



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107782834 B

(45)授权公告日 2020.02.21

(21)申请号 201610727898.1

审查员 冯婷

(22)申请日 2016.08.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107782834 A

(43)申请公布日 2018.03.09

(73)专利权人 中国科学院大连化学物理研究所

地址 116023 辽宁省大连市中山路457号

(72)发明人 许国旺 傅燕青 赵春霞 路鑫

周智慧

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司

公司 21002

代理人 马驰

(51)Int.Cl.

G01N 30/88(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种针对鱼中生物胺的快速分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种针对鱼中生物胺的快速分析方法。针对常见的生物胺(胍基丁胺,组胺,酪胺,精胺,亚精胺,2-苯乙胺,色胺,尸胺,腐胺等9种生物胺),采用5-磺基水杨酸作为提取溶剂,珠打研磨作为提取方法,苯甲酰氯作为衍生试剂,采用液相色谱-三重四级杆质谱联用仪进行靶向分析。基于优化得到的响应最佳的离子对作为定量离子对,响应次之的离子对作为辅助定性离子对,进行多反应监测模式的检测。此发明大大缩短了样品提取时间和生物胺衍生时间,从而极大地缩短了整个分析过程的分析时间。本发明分析方法具有样品前处理简单、衍生快速、检测灵敏度高,重复性好等优点。

1. 一种针对鱼中生物胺的快速分析方法,其特征在于:

(1) 将鱼肉组织均质化之后,采用5-磺基水杨酸作为提取溶剂,珠打研磨作为提取方法进行生物胺的提取;

(2) 将提取后的样品溶液进行稀释之后,加入苯甲酰氯溶液进行衍生,衍生反应在室温条件下涡旋即可完成,待反应结束后,离心,取上清液用于检测分析;

(3) 采用液相色谱-三重四级杆质谱联用仪的多反应监测模式进行样本分析;

(4) 采用内标法对生物胺衍生物进行定量分析,获得鱼中生物胺的含量;

步骤(1)中将获得的鱼去皮剔骨除内脏后放入料理机中进行粗均质,粗均质转速为10000-20000转/分,均质时间为1-5 min;

实际样品分析:称取20 mg \pm 0.5 mg粗均质后的鱼肉组织置于ep管中,依次加入氧化锆小球,300 μ L浓度为5 mg/mL的5-磺基水杨酸溶液,100 μ L浓度皆为4.5 μ g/mL的1-庚胺和1,7-庚二胺内标溶液,100 μ L体积浓度为20%的乙腈溶液,之后采用混合研磨仪在20-25 Hz的条件下研磨提取1 min,重复2-4次,研磨提取后的样品立即放入离心机中,在4-10 $^{\circ}$ C,14000-15000 rpm的条件下离心10-15 min,取离心之后的上清液100 μ L置于ep管备用;

和/或,方法验证中回收率、重复性以及日内日间精密度考察:称取20 mg \pm 0.5 mg粗均质后的鱼肉组织置于ep管中,依次加入氧化锆小球,300 μ L浓度为5 mg/mL的5-磺基水杨酸溶液,100 μ L浓度皆为4.5 μ g/mL的1-庚胺和1,7-庚二胺内标溶液,100 μ L含9种生物胺的混标溶液,浓度根据实验需要而定,之后采用混合研磨仪在20-25 Hz的条件下研磨提取1 min,重复2-4次,研磨提取后的样品立即放入离心机中,在4-10 $^{\circ}$ C,14000-15000 rpm的条件下离心10-15 min,取离心之后的上清液100 μ L置于ep管备用;

步骤(1)中离心之后取的100 μ L上清液加入900 μ L浓度为50 mM的硼砂缓冲溶液,涡旋1-2 min之后取10 μ L,依次加入45 μ L浓度为100 mM的硼砂缓冲溶液和45 μ L体积浓度为1%的苯甲酰氯乙腈溶液,涡旋10 min后置于离心机在4-10 $^{\circ}$ C,14000-15000 rpm的条件下离心10-15 min,然后取上清液用于分析;

步骤(3)中采用液相色谱-三重四级杆质谱联用仪的多反应监测模式进行样本分析;

(a) 液相色谱条件:Waters HSS T₃色谱柱 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m;柱温为60 $^{\circ}$ C;流动相:A相为体积浓度0.1% FA(甲酸)的H₂O,B相为体积浓度0.1% FA的ACN(乙腈);流速设置为0.2 mL/min;总的色谱运行时间为15 min;洗脱梯度为:0 ~ 1 min,2% B(V/V),1 ~ 4 min,梯度从2% B(V/V)线性增至30% B(V/V),4 ~ 4.1 min,梯度从30% B(V/V)线性增至50% B(V/V),4.1 ~ 9 min,50% B(V/V),9 ~ 9.1 min,梯度从50% B(V/V)线性增至95% B(V/V),9.1 ~ 12 min,95% B(V/V),12 ~ 12.1 min,梯度从95% B(V/V)线性降至2% B(V/V),12.1 ~ 15 min,2% B(V/V);色谱分析时,待分析的样品以及流动相在前2 min通过六通阀切进废液,2 ~ 12 min切进质谱,12 ~ 15 min切进废液;进样室温度为4 $^{\circ}$ C;进样体积为2 μ L~10 μ L;

(b) 质谱条件:ESI源,雾化气、加热气、干燥气的流速分别为3、10、10 L/min;接口温度、DL温度、加热气温度分别为300、250、400 $^{\circ}$ C;

所述生物胺为胍基丁胺,组胺,酪胺,精胺,亚精胺,2-苯乙胺,色胺,尸胺,腐胺。

2. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,步骤(3)中采用多反应监测模式分析样本;优化多反应监测模式的方法,挑选响应最高的离子对作为定量离子对,响应次之的离

子对作为辅助定性离子对。

3. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,步骤(4)中采用内标法定量,根据线性定量曲线进行定量检测分析。

一种针对鱼中生物胺的快速分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分析化学领域和食品安全领域,是一种针对鱼中生物胺的快速分析方法。

背景技术

[0002] 生物胺是一类含氮的低分子量有机化合物,具有生物活性。常见的生物胺主要有胍基丁胺,组胺,酪胺,精胺,亚精胺,2-苯乙胺,色胺,尸胺,腐胺。在生物体内,微生物产生的脱羧酶作用于游离氨基酸引起其脱羧基反应从而产生相应生物胺。他们多存在于动植物体、发酵食品以及肉类食品中。生物胺是生物活性细胞必不可少的组成部分,具有重要的生物功能,但是摄入量过多则会引起头疼、恶心以及过敏等不良反应,严重时甚至危及生命。因此食品中生物胺含量的多少可以作为食品质量的指示剂。基于此,建立相关食品中生物胺的快速分析方法具有重要的意义。

[0003] 目前已有多种分析方法应用于生物胺的检测,如薄层色谱、气相色谱、液相色谱等。其中液相色谱的应用较为广泛,通常与紫外检测器,荧光检测器或者质谱分析仪联用。Önal等人综述了液相色谱结合不同检测器对于不同食品中生物胺的检测,与紫外检测器或荧光检测器联用的灵敏度大大低于与质谱(尤其是SRM检测模式)联用的检测灵敏度;而且常规方法中生物胺的提取通常采用盐酸,高氯酸和三氯乙酸等,若用质谱检测,会对仪器产生较大影响;同时,提取过程中所用鱼的量和提取溶剂的量都较大,过程比较繁琐;常用衍生方法是以丹磺酰氯和邻苯二甲醛等作为衍生试剂,衍生过程需要加热而且部分衍生物不稳定。本发明中采用液相色谱-三重四级杆质谱联用技术靶向分析9中生物胺,极大的排除了基质干扰,使分析结果灵敏度高,线性范围宽;样品预处理参照代谢组学中组织样品的处理方法,称取少量鱼肉组织(约20mg),采用5-磺基水杨酸作为提取溶剂的珠打研磨方法进行提取,一方面样品量和提取溶剂量都极大地减少了,属于环境友好操作,而且对质谱的影响较小,另一方面采用珠打研磨方法,一次可以同时处理20份样品,极大地缩短了分析时间;此外采用苯甲酰氯衍生生物胺,反应仅需要在室温条件下涡旋10分钟即可完成,操作也相对简单,极大地提高了工作效率。至今尚无将本发明所述方法应用于鱼肉组织中生物胺分析的报导。

发明内容

[0004] 本发明为了进一步改善生物胺的分析方法,建立了基于5-磺基水杨酸作为提取溶剂的珠打研磨提取、苯甲酰氯快速衍生、液相色谱-三重四级杆质谱联用仪分析的鱼肉组织中生物胺的分析方法。该方法的样品前处理简单,且所用样品量及提取溶剂量都较少,属于环境友好型;采用苯甲酰氯作为衍生试剂,衍生反应可在10分钟内完成,极大地缩短了样品的处理时间;采用多反应监测模式,具有灵敏度高、重复性好、线性范围宽等优点。

[0005] 本发明采用的具体技术方法如下:

[0006] (1) 将去皮剔骨除内脏后的鱼肉组织放入料理机中进行粗均质(转速为12000转/

分,均质时间为1-5min)。

[0007] 实际样品分析:称取 $20\text{mg} \pm 0.5\text{mg}$ 粗均质后的鱼肉组织置于2mL ep管中,依次加入氧化锆小球,300 μL 浓度为5mg/mL的5-磺基水杨酸溶液,100 μL 浓度皆为4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的1-庚胺和1,7-庚二胺内标溶液,100 μL 体积浓度为20%的乙腈溶液,之后采用混合研磨仪在20Hz的条件下研磨提取1min,重复2次,研磨提取后的样品立即放入离心机中,在4 $^{\circ}\text{C}$,14000rpm的条件下离心10min,取离心之后的上清液100 μL 置于1.5mL ep管备用;

[0008] 方法验证中回收率、重复性以及日内日间精密度考察:称取 $20\text{mg} \pm 0.5\text{mg}$ 粗均质后的鱼肉组织置于2mL ep管中,依次加入氧化锆小球,300 μL 浓度为5mg/mL的5-磺基水杨酸溶液,100 μL 浓度皆为4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的1-庚胺和1,7-庚二胺内标溶液,100 μL 含9种生物胺的混标溶液(浓度根据实验需要而定),之后采用混合研磨仪在20Hz的条件下研磨提取1min,重复2次,研磨提取后的样品立即放入离心机中,在4 $^{\circ}\text{C}$,14000rpm的条件下离心10min,取离心之后的上清液100 μL 置于1.5mL ep管备用。

[0009] (2) 离心之后取的100 μL 上清液加入900 μL 浓度为50mM的硼砂缓冲溶液,涡旋1min之后取10 μL ,依次加入45 μL 浓度为100mM的硼砂缓冲溶液和45 μL 体积浓度为1%的苯甲酰氯乙腈溶液,涡旋10min后置于离心机在4 $^{\circ}\text{C}$,14000rpm的条件下离心10min,取上清液用于检测分析。

[0010] (3) 采用液相色谱-三重四级杆质谱联用仪的多反应监测模式进行样本分析;

[0011] ①液相色谱条件:Waters HSS T₃色谱柱2.1mm \times 100mm,1.7 μm ;柱温为60 $^{\circ}\text{C}$;流动相:A相为体积浓度0.1%FA的H₂O,B相为体积浓度0.1%FA的ACN;流速设置为0.2mL/min;总的色谱运行时间为15min;洗脱梯度为:0~1min,2%B(V/V),1~4min,梯度从2%B(V/V)线性增至30%B(V/V),4~4.1min,梯度从30%B(V/V)快速增至50%B(V/V),4.1~9min,50%B(V/V),9~9.1min,梯度从50%B(V/V)快速增至95%B(V/V),9.1~12min,95%B(V/V),12~12.1min,梯度从95%B(V/V)快速降至2%B(V/V),12.1~15min,2%B(V/V);色谱分析时,待分析的样品以及流动相在前2min通过六通阀切进废液,2~12min切进质谱,12~15min切进废液;进样室温度为4 $^{\circ}\text{C}$;进样体积为2 μL ;

[0012] ②质谱条件:ESI源,雾化气、加热气、干燥气的流速分别为3、10、10L/min;接口温度、DL温度、加热气温度分别为300、250、400 $^{\circ}\text{C}$;

[0013] ③采用多反应监测模式分析样本,优化多反应监测模式的方法,挑选响应最高的离子对作为定量离子对,响应次之的离子对作为辅助定性离子对。

[0014] (4) 采用内标法定量,根据线性定量曲线进行定量检测分析。

[0015] 本方法采用5-磺基水杨酸作为提取溶剂,较常规采用的高氯酸和三氯乙酸等来说对质谱仪器影响较小;采用珠打研磨的方法进行提取,提取过程简单快速;采用苯甲酰氯作为生物胺的衍生试剂,衍生反应快速高效且衍生物稳定;采用液相色谱-三重四级杆质谱进行检测,灵敏度高,线性范围宽,靶向分析定量能力强。

附图说明

[0016] 图1 苯甲酰氯衍生化反应的反应图解。

[0017] 图2 9种生物胺衍生物和2种内标衍生物的提取离子色谱图。

具体实施方式

[0018] 下面结合附表附图对本发明的实施例作详细说明：实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0019] 实施例一

[0020] 基于5-磺基水杨酸的珠打研磨提取，苯甲酰氯衍生，液相色谱-三重四级杆质谱联用仪检测的鱼肉组织中生物胺的分析方法的评价

[0021] 线性、检测限以及定量限的考察。胍基丁胺，组胺，酪胺，精胺，亚精胺，2-苯乙胺，色胺，尸胺，腐胺，1-庚胺和1,7-庚二胺的单标母液浓度均为10mg/mL，1-庚胺和1,7-庚二胺是内标，余下的9种胺是待分析的生物胺。除了色胺、酪胺和2-苯乙胺采用乙醇作为溶剂，其他物质皆选择体积浓度20%的乙腈溶液作为溶剂。9种生物胺的混标母液浓度为1mg/mL（各生物胺的质量相同）：10mg/mL的单标生物胺母液每个取100 μ L混合，然后加入100 μ L体积浓度为20%的乙腈溶液，涡旋混合即得到1mg/mL的生物胺混标母液；1-庚胺和1,7-庚二胺2种内标的混标母液为1mg/mL：10mg/mL的内标母液每个取100 μ L混合，然后加入800 μ L体积浓度为20%的乙腈溶液，涡旋混合。之后所用的不同浓度的生物胺混标和内标混标皆由上述两种混标母液稀释而得。线性考察通过设置22个浓度水平的9种生物胺的混标溶液进行，22个浓度水平依次为：1 μ g/mL，500ng/mL，200ng/mL，100ng/mL，50ng/mL，20ng/mL，10ng/mL，5ng/mL，2ng/mL，1ng/mL，500pg/mL，200pg/mL，100pg/mL，50pg/mL，20pg/mL，10pg/mL，5pg/mL，2pg/mL，1pg/mL，500fg/mL，200fg/mL，100fg/mL。每个浓度水平取10 μ L，依次加入45 μ L含内标浓度为20ng/mL的100mM硼砂缓冲溶液和45 μ L体积浓度为1%的苯甲酰氯乙腈溶液，在涡旋的条件下反应10min，反应机理见附图1，然后置于离心机中在4 $^{\circ}$ C，14000rpm的条件下离心10min，取上清液用于分析。

[0022] 液相色谱条件：Waters HSS T₃色谱柱2.1mm \times 100mm，1.7 μ m；柱温为60 $^{\circ}$ C；流动相：A相为体积浓度为0.1%FA的H₂O，B相为体积浓度为0.1%FA的ACN；流速设置为0.2mL/min；总的色谱运行时间为15min；洗脱梯度为：0~1min，2%B（V/V），1~4min，梯度从2%B（V/V）线性增至30%B（V/V），4~4.1min，梯度从30%B（V/V）快速增至50%B（V/V），4.1~9min，50%B（V/V），9~9.1min，梯度从50%B（V/V）快速增至95%B（V/V），9.1~12min，95%B（V/V），12~12.1min，梯度从95%B（V/V）快速降至2%B（V/V），12.1~15min，2%B（V/V）；色谱分析时，待分析的样品以及流动相在前2min通过六通阀切进废液，2~12min切进质谱，12~15min切进废液；进样室温度为4 $^{\circ}$ C；进样体积为2 μ L。质谱条件：ESI源，雾化气、加热气、干燥气的流速分别为3、10、10L/min；接口温度、DL温度、加热气温度分别为300、250、400 $^{\circ}$ C。

[0023] 经多反应监测优化得到各生物胺衍生物的定性、定量离子对，相应碰撞能以及在设定方法中得到的保留时间，详细信息见附表1。采用附表1所确定的质谱条件对22个浓度水平的9种生物胺混标衍生溶液进行方法的线性分析，得到各生物胺的线性范围、线性相关系数、检测限和定量限见附表2。从表中可以看出线性范围可以达到3-4个数量级，线性相关系数在0.9966-0.9999之间，检测限和定量限可以达到飞克（fg）级别甚至更低。

[0024] 日内、日间精密度、48小时稳定性以及重复性的考察。采用实际样品加标的方式进行考察。称取20mg \pm 0.5mg粗均质的鱼肉组织置于2mL ep管中，依次加入氧化锆小球，300 μ L浓度为5mg/mL的5-磺基水杨酸溶液，100 μ L浓度皆为4.5 μ g/mL的1-庚胺和1,7-庚二胺内标

溶液,100 μ L浓度为500ng/mL(对应的衍生反应时的终浓度为1ng/mL)的9种生物胺混标溶液;之后采用混合研磨仪在20Hz的条件下研磨提取1min,重复2次;研磨提取后的样品立即放入离心机,在4 $^{\circ}$ C,14000rpm的条件下离心10min;取离心之后的上清液100 μ L加入900 μ L浓度为50mM的硼砂缓冲溶液,涡旋1min之后取10 μ L,依次加入45 μ L浓度为100mM的硼砂缓冲溶液和45 μ L体积浓度为1%的苯甲酰氯乙腈溶液,涡旋10min后置于离心机在4 $^{\circ}$ C,14000rpm的条件下离心10min,然后取上清液用于检测分析。每天连续重复进样6针用于日内精密度考察;连续4天每天进样6针用于日间精密度的考察;将样品放置在4 $^{\circ}$ C的进样室中分别测定0小时、12小时、24小时、36小时、48小时时样品中生物胺衍生物的响应用于48小时稳定性的考察;上述样品操作平行处理6份用于重复性的考察。经验证,日内、日间精密度的RSD皆小于5.00%,除精胺的日间精密度为6.31%;放置48小时的差异变化RSD均值为5.68%;重复性结果显示平行处理的6份样品中生物胺衍生物质谱响应的RSD皆小于8%。实验结果显示实验方法具有良好的日内、日间精密度和重复性,衍生物4 $^{\circ}$ C条件下放置48小时具有良好的稳定性。详细信息见附表2。

[0025] 实验方法回收率的考察。选择0.5ng/mL,1.0ng/mL,5.0ng/mL三个浓度作为回收率考察的低、中、高三个浓度,分别做空白、加标、以及纯标样实验,每组平行六份样品。

[0026] 纯标样实验:1mg/mL的9种生物胺混标母液分别稀释至50ng/mL,10ng/mL,5ng/mL,然后分别取10 μ L,依次加入45 μ L含内标浓度为20ng/mL的100mM硼砂缓冲溶液和45 μ L体积浓度为1%的苯甲酰氯乙腈溶液,最终的高、中、低三个浓度分别对应为5.0ng/mL,1.0ng/mL,0.5ng/mL,在涡旋的条件下反应10min,然后置于离心机中在4 $^{\circ}$ C,14000rpm的条件下离心10min,取上清液用于分析。

[0027] 空白样品实验的操作:称取20mg \pm 0.5mg粗均质的鱼肉组织置于2mL ep管中,依次加入氧化锆小球,300 μ L浓度为5mg/mL的5-磺基水杨酸溶液,100 μ L浓度皆为4.5 μ g/mL的1-庚胺和1,7-庚二胺内标溶液,100 μ L体积浓度为20%的乙腈溶液;之后采用混合研磨仪在20Hz的条件下研磨提取1min,重复2次;研磨提取后的样品立即放入离心机,在4 $^{\circ}$ C,14000rpm的条件下离心10min;取离心之后的上清液100 μ L加入900 μ L浓度为50mM的硼砂缓冲溶液,涡旋1min之后取10 μ L,依次加入45 μ L浓度为100mM的硼砂缓冲溶液和45 μ L体积浓度为1%的苯甲酰氯乙腈溶液,涡旋10min后置于离心机在4 $^{\circ}$ C,14000rpm的条件下离心10min,然后取上清液用于检测分析。

[0028] 样品加标实验的操作:称取20mg \pm 0.5mg粗均质的鱼肉组织置于2mL ep管中,依次加入氧化锆小球,300 μ L浓度为5mg/mL的5-磺基水杨酸溶液,100 μ L浓度皆为4.5 μ g/mL的1-庚胺和1,7-庚二胺内标溶液,100 μ L含9种生物胺的混标溶液(加入的低、中、高浓度分别为2.5 μ g/mL、500ng/mL、250ng/mL对应于最终的衍生浓度分别为5.0ng/mL、1.0ng/mL、0.5ng/mL);之后采用混合研磨仪在20Hz的条件下研磨提取1min,重复2次;研磨提取后的样品立即放入离心机,在4 $^{\circ}$ C,14000rpm的条件下离心10min;取离心之后的上清液100 μ L加入900 μ L浓度为50mM的硼砂缓冲溶液,涡旋1min之后取10 μ L,依次加入45 μ L浓度为100mM的硼砂缓冲溶液和45 μ L体积浓度为1%的苯甲酰氯乙腈溶液,涡旋10min后置于离心机在4 $^{\circ}$ C,14000rpm的条件下离心10min,然后取上清液用于检测分析。

[0029] 经过分析与计算,高、中、低三个浓度的加标回收率在74.88-119.25%,见附表2,RSD基本在10%以下,能够满足分析要求。上述方法评价表明本方法检测灵敏度高,线性、准

确性、稳定性以及重复性好。

[0030] 实施例二

[0031] 不同来源四类鱼体内生物胺的分析

[0032] (1) 样品预处理: 将从两个商品零售市场购买的鲮鱼、黄花鱼、带鱼、鲳鱼分别去皮剔骨除内脏后的鱼肉组织用料理机进行粗均质(转速为12000转/分,均质时间为1-5min)。粗均质后分别称取 $20\text{mg} \pm 0.5\text{mg}$ 的鱼肉组织置于2mL ep管中,依次加入氧化锆小球,300 μL 浓度为5mg/mL的5-磺基水杨酸溶液,100 μL 浓度皆为4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的庚胺和1,7-庚二胺内标溶液,100 μL 体积浓度为20%的乙腈溶液;采用混合研磨仪在20Hz的条件下研磨提取1min,重复2次;研磨提取后的样品立即放入离心机,在4 $^{\circ}\text{C}$,14000rpm的条件下离心10min;取离心之后的上清液100 μL 加入900 μL 浓度为50mM的硼砂缓冲溶液,涡旋1min之后取10 μL ,依次加入45 μL 浓度为100mM的硼砂缓冲溶液和45 μL 体积浓度为1%的苯甲酰氯乙腈溶液,涡旋10min后置于离心机在4 $^{\circ}\text{C}$,14000rpm的条件下离心10min,然后取上清液用于检测分析。

[0033] (2) 液相色谱条件: Waters HSS T₃色谱柱2.1mm \times 100mm,1.7 μm ;柱温为60 $^{\circ}\text{C}$;流动相:A相为0.1%FA的H₂O,B相为0.1%FA的ACN;流速设置为0.2mL/min;总的色谱运行时间为15min;洗脱梯度为:0~1min,2%B(V/V),1~4min,梯度从2%B(V/V)线性增至30%B(V/V),4~4.1min,梯度从30%B(V/V)快速增至50%B(V/V),4.1~9min,50%B(V/V),9~9.1min,梯度从50%B(V/V)快速增至95%B(V/V),9.1~12min,95%B(V/V),12~12.1min,梯度从95%B(V/V)快速降至2%B(V/V),12.1~15min,2%B(V/V);色谱分析时,待分析的样品以及流动相在前2min通过六通阀切进废液,2~12min切进质谱,12~15min切进废液;进样室温度为4 $^{\circ}\text{C}$;进样体积为2 μL 。质谱条件:ESI源,雾化气、加热气、干燥气的流速分别为3、10、10L/min;接口温度、DL温度、加热气温度分别为300、250、400 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0034] 采用上述方法分析,发现从两个市场购买的鱼体内的生物胺含量皆很少,我国规定的除鲈鱼以外的其他鱼体内组胺的含量不得超过300mg/kg,对于其他生物胺则没有规定限量,从附表3中可以看出,市售鱼体内组胺含量都很低,而且远远低于国家规定的限量,说明所购鱼是新鲜的,具体数据见附表3。

[0035] 表1 9种生物胺衍生物多反应监测的参数设置

生物胺	母离子	子离子(1)	碰撞能(1)(v)	子离子(2)	碰撞能(2)(v)	保留时间 (min)
胍基丁胺	235.15	105.00	-27	77.05	-48	5.1
组胺	216.10	77.05	-40	105.00	-33	4.7
酪胺	346.15	105.20	-24	77.00	-54	10.9
精胺	619.35	105.05	-55	497.20	-29	8.4
亚精胺	458.25	105.15	-46	162.15	-27	7.5
2-苯乙胺	226.12	104.95	-20	76.95	-40	8.1
色胺	265.15	144.10	-15	105.20	-21	7.7
尸胺	311.20	105.00	-26	77.00	-51	7.0
腐胺	297.15	105.00	-26	77.00	-47	6.7
1,7-庚二胺-IS	339.2	105.0	-20	77.00	-45	8.1
庚胺-IS	220.20	105.00	-20	77.00	-50	11.0

[0036]

[0037] 表2 分析方法的评价

生物胺	线性范围 (pg/mL)	R ²	检测限 (pg/mL)	定量限 (pg/mL)	日内精密 度 (n=6) (%)	日间精 密度 (n=4, day)(%)	重复性 (n=6) (%)	回收率 (%)			48h 稳定 性 (%)
								0.5 ng/mL	1.0 ng/mL	5.0 ng/mL	
[0038] 胍基丁胺	5-10000	0.9995	5.0	20.0	3.10	3.27	3.12	101.95	96.28	94.14	4.68
组胺	20-50000	0.9966	10.0	100.0	2.09	4.54	4.06	98.99	96.67	101.21	3.88
酪胺	20-50000	0.9986	0.2	0.5	1.58	3.99	6.82	101.28	103.12	106.99	6.49
精胺	10-200000	0.9999	5.0	10.0	1.27	6.31	3.36	100.76	102.36	108.81	8.53
亚精胺	20-50000	0.999	0.2	2.0	4.09	3.89	4.57	90.52	89.33	76.35	2.64
2-苯乙胺	200-200000	0.9988	0.1	1.0	0.83	3.51	5.52	93.65	84.56	74.88	7.72
[0039] 色胺	20-100000	0.9985	2.0	5.0	3.40	4.28	3.61	119.25	115.41	102.03	3.88
尸胺	50-100000	0.9991	0.2	10.0	1.16	4.18	7.43	98.47	96.84	99.02	7.65
腐胺	50-200000	0.9999	0.5	20.0	1.59	1.24	3.24	97.34	95.68	100.81	2.86

[0040] 表3 两个市场所购四种鱼体内生物胺的含量

生物胺	单位: mg/kg							
	市场 1				市场 2			
	鲮鱼	黄花鱼	带鱼	鲳鱼	鲮鱼	黄花鱼	带鱼	鲳鱼
[0041] 胍基丁胺	-	-	-	-	-	-	-	-
组胺	4.15	0.66	-	1.97	-	-	-	-
酪胺	6.32	2.13	-	5.18	-	-	-	-
精胺	12.07	14.18	14.87	14.19	13.73	8.64	12.76	17.72
亚精胺	9.58	4.06	3.35	5.78	6.30	3.98	4.38	5.68
2-苯乙胺	-	-	-	-	-	-	-	-
色胺	-	-	-	-	-	-	-	-
尸胺	8.42	39.44	0.21	67.63	0.13	0.60	1.19	0.20
腐胺	4.10	5.98	0.49	15.09	0.49	1.92	0.61	0.12

[0042] 此发明大大缩短了样品提取时间和生物胺衍生时间,从而极大地缩短了整个分析过程的分析时间。本发明分析方法具有样品前处理简单、衍生快速、检测灵敏度高,重复性好等优点。

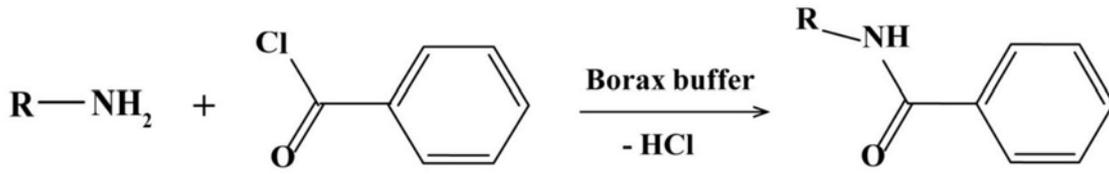


图1

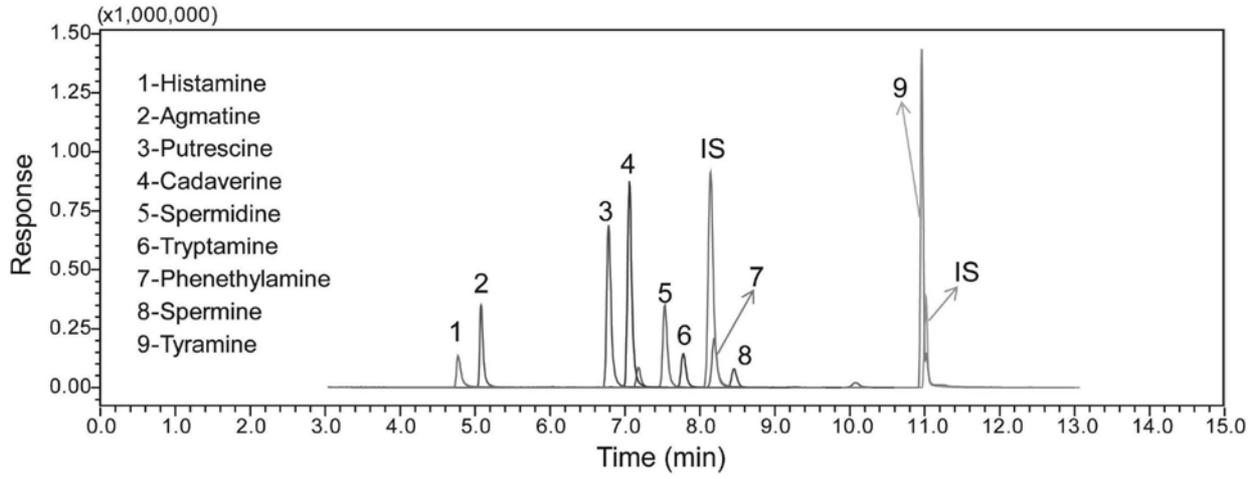


图2