

AQC 柱前衍生高效液相色谱法快速测定葡萄中的仲丁胺

马丽艳^{1,1,2}, 张新娜²

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 农业农村部农产品质量监督检验测试中心(北京), 北京 100083;)

摘要: 仲丁胺是一种保护性杀菌剂, 本研究利用凯氏定氮仪对葡萄中的仲丁胺进行提取, 蒸馏产物经 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯(AQC)衍生后, 用高效液相色谱荧光检测器检测。检测波长在激发波长 250nm, 发射波长在 395nm 条件下灵敏度最高。衍生反应在室温下即可进行, 反应迅速, 0.5min 可反应完全, 衍生产物稳定, 可在室温避光下储存 5 天。仲丁胺的浓度在 0.002~1.000mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.9996, 在 0.05-2.50 mg/kg 三个浓度范围内, 添加回收率为 93.6~102%之间, 相对标准偏差为 1.4~7.1%, 方法检出限为 0.005mg/kg, 定量限为 0.02mg/kg, 该方法简便、快速、灵敏度高、操作性强, 可用于葡萄中仲丁胺残留的测定。

关键词: 仲丁胺; 柱前衍生; 高效液相色谱; 葡萄

中图分类号: O657.72

文献标识码:

Determination of 2-Aminobutane in Grape by High Performance Liquid Chromatography Coupled with AQC Derivatization

Ma Liyan^{1,2*}, Zhang Xinna²

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 10083, China;

2. Supervision, Inspection & Testing Center for Agricultural Products Quality, MOA, (Beijing), Beijing 100083, China)

Abstract: 2-aminobutane is a protective fungicide. In this study, a high performance liquid chromatographic method with pre-column derivatization was developed for the determination of 2-aminobutane in grape. 2-Aminobutane was extracted from grapes using a Kjeldahl apparatus and was derived with 6-AminoquinolyI-N-hydroxysccinimidyl carbamate (AQC). The derivative was separated on a C18 analytical column and detection was carried out by fluorescence with

¹作者简介: 马丽艳, 女, 教授级高级实验师, 博士, 研究方向为食品安全及其检测技术。E-mail:lyma1203@163.com
张新娜, 女, 硕士, 工程师, 研究方向为食品生物技术。 E-mail: xinnazh1215@163.com

excitation at 250nm and emission at 395nm. The derivatization reaction can be carried out at room temperature, the reaction completed in 0.5 minutes, and the derivatization product was stable, and it can be stored at room temperature by protecting from light for 5 days. A linear relationship was achieved between the peak area and the concentration of 2-aminobutane in the range of 0.002-1.000 mg/L, with a correlation coefficient of 0.9996. The recoveries at three spiked levels were in the range of 93.6-102% with relative standard deviations (RSDs) of 1.4-7.1%. The limit of detection (LOD) was 0.005 mg/kg and the limit of quantitation (LOQ) was 0.02 mg/kg. This method is simple, rapid, sensitive and operable, and it can be used for the determination of 2-aminobutane residues in grapes.

Keywords: 2-aminobutane; Pre-column Derivatization; High Performance Liquid Chromatography; grape

仲丁胺 (2-aminobutane, 简称 2-AB) 又名 2-氨基丁烷, 是一种保护性杀菌剂, 对多种真菌有抗菌活性, 可用作蒜薹、青椒、柑橘、葡萄的贮藏期防腐保鲜剂^[1], 1972 年美国率先登记使用仲丁胺, 我国从 1976 年开始应用。在 2015 年前作为食品添加剂允许其在柑橘、荔枝、苹果等经表面处理的水果、新鲜的蒜薹和青椒中作为防腐剂使用。有研究表明, 仲丁胺进入人体后仲丁胺一部分随尿排出, 而另一部分会积累在肾脏中。美国将其对人体健康的危害等级定为三级, 并对其应用范围和最大允许残留量作了规定。日本实施的《食品中残留农业化学品肯定列表制度》中也对仲丁胺作出了最大残留限量要求^[2]。我国在 2014 年颁布的《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760-2014) 中将仲丁胺从添加剂列表中删除, 意味着在食品中使用仲丁胺为非法添加剂^[3]。

由于仲丁胺分子量小, 结构上没有生色基团, 通常需要进行前处理后进行检测, 目前常用的方法主要有薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法和液相色谱串联质谱法^[4-9]。薄层色谱法最低检测限为 0.672 mg/kg^[4], 不能满足我国对水果中仲丁胺残留量的限量要求。气相色谱法对样品前处理要求苛刻, 且载体对胺的吸收作用以及胺在柱内可能产生的分解, 检出峰有拖尾现象, 准确度较差, 测定误差较大, 有待改进^[5]。高效液相色谱是目前应用较为广泛的检测方法, 仲丁胺经衍生后形成具有紫外吸收基团和荧光发射基团的衍生物, 再利用紫外检测器或荧光检测器进行检测。常用的颜色剂丹磺酰氯、有荧光胺、2, 4-二硝基氟苯、9-氯甲酸苄甲酯^[2,4,5,8]等, 这些利用衍生试剂与仲丁胺的 NH₂ 反应生成相应的衍生物, 发生衍生反应时对衍生温度和衍生时间都有一定的要求, 衍生物的稳定性和本方法中的衍生试

剂 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯 (AQC) 与仲丁胺发生衍生反应, 在氨基酸^[9]分析中得到广泛的应用, 衍生条件温和、衍生物的稳定性较好, 但未见其在仲丁胺检测中的应用。

本文以 AQC 为衍生剂, 建立了操作简便、快速、准确度高的仲丁胺检测方法, 为果蔬中对仲丁胺的食品安全监测提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

2-氨基丁烷 (仲丁胺) (99%) 购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH (德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 硫酸、甲酸、氧化镁、氯化钙、氢氧化钠为分析纯, 购自北京化学试剂公司; 甲醇为色谱纯, 购自百灵威科技有限公司; ACCQ-Fluor™ reagent kit 含 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯 (AQC)、乙腈和 AccQ.Fluor 硼酸缓冲液, 购自美国 waters 公司; 水为超纯水, Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 液相色谱仪带荧光检测器; Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱 (4.6×150 mm, 5μm); BÜCHI K-360 凯式定氮仪; Vortex-5 涡旋振荡器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); DIF-6050B 真空干燥箱 (上海一恒科技有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司)。

1.3 方法

1.3.1 提取方法

葡萄样品在组织捣碎机中捣成匀浆, 称取 20.0 g 样品放入 250 mL 凯式定氮瓶中, 加入 2 g 氧化镁, 随后沿瓶壁加入 50 mL 1 mol/L 氯化钙, 冲洗瓶壁, 转动凯式定氮瓶使之混合均匀。在凯式定氮仪上设置蒸馏程序, 蒸馏时间为 120 s, 用装有 10 mL 0.15 mol/L 硫酸溶液的烧杯接收流出液, 用 0.3 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值为中性, 用水定容至 100 mL 的容量瓶中, 提取液待衍生。

1.3.2 衍生方法

吸取 30 μL 标准工作溶液或样品提取液, 加入到 2 mL 样品瓶中, 加入 70 μL 硼酸缓冲液, 在涡旋振荡器上混合均匀, 再加入 20 μL AQC 衍生试剂立刻混匀, 衍生后加入带有内插管的进样瓶中, 供液相色谱仪分析。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB C₁₈(4.6×150 mm, 5 μm)柱温: 30℃; 流动相: 甲醇+水(60+40);
流速: 0.8 mL/min; 进样量: 20 μL; 激发波长: 250 nm; 发射波长: 395 nm。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的优化

仲丁胺分子内没有生色基团, 应用液相色谱分析时需要进行衍生化处理。AQC 能与分子中的伯胺和仲胺反应, 生成具有较强荧光特性的物质, 最早用于氨基酸的分析。由于仲丁胺分子中含有一个氨基基团, 因此有可能与 AQC 发生反应生成具有荧光特性的物质。为了确定衍生产物的测定波长, 将 0.5 ug/mL 的仲丁胺标准物质衍生后进行波长扫描。固定发射波长为 395nm, 采集 220~400nm 范围内激发波长, 激发波长扫描图见图 1, 从图中可以看出最佳激发波长为 250nm; 固定激发波长为 250nm, 采集 260~400nm 范围的发射波长, 发射波长扫描图见图 2, 结果表明最佳发射波长为 395nm。因此确定检测波长为激发波长 250nm, 发射波长 395nm。

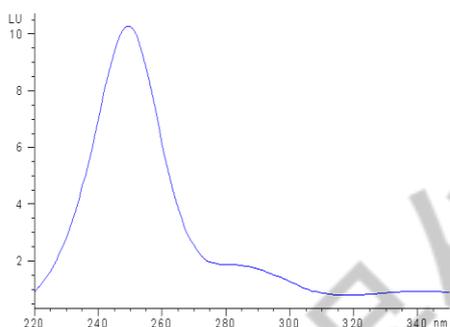


图 1 激发波长扫描

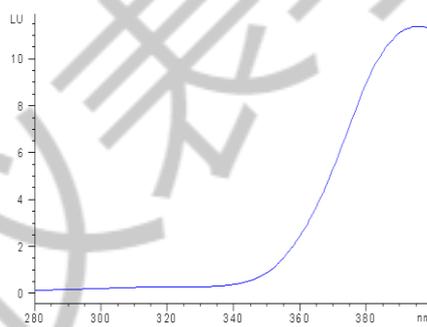


图 2 发射波长扫描

2.2 衍生条件的确定

衍生温度和衍生时间是衍生反应重要的条件之一。为确定适宜的衍生条件, 将同一浓度的仲丁胺标准溶液分别在室温 (20℃左右)、30℃、40℃、50℃、60℃ 与 AQC 衍生 10 min 后进行色谱分析, 结果见图 3。

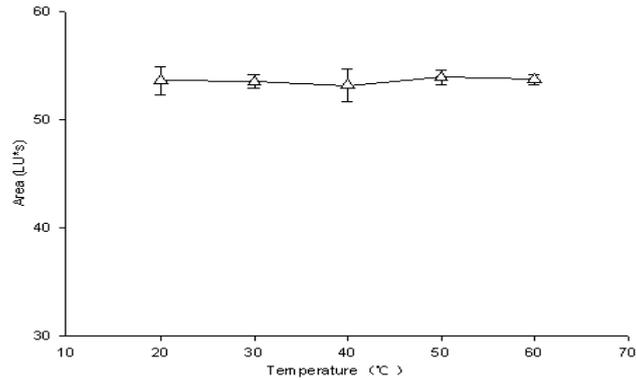


图3 衍生温度对衍生效果的影响

由图3可以看出，在不同的温度环境下衍生结果无明显差异，说明在室温~60℃范围内温度对衍生反应无影响，衍生反应在常温下即可进行，不需要提供特殊的温度环境。

为确定衍生所需要的时间，将同一浓度仲丁胺标准溶液分别在衍生0.5 min、10 min、30 min、60 min、90 min后进行液相色谱分析，结果见图4。

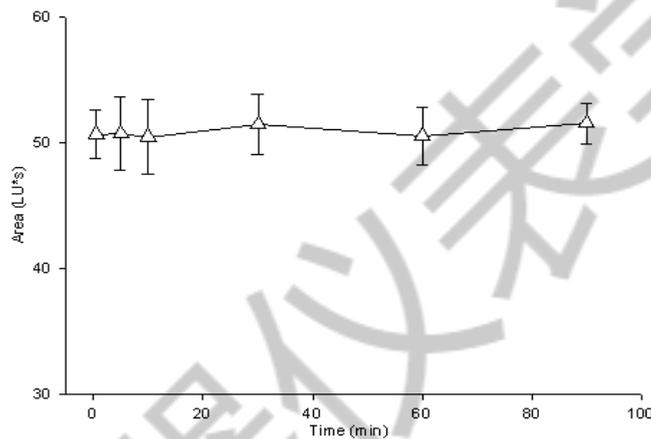


图4 衍生时间对衍生效果的影响

图4表明，衍生时间在0.5~90 min范围内无明显差异，说明衍生反应进行非常迅速，样品加入衍生剂后，在涡旋混合的过程中迅速反应，且反应较完全。

2.3 衍生产物的稳定性

将衍生后的样品放置在室温、避光条件下，0 h、12 h、24 h、3 d、5 d后对其进行测定，衍生产物的峰面积无明显变化，故仲丁胺的衍生产物在室温、避光条件下可以稳定5 d无降解。与其他柱前衍生剂比如2,4-二硝基氟苯、丹磺酰氯等相比，AQC衍生速度快，且不需要特定温度，操作更加方便，衍生物的稳定性较好，灵敏度较高。

2.4 提取条件的优化

样品提取过程中加入氧化镁的目的是保持样品在弱碱性的环境中，通过蒸馏使仲丁胺从样品中游离出来，前期文献中加入氧化镁的数量较多，而使用凯式定氮装置进行蒸馏时，容

器蒸馏管的体积相对较小，加入过多的氧化镁一方面造成浪费，另一方面会使蒸馏瓶沸腾较强烈，易造成样品的逸失。实验比较了 1 g、2 g、5 g、10 g 氧化镁对提取效果的影响，结果见图 5。

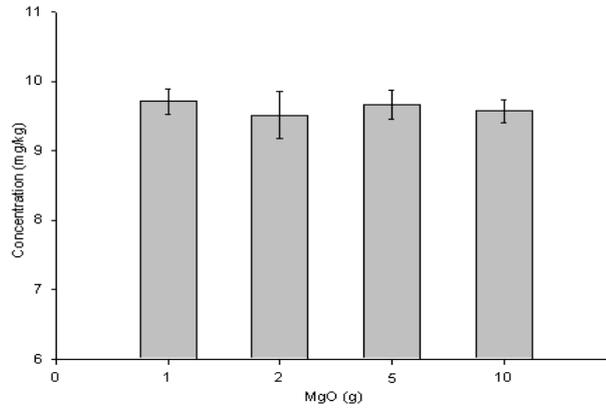


图 5 不同氧化镁用量对提取效果的影响

由图 5 可以看出不同氧化镁用量对提取效果无明显影响，考虑到样品之间的差异性，试验过程选择了氧化镁的用量为 2g。

2.5 线性范围

分别取 2、10、50、250、500、1000 $\mu\text{g/L}$ 仲丁胺标准工作液 30 μL 衍生后进行色谱分析。仲丁胺的标准溶液及空白葡萄样品色谱图见图 6。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，线性方程为 $y = 0.4167x + 5.3514$ ，相关系数 r 为 0.9996。由此表明仲丁胺在 2~1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好。

分别以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比计算方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别为 0.005 mg/kg 和 0.02 mg/kg。

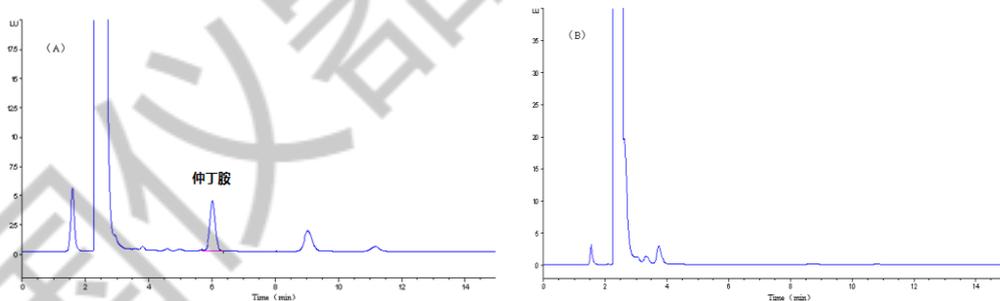


图 6 仲丁胺标准溶液 (A) 和空白葡萄样品 (B) 色谱图

2.6 精密度和准确度

准确度采用添加回收实验进行，分别向葡萄空白样品中加入仲丁胺标准溶液，使加标浓度分别为 0.05、0.25、2.50 mg/kg，添加回收试验结果见表 1。

表 1 葡萄中仲丁胺加标回收试验 (n=6)

加标浓度 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
0.05	0.051	102	7.1
0.50	0.477	95.4	1.4
2.50	2.277	93.6	4.6

从表 1 中可以看出, 葡萄中添加浓度在 0.05~2.50 mg/kg 范围内, 仲丁胺的回收率在 93.6-102%之间, 相对标准偏差在 1.4~7.1%之间, 符合农药残留测定标准中的规定。

3 结论

本文建立的仲丁胺 HPLC 柱前衍生方法简单易操作, 灵敏度高, 衍生条件温和, 常温并且迅速的衍生彻底, 生成的衍生产物较温度, 适合于大批量葡萄样品中仲丁胺的检测。

参考文献:

- [1]何晓晗, 纪淑娟. 仲丁胺在果蔬保鲜中的应用及其检测技术研究现状[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(4) : 144-146.
- [2]王永莲, 刘刚, 周凯等.超高效液相色谱串联质谱法测定白菜、青椒和葡萄中的仲丁胺[J]. 农产品质量与安全, 2018,1: 75-79.
- [3]GB 2760-2014, 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准. 中华人民共和国国家标准.
- [4]丁华, 王婧, 赵明明等. 超高效液相色谱-柱前衍生法测定葡萄和大白菜中防腐保鲜剂仲丁胺的残留[J]. 食品科学, 2017, 28: 55-56.
- [5]NY/T 946-2006, 蒜薹、青椒、柑橘、葡萄中仲丁胺残留量测定. 中华人民共和国农业行业标准.
- [6]Kenneth H., David L. High-pressure liquid chromatographic determination of sec-butylamine residues in potatoes , Pesticide Science[J]. 1981,12(3): 319-324.
- [7]杨文熙, 陈辉平, 张瑞敏. 低级脂肪胺的气相色谱分析[J]. 河北农业大学学报,1985,8(8):72-81.
- [8]周蓉, 曹赵云, 赵肖华等. 柱前衍生/高效液相色谱法测定果蔬中仲丁胺残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(6): 778 - 782.
- [9]Busto O, Miracle M, Guasch J *et al.* Solid Phase Extraction of Biogenic Amines from

Wine Before Chromatographic Analysis of Their AQC Derivatives, Journal of Liquid
Chromatography & Related Technologies[J].1997,20(5):743-755

中国仪器仪表学会