



中华人民共和国国家标准

GB 5009.208—2016

食品安全国家标准 食品中生物胺的测定

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布
国家食品药品监督管理总局

前 言

本标准代替 GB/T 5009.208—2008《食品中生物胺含量的测定》、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》、SN/T 2209—2008《进出口水产品中有毒生物胺的检测方法 高效液相色谱法》，及 GB/T 5009.45—2003《水产品卫生标准的分析方法》中组胺检测部分。

本标准与 GB/T 5009.208—2008 相比，主要变化如下：

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品中生物胺的测定”；
- 增加了分光光度法；
- 增加了章鱼胺；
- 修改了酒类和醋酱油的测定；
- 修改了流动相和洗脱梯度；
- 修改了样品前处理方法；
- 适用范围删除了乳制品。

食品安全国家标准

食品中生物胺的测定

第一法 液相色谱法

1 范围

本标准规定了食品中色胺、 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、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(醋和酱油)、水产品(鱼类及其制品、虾类及其制品)、肉类中生物胺的测定。

2 原理

水产品(鱼类及其制品、虾类及其制品)、肉类:试样用5%三氯乙酸提取,正己烷去除脂肪,三氯甲烷-正丁醇(1+1)液液萃取净化后,丹磺酰氯衍生, C_{18} 色谱柱分离,高效液相色谱-紫外检测器检测,内标法定量。

酒类(葡萄酒、啤酒、黄酒等)、调味品(醋和酱油):试样用丹磺酰氯衍生, C_{18} 色谱柱分离,高效液相色谱-紫外检测器检测,内标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 3.1.2 丙酮(C_3H_6O):色谱纯。
- 3.1.3 乙醚($C_4H_{10}O$):重蒸。
- 3.1.4 正丁醇($C_4H_{10}O$)。
- 3.1.5 三氯甲烷($CHCl_3$)。
- 3.1.6 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。
- 3.1.7 乙酸(CH_3COOH):色谱纯。
- 3.1.8 乙酸铵($CH_3COO NH_4$):色谱纯。
- 3.1.9 谷氨酸钠($C_5H_8NNaO_4$)。
- 3.1.10 碳酸氢钠($NaHCO_3$)。
- 3.1.11 氯化钠($NaCl$)。
- 3.1.12 氢氧化钠($NaOH$)。
- 3.1.13 盐酸(HCl , 37%)。
- 3.1.14 三氯乙酸($C_2HCl_3O_2$)。

3.1.15 丹磺酰氯(Dansyl chloride, $C_{12}H_{12}ClNO_2S$, CAS 号:605-65-2, 纯度 $>99\%$)。

3.2 试剂配制

3.2.1 丹磺酰氯衍生剂溶液:准确称取丹磺酰氯适量,以丙酮为溶剂配制浓度为 10 mg/mL 的衍生剂使用液,置 4 °C 冰箱避光储存。

3.2.2 5%三氯乙酸溶液:准确称取 25 g 三氯乙酸于 250 mL 烧杯中,用适量水完全溶解后转移至 500 mL 容量瓶中,定容至刻度。

3.2.3 1 mol/L 盐酸溶液:准确量取 8.6 mL 盐酸于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。

3.2.4 0.1 mol/L 盐酸溶液:准确量取 1 mol/L 盐酸溶液 10 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。

3.2.5 1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 4 g 氢氧化钠,加入 100 mL 水完全溶解。

3.2.6 正丁醇/三氯甲烷(1+1)混合溶液:分别量取相同体积的正丁醇和三氯甲烷混合均匀即可。

3.2.7 饱和碳酸氢钠溶液:称取 15 g 碳酸氢钠,加入 100 mL 水溶解,取上清液即为饱和溶液。

3.2.8 50 mg/mL 谷氨酸钠溶液:准确称取 5.0 g 谷氨酸钠用饱和碳酸氢钠溶液溶解并定容至 100 mL。

3.2.9 含 1%乙酸的 0.01 mol/L 乙酸铵溶液:称取 0.77 g 乙酸铵溶解于水中,转移至 1 000 mL 容量瓶中,加入 10 mL 甲酸,用水定容至刻度。

3.2.10 流动相 A:量取 100 mL 含 1%乙酸的 0.01 mol/L 乙酸铵溶液加入 900 mL 乙腈。

3.2.11 流动相 B:量取 900 mL 含 1%乙酸的 0.01 mol/L 乙酸铵溶液于加入 100 mL 乙腈。

3.3 标准品

3.3.1 组胺盐酸盐(Histamine dihydrochloride, $C_5H_9N_3 \cdot 2HCl$, CAS 号:56-92-8)标准品(纯度 $>99\%$)。

3.3.2 β -苯乙胺盐酸盐(β -phenylethylamine hydrochloride, $C_8H_{11}N \cdot HCl$, CAS 号:64-04-0)标准品(纯度 $>98\%$)。

3.3.3 酪胺盐酸盐(Tyramine hydrochloride, $C_8H_{11}NO \cdot HCl$, CAS 号:60-19-5)标准品(纯度 $>98\%$)。

3.3.4 腐胺盐酸盐(Putrescine dihydrochloride, $C_4H_{12}N_2 \cdot 2HCl$, CAS 号:333-93-7)标准品(纯度 $>98\%$)。

3.3.5 尸胺盐酸盐(Cadaverine dihydrochloride, $C_5H_{14}N_2 \cdot 2HCl$, CAS 号:1476-39-7)标准品(纯度 $>98\%$)。

3.3.6 色胺盐酸盐(Tryptamine hydrochloride, $C_{10}H_{12}N_2 \cdot HCl$, CAS 号:61-54-1)标准品(纯度 $>99\%$)。

3.3.7 精胺盐酸盐(Spermine tetrahydrochloride, $C_{10}H_{26}N_4 \cdot 4HCl$, CAS 号:306-67-2)标准品(纯度 $>97\%$)。

3.3.8 亚精胺盐酸盐(Spermidine trihydrochloride, $C_7H_{19}N_3 \cdot 3HCl$, CAS 号:334-50-9)标准品(纯度 $>97\%$)。

3.3.9 章鱼胺盐酸盐(Octopamine hydrochloride, $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$, CAS 号:770-05-9)标准品(纯度 $>97\%$)。

3.3.10 1,7-二氨基庚烷(1,7-Diaminoheptane, $C_7H_{18}N_2$, CAS 号:646-19-5)内标标准品(纯度 $>98\%$)。

3.4 标准溶液配制

注:标准溶液的配制浓度以各生物胺单体计算,称取标准品时应对其中的盐酸盐进行折算。所有标准溶液配制好

后均需转移至密闭棕色容器中,避光贮存。

3.4.1 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小烧杯中,用0.1 mol/L盐酸溶液溶解后转移至10 mL容量瓶中,定容至刻度,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-20 °C冰箱储存。保存期为6个月。

3.4.2 生物胺标准混合使用液的配制:分别吸取1.0 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)。保存期为3个月。

3.4.3 生物胺标准系列溶液的配制:分别吸取0.10 mL、0.25 mL、0.50 mL、1.0 mL、1.50 mL、2.50 mL、5.0 mL生物胺标准混合使用液(100 mg/L),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1.0 mg/L、2.5 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、15.0 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L,临用现配。

3.4.4 内标标准储备溶液的配制:准确称取内标标准品适量,置于10 mL容量瓶中,用0.1 mol/L盐酸溶液溶解后稀释至刻度,混匀,配制成浓度为10 mg/mL的内标标准储备溶液,置-20 °C冰箱储存。保存期为6个月。

3.4.5 内标标准中间使用液的配制:吸取1.0 mL内标标准储备溶液于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(1.0 mg/mL),存期为3个月。

3.4.6 内标标准使用液的配制:吸取1.0 mL内标标准中间使用液于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),临用现配。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪(HPLC),配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.2 组织匀质仪。

4.3 离心机:转速 \geq 6 500 r/min。

4.4 涡旋振荡器。

4.5 水浴装置。

4.6 氮气浓缩装置。

4.7 天平:感量分别为0.01 g和0.000 1 g。

4.8 酸度计: \pm 0.1 pH。

4.9 超纯水器。

4.10 滤膜针头滤器:0.22 μ m。

5 分析步骤

5.1 水产品和肉类

5.1.1 试样制备

取水产品及肉类样品的可食部分约500 g,充分匀质,均分成两份装入洁净容器中,密封,于-20 °C保存。

5.1.2 提取

准确称取已经绞碎或匀浆后的水产品、肉类10 g(精确至0.01 g),置于100 mL具塞锥形瓶中,加入500 μ L内标使用液(1.0 mg/mL)与样品充分混匀,加入20 mL 5%三氯乙酸溶液和振荡提取30 min,转移至50 mL具塞离心管中,5 000 r/min离心10 min,转移上清液至50 mL容量瓶中,残渣用20 mL

5%三氯乙酸溶液再提取一次,合并上清液,用5%三氯乙酸稀释至刻度,待净化。

5.1.3 净化

5.1.3.1 除脂肪:移取上述试样提取液10 mL于25 mL具塞试管中,加入0.5 g氯化钠涡旋振荡至氯化钠完全溶解后加入10 mL正己烷,涡旋振荡5 min,静置分层后弃去上层有机相,下层试样溶液加入10 mL正己烷再除脂一次。

5.1.3.2 萃取:移取5 mL上述除脂肪后的试样溶液于10 mL具塞离心管中,用5 mol/L氢氧化钠溶液(几滴)调节pH至12.0左右。加入5 mL的正丁醇/三氯甲烷(1+1)混合溶液,涡旋振荡5 min,5 000 r/min离心5 min,取出,静置分层后,转移上层水相于另一个10 mL具塞离心管中,再萃取一次,合并萃取液,用正丁醇/三氯甲烷(1+1)稀释至刻度。取5 mL萃取液加入200 μ L盐酸(1 mol/L),混匀后40 $^{\circ}$ C水浴下氮气吹干,加入1 mL盐酸(0.1 mol/L)涡旋振荡,使残留物完全溶解,待衍生。

5.1.4 衍生

5.1.4.1 试样的衍生:在上述待衍生的试样溶液中依次加入1 mL饱和碳酸氢钠溶液、100 μ L氢氧化钠溶液(1 mol/L)、1 mL衍生试剂,涡旋混匀1 min后置于60 $^{\circ}$ C恒温水浴中衍生15 min,取出,分加入100 μ L谷氨酸钠溶液,振荡混匀,60 $^{\circ}$ C恒温反应15 min。取出,冷却至室温,于每个离心管中加入1 mL水,涡旋混合1 min,40 $^{\circ}$ C水浴下氮吹除去丙酮(约1 mL),加入0.5 g氯化钠涡旋振荡至氯化钠完全溶解后加入5 mL乙醚,涡旋振荡2 min,静置分层后,吸出上层有机相(乙醚层),再萃取一次,合并乙醚萃取液,40 $^{\circ}$ C水浴下氮气吹干。加入1 mL乙腈涡旋振荡使残留物完全溶解,0.22 μ m滤膜针头过滤器过滤于进样小瓶,待测定。

5.1.4.2 标准的衍生:分别移取1 mL生物胺标准系列溶液,置于10 mL具塞试管中,依次加入250 μ L内标使用液(100 mg/L),以下操作同试样的衍生步骤。

5.2 酒类及调味品(醋和酱油)

5.2.1 试样的衍生:准确量取1.0 mL样品于15 mL塑料离心管中,依次加入250 μ L内标溶液(100 mg/L)、1 mL饱和碳酸氢钠溶液、100 μ L氢氧化钠溶液(1 mol/L)、1 mL衍生试剂,涡旋混匀1 min后置于60 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中衍生15 min,取出,分别加入100 μ L谷氨酸钠溶液,振荡混匀,60 $^{\circ}$ C恒温反应15 min,取出冷却至室温,于每个离心管中加入1 mL超纯水,涡旋混合1 min,40 $^{\circ}$ C水浴下氮吹除去丙酮(约1 mL),加入0.5 g氯化钠涡旋振荡至完全溶解,再加入5 mL乙醚,涡旋振荡2 min,静置分层后,转移上层有机相(乙醚层)于15 mL离心管中,水相(下层)再萃取一次,合并两次乙醚萃取液,40 $^{\circ}$ C水浴下氮气吹干。加入1 mL乙腈振荡混匀,使残留物溶解,0.22 μ m滤膜针头过滤器过滤,待测定。

5.2.2 标准的衍生:同5.1.4.2。

5.3 液相色谱参考条件

色谱柱为C₁₈柱(柱长250 mm,柱内径4.6 mm,柱填料粒径5 μ m),紫外检测波长254 nm,进样量20 μ L,柱温35 $^{\circ}$ C,流动相A为90%乙腈/10%(含0.1%乙酸的0.01 mol/L乙酸铵溶液),流动相B为10%乙腈/90%(含0.1%乙酸的0.01 mol/L乙酸铵溶液),流速0.8 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	22	25	32	32.01	37
流动相 A/%	60	85	100	100	60	60
流动相 B/%	40	15	0	0	40	40

5.4 标准曲线的制作

将 20 μL 系列混合标准工作液的衍生液分别注入高效液相色谱仪,测得目标化合物的峰面积,以系列混合标准工作液的浓度为横坐标,以目标化合物的峰面积与内标的峰面积的比值为纵坐标,绘制标准曲线。标准溶液的色谱图见图 A.1。

5.5 试样溶液的测定

将试样的衍生溶液注入高效液相色谱仪中,测得峰面积,以保留时间定性。根据标准曲线得到待测液中各目标化合物的浓度。

6 分析结果的表述

试样中生物胺含量按式(1)计算:

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

式中:

X —— 试样中被测组分的含量,单位为毫克每千克或毫克每升(mg/kg 或 mg/L);

c —— 试样溶液中被测组分的浓度,单位为微克每升(mg/L);

V —— 试样溶液的体积,单位为毫升(mL);

f —— 稀释倍数;

m —— 试样的质量,单位为克(g)。

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%。

8 其他

8.1 检出限

酒类及醋: β -苯乙胺 2 mg/L、腐胺 2 mg/L、尸胺 2 mg/L、组胺 2 mg/L、酪胺 2 mg/L、章鱼胺 5 mg/L、色胺 5 mg/L、亚精胺 5 mg/L、精胺 5 mg/L。

水产品及肉类:色胺、 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、精胺和亚精胺均为 20 mg/kg。

8.2 定量限

酒类及醋: β -苯乙胺 5 mg/L、腐胺 5 mg/L、尸胺 5 mg/L、组胺 5 mg/L、酪胺 5 mg/L、章鱼胺 10 mg/L、色胺 10 mg/L、亚精胺 mg/L、精胺 10 mg/L。

水产品及肉类:色胺、 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、精胺和亚精胺均为 50 mg/kg。

第二法 分光光度法

9 范围

本标准规定了水产品中组胺含量的测定方法。

本标准适用于水产品(鱼类及其制品、虾类及其制品)中组胺的测定。

10 原理

以三氯乙酸为提取溶液,振摇提取,经正戊醇萃取净化,组胺与偶氮试剂发生显色反应后,分光光度计检测,外标法定量。

11 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

11.1 标准及试剂

11.1.1 磷酸组胺($C_5H_9N_3 \cdot 2H_3PO_4$)。

11.1.2 正戊醇($C_5H_{12}O$)。

11.1.3 三氯乙酸($C_2HCl_3O_2$)。

11.1.4 碳酸钠(Na_2CO_3)。

11.1.5 氢氧化钠(NaOH)。

11.1.6 盐酸(HCl,37%)。

11.1.7 对硝基苯胺($C_6H_6N_2O_2$)。

11.1.8 亚硝酸钠($NaNO_2$)。

11.2 试剂配制

11.2.1 组胺标准储备液:在 100 °C(±5 °C)下将磷酸组胺标准干燥 2 h 后,称取 0.276 7 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 烧杯中,用适量水完全溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。此溶液每毫升相当于 1.0 mg 组胺。置-20 °C 冰箱储存。保存期为 6 个月。

11.2.2 磷酸组胺标准使用液:吸取 1.0 mL 组胺标准溶液于 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。此溶液每毫升相当于 20.0 μg 组胺。临用现配。

11.2.3 100 g/L 三氯乙酸溶液:称取 50 g 三氯乙酸于 250 mL 烧杯中,用适量水完全溶解后转移至 500 mL 容量瓶中,定容至刻度。保存期为 6 个月。

11.2.4 50 g/L 碳酸钠溶液:称取 5 g 碳酸钠于 100 mL 烧杯中,用适量水完全溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。保存期为 6 个月。

11.2.5 250 g/L 氢氧化钠溶液:称取 25 g 氢氧化钠于 100 mL 烧杯中,用适量水完全溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。保存期为 3 个月。

11.2.6 (1+11)盐酸溶液:吸取 5 mL 盐酸于 100 mL 烧杯中,加水 55mL,混匀。保存期为 6 个月。

11.2.7 偶氮试剂:

甲液(对硝基苯胺):称取 0.5 g 对硝基苯胺,加 5 mL 盐酸溶液溶解后,再加水稀释至 200 mL,置冰箱中,临用现配。

乙液(亚硝酸钠溶液):称取 0.5 g 亚硝酸钠,加入 100 mL 水溶解混匀,临用现配。

吸取 5 mL 甲液,40 mL 乙液混合即为偶氮试剂,临用现配。

12 分析步骤

12.1 试样制备

取鲜活水产品的可食部分约 500 g 代表性样品,用组织捣碎机充分捣碎,均分成两份分别装入洁净容器中,密封,并标明标记。-20 ℃ 保存。

12.2 试样的分析

12.2.1 试样提取

准确称取已经绞碎均匀的试样 10 g(精确至 0.01 g),置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 20 mL 10% 三氯乙酸溶液浸泡 2 h~3 h,振荡 2 min 混匀,滤纸过滤,准确吸取 2.0 mL 滤液于分液漏斗中,逐滴加入氢氧化钠溶液调节 pH 在 10~12 之间,加入 3 mL 正戊醇振摇提取 5 min,静置分层,将正戊醇提取液(上层)转移至 10 mL 刻度试管中。正戊醇提取三次,合并提取液,并用正戊醇稀释至刻度。吸取 2.0 mL 正戊醇提取液于分液漏斗中,加入 3 mL 盐酸溶液振摇提取,静置分层,将盐酸提取液(下层)转移至 10 mL 刻度试管中。提取三次,合并提取液,并用盐酸溶液稀释至刻度。

12.2.2 测定

分别吸取 0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.0 mL 组胺标准使用液(相当于 0、4.0、8.0、12、16、20 μg 组胺)及 2.0 mL 试样提取液于 10 mL 比色管中,加水至 1 mL,再加入 1 mL 盐酸溶液,混匀。加入 3 mL 碳酸钠溶液,3 mL 偶氮试剂。加水至刻度,混匀,放置 10 min。将“0”管溶液转移至 1 cm 比色皿,分光光度计波长调至 480 nm,调节吸光度为“0”后,依次测试系列标准溶液及试样溶液吸光度,以吸光度 A 为纵轴,组胺的质量为横轴绘制标准曲线。

13 结果计算

试样中组胺的含量按式(2)计算:

$$X = \frac{m_1 V_1 \times 10 \times 10}{m_2 \times 2 \times 2 \times 2} \times \frac{100}{1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X —— 试样中组胺的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
- m_1 —— 试样中组胺的吸光度值对应的组胺质量,单位为微克(μg);
- V_1 —— 加入三氯乙酸溶液的体积,单位为毫升(mL);
- 10 —— 第一个是正戊醇提取液的体积,单位为毫升(mL);第二个是盐酸提取液的体积,单位为毫升(mL);
- m_2 —— 取样量,单位为克(g);
- 2 —— 第一个是三氯乙酸提取液的体积,单位为毫升(mL);第二个是正戊醇提取液的体积,单位为毫升(mL);第三个是盐酸提取液的体积,单位为毫升(mL);
- 100 —— 换算系数;
- 1 000 —— 换算系数。

计算结果保留小数点后一位。

14 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%。

15 其他

方法定量限:组胺 50 mg/kg。

附录 A

9 种生物胺标准溶液及内标衍生物液相色谱图

9 种生物胺标准溶液及内标衍生物液相色谱图见图 A.1。

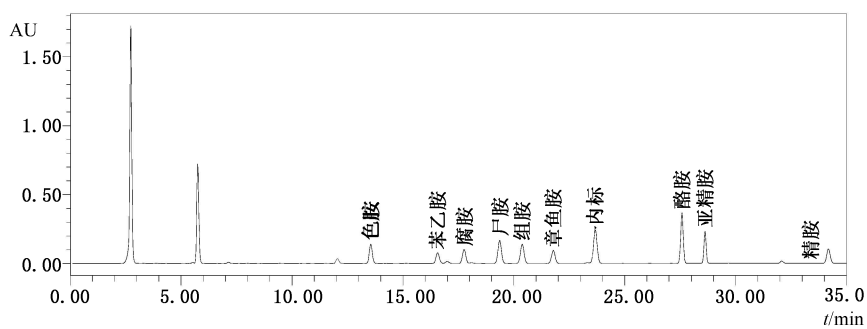


图 A.1 9 种生物胺标准溶液及内标衍生物液相色谱图