelf life storage [J]. *Foods*, 2022, 11(24): 3962–3962.
- [30] 魏泉增, 汤雅, 李伟民. 液相色谱-串联质谱测定食醋中生物胺含量[J]. *中国酿造*, 2019, 38(4): 170–173.
WEI QZ, TANG Y, LI WM. Determination of biogenic amines in vinegar by LC-MS/MS [J]. *China Brew*, 2019, 38(4): 170–173.
- [31] 沙丽娜, 吐尔洪·买买提, 阿孜古丽·衣该木, 等. 建立检测酱油中 8 种生物胺的液相色谱-串联质谱方法(LC-MS)[J]. *中国调味品*, 2020, 45(11): 151–156.
SHA LN, TURGHUN M, AZIGULI Y, *et al.* Establishment of a LC-MS method for the determination of eight biogenic amines in soy sauce [J]. *China Cond*, 2020, 45(11): 151–156.
- [32] 罗娇依, 郑越男, 刘彤彤, 等. 柱前衍生超高效液相色谱-串联质谱法测定三文鱼中 9 种生物胺[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(17): 6909–6917.
LUO JY, ZHENG YN, LIU TT, *et al.* Determination of 9 kinds of biogenic amines in salmon by precolumn derivatization-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(17): 6909–6917.
- [33] 邢雪, 盛新颖, 郝玉玲, 等. 液相色谱-串联质谱法测定酿造酱油中 12 种生物胺[J]. *食品安全导刊*, 2023, 17: 80–85.
XING X, SHENG XY, HAO YL, *et al.* Determination of 12 biogenic amine in fermented soy sauce by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J] *Chin Food Saf Magaz*, 2023, 17: 80–85.
- [34] AHANGATI H, TAVASSOLI M, KHEZERLOU A, *et al.* A review on the determination of biogenic amines in fresh and processed fish products using HPLC, LC-MS/MS and other chromatographic methods [J]. *Comb Chem High TSCR*, 2023, 25(15): 2598–2606.
- [35] 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.
WANG L, SUN XJ, GENG Y, *et al.* Rapid determination of 9 kinds of biogenic amines in fish by non-derivatization-QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(3): 269–276.
- [36] VERONICA S, GIOVANNI C, MASSIMO R, *et al.* Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [J]. *J Mass Spectrom*, 2014, 49(9): 819–825.
- [37] 蔡勤仁, 冯家望, 张毅, 等. 液相色谱-串联质谱结合谱库检索法同时测定猪组织中 12 种类固醇激素[J]. *色谱*, 2011, 29(8): 712–717.
CAI QR, FENG JW, ZHANG Y, *et al.* Determination of 12 steroid hormone residues in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combining with library search [J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(8): 712–717.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



蔡琼, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: 1846166237@qq.com



余文琴, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: kathy198813@126.com