

团 体 标 准

T/CFIAS 6004—2022

动物源性饲料原料中生物胺的测定 离子交换色谱法

Determination of biogenic amines in animal-derived feed ingredients
— Ion exchange chromatography

2022-04-13 发布

2022-05-13 实施

中国饲料工业协会

发布

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。

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。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件负责起草单位：四川新希望六和科技创新有限公司、赛卡姆（北京）科学仪器有限公司、中国农业科学院饲料研究所、新希望六和股份有限公司。

本文件主要起草人：乔煦玮、李欣欣、梁玉树、何开蓉、刘尚群、周桂莲、李勇、杨青、曹发明、范志影、赵维香、包郁明。

动物源性饲料原料中生物胺的测定 离子交换色谱法

1 范围

本文件规定了动物源性饲料原料中生物胺的离子交换色谱测定方法。

本文件适用于动物源性饲料原料中组胺、腐胺、尸胺、精胺、亚精胺、酪胺的测定。

本文件各生物胺的检出限为 3 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

试样中的生物胺经碘基水杨酸溶液提取，用氨基酸分析仪检测，外标法定量。

5 试剂或材料

除另有规定外，均使用分析纯试剂，如含量与本文件不同，需进行折算。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 氢氧化钾：优级纯，含量 85%。

5.3 氯化钾：优级纯。

5.4 盐酸：优级纯，含量 36.0%~38.0%。

5.5 甲醇：色谱纯。

5.6 2%碘基水杨酸溶液：称取碘基水杨酸 20.0 g，加水溶解并稀释至 1 000 mL，混匀。

5.7 4%碘基水杨酸溶液：称取碘基水杨酸 40.0 g，加水溶解并稀释至 1 000 mL，混匀。

5.8 氢氧化钾溶液（1 mol/L）：称取氢氧化钾（5.2）65.9 g，加水溶解并稀释至 1 000 mL，混匀。

5.9 盐酸溶液（0.1 mol/L）：移取盐酸 8.3 mL（5.4），加水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.10 柠檬酸钾液 A ($\text{pH}=5.75\pm0.03$)：称取氢氧化钾 (5.2) 11.2 g、一水合柠檬酸 14.0 g、氯化钾 (5.3) 14.9 g，加水溶解，加 1.0 g 苯酚，加水稀释至 1 000 mL，混匀，用盐酸 (5.9) 或氢氧化钾溶液 (5.8) 调节 pH 值至 5.75 ± 0.03 ，经微孔滤膜 (5.19) 过滤。

5.11 柠檬酸钾液 B ($\text{pH}=8.30\pm0.03$)：称取氢氧化钾 (5.2) 16.8 g、一水合柠檬酸 16.0 g、硼酸 10.0 g、氯化钾 (5.3) 164.0 g，加水溶解，加 1.0 g 苯酚，加水稀释至 1 000 mL，混匀，用盐酸 (5.9) 或氢氧化钾溶液 (5.8) 调节 pH 值至 8.30 ± 0.03 ，经微孔滤膜 (5.19) 过滤。

5.12 再生液：称取氢氧化钾 (5.2) 33.7 g、EDTA 0.2 g，加水溶解并稀释至 1 000 mL，混匀，经微孔滤膜 (5.19) 过滤。

5.13 钾钠缓冲液：分别称取乙酸钾 196.0 g、三水乙酸钠 272.0 g，加水分别溶解，将溶解后的液体混合，加乙酸 200 mL，加水稀释至 1 000 mL，混匀，经微孔滤膜 (5.19) 过滤。

5.14 茚三酮溶液：称取茚三酮 20.0 g，加甲醇 (5.5) 600 mL 溶解，经微孔滤膜 (5.20) 过滤，再加入钾钠缓冲液 (5.13) 400 mL，加入苯酚 2.0 g、抗坏血酸 0.2 g、Brij-35 聚氧乙烯月桂醚 0.2 g，混匀。

5.15 异丙醇溶液 (20%)：取 200 mL 异丙醇和 800 mL 水混匀，超声脱气。

5.16 生物胺标准储备溶液 (1 mg/mL)：准确称取组胺二盐酸盐 (纯度 $\geq 99\%$) 83 mg、腐胺二盐酸盐 (纯度 $\geq 99.9\%$) 91 mg、尸胺二胺盐酸 (纯度 $\geq 99.7\%$) 86 mg、亚精胺三盐酸盐 (纯度 $\geq 99.9\%$) 88 mg、精胺四盐酸盐 (纯度 $\geq 98.0\%$) 86 mg 和酪胺盐酸盐 (纯度 $\geq 98.9\%$) 63 mg (精确至 0.01 mg)，分别置于 50 mL 棕色容量瓶中，用盐酸溶液 (5.9) 溶解并定容至刻度，混匀，转移至棕色玻璃瓶中。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，或使用有证混合标准溶液或单体标准溶液。

5.17 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 (5.15) 1 mL，置于 10 mL 棕色容量瓶中，用盐酸溶液 (5.9) 定容。2 $^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。有效期为一周。

5.18 混合标准系列工作溶液：准确移取适量混合标准中间溶液 (5.16)，置于 10 mL 棕色容量瓶中，用水 (5.1) 稀释定容配成标准系列溶液，浓度分别为：0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

5.19 微孔滤膜：0.45 μm ，水系。

5.20 微孔滤膜：0.45 μm ，有机系。

6 仪器设备

6.1 氨基酸分析仪：配有茚三酮柱后衍生装置、可见光检测器。

6.2 电子天平：感量 0.01 g、0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 旋涡混合器。

6.4 振荡器。

6.5 离心机：转速不低于 5 000 r/min。

6.6 酸度计，精度 0.01。

7 样品

7.1 固体

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

7.2 膏浆状

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，用匀浆机或搅拌器充分混匀，装入密闭容器中，备用。

8 试验步骤

8.1 样品前处理

平行做两份试验。称取试样 5 g，精确至 0.1 mg，置于 100 mL 具塞三角瓶中，准确加入 50 mL 2%磺基水杨酸溶液（5.6）（需边加入边振荡，防止试样团簇结块，膏浆状样品需匀浆 30 s），200 r/min 振荡提取 60 min，移取试样溶液于 50 mL 离心管中，5 000 r/min 离心 10 min。准确移取 2 mL 上清液，置于 15 mL 离心管中，准确加入 1 mL 4%磺基水杨酸溶液（5.7）和 2 mL 二氯甲烷，涡旋混匀后，200 r/min 振荡 5 min 或旋涡混合器涡旋 1min。5 000 r/min 离心 10 min。准确移取 1 mL 水层试样溶液，加入 100 μ L 氢氧化钾溶液（5.8）调节试样溶液 pH 至 3.0~3.5，涡旋混匀，经微孔滤膜（5.19）过滤，待测。

8.2 测定

8.2.1 液相色谱参考条件

色谱柱：磺酸型钾阳离子交换色谱柱，柱长 30 mm，内径 4.6 mm，粒径 7 μ m，或性能相当者。
柱温：70 $^{\circ}$ C。
检测波长：570 nm。
流速：0.45 mL/min。
进样量：80 μ L。
流动相：柠檬酸钾液 A（5.10）、柠檬酸钾液 B（5.11）、再生液（5.12），梯度洗脱程序见表 1。
衍生系统：反应器温度 130 $^{\circ}$ C，以茚三酮溶液（5.14）为衍生剂、异丙醇溶液（5.15）为冲洗液，衍生程序见表 2。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	柠檬酸钾液 A/%	柠檬酸钾液 B/%	再生液/%	流速/mL•min ⁻¹
0.0	80	20	0	0.45
0.1	80	20	0	0.45
8.0	28	72	0	0.45
14.0	28	72	0	0.45
15.0	0	100	0	0.45
16.0	0	100	0	0.45
21.0	0	72	28	0.45
24.0	0	72	28	0.45

表 1 流动相梯度洗脱程序 (续)

27.0	0	62	38	0.45
30.0	0	62	38	0.45
30.1	0	0	100	0.45
34.1	0	0	100	0.45
34.2	80	20	0	0.45
44.2	80	20	0	0.45
44.3	80	20	0	0.00

表 2 衍生程序表

时间/min	茚三酮溶液/%	异丙醇溶液/%	流速/mL·min ⁻¹
0.0	100	0	0.25
35.0	100	0	0.25
35.1	0	100	0.25
44.3	0	100	0.25

8.2.2 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工作溶液(5.18)和试样溶液(8.1)上机测定。在上述色谱条件下,生物胺混合标准溶液色谱图见附录 A.1。

8.2.3 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工作溶液(浓度相当)中生物胺的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

8.2.4 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,标准曲线的相关系数应不低于 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。如超出线性范围,应将试样(8.1)用水稀释后,重新进样分析。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

试样中生物胺含量以其质量分数 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:

$$w_i = \frac{\rho_{is} \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ_{is} ——从标准曲线查得的试样溶液中生物胺 i 的质量浓度,单位为微克每毫升 (μg/mL);

V ——试样提取溶液的体积,单位为毫升 (mL);

n ——试样提取溶液稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）；

$$w_i = \frac{A_i \times V \times \rho_{is} \times n}{A_{is} \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A_i ——试样溶液中生物胺 i 的色谱峰面积（响应值）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

ρ_{is} ——标准溶液中生物胺 i 的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

n ——试样提取溶液稀释倍数；

A_{is} ——标准溶液中生物胺 i 的色谱峰面积；

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。

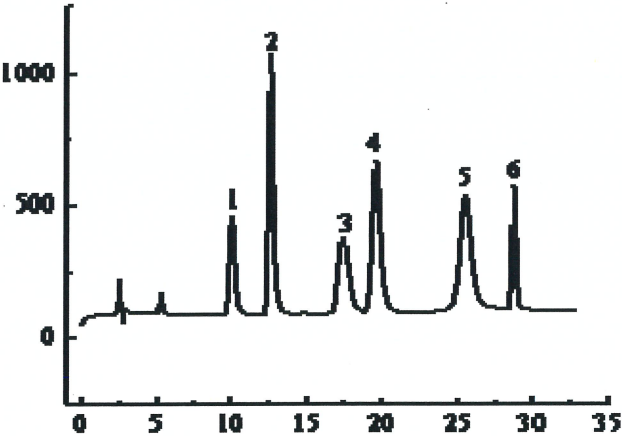
10 精密度

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)
生物胺标准溶液色谱图

混合标准系列工作溶液色谱图见图 A.1。



标引序号说明：1——组胺；2——腐胺；3——尸胺；4——亚精胺；5——精胺；6——酪胺；

图 A.1 6 种生物胺溶液 (20 μg/mL) 的色谱图

