



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 20768—2006

---

## 鱼和虾中有毒生物胺的测定 液相色谱-紫外检测法

Method for the determination of biogenic amines in fish and shrimp—  
LC-UV detection method

2006-12-31 发布

2007-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、方晓明、唐毅锋、王传现、陈迪、姜维。

本标准系首次发布的国家标准。

## 鱼和虾中有毒生物胺的测定 液相色谱-紫外检测法

### 1 范围

本标准规定了鱼和虾中苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺和亚精胺的液相色谱-紫外检测法。

本标准适用于鱼和虾中苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺和亚精胺的测定。

本标准的方法检出限：腐胺、亚精胺、尸胺、组胺、酪胺、章鱼胺、苯乙胺均为 50 mg/kg。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 1 部分：总则与定义（GB/T 6379.1—2004, ISO 5725-1:1994, IDT）

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第 2 部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法（GB/T 6379.2—2004, ISO 5725-2:1994, IDT）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987）

### 3 原理

试样中的生物胺用高氯酸溶液提取，经丹酰氯衍生化后，用液相色谱-紫外检测器检测，外标法定量。

### 4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 甲醇：色谱纯。
- 4.2 乙腈：色谱纯。
- 4.3 丙酮：色谱纯。
- 4.4 丹酰氯(dansyl chloride)：纯度 $\geq 99.0\%$ 。
- 4.5 碳酸氢钠。
- 4.6 高氯酸。
- 4.7 氢氧化钠。
- 4.8 氢氧化铵：25%~28%。
- 4.9 乙酸铵。
- 4.10 高氯酸溶液：0.4 mol/L。量取 24 mL 高氯酸(4.6)，用水稀释到 1 L。
- 4.11 氢氧化钠溶液：2 mol/L。称取 4.0 g 氢氧化钠(4.7)，用水溶解并定容至 50 mL。
- 4.12 饱和碳酸氢钠溶液。
- 4.13 丹酰氯溶液：10 mg/mL。称取 0.20 g 丹酰氯(4.4)，用丙酮溶解并定容至 20 mL。
- 4.14 标准物质：盐酸苯乙胺( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ ，分子量为 157.64，纯度 $\geq 98\%$ )，盐酸腐胺 $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}]$ ，分子量为 161.07，纯度 $\geq 98\%$ ]，盐酸尸胺 $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}]$ ，分子

量为 175.10, 纯度  $\geq 98.0\%$ ], 盐酸组胺 ( $C_5H_9N_3 \cdot 2HCl$ , 分子量为 184.07, 纯度  $\geq 99.0\%$ ), 盐酸章鱼胺 [ $HOC_6H_4CH(CH_2NH_2)OH \cdot HCl$ , 分子量为 189.64, 纯度  $\geq 95\%$ ], 盐酸酪胺 ( $HOC_6H_4CH_2CH_2NH_2 \cdot HCl$ , 分子量为 173.64, 纯度  $\geq 99.0\%$ ), 盐酸亚精胺 [ $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2 \cdot 3HCl$ , 分子量为 254.63, 纯度  $\geq 99.5\%$ ].

4.15 混合标准储备溶液: 1.0 mg/mL。分别称取盐酸苯乙胺、盐酸腐胺、盐酸尸胺、盐酸组胺、盐酸章鱼胺、盐酸酪胺和盐酸亚精胺(4.14)标准物质 13.01 mg、18.29 mg、17.15 mg、16.57 mg、12.38 mg、12.66 mg 和 17.55 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 得到游离型混合标准储备溶液 1.0 mg/mL。混合标准储备溶液于 4℃ 保存, 可使用 3 个月。

4.16 混合标准工作溶液: 根据需要, 取适量混合标准储备溶液(4.15), 用水稀释至所需浓度。

4.17 滤膜: 0.45  $\mu m$ 。

## 5 仪器

5.1 液相色谱仪: 配有紫外检测器。

5.2 液体混匀器。

5.3 均质机。

5.4 离心机: 最高转速 5 000 r/min。

5.5 移液器: 10  $\mu L$ ~100  $\mu L$  和 100  $\mu L$ ~1 000  $\mu L$ 。

## 6 试样的制备与保存

### 6.1 试样的制备

取样品约 500 g 用组织粉碎机粉碎, 装入洁净容器作为试样, 密封, 并标明标记。

### 6.2 试样的保存

将试样于 -18℃ 冰箱中保存。

## 7 测定步骤

### 7.1 提取

称取 2 g 试样, 精确至 0.01 g, 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸溶液(4.10), 均质 1 min, 于 3 000 r/min 离心 10 min, 上清液移入 25 mL 棕色容量瓶中。沉淀物用 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸溶液重复提取一次, 于 3 000 r/min 离心 10 min, 合并上清液于上述容量瓶中, 用 0.4 mol/L 高氯酸溶液定容至刻度。

### 7.2 衍生

移取上述提取液(7.1) 1.0 mL, 放入 5 mL 容量瓶中, 依次加入 100  $\mu L$  2 mol/L 氢氧化钠溶液(4.11)、300  $\mu L$  饱和碳酸氢钠溶液(4.12)和 2 mL 10 mg/mL 丹酰氯溶液(4.13), 盖塞, 于 40℃ 避光反应 45 min。反应完毕后, 加入 100  $\mu L$  氢氧化铵(4.8), 静置 30 min, 用乙腈(4.2)定容至刻度, 振荡混匀, 取适量的溶液通过滤膜(4.17)后, 供液相色谱测定。

混合标准工作溶液衍生: 取适量混合标准工作溶液于 5 mL 容量瓶中, 加入 300  $\mu L$  饱和碳酸氢钠溶液和 2 mL 10 mg/mL 丹酰氯溶液, 盖塞, 于 40℃ 避光反应 45 min。反应完毕后, 加入 100  $\mu L$  氢氧化铵, 静置 30 min, 用乙腈定容到 5.00 mL, 振荡混匀, 取适量的溶液通过滤膜。

### 7.3 测定

#### 7.3.1 液相色谱条件

a) 色谱柱: Kromasil  $C_{18}$ , 5  $\mu m$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm(内径)或相当者。

b) 柱温: 35℃。

c) 流动相: A: 0.01 mol/L 乙酸铵; B: 水 + 乙腈(10 + 90)含 0.01 mol/L 乙酸铵。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	A:0.01 mol/L 乙酸铵/(%)	B:水+乙腈(10+90)含 0.01 mol/L 乙酸铵/(%)
0.00	1.0	45	55
25.00	1.0	5	95
35.00	1.0	5	95
43.00	1.0	45	55
45.00	1.0	45	55

d) 检测波长:254 nm。

e) 进样量:10  $\mu$ L。

### 7.3.2 色谱测定

用混合标准工作溶液(7.2)分别进样,以标准工作溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中七种生物胺的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,七种生物胺标准物质的液相色谱图参见图 A.1。

### 7.4 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

### 7.5 回收率试验

阴性样品中添加标准溶液,按 7.1~7.2 操作,测定后计算样品添加的回收率。

## 8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$X$ ——试样中被测组分含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

$c$ ——从标准工作曲线得到的试样溶液中被测组分的浓度,单位为微克每毫升( $\mu$ g/mL);

$V$ ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

$m$ ——最终试样溶液所代表的试样质量,单位为克(g)。

## 9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95%的可信度来计算。

### 9.1 重复性

在重复性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限  $r$ ,试样中被测物的含量范围及重复性方程见表 2~表 4。

表 2 虾中七种生物胺的含量范围及重复性和再现性方程

化合物名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 $r$	再现性限 $R$
苯乙胺	50~500	$r=0.290\,7m$	$R=0.323m$
腐胺	50~500	$r=0.052\,9m+8.23$	$R=0.181m+0.954$
尸胺	50~500	$r=0.112\,5m+0.802$	$R=0.245\,8m$

表 2(续)

化合物名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 $r$	再现性限 $R$
组胺	50~500	$r=0.148\ 3m+4.184$	$R=0.249\ 8m$
章鱼胺	50~500	$r=0.126m+3.232$	$R=0.319\ 2m$
酪胺	50~500	$r=0.222\ 2m$	$R=0.373\ 4m$
亚精胺	50~500	$r=0.152\ 4m+1.389$	$R=0.327\ 8m$

注： $m$  为两次测定结果的算术平均值。

表 3 黄鲛鱼中七种生物胺的含量范围及重复性和再现性方程

化合物名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 $r$	再现性限 $R$
苯乙胺	50~500	$r=0.128\ 6m+3.506$	$R=0.307\ 3m$
腐胺	50~500	$r=0.218\ 9m$	$R=0.328\ 5m$
尸胺	50~500	$r=0.132\ 8m+4.745$	$R=0.306\ 5m$
组胺	50~500	$r=0.217\ 5m$	$R=0.374\ 6m$
章鱼胺	50~500	$r=0.108\ 9m+4.600$	$R=0.440\ 3m+0.374\ 2$
酪胺	50~500	$r=0.130\ 7m$	$R=0.383\ 9m$
亚精胺	50~500	$r=0.189\ 0m+0.713\ 3$	$R=0.415\ 6m$

注： $m$  为两次测定结果的算术平均值。

表 4 鳗鱼中七种生物胺的含量范围及重复性和再现性方程

化合物名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 $r$	再现性限 $R$
苯乙胺	50~500	$r=0.129\ 9m+0.693\ 5$	$R=0.286\ 5m$
腐胺	50~500	$r=0.119\ 9m$	$R=0.223\ 4m$
尸胺	50~500	$r=0.194\ 7m$	$R=0.231\ 3m$
组胺	50~500	$r=0.143\ 9m+2.730\ 4$	$R=0.301\ 8m$
章鱼胺	50~500	$r=0.056\ 3m+3.242\ 4$	$R=0.299\ 8m$
酪胺	50~500	$r=0.222\ 2m$	$R=0.373\ 4m$
亚精胺	50~500	$r=0.154\ 1m$	$R=0.319\ 1m$

注： $m$  为两次测定结果的算术平均值。

如果两次测定值的差值超过重复性限  $r$ ,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

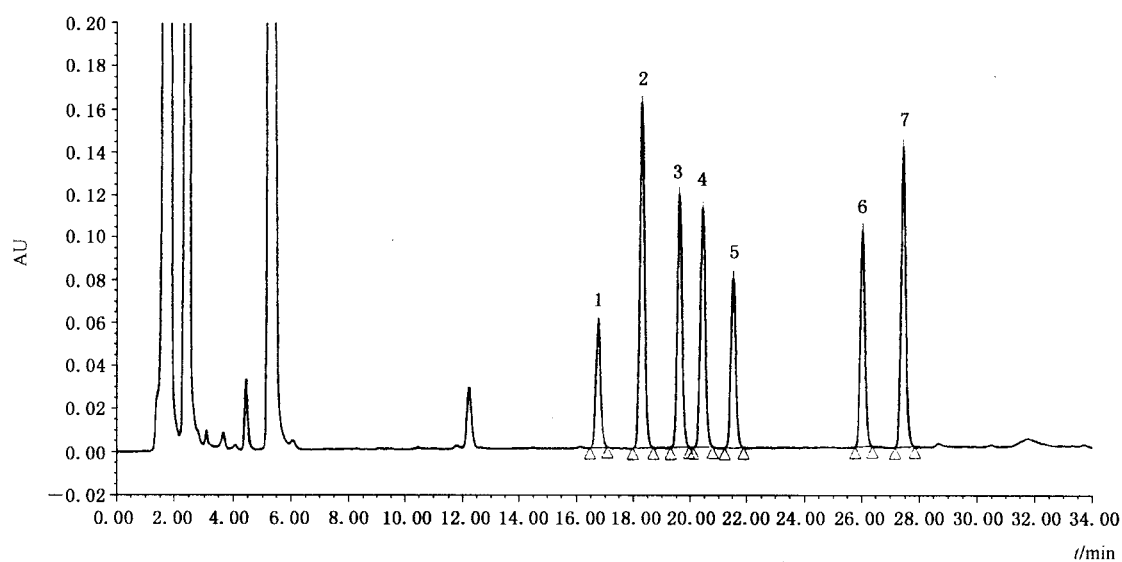
## 9.2 再现性

在再现性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限  $R$ ,试样中被测物的含量范围及再现性方程见表 2~表 4。

附 录 A  
(资料性附录)

七种生物胺标准物质衍生物色谱图

七种生物胺标准物质衍生物的色谱图,见图 A.1。



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

图 A.1 七种生物胺标准物质衍生物的色谱图

附 录 B  
(资料性附录)  
回 收 率

本方法中七种生物胺添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 七种生物胺添加浓度及其平均回收率的试验数据

化合物名称	添加浓度/(mg/kg)	平均回收率/(%)
苯乙胺	50	91.4
	100	90.5
	500	93.1
腐胺	50	96.9
	100	93.0
	500	94.5
尸胺	50	92.9
	100	92.0
	500	93.4
组胺	50	94.3
	100	92.6
	500	95.1
章鱼胺	50	94.7
	100	93.7
	500	91.8
酪胺	50	92.6
	100	93.8
	500	91.6
亚精胺	50	92.5
	100	92.4
	500	90.9