



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105866302 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610447198.7

(22)申请日 2016.06.17

(71)申请人 安徽古井贡酒股份有限公司

地址 236826 安徽省亳州市谯城区古井镇
产业园区

申请人 安徽瑞思威尔科技有限公司

(72)发明人 王银辉 刘国英 汤有宏 沈小梅
马雷 李安军

(74)专利代理机构 安徽省合肥新安专利代理有
限责任公司 34101

代理人 卢敏 何梅生

(51) Int. Cl.

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/88(2006.01)

G01N 33/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种利用超高效合相色谱串接QDa同时快速
检测白酒中7种生物胺的方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用超高效合相色谱串接QDa同时快速检测白酒中7种生物胺的方法,属于检测技术领域,其特征在于:待测酒样经乙腈萃取后,采取BEH C₁₈合相专用色谱柱为分离柱,以二氧化碳(A)+异丙醇(B)为流动相进行梯度洗脱,样品经超高效合相色谱(UPC²)分离后,采用QDa质谱检测器进行检测。本发明方法简单快捷、准确可靠,可用于同时检测白酒中7种生物胺(组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、酪胺以及章鱼胺)的含量。

1. 一种利用超高效合相色谱串接QDa同时快速检测白酒中7种生物胺的方法,其特征在于:

所述的7种生物胺为组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、酪胺以及章鱼胺;

所用仪器为:配有QDa检测器的超高效合相色谱仪,色谱柱为 $3.0 \times 100\text{mm}$, $1.7\mu\text{m}$ 的BEH C_{18} 合相专用色谱柱;

所述方法包括如下步骤:

(1)对待测白酒酒样进行前处理:

准确量取 $1.0 \sim 5.0\text{mL}$ 待测白酒酒样于 10mL 塑料离心管中,加入 $8 \sim 10\text{mL}$ 体积浓度为80%的乙腈溶液,涡旋 $1 \sim 5\text{min}$, 1000转/分钟 离心 $5 \sim 10\text{min}$, $0.22\mu\text{m}$ 滤膜针头过滤器过滤,获得待测样品;待进样;

(2)条件设定

设定超高效合相色谱仪的条件为:

色谱柱为 $3.0 \times 100\text{mm}$, $1.7\mu\text{m}$ 的BEH C_{18} 色谱柱;柱温为 $30 \sim 50^\circ\text{C}$;

样品室温度为 $10 \sim 20^\circ\text{C}$

流动相:A相为二氧化碳,B相为异丙醇;流速为 $2 \sim 3\text{mL/min}$;洗脱方式为梯度洗脱;进样量为 $1 \sim 3\mu\text{L}$;检测所用时间为 $7 \sim 10\text{min}$;ABPR压力为 $1885 \sim 2200\text{psi}$;

设定QDa检测器的条件为:

系统:ACQUITY QDa质谱检测器,Performance模式;

离子化方式:ESI+;

监测方式:选择离子监测(SIR);

喷雾电压: 1.3kV ;

离子源温度: $550 \sim 600^\circ\text{C}$;

(3)7种生物胺的标准曲线的绘制

取组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、酪胺和章鱼胺配制质量浓度范围在 $5 \sim 1000\text{ng/mL}$ 的混合系列标准工作溶液,然后按照步骤(2)所设定的条件取各标准工作溶液进样,用超高效合相色谱检测,以待测物的峰面积对其所相应的质量浓度进行线性回归,获得7种生物胺的线性回归方程,各线性回归方程所对应的曲线,即为相应生物胺的标准曲线;

(4)待测白酒酒样的检测

将待测白酒酒样按步骤(1)的方式进行前处理后,再按步骤(2)的条件作UPC²检测,通过使用QDa扫描检测,获得待测样品的色谱图,对待测白酒酒样根据选择离子进行定性分析,然后根据7种生物胺的标准曲线对待测白酒酒样进行定量分析。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征不在于:步骤(2)中所述的梯度洗脱的程序为: 0min 时,流动相B异丙醇的体积分数为 $5 \sim 10\%$;由 0min 到 4.0min ,异丙醇的体积分数从 $5 \sim 10\%$ 升至 $80 \sim 90\%$,并保持 0.5min ;由 4.5min 到 6.5min ,异丙醇的体积分数从 $80 \sim 90\%$ 降至 $5 \sim 10\%$;由 6.5min 到 8.0min ,异丙醇的体积分数保持 $5 \sim 10\%$ 。

一种利用超高效合相色谱串接QDa同时快速检测白酒中7种生物胺的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及检测技术领域,具体地说是一种利用超高效合相色谱串接QDa检测器同时快速检测白酒中7种生物胺的方法,属于酒类分析技术领域。

背景技术

[0002] 生物胺是生物活性物质,主要包括 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺等,其存在于多种食品尤其是发酵食品(如奶酪、葡萄酒、啤酒、米酒、发酵香肠、调味品)、水产品及肉类产品等中。生物胺尤其是组胺,它们本身就有毒性,因此其是衡量肉类食品和水产品是否新鲜、酒的生产过程中卫生条件好坏的一个主要指标。

[0003] 目前的GB标准采用比色法或者液相色谱-衍生化法检测。其中,比色法只能半定量,液相色谱-衍生化法不稳定,操作费时、麻烦,且衍生化试剂苯甲酰氯有毒,不利于人体健康。有文献报道采用串联四极杆法测试生物胺,但是由于生物胺分子量小,没有丰度高的碎片,且碎片太小,检测结果容易受到干扰。

[0004] 此外,酒中的生物胺限量值低,使用原有的高效液相衍生化法满足不了出口的低限量测试要求。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种利用超高效合相色谱仪串接QDa检测器同时快速检测白酒中7种生物胺(组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、酪胺以及章鱼胺)的方法。本发明可以为白酒中生物胺检测的准确判定、快速检测提供科学依据。

[0006] 本发明解决技术问题,采用如下技术方案:

[0007] 本发明利用超高效合相色谱串接QDa同时快速检测白酒中7种生物胺的方法,其特征在于:

[0008] 所述的7种生物胺为组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、酪胺以及章鱼胺;

[0009] 所用仪器为:配有QDa检测器的超高效合相色谱仪、色谱柱为BEH C₁₈色谱柱(3.0×100mm,1.7 μ m);涡旋仪及移液枪;

[0010] 所述方法包括如下步骤:

[0011] (1)对待测白酒酒样进行前处理:

[0012] 准确量取1.0~5.0mL待测白酒酒样于10mL塑料离心管中,加入8~10mL体积浓度为80%的乙腈溶液,涡旋1~5min,1000转/分钟离心5~10min,0.22 μ m滤膜针头过滤器过滤,获得待测样品;待进样;

[0013] (2)条件设定

[0014] 设定超高效合相色谱仪的条件为:

[0015] 色谱柱为BEH C₁₈色谱柱(3.0×100mm,1.7 μ m);柱温为30~50℃;

[0016] 样品室温度为10~20℃

[0017] 流动相:A相为二氧化碳,B相为异丙醇;流速为2~3mL/min;洗脱方式为梯度洗脱;进样量为1~3 μ L;检测所用时间为7~10min;ABPR压力为1885~2200psi;梯度洗脱的具体程序为:0min时,流动相B异丙醇的体积分数为5~10%;由0min到4.0min,异丙醇的体积分数从5~10%升至80~90%,并保持0.5min;由4.5min到6.5min,异丙醇的体积分数从80~90%降至5~10%;由6.5min到8.0min,异丙醇的体积分数保持5~10%。

[0018] 设定QDa检测器的条件为:

[0019] 系统:ACQUITY QDa质谱检测器,Performance模式;

[0020] 离子化方式:ESI+;

[0021] 监测方式:选择离子监测(SIR);

[0022] 喷雾电压:1.3kV;

[0023] 离子源温度:550~600 $^{\circ}$ C;

[0024] 选择离子监测方式的各生物胺的质谱参数表如表1所示。

[0025] 表1:选择离子监测方式的质谱参数表

[0026]

序号	生物胺名称	英文名称	选择离子(m/z)	锥孔电压(v)
1	腐胺	diaminobutane	89.1	2
2	尸胺	Diaminopentane	103.1	5
3	组胺	Histamine	112.1	10
4	苯乙胺	Phenylethylamine	122.1	5
5	酪胺	Tyramine	138.1	5
6	亚精胺	Spermidine	146.1	10
7	章鱼胺	Octopamine	136	3

[0027] (3)7种生物胺的标准曲线的绘制

[0028] 取组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、酪胺和章鱼胺配制质量浓度范围在5~1000ng/mL的混合系列标准工作溶液,然后按照步骤(2)所设定的条件取1~1.5mL各标准工作溶液进样,用UPC²(串接QDa检测器)检测,以待测物的峰面积对其所相应的质量浓度进行线性回归,获得7种生物胺的线性回归方程,各线性回归方程所对应的曲线,即为相应生物胺的标准曲线;

[0029] 所述的7种生物胺对应的线性回归方程及相关系数 r^2 见表2。

[0030] 表2:7种生物胺的线性回归方程、相关系数、检出限、定量限

[0031]

分析物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系 数 r^2	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
组胺	5~200	$Y=1.41e+4X-7.4$	0.9994	5	15
腐胺	20~300	$Y=3.22e+2X-2.1$	0.9999	10	40
尸胺	20~300	$Y=1.78e+3X-2.8$	0.9995	10	60
苯乙胺	5-200	$Y=10.00e+3X+6.$	0.9982	5	30
亚精胺	50-1000	$Y=-6.13e-1X$	0.9997	30	100
酪胺	20-300	$Y=3.22e+2X-2.1$	0.9983	15	30
章鱼胺	20~300	$Y=3.22e+2X-2.1$	0.9999	25	50

[0032] (4)待测白酒酒样的检测

[0033] 将待测白酒酒样按步骤(1)的方式进行前处理后,取1.0~2.0mL样品按步骤(2)的条件作UPC²检测,通过使用QDa扫描检测,获得待测样品的色谱图,对待测白酒酒样根据选择离子进行定性分析,然后根据7种生物胺的标准曲线对待测白酒酒样进行定量分析。

[0034] 对本发明方法作如下灵敏度测试:灵敏度测试包括仪器的灵敏度与方法的灵敏度,仪器的灵敏度用仪器的检出限表示,取信噪比 ≥ 3 的生物胺的混合标准溶液的最小浓度为仪器检出限;方法的灵敏度用方法的定量限表示,取信噪比 ≥ 9 的生物胺混合标准溶液的最小浓度为方法定量限。所得的相关数据见表1。

[0035] 对本发明方法作如下准确性及重现性实验:选用同一个白酒样品经前处理后作为空白样品,分为3份,分别加入混合标准工作溶液进行加标回收实验,计算回收率;选取1个白酒样品按照同一前处理方法处理6个,分别进行实验,通过计算其相对标准偏差(RSD)的范围来判断分析方法的重现性。方法的准确性用回收率来表示,见表3,方法的重现性用相对标准偏差(RSD)来表示,见表4。可以看出回收率在80~120%,RSD $< 10\%$ 。

[0036] 表3:7种生物胺的加标回收率实验

[0037]

生物胺名称	加标水平 (ng/mL)							
	40		100		125		200	
	实测值	回收率	实测值	回收率	实测值	回收率	实测值	回收率
组胺	32.5	81.25%	97.4	97.40%	122	97.60%	188.8	94.40%
腐胺	32.5	81.25%	84.9	84.90%	110.6	88.48%	182.8	91.40%
尸胺	35	87.50%	91.9	91.90%	112.1	89.68%	178.9	89.45%

[0038]

苯乙胺	36.5	91.25%	97.3	97.30%	120.2	96.16%	202.3	101.15%
章鱼胺	35.8	89.50%	90.9	90.90%	120.2	96.16%	199.7	99.85%
酪胺	22.7	56.75%	84	84.00%	101.7	81.36%	179	89.50%
亚精胺	加标水平 (ng/mL)							
	300		500		625		1000	
	实测值	回收率	实测值	回收率	实测值	回收率	实测值	回收率
	314.6	104.87%	487.4	97.48%	638.1	102.10%	1044	104.40%

[0039] 表4:7种生物胺的重现性实验

[0040]

名称	组分含量单位: ng/mL							
	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD
组胺	114.2	114.4	113.9	111.3	117	113.5	114.05	1.42%
腐胺	115.2	124.7	117.2	125.2	127	120.5	121.63	4.32%
尸胺	119.7	123.4	121.2	118.6	122.8	120.4	121.02	2.45%
苯乙胺	118.6	119.4	115.5	117.7	121.2	127.8	120.03	3.03%
亚精胺	114.1	117.4	113.9	118.8	111.8	117.3	115.55	2.76%
酪胺	114	126.6	125	127.6	130.3	126.2	124.95	4.64%
章鱼胺	116.5	112.7	109.4	114.2	118.8	113.4	114.17	2.24%

[0041] 本发明使用QDa质谱检测器检测,采用选择离子扫描模式(SIR),灵敏度满足酒类样品低限量检测要求,同时该检测器使用方便,即插即用,不需要进行调谐,能够快速的检测白酒中7种生物胺。七种生物胺的检出限量完全能够满足酒类样品的低含量测定要求,各化合物回收率、重现性均满足定量测试要求。

[0042] 本发明的有益效果体现在:

[0043] 1、本发明建立了一种利用超高效合相色谱串接QDa检测器同时快速检测白酒中7种生物胺的方法,能够准确地对白酒中的生物胺进行定性、定量,为白酒中生物胺的准确判定、快速检测提供科学依据。

[0044] 2、本发明超高效合相色谱串接QDa质谱检测器操作简单快捷、准确可靠、重复性好。

[0045] 3、本发明BEH C₁₈合相专用色谱柱(3.0×100mm,1.7μm)与CO₂和异丙醇流动相的选择对白酒中7种生物胺达到了优异的分离效果。

[0046] 4、本发明通过使用QDa检测器,不需要衍生,直接进样测试生物胺。

[0047] 5、本发明的检测方法是一项环保的“绿色”技术。分析中采用的主要流动相二氧化碳来自于其它工业释放的回收二氧化碳,实验中使用的二氧化碳不会再产生新的温室气体。使用此方法时,每次进样所消耗的改性剂(异丙醇)仅为0.9~1.0mL,与同类检测方法相比,降低了85~90%的有机溶剂使用量。

[0048] 6、本发明通过减少实验室消耗品的使用可以节约成本。

附图说明

[0049] 图1为7种生物胺标准工作溶液的液相色谱图。

具体实施方式

[0050] 下面结合实例对本发明做进一步的阐述。

[0051] 本实施例按如下步骤对某白酒中7种生物胺进行测定：

[0052] 所用仪器为：超高效合相色谱仪(配有QDa检测器)；BEH C₁₈合相专用色谱柱(3.0×100mm, 1.7μm)；涡旋仪；移液枪。

[0053] 具体步骤为：

[0054] (1)对待测白酒酒样进行前处理：

[0055] 准确量取1.0mL待测白酒酒样于10mL塑料离心管中，加入9mL体积浓度为80%的乙腈溶液，涡旋5min，1000转/分钟离心10min，0.22μm滤膜针头过滤器过滤，获得待测样品；待进样；

[0056] (2)条件设定

[0057] 设定超高效合相色谱仪的条件为：

[0058] 色谱柱为BEH C₁₈色谱柱(3.0×100mm, 1.7μm)；柱温为45℃；

[0059] 样品室温度为20℃

[0060] 流动相：A相为二氧化碳，B相为异丙醇；流速为2.0mL/min；洗脱方式为梯度洗脱；进样量为2μL；检测所用时间为8min；ABPR压力为1885psi；洗脱方式为梯度洗脱；洗脱程序如下：0min，异丙醇的体积分数为10%；由0min到4.0min，异丙醇的体积分数从10%升至90%，并保持0.5min；由4.5min到6.5min，异丙醇的体积分数从90%降至10%；由6.5min到8.0min，异丙醇的体积分数保持10%。具体的，梯度洗脱各阶段的变化曲线均选择所用仪器中的曲线6。

[0061] 设定QDa检测器的条件为：

[0062] 系统：ACQUITY QDa质谱检测器，Performance模式；

[0063] 离子化方式：ESI+；

[0064] 监测方式：选择离子监测(SIR)；

[0065] 喷雾电压：1.3kV；

[0066] 离子源温度：600℃；

[0067] (3)7种生物胺的标准曲线的绘制

[0068] 取组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、亚精胺、酪胺以及章鱼胺，配制1~2mg/L的储备液，然后分别将其稀释5个不同的混合系列标准工作溶液，然后按照(2)所设定的条件取1.0~2.0mL混合系列标准工作溶液进样，用超高效合相色谱仪串接QDa质谱仪检测(谱图如图1所示)，以待测物的峰面积对其所相应的质量浓度进行线性回归，获得7种生物胺的线性回归方程，各线性回归方程所对应的曲线，即为相应生物胺的标准曲线；

[0069] (4)待测白酒酒样的检测

[0070] 将待测白酒酒样按步骤(1)的方式进行前处理后，取1.0~2.0mL处理好的样品按步骤(2)的条件作UPC²检测，通过使用QDa扫描检测，获得待测样品的色谱图，对待测白酒酒

样根据选择离子进行定性分析,然后根据7种生物胺的标准曲线对待测白酒酒样进行定量分析。

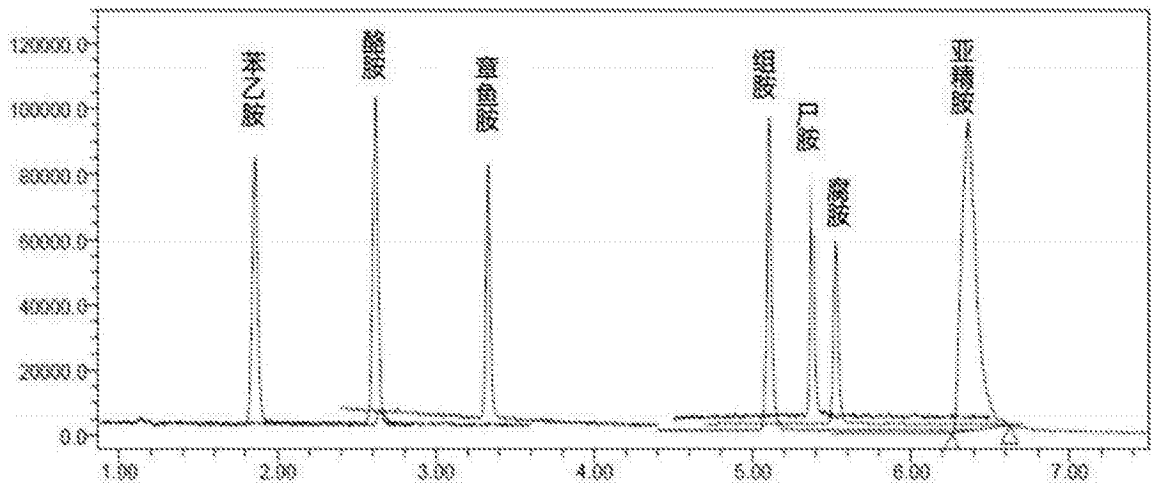


图1