

柱前衍生-高效液相色谱-二极管阵列法测定葡萄酒中组胺含量

续艳丽, 陈婷*, 彭涛, 徐雪梅, 许淑琴, 张文

(兰州市食品药品检验所, 兰州 730000)

摘要: **目的** 建立柱前衍生-高效液相色谱-二极管阵列法(high performance liquid chromatography-diode array detector, HPLC-DAD)测定葡萄酒中组胺含量的方法。**方法** 将葡萄酒样品与 10 mg/mL 的丹磺酰氯在 70 °C柱前衍生 10 min, 衍生样品以乙腈和 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%乙酸)为流动相进行等度洗脱, 于波长 254 nm 处进行检测。**结果** 该方法的标准曲线回归方程为 $Y=0.0319X+0.00059$, 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ 的线性范围内, 组胺标准品峰面积与内标物峰面积的比值与组胺含量线性关系良好, 相关系数 r^2 为 0.9987, 回收率为 92.3%~105.2%, 检出限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。**结论** 该方法操作简便、准确度高, 适用于葡萄酒中组胺含量测定。**关键词:** 柱前衍生; 高效液相色谱-二极管阵列法; 葡萄酒; 组胺

Determination of histamine in wine by pre-column derivatization-high performance liquid chromatography-diode array detector

XU Yan-Li, CHEN Ting*, PENG Tao, XU Xue-Mei, XU Shu-Qin, ZHANG Wen

(Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of histamine in wine by pre-column derivatization-high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). **Methods** The wine sample was derivatized with 10 mg/mL dansyl chloride for 10 min at 70 °C. The derived sample was detected at 254 nm after isocratic elution with acetonitrile and 0.01 mol/L ammonium acetate solution (containing 0.1% acetic acid) as the mobile phase. **Results** The standard curve regression equation of this method was $Y=0.0319X+0.00059$, with the linear range of 0.1-100 $\mu\text{g/mL}$. The ratio of the peak area of the histamine standard to the peak area of the internal standard was linearly related to the histamine content, the correlation coefficient r^2 was 0.9987, the recovery was 92.3%-105.2%, and the limit of detection was 0.05 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate, which is suitable for the determination of histamine in wine.

KEY WORDS: pre-column derivatization; high performance liquid chromatography-diode array detector; wine; histamine

1 引言

近年来,葡萄酒尤其红葡萄酒以其延缓衰老、预防心

血管病、白藜芦醇预防癌症、美容养颜等作用备受国内外消费者青睐,国际葡萄酒及烈酒研究所近期发布预测称,未来全球酒类消费将大幅上涨,其中以葡萄酒销量涨势最

基金项目: 甘肃省食品药品科研项目(2018GSFDA044)

Fund: Supported by Gansu Province Food and Drug Research Project (2018GSFDA044)

*通讯作者: 陈婷, 工程师, 主要研究方向为食品检测及风险评估。E-mail: 125731803@qq.com

*Corresponding author: CHEN Ting, Engineer, Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730000, China. E-mail: 125731803@qq.com

为突出^[1]。但由于葡萄酒在发酵前,细菌在代谢过程中会产生一种名为“组胺”的生物胺化合物,当人体过多摄入此物质,可能会引起对组胺不耐受者出现头痛或其他症状,从而对健康造成一定影响^[2,3]。因此在葡萄酒的酿造过程中,为确保葡萄酒的品质及安全,建立检测葡萄酒中组胺的含量的快速、灵敏、简单的方法很有意义^[4]。

食品中组胺的现有检测方法主要有紫外分光光度法^[5]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[6]、气相色谱法^[7]、酶联免疫法^[8]、电化学方法^[9]等, HPLC 因灵敏度高、结果准确、分析速度快等原因,已成为食品中组胺分析检测的主要手段^[10-13]。由于组胺没有紫外或者荧光吸收,在检测前必须要经过衍生试剂进行衍生化处理。丹磺酰氯作为液相色谱柱前衍生试剂之一,具有衍生物荧光和紫外吸收强、操作简单、灵敏度高、基体干扰不明显等优点^[14,15]。因此本研究采用丹磺酰氯作为组胺的柱前衍生剂,采用高效液相色谱法-二极管阵列法,建立一种葡萄酒中组胺含量的检测方法,为低组胺葡萄酒的安全监测及风险评估提供实验数据及基本依据。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

葡萄酒(市售);丹磺酰氯(纯度 $\geq 98\%$,上海安谱公司);1,7-二氨基庚烷(内标物)、组胺(纯度 $\geq 99\%$,上海安谱公司);甲酸、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);乙酸铵(色谱纯,上海阿拉丁公司);碳酸氢钠、氢氧化钠、氨水(分析纯,天津科密欧公司),实验用水为超纯水。

2.2 仪器与设备

1260 型高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器)、Agilent C₁₈ 色谱柱(美国 Agilent 公司);AE-163 分析天平(美国梅特勒托利多公司)。

2.3 实验方法^[16]

2.3.1 标准溶液的配制

1) 内标标准储备液的配制

用分析天平准确称取 1,7-二氨基庚烷内标标准品,用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解后稀释至刻度,混匀,配制成一定浓度的内标标准储备溶液,置于-20 °C 冰箱储存。

2) 标准储备液的配制

准确称取一定量的组胺标准品,置于 10 mL 小烧杯中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解后转移至 10 mL 容量瓶中,定容至刻度,混匀,配制成为标准储备溶液,置于-20 °C 冰箱储存。精密吸取上述组胺标准储备溶液,用 0.1 mol/L 盐酸溶液配制组胺标准系列溶液。

2.3.2 样品的衍生

准确量取 1.0 mL 葡萄酒样品至 15 mL 离心管中,依次加入 25 μ L 1,7-二氨基庚烷内标溶液,200 μ L 饱和碳酸氢钠和 100 μ L 氢氧化钠溶液(2 mol/L),2 mL 丹磺酰氯衍生剂,

涡旋混匀 1 min 后置于 70 °C 水浴锅中衍生 10 min,取出,加入 100 μ L 氨水终止反应,暗中静置 10 min。过 0.22 μ m 滤膜于进样小瓶,待上机测定。

2.3.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m), DAD 检测器,检测波长为 254 nm。进样量 10 μ L,柱温 35 °C,流动相 A 为 90%乙腈/10% 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%乙酸),流动相 B 为 10%乙腈/90% 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%乙酸),A:B=75:25(V:V),流速 0.8 mL/min。

2.3.4 标准曲线

将 10 μ L 组胺系列标准工作液的衍生液分别注入高效液相色谱仪,以组胺系列标准工作液的浓度为横坐标,以组胺的峰面积与内标的峰面积的比值为纵坐标绘制标准曲线。

3 结果与分析

3.1 样品前处理条件优化

3.1.1 衍生温度的确定

组胺衍生温度分别为 20、40、60、70、80 °C 时,衍生时间为 10 min,其他条件不变,取 15 μ g/mL 的组胺标准溶液进行衍生,组胺的衍生效率以标准品峰面积表示,结果见图 1。从图 1 中可以看出,组胺衍生温度从室温到 70 °C 时组胺衍生物的峰面积随温度的升高呈现上升趋势,且溶液颜色常有深浅不均的现象。当温度达到 70 °C 后再增加衍生温度,组胺衍生物峰面积变化不大。因此本研究选择 70 °C 为最佳衍生温度。

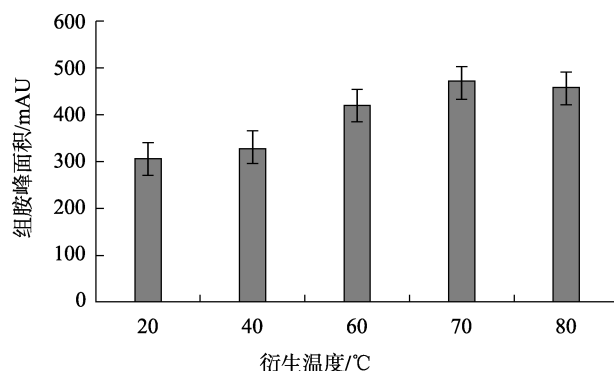
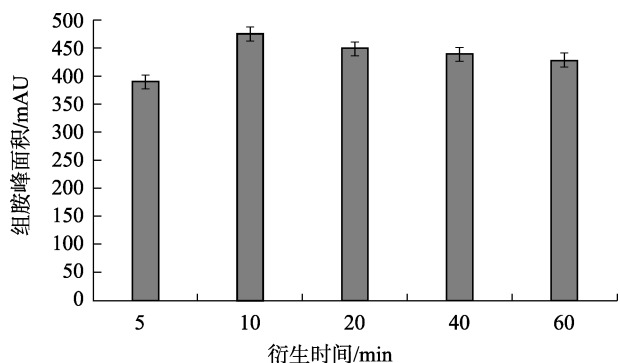


图 1 衍生温度对组胺衍生结果的影响(n=3)

Fig.1 Influence of derivative temperature on histamine derivative results (n=3)

3.1.2 衍生反应时间的确定

组胺衍生时间分别为 5、10、20、40、60 min 时,衍生温度为 70 °C,其他条件不变,取 15 μ g/mL 的组胺标准溶液进行衍生,组胺的衍生效率以标准品峰面积表示。结果见图 2。从图 2 中可以看出,组胺衍生 10 min 的效率最佳,10 min 后再增加衍生时间,组胺衍生物含量呈现下降后趋于稳定。因此,本研究选择 10 min 为最佳衍生反应时间。

图 2 衍生时间对组胺衍生结果的影响($n=3$)Fig. 2 Influence of derivation time on histamine derivation results ($n=3$)

3.2 液相色谱条件优化

参照 GB 5009.208-2016《食品安全国家标准 食品中生物胺的测定》及相关文献^[6,12],本研究比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1 乙酸%溶液、乙腈-乙酸-乙酸铵溶液作为流动相时,组胺的回收率和分离效果。结果表明,流动相 A 为 90%乙腈/10%0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%乙酸),流动相 B 为 10%乙腈/90%0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%乙酸),A:B=75:25(V:V)时,组胺分离效果好,回收率较高。结果见图 3。

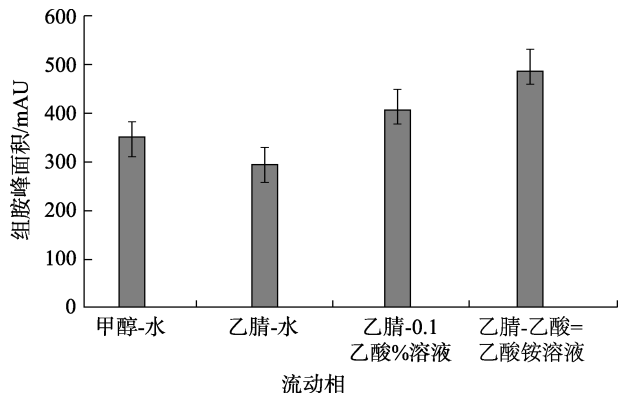
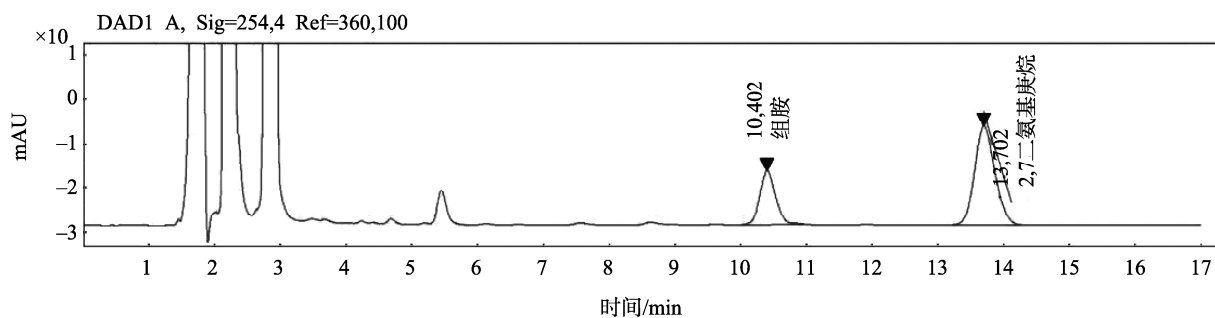
图 3 流动相对组胺测定结果的影响($n=3$)Fig. 3 Influence of flow on histamine measurement results ($n=3$)

图 4 组胺标准品及内标物质 1,7-二氨基庚烷图谱

Fig. 4 HPLC chromatogram of histamine standard and internal standard substance 1,7-diaminoheptane

3.3 组胺标准色谱图谱和标准曲线

在本实验优化的色谱条件下,得到组胺标准品及内标物质 1,7-二氨基庚烷的 HPLC 图谱,见图 4。

将组胺标准溶液用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释并配制成 0.01~200 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,按上述优化条件处理后上机检测,并计算标准曲线的回归方程及相关系数。结果显示:在 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,组胺与内标物质峰面积比值与相应浓度线性关系良好,标准曲线回归方程为 $Y=0.0319X+0.00059$,相关系数 r^2 为 0.9987。

3.4 精密度、回收率和检出限

将 8.306 $\mu\text{g/mL}$ 的组胺标准溶液衍生后,连续进样 5 次,根据组胺与内标物的峰面积比计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.56%,表明组胺保留时间稳定,仪器精密度良好。将 2.076、6.228、12.460 $\mu\text{g/mL}$ 的 3 个不同水平的组胺标准溶液加入到葡萄酒样品中,每个加标水平重复测定 3 次,计算加标水平的回收率,结果见表 1。总体来看,样品加标回收率在 92.3%~105.2% 范围之间,RSD 在 0.78%~1.85% 之间,说明该检测方法的准确度高,符合检测要求。

将 0.8306 $\mu\text{g/mL}$ 的组胺标准溶液适当稀释,衍生后测定,以 3 倍信噪比进行最低检测限的检测,得出最低检出限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.5 样品的测定

采用本研究建立的 HPLC-DAD 法,测定了 50 批市售葡萄酒样品中组胺的含量,每个测定取 3 次平行的平均值,并计算 RSD 值,结果表明,组胺含量在 1.53~24.3 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,RSD 值在 0.35%~1.89% 范围内,可为低组胺葡萄酒的安全监测及风险评估提供技术支撑。

4 结论

本文以市售葡萄酒为研究对象,建立了一种柱前衍生高效液相色谱-二极管阵列法检测葡萄酒中组胺含量的分析方法。本研究优化了该方法的衍生温度、衍生时间、

表 1 组胺加标回收率及相对标准偏差的测定($n=3$)
Table 1 Recovery of histamine in spiked samples and relative standard deviation ($n=3$)

本底值/($\mu\text{g/mL}$)	加入量/($\mu\text{g/mL}$)	检出量/($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
16.91	2.076	18.74	98.7		1.85
16.91	6.228	23.02	99.5	96.8	0.78
16.91	12.460	27.11	92.3		1.11
10.75	2.076	12.98	101.2	101.3	0.98
10.75	6.228	16.55	97.5		1.02
10.75	12.460	24.42	105.2		1.05
4.26	2.076	6.36	100.4	100.9	0.85
4.26	6.228	10.34	98.6		0.89
4.26	12.460	17.34	103.7		1.08

液相色谱条件等,最终确定最优检测条件为:葡萄酒样品与 10 mg/mL 的丹磺酰氯在 70 °C 柱前衍生 10 min,以乙腈和 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%乙酸)为流动相进行梯度洗脱,在此条件下标准曲线相关系数都达到 99%以上,回收率在 92%以上,说明该方法操作简便、准确度高,稳定性和重复性较好,适用于葡萄酒中组胺含量测定。

参考文献

- 陈玉庆. 葡萄酒的成分与营养价值[J]. 酿酒, 2004, 31(5): 112-114.
Chen YQ. Composition and nutritional value of wine [J]. Liq Mak, 2004, 31(5): 112-114.
- 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, 2004, 30(10): 87-94.
Li ZJ, Wu YN, Xue CH. Biogenic amines and food safety [J]. Food Ferm Ind, 2004, 30(10): 87-94.
- 冉春霞, 陈光静, 胡江. HPLC 法测定渝东南地区传统土家特色酸鲜肉中的组胺含量[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 286-231.
Ran CX, Chen GJ, Hu J. Determination of histamine content in Suanzharou, a unique and traditional fermented meat product of the tujia nationality in southeastern Chongqing by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2017, 38(12): 286-231.
- 魏雷, 吉姆·哈迪, 曾令文. 果酒中组胺含量快速检测方法研究[J]. 食品科技, 2018, 43(7): 327-331.
Wei L, Jimu HD, Zeng LW. Rapid detection method of histamine content in fruit wine [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(7): 327-331.
- 赵宇明. 分光光度法快速测定水产品中组胺的含量[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(8): 94-96.
Zhao YM. Rapid detection histamine content in aquatic product using spectrophotometry [J]. Food Res Dev, 2014, 35(8): 94-96.
- 曹利瑞, 朱松, 俞剑梁, 等. 黄酒中 9 种生物胺的高效液相色谱分析法[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 103-106.
Cao LR, Zhu S, Yu JS, et al. Development of an analytical method for nine biogenic amines in Chinese yellow wine by HPLC [J]. Food Sci, 2016, 37(4): 103-106.
- Huang J, Gan N, Lv F, et al. Environmentally friendly solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of biogenic amines in fish samples [J]. J Separ Sci, 2016, (39): 4384-4390.
- 郑海松, 杨小娇. 进出口食品中组胺的 ELISA 快速测定[J]. 食品工业, 2011, (10): 110-112.
Zheng HS, Yang XJ. Rapid detection of histamine in import and export food by ELISA method [J]. Food Ind, 2011, (10): 110-112.
- 周婵媛, 赵晓娟, 杨春婷. 化学修饰电极检测食品中组胺的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(6): 281-286.

Zhou CY, Zhao XJ, Yang CT. Research progress in chemically modified electrodes for determination of histamine in foods [J]. Food Ferm Ind, 2018, 44(6): 281-286.

- 廖国周, 王桂瑛, 曹锦轩, 等. 宣威火腿中生物胺的 HPLC 测定[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(12): 130-132.
Liao GZ, Wang GY, Cao JX, et al. Detection of biogenic amines in Xuanwei ham by HPLC [J]. Food Ferm Ind, 2011, 37(12): 130-132.
- 郝宏兰. 水产品中组胺的测定方法研究[J]. 食品科学, 2000, 21(8): 46-48.
Hao HL. Study on the determination method of histamine in aquatic products [J]. Food Sci, 2000, 21(8): 46-48.
- 沈念原, 王秀芹. 高效液相色谱法测定葡萄酒中生物胺的含量[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 394-396.
Shen NY, Wang XQ. Determination of biogenic amines in wine by high performance liquid chromatography [J]. Sci Technol Food Ind, 2011, 32(4): 394-396.
- 王瑞, 许超丽, 乔丹, 等. 新疆四大优势产区葡萄酒中生物胺含量的测定[J]. 中国酿造, 2018, 37(8): 178-181.
Wang R, Xu CL, Qiao D, et al. Determination of biogenic amines in wines from four major production areas in Xinjiang [J]. China Brew, 2018, 37(8): 178-181.
- 胡家伟, 高榕, 曹敏杰, 等. 水产食品中组胺的丹磺酰氯柱前衍生反相高效液相色谱测定方法的建立及应用[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 283-288.
Hu JW, Gao R, Cao MJ, et al. Establishment and application of dansyl chloride precolumn derivatization RP-HPLC for determination of histamine in aquatic products [J]. Food Sci, 2014, 35(8): 283-288.
- Legua CM, Falco PC, Cabeza AS, et al. Urine polyamines determination using dansyl chloride derivatization in solid-phase extraction cartridges and HPLC [J]. Analyst, 1999, 124(4): 477-482.
- GB 5009.208-2016 食品安全国家标准 食品中生物胺的测定[S].
GB 5009.208-2016 National food safety standard-Determination of biogenic amines in food [S].

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介

续艳丽, 硕士研究生, 工程师, 主要研究方向为食品检测及风险评估。
E-mail: 864093439@qq.com

陈婷, 硕士研究生, 工程师, 主要研究方向为食品检测及风险评估。
E-mail: 125731803@qq.com