



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.208—2008

食品中生物胺含量的测定

Determination of biogenic amine in foods

2008-11-21 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由中华人民共和国卫生部负责解释。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准参加起草单位：北京市疾病预防控制中心、烟台大学、河南省药品检验所。

本标准主要起草人：吴永宁、赵云峰、李志军、吕斌、李敬光、张磊、邵兵、苗虹。

食品中生物胺含量的测定

1 范围

本标准规定了食品中色胺、 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺和精胺含量的测定方法。

本标准适用于酒类(葡萄酒、啤酒、黄酒等)、调味品(醋、酱油等)、水产品(鱼类及其制品、虾类及其制品)、肉类及乳制品中生物胺的测定。

本标准定量限:

- a) 酒类、醋等调味品:色胺 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 β -苯乙胺 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、腐胺 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、尸胺 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、组胺 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、酪胺 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、亚精胺 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、精胺 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。
- b) 水产品、肉类、乳制品及以豆类为原料的调味品:色胺 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 β -苯乙胺 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、腐胺 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、尸胺 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、组胺 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、酪胺 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、亚精胺 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、精胺 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 原理

以 1,7-二氨基庚烷为内标,以 5%三氯乙酸为提取溶液,振摇提取,以正己烷去除脂肪,经过三氯甲烷-正丁醇(1+1)液液萃取净化后,以丹磺酰氯为衍生剂,60℃衍生 30 min,采用高效液相色谱的 C_{18} 柱分离,紫外检测器检测,内标法定量。

3 试剂和材料

除非另有规定,本标准中所用试剂均为分析纯。

- 3.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 3.2 丙酮($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$):色谱纯。
- 3.3 乙醚($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$):重蒸。
- 3.4 正丁醇($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)。
- 3.5 三氯甲烷(CHCl_3)。
- 3.6 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。
- 3.7 谷氨酸钠($\text{C}_5\text{H}_9\text{NNaO}_4$)。
- 3.8 碳酸氢钠(NaHCO_3)。
- 3.9 氯化钠(NaCl)。
- 3.10 氢氧化钠(NaOH)。
- 3.11 盐酸(HCl)。
- 3.12 三氯乙酸($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$)。
- 3.13 组胺盐酸盐(histamine dihydrochloride, $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 \cdot 2\text{HCl}$)标准品(纯度>99%,计算时应折算掉盐酸盐, $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 / \text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 \cdot 2\text{HCl} = 155/184$)。
- 3.14 β -苯乙胺(β -phenylethylamine, $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$)标准品(纯度>98%)。
- 3.15 酪胺盐酸盐(tyramine hydrochloride, $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO} \cdot \text{HCl}$)标准品(纯度>99%,计算时应折算掉盐酸盐, $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO} / \text{C}_8\text{H}_9\text{NO} \cdot \text{HCl} = 137/174$)。
- 3.16 腐胺(putrescine, $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2$)标准品(纯度>98%)。
- 3.17 尸胺(cadaverine, $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$)标准品(纯度>98%)。
- 3.18 色胺(tryptamine hydrochloride, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2$)标准品(纯度>99%)。
- 3.19 亚精胺(spermidine, $\text{C}_7\text{H}_{19}\text{N}_3$)标准品(纯度>97%)。

- 3.20 精胺(spermine, $C_{10}H_{26}N_4$)标准品(纯度 $>97\%$)。
- 3.21 1,7 二氨基庚烷(1,7-diaminoheptane, $C_7H_{18}N_2$)内标标准品(纯度 $>98\%$)。
- 3.22 丹磺酰氯(dansyl chloride, $C_{12}H_{12}ClNO_2S$)标准品(纯度 $>95\%$)。
- 3.23 生物胺标准储备溶液的配制:准确称取各种生物胺标准品适量,分别置于 10 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,混匀,配制成浓度为 1 000 mg/L(以各种生物胺单体计)的标准储备溶液,置 4 °C 冰箱储存。
- 3.24 生物胺标准混合使用液的配制:分别吸取 1.00 mL 各生物胺单组分标准储备溶液,置于同一个 10 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸稀释至刻度,混匀,配制成生物胺标准混合使用液(100 mg/L)。
- 3.25 生物胺标准系列溶液配制:吸取 0.10 mL、0.25 mL、0.50 mL、1.00 mL、1.50 mL、2.50 mL、5.00 mL 生物胺标准混合使用液(100 mg/L),分别置于 10 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,混匀,使浓度分别为 1.00 mg/L、2.50 mg/L、5.00 mg/L、10.0 mg/L、15.0 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L。
- 3.26 内标标准储备溶液的配制:准确称取内标物质适量,置于 10 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,混匀,配制成浓度为 1 000 mg/L 的内标标准储备溶液,置 4 °C 冰箱储存。
- 3.27 内标标准使用液的配制:吸取 1.00 mL 内标标准储备溶液,置 10 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸稀释至刻度,混匀,作为内标使用液(100 mg/L),置 4 °C 冰箱储存。
- 3.28 丹磺酰氯衍生剂溶液的配制:准确称取丹磺酰氯适量,以丙酮为溶剂配制成浓度为 0.01 mg/L 的衍生剂标准使用液(10 mg/mL 丙酮溶液),置 4 °C 冰箱储存。

4 仪器

- 4.1 高效液相色谱仪(HPLC),配紫外检测器。
- 4.2 离心机。
- 4.3 旋涡混合器。
- 4.4 恒温箱。
- 4.5 氮气浓缩器。
- 4.6 电子天平。
- 4.7 酸度计。
- 4.8 超纯水器。
- 4.9 0.22 μ m 滤膜针头滤器。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 试样提取

5.1.1.1 水产品、肉类、乳制品及以豆类为原料的调味品

准确称取已经绞碎或匀浆后的水产品、肉类、乳制品或以豆类为原料的调味品 10.00 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 20 mL 5%三氯乙酸溶液和 2.0 mL(100 mg/L)内标使用液,混匀,振荡提取 60 min,转移至 50 mL 离心管中,3 600 r/min 离心 10 min,取上清液,置 50 mL 容量瓶中,连续提取两次,合并上清液,用 5%三氯乙酸稀释至刻度,滤纸过滤,待净化。

5.1.1.2 酒类、醋及醋饮料

量取含酒类、醋或醋饮料 10.00 mL,加入 0.2 mL(100 mg/L)内标使用液,采用 5.1.2.2 方法直接萃取。

5.1.2 试样净化

5.1.2.1 除脂肪:移取上述试样提取液 10.00 mL,置 25 mL 具塞试管中,加入 10 mL 正己烷,涡旋振

荡 5 min, 弃去上层有机相, 重复进行两次。

5.1.2.2 萃取: 将上述除脂肪后溶液加入适量氯化钠使溶液饱和。准确移取上述饱和后的试样提取液 5.00 mL, 置于 15 mL 离心管中, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 12.0。加入 5.0 mL 的正丁醇-三氯甲烷(1+1)混合溶液, 涡旋振荡 5 min, 3 600 r/min 离心 10 min, 吸取上层有机相, 再重复萃取两次, 最后一步萃取用分液漏斗分离, 合并萃取液, 混匀, 取 3.0 mL 萃取液并加入 0.2 mL 1 mol/L 盐酸, 混合后 40 °C 水浴下氮气吹干, 加入 1.0 mL 0.1 mol/L 盐酸使残留物溶解, 待衍生。

5.2 生物胺的衍生

取上述待衍生的试样溶液 0.50 mL 置 10 mL 具塞试管中, 加入 1.5 mL 饱和碳酸氢钠溶液、1.0 mL 丹磺酰氯衍生溶液, 振荡使混匀。置 60 °C 培养箱中反应 30 min, 中间振荡两次, 取出, 分别加入 100 μ L 谷氨酸钠(50 mg/mL 饱和碳酸氢钠溶液), 振荡混匀, 60 °C 保温 15 min。取出, 每个试管中加入 1 mL 超纯水, 在 40 °C 水浴下用氮气除去丙酮。加入 3 mL 乙醚, 振荡 2 min, 静置分层后, 吸取出上层有机相(乙醚层), 重复萃取两次, 合并乙醚萃取液, 氮气吹干。加入 1.0 mL 甲醇使残留物溶解, 振荡混匀, 0.22 μ m 滤膜针头过滤器过滤, 滤液待测。

分别移取 0.50 mL 生物胺标准系列溶液, 分别置 10 mL 具塞试管中, 依次加入 20 μ L(100 mg/L) 内标使用液, 加入 1.5 mL 饱和碳酸氢钠溶液、1.0 mL 丹磺酰氯衍生溶液, 振荡使混匀。自“置 60 °C 培养箱中……”, 以下操作同试样的衍生步骤。

5.3 液相色谱参考条件

色谱柱为 C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm 内径, 5 μ m), 紫外检测波长 254 nm, 进样量 20 μ L, 柱温 30 °C, 流动相 A 为甲醇溶液, B 为超纯水, 流速: 1.5 mL/min。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序表

组成	时间/min								
	0	7	14	20	27	30	35	36	45
流动相 A	55	65	70	70	90	100	100	55	55
流动相 B	45	35	30	30	10	0	0	45	45

5.4 测定

分别吸取上述标准系列和试样的衍生溶液注入高效液相色谱仪中, 测定, 记录色谱图, 色谱图参见附录 A。

6 结果计算

计算各生物胺和内标的峰面积比, 以标准系列溶液的质量(μ g)为纵坐标, 以各生物胺和内标的峰面积比为横坐标, 绘制标准曲线, 按式(1)计算试样中生物胺含量。

$$\rho = \frac{m_1 \times f}{m} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——试样中生物胺的含量, 单位为毫克每千克或毫克每升(mg/kg 或 mg/L);

m_1 ——试样中各生物胺色谱峰与内标色谱峰的峰面积比值对应的生物胺质量, 单位为微克(μ g);

f ——试样稀释倍数;

m ——取样量, 单位为克或毫升(g 或 mL)。

计算结果保留三位有效数字。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附 录 A
(资料性附录)

生物胺及内标标准溶液衍生物的 HPLC 色谱图

8 种生物胺及内标标准溶液衍生物的 HPLC 色谱图见图 A.1。

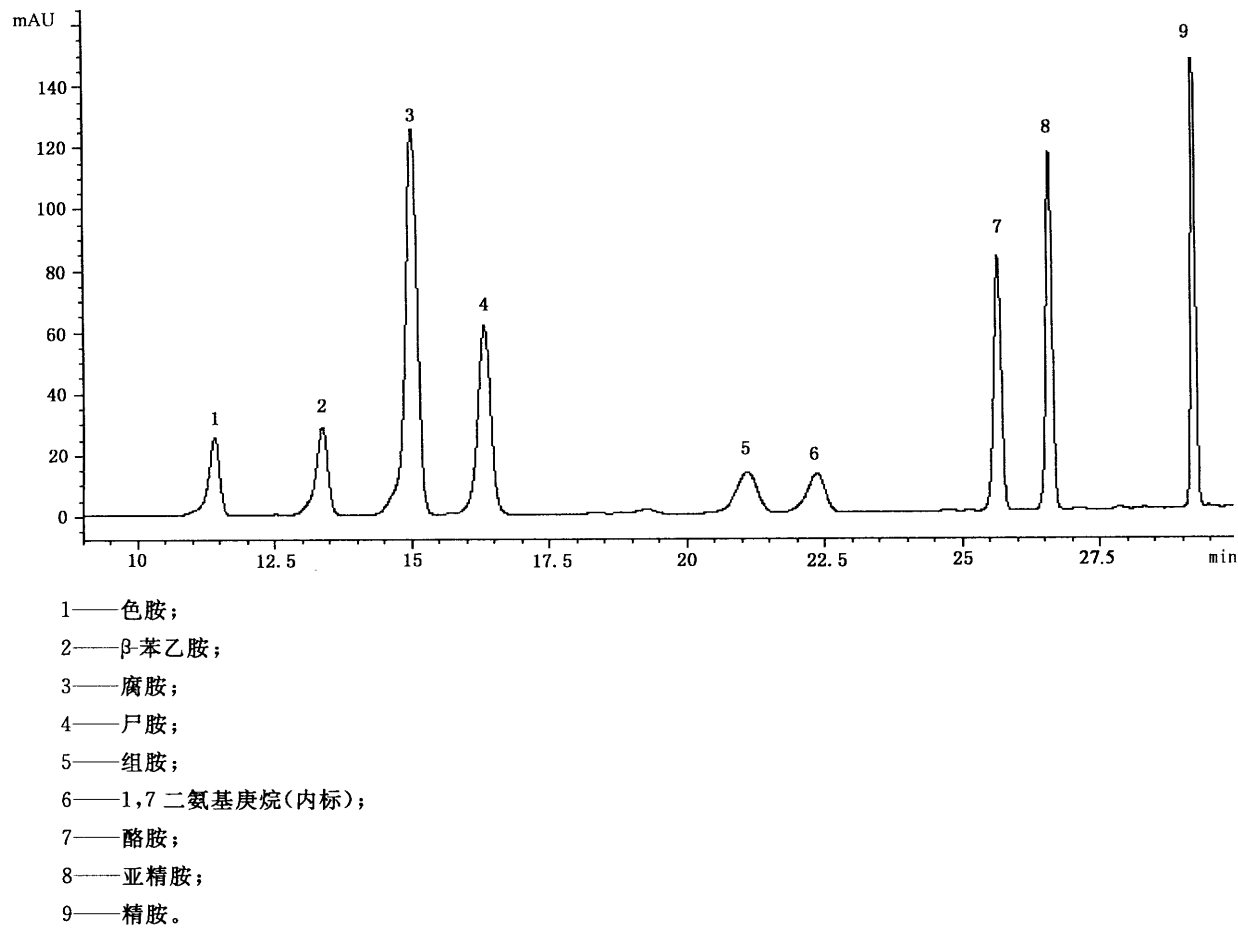


图 A.1 8 种生物胺及内标标准溶液衍生物的色谱图