

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4355—2023

农产品及其制品中嘌呤的测定 高效液相色谱法

Determination of purines in agricultural products and derived products—
high performance liquid chromatography

2023-04-11 发布

中华人民共和国农业农村部

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部农产品质量安全监管司提出。

本文件由农业农村部农产品营养标准专家委员会归口。

本文件起草单位：农业农村部食物与营养发展研究所、北京市营养源研究所有限公司、内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司、大连工业大学、北京城市学院、北京工商大学、北京林业大学、中国合格评定国家认可委员会、北京市理化分析测试中心、北京市农林科学院农产品加工与食品营养研究所、北京东方倍力营养科技有限公司、湛江市食品药品检验所、检科测试集团有限公司、安徽国泰众信检测技术有限公司。

本文件主要起草人：朱大洲、崔亚娟、白沙沙、孔凡华、郭倩、罗欣、梁敏慧、马利军、李雪晶、刘伯扬、杜明、田荣荣、李赫、孟冬、杨清、李宏、贾丽、刘光敏、蒋峰、蒋彤、高平、乐粉鹏、何涛。



农产品及其制品中嘌呤的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了农产品及其制品中嘌呤的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于农产品及其制品中嘌呤(次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤和腺嘌呤)含量的测定。

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

嘌呤化合物在高温条件下经三氟乙酸甲酸溶液水解形成游离态嘌呤,经反相色谱柱分离,紫外检测器或二极管阵列检测器检测,保留时间定性,外标法定量。

5 试剂和材料

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 氢氧化钠(NaOH)。

5.1.2 三氟乙酸(CF_3COOH)。

5.1.3 甲酸(HCOOH)。

5.1.4 磷酸(H_3PO_4)。

5.1.5 磷酸二氢钾(KH_2PO_4):优级纯。

5.1.6 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 10 mmol/L 氢氧化钠溶液:称取氢氧化钠(5.1.1)0.04 g,用水溶解并定容至 100 mL,混匀。

5.2.2 试样提取溶液:量取三氟乙酸(5.1.2)45 mL,甲酸(5.1.3)45 mL,加水定容至 100 mL,混匀。

5.2.3 10%磷酸溶液:取磷酸(5.1.4)10 mL,用水稀释定容至 100 mL,混匀。

5.2.4 5 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(pH 3.8):称取磷酸二氢钾(5.1.5) 0.952 g,加水 900 mL 溶解,加水定容至 1 L,混匀,用磷酸溶液(5.2.3)调节 pH 至 3.8。

5.3 标准品

5.3.1 次黄嘌呤($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$,CAS 号:68-94-0):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2 黄嘌呤($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$,CAS 号:69-89-6):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.3 鸟嘌呤($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$,CAS 号:73-40-5):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.4 腺嘌呤($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$,CAS 号:73-24-5):纯度 $\geq 98\%$,或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 嘌呤混合标准储备溶液：分别准确称取次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤、腺嘌呤各 10 mg（精确至 0.01 mg）于烧杯中，用 10 mmol/L 的氢氧化钠溶液（5.2.1）溶解并转移至 100 mL 容量瓶，定容，即为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤混合标准储备溶液，标准储备溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，不超过 6 个月。

5.4.2 嘌呤混合标准工作溶液：量取嘌呤混合标准储备溶液 1 mL 用磷酸二氢钾溶液（5.2.4）稀释定容至 10 mL 后，分别量取 0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1 mL、5 mL、10 mL，用磷酸二氢钾溶液（5.2.4）稀释定容至 10 mL，即得到浓度分别为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤混合标准工作液，或根据需要配制其他浓度，现用现配。

5.5 材料

微孔滤膜：水相滤膜或尼龙滤膜，0.45 μm 。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 天平：感量 0.0001 g 和 0.000 01 g。

6.3 粉碎机。

6.4 匀浆机。

6.5 恒温水浴锅。

6.6 pH 计。

6.7 旋转蒸发仪。

7 试样制备与保存

试样取可食部经匀浆机匀浆或粉碎机粉碎均匀后，储存于样品瓶中备用。所制备试样于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

8 分析步骤

8.1 试样提取

称取试样 0.5 g~5 g（精确至 0.000 1 g）于具塞磨口三角瓶中，加入 10 mL 试样提取溶液（5.2.2），涡旋混匀，于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min，取出后冷却至室温。转移至 50 mL 容量瓶，定容至刻度，混匀后滤纸过滤。吸取 2 mL 滤液，旋转蒸发至近干，用 2 mL 磷酸二氢钾溶液（5.2.4）溶解，过 0.45 μm 滤膜备用。根据需要可进行稀释。

8.2 试样测定

8.2.1 色谱参考条件

8.2.1.1 色谱柱：AQ 色谱柱（250 mm \times 4.6 mm，5 μm ）或性能相当者。

8.2.1.2 流动相：甲醇（5.1.6）与磷酸二氢钾溶液（5.2.4）比例为 1：99，等度洗脱。

8.2.1.3 流速：1.0 mL/min。

8.2.1.4 进样量：10 μL 。

8.2.1.5 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ 。

8.2.1.6 测定波长：254 nm。

8.2.2 标准曲线的制作

将系列嘌呤混合标准工作溶液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以各嘌呤标准工作溶液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤和腺嘌呤混合标准溶液的液相色谱图见附录 A。

8.2.3 试样测定

试样溶液经高效液相色谱仪分析,测得试样溶液中各嘌呤的峰面积,外标法定量。

8.3 结果计算

试样中次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤和腺嘌呤含量以质量分数表示,分别按公式(1)计算。

$$\omega_i = \frac{\rho_i \times V}{m} \times f \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ω_i ——试样中嘌呤含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ_i ——从标准曲线上得到的试样溶液中各嘌呤质量浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——试样称样量的数值,单位为克(g);

f ——试样溶液稀释倍数。

以 2 次测定结果的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

试样中嘌呤含量为次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤和腺嘌呤含量的总和。

以 2 次测定结果的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字。

9 精密度

9.1 重复性

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 10%。

9.2 再现性

在再现性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的 10%。

10 其他

当称样量为 5 g、定容体积为 25 mL 时,次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤和腺嘌呤检出限均为 0.5 mg/kg,次黄嘌呤、黄嘌呤、鸟嘌呤和腺嘌呤定量限均为 1.5 mg/kg。

附 录 A

(资料性)

4 种嘌呤标准工作溶液的液相色谱图

4 种嘌呤标准工作溶液的液相色谱图见图 A.1。

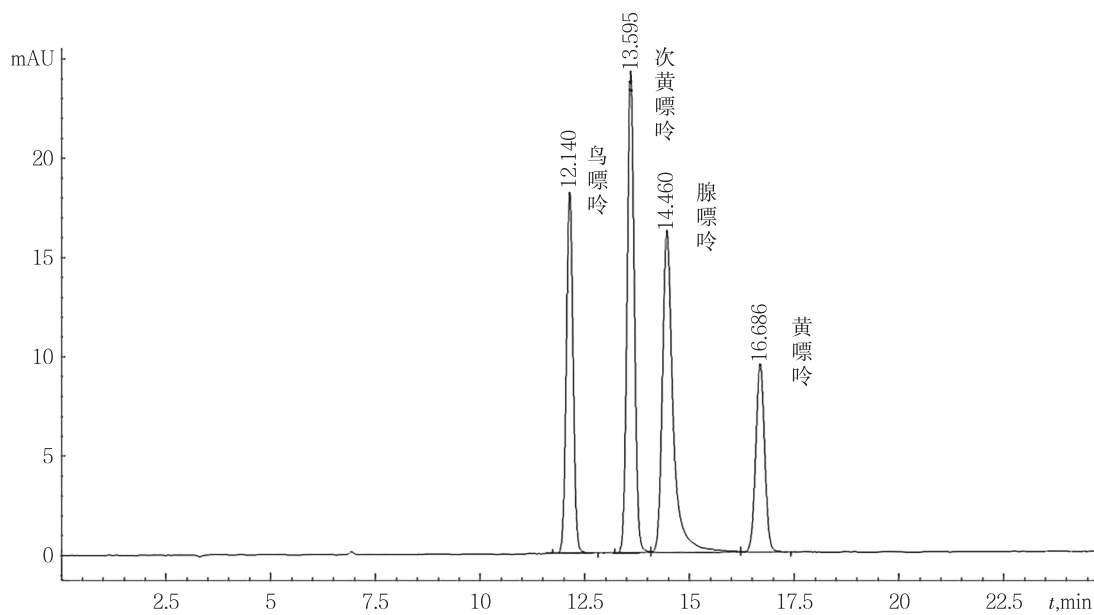


图 A.1 4 种嘌呤标准工作溶液 (5 µg/mL) 的液相色谱图