

ICS 号: *+'\$\$

中国标准文献分类号: L\$

ICS 号: *+'\$\$

中国标准文献分类号: L\$

团 体 标 准

H# %& \$+&\$\$ &+*' %&\$(: ' &+&\$\$

!

8YMa]bU]cb'cZd f]bYg]b VUb'dfcXl Vg]l 'YUdYzcfA UbW]el]X
Wfca Uc[fU\rtHUbXYa 'a Ugg]Mfca Yfm

发布

实施

发布



23072514913386

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。

本文件的某些内容可能涉及专利。

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：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、上海理工大学、上海应用技术大学。

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、样品制备与保存、测定、结果计算、检出限、定量限和精密度。

本文件适用于以大豆或杂豆为主要原料,经加工制成的发酵豆制品和非发酵豆制品中基于四种嘌呤含量(包括腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤)的嘌呤测定。

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四种嘌呤,经100 °C水浴,冷却,离心取上清液,旋蒸至干,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

水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(C_2H_5N): 色谱纯。

5.1.2 甲酸(CH_2O_2): 色谱纯。

5.1.3 三氟乙酸($C_2HO_2F_3$): 色谱纯。

5.1.4 氨水($NH_3 \cdot H_2O$): 优级纯。

5.2 标准品

5.2.1 腺嘌呤($C_5H_5N_5$): 纯度 $\geq 99\%$ 。

5.2.2 鸟嘌呤($C_5H_5N_5O$): 纯度 $\geq 99\%$ 。

5.2.3 黄嘌呤($C_5H_4N_4O_2$): 纯度 $\geq 99\%$ 。

5.2.4 次黄嘌呤($C_5H_4N_4O$): 纯度 $\geq 99\%$ 。

5.3 材料

聚四氟乙烯滤膜: 孔径0.22 μm , 直径13 mm, 有机相。

5.4 溶液的配制

5.4.1 乙腈水溶液(900 mL/L)

量取900.0 mL乙腈（5.1.1）和100.0 mL水充分混匀。

5.4.2 标准储备溶液（200 mg/L）

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（精确至0.01 mg），用20.0 mL水初步溶解，于25 °C下超声助溶，其中鸟嘌呤溶液分三次加入6.0 mL氨水（5.1.4）助溶，腺嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤溶液各加入200.0 μL氨水（5.1.4）助溶，用水分别稀释并用容量瓶定容至50.0 mL，于0 °C~4 °C保存。其中腺嘌呤标准储备溶液的保质期为2天，鸟嘌呤标准储备溶液的保质期为4天，黄嘌呤标准储备溶液现配现用，次黄嘌呤标准储备溶液的保质期为2天。

5.4.3 混合标准工作溶液

用移液枪分别移取0.5 μL、2.5 μL、5.0 μL、12.5 μL、25.0 μL、40.0 μL、50.0 μL的腺嘌呤、鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤标准储备溶液（5.4.2）于15 mL离心管中，加入2.5 mL甲酸（5.1.2）和5.0 mL三氟乙酸（5.1.3），涡旋混匀后置入100 °C水浴15 min，取出立即冰浴30 min，12000 r/min离心10 min，取清液，于60 °C旋转蒸发仪浓缩至近干，准确加入10.0 mL 乙腈水溶液（5.4.1）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）过滤，得到一系列混合标准工作液（质量浓度分别为10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、250 μg/L、500 μg/L、800 μg/L和1000 μg/L），待测。

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0.001 g和0.01 mg。
- 6.3 离心机： ≥ 12000 r/min。
- 6.4 恒温水浴锅：控温精度 ± 2 °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 旋转蒸发仪。

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100.0 g，用粉碎机粉碎均匀后充分混匀备用，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。一份为检样，一份为留样，于0 °C~4 °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100.0 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。一份为检样，一份为留样，于0 °C~4 °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100.0 mL，充分混合后，分取两份试样，装入清洁容器内，密封并标记。一份为检样，一份为留样，于0 °C~4 °C保存。

8 测定

8.1 样品前处理

准确称量0.5 g~2 g样品（精确至0.001 g）置于50 mL离心管中，加入2.5 mL甲酸（5.1.2）和5.0 mL三氟乙酸（5.1.3），涡旋混匀后置入100 °C水浴15 min，取出立即冰浴30 min，12000 r/min离心10 min。若无沉淀产生，取清液收集于250 mL茄形瓶中，于60 °C旋转蒸发仪浓缩至近干；若有沉淀产生，取清液收集于250 mL茄形瓶中，在样品残渣中再加入2.5 mL甲酸和5.0 mL三氟乙酸，重复上述操作，合并酸水解提取液，于60 °C旋转蒸发仪浓缩至近干。准确加入10.0 mL乙腈水溶液（5.4.1）复溶，超声助溶，12000 r/min离心10 min，取上清液1.0 mL，准确加入9.0 mL乙腈水溶液（5.4.1）混匀，经聚四氟乙烯滤膜（5.3）过滤，液相色谱-串联质谱测定。根据需要可进行稀释。

8.2 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

- 色谱柱：HILIC 色谱柱（2.1 mm×100 mm，粒径 1.9 μm），或相当者；
- 流速：0.30 mL/min；
- 流动相：乙腈：水=90：10（v/v）；
- 柱温：30 ℃；
- 进样量：2 μL。

8.3 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 离子化模式：电喷雾电离（ESI）；
- 扫描方式：多反应监测（MRM）；
- 分辨率：单位质量分辨率；
- 其他质谱条件参见附录 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
10~50	±30
≤10	±50

8.5 定量测试

采用外标校准曲线法定量测定，标准曲线应至少保证5个浓度点。

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

样品中各嘌呤含量以质量分数表示，按式（1）计算：

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

式中：

X ——样品中某嘌呤的含量，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某嘌呤的浓度，单位为微克每升（μg/L）；

10^{-4} ——单位转换系数。

样品中的嘌呤含量以四种嘌呤含量的算术加和计。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

各目标化合物的检出限与定量限见图1。

图1 四种嘌呤的检出限及定量限参数

参数	腺嘌呤 (Adenine)	鸟嘌呤 (Guanine)	黄嘌呤 (Xanthine)	次黄嘌呤 (Hypoxanthine)
检出限 mg/100 g	0.002	0.020	0.010	0.001
定量限 mg/100 g	0.050	0.050	0.030	0.050

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) 源温：150 °C；
- b) 气帘气流量：150 L/Hr；
- c) 脱溶剂气温度：150 °C；
- d) 脱溶剂气流量：800 L/Hr；
- e) 碰撞气流量：0.15 mL/min；
- f) 雾化气体：氮气。
- g) 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

化合物	保留时间 (min)	电离方式	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	毛细管电压 (V)	碰撞能量 (eV)
腺嘌呤 (Adenine)	2.24	ESI+	136.1>109.2	136.1>119.2	95.5	3000	15
			136.1>119.2				15
鸟嘌呤 (Guanine)	2.59	ESI-	150.0>108.2	150.0>133.1	95.5	2500	15
			150.0>133.1				15
黄嘌呤 (Xanthine)	1.61	ESI-	151.0>80.3	151.0>108.2	95.5	2500	15
			151.0>108.2				15
次黄嘌呤 (Hypoxanthine)	1.74	ESI+	137.1>110.2	137.1>119.2	95.5	3000	15
			137.1>119.2				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)
总离子流图

100 $\mu\text{g/L}$ 四种嘌呤混合标准品的总离子流图见图B.1。

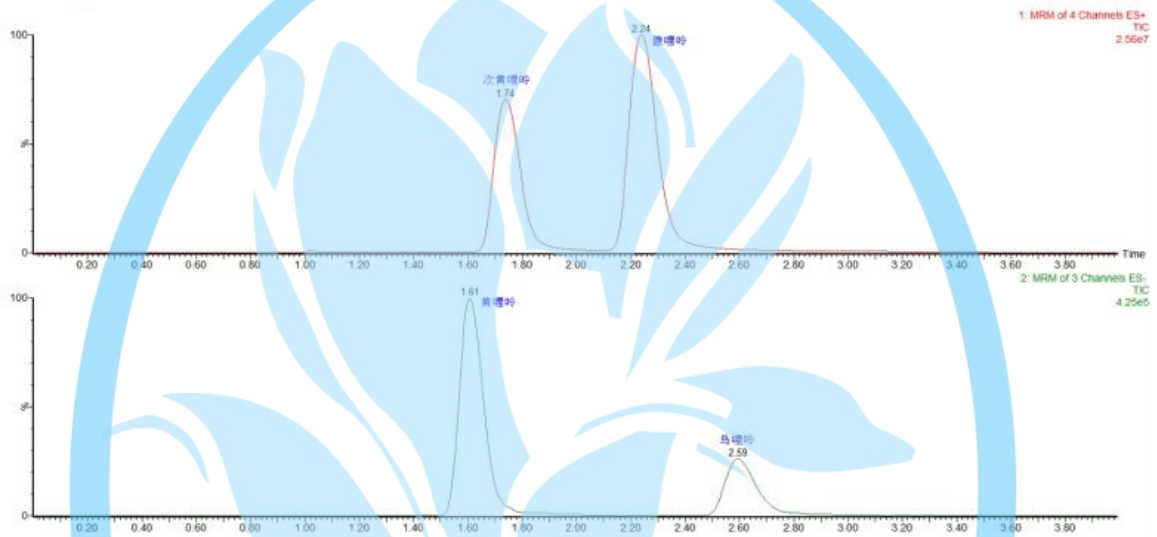


图 B.1 四种嘌呤混合标准品的总离子流图

参 考 文 献

- [1] T/CASME 226—2022 软包装低嘌呤炖汤
- [2] 中国常见植物性食品中嘌呤的含量[J]. 荣胜忠, 邹立娜, 王朝旭, 潘洪志, 杨月欣. 卫生研究. 2012, 41(01)
- [3] Quantitation of Purine in Urine by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Sun Qin. *Methods in Molecular Biology*. 2022. 2546
- [4] Simultaneous quantification of purine and pyrimidine bases, nucleosides and their degradation products in bovine blood plasma by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Charlotte Stentoft, Mogens Vestergaard, Peter Lovendahl, Niels Bastian Kristensen, Jon M Moorby, Søren Krogh Jensen. *Journal of Chromatography A*. 2014. 1356
- [5] Simultaneous analysis of the main markers of nitrogen status in dairy cow's urine using hydrophilic interaction chromatography and tandem mass spectrometry detection[J]. H Boudra, M Doreau, P Noziere, E Pujos-Guillot, D P Morgavi. *Journal of Chromatography A*. 2012. 1256
- [6] Analysis of seven purines and pyrimidines in pork meat products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Clariana M, Gratacós-Cubarsí M, Hortós M, García-Regueiro JA, Castellari M. *Journal of Chromatography A*. 2010. 1217(26)
- [7] Determination and profiling of purines in foods by using HPLC and LC-MS[J]. Inazawa K, Sato A, Kato Y, Yamaoka N, Fukuuchi T, Yasuda M, Mawatari K, Nakagomi K, Kaneko K. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014. 33(4-6)
- [8] Simultaneous determination of purines and uric acid in Chinese chicken broth using TFA/FA hydrolysis coupled with HPLC-VWD[J]. Manli Wu, Wangang Zhang, Xixi Shen, Wei Wang. *Foods*. 2021. 10(11)
- [9] Simultaneous determination of nucleosides and nucleotides in dietary foods and beverages using ion-pairing liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Noriko Yamaoka 1, Yuko Kudo, Katsunori Inazawa, Satoko Inagawa, Makoto Yasuda, Ken-ichi Mawatari, Kazuya Nakagomi, Kiyoko Kaneko. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2010. 878(23)
-