

## 实验技术与方法

## 高效液相色谱法检测葡萄酒中的8种生物胺

张文豪,张伟,张利锋,夏方,银恭举,张丁

(河南省疾病预防控制中心 卫生检测检验中心,河南 郑州 450016)

**摘要:**目的 建立快速测定葡萄酒中的组胺、尸胺、腐胺、酪胺、色胺、精胺、亚精胺和 $\beta$ -苯乙胺的液相色谱分析方法。方法 采用邻苯二甲醛/巯基乙胺混合溶液为衍生化试剂,设置在线自动衍生化进样程序,反相高效液相色谱法测定葡萄酒中的8种生物胺。结果 在0.25~10 mg/L范围内,液相色谱的荧光响应值与葡萄酒中生物胺含量呈线性关系,8种生物胺的检出限在20~100  $\mu$ g/L范围之内, $RSD < 5\%$ ,日间精密度在2.5%~6.3%之间,加标回收率在91.2%~104.1%之间。结论 本方法在25 min内能够测定葡萄酒中的8种生物胺,操作简单、结果准确可靠、重现性好。

**关键词:**生物胺;高效液相色谱法;葡萄酒;在线衍生;食品安全;食品污染物

中图分类号:R155; O657.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)04-0404-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.04.012

### High performance liquid chromatography method for rapid determination of eight kinds of biogenic amines in wine

ZHANG Wen-hao, ZHANG Wei, ZHANG Li-feng, XIA Fang, YIN Gong-ju, ZHANG Ding

(Center for Hygienic Monitoring and Testing, Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Henan Zhengzhou 450016, China)

**Abstract: Objective** This paper reports a new, simple and rapid method to determine histamine, cadaverine, putrescine, tyramine, tryptamine, spermine, spermidine and  $\beta$ -phenylethylamine in wine without sample pretreatment. **Methods** Following automatic online derivatization with a mixed solution of cysteamine and o-phthalaldehyde, eight kinds of biogenic amines in wine were separated on a high performance liquid chromatography instrument with a  $C_{18}$  column. **Results** The linear range of the proposed method was validated in the range 0.25-10 mg/L. The relative standard deviation was less than 5%, and the intermediate precision ranged from 2.5 to 6.3%. The recoveries varied from 91.2% to 104.1%, and the detection limits varied from 20 to 100  $\mu$ g/L for the eight kinds of biogenic amines. **Conclusion** The method is able to accurately determine the content of eight kinds of biogenic amines in wine with good reproducibility, accurate quantization and without sample pretreatment.

**Key words:** Biogenic amine; high performance liquid chromatography; wine; online derivative; food safety; food contaminant

生物胺(BA)是一类具有生物活性的低分子量含氮有机物的总称。人体若摄入过量的生物胺,会引起头痛、呼吸紊乱、心悸、血压变化等症状或体征,甚至会危及生命<sup>[1]</sup>;流行病学研究表明,人体摄入过量的生物胺会导致肿瘤发生率的明显上升<sup>[2]</sup>。发酵食品和酒精类饮料的生产、加工和储藏过程所处环境的污染会导致食品中生物胺含量增加<sup>[3]</sup>;因

此,生物胺种类和含量的监测是控制发酵食品卫生质量的一个重要方面,是关乎食品卫生和疾病预防的重要问题之一<sup>[4]</sup>。

发酵食品中最常见的生物胺有腐胺、组胺和尸胺等单胺和多胺,这些生物胺的分子结构中没有生色团,无明显的紫外可见吸收和荧光信号。生物胺检测前通常需要和有机试剂进行衍生反应,其中最常用的有丹黄酰氯和邻苯二甲醛<sup>[5]</sup>。丹黄酰氯和生物胺反应形成具有紫外可见吸收的衍生物,孙钦秀等<sup>[6]</sup>总结了采用丹黄酰氯液相色谱-紫外检测器测定生物胺的研究进展。与紫外可见吸收法相比,荧光方法的检测灵敏度高,基质干扰少,检出限低<sup>[5]</sup>。Padovan等<sup>[7]</sup>研究了高效液相

收稿日期:2015-04-29

基金项目:河南省医学科技攻关项目(200903152)

作者简介:张文豪 男 研究员 研究方向为食品分析

E-mail:1710315855@qq.com

通讯作者:张丁 男 主任医师 研究方向为公共卫生与食品污染物风险评估 E-mail:zhangd222@hncdc.com.cn

色谱荧光法测定发酵食品中的生物胺和其他氨基化合物的反应条件,用邻苯二甲醛(OPA)为荧光衍生剂。OPA和生物胺反应形成的衍生物荧光稳定性较差,人工操作难以保证每次的反应条件完全一致,导致检测结果的重现性差。本研究设置液相色谱自动衍生进样程序检测生物胺,克服人工操作误差大、耗时费力等缺点。建立一种无需复杂的样品前处理,简单快速测定葡萄酒中的组胺、尸胺、腐胺、酪胺、色胺、精胺、亚精胺和β-苯乙胺含量的液相色谱分离方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent)、Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 美国 Waters), 电子天平、超声波清洗仪、纯水仪、高速离心机。

组胺(00385)、尸胺(00198)、腐胺(00702)、酪胺(00217)、色胺(90508)、精胺(05639)、亚精胺(00489)和β-苯乙胺(00689)均购自美国 Sigma, 邻苯二甲醛和巯基乙胺为优级纯, 甲醇和乙腈为色谱纯, 试验用水全部为超纯水。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 标准溶液的配制

分别精密称取 8 种生物胺标准品 0.04 g(精确到 0.000 1 g)至 1 000 ml 棕色容量瓶中,用超纯水分别配制成 40.0 mg/L 的标准品储备溶液,4 ℃ 冰箱保存。临用前配制为浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L 的混合标准使用液。

#### 1.2.2 衍生试剂的配制

将 50.0 mg 的 OPA 溶解在 10 ml 甲醇溶液中,400.0 mg 的巯基乙胺溶解在 50.00 ml 硼砂缓冲液中,将以上两种溶液混合均匀后形成衍生化试剂,配制的衍生溶液在 4 ℃ 冰箱保存(保存时间不超过 3 d)。

#### 1.2.3 样品前处理

选择河南省市售的 4 种葡萄酒样品(干红,半干红,干白,半干),将瓶中的样品充分混合均匀,量取 50 ml 样品溶液置于离心管中,高速离心机 14 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.45 μm 过滤膜净化后。

#### 1.2.4 仪器条件

色谱条件: Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.02 mmol/l 弱碱性硼酸-硼砂缓冲液(pH = 8.0), 流动相 B 为甲醇; 流速 1.0 ml/min, 采用梯度洗脱的方式, 具体梯度程序见表 1, 柱温 25 ℃, 进样量 5.0 μl。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	65	35
7	20	50
13	40	60
15	35	65
20	40	60
21	65	35
25	65	35

荧光检测条件: 荧光检测器激发波长 330 nm, 发射波长 440 nm。

### 1.2.5 在线衍生程序设定

在液相色谱样品盘 1 号位置放置硼酸-硼砂缓冲液, 2 号位置放置 OPA 衍生试剂。在线衍生程序的仪器操作步骤设定过程如下: ① 仪器进样针在 1 号位置吸取 2.0 μl 硼酸-硼砂缓冲液; 吸取的溶液置于反应池中; ② 吸取 5.0 μl 的样品溶液置于反应池中; ③ 上述两种溶液在反应池中混合 7 次; ④ 10% 甲醇溶液清洗进样针 3 次; ⑤ 进样针吸取 3.0 μl 的衍生化溶液置于反应池中; ⑥ 将缓冲溶液、衍生试剂和样品溶液在反应池中混合 20 次, 等待 3 min; ⑦ 吸取 3.0 μl 的超纯水溶液; ⑧ 将上述溶液混合 7 次; ⑨ 液相色谱进样器按照上述程序自动进样。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

弱碱性的硼酸-硼砂缓冲液可以抑制生物胺分子中氨基的电离, 增加生物胺在反相色谱柱上的保留; 试验采用 0.02 mmol/L 弱碱性的硼酸-硼砂缓冲液(pH = 8.0)为流动相 A, 在试验中通过调整液相色谱流动相 B(甲醇)的比例, 在 25 min 内完全分离 8 种生物胺(见表 1)。

碱性物质在 C<sub>18</sub> 色谱柱上分离时易产生拖尾现象, 试验发现在流动相 A 中加入 0.2% 三乙胺可适当改善峰形; 流动相所使用的梯度洗脱也会导致个别组分的色谱峰宽度增加, 在试验中需要适当的调整梯度洗脱程序来避免样品杂质的干扰, 本方法设定的梯度洗脱程序仅为参考条件。

按照优化的液相色谱分离条件, 设置仪器在线自动进样程序, 将生物胺混和标准溶液(10.0 mg/L)经在线衍生后色谱分离, 在 25 min 内, 8 种生物胺在 C<sub>18</sub> 反相色谱柱上得到完全的分离, 见图 1。

### 2.2 衍生化试剂的选择

生物胺和 OPA 形成的有机衍生物的稳定性较差, 导致试验结果的重现性和准确性不理想。加入含巯基的试剂可以提高衍生产物的稳定性; 试验中加入巯基乙醇, L-半胱氨酸, 巯基乙胺和巯基乙酸等

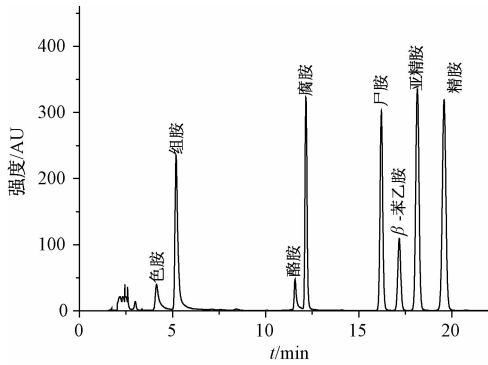


图1 液相色谱自动衍生检测8种生物胺

Figure 1 Determine eight kinds of biogenic amines with automated online derivatisation on a high performance liquid chromatography

巯基试剂,结果发现加入巯基乙胺(CA)后可以提高生物胺/OPA 衍生产品的稳定性,故本研究以 OPA/CA 混合溶液做为生物胺的衍生化试剂,并采用仪器自动进样器柱前衍生法检测生物胺。

### 2.3 方法的准确度和精确度

采用单标法确定8种生物胺的保留时间,并将不同浓度的8种生物胺混合标准溶液进样,在0.25~10 mg/L 线性范围内,液相色谱的荧光响应值与葡萄酒中8种生物胺含量呈线性关系。并根据3倍样品空白测定浓度值的标准偏差计算8种不同生物胺的检出限。分别配制浓度为5.0 mg/L的8种生物胺标准品溶液,平行测定7次,计算相对标准偏差;经24 h后重新测定,计算日间精密度,见表2。

表2 方法的准确度测定结果( $n=7$ )

Table 2 Methods the accuracy of results

组分	检出限/( $\mu\text{g/L}$ )	RSD/%	日间精密度/%
色胺	96.5	4.5	6.3
组胺	21.5	1.9	2.8
酪胺	72.6	4.1	5.1
腐胺	42.8	2.9	3.8
尸胺	43.6	3.1	3.9
$\beta$ -苯乙胺	56.7	3.7	4.2
亚精胺	31.5	2.3	2.8
精胺	25.4	1.8	2.5

选择某种葡萄酒样品进行样品加标测试,分别取高、中、低3个浓度系列做回收试验,评价不同添

加水平的可靠性;对于样品中存在的生物胺组分,每个浓度要做样品含量0.5、1、2倍3个含量值的加标回收试验;对于本底值很低或未检出的组分,按照10倍检出限的含量进行添加,放置一定时间后做回收试验。每个试验平行测定3次,计算样品加标回收率,8种不同生物胺的加标回收率结果见表3。从表中可以看出,8种生物胺的加标回收率在91.2~104.1%之间。

表3 回收率试验结果( $n=3$ )

Table 3 Results of recovery rate of determination

组分	含量/( $\text{mg/L}$ )	加标浓度/( $\text{mg/L}$ )	测定值/( $\text{mg/L}$ )	回收率/%
腐胺	—	0.43	0.40	93.7
尸胺	—	0.44	0.43	98.1
		0.31	0.29	94.5
组胺	0.62	0.62	0.60	97.3
		1.24	1.22	98.2
		0.29	0.26	91.2
酪胺	0.58	0.58	0.54	92.5
		1.16	1.09	93.7
色胺	—	0.97	0.89	91.4
亚精胺	—	0.32	0.33	104.1
苯乙胺	—	0.58	0.59	101.9
精胺	—	0.25	0.24	97.8

注:—表示未检出

### 2.4 生物胺检测方法的验证与比较

食品(包括葡萄酒)中生物胺的国家标准检测方法为GB/T 5009.208—2008《食品中生物胺含量的测定》<sup>[8]</sup>(以下简称为国标方法),样品经5%三氯乙酸提取后采用三氯甲烷-正丁醇萃取净化,与丹磺酰氯在60℃下反应30 min后以1,7-二氨基庚烷内标法定量。选择空白葡萄酒样品添加8种生物胺标准品(添加水平均为2.0 mg/L),将国标方法与本试验方法的检测结果进行对比,结果如表4所示,两种方法对阳性样品的检测结果基本一致,本试验所建立的方法针对葡萄酒样品的检测结果更接近添加值,表明了本研究所建立的方法的准确可靠性。另外,国标方法包括提取,净化,氮吹和柱前衍生等多项操作步骤,方法操作复杂。本方法直接仪器在线衍生反应测定样品中的8种生物胺,无需复杂的样品前处理技术,结果准确可靠。

表4 不同样品和检测方法中8种生物胺检出结果的比较

Table 4 Comparison of biogenic amines detection methods

样品类型	检测方法	检测值/( $\text{mg/L}$ )							
		色胺	组胺	酪胺	腐胺	尸胺	$\beta$ -苯乙胺	亚精胺	精胺
空白加标样品	1	1.85	1.95	1.87	1.89	2.11	2.03	2.18	1.93
	2	1.88	1.91	1.95	1.92	1.78	1.93	1.65	1.86
阳性样品	1	—	2.65	0.87	0.32	2.45	—	—	—
	2	—	2.73	0.95	0.38	2.38	—	—	0.19

注:—表示未检出;1表示检测方法是国标方法,2表示检测方法为本研究建立的方法;加标水平为2.0 mg/L

### 2.5 实际样品的测定

按照所设定的样品衍生化程序进样,测定 3 次,计算平均值。从葡萄酒样品测定结果发现,大部分品种的葡萄酒中存在一定含量的组胺;部分

种类的葡萄酒中存在不同含量的酪胺、尸胺、腐胺和精胺;少量种类的葡萄酒中存在亚精胺和  $\beta$ -苯乙胺,而抽检的几种样品中的色胺含量处于检测限以下,见表 5。

表 5 葡萄酒中生物胺的检测结果(mg/L)

Table 5 Determination of biogenic amines in wines

样品种类	色胺	$\beta$ -苯乙胺	组胺	酪胺	尸胺	腐胺	亚精胺	精胺
干红	—	—	2.73	0.95	2.38	0.38	—	0.19
半干红	—	0.86	5.21	1.37	5.67	1.21	0.71	0.36
干白	—	—	1.52	0.89	—	0.11	—	—
半干白	—	—	0.37	0.33	—	—	—	0.23

注:—表示未检出

### 3 小结

本研究采用 OPA/CA 为衍生化试剂,经柱前仪器在线自动衍生化后高效液相色谱快速检测葡萄酒中的 8 种生物胺。在 0.25 ~ 10 mg/L 范围内,液相色谱的荧光响应值与葡萄酒中 8 种生物胺含量呈线性关系,检出限范围在 20 ~ 100  $\mu$ g/L,  $RSD < 5\%$ , 日间精密度在 2.5% ~ 6.3% 范围内,加标回收率范围为 91.2% ~ 104.1%。本研究建立的方法操作简单快捷、检测结果灵敏度高和重现性好,适用于葡萄酒中多种生物胺含量的准确测定。

### 参考文献

[ 1 ] 李志军,吴永宁,薛长湖.生物胺与食品安全[J].食品与发酵工业,2005,30(10):84-91.  
 [ 2 ] Anli R E, Bayram M. Biogenic amines in wines [J]. Food Res

Int, 2009,25(1):86-102.  
 [ 3 ] Bulushi I A, Poole S, Deeth H C, et al. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation—a review [J]. Crit Rev Food Sci, 2009, 49(4):369-377.  
 [ 4 ] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Res Int, 1996, 29(7):675-690.  
 [ 5 ] Önal A, Tekkeli S E, Önal C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1):509-515.  
 [ 6 ] 孙钦秀,陈倩,孔保华,等.高效液相色谱技术检测食品中生物胺的研究进展[J].食品工业,2014,35(12):193-198.  
 [ 7 ] Padovan G J, Leme I A, Fassini P G, et al. A new o-phthaldialdehyde (OPA) solution for fluorescence HPLC amine group detection without boric acid preparation [J]. J Chromatograph Separat Techniq, 2014, 5(3):2-5.  
 [ 8 ] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.208—2008 食品中生物胺含量的测定[S].北京:中国标准出版社,2008.

· 请示批复 ·

## 食品药品监管总局办公厅关于袋装火腿肠等产品包装标识有关问题的复函

食药监办食监一函[2015]361号

中国肉类协会:

你会《关于袋装火腿肠等产品包装标识问题的请示》收悉。经研究,现函复如下:

依据《中华人民共和国食品安全法》规定,食品标签应当标注在食品包装或者包装容器上。我们同意你会就单支产品采用 PVDC 作为肠衣,通过组合形式包装的袋装火腿肠等产品提出的标签标注意见。即,生产企业可以将外包装袋作为袋装火腿肠等产品的最小销售单元,并按照相关法律法规和标准的规定标示食品的标签。

(相关链接:<http://www.cfd.gov.cn/WS01/CL1601/123018.html>)

食品药品监管总局办公厅  
二〇一五年六月二十九日