DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251215002
引用格式: 樊紫朝, 刘通, 何剑, 等. 通过式固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法快速检测发酵乳中 6 种生物胺[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(11): 120–128.
FAN ZZ, LIU T, HE J, *et al*. Rapid determination of 6 kinds of biogenic amines in fermented dairy products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pass-through solid-phase extraction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(11): 120–128. (in Chinese with English abstract).

通过式固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法快速检测发酵乳中 6 种生物胺

樊紫朝[1,2,3#], 刘 通[1,3#], 何 剑[4,5], 夏金涛[1,3,6], 王秀娟[1,3], 裴晓燕[4,5], 韩晓旭[4,5*], 许秀丽[1,3*]

[1. 国家食品安全检验检测技术研究中心, 北京 100045; 2. 河北农业大学食品科技学院, 保定 071001; 3. 国家市场监督管理总局重点实验室(食品质量与安全), 北京 100176; 4. 国家乳业技术创新中心, 呼和浩特 010010; 5. 国家市场监督管理总局重点实验室(牛羊乳肉制品风险防控与关键技术), 呼和浩特 010010; 6. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430075]

摘 要: 目的 建立通过式固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)快速检测发酵乳中 6 种生物胺的方法。**方法** 样品经 2%甲酸/乙腈溶液提取后, 采用 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱进行净化, 有效去除蛋白质和磷脂等干扰物。色谱分离采用亲水作用色谱柱, 质谱检测在多反应监测模式下进行, 以内标法定量。**结果** 6 种生物胺在一定浓度范围内线性关系良好($r^2 \geqslant 0.996$), 检出限为 0.20~1.80 μg/kg, 定量限为 0.67~6.00 μg/kg, 加标回收率为 76.0%~117.8%, 相对标准偏差小于 13%。对市售发酵乳样品分析结果表明, 酪胺为最主要的生物胺, 浓度范围为在 0.80~1.70 mg/kg, 而组胺等与安全风险相关的生物胺含量极低或未检出。**结论** 本研究建立的方法, 通过引入 Oasis PRiME HLB 净化策略, 有效解决了乳品中磷脂干扰的问题, 具备前处理简便快速、灵敏度高、抗干扰能力强等优点, 适用于发酵乳中多种生物胺的高通量测定, 为乳制品质量控制与安全风险评估提供有力的技术支撑。

关键词: 生物胺; 发酵乳; 通过式固相萃取; 高效液相色谱-串联质谱法

收稿日期: 2025-12-15
基金项目: 国家乳业技术创新中心项目(2024-KFKT-002)
#樊紫朝和刘通为共同第一作者
第一作者: 樊紫朝(2000—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 860288600@qq.com
刘通(1986—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为分析化学。E-mail: liutongyes@163.com
***通信作者:** 韩晓旭(1985—), 女, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: hanxiaoxu@yili.com
许秀丽(1983—), 女, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 13146594637@163.com

Rapid determination of 6 kinds of biogenic amines in fermented dairy products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pass-through solid-phase extraction

FAN Zi-Zhao[1,2,3#], LIU Tong[1,3#], HE Jian[4,5], XIA Jin-Tao[1,3,6], WANG Xiu-Juan[1,3], PEI Xiao-Yan[4,5], HAN Xiao-Xu[4,5*], XU Xiu-Li[1,3*]

(1. *China National Research Center for Food Safety Inspection and Testing*, *Beijing* 100045, *China*; 2. *College of Food Science and Technology*, *Hebei Agricultural University*, *Baoding* 071001, *China*; 3. *Key Laboratory of Food Quality and Safety*, *State Administration for Market Regulation*, *Beijing* 100176, *China*; 4. *National Technology Innovation Center for Dairy*, *Hohhot* 010010, *China*; 5. *Key Laboratory of Cattle and Sheep Milk and Meat Products Risk Control and Key Technology*, *State Administration for Market Regulation*, *Hohhot* 010010, *China*; 6. *Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test*, *Wuhan* 430075, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid determination of 6 kinds of biogenic amines in fermented milk by pass-through solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** After extraction with a 2% formic acid/acetonitrile solution, samples were purified using an Oasis PRiME HLB solid-phase extraction cartridge to efficiently remove interferences such as proteins and phospholipids. Chromatographic separation was performed on a hydrophilic interaction chromatography column. Mass spectrometric detection was carried out in multiple reaction monitoring mode, and quantification was achieved by the internal standard method. **Results** The method was validated and demonstrated good linearity ($r^2 \geqslant 0.996$) for the 6 kinds of biogenic amines within a certain concentration range, the limits of detection were 0.20 μg/kg–1.80 μg/kg, the limits of quantitation were 0.67–6.00 μg/kg. Spiked recoveries were 76.0%–117.8%, with relative standard deviations below 13%. Analysis of commercial fermented dairy samples revealed that tyramine was the predominant biogenic amine, with concentrations ranging from 0.80 to 1.70 mg/kg, while safety-risk-associated biogenic amines such as histamine were detected at extremely low levels or were not detected. **Conclusion** The established method, by incorporating the Oasis PRiME HLB purification strategy, effectively resolves the critical issue of phospholipid interference in dairy products. It features advantages such as simple and rapid sample preparation, high sensitivity and strong anti-interference capability. The method is suitable for the high-throughput determination of multiple biogenic amines in fermented dairy products, providing robust technical support for the quality control and safety risk assessment of these products.

KEY WORDS: biogenic amines; fermented dairy products; pass-through solid-phase extraction; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0　引　言

乳品作为优质蛋白质、维生素和矿物质的重要膳食来源[1], 其品质与安全性备受消费者与监管机构关注[2]。然而, 在乳品的生产、加工及储存过程中, 微生物代谢活动可能催化游离氨基酸脱羧发生脱羧反应, 生成一类具有生理活性的低分子量含氮化合物-生物胺[3–4]。乳品中常见的生物胺包括组胺、酪胺、2-苯乙胺、色胺及尸胺等, 其含量不仅可用于评价产品的新鲜度与卫生状况, 也是判断其是否发生腐败变质的重要指标[5]。若生物胺在体内大量积累, 可能对人体健康构成潜在威胁。例如, 组胺摄入过量可能诱发类过敏反应, 酪胺与苯乙胺则可能引起血压升高或神经系统功能紊乱[6]。鉴于生物胺的潜在风险, 国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)、欧盟及美国等机构已针对部分食品(特别是水产品)中组胺、酪胺等生物胺制定了明确的限量标准[7]。美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)规定水产品中组胺限量为 50 mg/kg, 酪胺为 100 mg/kg[8]; 欧盟则规定食品中组胺限量为 100 mg/kg, 酪胺为 100~800 mg/kg, 其中水产品组胺限量为 100 mg/kg[9]。我国现行标准 GB 2733—2015《食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品》、GB 10136—2015《食品安全国家标准 动物性水产制品》等亦对水产品中组胺含量做出规定(如高组胺鱼类为 40 mg/100 g, 其他鱼类为 20 mg/100 g), 但整体来看, 相关限量标准仍显宽松[10], 覆盖面有限。然而, 针对乳制品中生物胺的种类和限量标准, 目前尚缺乏系统、统一的国家或国际法规, 亟需开展深入

研究并建立有效监控手段, 以保障消费者健康与行业规范发展[11]。

因此, 开发和验证一种高灵敏度、高准确性和高稳定性的生物胺检测方法, 对于提升乳品质量控制水平、开展安全风险评估及保障公众健康具有重要意义[12]。传统的色谱分析技术(如液相色谱法[13]、气相色谱法[14]等)在生物胺检测中存在明显局限。由于生物胺多具有强极性且缺少发色基团[15], 通常需要通过衍生化处理以改善其色谱行为并引入可检测基团, 增加了分析复杂性与不确定性。衍生化步骤与乳制品复杂基质中大量共存物质的干扰效应相互叠加[16], 进一步降低了传统方法在灵敏度及选择性方面的表现。相较之下, 液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)兼具出色的分离能力和高特异性检测性能, 已成为生物胺分析领域的主流方法[17]。

然而, 乳品基质复杂, 尤其是磷脂含量较高, 易在 LC-MS/MS 分析中引发基质效应(尤其是离子抑制)[18], 严重影响生物胺的准确定量[19−20]。为应对上述问题, 目前常用的前处理手段主要包括蛋白沉淀与固相萃取(solid-phase extraction, SPE)。然而, 蛋白沉淀法对磷脂去除效果有限; 传统 SPE 方法(如阳离子交换)虽具备良好选择性, 但操作步骤烦琐、耗时较长、且洗脱液常需蒸干复溶, 不利于高通量分析。在各类乳制品中, 发酵乳因涉及多种微生物参与的发酵过程, 生物胺的生成风险更高, 基质也更为复杂, 因此对其生物胺含量的准确监测更具挑战性, 也更具实际意义。

针对上述技术难题, 本研究引入一种基于穿流机制的新型反相/磷脂去除固相萃取材料-Oasis PRiME HLB, 应用于发酵乳中多种生物胺的高效净化。该净化策略利用填料对磷脂等强干扰物的选择性吸附, 使极性较强的生物胺直接穿过萃取柱, 在简化操作流程、缩短分析时间的同时, 实现对基质干扰的高效去除。本研究围绕该新型净化技术, 系统优化提取溶剂组成、涡旋与超声时间等关键参数, 旨在建立一种前处理简便、分析快速、抗干扰能力强的高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)新方法, 解决当前发酵乳品中生物胺检测的前处理瓶颈, 为批量样品的高效监测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

市售发酵乳样品。

组胺(100 mg, 纯度 96.7%)、色胺(100 mg, 纯度 99.9%)、酪胺(100 mg, 纯度 99.0%)、2-苯乙胺盐酸盐(100 mg, 纯度 99.2%)、尸胺(250 mg, 纯度 99.9%)、章胺盐酸盐(100 mg, 纯度 99.9%)、内标 1,7-庚二胺(100 mg, 纯度 99.4%)(上海泰坦科技有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国赛默飞世尔科技公司); 甲酸、乙醇(色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 实验所用超纯水由 Millipore Milli-Q 纯水仪净化得到。

PL-203 型号称量天平(精度 0.001 g, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司); QT-MT200 多管涡旋混合仪(美国 Benchmark 公司); KQ-500DE 数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Allegra X-22 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Millipore 有限公司); LC-30AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司); AB SCIEX Triple Quad™ 6500$^+$质谱系统(美国 AB SCIEX 公司); Xbridge BEH HILIC (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)、Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(6 cc)(美国 Waters 公司); 有机相针式滤器滤膜(13 mm×0.22 μm, 尼龙材质, 美国 Agilent 公司)。

1.2 标准溶液配制

1.2.1 标准储备液

准确称取(精确至 0.1 mg)组胺、色胺、酪胺、尸胺及 1,7-庚二胺(内标)各 10.0 mg, 并称取相应质量的 2-苯乙胺盐酸盐与章胺盐酸盐(换算后相当于各 10.0 mg 游离胺), 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中。加入适量 0.5%甲酸水/乙腈溶液(3:7, *V*:*V*), 定容至 10 mL, 配制成质量浓度为 1000 mg/L 的标准储备液。储备液于–25 ℃避光保存, 有效期 3 个月。

1.2.2 混合标准中间液

分别精确吸取上述各生物胺储备液(1000 mg/L) 200 μL, 置于 10 mL 棕色瓶中, 加入适量 0.5%甲酸水/乙腈溶液(3:7, *V*:*V*)定容至 10 mL, 配制成质量浓度为 10.0 mg/L 的混合标准中间液。该溶液于–25 ℃避光保存, 有效期 1 个月。

1.2.3 标准工作液

以 2%甲酸乙腈为溶剂, 配制质量浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 μg/L 的混合标准系列溶液。内标 1-7 庚二胺质量浓度为 1 mg/L, 采用内标法定量。

1.3 样品采集与前处理

市售发酵乳样品购回后立即混匀, 冷冻样品于 4 ℃解冻。取 10~20 g 样品均质后分装, 于–25 ℃冷冻保存。分析前取单份样品于 4 ℃解冻, 避免反复冻融。

样品提取: 准确称取 1 g 样品, 加入 5 mL 2%甲酸乙腈溶液, 振荡涡旋 4 min, 超声 6 min, 10000 r/min 离心 10 min。取 3 mL 上清液过 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(6 cc), 收集流出液, 经 0.2 μm 滤膜过滤, 取 990 μL 滤液加入 10 μL 内标溶液, 定容至 1 mL, 待上机测定。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱: Xbridge BEH HILIC (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)。

柱温 40 ℃。流动相 A: 乙腈溶液(0.5%甲酸), 流动相 B: 含 0.1%甲酸+50 mmol/L 甲酸铵水溶液。进样量: 4.0 μL; 流速: 0.4 mL/min。梯度洗脱程序见表 1。

1.4.2　质谱条件

扫描模式: 电喷雾电离正离子模式(electrospray ionization positive mode, ESI+), 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 气帘气体压力, 35 psi; 碰撞气压力: 9 psi; 离子喷雾电压(ion spray voltage, IS): 4500 V, 离子源温度: 500 ℃。目标物及内标的母离子、子离子、去簇电压(declustering potential, DP)及碰撞能量(collision energy, CE)参数见表 2。

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	90	10
0.5	90	10
1.0	60	40
2.5	60	40
4.0	90	10
8.0	90	10

表 2　目标化合物质谱参数

Table 2　Mass spectrometry parameters of target compounds

化合物	保留时间/min	母离子(*m*/*z*)	子离子(*m*/*z*)	DP/V	CE/eV
色胺	1.44	161.1	144.2*/117.1	30/30	15/34
2-苯乙胺	1.47	122.1	105.1*/77.1	30/30	17/36
酪胺	1.51	138.1	121.1*/77.1	30/30	15/36
章胺	1.54	136.1	119.1*/91.1	50/50	24/17
组胺	2.07	112.1	95.1*/68.1	40/40	20/29
尸胺	2.10	103.1	86.1*/69.0	40/40	14/21
1,7-庚二胺(内标)	2.01	131.1	114.0*/66.0	15/15	14/10

注: *定量离子。

1.5　标准曲线绘制

本研究采用超高温瞬时灭菌牛乳基质匹配结合内标(1,7-庚二胺)法进行定量分析。以目标物质量浓度为横坐标(*X*, mg/L), 扣除本底后的目标物与内标峰面积比为纵坐标(*Y*)绘制标准曲线。

1.6　数据处理

数据采集与峰面积积分采用 AB SCIEX Analyst 1.7 软件, 统计学分析使用 Microsoft Excel 2010 软件。

2　结果与分析

2.1　质谱条件与色谱条件优化

在质谱系统上对各目标物进行参数优化。首先采用 Q1 扫描确定母离子, 再通过子离子扫描(MS^2)筛选响应稳定、特异性强的碎片离子。最后在 MRM 模式下优化各离子对的 DP 与 CE 等关键参数, 以获得最大信号响应。最终确定的质谱参数见表 2。

生物胺极性较强, 色谱分离是方法建立的关键。初步试验表明常规反相 C_{18} 色谱柱对目标物几乎无保留, 酪胺、苯乙胺、色胺等均在接近死时间(<1 min)流出, 无法实现有效分离(图 1)。因此, 本研究改用亲水作用色谱柱进行后续优化, 以增强保留与分离效果。

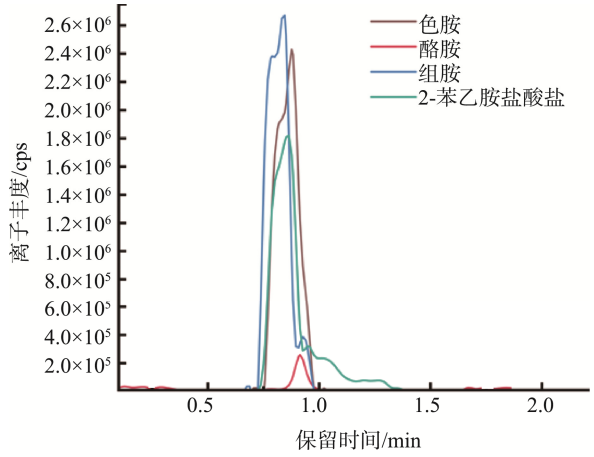


图 1　C_{18} 色谱柱对生物胺的分离效果色谱图

Fig.1　Chromatogram of the separation effect of C_{18} chromatographic column on biogenic amines

色谱柱换用极性更强的 Xbridge BEH HILIC 色谱柱, 能检出 6 种生物胺, 保留时间相对于 C_{18} 色谱柱得到改善。说明色谱柱对生物胺具有更强的保留能力。

结合 Xbridge BEH HILIC 色谱柱特性, 系统优化流动相组成。通过比较乙腈与甲醇的洗脱能力及系统压力, 并考察不同酸改性剂(甲酸、乙酸)及其浓度, 最终确定有机相为 0.5%甲酸/乙腈溶液。该体系不仅洗脱能力适宜, 且有利于生物胺质子化, 增强 ESI+模式下的离子化效率[21]。水相

方面，通过考察不同浓度甲酸铵(含 0.1%甲酸)对生物胺保留、分离和响应的影响，最终水相为 0.1%甲酸+50 mmol/L 甲酸铵水溶液。该体系可稳定 pH，延缓出峰时间，改善分离度，并提升目标物响应[22]。经上述优化，6 种生物胺在 HPLC-MS/MS 体系中实现良好分离、稳定电离与高灵敏度检测，标准溶液色谱图见图 2。

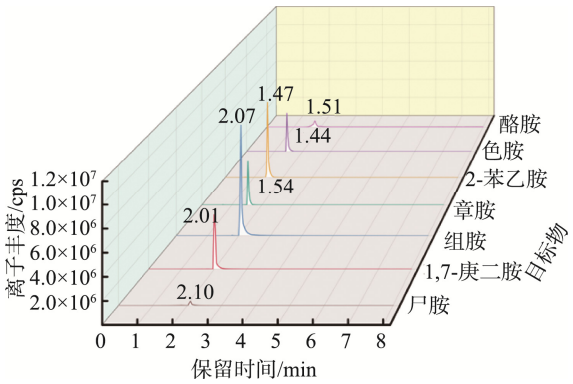


图 2 优化条件下 6 种生物胺及内标的色谱图

Fig.2 Chromatogram of the 6 kinds of biogenic amines and the internal standard under optimized conditions

2.2 固相萃取柱的优化

乳制品基质中生物胺的分析前处理，其核心目标在于高效萃取目标物并最大程度去除蛋白与磷脂等基质干扰。为建立适用于批量样品的前处理方法，本研究通过文献调研比较两种常用于去除磷脂的固相萃取(solid-phase extraction, SPE)策略：混合型阳离子交换柱(Oasis MCX)与新型反相/磷脂去除固相萃取柱(Oasis PRiME HLB)[23]。

Oasis MCX 柱基于强阳离子交换的“保留-洗脱”机制，虽能有效去除干扰物，但其烦琐的 pH 调控及洗脱液蒸干复溶步骤不仅耗时，还易造成目标物损失[24–26]。相比之下，Oasis PRiME HLB 固相萃取柱采用更为高效的穿流净化模式[27]。该柱通过吸附磷脂等大分子干扰物，使极性较强的生物胺直接流出。这一方法无需活化、平衡及洗脱步骤，流出液可直接进样分析，显著缩短了前处理时间[28]。

为验证 Oasis PRiME HLB 对基质效应的抑制效果，本研究比较了经该柱净化与未净化(仅蛋白沉淀)加标样品(100 μg/L)中 6 种生物胺的信号响应强度，结果见图 3。未经净化的样品中各目标物的质谱响应均受到不同程度的抑制，这主要是由于发酵乳基质中富含的磷脂等共流出干扰物在离子源内产生了强烈的基质抑制效应。经通过式固相萃取净化，所有目标物的信号强度均显著回升。特别是对于 2-苯乙胺、色胺、酪胺和章胺，其峰面积响应值提高了两倍以上。这一结果有力证明了 Oasis PRiME HLB 柱能有效截留引起离子抑制的磷脂类杂质，从而提高检测灵敏度。综上，本研究选用 Oasis PRiME HLB 作为前处理手段，后续所有关键参数(提取溶剂、涡旋及超声时间)均在 100 μg/L 加标发酵乳中优化，确保条件贴近实际样品。

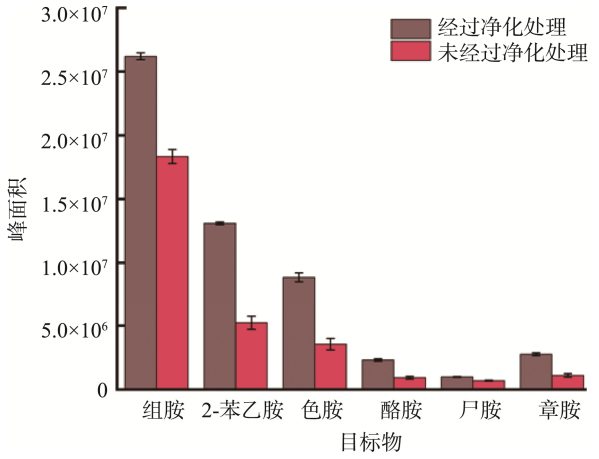


图 3 Oasis PRiME HLB 净化对生物胺信号响应的影响

Fig.3 Effects of Oasis PRiME HLB purification on the signal response of biogenic amines

2.3 提取溶剂优化

提取试剂直接影响生物胺回收率、基质去除效果及方法灵敏度。本研究系统比较了不同有机溶剂及其酸度对提取效果的影响(图 4)。纯乙腈、纯甲醇或乙腈:甲醇(1:1, *V*:*V*)混合物提取时，生物胺峰面积最低，表明中性或弱极性条件沉淀蛋白能力弱，且不利于生物胺电离[29]。向乙腈中添加甲酸可显著提升生物胺的回收率和离子化效率。当甲酸浓度从 0.5%逐步提高至 2.0%时，6 种生物胺的峰面积持续增加，于 2.0%甲酸/乙腈条件下达到最大值，蛋白质沉淀与质子化效果最佳。当甲酸浓度继续增至 5.0%时，峰面积略有下降，这归因于高浓度甲酸引起的离子抑制效应[30]。综合考量回收率与抑制效应，确定 2.0%甲酸/乙腈溶液为最优提取试剂。

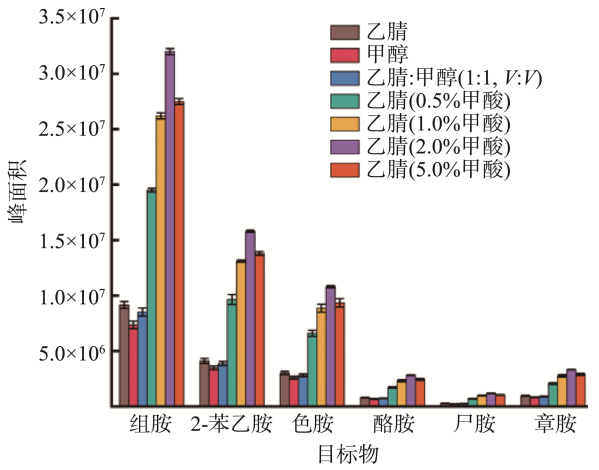


图 4 不同提取溶剂对 6 种生物胺提取效率的影响

Fig.4 Effects of different extraction solvents on the extraction efficiency of the 6 kinds of biogenic amines

2.4　涡旋时间优化

涡旋混匀作为前处理的关键步骤, 其主要目的是通过物理作用促进提取剂与基质充分接触, 促进生物胺释放[31]。本研究考察了 2、4、6、8 min 的不同涡旋提取时间对 6 种生物胺峰面积的影响(图 5)。结果显示, 2 min 涡旋处理未能充分提取生物胺, 峰面积最低。当延长至 4 min 时, 所有目标物峰面积显著增加, 表明提取剂已能有效渗透乳品基质, 促使大部分生物胺被充分释放和溶解, 达到了提取效率的平衡点。继续延长至 6 min 或 8 min, 峰面积几乎不再增加。因此, 确定 4 min 为最佳涡旋时间。

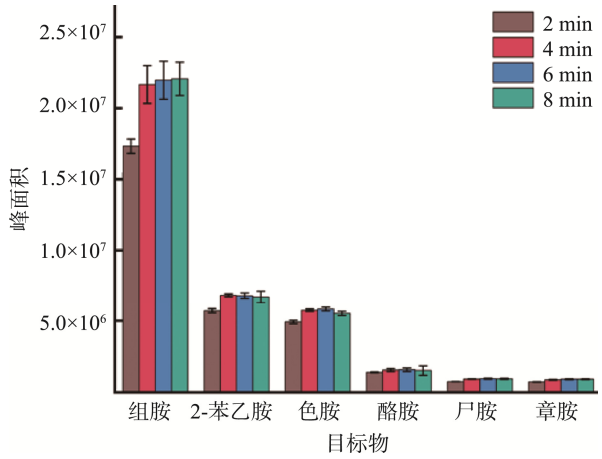


图 5　不同涡旋时间对 6 种生物胺提取效率的影响

Fig.5　Effects of different vortexing times on the extraction efficiency of the 6 kinds of biogenic amines

2.5　超声时间

超声提取作为一种高效的物理辅助提取手段, 其核心作用在于通过空化效应[32]促进生物胺从复杂乳品基质中释放与溶解。本研究考察了不同超声提取时间(2、4、6、8、10 min)对 6 种生物胺峰面积的影响(图 6), 以确定最短高效提取时间。结果显示, 较短的超声处理时间(2 min 和 4 min)未能实现充分提取, 导致各生物胺的信号响应普遍偏低。当延长至 6 min 时, 目标物峰面积明显增加并达到或接近峰值, 表明提取效率趋于平衡。继续延长至 8 min 或 10 min, 信号响应无明显变化, 提取已进入平台期。因此, 综合考量提取效率与时间成本, 确定 6 min 为最佳超声提取时间。

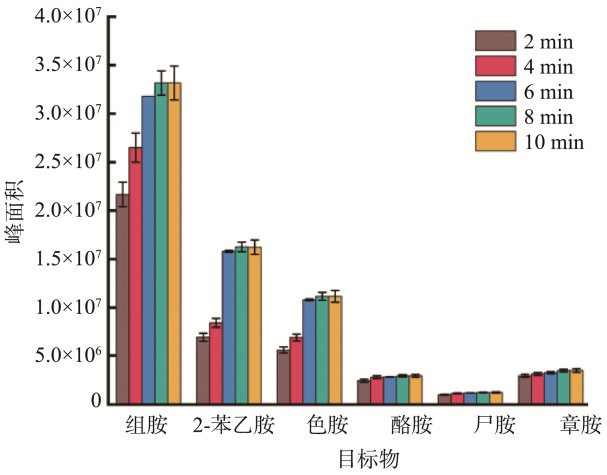


图 6　不同超声时间对 6 种生物胺提取效率的影响

Fig.6　Effects of different ultrasonic times on the extraction efficiency of the 6 kinds of biogenic amines

2.6　方法学评价

2.6.1　基质效应评价

基质效应是评估前处理净化效果的关键指标。本研究通过比较基质匹配标准曲线与溶剂标准曲线的斜率来计算, 计算如公式(1):

基质效应/%=基质标准曲线斜率/溶剂标准曲线斜率×100%　　(1)

结果(表 3)显示, 组胺、2-苯乙胺、色胺、尸胺和章胺的基质效应在 101.37%~118.18% 之间, 处于弱基质效应范围。然而, 酪胺的基质效应为 72.97%, 存在中等程度的离子抑制, 这可能是由于酪胺的色谱保留行为与某些未被 Oasis PRiME HLB 柱截留的强极性基质组分(如小分子肽)重叠, 导致电离竞争所致。为确保酪胺定量准确度, 必须引入基质匹配校正。同时, 为保证多组分分析方法的整体统一性, 并有效减小其他分析物因微弱基质差异可能引入的系统偏差, 本研究最终对所有 6 种生物胺均统一采用基质匹配-内标法进行定量。

2.6.2　线性范围、检出限与定量限

本研究采用基质匹配-内标法建立校准曲线方程。结果显示, 6 种生物胺在对应的浓度范围内线性良好, 决定系数(r^2)均大于等于 0.996。以信噪比(S/N)为 3 和 10 分别计算方法的检出限(limit of detection, LOD)与定量限(limit of quantitation, LOQ)。LODs 为 0.20~1.80 μg/kg, LOQs 为 0.67~6.00 μg/kg(表 3), 灵敏度满足发酵乳中生物胺的检测需求。

2.6.3　精密度与准确度

方法的精密度通过日内和日间相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)进行评价。如表 3 所示, 日内精密度为 3.19%~9.62%, 日间精密度为 4.67%~10.58%, 均表明该方法具有良好的稳定性。方法的准确度通过在样品中进行 3 个水平的加标回收实验来评估。由表 4 可知, 6 种生物胺在 3 个加标水平下的平均回收率范围为 76.0%~117.8%。本研究在净化步骤后加入内标, 该数据直观反映了绝对提取效率。基于 Oasis PRiME HLB 的净化, 目标物无需经历洗脱步骤, 减少了过程损失。结果显示, 即使不采用内标校正提取过程, 方法的绝对回收率依然稳定(RSD<15%), 符合分析的要求, 证明本方法准确度高。

2.7　实际样品测定

应用本方法对多批次市售发酵乳中的 6 种生物胺进行测定, 结果表明不同产品中生物胺种类与含量存在差

异。所检样品总体安全，与过敏反应相关的高风险生物胺组胺以及反映产品腐败的尸胺均未检出或低于 LOQ，表明产品卫生控制良好，对普通消费者无显著风险。酪胺是样品中含量最高的生物胺，其浓度稳定在 0.80~1.70 mg/kg(表 5)，符合乳品发酵过程的典型特征，但提示了对服用单胺氧化酶抑制剂等特定敏感人群存在潜在风险[33]。此外，2-苯乙胺与色胺含量较低但波动大，提示不同产品在生产工艺或原料控制方面存在差异。

表 3 6 种生物胺的线性范围、LODs、LOQs、精密度及基质效应

Table 3 Linear ranges, LODs, LOQs, precision and matrix effects for the 6 kinds of biogenic amines

目标物	标准曲线	线性范围/(μg/kg)	决定系数(r^2)	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)	基质效应/%	日内精密度(n=3)	日间精密度(n=3)
2-苯乙胺	Y=0.0222X+0.0247	0.1~200.0	0.999	0.64	2.12	101.37	5.67	6.30
章胺	Y=0.0047X–0.001	0.1~200.0	0.999	0.20	0.67	114.63	3.79	5.87
组胺	Y=0.0449X+0.0186	0.1~200.0	0.999	0.85	2.84	108.45	7.55	9.22
色胺	Y=0.0158X+0.0176	0.2~200.0	0.999	0.47	1.56	110.49	3.19	4.67
尸胺	Y=0.0013X+0.0058	2.0~500.0	0.996	1.80	6.00	118.18	6.49	8.24
酪胺	Y=0.0027X+0.0054	2.0~500.0	0.998	1.62	5.39	72.97	9.62	10.58

表 4 6 种生物胺的回收率与精密度(n=6)

Table 4 Recoveries and precision for the 6 kinds of biogenic amines (n=6)

目标物	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	RSDs/%
2-苯乙胺	20	117.8	2.0	50	104.9	7.0	100	106.7	2.6
章胺	20	91.0	3.9	50	85.8	2.5	100	93.1	4.2
组胺	20	98.5	4.5	50	94.4	6.4	100	91.5	4.9
色胺	20	100.5	1.9	50	82.3	8.4	100	83.5	3.8
尸胺	20	76.0	3.8	50	82.2	1.9	100	96.3	2.5
酪胺	100	98.4	12.7	200	93.3	8.3	500	90.3	5.3

表 5 市售发酵乳样品中 6 种生物胺的测定结果

Table 5 Determination results of 6 kinds of biogenic amines in commercial fermented dairy samples

样品名称	酪胺/(mg/kg)	组胺/(μg/kg)	色胺/(μg/kg)	2-苯乙胺/(μg/kg)	章胺/(μg/kg)	尸胺/(μg/kg)
样品 1	1.05±0.21	ND	ND	7.45±0.64	ND	ND
样品 2	1.37±0.04	ND	ND	10.49±2.43	ND	ND
样品 3	1.33±0.01	ND	1.80±0.16	5.04±1.99	ND	ND
样品 4	1.21±0.13	ND	1.57±0.21	9.95±0.50	ND	ND
样品 5	1.27±0.07	ND	1.58±0.19	7.35±2.26	ND	ND
样品 6	1.25±0.15	ND	ND	10.40±0.21	ND	ND
样品 7	1.38±0.04	ND	ND	ND	ND	ND
样品 8	1.10±0.05	ND	ND	7.80±0.42	ND	ND
样品 9	1.70±0.04	ND	3.15±0.18	10.78±4.70	ND	ND
样品 10	1.48±0.09	ND	ND	ND	ND	ND
样品 11	1.27±0.03	ND	1.36±0.23	5.07±0.47	ND	ND
样品 12	1.61±0.02	7.88±0.53	45.65±1.56	96.00±3.54	ND	ND
样品 13	1.11±0.10	ND	1.60±0.32	7.20±0.07	ND	ND
样品 14	1.03±0.03	ND	4.43±0.02	4.35±0.09	ND	ND
样品 15	1.02±0.08	ND	2.56±0.29	ND	ND	ND
样品 16	1.00±0.05	ND	ND	17.40±9.12	ND	ND
样品 17	0.80±0.06	ND	2.21±0.41	7.23±0.74	ND	ND

注: ND 表示未检出(浓度低于 LOD)。

3 结　论

本研究将 Oasis PRiME HLB 穿流式固相萃取技术引入发酵乳中 6 种生物胺的 HPLC-MS/MS 分析, 建立了无需衍生、前处理简便、灵敏度高、抗干扰能力强的新方法, 解决了传统方法中磷脂干扰严重、操作烦琐、通量低等瓶颈。方法学验证结果表明, 该方法在给定的浓度范围内线性良好(r^2≥0.996), LOQs 低至 0.67~6.00 μg/kg, 满足发酵乳中生物胺高通量检测需求。对市售样品的分析揭示了酪胺是发酵乳中的主要生物胺其浓度稳定在 0.80~1.70 mg/kg, 组胺、尸胺等高风险胺未检出或低于 LOD, 表明市售发酵乳总体安全; 但酪胺含量对单胺氧化酶抑制剂使用者存在潜在风险, 需持续关注。本方法操作全程无需活化、平衡与洗脱步骤, 单样前处理时间小于 15 min, 有机溶剂消耗量低, 适用于大批量样品快速筛查与日常监测, 为乳制品生物胺风险评估及限量标准制定提供了可靠技术支撑。

参考文献

[1] ZHAO S, LI R, LI M, *et al*. Evaluation of the effects of Chinese dietary guidelines on nutrition, environment, and cost [J]. Chinese Journal of Population, Resources and Environment, 2024, 22(4): 515–525.

[2] WU X, LU Y, XU H, *et al*. Challenges to improve the safety of dairy products in China [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 76: 6–14.

[3] BENKERROUM N. Biogenic amines in dairy products: Origin, incidence, and control means [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016, 15(4): 801–826.

[4] ALVAREZ AM, MORENO-ARRIBAS VAM. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution [J]. Trends in Food Science & Technology, 2014, 39(2): 146–55.

[5] VINCI G, ANTONELLI M. Biogenic amines: Quality index of freshness in red and white meat [J]. Food Control, 2002, 13(8): 519–524.

[6] ÖNAL A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods [J]. Food Chemistry, 2006, 103(4): 1475–1486.

[7] PIERINA V, MARIA S, ANTONELLO P. An overview of histamine and other biogenic amines in fish and fish products [J]. Foods (Basel, Switzerland), 2020, 9(12): 1795.

[8] TONG L, RUIGUO W, PEILONG W. The development of an ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for biogenic amines in fish samples [J]. Molecules, 2022, 28(1): 184–184.

[9] SON CY, KEE AL, LIN MC, *et al*. Determination of biogenic amines in chicken, beef, and mutton by dansyl chloride microwave derivatization in Malaysia [J]. Journal of food science, 2023, 88(2): 650–665.

[10] 孙项丽, 郭莹莹, 于秀娟, 等. 鲭鱼品质评价及品质变化与组胺含量研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(12): 3708–3713.
SUN XL, GUO YY, YU XJ, *et al*. Research progress in quality evaluation, quality changes and histamine content of mackerel [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(12): 3708–3713.

[11] MARTA M, LAURA B, DIEGO G, *et al*. Analytical strategies for the determination of biogenic amines in dairy products [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(4): 3612–3646.

[12] 史赟学, 邱雨, 王峻, 等. 婴幼儿配方乳粉中污染物风险评估体系的探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(10): 3874–3880.
SHI YX, QIU Y, WANG J, *et al*. Discussion on the risk assessment system of pollutants in infant formula milk powder [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(10): 3874–3880.

[13] FRANçOIS I, SANDRA K, SANDRA P. Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations—A review [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 641(1-2): 14–31.

[14] BARTLE DK, MYERS P. History of gas chromatography [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21(9-10): 547–557.

[15] 蔡琼, 余文琴, 李小琴, 等. 高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱法同时测定液态发酵食品中 14 种生物胺及其代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(4): 87–97.
CAI Q, YU WQ, LI XQ, *et al*. Simultaneous determination of 14 kinds of biogenic amines and their metabolites in liquid fermented food by high performance liquid chromatography-triple quadrupole/composite linear ion trap mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(4): 87–97.

[16] HUPPERTZ T, SHKEMBI B, BRADER L, *et al*. Dairy matrix effects: Physicochemical properties underlying a multifaceted paradigm [J]. Nutrients, 2024, 16(7): 943.

[17] 张殿伟, 张玉华, 马元辰, 等. 发酵食品中生物胺检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(20): 140–151.
ZHANG DW, ZHANG YH, MA YC, *et al*. Research progress in detection technology of biogenic amines in fermented foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(20): 140–151.

[18] CONTARINI G, POVOLO M. Phospholipids in milk fat: Composition, biological and technological significance, and analytical strategies [J]. IJMS, 2013, 14(2): 2808–2831.

[19] GOSETTI F, MAZZUCCO E, ZAMPIERI D, *et al*. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1217(25): 3929–3937.

[20] AZADEH N, REZA J, SHAYA M, *et al*. Overview, consequences, and strategies for overcoming matrix effects in LC-MS analysis: A critical review [J]. The Analyst, 2021, 146(20): 6049–6063.

[21] 王璐, 孙小杰, 耿岳, 等. 非衍生化-QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鱼肉中 9 种生物胺 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(3): 269–276.
WANG L, SUN XJ, GENG Y, *et al*. Rapid determination of 9 kinds of biogenic amines in fish by non-derivatization-QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(3): 269–276.

[22] 王奇, 苏佳婷, 杨华瑞, 等. 液相色谱-串联质谱法测定特膳食品中天冬酰胺和谷氨酰胺[J]. 分析测试学报, 2025(5): 884–891.
WANG Q, SU JT, YANG HR, *et al*. Determination of asparagine and glutamine in special dietary foods by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2025(5): 884–891.

[23] POOLE FC. New trends in solid-phase extraction [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(6): 362–373.

[24] DEEB AA, SCHMIDT TC.. Tandem anion and cation exchange solid phase extraction for the enrichment of micropollutants and their transformation products from ozonation in a wastewater treatment plant [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(16): 4219–4232.

[25] LAVÉN M, ALSBERG T, YU Y, *et al*. Serial mixed-mode cation- and anion-exchange solid-phase extraction for separation of basic, neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by high-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1216(1): 49–62.

[26] 王旭峰, 王强, 张英侠, 等. 固相萃取净化/超高效液相色谱-串联质谱法测定养殖环境中地西泮及其代谢物[J]. 分析测试学报, 2023(3): 337–343.
WANG XF, WANG Q, ZHANG YX, *et al*. Determination of diazepam and its metabolites in aquaculture environment samples by solid phase extraction cleanup and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(3): 337–343.

[27] DONGHUI L, JINGJING G, HAO D, *et al*. Simultaneous determination of twelve mycotoxins in edible oil, soy sauce and bean sauce by PRiME HLB solid phase extraction combined with HPLC-Orbitrap HRMS [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1001671.

[28] 杜瑞, 高海东, 高火亮, 等. 基于 PRiME-HLB 的超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中 43 种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6480–6488.
DU R, GAO HD, GAO HL, *et al*. Determination of 43 kinds of pesticide residues in vegetables by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on PRiME-HLB [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(16): 6480–6488.

[29] PLENIS A, OLĘDZKA I, KOWALSKI P, *et al*. Recent trends in the quantification of biogenic amines in biofluids as biomarkers of various disorders: A review [J]. Journal of Clinical Medicine, 2019, 8(5): 640–640.

[30] FUREY A, MORIARTY M, BANE V, *et al*. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications [J]. Talanta, 2013, 115: 104–122.

[31] CHEN Z, XIE J, MEI J. A review on analytical techniques for quantitative detection of biogenic amines in aquatic products [J]. Chemosensors, 2024, 12(12): 274–274.

[32] WANG W, WU X, CHANTAPAKUL T, *et al*. Acoustic cavitation assisted extraction of pectin from waste grapefruit peels: A green two-stage approach and its general mechanism [J]. Food Research International, 2017, 102: 101–110.

[33] EDINOFF AN, SWINFORD CR, ODISHO AS, *et al*. Clinically relevant drug interactions with monoamine oxidase inhibitors [J]. Health Psychology Research, 2022, 10(4): 39576–39576.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)