

T B

团体标准

T/ NAIA×××-××××

葡萄酒中游离氨基酸的测定 液相色谱-串联质谱法

×××××-×××××发布

×××××-×××××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020 《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》规定编写。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家葡萄酒检验检测中心（宁夏））、宁夏回族自治区标准化研究院、宁夏化学分析测试协会、宁夏农产品质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人：马桂娟、马雪梅、汤丽华、刘继辉、吴明、吕毅、王鹏、张小飞、葛谦、陈盼盼、王琛、王泽岚。

本文件为首次发布。

葡萄酒中游离氨基酸的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了葡萄酒中游离氨基酸的液相色谱-串联质谱法检测方法。

本文件适用于葡萄酒中游离氨基酸含量的测定和确证。

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实验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经 HILIC Plus 色谱柱分离，液相色谱串联质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，本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 甲酸铵：优级纯。

5.1.2 甲酸：优级纯。

5.1.3 乙腈：色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 20mM 甲酸铵溶液（pH=3）：准确称取 0.126g 甲酸铵用水定容到 100mL，并用甲酸调节 pH 到 3。

5.2.2 甲酸铵-乙腈溶液：取 20mM 甲酸铵溶液(5.2.1)50mL 用乙腈稀释定容至 500mL。

5.2.3 0.1%甲酸水溶液：准确吸取 0.1mL 甲酸用水定容至 100mL。

5.3 标准品

16 种氨基酸混合标准溶液：中文名称、英文名称、缩写、CAS 编号、浓度、相对分子质量等信息见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 氨基酸混合标准储备液：准确吸取氨基酸混合标准溶液（5.3）1.0mL 于 10mL 棕色容量瓶 中用 0.1%甲酸水配制成氨基酸混合标准储备液，4℃保存，有效期三个月。

5.4.2 氨基酸混合标准中间液（1.872~4.53μg/mL）：准确吸取氨基酸混合标准储备液（5.4.1）1.0mL 于 10mL 棕色容量瓶 中用 0.1%甲酸水配制成浓度范围为 1.872~4.53μg/mL 混合标准中间液，4℃保存，有效期一个月。

5.4.3 标准工作液：根据需要，用 0.1%甲酸水（5.2.3）配制适当浓度的标准工作液，临用现配。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源(ESI)。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取原始样品 1kg 在瓷混样桶内充分混匀，将混匀样品置于洁净容器内密封，作为试样。

7.2 试样的提取

称取 10g 葡萄酒样品于 60°C 下挥发酒精后用 0.1% 甲酸水（5.2.3）定容至 50mL 容量瓶中，混匀，过 0.22 μ m 微孔滤膜，用于测定。

7.3 标准曲线

将标准曲线工作液按浓度由低到高的顺序各取 10 μ L 分别注入液质联用仪，以标准曲线工作液的质量浓度为横坐标，以定量离子峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：Agilent ZORBAX HILIC Plus，粒径 3.5 μ m 或性能相当者。
- b) 柱温：40°C。
- c) 流动相：A：20mM 甲酸铵溶液，B：甲酸铵-乙腈溶液；梯度洗脱见表 1。
- d) 流速：0.40mL/min。
- e) 进样量：10 μ L。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流速/ (mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.40	0	100
2.00	0.40	10	90
8.00	0.40	20	80
13.00	0.40	40	60
15.00	0.40	40	60
15.10	0.40	0	100
18.00	0.40	0	100

7.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。
- b) 扫描方式：正离子扫描。
- c) 检测方式：多反应监测（MRM）。
- d) 离子源温度：330°C。
- e) 气体流速：7L/min。
- f) 雾化器压力：45psi。
- g) 鞘气温度：390°C。
- h) 鞘气流速：12L/min。
- i) 毛细管电压：1500V。
- j) 喷嘴电压：0V。
- k) 定性离子对、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量参考值见表 2。

表 2 游离氨基酸的定性离子对、定量离子对、碰撞能量和碎裂电压参考值

化合物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子				
			定量离子 (m/z)	碰撞能量 V	定性离子 (m/z)	碰撞能量 V	碎裂电压 V
苯丙氨酸	7.97	166.1	120.1	13	103	29	80
亮氨酸	8.46	132.1	86.1	9	30.2	17	75
异亮氨酸	8.75	132.1	86.1	9	44.2	25	75
甲硫氨酸	8.68	150.1	104	9	56.1	17	75
缬氨酸	9.71	118.1	72.1	9	55.1	25	70
脯氨酸	11.29	116.1	70.1	17	43.2	37	75
酪氨酸	8.27	182.1	136.1	13	91.1	33	85
丙氨酸	10.81	90.1	44.2	9	45.3	40	40
苏氨酸	10.37	120.1	74.1	9	56.1	17	75
甘氨酸	11.24	76	30.3	12	NA	NA	35
丝氨酸	10.55	106.1	88.1	8	42.2	24	67
谷氨酸	12.37	148.1	84.1	17	130	5	75
天冬氨酸	12.84	134	88.1	9	74	13	70
组氨酸	14.82	156.1	110.1	13	83.1	29	90
精氨酸	14.43	175.1	70.1	24	60.1	12	100
赖氨酸	14.91	147.1	84.1	17	130.1	9	75

7.4.3 定量测定

根据试样溶液中被测物含量情况，选定浓度相近的标准工作溶液，标准工作溶液和待测样液中游离氨基酸的响应值均应在仪器检测的线性范围内。标准溶液及试样溶液均按 7.4.1 和 7.4.2 规定的条件进行测定，游离氨基酸标准品的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 B，采用 0.1%甲酸水溶液配标，外标法定量。

7.4.4 定性测定

如果试样溶液中检出的色谱峰与标准溶液的保留时间相一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，目标化合物的定量离子和定性离子均出现。同时所选择离子的丰度比与标准物质相关离子的相对丰度一致，相似度在允许偏差之内（见表 3），则可判定样品中存在对应的被测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.5 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

8 结果计算和表述

试样中游离氨基酸含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{(C - C_0) \times V}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X—试样中游离氨基酸含量，单位为微克每千克(μg/Kg)；

C-测定溶液浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

C₀-空白溶液浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V-定容体积（mL）；

m-测定溶液质量（g）

9 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

10 定量限

本方法的游离氨基酸的检出限为 0.001mg/L，定量限为 0.005mg/L。

附录 A
(资料性附录)

16 种氨基酸的中文名称、英文名称、缩写、CAS 号、浓度、相对分子质量

16 种氨基酸的中文名称、英文名称、缩写、CAS 号、浓度、相对分子质量见表 A.1。

表 A.1 16 种氨基酸的中文名称、英文名称、缩写、CAS 号、浓度、相对分子质量

序号	中文名称	英文名称	缩写	CAS 编号	浓度 (mg/L)	相对分子质量
1	L-天冬氨酸	L-Aspartic acid	Asp	[56-84-8]	332.9	133.10
2	L-谷氨酸	L-Glutamic acid	Glu	[56-86-0]	368	147.13
3	丝氨酸	L-Serine	Ser	[56-45-1]	263.0	105.09
4	甘氨酸	Glycine	Gly	[56-40-6]	187.2	75.07
5	L-组氨酸	L-Histidine	His	[71-00-1]	388	289.29
6	L-精氨酸	L-Arginine	Arg	[74-79-3]	435	174.20
7	L-苏氨酸	L-Threonine	Thr	[72-19-5]	298.1	119.12
8	L-丙氨酸	L-alanine	Ala	[56-41-7]	222.4	89.09
9	L-酪氨酸	L-Tyrosine	Tyr	[60-18-4]	453	181.19
10	L-缬氨酸	L-Valine	Val	[72-18-4]	292.8	117.15
11	L-甲硫氨酸	L-Methionine	Met	[63-68-3]	373	149.21
12	脯氨酸	Proline	Pro	[147-85-3]	288	115.13
13	L-异亮氨酸	L-Isoleucine	Ile	[73-32-5]	328.3	131.17
14	L-亮氨酸	L-Leucine	Leu	[61-90-5]	327.5	131.17
15	L-苯丙氨酸	L-Phenylalanine	Phe	[63-91-2]	413	165.19
16	L-赖氨酸	L-Lysine	Lys	[56-87-1]	366	146.19

附录 B

(资料性附录)

游离氨基酸标准品的多反应监测 (MRM) 色谱图

游离氨基酸的多反应监测 (MRM) 总离子流图见图 B.1。

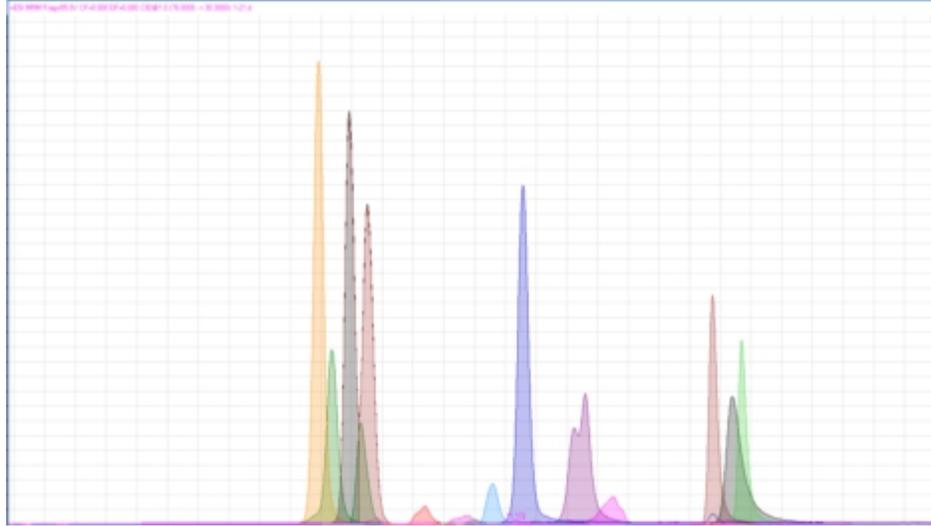


图 B.1 游离氨基酸的多反应监测 (MRM) 总离子流图
