

高效液相色谱—三重四极杆串联质谱法分析 奶酪中 5 种生物胺

Determination of 5 kinds of biogenic amines in cheeses by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

张 慧¹ 曹 慧² 王 瑾² 肖功年¹ 姜 侃²

ZHANG Hui¹ CAO Hui² WANG Jin² XIAO Gongnian¹ JIANG Kan²

(1. 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023; 2. 浙江省产品质量安全科学研究院, 浙江 杭州 310018)
(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science & Technology, Hangzhou, Zhejiang 310023, China; 2. Zhejiang Institute of Product Quality and Safety Science, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

摘要:目的:为生物胺形成机制的研究和食品安全风险评估提供新的技术思路。方法:建立液相色谱—三重四极杆串联质谱同时检测奶酪中酪胺、2-苯乙胺、色胺、章鱼胺和尸胺的测定方法。采用超声辅助溶剂萃取生物胺, HILIC 色谱柱分离, 三重四极杆质谱正离子多反应监测模式进行测定, 内标法定量; 研究提取溶剂种类、超声时间选择和基质效应对峰面积的影响, 进行方法学验证和评估。结果:以 0.1% 甲酸—乙腈—水溶液为提取溶剂, 超声提取 15 min, 生物胺无需衍生化处理, 以乙酸铵(甲酸调 pH 值为 4)—乙腈为流动相, HPLC-MS/MS 直接测定。5 种生物胺的加标回收率为 78.6%~113.8%, 相对标准偏差为 2.41%~7.12%($n=3$); 色胺、苯乙胺、酪胺和章鱼胺的检出限为 0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 尸胺的检出限为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在各自线性范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99。对市售奶酪样品进行测定, 不同样品中不同的生物胺含量差异较大, 含量范围为 4.45~2 863.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 均在安全范围内。结论:试验所建方法适合奶酪中 5 种生物胺含量的快速检测。

关键词:液相色谱—三重四极杆串联质谱法; 非衍生化; 奶酪; 生物胺; 检测

Abstract: Objective: A new technical idea was provided for the study of biogenic amine formation mechanism and food safety risk assessment. **Methods:** An analytical method was established for determination of tyramine, phenylethylamine, tryptamine,

octopamine and cadaverine in cheeses with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Biogenic amines were extracted by ultrasonic-assisted solvent extraction from cheeses, and were separated by HILIC column, determined by positive electrospray ionization (ESI) with multiple reaction monitoring (MRM) mode, quantified by the internal standard method. The effect of extraction solvent type, ultrasonic time and matrix effect on the peak area was studied, and the performance of the method was validated and evaluated. **Results:** Using 0.1% formic acid (acetonitrile/water) as the extraction solvent, the samples were extracted by ultrasound for 15 min. Ammonium acetate of 5 mmol/L (pH value was adjusted to 4 by formic acid) and acetonitrile were used as the mobile phase, biogenic amines without derivatization were detected by HPLC-MS/MS. The recoveries of 5 biogenic amines were 78.6%~113.8% and relative standard deviations were 2.41%~7.12% at three spiked levels. The limit of detection of tryptamine, phenylethylamine, tyramine and octopamine was 0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limit of quantification was 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; The limit of detection of cadaverine was 1.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limit of quantification was 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The linear relationship was good in the respective linear ranges, and the correlation coefficient was greater than 0.99. The method was used for the determination of commercially available cheese samples. The contents of different biogenic amines in different samples varied greatly, ranging from 4.45 to 2 863.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, which was within the safe range. **Conclusion:** The proposed method was suitable for fast determination of 5 kinds of biogenic amines in cheese.

Keywords: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; without derivatization; cheese; biogenic amines; determination

基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(编号: LGN20C200011)

作者简介:张慧(1972—),女,浙江科技学院正高级工程师,博士。
E-mail: zhanghui0461@163.com

收稿日期:2022-11-27 **改回日期:**2023-05-07

生物胺是一类含氮低分子量有机胺类化合物,常见的有酪胺、组胺、 β -苯乙胺、尸胺、腐胺、色胺等,在多种食品如鱼^[1]、黄酒^[2]、火腿^[3]、豆瓣酱^[4]、干酪^[5]等中都有检出,一般认为是由于食品在加工或贮藏过程中微生物产生的氨基酸脱羧酶对食品中的游离氨基酸进行脱羧基等作用而生成^[6]。生物胺的安全性和含量密切相关,适量的生物胺是体内的活性成分,而过量的生物胺则会引发系列过敏反应,如苯乙胺、酪胺和色胺可导致人体血压升高、偏头痛等症状^[7-8],色胺还会增强其他生物胺的毒性^[9];尸胺可引发恶心、咳嗽、呕吐等问题^[10],还可与亚硝酸盐作用形成亚硝胺。

奶酪中的生物胺含量和形成规律一直备受关注,刘蕾等^[11]对17种中国传统干酪中生物胺进行了分析,不同样品中生物胺均有检出,含量为1.296~41.268 mg/kg。宋雪梅等^[12]研究了牦牛乳干酪在成熟过程中生物胺的变化趋势和细菌群落的结构情况。这些研究大多采用高效液相色谱的方法进行生物胺的分析研究。

当前,食品中生物胺的检测方法有液相色谱法^[13-15]、高分辨质谱法^[16]、气相色谱—质谱法^[17]、离子色谱法^[18]、薄层色谱法^[19]、液相色谱—质谱法^[20-22]等。常见的液相色谱法中,生物胺一般需要衍生化后再进行色谱柱分离和测定,样品前处理复杂、耗时长,并且在探索生物胺形成规律的研究中,存在早期低含量的生物胺无法准确监测的问题。Lee等^[20]采用磺基水杨酸溶液提取米酒中的9种生物胺,经丹磺酰氯衍生后UHPLC-MS/MS进行分析,定量限为0.5~14.0 ng/mL。该法提高了检测的灵敏度,但前处理仍需繁琐的衍生化过程。Huang等^[21]采用2%甲酸溶液提取豆瓣酱中的8种生物胺,SPE小柱净化,C₁₈柱分离,UHPLC-MS/MS直接检测生物胺;Zhang等^[22]采用5%高氯酸提取水产品中的生物胺,经净化和0.5%高氯酸溶液稀释,HSS T3色谱柱分离,HPLC-MS/MS直接测定。以上两种研究方法均无需衍生化处理,大大提高了检测效率。但是仍然存在生物胺出峰不稳定,方法重现性差,以及强酸溶液易腐蚀质谱仪等问题。奶酪基质复杂,而适合奶酪中多种生物胺的高效提取、无需衍生化处理和稳定性好的快速检测方法尚未有相关研究。

研究拟建立超声辅助溶剂萃取、液相色谱—三重四极杆串联质谱技术同时检测奶酪中5种常见生物胺的测定方法,旨在为生物胺形成机制的研究和食品安全风险评估提供新的技术思路。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

奶酪样品:随机购自超市和网店;

酪胺(Tyramine, Tyr; CAS号60-19-5)、2-苯乙胺

(Phenylethylamine, Phe; CAS号64-04-0)、尸胺(Cadaverine, Cad; CAS号1476-39-7):纯度>99%,北京曼哈格生物科技有限公司;

色胺(Tryptamine, Try; CAS号61-54-1)、章鱼胺(Octopamine, Oct; CAS号770-05-8):纯度>98%,北京曼哈格生物科技有限公司;

庚胺内标(Heptylamine, Hep; CAS号111-68-2):纯度>98%,阿拉丁试剂(上海)有限公司;

乙腈:色谱纯,德国Merck公司;

甲酸、乙酸铵:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;试验用水为Milli-Q超纯水。

1.2 仪器与设备

HPLC仪:LC 20AD型,日本岛津公司;

三重四极杆串联质谱仪:5500QTRAP型,美国AB SCIEX公司;

电子天平:FA2004型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

超纯水仪:Milli-Q型,美国密理博公司;

离心机:2-16P型,德国SIGMR公司。

1.3 方法

1.3.1 仪器条件

(1) 色谱条件:采用WATERS Atlantis HILIC Silica色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3 μ m)分离,流动相A为5 mmol/L乙酸铵溶液(pH值为4),B为乙腈;进样量10.0 μ L;柱温40 $^{\circ}$ C;梯度洗脱程序见表1。

(2) 质谱条件:ESI正离子模式;多反应监测(MRM);喷雾电压为5 500 V;离子源温度为550 $^{\circ}$ C;气帘气(N₂)为275 kPa;雾化气(N₂)压力为379 kPa;辅助加热气(N₂)为413 kPa;在电喷雾正离子模式下对质谱参数进行优化。

1.3.2 溶液配制

(1) 生物胺和内标标准储备液:准确称取各标准品10 mg,用0.1 mol/L盐酸溶剂配制质量浓度为1 mg/mL

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient conditions of liquid chromatography

时间/min	流速/ (mL·min ⁻¹)	流动相体积分数/%	
		A 乙酸铵	B 乙腈
0.01	0.6	10	90
1.00	0.6	10	90
5.50	0.6	50	50
5.60	0.6	70	30
8.00	0.6	70	30
8.50	0.6	10	90
10.00	0.6	10	90

的生物胺单标储备液。

(2) 5 种生物胺混合标准中间液:准确吸取各单标储备液,用 0.1%甲酸乙腈溶液配制成质量浓度为 1 mg/L (其中尸胺质量浓度为 2 mg/L)的混合标准溶液,4 ℃冰箱保存。

(3) 标准曲线:准确吸取上述混合标准溶液,采用 0.1%甲酸乙腈溶液配制成 0.5~50.0 μg/L 或 1~200 μg/L 系列溶剂标准工作液,分别加入等量内标溶液。以标准品质量浓度为横坐标,以定量离子和内标离子的峰面积比值为纵坐标,绘制各标准曲线。

1.3.3 提取溶剂的选择 以奶酪样品为基质添加混标,分别采用乙腈、0.1%甲酸乙腈溶液、0.1%甲酸乙腈—水溶液($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=4:1$)各 5 mL 进行提取溶剂的比较研究,选择适合的提取溶剂。

1.3.4 超声时间的选择 以奶酪样品为基质添加混标,设定超声功率为 500 W,分别选取超声 0,5,10,15,20,30,50 min 时间进行超声时间的研究,选择适合的超声时间。

1.3.5 样品处理 准确称取 1 g 研磨好的奶酪样品于 15 mL 具塞离心管中,加入 25 μL 内标准溶液,加入 0.1%甲酸乙腈—水溶液($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}=4:1$)5 mL 涡旋振荡 2 min,超声 15 min,8 000 r/min 离心 5 min,取乙腈—水溶液层用 0.22 μm 滤膜过滤,待测。

1.3.6 方法学验证 选取奶酪样品,分别添加低、中、高 3 个水平的 5 种生物胺混标溶液,按照 1.3.5 方法提取,同时设置空白对照试验,计算相对标准偏差和加标回收率。

1.3.7 数据处理 使用 Analyst Software 软件进行质谱数据采集,MultiQuant 3.0.2 软件进行数据分析,Microsoft Excel 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 色谱和质谱条件的优化

2.1.1 色谱条件的优化 试验考察了 AtlantisTM T3 (150 mm×2.1 mm, 3 μm)、AdvanceBio Glycan Map (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)、HILIC Silica (2.1 mm×150 mm, 3 μm) 3 种不同型号色谱柱的分离效果。结果表明,使用反相色谱柱 T3 柱时 5 种生物胺均未出峰,说明在生物胺 T3 色谱柱上没有保留;正相色谱柱 Glycan 柱和 HILIC 色谱柱上 5 种生物胺均有出峰,但 Glycan 柱峰形较差,而经 HILIC 色谱柱分离后生物胺得到较好的保留和峰形。生物胺是一类分子量较低、极性较强的化合物,HILIC 色谱柱的固定相是硅胶,是具有亲水作用的色谱,适合分离亲水和极性小分子的物质。因此,选择 HILIC 色谱柱进行生物胺的分离。

生物胺还一类碱性物质,流动相的 pH 值和组成会对色谱分离和响应强度有较大的影响。崔晓美等^[23]在测

定鲑鱼中的生物胺时采用 50 mmol/L 甲酸铵(pH 值为 4)—乙腈为流动相时,生物胺呈现保留并分离。叶磊海等^[24]在检测水产品中的生物胺时采用 20 mmol/L 甲酸铵(pH 值为 4)—乙腈为流动相,兼顾了目标物的保留行为和质谱响应。试验分别采用甲酸—乙腈、乙酸铵—乙腈作为流动相进行考察,发现 5 mmol/L 乙酸铵(甲酸调 pH 值为 4)—乙腈为流动相时,5 种生物胺分离效果和峰形较好,目标物响应值高;而 pH 值为 3 时,生物胺均有保留但峰的分离度和峰形较差;pH 值为 5 时,部分生物胺在色谱柱上没有保留。因此,试验选择 5 mmol/L 乙酸铵(甲酸调 pH 值为 4)—乙腈作为流动相。

5 种生物胺多反应监测(MRM)色谱图见图 1。

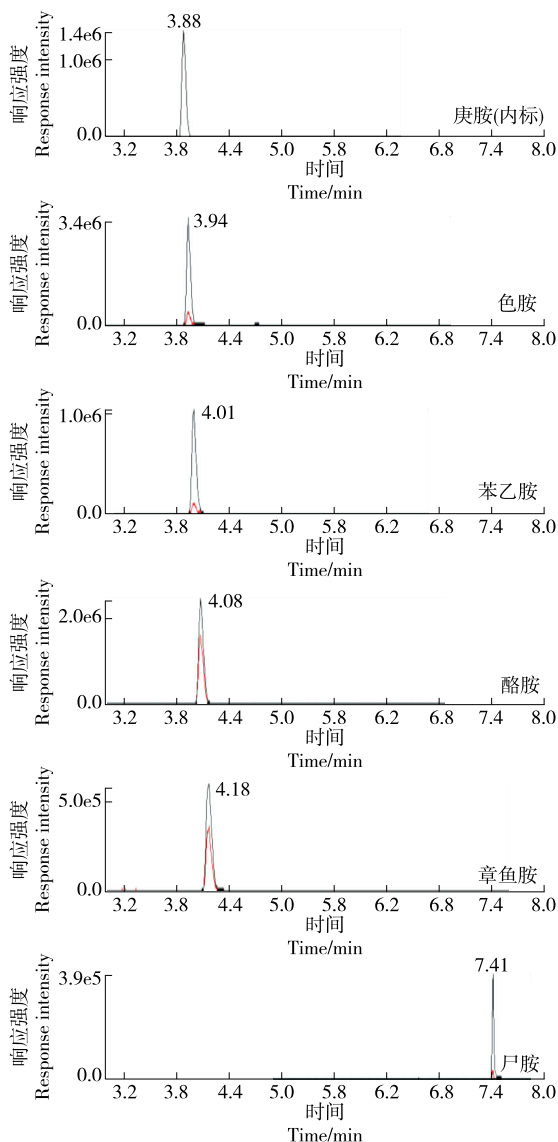


图 1 5 种生物胺的 MRM 色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of 5 kinds of biogenic amines

2.1.2 质谱条件的优化 生物胺的分子中均含有氨基,容易接受质子而形成带正电的分子离子,因此选择在电喷雾正离子模式下进行优化。将50 μg/L的生物胺单标溶液以针泵注射模式直接进样,通过母离子一级质谱分析得到分子离子峰,以分子离子为母离子进行二级质谱分析,得到子离子信息。进一步优化去簇电压和碰撞能量等参数,结果见表2。

表2 生物胺的质谱参数[†]

Table 2 Mass spectrometric parameters of biogenic amines and heptylamine

化合物	保留时间/ min	监测离子对 (<i>m/z</i>)	去簇电 压/V	碰撞电 压/V
庚胺(内标)	3.88	116.0/57.2	38	20
色胺	3.94	161.2/144.1*	27	15
		161.2/115.1	27	43
苯乙胺	4.01	122.2/105.1*	42	32
		122.2/77.0	30	19
酪胺	4.08	138.0/121.0*	42	11
		138.0/77.0	42	38
章鱼胺	4.18	136.0/119.0*	50	17
		136.0/91.0	50	44
尸胺	7.41	103.1/86.1*	27	14
		103.1/69.1	39	22

† * 定量离子。

2.2 提取溶剂的选择

奶酪富含蛋白质等物质,基质较为复杂。一些食品中生物胺的提取溶剂有高氯酸^[25]、三氯乙酸^[26]、乙腈—甲酸铵水溶液^[23]和0.2%甲酸乙腈溶液^[24]等,由于酸性较强的溶液容易对质谱或色谱柱造成损伤,因此,选取乙腈、0.1%甲酸乙腈溶液和0.1%甲酸乙腈—水溶液进行奶酪中生物胺的提取研究,结果见图2。由图2可知,以0.1%甲酸乙腈—水溶液为提取溶剂时,苯乙胺、酪胺、色胺、章鱼胺和尸胺的峰面积均较高,3种提取溶剂的提取

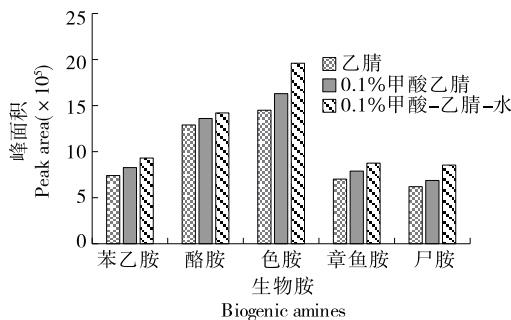


图2 提取溶剂对生物胺色谱峰面积的影响

Figure 2 Effects of extraction solvent on the chromatographic peak area of biogenic amines

效率为0.1%甲酸乙腈—水溶液>0.1%甲酸乙腈溶液>乙腈。因此,选择0.1%甲酸乙腈—水溶液为奶酪中生物胺的提取溶剂。

2.3 超声时间的选择

试验考察了超声时间对生物胺提取效果的影响,结果见图3。图3显示,超声时间为0~10 min时随着处理时间的延长,5种生物胺的提取效率均快速增加,而15 min后峰面积随时间变化趋于平缓,提取效率变化不大。综合考虑,选择超声15 min作为超声提取时间。

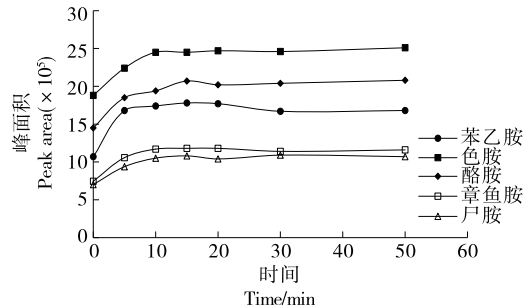


图3 超声时间对生物胺色谱峰面积的影响

Figure 3 Effects of ultrasound time on the chromatographic peak area of biogenic amines

2.4 基质效应

奶酪样品的基质较为复杂,采用液相色谱—串联质谱分析生物胺时,样品中的复杂成分可能会对生物胺的检测造成干扰,产生基质效应。基质效应可以用样品提取后的空白基质加入待测物的响应与流动相配制的等浓度待测物的响应比值来评价,一般认为响应比值越接近1,基质对目标物响应值影响也越小;比值大于1,则基质对目标物响应值有增强作用;比值小于1,基质对目标物响应值有抑制作用。如表3所示5种生物胺的响应比值为0.09~0.67,均远小于1,说明奶酪样品基质对生物胺存在较强的离子抑制作用。由于奶酪样品中均含有不同的生物胺,未发现空白基质样品,因此,采用内标法(以庚胺为内标)来减弱或消除基质效应的影响。

表3 奶酪中生物胺的基质效应

Table 3 Matrix factors of biogenic amines

化合物	基质加标的响应值	标准品的响应值	比值
庚胺(内标)	2.26 × 10 ⁵	1.66 × 10 ⁶	0.14
色胺	8.89 × 10 ⁵	6.78 × 10 ⁶	0.13
苯乙胺	2.67 × 10 ⁵	1.70 × 10 ⁶	0.16
酪胺	4.44 × 10 ⁵	4.86 × 10 ⁶	0.09
章鱼胺	1.55 × 10 ⁵	1.11 × 10 ⁶	0.14
尸胺	4.91 × 10 ⁵	7.25 × 10 ⁵	0.67

2.5 线性方程、检出限和定量限

配制质量浓度梯度为 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 μg/L 以及质量浓度梯度为 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0 μg/L 的系列标准混合溶液, 以定量离子对峰面积和内标离子对峰面积比值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行标准曲线的绘制。在奶酪基质中添加目标物来考察生物胺检测方法的检出限(等于或大于 3 倍信噪比)和定量限(等于或大于 10 倍性噪比), 具体见表 4。由表 4 可知, 5 种生物胺线性相关系数(*r*)为 0.992 3~0.999 5, 其中色胺、苯乙胺、酪胺和章鱼胺在

0.5~50.0 μg/L 范围内线性关系良好, 检出限为 0.75 μg/kg, 定量限为 2.5 μg/kg; 尸胺在 1.0~200.0 μg/L 范围内线性关系良好, 检出限为 1.50 μg/kg, 定量限为 5.0 μg/kg。刘蕾等^[11]采用丹磺酰氯衍生、液相色谱法检测干酪中 8 种生物胺, 生物胺的定量限为 0.52~10.10 μg/mL。Zhang 等^[22]建立了水产品中生物胺的 HPLC-MS/MS 检测方法, 提取的生物胺未经衍生化处理直接测定, 各生物胺的定量限为 0.25~2.50 mg/kg。试验中 5 种生物胺的定量限为 2.5~5.0 μg/kg, 方法的灵敏度较高。

表 4 生物胺的线性方程、检出限和定量限

Table 4 The linear equation, LODs and LOQs of biogenic amines

化合物	线性范围/(μg · L ⁻¹)	线性方程	相关系数	检出限/(μg · kg ⁻¹)	定量限/(μg · kg ⁻¹)
色胺	0.5~50.0	Y=0.336 9x+0.139 3	0.992 3	0.75	2.5
苯乙胺	0.5~50.0	Y=0.373 9x+0.004 9	0.997 6	0.75	2.5
酪胺	0.5~50.0	Y=0.243 8x+0.083 9	0.998 7	0.75	2.5
章鱼胺	0.5~50.0	Y=0.292 9x+0.002 5	0.999 5	0.75	2.5
尸胺	1.0~200.0	Y=0.044 2x+0.049 2	0.997 9	1.50	5.0

2.6 加标回收与精密度

选取合适的奶酪样品分别进行低、中、高 3 个水平的加标回收试验, 加标回收率和相对标准偏差结果见表 5。结果显示: 奶酪中 5 种生物胺的平均回收率为 78.6%~113.8%, 相对标准偏差为 2.41%~7.12% (*n*=3)。方法回收率和精密度良好, 满足奶酪样品中 5 种生物胺的分析测定要求。

表 5 生物胺的回收率与精密度

Table 5 Recovery and RSD of biogenic amines (*n*=3)

生物胺	加标量/(μg · kg ⁻¹)	回收率/%	相对标准偏差/%
色胺	25	103.2	4.51
	75	99.6	3.19
	125	107.7	2.48
苯乙胺	25	101.8	2.89
	75	109.7	5.46
	125	113.8	4.76
酪胺	25	81.5	6.11
	75	78.6	3.25
	125	80.3	2.93
章鱼胺	25	91.9	3.64
	75	93.8	7.12
	125	86.5	2.41
尸胺	50	85.9	4.43
	150	81.6	3.56
	250	80.5	2.12

2.7 实际样品的测定

采用所建立的检测方法, 对随机购买的市售奶酪棒、再制干酪片、原制奶酪等 8 个样品进行测定。所有样品均有不同的生物胺检出, 其中 3 个奶酪棒样品均有酪胺检出, 含量最高为 12.60 μg/kg, 色胺和章鱼胺均未检出; 2 个再制干酪片样品中除章鱼胺均未检出外, 其他均有检出, 最高的为酪胺 (922.00 μg/kg), 其次为苯乙胺 (86.20 μg/kg); 3 个原制奶酪样品中含量最高的也为酪胺 (2 863.00 μg/kg), 其次为苯乙胺 (625.00 μg/kg), 章鱼胺均未检出。在所有样品中 5 种生物胺总量最高的是原制奶酪样品 8 号, 含量为 3 282.00 μg/kg, 其次为再制干酪片 5 号, 含量为 1 031.00 μg/kg。这 5 种生物胺中, 酪胺和苯乙胺为检出含量较高的生物胺, 对于原制奶酪可能是奶酪成熟过程中由酪氨酸和苯丙氨酸分别通过脱羧基反应转化而来, 而再制干酪则通常是以原制奶酪为原料进行加工, 由此引入生物胺。一般认为摄入 100 mg 的酪胺或 3 mg 的苯乙胺即可引发偏头痛等不良反应^[7-8], 此次 8 个样品中的酪胺和苯乙胺均在安全范围内。杨姗姗等^[27]采用毛细管高效液相色谱从 1 个市售奶酪样品中检出章鱼胺, 而此次试验所有样品均未发现章鱼胺。不同的奶酪样品可能由于发酵剂种类、工艺过程或贮存环境等多种因素的影响, 其生物胺种类也会有所不同。

3 结论

试验建立了液相色谱—三重四极杆串联质谱同时检测奶酪中 5 种生物胺的测定方法, 样品以 0.1% 甲酸乙

表 6 奶酪样品中生物胺含量测定结果[†]

Table 6 Determination of biogenic amine in cheese sample (n=3) μg/kg

样品	色胺	苯乙胺	酪胺	章鱼胺	尸胺	总量
奶酪棒 1	ND	ND	12.6±0.24	ND	ND	12.60±0.24
奶酪棒 2	ND	ND	4.45±0.13	ND	6.75±0.39	11.20±0.26
奶酪棒 3	ND	9.78±0.16	11.70±0.27	ND	13.10±0.23	34.60±0.22
再制干酪片 4	4.72±0.24	17.50±0.11	9.32±0.43	ND	12.20±0.56	43.70±0.34
再制干酪片 5	8.64±0.31	86.20±0.69	922.00±2.38	ND	14.60±0.42	1 031.00±0.95
原制奶酪 6	ND	27.90±0.57	11.80±0.46	ND	151.00±1.47	190.00±0.83
原制奶酪 7	9.21±0.23	625.00±1.19	114.00±1.63	ND	29.90±0.64	778.00±0.92
原制奶酪 8	251.00±2.28	152.00±1.07	2 863.00±3.45	ND	16.40±0.29	3 282.00±1.77

† ND 为未检出。

腈—水溶液为提取溶剂,经超声提取 15 min,无需衍生化,以 5 mmol/L 乙酸铵(甲酸调 pH 值为 4)—乙腈作为流动相,采用 HILIC 色谱柱分离,正离子多反应监测模式进行测定,内标法消除基质效应并定量。结果表明,5 种生物胺的回收率为 78.6%~113.8%,相对标准偏差为 2.41%~7.12%(n=3),色胺、苯乙胺、酪胺和章鱼胺的检出限为 0.75 μg/kg,定量限为 2.50 μg/kg;尸胺的检出限为 1.50 μg/kg,定量限为 5.0 μg/kg;相关系数均大于 0.99,线性关系良好。采用所建方法对市售奶酪样品进行测定,8 个样品均有不同的生物胺检出,含量范围为 4.45~2 863.00 μg/kg,不同样品中不同的生物胺种类含量差异较大,含量最高的为酪胺(2 863.00 μg/kg),其次为苯乙胺(625.00 μg/kg),均在安全范围内。试验所建方法中样品经提取后无需衍生化,即可对奶酪中 5 种生物胺快速、准确的定性、定量,大幅提高了工作效率,可作为液相色谱方法的补充,为生物胺的形成机制探索和风险评估研究提供新的技术手段。

参考文献

[1] 丁海燕,孙晓杰,宁劲松,等. 储藏温度对 3 种海水鱼产生生物胺的规律影响研究[J]. 食品科技, 2018, 43(9): 172-177.
DING H Y, SUN X J, NING J S, et al. Study on the regular of biogenic amines from three marine fish stored at different temperature [J]. Food Science and Technology, 2018, 43 (9): 172-177.

[2] 宋颖,董全. 黄酒中生物胺的形成与控制研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 387-391.
SONG Y, DONG Q. Research progress in formation and control of the biogenic amine in Chinese rice wine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(8): 387-391.

[3] 胡永金,薛桥丽,李泽众,等. 四川火腿加工过程中生物胺的变化规律[J]. 轻工学报, 2018, 33(5): 1-8.
HU Y J, XUE Q L, LI Z Z, et al. The change rule of biogenic amines during the processing of Sanchuan ham[J]. Journal of Light

Industry, 2018, 33(5): 1-8.

[4] 李东蕊,刘红霞,吴剑荣,等. 豆瓣酱工业发酵过程中生物胺的生成规律[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 78-82.
LI D R, LIU H X, WU J R, et al. The regular pattern of biogenic amine formation during the industrial fermentation of broad bean paste[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(9): 78-82.

[5] 刘景,任婧,王渊龙,等. 中国地区干酪生物胺风险评估中膳食暴露评估模型的构建[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 289-294.
LIU J, REN J, WANG Y L, et al. Probability estimate modeling of risk assessment on dietary exposure to biogenic amines via cheeses in China[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34 (23): 289-294.

[6] SANTOS M H S. Biogenic amines: Their importance in foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 29: 213-231.

[7] SANDLER M, YOUDIM M B H, HANINGTON E. A phenylethylamine oxidising defect in migraine[J]. Nature, 1974, 250 (5 464): 335-337.

[8] ANLI R E, VURAL N, YILMAZ S, et al. The determination of biogenic amines in Turkish red wines [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2004, 17(1): 53-62.

[9] BRINK B T, DAMINK C, JOOSTEN H M, et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 1990, 11(1): 73-84.

[10] KUNG H F, LEE Y C, HUNG Y R, et al. Biogenic amines content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork and poultry in tuna dumpling products[J]. Food Control, 2010, 21(7): 977-982.

[11] 刘蕾,牛天娇,陈历水,等. 我国传统干酪中生物胺含量检测分析[J]. 中国酿造, 2018, 37(2): 164-168.
LIU L, NIU T J, CHEN L S, et al. Determination and analysis of biogenic amines in Chinese traditional cheese[J]. China Brewing, 2018, 37(2): 164-168.

[12] 宋雪梅,宋国顺,梁琪,等. 牦牛乳硬质干酪成熟过程中生物胺与细菌群落结构分析[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 27-33.
SONG X M, SONG G S, LIANG Q, et al. Analysis of biogenic amines and bacterial community composition during the ripening of hard cheese made from Yak's milk[J]. Food Science, 2021, 42

- (23): 27-33.
- [13] MAYER H K, GREGOR F. UHPLC analysis of biogenic amines in different cheese varieties[J]. *Food Control*, 2018, 93: 9-16.
- [14] VIEIRA C P, COSTA M P, SILVA V L M, et al. Development and validation of RP-HPLC-DAD method for biogenic amines determination in probiotic yogurts [J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, 12: 1-16.
- [15] 刘慧琳, 赵源, 张瑛, 等. 白酒和黄酒中生物胺的高效液相色谱分析法[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(8): 248-254.
LIU H L, ZHAO Y, ZHANG Y, et al. Determination of biogenic amines in Baijiu and Chinese rice by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(8): 248-254.
- [16] 丁涛, 吕辰, 柳茵, 等. 高效液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱检测葡萄酒中 8 种生物胺[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(1): 27-32.
DING T, LU C, LIU H, et al. Determination of eight biogenic amines in red wines by liquid chromatography quadrupole/electrostatic field orbit trap mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2014, 33(1): 27-32.
- [17] FABJANOWICZ M, NSKA A R, KALINOWSKA K, et al. Miniaturized, green salting-out liquid-liquid microextraction coupled with GC-MS used to evaluate biogenic amines in wine samples[J]. *Microchemical Journal*, 2022, 180: 107616.
- [18] MICHAKSKI R, UTYSKA P P, KERNERT J. Determination of ammonium and biogenic amines by ion chromatography: A review [J]. *Journal of Chromatography A*, 2021, 1 651: 462319.
- [19] ROMANO A, KLEBANOWSKI H, GUERCHE S L, et al. Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135: 1 392-1 396.
- [20] LEE S H, YOO M, SHIN D B. The identification and quantification of biogenic amines in Korean turbid rice wine, Makgeolli by HPLC with mass spectrometry detection[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 62: 350-356.
- [21] HUANG Y K, SONG Y N, CHEN F, et al. Simultaneous determination of eight biogenic amines in the traditional Chinese condiment Pixian Douban using UHPLC-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2021, 353: 129423.
- [22] ZHANG X, FANG C L, HUANG D M, et al. Determination of 8 biogenic amines in aquatic products and their derived products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization [J]. *Food Chemistry*, 2021, 361: 130044.
- [23] 崔晓美, 陈树兵, 陈杰, 等. 基质分散固相萃取—亲水作用色谱—串联质谱法测定鲤鱼中 5 种生物胺的含量[J]. *分析化学*, 2013, 41(12): 1 869-1 874.
CUI X M, CHEN S B, CHEN J, et al. Phase dispersion extraction with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(12): 1 869-1 874.
- [24] 叶磊海, 裴均陶, 钟世欢, 等. 基于 PriME 净化的高效液相色谱—串联质谱法检测水产品中 9 种生物胺[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(9): 253-257.
YE L H, QIU J T, ZHONG S H, et al. Determination of 9 kinds of biological amines in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on PriME solid phase extraction [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(9): 253-257.
- [25] 曾立威, 蔡翔宇, 吴玉杰, 等. 超高效液相色谱法同时快速测定多种动物源食品中 9 种生物胺的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(3): 968-974.
ZENG L W, CAI X Y, WU Y J, et al. Rapid and simultaneous determination of 9 kinds of biogenic amines in various animal-derived foodstuffs by ultra performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(3): 968-974.
- [26] 陈召桂, 郑国建, 朱玲琳. 液相色谱—串联质谱法测定腐乳中的生物胺[J]. *中国酿造*, 2020, 39(12): 160-163.
CHEN Z G, ZHENG G J, ZHU L L. Determination of biogenic amine in sufu by LC-MS/MS[J]. *China Brewing*, 2020, 39(12): 160-163.
- [27] 杨姗姗, 杨亚楠, 李雪霖, 等. 在线固相萃取—毛细管高效液相色谱联用测定奶酪中的生物胺[J]. *分析化学*, 2016, 44(3): 396-402.
YANG S S, YANG Y N, LI X L, et al. Determination of biogenic amines in cheese by on-line solid phase extraction coupled with capillary high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(3): 396-402.

欢迎订阅 2024 年《粮油科学与工程》

《粮油科学与工程》期刊是经国家新闻出版署批准,《现代面粉工业》更名的期刊,由江苏省教育厅主管、江苏科技大学主办。被中国核心期刊(遴选)数据库、万方数据库、知网数据库、维普期刊数据库全文收录。

《粮油科学与工程》是一本中文科技期刊,是中国粮食行业协会小麦分会、江苏省粮油学会会刊。期刊为粮油领域的研究和学术交流搭建了新平台,旨在推动粮油领域的科学研究和技术创新,保障国家粮食安全。

《粮油科学与工程》主要刊载粮食、油脂、食品等方面的研究成果,栏目包括:粮油科学与工程、粮油质量与安全、粮油生产与管理、粮油经济与市场、粮油文化与健康、粮油营养与健康、粮油节约与减损、粮油创新与改良。

《粮油科学与工程》是国内外公开发行的刊物,邮发代号:28-343,国内统一连续出版物号:CN 32-1912/TS,国际标准连续出版物号:ISSN 2097-3551。双月刊,每月 15 日出版,大 16 开 56 页,每期定价 8.00 元,全年定价 48.00 元。

地址:江苏省镇江市丹徒区长晖路 666 号(邮编:212100)

投稿邮箱:xdfmgy@163.com jsmftx@163.com

编辑部电话:0511-84401750 13295222192(微信)