

### 豆制品中嘌呤的测定 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of purines in bean products

Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

2023-XX-XX 发布

2023-XX-XX 实施

上海市食品学会 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。

本文件中附录A和附录B为资料性附录。

本文件由上海市食品学会提出、归口并组织实施。

本文件起草单位：上海清美绿色食品（集团）有限公司、上海海洋大学、上海天计标准技术服务有限公司、上海清美食品有限公司、上海天智绿色食品有限公司、上海天信绿色食品有限公司、上海天恩绿色食品有限公司、上海清美农业科技有限公司、上海市清美现代农业产业研究院、上海天宣农业科技有限公司。

本文件主要起草人：李立、赵勇、沈沪铭、刘海泉、马新新、杨露露、欧杰、葛春妹、陈婷、杜龙、赵振阳、付行、杨丽。

声明：本文件的知识产权归属于上海市食品学会，未经上海市食品学会同意，不得印刷、销售。任何组织、个人使用本标准开展认证、检验等活动应经上海市食品学会批准授权。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。

本文件首批承诺执行单位：海清美绿色食品（集团）有限公司、上海海洋大学、上海天计标准技术服务有限公司、上海清美食品有限公司、上海天智绿色食品有限公司、上海天信绿色食品有限公司、上海天恩绿色食品有限公司、上海清美农业科技有限公司、上海市清美现代农业产业研究院、上海天宣农业科技有限公司、中国水产科学研究院东海水产研究所、上海德诺产品检测有限公司。

# 豆制品中嘌呤的测定 超高效液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本文件规定了超高效液相色谱-串联质谱法测定腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤的方法原理、试剂和材料、仪器设备、测定步骤、结果计算、检出限、定量限与精密度。

本文件适用于以大豆或杂豆为主要原料，经加工制成的食品的嘌呤总量（包括腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤）的测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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用水方法。

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 方法原理

用甲酸和三氟乙酸混合溶剂水解提取豆制品中的总嘌呤，经 90°C 水浴，冷却，离心取清液，旋蒸至干，90% 乙腈水溶液复溶，经高速离心后过滤膜，用超高效液相色谱串联质谱测定，外标法定量。

## 5 试剂和材料

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

### 5.1 试剂

5.1.1 乙腈（C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N，CAS 号：75-05-8）：高效液相色谱级。

5.1.2 甲酸（CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，CAS 号：64-18-6）：色谱纯。

5.1.3 三氟乙酸 ( $C_2HO_2F_3$ , CAS 号: 76-05-1): 色谱纯。

5.1.4 氢氧化钠 (NaOH, CAS 号: 1310-73-2)。

## 5.2 标准品

5.2.1 腺嘌呤 ( $C_5H_5N_5$ , CAS 号: 73-24-5): 纯度  $\geq 99\%$ 。

5.2.2 鸟嘌呤 ( $C_5H_5N_5O$ , CAS 号: 73-40-5): 纯度  $\geq 99\%$ 。

5.2.3 黄嘌呤 ( $C_5H_4N_4O_2$ , CAS 号: 69-89-6): 纯度  $\geq 99\%$ 。

5.2.4 次黄嘌呤 ( $C_5H_4N_4O$ , CAS 号: 68-94-0): 纯度  $\geq 99\%$ 。

## 5.3 材料

5.3.1 聚四氟乙烯滤膜: 孔径 0.22  $\mu m$ , 有机相。

5.3.2 离心管: 50 mL。

5.3.3 容量瓶: 50 mL 和 100 mL。

5.3.4 样品筛: 孔径 0.4 mm (40 目)。

## 5.4 标准溶液的配制

5.4.1 1 mol/L 氢氧化钠溶液: 称取氢氧化钠 (5.1.4) 4.00 g, 用水溶解并定容至 100 mL。

5.4.2 90%乙腈水溶液: 量取 900 mL 乙腈 (5.1.1) 和 100 mL 水充分混匀。

### 5.4.3 200 mg/L 标准储备溶液

准确称取腺嘌呤 (5.2.1)、鸟嘌呤 (5.2.2)、黄嘌呤 (5.2.3)、次黄嘌呤 (5.2.4) 各 0.01 g, 用 20 mL 水溶解, 于 25°C 下超声助溶, 其中腺嘌呤溶液分两次加入 500  $\mu L$  1 mol/L 氢氧化钠溶液 (5.4.1) 助溶, 鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤溶液各加入 250  $\mu L$  1 mol/L 的氢氧化钠溶液 (5.4.1) 助溶, 用水分别稀释并定容至 50 mL, 于 0~4°C 保存。

### 5.4.4 混合标准工作溶液

分别准确移取 0.5  $\mu L$ 、2.5  $\mu L$ 、5.0  $\mu L$ 、12.5  $\mu L$ 、25.0  $\mu L$ 、40.0  $\mu L$ 、50.0  $\mu L$  的腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤标准储备溶液 (5.4.3), 加入 2.5 mL 甲酸 (5.1.2) 和 2.5 mL 三氟乙酸 (5.1.3), 涡旋混匀后置入 90°C 水浴 15 min, 取出立即冰浴, 12000 r/min 离心 10 min, 取清液, 于 60°C 旋转蒸发器浓缩至近干, 用 10 mL 90% 乙腈水溶液 (5.4.2) 复溶, 超声助溶, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液经聚四氟乙烯滤膜 (5.3.1) 过滤, 得到一系列混合标准工作液 (质量浓度分别为 10  $\mu g/L$ 、50  $\mu g/L$ 、100  $\mu g/L$ 、250  $\mu g/L$ 、500  $\mu g/L$ 、800  $\mu g/L$  和 1000  $\mu g/L$ ), 于 0~4°C 保存。

## 6 仪器设备

- 6.1 超高效液相色谱仪-串联三重四级杆质谱仪：配备电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 电子天平：感量 0.001g 和 0.0001g。
- 6.3 离心机： $\geq 12000$  r/min。
- 6.4 恒温水浴锅：控温精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.5 超声波清洗器。
- 6.6 组织捣碎机。
- 6.7 粉碎机。
- 6.8 涡旋混合器。
- 6.9 旋转蒸发器。
- 6.10 茄型瓶：250 mL。
- 6.11 具塞离心管：50 mL。
- 6.12 样品瓶：2 mL，带聚四氟乙烯旋盖。

## 7 样品制备与保存

- 7.1 固体样品：取有代表性的样品用四分法缩分出至少 200 g，用粉碎机粉碎后过 40 目筛，充分混匀备用，粉碎过程中避免样品过热。分取两份试样，装入清洁容器内，密封并标记。一份作为检样，一份作为留样，于 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 7.2 半固体样品：取有代表性的样品用四分法缩分出至少 200 g，用组织捣碎机充分捣碎，混匀备用，分取两份试样，装入清洁容器内，密封并标记。一份作为检样，一份作为留样，于 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
- 7.3 液体样品：将样品充分混匀均质后，采用虹吸法按上、中、下三层取出至少 200 mL，充分混合后，分取两份试样，装入清洁容器内，密封并标记。一份作为检样，一份作为留样，于 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 8 测定

### 8.1 样品前处理

准确称量 0.20 g 样品于 50 mL 离心管中，加入 2.5 mL 甲酸（5.1.2）和 2.5 mL 三氟乙酸（5.1.3），

涡旋混匀后置入 90°C 水浴 15 min，取出立即冰浴，12000 r/min 离心 10 min，取清液，于 60°C 旋转蒸发器浓缩至近干，用 10 mL 90% 乙腈水溶液（5.4.2）复溶，超声助溶，12000 r/min 离心 10 min，取上清液，经聚四氟乙烯滤膜（5.3.1）过滤，0~4°C 保存待用。

## 8.2 色谱参考条件：

- a) 色谱柱：HILIC 色谱柱（2.1 mm×100 mm，粒径 1.9 μm），或相当者；
- b) 流速：0.30 mL/min；
- c) 流动相：
  - 流动相 A：水；流动相 B：乙腈（5.1.1）；
  - 等度洗脱程序：
    - 流动相 A：流动相 B=10：90（v/v）；
- d) 柱温：30°C；
- e) 进样量：2 μL。

## 8.3 质谱参考条件

- a) 离子化模式：电喷雾电离（ESI）；
- b) 扫描方式：多反应监测（MRM）；
- c) 分辨率：单位质量分辨率；
- d) 其他质谱条件参见附录 A；
- e) 使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求；详细条件参见附录 A；
- f) 毛细管电压、锥孔电压、气帘气压力、碰撞能量等参数应优化至最优灵敏度，参考条件和定性离子对、定量离子对见附录 A。

## 8.4 定性测定

取样品溶液与混合标准工作溶液在相同实验条件下测定，样液中待测物质的保留时间与标准工作溶液中对应的标准物质保留时间偏差在±2.5%之内；在试样谱图中所选择的待测物离子对均出现且相对丰度与标准工作溶液中定性离子的相对丰度允许偏差不超过表 1 规定的范围，即可确定为样液中存在相应的目标化合物。

表 1 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度比（%）	允许的最大偏差（%）
>50	±20

20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

### 8.5 定量测试

采用外标校准曲线法定量测定。

取样品溶液与混合标准工作溶液在相同实验条件下测定，按浓度由低到高进样检测，以定量离子峰面积-浓度绘制标准工作曲线。待测样液中待测分析物的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应稀释后测定。

### 8.6 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

## 9 结果计算与表述

样品中总嘌呤含量（mg/100g）按式（1）计算：

$$X = \frac{C_S \times V}{M} \times 10^{-4} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$X$  ——样品中总嘌呤的含量，单位为毫克每 100 克（mg/100g）；

$M$  ——样品的质量，单位为克（g）；

$V$  ——样品溶液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$C_S$  ——从标准曲线得到的待测组分溶液中四种嘌呤的浓度之和，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）。

$10^{-4}$ ——单位转换系数。

计算结果保留到小数点后两位。

## 10 检出限、定量限和精密度

### 10.1 检出限与定量限

本方法的检出限为 0.1 mg/kg，定量限为 0.5 mg/kg。

### 10.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

## 附录 A

(资料性)

### 质谱仪器参数参考条件

质谱仪器参数参考条件如下：

- a) 电离模式：电喷雾电离 (ESI)；
- b) 检测方式：多反应监测 (Multiple reaction monitoring, MRM)；
- c) 源温：150°C；
- d) 气帘气流量：150 L/Hr；
- e) 脱溶剂气温度：150°C；
- f) 脱溶剂气流量：800 L/Hr；
- g) 锥孔电压：95.5 V；
- h) 碰撞气流量：0.15 mL/min；
- i) 低端分辨率：3.0；
- j) 高端分辨率：15.0；
- k) 雾化气体：氮气。
- l) 质谱测定参数见表 A.1。

表 A.1 四种嘌呤的主要参考质谱参数

名称	保留时间 (min)	电离 方式	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	毛细管电 压 (V)	碰撞能量 (eV)
腺嘌呤 (Adenine)	2.24	ESI+	136.105 > 109.152	136.105 >	3000V	15
			136.105 > 119.180	119.180		15
鸟嘌呤 (Guanine)	2.59	ESI-	149.985 > 108.150	149.985 >	2500V	15
			149.985 > 133.107	133.107		15
黄嘌呤 (Xanthine)	1.61	ESI-	150.974 > 80.257	150.974 >	2500V	15
			150.974 > 108.169	108.169		15
次黄嘌呤 (Hypoxanthine)	1.74	ESI+	137.063 > 110.184	137.063 >	3000V	15
			137.063 > 119.170	119.170		15

**注：**对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

## 附录 B

(资料性)

## 色谱图及总离子流图

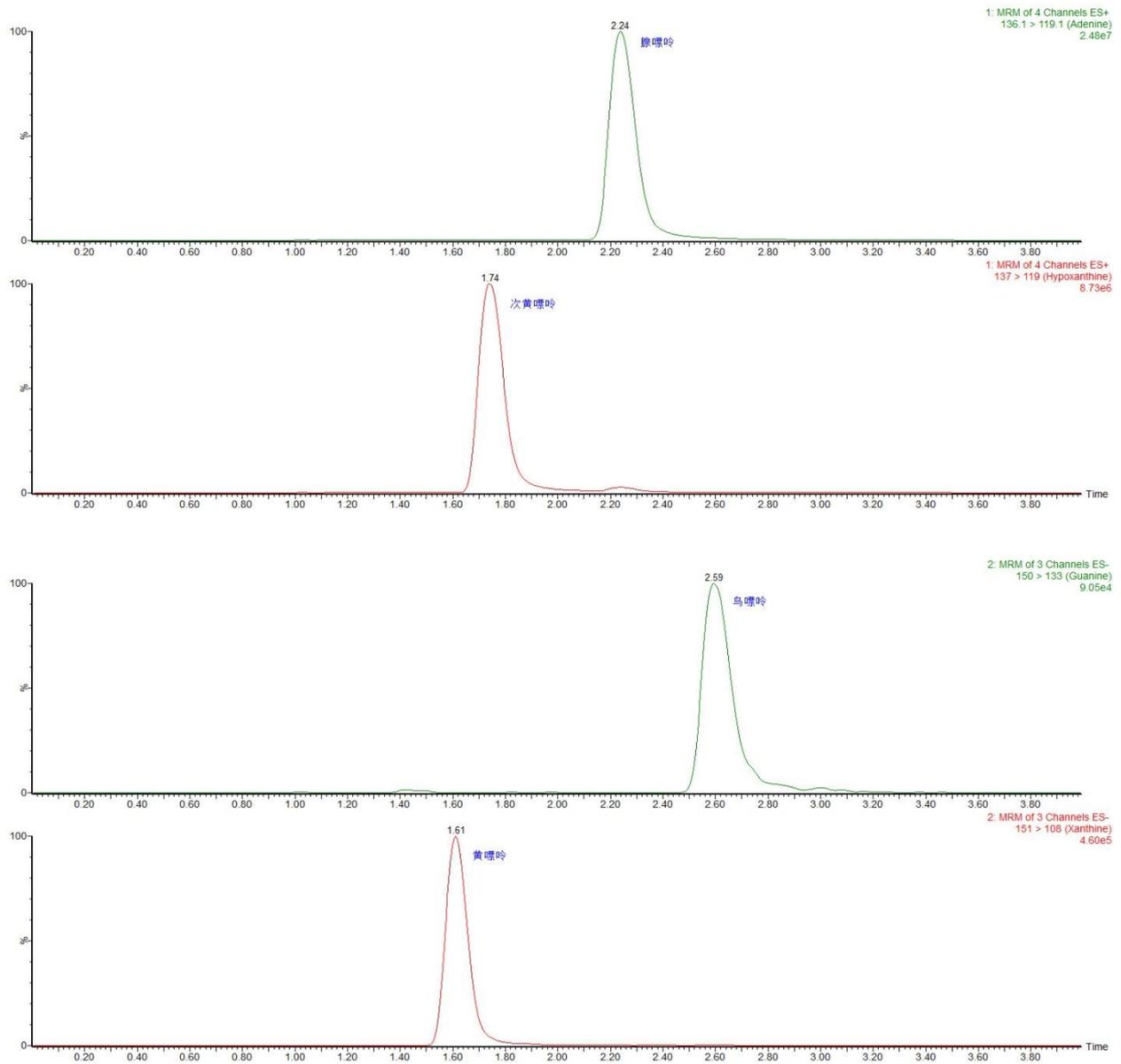
100  $\mu\text{g/L}$  四种嘌呤混合标准物质的多反应检测检测 (MRM) 色谱图见图 B.1。

图 B.1 四种嘌呤混合标准品的多反应监测检测 (MRM) 色谱图

四种嘌呤混合标准品的总离子流图见图 B.2。

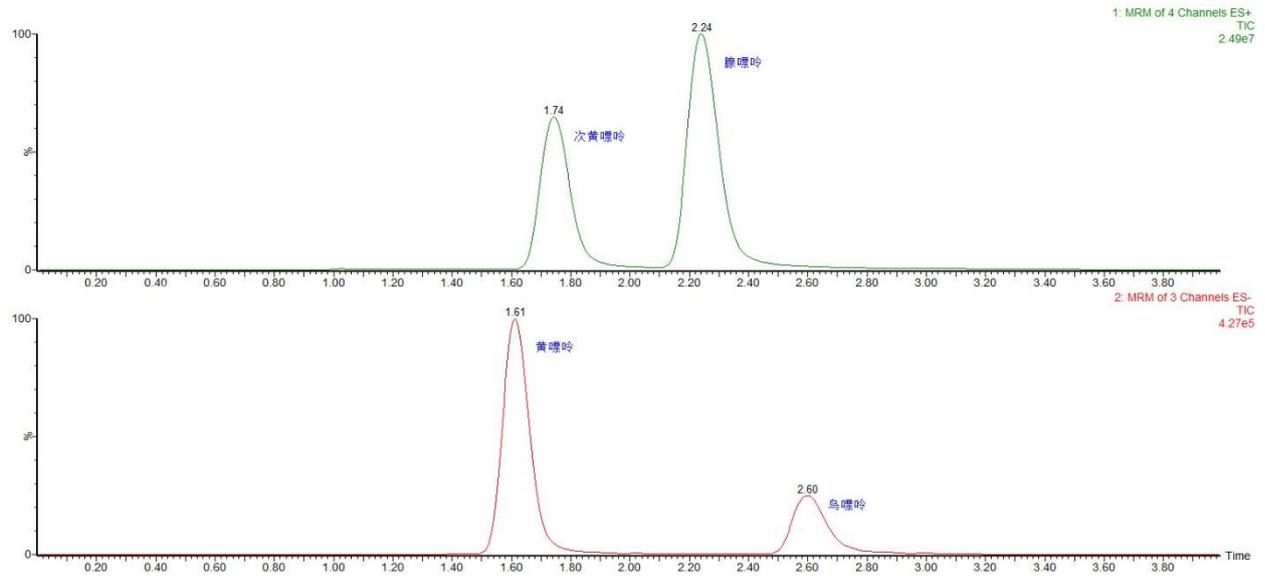


图 B.2 四种嘌呤混合标准品的总离子流图