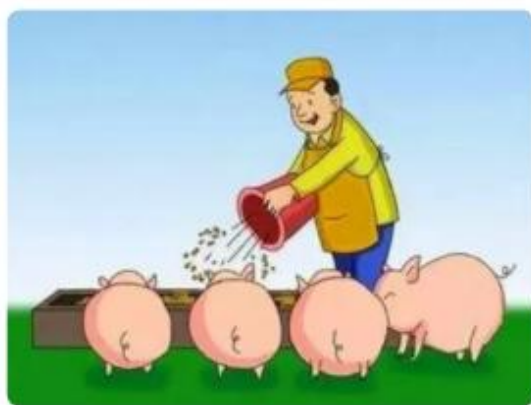


饲料中生物胺的含量测定——高效液相色谱法

背景:



生物胺是一类由氨基酸脱羧或醛和酮氨基化形成的弱碱性低分子量含氮化合物，在机体生命活动中发挥着重要作用，但在体内聚集到高水平时或在摄入量很高时会表现出毒性，其中毒症状包括头痛、恶心、心悸、血压变化、呼吸紊乱等过敏反应，严重的还会危及生命。



根据其组成成分，生物胺可分为两类：单胺和多胺。单胺主要有酪胺、组胺、腐胺、尸胺、苯乙胺、色胺等；多胺主要包括精胺和亚精胺。动物体内残留的生物胺含量与摄入的动物源性饲料原料如鱼粉、肉骨粉、家禽副产品中生物胺的含量直接相关。因此，国家对于动物源性饲料中的生物胺含量设定了严格的限量标准。



本实验参照《GB/T 23884-2021 动物源性饲料中生物胺的测定 高效液相色谱法》使用悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪对饲料中的生物胺含量进行测定。

实验部分:

饲料中生物胺的含量测定 高效液相色谱法

【仪器与试剂】

仪器与设备: 悟空 K2025 高效液相色谱仪; 分析天平(精确到 0.0001g); 涡旋振荡器; 超声波清洗机; 离心机; 恒温摇床; 氮气吹干仪; 容量瓶(100mL、1000mL, 棕色带刻度)。

试剂与材料: 符合 GB/T6682 的一级水; 乙腈、氨水、乙酸铵[色谱纯]; 丙酮、氢氧化钠、碳酸氢铵、盐酸[分析纯]; 高氯酸(纯度为 70%~72%); 丹磺酰氯(纯度≥99%); 色胺(纯度为 99.3%); 苯乙胺(纯度为 99.9%); 腐胺·二盐酸(纯度为 99.7%); 尸胺(纯度为 98.1%); 组胺(纯度为 98.3%); 章鱼胺·一盐酸(纯度为 97%); 酪胺(纯度为 99.5%); 亚精胺·三盐酸(纯度为 99.5%); 精胺(纯度为 97.2%); 微孔滤膜(0.22μm, 有机相)。

【样品前处理】

样品提取: 称取 1g (精确至 0.0001g) 鱼粉样品于 50mL 离心管中, 准确加入 10mL 的 0.4mol/L 高氯酸提取液, 涡旋混匀, 置于恒温摇床上, 室温下 200r/min 振荡 10min, 然后于

5000r/min条件下离心10min, 将上清液转移至另一50mL离心管中, 残渣再用10mL的0.4mol/L高氯酸提取液提取, 重复上述操作, 合并上清液, 备用。

衍生: 准确移取上清液1mL, 置于15mL具塞离心管中, 依次加入200 μ L的2mol/L氢氧化钠溶液、300 μ L的2mol/L饱和碳酸氢钠溶液和2mL的10mg/mL丹磺酰氯衍生溶液, 涡旋混匀, 置于恒温摇床上, 于45 $^{\circ}$ C避光反应45min; 然后加入100 μ L氨水终止反应, 混匀, 静置15min, 45 $^{\circ}$ C氮吹去丙酮, 用乙腈定容至5mL, 超声复溶, 混匀, 用0.22 μ m有机微孔滤膜过滤备用。

精密量取混合标准系列溶液各1mL与试样溶液同时进行衍生。

【色谱条件】

a) 色谱柱: C18 4.6 \times 250mm, 5 μ m

b) 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 5mMol/L 乙酸铵溶液, 梯度洗脱设置如下表:

时间(min)	流动相 A%	流动相 B%
0.0	60	40
5.0	60	40
16.0	75	25
24.0	95	5
25.0	95	5
31.0	60	40
35.0	60	40

c) 柱温: 30 $^{\circ}$ C

d) 进样量: 10 μ L

e) 流速: 1.0 mL/min

f) 波长: 254nm

【结果与讨论】:

1. 9种生物胺混合标准溶液色谱图如图1所示, 结合色谱积分数据(表1)可知, 9种生物胺的分离度均大于1.5, 对称因子在0.97-1.16之间, 具有良好的分离度和色谱峰形。

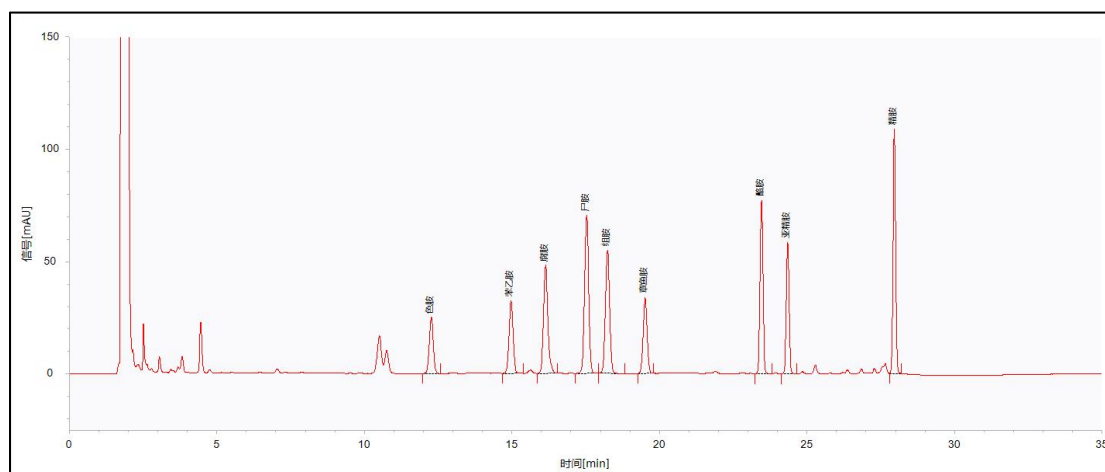


图 1 9 种生物胺混合标准溶液色谱图

表 1 9 种生物胺混合标准溶液色谱积分结果

目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 (min)	峰面积 (mAU·s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称 /拖尾因子
色胺	24.825	12.283	235.225	24.983	39217	-	1.01
苯乙胺	24.975	14.983	312.100	32.344	55360	10.74	1.00
腐胺	24.925	16.158	498.357	48.119	61022	4.55	1.16
尸胺	24.500	17.550	684.999	70.439	75443	5.38	0.98
组胺	24.575	18.258	552.647	54.984	76106	2.72	0.97
章鱼胺	24.008	19.533	314.376	33.634	99856	4.98	0.97
酪胺	24.875	23.475	539.073	77.000	259091	18.26	1.00
亚精胺	24.87	24.358	382.986	58.482	318865	4.95	1.00
精胺	24.300	27.975	664.358	108.942	483366	21.69	1.00

2. 将生物胺混合标准溶液逐级稀释至信噪比 S/N 为 3 左右, 计算仪器的检出限, 数据结果见表 2, 9 种生物胺的检出限为 0.002—0.010 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.010—0.033 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 2 灵敏度测试数据

目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
色胺	0.250	0.243	0.003	81.0	0.009	0.031
苯乙胺	0.248	0.317	0.003	105.7	0.007	0.023
腐胺	0.250	0.975	0.003	325.0	0.002	0.008

尸胺	0.249	0.676	0.003	225.3	0.003	0.011
组胺	0.245	0.371	0.003	123.7	0.006	0.020
章鱼胺	0.246	0.225	0.003	75.0	0.010	0.033
酪胺	0.240	0.751	0.003	250.3	0.003	0.010
亚精胺	0.249	0.447	0.003	149.0	0.005	0.017
精胺	0.249	0.671	0.003	223.7	0.003	0.011

3. 将生物胺混合标准溶液在 HPLC 上进行测定，绘制校准曲线，线性方程见图 2，9 种生物胺在测定浓度范围内，曲线的确定系数 R^2 均达到 0.9990，线性关系良好。

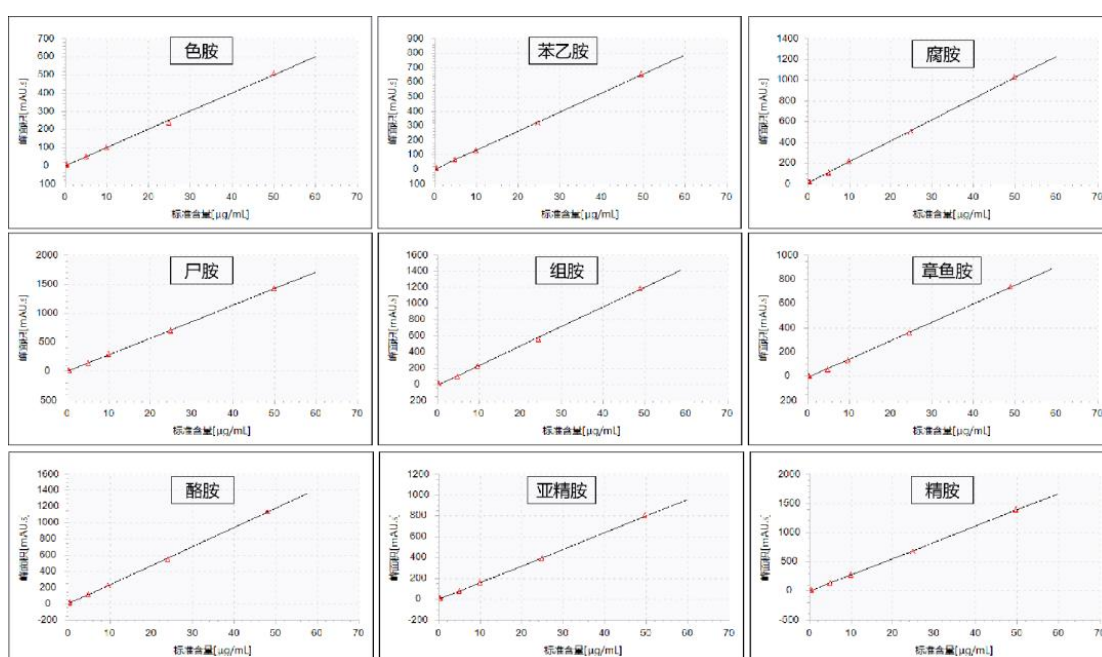


图 2 生物胺标准溶液校准曲线

4. 购买市售鱼粉饲料作为样品进行处理，并计算样品中各生物胺的含量。经计算，此鱼粉饲料样品中 9 种生物胺的含量详见表 3。

表 3 鱼粉饲料样品中 9 种生物胺的含量

目标物	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	章鱼胺	酪胺	亚精胺	精胺
样品含量 (mg/kg)	1.18×10^3	2.68×10^3	3.08×10^4	2.88×10^4	1.61×10^4	2.06×10^2	1.43×10^4	1.58×10^3	3.45×10^2

【结论】

使用 K2025 高效液相色谱仪测定鱼粉饲料中的生物胺, 实验结果表明: 9 种生物胺色谱峰的理论塔板数均大于 30000, 对称因子在 0.97-1.16 之间, 峰型良好; 在测定浓度范围内, 9 种生物胺具有良好的线性关系, 确定系数 R^2 均大于 0.9990; 重复性测试中, 连续进样 7 针的保留时间的 RSD 在 0.024%~0.048%, 峰面积的 RSD 在 0.162%~0.396%, 定性定量均有良好的重复性; 9 种生物胺的检出限均不大于 $0.010\mu\text{g/mL}$, 定量限均不大于 $0.033\mu\text{g/mL}$ 。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪完全满足《GB/T 23884-2021 动物源性饲料中生物胺的测定 高效液相色谱法》标准中对饲料中 9 种生物胺含量测定的需求。