

文章编号: 1004-4353(2014)03-0249-04

柱前衍生化-高效液相色谱法测定啤酒中的多胺

王利娜, 金东日*
(延边大学理学院 化学系, 吉林 延吉 133002)

摘要: 建立了用柱前衍生化高效液相色谱法分析啤酒中多胺的方法. 在碱性介质中, 多胺与 1-(5-氟-2,4-二硝基苯基)-4-甲基哌嗪 (PPZ) 进行衍生化反应生成衍生物. 实验采用 Diamonsil C18(2) (迪马, 150 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以水-有机溶剂 (乙腈-甲醇, 体积比为 6:4) 作为流动相, 流速为 0.5 mL/min, 用梯度洗脱程序方法同时分离 5 种多胺衍生物, 衍生物的检测波长为 362 nm. 通过考察方法的线性范围、稳定性、检测限和回收率表明: 本方法具有样品处理简单、灵敏度高、速度快的优点, 可用于啤酒中多胺含量的测定.

关键词: 高效液相色谱; 多胺; 1-(5-氟-2,4-二硝基苯基)-4-甲基哌嗪

中图分类号: O656.31 **文献标识码:** A

Determination of polyamines in beer using high-performance liquid chromatography with derivatization reagent

WANG Lina, JIN Dongri*
(Department of Chemistry, College of Science, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: A high performale liquid chromatography method was developed for the determination of polyamines in beer. The polyamines were derivatived by 1-(5-fluoro-2, 4-dinitrophenly)-4-methlypiperazine (PPZ) in alkaline condition and then separated on a Diamonsil C18(2) (Dikma, 150 mm×4.6 mm, 3 μm) column. The effect of mobile phase composition was investigated at detection wavelength of 362 nm. The result indicated that the optimum separation was obtained by using water; (acetonitrile: methanol=6:4, *v/v*) as the mobile phase with gradient elution (flow rate of 0.5 mL/min). The linear range, stability, detection limit and recovery were examined. The method was simple, sensitive and rapid. The proposed method has been applied to the determination of polyamines in beer.

Key words: high performale liquid chromatography; polyamines; 1-(5-fluoro-2, 4-dinitrophenly)-4-methlypiperazine

多胺是一类广泛存在于生物体内的有机小分子物质, 主要包括腐胺 (PUT)、尸胺 (CAD)、精咪 (SPD) 和精胺 (SPM) 等, 它与细胞分化、增殖、发育有关, 并能影响 DNA、RNA 和蛋白质的代谢. 食物是人体内多胺的重要来源之一^[1], 研究表明, 多胺水平与肿瘤发生、发展存在一定相关性^[2], 因此如何准确而快速地检测出食物中多胺的含量具有重要意义. 传统的多胺检测方法^[3] 主要采用氨基酸分析仪和纸电泳法, 但这两种方法存在样品回收率低、检测灵敏度不高的问题. 目前多胺的检测多采用衍生化的方法, 即将多胺的氨基接在对荧光或紫外有吸收的基团上, 再通过液相色谱分

离检测. Tang 等^[4]人采用 4-氯-3,5-二硝基三氟甲苯作为衍生化试剂,用 HPLC-UV 检测了啤酒中的多胺,但此方法分析时间较长,灵敏度较低. 文献[5]用衍生化试剂 1-(5-氟-2,4-二硝基苯基)-4-甲基哌嗪(PPZ)建立了分析啤酒中多胺含量的高效液相色谱法,本文依据文献[5]的方法,对啤酒中多胺含量的测定进行研究.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器有 Shimadzu LC-6A 系列液相色谱仪,UV 检测器,N2000 色谱软件(浙江大学),U-3100 紫外-可见分光光度仪(Shimadzu),Agilent HPLC-6410 三重串联四级杆质谱仪.

1-(5-氟-2,4-二硝基苯基)-4-甲基哌嗪(PPZ)、1,6-己二胺(DAH)、1,3-丙二胺(DAP)、腐胺(PUT)为梯希爱(上海)化成工业发展有限公司产品,尸胺(CAD)为百灵威科技公司产品,亚精胺(SPD)和精胺(SPM)为 Sigma-Aldrich 公司产品,乙腈为色谱纯,水为超纯水,6 种不同品牌啤酒购于延吉市的超市.

1.2 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C18(2)(迪马,150 mm×4.6 mm,3 μm),流动相为水-有机溶剂(乙腈-甲醇,体积比为 6:4),紫外检测波长为 362 nm,流速为 0.5 mL/min,柱温为 25 ℃,进样量为 10 μL,梯度洗脱程序如表 1 所示.

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	水/%	乙腈-甲醇/%
3	22	78
10	15	85
13	10	95
19	5	95
20	22	78
30	22	78

1.3 LC-MS

MS 条件:ESI 离子源,正离子模式,干燥气温度为 300 ℃,干燥气流量为 3 L/min,雾化器压力为 15 psi,毛细管电压为 4 000 V,质量范围为 200~1 300 Da. 色谱条件同 1.2.

1.4 试液

取 PPZ(20.2 mg)溶解于 1 mL 乙腈溶液中,配成浓度为 71.1 mmol/L 的储备液,于 4 ℃保存,临用前稀释. 取适量 DAD、CAD、PUT、SPD 和 SPM,分别加 1 mL 超纯水溶解,再加 10 mmol/L 硼砂溶液使各多胺浓度均为 5 mmol/L. 取 DAH 11.6 mg,加 1 mL 超纯水溶解,再加 10 mmol/L 硼砂溶液使 DAH 浓度为 30 μmol/L.

1.5 衍生化反应

分别取 7.0 mmol/L PPZ 和 50.0 μmol/L 多胺溶液各 150 μL 置于聚丙烯管中,搅拌 2 min 后于 60 ℃条件下反应 50 min. 反应液冷却后,过 0.22 μm 膜,取滤液 10 μL 进样.

1.6 样品处理

用 0.45 μm 滤膜过滤啤酒样品,然后用 0.1 mol/L 硼砂溶液稀释啤酒滤液 1 倍. 向啤酒稀释液加适量 DAH 后,按 1.4 衍生化反应方法进行衍生化.

2 结果与讨论

2.1 紫外波长的选择

PPZ 紫外吸收光谱如图 1 所示. PPZ 在 196 nm 和 362 nm 波长处有明显的紫外吸收峰,且 362 nm 处的吸光度最大,其摩尔吸光系数 $\epsilon_{\max} = 1.62 \times 10^4$,因此本实验以 362 nm 为检测波长.

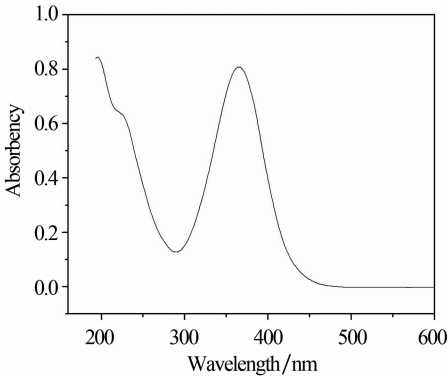


图 1 PPZ 紫外吸收光谱图

2.2 衍生化反应及其条件

以 CAD 为例说明衍生化试剂 PPZ 与多胺的衍生化反应(图 2). 此反应在硼砂介质中进行,生成 CAD-PPZ 衍生物($[M+H]^+ = 631.4$,见图 3),其衍生物在 4 ℃条件下能保存 3 d 以上. 碱性

方程、线性范围、最低检出限、稳定性等。

2.5 方法回收率

向啤酒中加入一定量的多胺和内标物(DAH),按样品处理方法处理,衍生化后直接进行分析并根据线性回归方程计算测定值回收率。结果如表 3 所示,多胺回收率在 93.1%~105.8%范围内。

表 3 方法回收试验

多胺	加标量/ (μmol/L)	检测量/ (μmol/L)	RSD% (n=3)	回收率/ %
DAP	0	7.02	3.9	105.8
	25.00	33.47		
PUT	0	16.85	2.6	93.1
	25.00	40.13		
CAD	0	2.19	2.9	98.0
	25.00	26.69		
SPD	0	3.81	4.1	96.9
	25.00	28.03		
SPM	0	13.47	3.0	93.4
	25.00	35.82		

2.6 啤酒中多胺的测定

取前处理的啤酒样品,按照 1.2 和 1.5 进行实验。典型的啤酒多胺色谱图如图 5 a 所示,采用标准加入法对各峰进行确证的结果如图 5 b 所示。6 种不同品牌啤酒中多胺含量见表 4。有些样品中未能检测到多胺的浓度,其原因可能是多胺的浓度低于本方法的检出限。

表 4 啤酒中多胺含量的测定

样品 编号	pH	浓度/(μmol/L)(n=3)				
		DAP	PUT	CAD	SPD	SPM
1	4.21	17.05	34.35	9.06	4.55	ND
2	4.15	15.34	33.96	3.58	6.33	ND
3	4.27	14.03	33.71	4.37	7.63	26.94
4	4.34	44.39	106.45	10.42	5.28	ND
5	4.18	28.80	67.21	5.93	ND	ND
6	4.32	17.98	56.44	9.68	ND	25.49

注:ND 表示未能检测。

3 结论

本文将 PPZ 作为衍生化试剂与多胺反应,该衍生化反应条件温和,生成的多胺衍生物较为稳定。在常规 ODS 色谱柱和 UV 检测器条件下,可同时分离、检测多种多胺化合物,其检测灵敏度较高,准确度好,分析速度快。本方法可用于生物样品和食品中多胺含量的检测。

参考文献:

[1] 吉晓佳,张大栋,刘友良,等. 植物源食品多胺的作用及其调控[J]. 植物学通报,2002,19(4):504-509.

[2] Anthony E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes[J]. Biochem J, 1986,234(2):249-262.

[3] Nikolaus S. Thin-layer Chromatography and Thin-layer Electrophoresis of Polyamines and Their Derivatives[M]. New York: Academic Press, 1983: 3-9.

[4] Tang T, Shi T, Qian K, et al. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2009,877(5-6):507-512.

[5] Jin D, Wang L, Lee Y. Determination of the polyamines in human nails as 1-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-4-methylpiperazine derivatives using high performance liquid chromatography[J]. Microchem J, 2013,110:568-574.

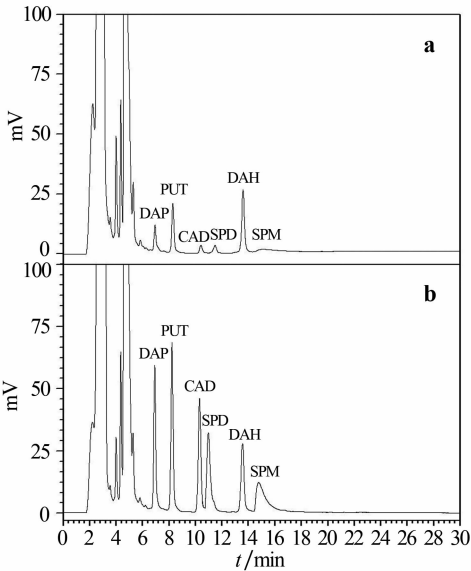


图 5 啤酒中多胺的色谱(a)和标准加入法确证色谱图(b)