

中华人民共和国国家标准

GB/T 23884—2021

代替 GB/T 23884—2009

动物源性饲料中生物胺的测定 高效液相色谱法

Determination of biogenic amines in animal-derived feeds—
High performance liquid chromatography

2021-10-11 发布

2022-05-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 23884—2009《动物源性饲料中生物胺的测定 高效液相色谱法》，与 GB/T 23884—2009 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了色胺、苯乙胺和章鱼胺的测定；增加了虾粉、鸡肉粉、猪肉粉、血粉、羽毛粉、鱼溶浆、乌贼膏和蚕蛹粉 8 种动物源性饲料原料；修改了方法的检出限，增加了定量限（见第 1 章，2009 年版的第 1 章）；
- 修改了衍生剂、衍生条件和衍生后处理方法（见 5.11、8.2，2009 年版的 4.1、7.1.2、7.1.3）；
- 修改了色谱梯度洗脱程序（见表 1，2009 年版的表 1）；
- 删除了“6 种生物胺的化学名称、分子式和相对分子质量”（见 2009 年版的附录 A）；
- 修改了生物胺液相色谱图（见附录 A，2009 年版的附录 B）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学。

本文件主要起草人：杨文军、田颖、张丽英、陈义强。

本文件于 2009 年首次发布，本次为第一次修订。

动物源性饲料中生物胺的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了动物源性饲料原料中色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于鱼粉、虾粉、鸡肉粉、猪肉粉、肉骨粉、血粉、羽毛粉、鱼溶浆、乌贼膏和蚕蛹粉等动物源性饲料原料中色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺九种生物胺的测定。

本文件检出限为 5 mg/kg,定量限为 10 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的生物胺经高氯酸溶液提取、丹磺酰氯衍生,用高效液相色谱仪测定,外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2 乙腈:色谱纯。

5.3 丙酮。

5.4 氨水。

5.5 乙酸铵:色谱纯。

5.6 乙酸铵溶液(5 mmol/L):称取 0.38 g 乙酸铵(5.5),加水溶解,定容至 1 L。

5.7 高氯酸提取液(0.4 mol/L):准确量取高氯酸 32.3 mL,用水定容至 1 L。

5.8 氢氧化钠溶液(2 mol/L):准确称取 8 g 氢氧化钠,用水定容至 100 mL。

5.9 饱和碳酸氢钠溶液:向水中加入足量的碳酸氢钠固体直到无法再溶解。

5.10 盐酸溶液(0.1 mol/L):准确量取 8.3 mL 浓盐酸,用水定容至 1 L。

5.11 丹磺酰氯衍生溶液(10 mg/mL):称取 1 g 丹磺酰氯(CAS 号:605-65-2, $\geq 99\%$),用丙酮溶解,定容至 100 mL。临用现配。

5.12 标准储备溶液(1 mg/mL):分别称取色胺(CAS 号:1476-39-7,纯度 $\geq 99\%$)12 mg、苯乙胺(CAS 号:64-04-0,纯度 $\geq 98\%$)13 mg、腐胺·二盐酸(CAS 号:333-93-7,纯度 $\geq 98\%$)18 mg、尸胺(CAS 号:462-94-2,纯度 $\geq 98.8\%$)10 mg、组胺(CAS 号:51-45-5,纯度 $\geq 97\%$)10 mg、章鱼胺·一盐酸(CAS 号:770-05-9,纯度 $\geq 99.3\%$)12 mg、酪胺(CAS 号:51-67-2,纯度 $\geq 98\%$)10 mg、亚精胺·三盐酸(CAS 号:334-50-9,纯度 $\geq 99.9\%$)17 mg、精胺(CAS 号:71-44-3,纯度 $\geq 98\%$)10 mg(精确至 0.01 mg),分别置于 10 mL 棕色容量瓶中,用盐酸溶液(5.10)溶解并定容。于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期为 6 个月。

注:标准溶液的配制浓度以各生物胺的单体计算,称取标准品时对其中的盐酸盐进行折算。所有标准溶液配制好后转移至密闭棕色容器中,避光贮存。

5.13 混合标准中间溶液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确移取各生物胺标准储备溶液(5.12)1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用盐酸溶液(5.10)定容。于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 1 周。

5.14 混合标准系列溶液:准确移取适量混合标准中间溶液(5.13)于 10 mL 棕色容量瓶中,用水(5.1)稀释定容配成系列标准溶液,浓度分别为:0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

5.15 微孔滤膜:0.22 μm ,有机系。



6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 恒温摇床:控温精度 $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

6.4 旋涡混匀器。

6.5 离心机:转速不低于 5 000 r/min。

6.6 氮吹仪。

6.7 超声波清洗器。

6.8 匀浆机。

7 样品

7.1 固体

按 GB/T 20195 制备样品,至少 100 g,粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中,避光保存,备用。

7.2 膏浆状

按 GB/T 20195 制备样品,至少 100 g,用一台机械搅拌器或均质器混合样品,边摇边用勺或大口吸管转移 100 g 或 100 mL 样品到磨口瓶中,避光保存,备用。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 1 g,准确至 0.000 1 g,置于 50 mL 离心管中,准确加入 10 mL 高氯酸提

取液(5.7),涡旋混匀(膏浆状样品均质 30 s),置于摇床上,室温下 200 r/min 振荡 10 min,于 5 000 r/min 离心 10 min,上清液倒入另一 50 mL 离心管中,残渣再用 10 mL 高氯酸提取液(5.7)提取,重复上述操作,合并上清液,备用。

8.2 衍生化

准确移取上清液(见 8.1)1 mL,放入 15 mL 具塞离心管中,依次加入 200 μ L 氢氧化钠溶液(5.8)、300 μ L 饱和碳酸氢钠溶液(5.9)和 2 mL 丹磺酰氯衍生溶液(5.11),涡旋混匀,置摇床上,45 $^{\circ}$ C 避光反应 45 min。加入 100 μ L 氨水(5.4)终止反应,混匀,静置 15 min,45 $^{\circ}$ C 氮气吹去丙酮,用乙腈(5.2)定容至 5 mL,超声复溶,混匀,用 0.22 μ m 有机微孔滤膜(5.15)过滤备用。

精确量取混合标准系列溶液(5.14)各 1 mL 与试样溶液同时进行衍生。

8.3 液相色谱参考条件

色谱柱:C18 柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μ m,或性能相当者。

柱温:30 $^{\circ}$ C。

检测波长:254 nm。

流动相:乙酸铵溶液(5.6)和乙腈(5.2)(用前超声脱气)。

流速:1.0 mL/min。

进样量:10 μ L。

梯度洗脱程序见表 1。

表 1 高效液相色谱梯度洗脱程序表

时间 min	乙酸铵溶液 %	乙腈 %
0	40	60
5	40	60
12	25	75
20	5	95
21	40	60
25	40	60

8.4 测定

8.4.1 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取混合标准系列溶液和试样溶液(见 8.2)上机测定。生物胺标准溶液的液相色谱图参见附录 A。

8.4.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中生物胺保留时间应与混合标准系列溶液(浓度相当)中生物胺的保留时间一致,其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

8.4.3 定量

以生物胺的浓度为横坐标,色谱峰面积(响应值)为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于

0.999。试样溶液中生物胺的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围,应将上清液(见 8.1)用高氯酸提取溶液(5.7)稀释后,重新衍生测定。单点校准定量时,试样溶液中生物胺的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30 %。

9 试验数据处理

试样中生物胺的含量以质量分数 w_i 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按公式(1)计算;单点校准按公式(2)计算:

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液生物胺 i 的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——氮气吹干后复溶的体积,单位为毫升(mL);
- V_1 ——衍生化时所用试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量,单位为克(g)。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{is} \times V \times V_2 \times 1\,000}{A_{is} \times V_1 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- A_i ——试样溶液中生物胺 i 的色谱峰面积;
- ρ_{is} ——标准溶液中生物胺 i 的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——氮气吹干后复溶的体积,单位为毫升(mL);
- A_{is} ——标准溶液中生物胺 i 的色谱峰面积;
- V_1 ——衍生化时所用试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量,单位为克(g)。

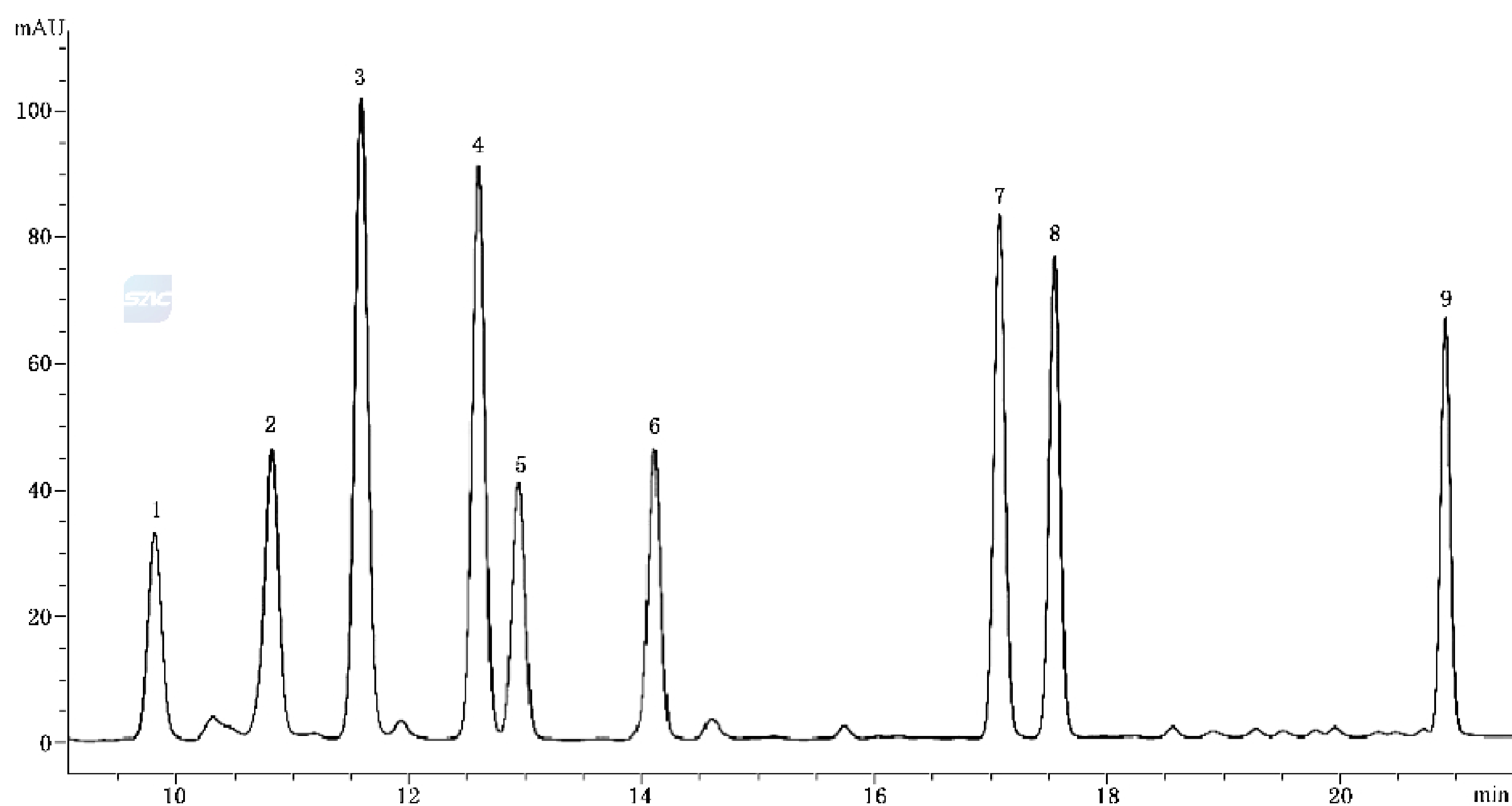
测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下,两次独立测定结果的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性)
生物胺标准溶液液相色谱图

9 种生物胺标准溶液的液相色谱图见图 A.1。



标引序号说明：

- 1——色胺；
- 2——苯乙胺；
- 3——腐胺；
- 4——尸胺；
- 5——组胺；
- 6——章鱼胺；
- 7——酪胺；
- 8——亚精胺；
- 9——精胺。

图 A.1 9 种生物胺标准溶液(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液相色谱图