ICS 01.040.65
CCS B 04

TB

团 体 标 准

T/ NAIA×××-××××

食用菌中游离氨基酸的测定 液相色谱-质谱联用法

Determination of free amino acids in edible fungi

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2023-××-××发布 2023-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 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：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所，宁夏农林科学院园艺研究所。

本文件主要起草人：赵子丹、牛艳、王晓静、李冬、王晓菁、陈翔、闫玥、王海霞、吴燕、石欣、开建荣、王彩艳、刘霞、杨静、张锋锋。

本文件为首次发布。

食用菌中游离氨基酸的测定

液相色谱-质谱联用法

1 范围

本文件规定了食用菌中游离氨基酸的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本文件适用于食用菌中游离氨基酸的液相色谱-质谱/质谱法测定。

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 原理

试样用甲醇溶液超声提取，通过液相色谱-质谱联用仪检测，外标法定量。

4 试剂与材料

除非另有规定外，所有试剂均为分析纯，水符合GB/T 6682中规定的一级水。

4.1 甲醇（CH_4O）：色谱纯。乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

4.2 甲酸（CH_2O_2）：色谱纯。

4.3 50%甲醇溶液（50+50，体积比）：量取 50 mL 水加入 50 mL 甲醇中，混匀。

4.4 0.1%甲酸溶液（体积分数）。

4.5 氨基酸标准品：蛋氨酸 Met（CAS 号 63-68-3）、甘氨酸 Gly（CAS 号 56-40-6）、缬氨酸 Val（CAS 号 72-18-4）、色氨酸 Trp（CAS 号 73-22-3）、组氨酸 His（CAS 号 71-00-1）、丝氨酸 Ser（CAS 号 56-45-1）、亮氨酸 Leu（CAS 号 61-90-5）、异亮氨酸 Ile（CAS 号 73-32-5）、苯丙氨酸 Phe（CAS 号 63-91-2）、苏氨酸 Thr（CAS 号 72-19-5）、丙氨酸 Ala（CAS 号 56-41-7）、脯氨酸 Pro（CAS 号 147-85-3）、酪氨酸 Tyr（CAS 号 60-18-4）、天冬氨酸 Asp（CAS 号 56-84-8）、天冬酰胺 Asn（CAS 号 70-47-3）、精氨酸 Arg（CAS 号 74-79-3）、赖氨酸 Lys（CAS 号 56-87-1）、谷氨酰胺 Gln（CAS 号 56-85-9）、谷氨酸 Glu（CAS 号 56-86-0）、γ-氨基丁酸（CAS 号 56-12-2），20 种氨基酸浓度均为 1000mg/L。

4.6 标准溶液配制：分别准确移取 0.1mL 的氨基酸标准品，用 50%甲醇溶液溶解，分别配制成 10 mg/L 的标准中间溶液，-18 ℃下保存。

5 仪器与设备

5.1　高效液相色谱-质谱/质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

5.2　分析天平：感量 0.01 g。

5.3　组织捣碎机。

5.4　高速万能粉碎机：10000 r/min。

5.5　高速分散机。

5.6　离心机：4000 r/min。

5.7　涡旋混合器。

5.8　离心管：50 mL，塑料。

5.9　滤膜：0.22 μm，有机相。

6　分析步骤

6.1　试样的制备

新鲜的食用菌子实体样品，用破壁料理机打浆，干样用高速万能粉碎机粉碎，分别置于样品盒(袋)中，-18℃冷冻备用。

6.2　样品提取

6.2.1 鲜样

称取试样 1.00 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管，加入 40.0 mL50%甲醇溶液(4.3)，经超声提取 30 min 后，吸取 2.00 mL 上清液过 0.22 μm 滤膜，待上机测定。

6.2.2 干样

称取试样 0.02 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管，加入 40.0 mL50%甲醇溶液(4.3)，经超声提取 30 min 后，吸取 2.00 mL 上清液过 0.22 μm 滤膜，待上机测定。

6.3　测定

6.3.1　液相色谱参考条件

a）色谱柱：C_{18}柱，3.5 mm（内径）×150 mm，粒径 4.6 μm，或相当者；

b）流动相：A 相为甲酸-水溶液（4.4），B 相为乙腈溶液，流动相梯度条件见表 1；

c）流速：0.3 mL/min；

d）柱温：40 ℃；

e）进样量：2 μL。

表 1　流动相及其梯度条件（V_A+V_B）

时间 min	V_A %	V_B %
0.00	98	2
2.0	98	2
14.0	2	98

15.0	2	98
15.1	98	2
18.0	98	2

6.3.2　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：5500 V；

d）离子源温度：550 ℃；

e）喷雾气流速：55 L/h；

f）气帘气流速：55 L/h；

g）多反应监测：20种氨基酸的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数见表2。

表2　20种氨基酸的多反应离子监测质谱参数

名称	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能 V
Gln	4.70	147.1/84.0 147.1/130.0	147.1/84.0	22	14 23
Lys	4.71	147.1/84.1 147.1/130.0	147.1/84.1	22	14 24
His	4.78	156.1/110.1 156.1/82.9	158.0/102.1	35	20 32
Arg	4.81	175.2/70.0 175.2/60.0	175.2/70.0	45	29 18
Gly	5.02	76.2/30.0	76.2/30.0	29	15
Asn	5.05	133.1/74.0 133.1/87.0	133.1/74.0	35	15 21
Ser	5.05	106.1/60.0 106.1/70.0	106.1/60.0	22	14 15
Asp	5.11	133.9/88.0 133.9/74.3	133.9/88.0	35	14 18
Ala	5.13	90.1/44.0	90.1/44.0	40	14
Thr	5.17	120.1/74.1 120.1/56.0	120.1/74.1	25	14 20
GABA	5.18	87.0/104.1 69.0/104.1	87.0/104.1	30	15 25
Glu	5.20	148.2/84.1 148.2/102.0	148.2/84.1	20	14 22
Pro	5.52	116.1/70.0	116.1/70.0	31	20
Val	6.15	118.1/72.2 118.1/55.1	118.1/72.2	55	15 28
Met	7.74	150.2/104.0 150.2/133.0	150.2/104.0	45	15 15
Tyr	9.43	182.1/165.0 182.1/136.1	182.1/165.0	50	15 20
Ile	10.61	132.1/86.1 132.1/69.1	132.1/86.1	35	15 25
Leu	10.73	132.1/86.1	132.1/86.1	25	15
Phe	11.18	166.1/120.1 166.1/103.0	166.1/120.1	40	20 40
Trp	11.70	205.1/146.0 205.1/118.0	205.1/146.0	30	25 35

6.3.3 色谱测定与确证

根据试样中被测物的含量情况，选取响应值适宜的标准工作液进行色谱分析。标准工作液和试样中被测物的响应值均应在仪器线性响应范围内。在上述仪器条件下，食用菌中游离氨基酸的保留时间范围为 4.70～11.70 min，多反应离子监测色谱图参见附录 A。按照上述条件进行样品测定，若检测样品的色谱峰保留时间与标准品一致，且与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致，相对丰度允许偏差不超过表 3 规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物。

表 3 定性确证相对离子丰度的最大允许偏差

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

6.4 空白试验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

7 结果计算和表达

用色谱数据处理或按式（1）计算试样中各农药的含量，计算结果需将空白值扣除。

$$X = \frac{A \times C_S \times V}{A_S \times m} \times \frac{1000}{1000} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中：

X—— 试样中被测物残留量的数值，单位为毫克每千克（mg /kg）；

A—— 试样溶液中被测物的质量色谱图峰面积；

V—— 提取液体积的数值，单位为毫升（mL）；

C_S—— 标准工作液中被测物的质量浓度的数值，单位为毫克每升（mg/L）；

A_S—— 标准工作溶液中被测物的质量色谱图峰面积；

m—— 试样质量的数值，单位为克（g）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

8 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术平均值的比值（百分率），应符合附录 B 的要求。

9 定量限和回收率

9.1 定量限

本方法的定量限为 0.01 mg/kg。

9.2 回收率

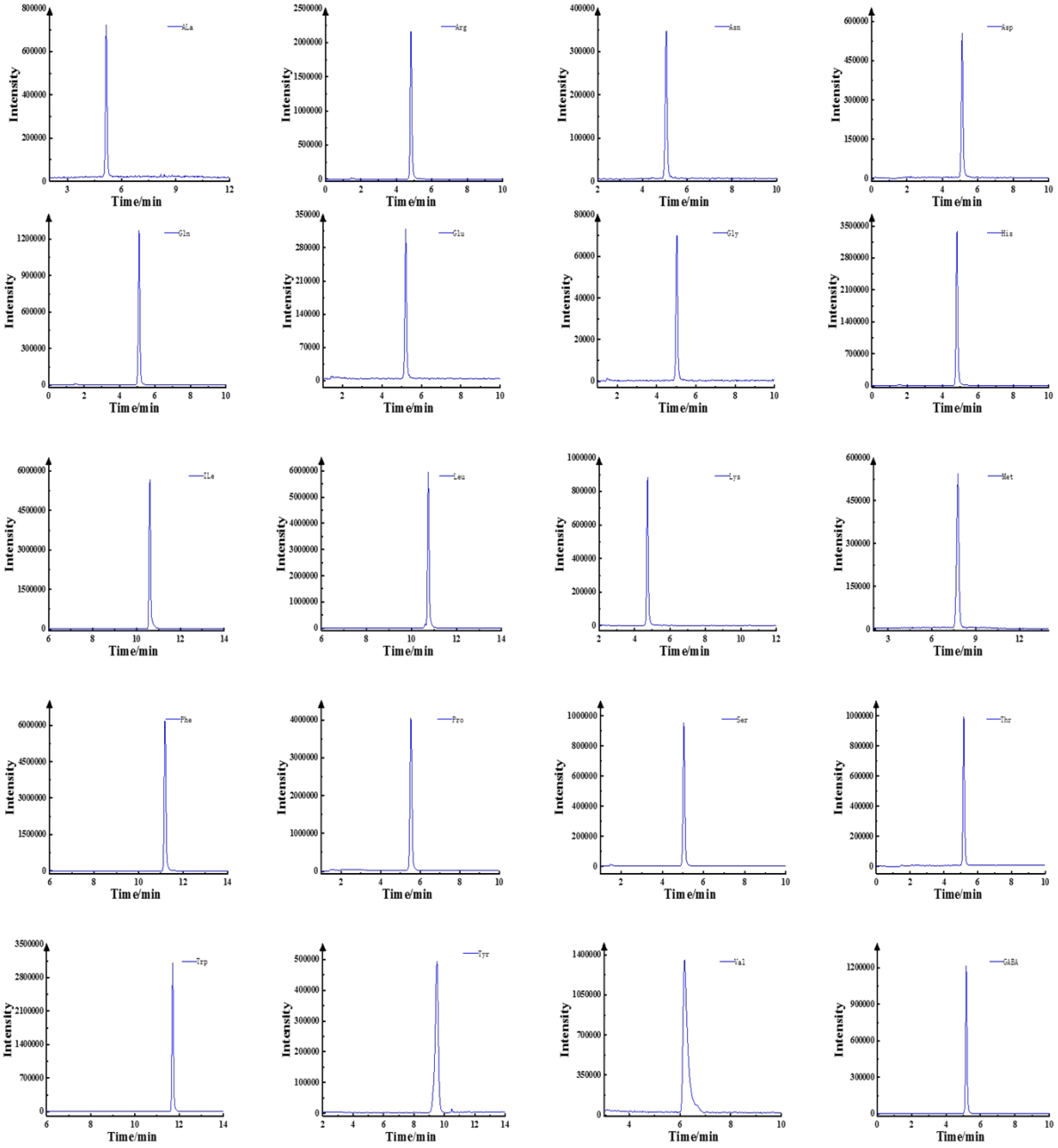
本方法的添加浓度和回收率范围见附录 C。

附录 A

（资料性）

20种氨基酸多反应监测（MRM）质量色谱图

20种氨基酸多反应监测（MRM）质量色谱图见图A.1。



图A.1 20种氨基酸多反应监测（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≤0.1	≤20
>0.1≤1	≤15
>1	≤10

附录 C

（资料性）

20种氨基酸在食用菌基质中的添加浓度和回收率范围

20种氨基酸在食用菌基质中的添加浓度和回收率范围，见表C.1。

表C.1 20种氨基酸在食用菌基质中的添加浓度及回收率范围

名称		羊肚菌			香菇		
		添加水平 /mg・L^{-1}	平均回收率 /%	RSD/%	添加水平 /mg・L^{-1}	平均回收率 /%	RSD/%
His	鲜样	1.0、10、40	70～106	1.1～3.9	5.0、20、80	81～115	1.6～3.1
	干样	0.2、0.5、2.0	73～100	1.1～5.5	0.2、0.5、2.0	77～99	0.9～2.8
Asn	鲜样	1.0、10、40	84～103	2.1～7.6	5.0、20、80	92～105	1.7～10.1
	干样	0.2、0.5、2.0	87～96	3.9～6.9	0.2、0.5、2.0	89～94	1.7～5.8
Trp	鲜样	1.0、10、40	75～109	2.7～3.3	5.0、20、80	85～113	1.1～3.9
	干样	0.2、0.5、2.0	85～98	2.1～4.5	0.2、0.5、2.0	92～98	1.2～4.7
Met	鲜样	2.0、10、40	83～93	1.9～5.3	5.0、20、80	94～102	0.8～3.5
	干样	0.2、0.5、2.0	91～99	2.3～5.3	0.2、0.5、2.0	98～101	1.9～3.1
Tyr	鲜样	2.0、10、40	89～101	1.4～6.1	5.0、20、80	99～113	1.1～1.8
	干样	0.2、0.5、2.0	93～96	3.2～6.1	0.2、0.5、2.0	98～101	2.2～2.9
Ile	鲜样	2.0、10、40	74～105	0.9～13.4	5.0、20、80	73～113	0.6～4.7
	干样	0.2、0.5、2.0	79～100	1.8～6.1	0.2、0.5、2.0	83～100	2.9～4.5
Phe	鲜样	2.0、10、40	73～116	1.9～3.2	5.0、20、80	72～109	0.9～6.0
	干样	0.2、0.5、2.0	75～102	2.4～3.4	0.2、0.5、2.0	73～101	0.9～3.0
Gly	鲜样	2.0、10、40	92～97	2.4～4.7	5.0、20、80	92～103	2.6～9.8
	干样	0.2、0.5、2.0	88～96	2.4～8.9	0.2、0.5、2.0	95～106	0.9～3.7

Pro	鲜样	2.0、10、40	78～117	1.3～3.9	5.0、20、80	73～102	1.3～6.0
	干样	0.2、0.5、2.0	75～101	1.1～3.9	0.2、0.5、2.0	74～101	1.6～10.6
Leu	鲜样	2.0、10、40	76～114	2.0～3.4	5.0、20、80	72～100	1.1～6.5
	干样	0.2、0.5、2.0	80～102	2.0～5.8	0.2、0.5、2.0	76～99	3.2～4.2
Lys	鲜样	4.0、20、40	77～89	1.5～5.2	5.0、20、80	78～91	1.0～7.4
	干样	0.2、0.5、2.0	86～91	5.3～8.3	0.2、0.5、2.0	88～99	1.6～5.0
Arg	鲜样	4.0、20、40	73～106	0.8～5.6	5.0、20、80	72～110	2.6～5.3
	干样	0.5、2.0、5.0	73～108	2.4～6.0	0.5、2.0、5.0	71～97	1.1～5.0
Ser	鲜样	4.0、20、40	88～109	1.6～2.3	5.0、20、80	88～106	1.8～8.3
	干样	0.2、0.5、2.0	81～93	4.8～9.5	0.2、0.5、2.0	88～101	2.3～4.2
Gln	鲜样	4.0、20、40	77～89	3.1～6.7	5.0、20、80	79～105	2.2～5.1
	干样	0.2、0.5、2.0	85～93	5.3～6.0	0.2、0.5、2.0	88～97	2.7～3.7
Asp	鲜样	4.0、20、40	90～112	1.2～6.1	5.0、20、80	86～100	0.5～5.9
	干样	0.2、0.5、2.0	85～90	3.3～8.7	0.2、0.5、2.0	85～92	1.8～5.7
Thr	鲜样	4.0、20、40	88～99	1.7～2.1	5.0、20、80	86～111	1.6～3.4
	干样	0.2、0.5、2.0	82～95	2.5～6.3	0.2、0.5、2.0	86～99	1.2～3.3
Val	鲜样	4.0、20、40	87～111	0.7～4.0	5.0、20、80	84～104	2.3～7.5
	干样	0.2、0.5、2.0	81～101	1.3～3.2	0.2、0.5、2.0	87～101	1.6～3.6
Glu	鲜样	4.0、20、40	102～112	2.0～9.0	5.0、20、80	87～99	4.7～10.2
	干样	0.5、2.0、5.0	95～100	1.6～5.3	0.5、2.0、5.0	82～108	1.5～7.1
Ala	鲜样	4.0、10、40	102～105	1.1～11.9	5.0、20、80	82～110	4.1～5.2
	干样	0.5、2.0、5.0	87～100	3.0～6.6	0.5、2.0、5.0	87～104	1.5～4.9
GABA	鲜样	2.0、10、40	91～98	2.0～2.3	5.0、20、80	85～104	2.0～9.7
	干样	0.2、0.5、2.0	80～92	4.8～9.2	0.5、2.0、5.0	74～91	3.0～8.6