

中华人民共和国国家标准

GB/T 21970—2008

水质 组胺等五种生物胺的测定 高效液相色谱法

Water quality—Determination of putrescine, cadaverine, spermidine,
spermine and histamine—High performance liquid chromatography method

2008-06-11 发布

2008-06-11 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、附录 B、附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国科学技术部和中国分析测试协会共同提出。

本标准由全国仪器分析测试标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位：中国医学科学院药物研究所、中国计量科学研究院。

本标准参加起草单位：中国人民解放军军事医学科学院、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所、中国科学院生态环境研究中心、北京理工大学、国家地质实验测试中心、岛津北京分析中心、北京市理化分析测试中心、中国农业科学院、中国地质大学(北京)、中国测试技术研究院。

本标准主要起草人：杜冠华、吕扬、李红梅、王琰、董方霆。

水质 组胺等五种生物胺的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用苯甲酰氯衍生化-高效液相色谱-紫外检测法测定水中腐胺、尸胺、亚精胺、精胺及组胺含量的方法。

本标准适用于水中 2.0 mg/L~40.0 mg/L 的腐胺、尸胺、亚精胺、精胺及组胺的测定。

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—2004 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 6379.2—2004 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

GB/T 12999 水质采样 样品的保存和管理技术规定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

水样 water sample

供实验室检验或测试的未经处理的水。

3.2

试样 treated water

经过衍生化和萃取处理后,供高效液相色谱仪测试用水样。

4 原理

水样经苯甲酰氯衍生化后用乙醚萃取,萃取物经溶剂转换后用高效液相色谱-紫外检测器检测,外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,实验用水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 苯甲酰氯(C_7H_5OCl)。

5.2 乙醚($C_4H_{10}O$)。

5.3 甲醇(CH_4O):色谱纯。

5.4 乙腈(C_2H_3N):色谱纯。

5.5 氯化钠($NaCl$)。

5.6 氮气(N_2):99.99%。

5.7 滤膜:0.45 μm ,水相。

5.8 一次性过滤器: ϕ 13 mm~15 mm,0.45 μm ,有机相。

5.9 氢氧化钠(NaOH)溶液:2.0 mol/L。

称取 4 g 氢氧化钠,用 50 mL 水溶解完全后,混匀。

5.10 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)溶液:0.02 mol/L。

称取 1.54 g 乙酸铵于 1 L 容量瓶中,用水完全溶解,稀释至刻度,经滤膜(5.7)过滤。

5.11 腐胺标准贮备溶液:1.00 mg/mL。

准确称取 0.1827 g 盐酸腐胺($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$,纯度 $\geq 99\%$)准确至 0.0001 g,于 100 mL 容量瓶中,用水溶解完全后,稀释至刻度,混匀。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 3 个月。

5.12 尸胺($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$)标准贮备溶液:1.00 mg/mL。

准确称取 0.1000 g 尸胺(纯度 $\geq 99\%$)准确至 0.0001 g,于 100 mL 容量瓶中,用水完全溶解后,稀释至刻度,混匀。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 3 个月。

5.13 亚精胺($\text{C}_7\text{H}_{19}\text{N}_3$)标准贮备溶液:1.00 mg/mL。

准确称取 0.1000 g 亚精胺(纯度 $\geq 99\%$)准确至 0.0001 g,于 100 mL 容量瓶中,用水完全溶解后,稀释至刻度,混匀。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 3 个月。

5.14 精胺($\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_4$)标准贮备溶液:1.00 mg/mL。

准确称取 0.1000 g 精胺(纯度 $\geq 99\%$)准确至 0.0001 g,于 100 mL 容量瓶中,用水完全溶解后,稀释至刻度,混匀。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 3 个月。

5.15 组胺($\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$)标准贮备溶液:1.00 mg/mL。

准确称取 0.1000 g 组胺(纯度 $\geq 99\%$)准确至 0.0001 g,于 100 mL 容量瓶中,用水完全溶解后,稀释至刻度,混匀。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 3 个月。

5.16 标准工作溶液:使用时配制。

5.16.1 分别移取 10.0 mL 腐胺(5.11)、尸胺(5.12)、亚精胺(5.13)、精胺(5.14)及组胺(5.15)标准贮备溶液,置于 100 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,混匀,获得标准混合溶液。此标准混合溶液 1 mL 含腐胺、尸胺、亚精胺、精胺及组胺各 0.100 mg。

5.16.2 按表 1 分别移取不同体积的标准混合溶液(5.16.1)置于 50 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,混匀。

表 1 标准工作溶液配制

标准混合溶液体积/mL	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00
腐胺、尸胺、亚精胺、精胺、组胺浓度/(mg/L)	2.00	4.00	10.00	20.00	40.00
定容体积/mL	50	50	50	50	50

6 仪器

6.1 高效液相色谱仪,紫外检测器:带梯度洗脱装置。

6.2 色谱柱: C_{18} 色谱柱,或性能相当者。

6.3 液体混匀器(或称涡旋混匀器)。

6.4 恒温水浴箱。

6.5 具塞刻度试管:10 mL。

6.6 分析天平:感量 0.1 mg。

7 样品的制备和保存

7.1 水样保存

水样密封,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,保存期不超过 7 d。

7.2 试样保存

试样密封,于4℃保存,保存期不超过7 d。

8 测定步骤

警告:由于有机生物胺成分可能存在有一定的毒副作用及过敏反应,实施本标准操作时建议配戴口罩和橡胶手套。

8.1 水样的衍生和萃取

8.1.1 移取2.00 mL水样置于10 mL具塞刻度试管(6.5)中,加入1 mL氢氧化钠溶液(5.9)、20 μL苯甲酰氯(5.1),在液体混匀器(6.3)上涡旋30 s,置于37℃水浴(6.4)中振荡,反应时间20 min,反应期间每隔5 min涡旋30 s。

8.1.2 衍生反应完毕后,加入1 g氯化钠(5.5)、2 mL乙醚(5.2),振荡混匀,涡旋30 s,静置。待溶液分层后,用滴管将乙醚层完全移取至10 mL具塞刻度试管(6.5)中,用氮气(5.6)或吸耳球缓缓吹干乙醚,加1.00 mL甲醇(5.3)溶解,再用一次性过滤器(5.8)过滤后,作为高效液相色谱分析用试样。

8.2 不同浓度标准工作溶液的衍生和萃取

8.2.1 移取2.00 mL不同浓度的标准工作溶液分别置于5个10 mL具塞刻度试管(6.5)中,加入1 mL氢氧化钠溶液(5.9)、20 μL苯甲酰氯(5.1),在液体混匀器(6.3)上涡旋30 s充分混匀。

8.2.2 萃取步骤同8.1.2。

8.3 高效液相色谱测定

8.3.1 色谱条件

- a) 色谱柱: C₁₈色谱柱, 5 μm, 4.6 mm×250 mm, 或性能相当者;
- b) 柱温: 室温;
- c) 流动相: A(乙腈), B(0.02 mol/L 乙酸铵)。梯度洗脱条件见表2;
- d) 检测波长: 254 nm;
- e) 进样量: 20 μL。

表2 梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	A(乙腈)/%	B(0.02 mol/L 乙酸铵)/%
0.00	1.0	30	70
5.00	1.0	75	25
10.00	1.0	75	25
15.00	1.0	30	70

8.3.2 液相色谱分析测定

8.3.2.1 仪器的准备

开机,预热,使用流动相冲洗色谱柱,待基线稳定30 min后开始进样。

8.3.2.2 定性分析

利用保留时间定性法。根据腐胺、尸胺、亚精胺、精胺及组胺的标准色谱图(参见附录A)中各物质的保留时间,确定样品中物质。

8.3.2.3 定量分析

校准方法为外标法。

8.3.2.3.1 校准曲线制作

使用衍生化的标准工作溶液(8.2.2)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,分别绘制腐胺、尸胺、亚精胺、精胺及组胺的校准曲线。

8.3.2.3.2 试样测定

使用试样(8.1.2)分别进样,每个试样重复3次,获得每个物质的峰面积。根据校准曲线计算被测试样中腐胺、尸胺、亚精胺、精胺及组胺的含量(mg/L)。

水样中各待测物质的响应值均应在本标准的线性范围内。

注:当试样中某种生物胺的响应值高于本标准的线性范围时,应将水样稀释适当倍数后再进行衍生、萃取和测定。

9 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = f \times c \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——水样中被测物质含量,单位为毫克每升(mg/L);

f——稀释倍数;

c——从标准工作曲线得到试样溶液中被测物质的含量,单位为毫克每升(mg/L)。

10 精密度

本标准精密度数据按照 GB/T 6379.1—2004 和 GB/T 6379.2—2004 规定确定,重复性和再现性值以 95% 的置信度计算,精密度结果应满足表 3 要求。

表 3 水质中五种生物胺含量范围及重复性和再现性方程

成分	水平范围/(mg/L)	重复性限(<i>r</i>)	再现性限(<i>R</i>)
腐胺	2.0~40.0	$r=0.726\ 5+0.250\ 1\ m$	$R=0.908\ 1+0.381\ 4\ m$
尸胺	2.0~40.0	$r=0.090\ 8+0.305\ 4\ m$	$R=0.474\ 6+0.433\ 3\ m$
亚精胺	2.0~40.0	$r=0.008\ 4+0.295\ 1\ m$	$R=0.776\ 6+0.391\ 0\ m$
精胺	2.0~40.0	$r=-0.188\ 6+0.358\ 5\ m$	$R=1.393\ 0+0.609\ 7\ m$
组胺	2.0~40.0	$r=0.333\ 4+0.373\ 1\ m$	$R=0.336\ 9+0.589\ 7\ m$

注: *m* 表示两次测定结果的算术平均值,单位为毫克每升(mg/L)。
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。

精密度实验结果参见附录 B,图示参见附录 C。

11 实验报告

实验报告应包括下列内容:

- a) 鉴别水样、实验室和分析日期等资料;
- b) 遵守本标准规定的程度;
- c) 分析结果及其表示;
- d) 测定中观察到的异常现象;
- e) 对分析结果可能有影响而本部分未包括的操作或者任选的操作。

12 质量控制与质量保证

实验人员、仪器设备、标准物质及水样的采集与保存等应满足如下要求:

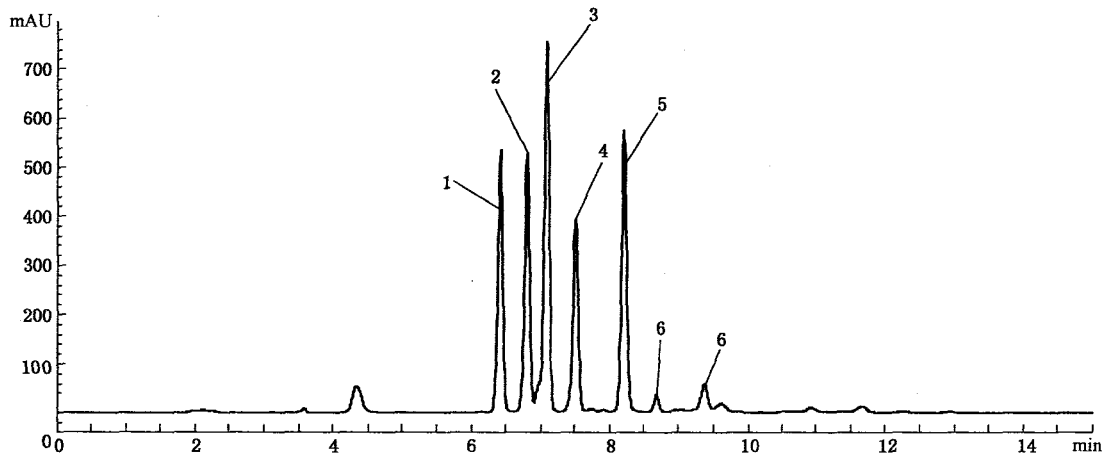
- a) 操作人员应按照国家相关规定,并具备从事相应实验的技术能力;
- b) 仪器应通过检定或校准,在有效使用期内;
- c) 建议采用有证标准物质,若采用自配标样,应使用有证标准物质对自配标样进行验证;
- d) 水样采集和保存应严格执行本标准、GB/T 12999 及国家其他相关规定,实施全过程质量控制和质量保证。

附录 A

(资料性附录)

五种生物胺标准物质衍生物色谱图

五种生物胺标准物质衍生物的色谱图,见图 A.1。



- 1—腐胺;
- 2—尸胺;
- 3—亚精胺;
- 4—精胺;
- 5—组胺;
- 6—反应副产物。

图 A.1 五种生物胺标准物质衍生物的色谱图

附 录 B
(资料性附录)

五种生物胺的精密度实验结果

五种生物胺的精密度实验结果见表 B.1。

表 B.1 五种生物胺精密度实验结果

成 分	样 品	实验结果/(mg/L)			
		理论值	测定结果平均值	重复性限(r)	再现性限(R)
腐胺	1	2.0	2.3	1.3	1.8
	2	15.8	15.4	4.0	7.7
	6	23.7	24.6	6.4	6.4
	3	39.6	40.3	12.6	20.2
尸胺	3	2.0	2.0	0.7	1.4
	2	16.0	15.8	4.7	7.9
	6	23.9	25.0	6.2	6.6
	1	39.9	39.5	15.0	23.6
亚精胺	1	2.1	2.2	0.7	1.7
	4	16.4	15.8	3.7	7.1
	6	25.2	27.0	6.6	8.8
	2	41.0	33.4	13.5	16.6
精胺	4	2.1	2.1	0.6	2.8
	3	16.4	13.8	3.8	8.3
	6	24.6	30.4	6.4	14.8
	1	41.0	43.3	24.1	38.0
组胺	2	2.0	2.1	1.1	1.6
	6	24.1	24.9	9.7	13.2
	3	40.2	35.7	13.5	23.8

附录 C

(资料性附录)

五种生物胺的精密度数据图示

五种生物胺的精密度图示分别见图 C.1~图 C.5,对应的公式见本标准第 10 章。其中 R 表示再现性限, r 表示重复性限。

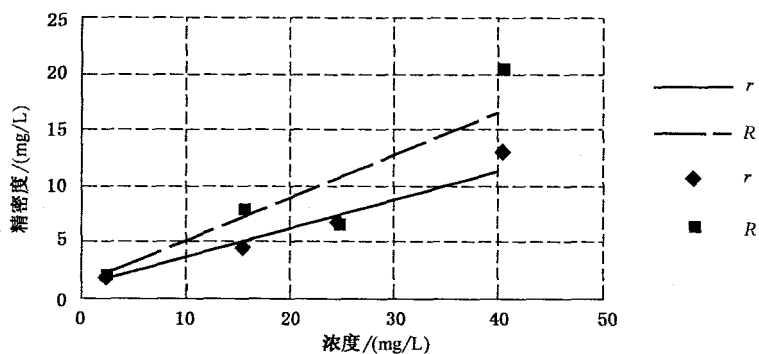


图 C.1 腐胺的精密度数据图示

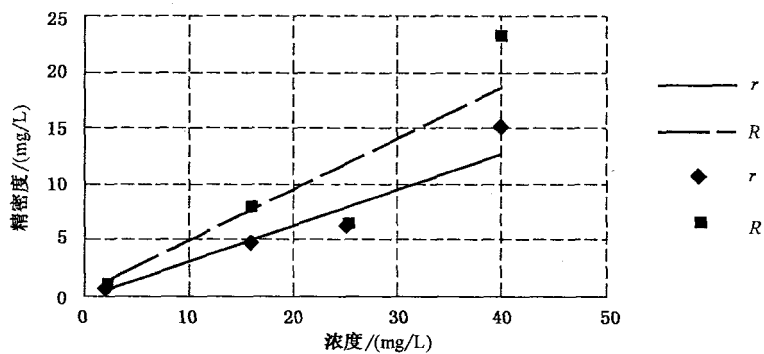


图 C.2 尸胺的精密度数据图示

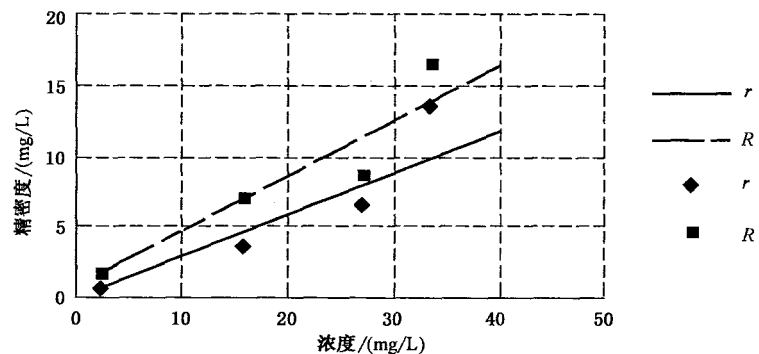


图 C.3 亚精胺的精密度数据图示

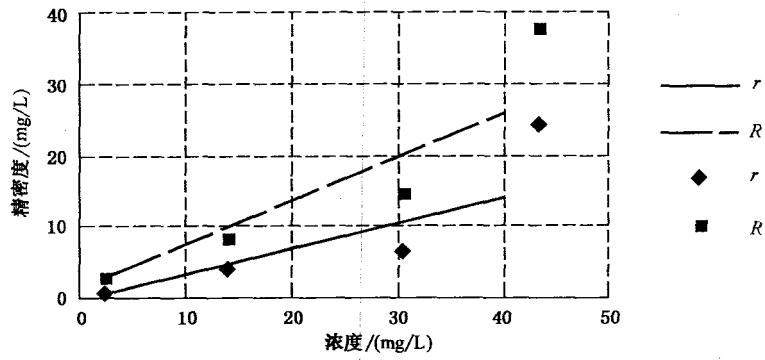


图 C.4 精胺的精密度数据图示

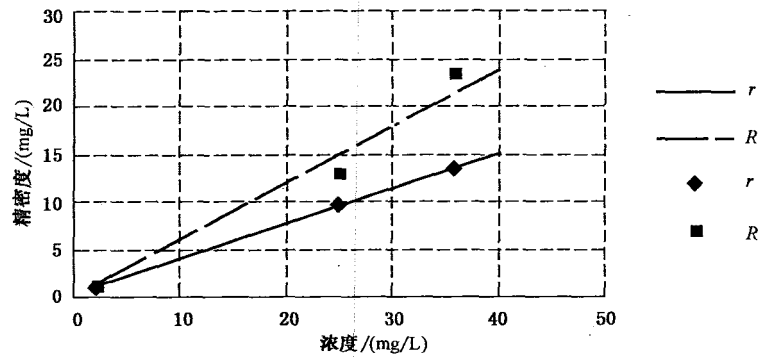


图 C.5 组胺的精密度数据图示
