

# 高效液相色谱法测定鱼粉饲料中生物胺

王惠玉, 张佳佳

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 济南 250104)

**摘要:** 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定鱼粉饲料中 9 种生物胺 (色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺、精胺) 的含量。色谱条件: 色谱柱为 C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6×250mm, 5μm), 流速为 1.0mL/min, 柱温为 30°C, 进样量为 10μL, 检测波长为 254nm。实验结果: 9 种生物胺在测定浓度范围内均具有良好的线性关系 ( $R^2 \geq 0.9990$ ); 9 种生物胺的仪器检出限均不大于 0.010μg/mL, 仪器定量限均不大于 0.033μg/mL; 按照标准规定进行操作, 测定结果满足《GB/T 23884-2021 动物源性饲料中生物胺的测定 高效液相色谱法》中高效液相色谱法的检出限 5mg/kg 和定量限 10mg/kg 的要求。

**关键词:** 鱼粉;饲料;生物胺

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, 是动植物和多数微生物体内的正常生理成分, 在机体生命活动中发挥着重要作用。正常浓度的生物胺在动物的生理过程中发挥着重要的作用, 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。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。生物胺中毒的症状包括恶心、呼吸窘迫、心悸、头疼、疹子、高血压和低血压等。

国家标准《GB 2733-2015 食品安全国家标准鲜、冻动物性水产品》中规定了高组胺鱼类中组胺限量≤40 mg/100g, 其它鱼类不得超过 20 mg/100g。美国规定水产品中组胺含量应低于 50 mg/kg, 澳新食品标准局和欧盟规定鱼类产品组胺含量不得超过 200mg/kg。

## 1 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

乙腈: 色谱纯;

氨水: 色谱纯;

丙酮: 分析纯;

乙酸铵: 色谱纯;

高氯酸: 纯度为 70%~72%;

氢氧化钠：分析纯；

碳酸氢钠：分析纯；

盐酸：优级纯；

丹磺酰氯：CAS 号为 605-65-2，纯度 $\geq$ 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%；

乙酸铵溶液（5mmol/L）：称取 0.38g 乙酸铵（3.5）加水溶解，定容至 1L；

高氯酸提取液（0.4mol/L）：准确量取高氯酸（3.6）32.5mL，用水定容至 1L；

氢氧化钠溶液（2mol/L）：准确称取 8g 氢氧化钠（3.7），用水定容至 100mL；

饱和碳酸氢钠溶液（2mol/L）：向水中加入足量的碳酸氢钠固体（3.8）直至不再溶解；

盐酸溶液（0.1mol/L）：准确量取 8.3mL 浓盐酸（3.9），用水定容至 1L；

丹磺酰氯衍生溶液（10mg/mL）：称取 1g 丹磺酰氯（3.10），用丙酮溶解，定容至 100mL，临用现配；

标准储备液（1mg/mL）：称取色胺（3.11）约 12mg、苯乙胺（3.12）约 13mg、腐胺·二盐酸（3.13）约 18mg、尸胺（3.14）约 10mg、组胺（3.15）约 10mg、章鱼胺·一盐酸（3.16）约 12mg、酪胺（3.17）约 10mg、亚精胺·三盐酸（3.18）约 17mg 和精胺（3.19）约 10mg，分别置于 10mL 棕色容量瓶中，用 0.1mol/L 盐酸溶液（3.24）溶解并定容至刻度，于-18℃条件下保存，有效期为 6 个月；

混合标准中间液：准确移取 1mL 各生物胺标准储备液（3.26）于 10mL 棕色容量瓶中，用 0.1mol/L 盐酸溶液（3.24）定容至 10mL，制得混合标准中间液，其中色胺浓度为 99.30 $\mu$ g/mL，苯乙胺浓度为 99.90 $\mu$ g/mL，腐胺浓度为 99.70 $\mu$ g/mL，尸胺浓度为 98.00 $\mu$ g/mL，组胺浓度为 98.30 $\mu$ g/mL，章鱼胺浓度为 96.03 $\mu$ g/mL，酪胺浓度为 99.50 $\mu$ g/mL，亚精胺浓度为 99.50 $\mu$ g/mL 和精胺浓度为 97.0 $\mu$ g/mL；

混合标准工作液：将混合标准中间液（3.27）用水稀释并定容配制成标准工作液，色胺系列浓度依次为 0.248 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.497 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.965 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.930 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.825 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 49.650 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，苯乙胺系列浓度依次为 0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.995 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.990 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.975 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 49.950 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，腐胺系列浓度依次为 0.249 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.499 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.985 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.970 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.925 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 49.850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，尸胺系列浓度依次为 0.245 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.490 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 49.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，组胺系列浓度依次为 0.246 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.492 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.915 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.830 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.575 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 49.150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，章鱼胺系列浓度依次为 0.240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.480 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.802 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.603 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.008 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 48.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，酪胺系列浓度依次为 0.249 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.498 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.975 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.950 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 48.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，亚精胺系列浓度依次为 0.249 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.498 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.975 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.950 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 48.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，精胺系列浓度依次为 0.243 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.486 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.860 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.720 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24.300 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 48.600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

微孔滤膜：0.22 $\mu\text{m}$ ，有机相；

氮气：纯度 $\geq 99.999\%$ 。

## 2 仪器与设备

高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站；

分析天平：精确到 0.0001g；

涡旋振荡器；

恒温摇床：控温精度 $\pm 1^\circ\text{C}$ ；

离心机：转速不低于 5000r/min；

氮气吹干仪；

超声波清洗机；

离心管：10mL、50mL，带盖；

容量瓶：10mL、1000mL，棕色带刻度。

## 3 测定步骤

### 3.1 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高氯酸提取液（3.21），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高氯酸提取液(3.21)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 $\mu$ L氢氧化钠溶液(3.22)、300 $\mu$ L饱和碳酸氢钠溶液(3.23)和2mL丹磺酰氯衍生溶液(3.25), 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 $\mu$ L氨水(3.3)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 $\mu$ 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。

## 3.2 色谱条件

a) 色谱柱: C<sub>18</sub> 4.6 $\times$ 250mm, 5 $\mu$ m 或者相当的色谱柱;

b) 流动相: 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为乙酸铵溶液(3.20), 梯度设置见下表;

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 $\mu$ L;

e) 流速: 1.0mL/min;

f) 波长: 254nm。

## 4 结果

### 4.1 重复性测试

按照上述色谱条件(5.2)进行采集, 9种生物胺混合标准溶液(色胺浓度为 24.825 $\mu$ g/mL、苯乙胺浓度为 24.975 $\mu$ g/mL、腐胺浓度为 24.925 $\mu$ g/mL、尸胺浓度为 24.500 $\mu$ g/mL、组胺浓度为 24.575 $\mu$ g/mL、章鱼胺浓度为 24.008 $\mu$ g/mL、酪胺浓度为 24.875 $\mu$ g/mL、亚精胺浓度为 24.875 $\mu$ g/mL、精胺浓度为 24.300 $\mu$ g/mL)的色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

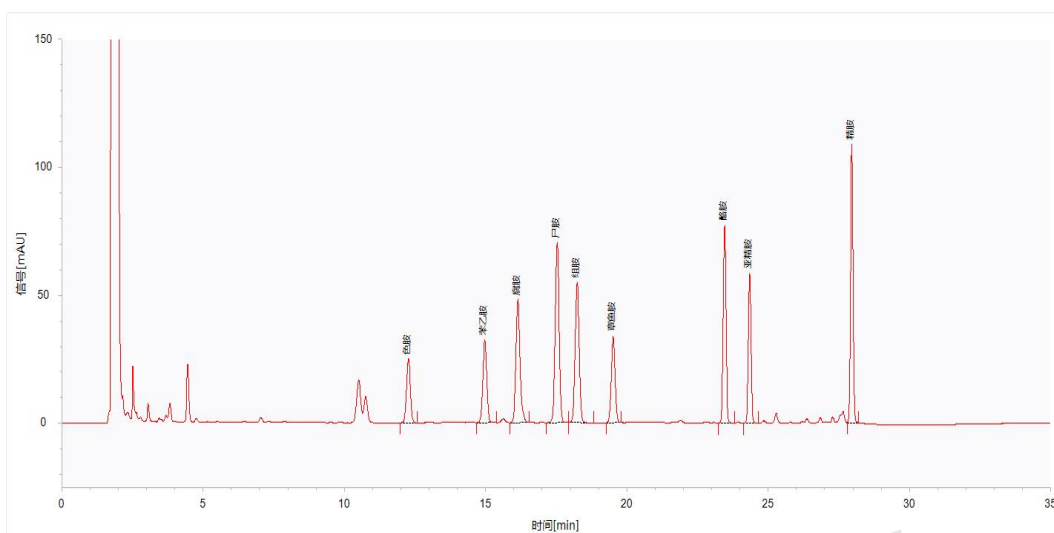


图 1 9 种生物胺混合标准溶液的色谱图

表 1 9 种生物胺混合标准溶液色谱图积分结果

目标物	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	12.283	235.225	24.983	39217	-	1.01
苯乙胺	14.983	312.100	32.344	55360	10.74	1.00
腐胺	16.158	498.357	48.119	61022	4.55	1.16
尸胺	17.550	684.999	70.439	75443	5.38	0.98
组胺	18.258	552.647	54.984	76106	2.72	0.97
章鱼胺	19.533	314.376	33.634	99856	4.98	0.97
酪胺	23.475	539.073	77.000	259091	18.26	1.00
亚精胺	24.358	382.986	58.482	318865	4.95	1.00
精胺	27.975	664.358	108.942	483366	21.69	1.00

由表 1 可知，9 种生物胺间的分离度均大于 1.5，所以 9 种生物胺均能够很好地分离。

将 9 种生物胺混合标准溶液连续进样 7 针，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。



酪胺	峰面积	315.573	315.267	315.449	314.137	314.183	313.616	313.471	314.528	0.282
	保留时间	23.483	23.492	23.483	23.483	23.475	23.467	23.483	23.481	0.033
亚精胺	峰面积	538.350	539.298	538.395	537.612	536.924	536.735	536.166	537.640	0.206
	保留时间	24.367	24.375	24.367	24.367	24.358	24.358	24.367	24.366	0.024
精胺	峰面积	382.501	382.861	382.653	381.960	381.397	380.989	380.489	381.836	0.237
	保留时间	27.975	27.983	27.983	27.975	27.967	27.967	27.983	27.976	0.026
	峰面积	664.589	664.641	662.528	663.285	660.896	660.913	659.577	662.347	0.296

由表 2 可知，9 种生物胺混合标准溶液连续进样 7 针，9 种生物胺保留时间的 RSD 在 0.024%~0.048% 范围内，峰面积的 RSD 在 0.162%~0.396% 范围内，均有良好的定性定量重复性。

## 4.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的谱图如图 3 所示，计算结果见表 3。

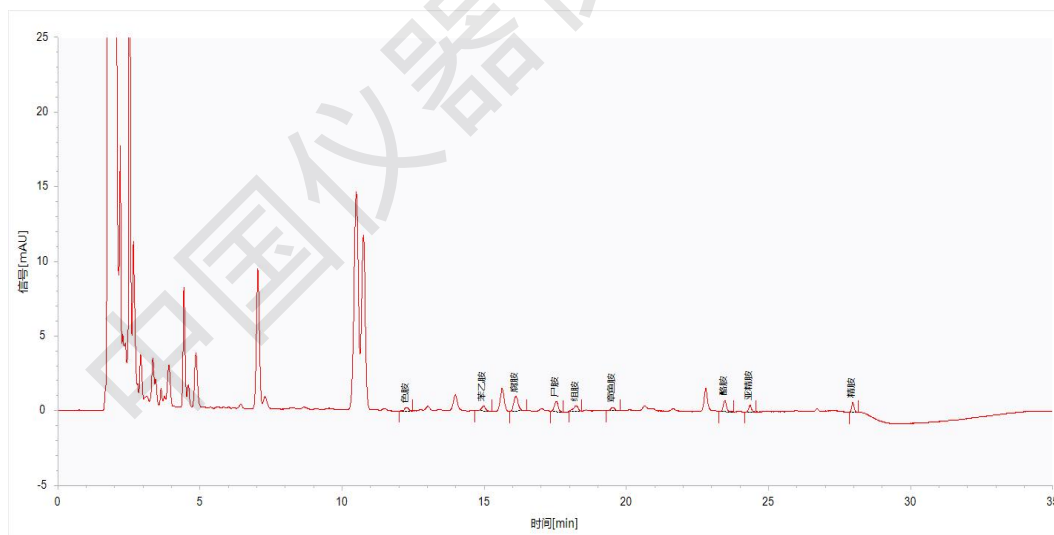


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

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

由表 3 可知，9 种生物胺的仪器检出限均不大于 0.010 $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限均不大于 0.033 $\mu\text{g/mL}$ 。

### 4.3 含量测定

#### 4.3.1 校准曲线

将配制好的混合标准工作液（3.28）在 HPLC 上进行测定，以浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程及相关系数见图 4~12，叠加色谱图见图 13。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。

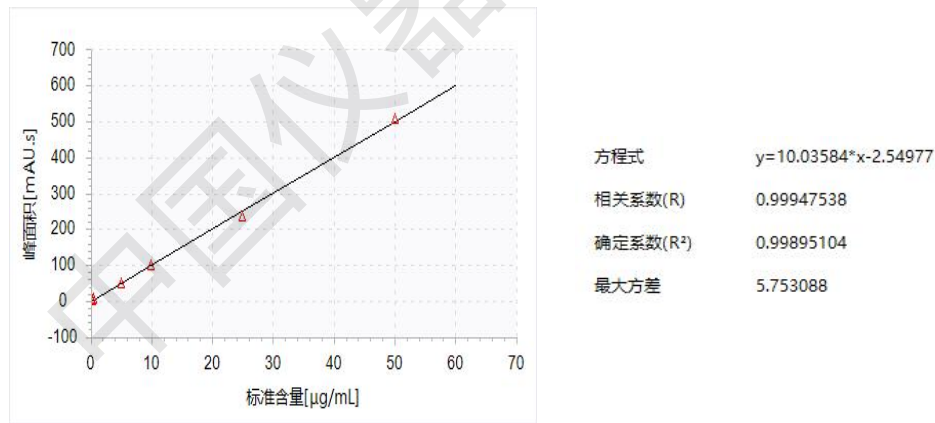
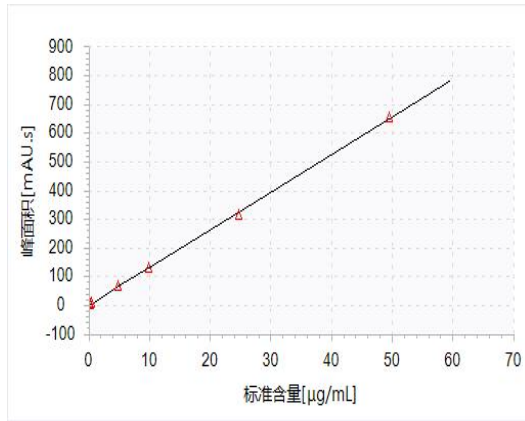


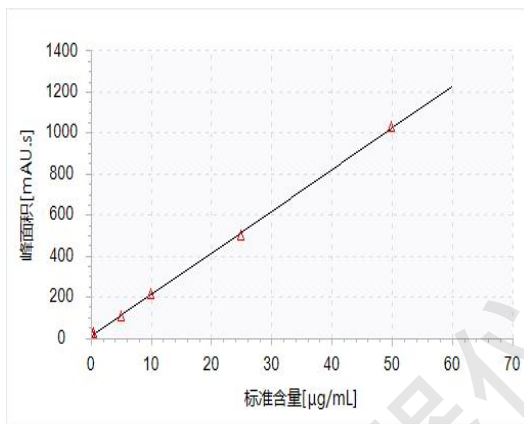
图 4 色胺标准溶液的校准曲线





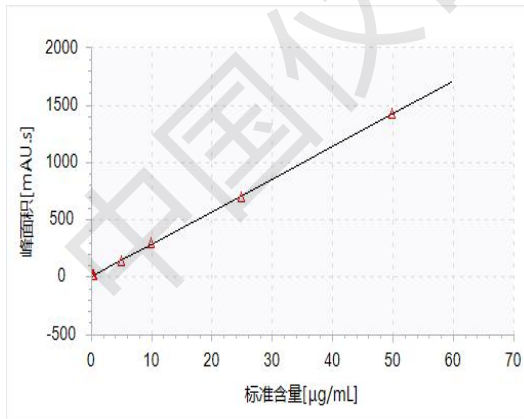
方程式  $y=13.11072*x-1.79417$   
 相关系数(R) 0.99972327  
 确定系数(R<sup>2</sup>) 0.99944662  
 最大方差 5.419375

图 5 苯乙胺标准溶液的校准曲线



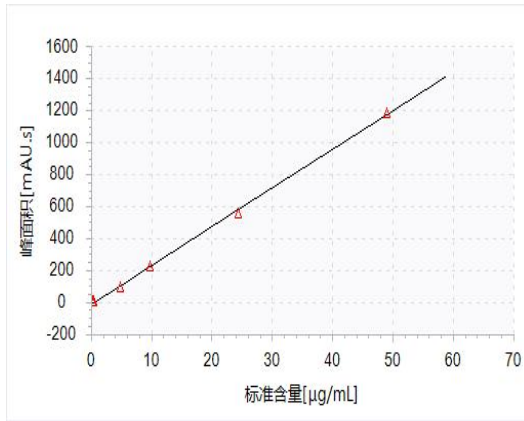
方程式  $y=20.36010*x+4.83297$   
 相关系数(R) 0.99980278  
 确定系数(R<sup>2</sup>) 0.99960560  
 最大方差 7.147301

图 6 腐胺标准溶液的校准曲线



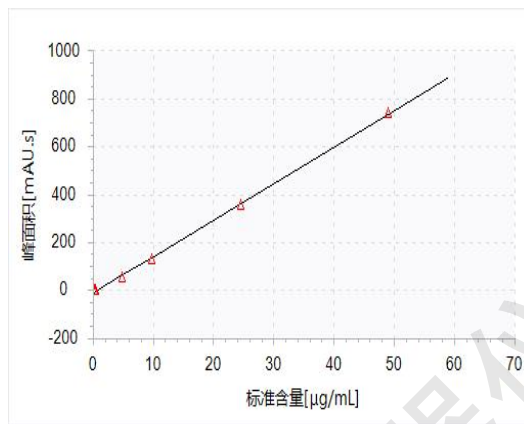
方程式  $y=28.40909*x-2.97167$   
 相关系数(R) 0.99981114  
 确定系数(R<sup>2</sup>) 0.99962232  
 最大方差 9.739581

图 7 尸胺标准溶液的校准曲线



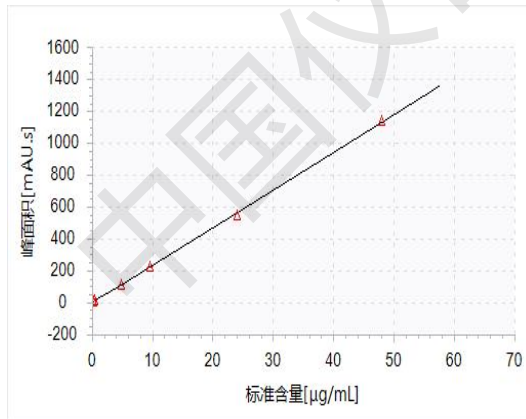
方程式  $y=24.26454*x-17.40294$   
 相关系数(R) 0.99951589  
 确定系数(R<sup>2</sup>) 0.99903201  
 最大方差 13.094347

图 8 组胺标准溶液的校准曲线



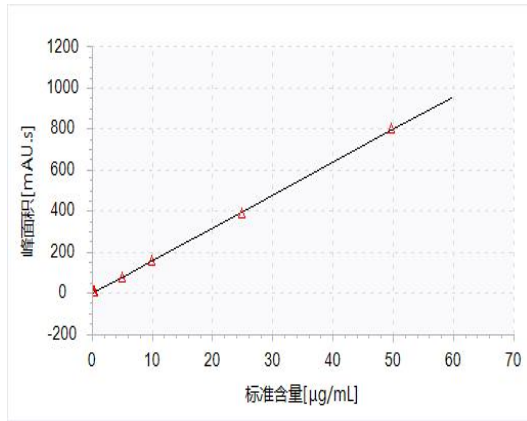
方程式  $y=15.23349*x-14.65049$   
 相关系数(R) 0.99951661  
 确定系数(R<sup>2</sup>) 0.99903345  
 最大方差 8.239721

图 9 章鱼胺标准溶液的校准曲线



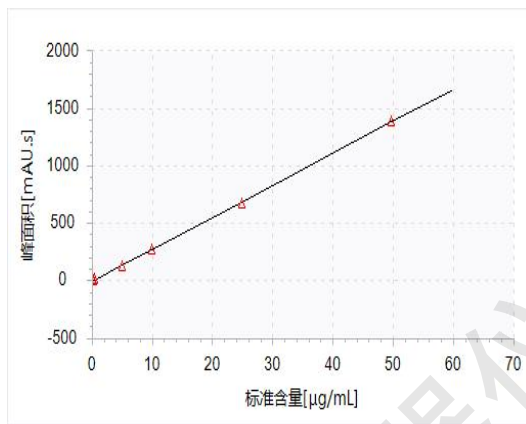
方程式  $y=23.55223*x-4.69354$   
 相关系数(R) 0.99966462  
 确定系数(R<sup>2</sup>) 0.99932935  
 最大方差 10.365083

图 10 酪胺标准溶液的校准曲线



方程式  $y=16.00608*x-3.95228$   
 相关系数(R) 0.99980822  
 确定系数(R<sup>2</sup>) 0.99961648  
 最大方差 5.518521

图 11 亚精胺标准溶液的校准曲线



方程式  $y=27.85361*x-10.09546$   
 相关系数(R) 0.99980209  
 确定系数(R<sup>2</sup>) 0.99960422  
 最大方差 9.755635

图 12 精胺标准溶液的校准曲线

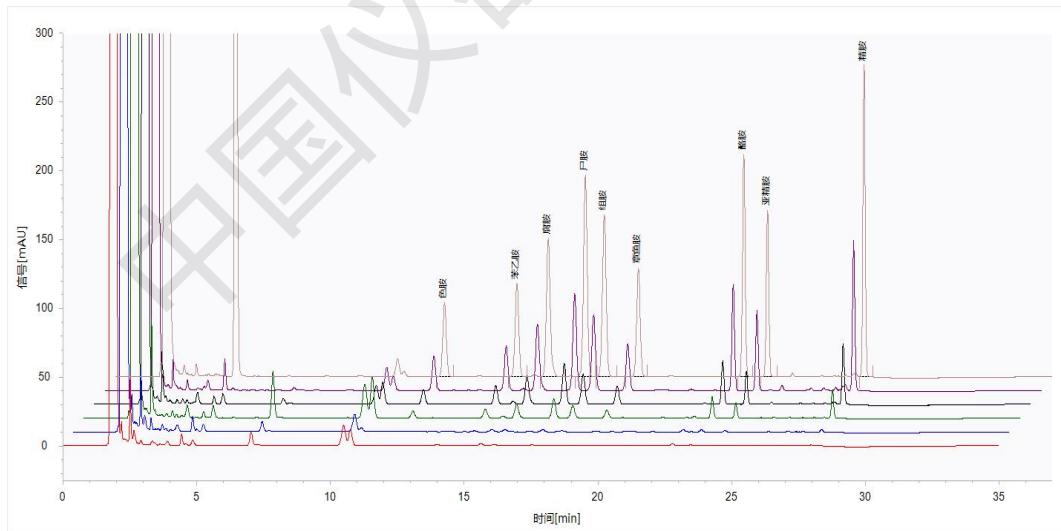


图 13 9 种生物胺标准溶液浓度系列曲线叠加色谱图

#### 4.3.2 样品含量测定

购买鱼粉饲料作为样品，按照 5.1 的流程对样品进行处理，并计算样品中各生物胺的含量。按照公式（1）进行计算，样品的色谱图如图 14 所示。

$$\omega_i = \frac{C \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \quad \text{----公式 (1)}$$

式中： $\omega_i$ ----为样品中生物胺  $i$  的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

$C$ ----为通过校准曲线计算的样品中生物胺  $i$  的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ----为样品的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ----为样品质量，单位为克（g）；

$f$ ----为稀释倍数；

1000----为换算系数。

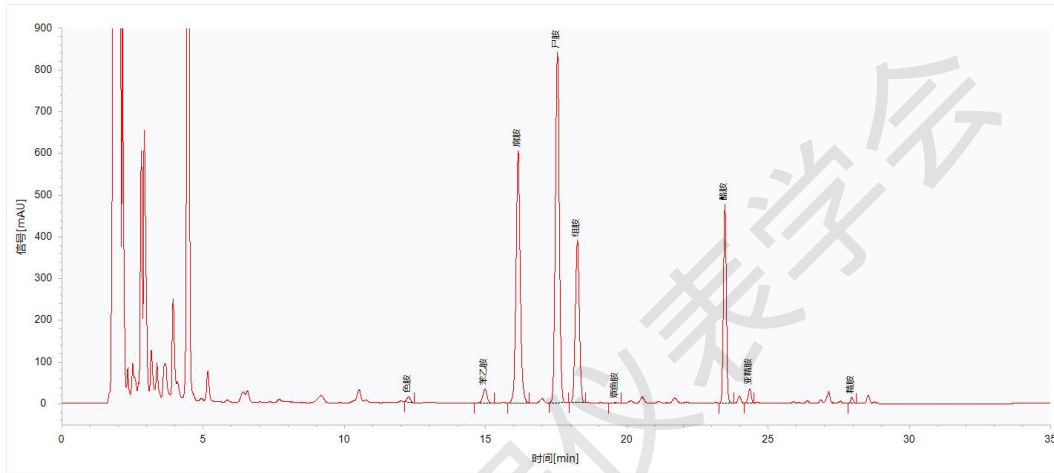


图 14 鱼粉饲料样品的色谱图

经计算，此鱼粉饲料样品中 9 种生物胺的含量详见表 4。

表 4 鱼粉饲料样品中 9 种生物胺的含量

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

## 5 结论

通过对 9 种生物胺的峰型、重复性、灵敏度、线性的测试以及对鱼粉饲料样品中 9 种生物胺的含量进行测定，实验结果表明：用 K2025 测定 9 种生物胺，各个峰的理论塔板数均大于 30000，对称因子在 0.95-1.2 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，9 种生物胺保留时间的 RSD 在 0.024%~0.048% 范围内，峰面积的 RSD 在 0.162%~0.396% 范围内，定性定量均有良好的重复性；9 种生物胺的仪器检出限均不大于  $0.010\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限均不大于  $0.033\mu\text{g/mL}$ ；。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪可以满足《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。

中国仪器仪表表学网