

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4438—2023

畜禽肉中9种生物胺的测定
液相色谱-串联质谱法

Determination of nine biogenic amines in livestock and poultry meat—
Liquid chromatography with tandem-mass spectrometry method

2023-12-22 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国屠宰加工标准化技术委员会(SAC/TC 516)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农产品加工研究所、食药环检验研究院(山东)集团有限公司、赤峰市动物疫病预防控制中心、济南护理职业学院、北京市农产品质量安全中心、安徽省兽药饲料监察所、海南省动物疫病预防控制中心、北京市畜牧总站、苏州市动物疫病预防控制中心、烟台市福山区市场监督管理局、北京英太格瑞检测技术有限公司、济南市历城区综合检验检测中心。

本文件主要起草人：单吉浩、徐迪、吴昊、李芳霞、谢军、刘伟、温雅君、李庆霞、斯琴图雅、杨信、刘发全、李复煌、李建勋、顾津僮、毕言锋、郭维、叶丰、何月新、孙越、杨波、程雪荣、谷玉柱。



畜禽肉中 9 种生物胺的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了畜禽肉中色胺、 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉和鹅肉中色胺、 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的生物胺用 5% 三氯乙酸溶液提取，正己烷除脂，经丹磺酰氯衍生，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，在分析中仅使用分析纯试剂，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。
- 5.1.2 三氯乙酸(CCl_3COOH)。
- 5.1.3 丙酮(CH_3COCH_3): 色谱纯。
- 5.1.4 正己烷(C_6H_{14}): 色谱纯。
- 5.1.5 浓氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 5.1.6 碳酸氢钠(NaHCO_3)。
- 5.1.7 碳酸钠(Na_2CO_3)。
- 5.1.8 氢氧化钠(NaOH)。
- 5.1.9 浓盐酸(HCl): 12 mol/L, 优级纯。
- 5.1.10 丹磺酰氯($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}$): 纯度 > 99%。
- 5.1.11 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOCCH}_3$): 色谱纯。
- 5.1.12 甲酸(HCOOH)。

5.2 溶液的配制

- 5.2.1 三氯乙酸溶液(5%): 称取 10 g 三氯乙酸于 250 mL 锥形瓶中，加 200 mL 水，超声充分溶解。
- 5.2.2 氢氧化钠溶液(1 mol/L): 称取 4 g 氢氧化钠，加 100 mL 水溶解。
- 5.2.3 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液: 称取 18.7 g 碳酸钠以及 1 g 碳酸氢钠于 500 mL 锥形瓶中，加 300 mL

水溶解,用 1 mol/L NaOH 溶液(5.2.2)调节 pH 至 11.5。

5.2.4 丹磺酰氯丙酮溶液(10 mg/mL):准确称取 100 mg 丹磺酰氯于 15 mL 离心管中,加 10 mL 丙酮(5.1.3)溶解,临用现配。

5.2.5 盐酸溶液(0.1 mol/L):在 800 mL 水中加 8.3 mL 浓盐酸(5.1.9),加水至 1 000 mL。

5.2.6 甲酸溶液(0.1%):在 800 mL 水中加 1.0 mL 甲酸(5.1.12),加水至 1 000 mL。

5.3 标准品

9 种生物胺和 2 种同位素内标物标准品:纯度 $\geq 97\%$,中英文名称、CAS 号和分子式见附录 A。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 混合标准储备溶液(10 mg/mL):分别称取各 100 mg(以生物胺的单体计,精确至 0.1 mg)9 种生物胺标准品,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.5)溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成质量浓度为 10 mg/mL 的混合标准储备溶液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准工作溶液(1 mg/mL):准确移取混合标准储备溶液(5.4.1)1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.5)定容,配制成浓度为 1 mg/mL 的混合标准工作溶液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.3 混合同位素内标储备溶液(0.1 mg/mL):分别称取 2 种生物胺同位素内标物标准品 1 mg(精确至 0.1 mg),用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.5)溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的混合同位素内标储备溶液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 6 个月。

5.4.4 混合同位素内标工作溶液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确移取混合同位素内标储备溶液(5.4.3)0.1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液(5.2.5)定容,配制成浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合同位素内标工作溶液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.5 材料

5.5.1 陶瓷均质子。

5.5.2 微孔滤膜:0.22 μm ,有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。

6.2 天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

6.3 pH 计。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 往复式振荡器。

6.6 离心机:转速 $\geq 8\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。

6.7 恒温水浴振荡器。

6.8 氮吹仪。

7 试样的制备与保存

7.1 试样制备

取适量刚屠宰后新鲜的空白供试样品,绞碎,并使均质。

a) 取均质后的供试样品,作为供试试样;

b) 取均质后的空白样品,作为空白试样;

c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的混合标准工作溶液,作为空白添加试样。

7.2 试样保存

$-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取净化

称取 5 g 试样(精确至±0.05 g)于 50 mL 具塞离心管中,加 2 粒陶瓷均质子,加 0.25 mL 混合同位素内标工作溶液(5.4.4)和 15 mL 5%三氯乙酸溶液(5.2.1),加盖涡旋振荡 30 s,用往复式振荡器振荡提取 15 min,于不低于 8 000 r/min 下离心 10 min,上清液转移至 50 mL 容量瓶中。残渣用 15 mL 5%三氯乙酸溶液(5.2.1)重复提取 1 次,合并上清液,混匀,用 5%三氯乙酸溶液(5.2.1)定容至刻度。准确移取上述溶液 10 mL 于 50 mL 具塞离心管中,加 10 mL 正己烷(5.1.4),加盖涡旋振荡 5 min,于不低于 5 000 r/min 离心 5 min。弃去上层有机相,向下层水相中加 10 mL 正己烷(5.1.4)重复提取 1 次,合并下层水相作为待衍生溶液。

8.2 衍生

准确移取 1.0 mL 待衍生溶液,置于 10 mL 具塞离心管中,加 1 mL pH 11.5 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液(5.2.3),涡旋混匀 1 min,加 1 mL 10 mg/mL 的丹磺酰氯丙酮溶液(5.2.4),立即加盖涡旋混匀 1 min 后,置于恒温水浴振荡器上于 60 °C 水浴下避光振荡 15 min。加 0.1 mL 浓氨水(5.1.5),涡旋混匀 30 s,静置 15 min 冷却至室温,加 3 mL 乙酸乙酯(5.1.11)涡旋振荡 1 min,吸取上层有机相于另一 10 mL 具塞离心管中,下层水相用 3 mL 乙酸乙酯(5.1.11)重复提取 1 次,合并 2 次有机相,在 40 °C 水浴下氮气吹干,准确加 1.0 mL 乙腈(5.1.1)溶解残渣,涡旋混匀,过 0.22 μm 滤膜后供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 标准曲线的制备

准确移取混合标准工作溶液(5.4.2)和混合同位素内标工作溶液(5.4.4)适量,用 15 mL 5%三氯乙酸溶液(5.2.1)稀释,配制成生物胺浓度分别为 1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL 和 200 μg/mL(2 种同位素内标浓度均为 5 μg/L)的系列溶液,按照 8.2 步骤进行衍生反应,得到质量浓度为 1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL 和 200 μg/mL 的系列标准溶液(2 种同位素内标浓度均为 5 μg/L),供液相色谱-串联质谱仪测定。以标准物特征离子色谱峰的峰面积与同位素内标物特征离子色谱峰的峰面积比值为纵坐标、相应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准工作曲线,求回归方程和相关系数。

8.4 测定步骤

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 粒径 2.7 μm), 或相当者;
- 流动相: 乙腈(5.1.1)和 0.1%甲酸溶液(5.2.6), 梯度洗脱条件见表 1;
- 流速: 0.3 mL/min;
- 柱温: 30 °C;
- 进样量: 2 μL。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

| 时间, min | 乙腈, % | 0.1%甲酸溶液, % |
|---------|-------|-------------|
| 0.0 | 30 | 70 |
| 1.0 | 30 | 70 |
| 5.0 | 20 | 80 |
| 6.5 | 20 | 80 |
| 7.5 | 100 | 0 |
| 9.0 | 100 | 0 |
| 9.5 | 30 | 70 |
| 11.0 | 30 | 70 |

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- 离子源: 电喷雾离子源(ESI);

- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 毛细管电压:4 000 V;
- d) 离子源温度:200 ℃;
- e) 雾化器压力:40 psi;
- f) 脱溶剂气温度:350℃;
- g) 脱溶剂气流速:氮气 15 L/min;
- h) 监测方式:多反应监测(MRM);
- i) 监测离子对、裂解电压和碰撞能量见表 2。

表 2 9 种生物胺和 2 种同位素内标物的监测离子对、裂解电压和碰撞能量

| 化合物 | 定性离子对 <i>m/z</i> | 定量离子对 <i>m/z</i> | 裂解电压 V | 碰撞能量 eV |
|-------------------|---------------------|---------------------|-----------|------------|
| 色胺 | 394.0>144.0 | 394.0>144.0 | 380 | 50 |
| | 394.0>130.1 | | | 50 |
| β-苯乙胺 | 355.0>156.0 | 355.0>156.0 | 380 | 50 |
| | 355.0>155.0 | | | 50 |
| 腐胺 | 555.0>321.0 | 555.0>321.0 | 380 | 50 |
| | 555.0>170.1 | | | 20 |
| 尸胺 | 569.0>186.0 | 569.0>186.0 | 380 | 50 |
| | 569.0>170.1 | | | 50 |
| 组胺 | 578.0>234.0 | 578.0>234.0 | 380 | 45 |
| | 578.0>170.1 | | | 50 |
| 章鱼胺 | 620.0>234.0 | 620.0>234.0 | 380 | 50 |
| | 620.0>170.1 | | | 50 |
| 酪胺 | 604.3>234.0 | 604.3>234.0 | 380 | 50 |
| | 604.3>170.1 | | | 45 |
| 亚精胺 | 845.2>360.0 | 845.2>360.0 | 380 | 50 |
| | 845.2>170.1 | | | 50 |
| 精胺 | 1 135.0>360.0 | 1135.0>360.0 | 380 | 50 |
| | 1 135.0>170.1 | | | 55 |
| 腐胺-D ₄ | 559.0>325.0 | 559.0>325.0 | 380 | 45 |
| 组胺-D ₄ | 582.0>238.0 | 582.0>238.0 | 380 | 45 |

注:内标以市场上购得的实际同位素内标物为准,腐胺、尸胺、亚精胺和精胺以腐胺-D₄定量,色胺、苯乙胺、组胺、章鱼胺和酪胺以组胺-D₄定量。如果市场上有一一对应的同位素内标物,优先采用。

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下,试样溶液中生物胺的保留时间与标准溶液中生物胺的保留时间相比,偏差应在±2.5%以内,试样溶液中的相对离子丰度应与浓度相当的标准溶液中的相对离子丰度一致,允许偏差应符合表 3 的要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

| 相对离子丰度 | 允许偏差 |
|--------|------|
| >50 | ±20 |
| >20~50 | ±25 |
| >10~20 | ±30 |
| ≤10 | ±50 |

8.4.3.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,按内标法以色谱峰面积定量,定量离子采用丰度

最大的二级特征离子碎片。标准溶液及试样溶液中生物胺与其相应同位素内标物的峰面积比,均应在仪器检测的线性范围内。对于数值超出仪器线性范围的,在提取时根据目标物浓度相应增加同位素内标工作溶液的添加量,使试样溶液稀释后生物胺的浓度在曲线范围之内,对应同位素内标浓度与标准溶液一致。标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B,同位素内标物标准溶液特征离子质量色谱图见附录 C。

8.5 空白试验

取空白试样,除不添加 9 种生物胺外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

多点校准按公式(1)计算,单点校准按公式(2)计算。

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中生物胺含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);
- ρ —— 从标准曲线查得的试样溶液中生物胺质量浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V_1 —— 提取液的体积的数值,单位为毫升(mL);
- V —— 上机前定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_2 —— 衍生化时所用溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)。

$$X = \frac{C_s \times C_{is} \times A_i \times A'_{is} \times V_1 \times V \times 1000}{C'_{is} \times A_s \times A_{is} \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X —— 试样中生物胺含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);
- C_s —— 标准溶液中生物胺浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- C_{is} —— 试样溶液中同位素内标浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A_i —— 试样溶液中生物胺的峰面积;
- A'_{is} —— 标准溶液中同位素内标的峰面积;
- V_1 —— 提取液体积的数值,单位为毫升(mL);
- V —— 上机前定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- C'_{is} —— 标准溶液中同位素内标浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A_s —— 标准溶液中生物胺的峰面积;
- A_{is} —— 试样溶液中同位素内标的峰面积;
- V_2 —— 衍生化时所用溶液体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)。

计算结果扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法的检出限为 10.0 mg/kg,方法定量限为 20.0 mg/kg。

10.2 准确度

本方法在 20.0 mg/kg~100 mg/kg 的添加浓度范围内,回收率为 85%~110%。

10.3 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立的测试结果的绝对差值不大于算术平均值的 15%。

附录 A

(资料性)

9 种生物胺和 2 种同位素内标物的中英文名称、CAS 号和分子式

9 种生物胺和 2 种同位素内标物的中英文名称、CAS 号和分子式见表 A.1。

表 A.1 9 种生物胺和 2 种同位素内标物的中英文名称、CAS 号和分子式

| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | CAS 号 | 分子式 |
|----|-------------------|--|-------------|--|
| 1 | 色胺 | Tryptamine | 61-54-1 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ |
| 2 | β-苯乙胺 | β-Phenylethylamine | 64-04-0 | C ₈ H ₁₁ N |
| 3 | 腐胺 | 1,4-Diaminobutane | 110-60-1 | C ₄ H ₁₂ N ₂ |
| 4 | 尸胺 | 1,5-Diaminopentane | 462-94-2 | C ₅ H ₁₄ N ₂ |
| 5 | 组胺 | Histamine | 51-45-6 | C ₅ H ₉ N ₃ |
| 6 | 章鱼胺 | Octopamine | 104-14-3 | C ₈ H ₁₁ NO ₂ |
| 7 | 酪胺 | Tyramine | 51-67-2 | C ₈ H ₁₁ NO |
| 8 | 亚精胺 | Spermidine | 124-20-9 | C ₇ H ₁₉ N ₃ |
| 9 | 精胺 | Spermine | 71-44-3 | C ₁₀ H ₂₆ N ₄ |
| 10 | 腐胺-D ₄ | 1,4-Sutane-2,2,3,3-D ₄ -diamine dihydrochloride | 88972-24-1 | C ₄ H ₉ Cl D ₄ N ₂ |
| 11 | 组胺-D ₄ | Histamine-α,α,β,β-D ₄ dihydrochloride | 344299-48-5 | C ₅ H ₆ Cl D ₄ N ₃ |

附录 B

(资料性)

色胺、 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺标准溶液特征离子质量色谱图

色胺、 β -苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、章鱼胺、酪胺、亚精胺和精胺标准溶液(1.0 mg/L)特征离子质量色谱图见图 B.1。

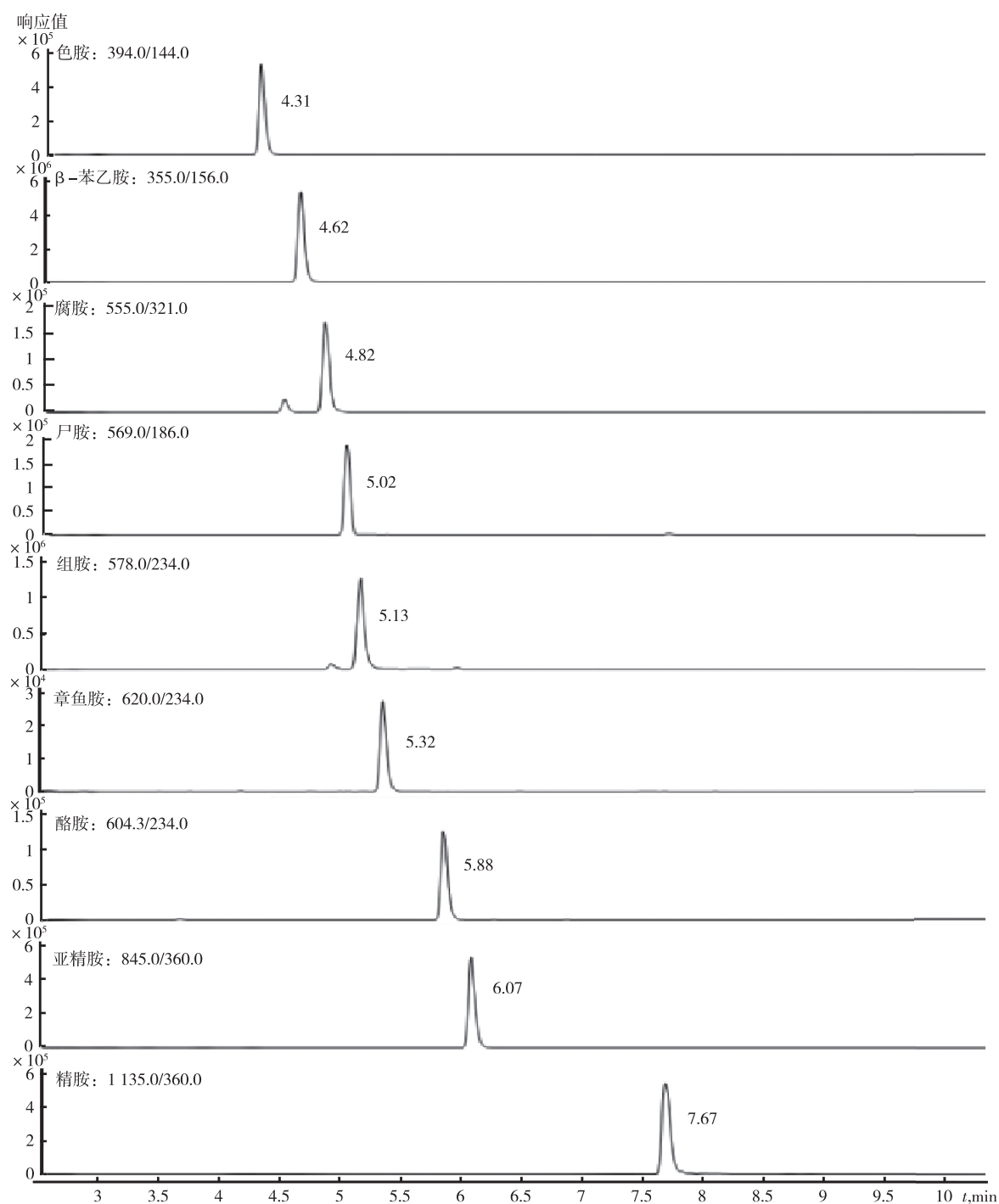


图 B.1 9 种生物胺标准溶液(1.0 mg/L)特征离子质量色谱图

附录 C

(资料性)

组胺-D₄ 和腐胺-D₄ 标准溶液特征离子质量色谱图

组胺-D₄ 和腐胺-D₄ 标准溶液(5 μg/L)特征离子质量色谱图见图 C.1。

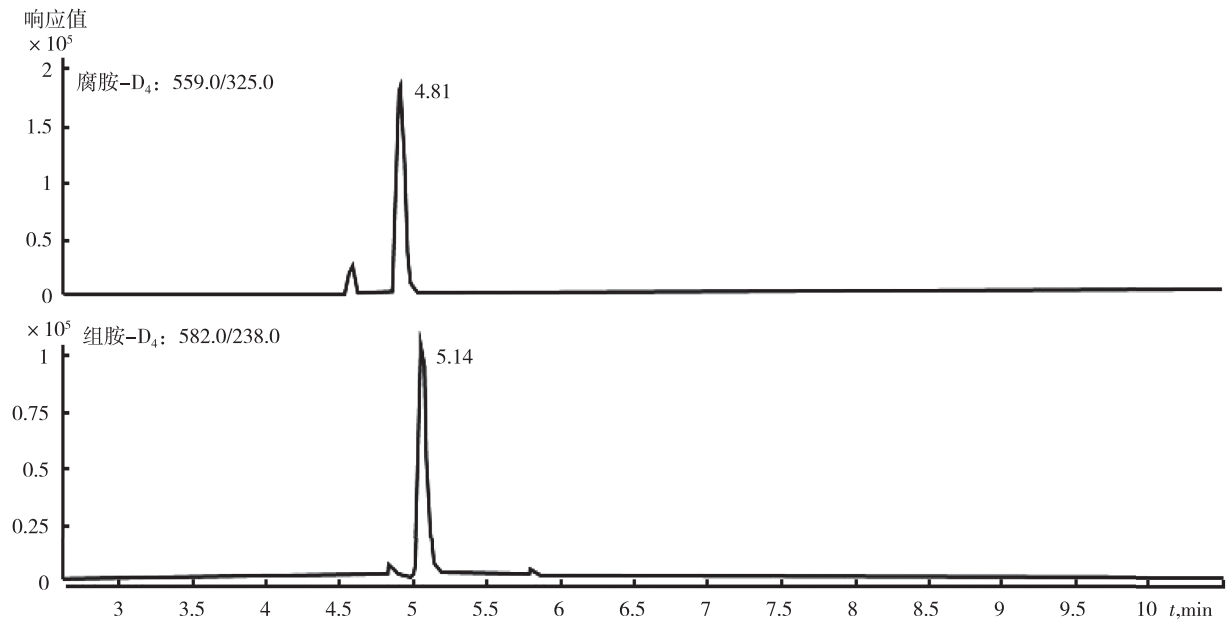


图 C.1 组胺-D₄ 和腐胺-D₄ 标准溶液(5 μg/L)特征离子质量色谱图