

TB

团体标准

T/NAIAxxx-xxx

枸杞中 18 种游离氨基酸和核苷的 含量测定

液相色谱-质谱联用法

Determination of 18 free amino acids and nucleosides in Wolfberry

Liquid chromatography-mass spectrometry

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 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》的规定起草。

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：宁夏回族自治区药品检验研究院（国家枸杞产品质量检验检测中心（宁夏）），中国科学院兰州化学物理研究所，宁夏农林科学研究院，宁夏回族自治区药品质量控制与评价重点实验室、宁夏回族自治区食品检验研究院。

本文件主要起草人：孙莹、马玲、陈欢、贺凯、撒志明、姜文霞、黄钰馨、臧娅妮、马宗卫、马桂娟、牛艳。

本文件为首次发布。

枸杞中 18 种游离氨基酸和核苷含量的测定

液相色谱-质谱联用法

1 范围

本文件规定了枸杞中 18 种游离氨基酸和核苷类成分含量的液相色谱-质谱联用法。

本文件适用于枸杞子中游离氨基酸和核苷类成分：天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、腺嘌呤、尿嘧啶、肌苷、鸟苷含量的测定，其他枸杞制品中这 18 种游离氨基酸和核苷类含量的测定也可以参考本方法。

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 18 种游离氨基酸和核苷类成分经水超声提取，通过液相色谱-质谱联用仪检测，外标法定量。

5 试剂与材料（再确定）

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 乙腈（CH₃CN）：质谱纯。

5.2 甲酸（CH₂O₂）：质谱纯。

5.3 标准品：L-天冬氨酸（CAS 号：56-84-8,）、苏氨酸（CAS 号：72-19-5, 99.9%）、丝氨酸（CAS 号：56-45-1, 100.0%）、谷氨酸（CAS 号：56-86-0, 99.9%）、甘氨酸（CAS 号：56-40-6, 100.0%）、丙氨酸（CAS 号：56-41-7, 99.9%）、缬氨酸（CAS 号：72-18-4, 99.8%）、甲硫氨酸（CAS 号：63-68-3, 100.0%）、L-异亮氨酸（CAS 号：73-32-5, 99.8%）、亮氨酸（CAS 号：61-90-5, 99.9%）、苯丙氨酸（CAS 号：63-91-2, 100.0%）、组氨酸（CAS 号：71-00-1, 99.9%）、L-赖氨酸（CAS 号：56-87-1, 99.1%）、精氨酸（CAS 号：74-79-3, 100.0%）、肌苷（CAS 号：58-63-9, 99.2%）、尿嘧啶（CAS 号：66-22-8, 99.6%）、腺嘌呤（CAS 号：73-24-5, 100.0%）、鸟苷（CAS 号：118-00-3, 88.6%）。以上标准物质均为经国

家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 单标储备溶液

精密称取适量的氨基酸、核苷对照品，用水溶解并分别配置成 2mg/mL 的天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、肌苷、鸟苷单标储备液及 1mg/mL 的腺嘌呤、尿嘧啶单标储备液，2-8℃下保存。

5.4.2 混合标准工作溶液

分别精密量取 5.4.1 项下的单标储备溶液，用水溶解并稀释制成含天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、肌苷、鸟苷 20μg/mL,含腺嘌呤、尿嘧啶 10μg/mL 的溶液，作为混合标准储备溶液，2-8℃下保存。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱-质谱联用仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量（0.00001g、0.000001mg）。

6.3 超声波清洗器。

6.4 高速粉碎机。

6.5 离心机：12000rpm/min。

6.6 超纯水机。

6.7 涡旋振荡器。

6.8 0.22μm 滤膜，有机相。

7 分析步骤

7.1 试样的制备

枸杞样品于-18℃冷冻冰箱中保存。试验时将枸杞样品取出，用高速万能粉碎机（可加少量的液氮）粉碎（30 g 样品粉碎时间为 30 s），分别置于样品瓶中，-18℃冷冻备用。

7.2 试样的提取

准确称取试样 0.5 g（精确至 0.1mg），置具塞的 50ml 离心管中，精密加入超纯水 40 mL，密塞，称定重量，涡旋混合 1 min，50℃超声提取 30 min，用超纯水补足减失的重量，摇匀，12000 rpm/min 离心 10 min，上清液用 0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液待上机测定。

7.3 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: Wates Atlantis™ T3 色谱柱, 2.1×150mm, 粒径 3μm, 或相当者;
- b) 柱温: 40 °C;
- c) 流动相: A 相为 0.2%甲酸-水, B 相为 0.2%甲酸-乙腈, 流动相梯度条件见表 1。
- d) 流速: 0.2 mL/min;
- e) 进样量: 2 μL。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	98	2
0.5	98	2
6.0	88	12
6.1	40	60
7.0	40	60
10.0	98	2
11.0	98	2

7.4 质谱参考条件

- a) 离子源类型: 电喷雾离子源;
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 电喷雾电压: 5500V;
- d) 离子源温度: 550°C;
- e) 喷雾气流速: 55 L/h;
- f) 气帘气流速: 55 L/h
- g) 多反应检测: 18 种氨基酸和核苷的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数见表 2。

表 2 多反应离子检测质谱参数

化合物	保留	母离子	子离子	去簇电压
-----	----	-----	-----	------

	时间 (min)		定量离子	碰撞能量 (V)	定性离子	碰撞能量 (V)	(V)
天冬氨酸	1.97	134.0	88.1	13	74.0	17	62
苏氨酸	1.98	120.1	74.1	16	56.1	32	65
丝氨酸	1.92	106.1	88.1	11	42.2	33	59
谷氨酸	1.99	148.1	84.1	32	130.0	13	15
甘氨酸	1.90	76.0	30.3	33	/	/	57
丙氨酸	1.95	90.1	43.9	13	/	/	60
缬氨酸	2.44	118.1	72.1	34	55.1	14	65
甲硫氨酸	3.32	150.1	104	14	56.1	35	62
异亮氨酸	4.85	132.1	86.1	12	44.2	35	55
亮氨酸	5.27	132.1	86.1	12	30.2	37	50
苯丙氨酸	7.17	166.1	120.1	32	103.0	35	79
组氨酸	1.67	156.1	110.1	20	83.1	35	106
赖氨酸	1.64	147.1	84.1	18	130.1	14	42
精氨酸	1.68	175.1	70.1	31	60.1	18	42
腺嘌呤	2.35	136.1	119.0	28	92.0	38	122
尿嘧啶	3.37	113.0	70.0	21	96.0	25	100
肌苷	5.82	269.2	137.1	28	152.0	24	54
鸟苷	5.67	284.3	152.0	32	135.0	50	52

7.5 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中游离氨基酸和核苷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 8.1 及 8.2 规定的条件进行测定,游离氨基酸和核苷标准品的多反应检测 (MRM) 色谱图参见附录 A。

7.6 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都一致,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%

8 结果计算和表述

试样中游离氨基酸和核苷含量按式（1）进行计算：

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

式中：

X-试样中游离氨基酸和核苷含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C-测定溶液浓度，单位为 μg/mL；

V-提取液体积的数值，单位为毫升（mL）；

m-试样的称样量，单位为克（g）。

9 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与其算数平均值的比值（百分率），应符合附录 B 的要求。

附录 A

18 种游离氨基酸和核苷多反应检测 (MRM) 质量色谱图

18 种游离氨基酸和核苷类成分多反应检测 (MRM) 质量色谱图见图 A.1。

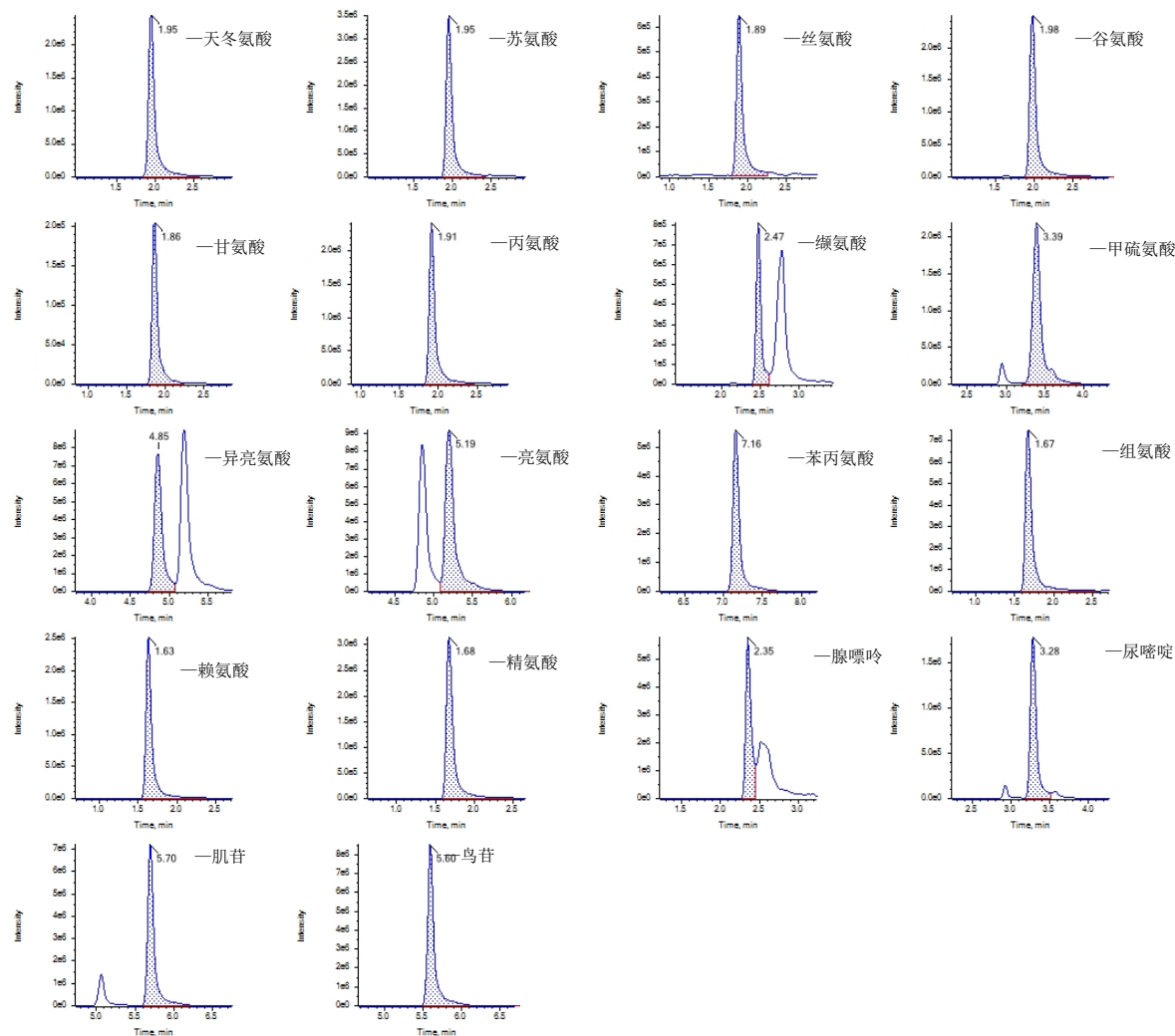


图 A.1 18 种游离氨基酸和核苷类成分多反应检测 (MRM) 质量色谱图

附录 B

(规范性)

实验室内重复性要求

实验室内重复性要求，见表 B.1。

表 B.1 实验室内重复性要求

被测组分含量 mg/kg	精密度 (RSD) %
$>0.01\leq0.1$	≤20
$>0.1\leq1$	≤15
>1	≤10