

## 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3949—2021

### 植物源性食品中酚酸类化合物的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of phenolic acids in foods of plant origin by high performance  
liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2021-11-09 发布

2022-05-01 实施



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。本文件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、中国标准化研究院、内蒙古蒙牛乳业集团有限公司、中国合格评定认可委员会、北京市理化分析测试中心、国家蔬菜工程技术研究中心、中检集团中原农食产品检测(河南)有限公司。

本文件主要起草人：朱大洲、崔亚娟、徐佳佳、孔凡华、白沙沙、孙君茂、史波林、黄家章、刘鹏、梁克红、赵欣、杨春雪、罗欣、李东、马文丽、杨志刚、宋晓东、李宏、马杰、贾丽、刘光敏、赵雪梅、宗珊盈。



# 植物源性食品中酚酸类化合物的测定

## 高效液相色谱-串联质谱法

### 1 范围

本文件规定了植物源性食品中酚酸类化合物的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于果蔬及其制品、谷物、茶叶、药食同源等植物源性食品中阿魏酸、对羟基苯甲酸、对-香豆酸、丁香酸、龙胆酸、芥子酸、咖啡酸、没食子酸、水杨酸、香草酸、异阿魏酸、原儿茶酸、2-羟基肉桂酸、2,3-二羟基苯甲酸、2,3,4-三羟基苯甲酸、3-羟基肉桂酸含量的测定。

### 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

试样经碱性水解液提取处理后水解为游离酚酸类化合物,采用高效液相色谱-串联质谱法测定,外标法定量。

### 5 试剂与材料

#### 5.1 试剂

- 5.1.1 水:GB/T 6682 规定的一级水。
- 5.1.2 氢氧化钠(NaOH):优级纯。
- 5.1.3 盐酸(HCl):优级纯。
- 5.1.4 乙酸乙酯( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ):优级纯。
- 5.1.5 乙腈( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):色谱纯。
- 5.1.6 甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):色谱纯。
- 5.1.7 抗坏血酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ):优级纯。
- 5.1.8 乙二胺四乙酸( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ):优级纯。

#### 5.2 试剂配制

- 5.2.1 氢氧化钠溶液(3 mol/L,含 1%抗坏血酸和 0.3%乙二胺四乙酸):称取 120 g 氢氧化钠(5.1.2)、10 g 抗坏血酸(5.1.7)、3.0 g 乙二胺四乙酸(5.1.8),加入 700 mL 水中,待溶解后转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。
- 5.2.2 盐酸溶液(6 mol/L):量取 50 mL 盐酸(5.1.3),缓慢注入 50 mL 蒸馏水中,混匀。
- 5.2.3 70%甲醇水溶液:取 70 mL 甲醇(5.1.6)和 30 mL 水,混匀。

#### 5.3 标准品

16 种酚酸类化合物标准品:纯度 $\geq 98.0\%$ ,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。相关信息见附录 A。

## 5.4 标准溶液的配制

5.4.1 标准储备溶液(1 mg/mL):分别准确称取 16 种酚酸标准品各 10 mg(精确至 0.01 mg),用甲醇(5.1.6)溶解于 10 mL 容量瓶,并定容至刻度,于-18 °C 下储存于密闭棕色玻璃瓶中,有效期为 6 个月。

5.4.2 标准中间溶液:分别吸取 0.2 mL 标准储备溶液于 25 mL 棕色容量瓶中,用 70% 甲醇水溶液(5.2.3)定容至 25 mL,制成标准中间溶液,现用现配。

5.4.3 标准工作溶液:吸取适量标准中间溶液,用 70% 甲醇水溶液(5.2.3)配制成质量浓度为 0.01 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL 的标准曲线工作溶液,现用现配。

## 5.5 材料

有机相微孔滤膜:孔径为 0.22 μm。

## 6 仪器设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源(ESI<sup>-</sup>)。

6.2 天平:感量 0.01 mg、0.1 mg。

6.3 匀浆机。

6.4 高速粉碎机。

6.5 离心机:转速≥8 000 r/min。

6.6 旋转蒸发仪:带有温度控制。

6.7 涡旋振荡器。

6.8 涡旋混合器。

## 7 试样制备

试样取可食部进行制备。果汁、酒类等均匀的液体试样直接混匀;带悬浮物的液体试样、新鲜果蔬、半固体等试样经匀浆机匀浆;固体试样采用高速粉碎机粉碎。试样制备后储存于样品瓶中备用,所有制备试样于-18 °C 条件下保存。

## 8 分析步骤

### 8.1 提取

称取试样 1 g~5 g(精确至 0.000 1 g)于 50 mL 离心管中,加入 30 mL 3 mol/L 氢氧化钠溶液(5.2.1),用涡旋振荡器混匀,振荡提取 60 min,用 6 mol/L 盐酸溶液(5.2.2)调节 pH 至 1.5~2.0,经离心机 8 000 r/min 离心 10 min,上清液移入分液漏斗,分别用 70 mL 乙酸乙酯(5.1.4)萃取 2 次,合并乙酸乙酯萃取液,于 35 °C~40 °C 下旋转蒸发至干,加入 5 mL 70% 甲醇水溶液(5.2.3),溶解蒸干后的物质,过滤膜(5.5),待测。

### 8.2 测定

#### 8.2.1 仪器参考条件

- a) 色谱柱:HSS T3 色谱柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,颗粒度 1.7 μm,或性能相当者;
- b) 流动相:A 为乙腈(5.1.5),B 为水溶液(5.1.1);
- c) 进样量:10 μL;
- d) 柱温:30 °C;
- e) 梯度洗脱程序,见表 1;

表 1 流动相洗脱梯度程序

时间, min	流速, mL/min	A, %	B, %
0	0.3	10	90

表 1 (续)

时间, min	流速, mL/min	A, %	B, %
0.5	0.3	30	70
1.0	0.3	40	60
4.0	0.3	60	40
4.1	0.3	10	90
5.0	0.3	10	90

- f) 扫描方式:离子源为电喷雾电离源负离子扫描方式(ESI<sup>-</sup>);  
g) 去溶剂气和锥孔反吹气流速分别为 800 L/h 和 150 L/h,气体均为高纯氮气;  
h) 碰撞气流速为 0.15 mL/min,气体为氦气;  
i) 去溶剂辅助加热温度为 400 ℃;  
j) 离子源温度为 150 ℃;  
k) 监测离子对、碰撞气能量和源内破碎电压见附录 B。

### 8.2.2 标准工作曲线

标准工作溶液注入液相色谱质谱仪按照 8.2.1 条件进行测定,以各酚酸类化合物质量浓度为横坐标、响应的峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。

### 8.2.3 定性测定

在相同试验条件下,试样溶液中各酚酸类化合物的保留时间与标准工作溶液中各酚酸类化合物的保留时间的偏差在±2.5%以内;且试样溶液中各酚酸类化合物的定性离子的相对丰度与浓度接近的标准工作溶液中各酚酸类化合物的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定试样溶液中存在被测化合物。16 种酚酸类化合物的多反应监测色谱图见附录 C。

表 2 质谱选择离子丰度允许偏差

相对丰度	>50	20~50	10~20	≤10
允许偏差	+20	±25	+30	±50

单位为百分号

### 8.2.4 定量测定

试样中各酚酸类化合物采用外标法定量。保证所测试样中组分的响应值均在标准工作曲线的线性范围内。

## 8.3 分析结果的表述

试样中酚酸类化合物的含量以质量分数表示,单位为毫克每千克,按公式(1)计算。

$$\omega = \rho \times \frac{V}{m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $\omega$ ——试样中酚酸类化合物的含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);  
 $\rho$ ——从标准曲线上得到的被测组分溶液质量浓度的数值,单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ );  
 $f$ ——试样溶液稀释倍数;  
 $V$ ——试样溶液的定容体积的数值,单位为毫升(mL);  
 $m$ ——试样质量的数值,单位为克(g)。

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。

## 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大于算术平均值的 15%。

## 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得超过算术平均值的 15%。

## 10 其他

本文件方法丁香酸、香草酸、2,3,4-三羟基苯甲酸和芥子酸的检出限均为 0.2 mg/kg,定量限均为 0.5 mg/kg;龙胆酸、对羟基苯甲酸、3-羟基肉桂酸、2-羟基肉桂酸和咖啡酸的检出限均为 0.1 mg/kg,定量限均为 0.3 mg/kg;原儿茶酸、没食子酸、对香豆酸、阿魏酸、异阿魏酸、水杨酸、2,3-二羟基苯甲酸的检出限均为 0.03 mg/kg,定量限均为 0.1 mg/kg。



## 附录 A

(资料性)

## 16 种酚酸类化合物标准物质基本信息

16 种酚酸类化合物标准物质基本信息见表 A.1。

表 A.1 16 种酚酸类化合物标准物质基本信息

序号	名称	CAS号	英文名称	分子式	相对分子质量
1	阿魏酸	1135-24-6	Ferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.19
2	对羟基苯甲酸	99-96-7	4-Hydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.13
3	对-香豆酸	501-98-4	<i>P</i> -coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164.16
4	丁香酸	530-57-4	Sringic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198.17
5	龙胆酸	490-79-9	Gentianic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.12
6	芥子酸	530-59-6	Sinapic acid	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	224.21
7	咖啡酸	331-39-5	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.16
8	没食子酸	149-91-7	Galllic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.12
9	水杨酸	69-72-7	Salicylic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.12
10	香草酸	121-34-6	Vanillic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168.15
11	异阿魏酸	537-73-5	Isoferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.19
12	原儿茶酸	99-50-3	Protocatechuic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.12
13	2-羟基肉桂酸	583-17-5	2-Hydroxycinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164.16
14	2,3-二羟基苯甲酸	303-38-8	2,3-Dihydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.11
15	2,3,4-三羟基苯甲酸	610-02-6	2,3,4-Trihydroxybenzoic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.11
16	3-羟基肉桂酸	588-30-7	3-Hydroxycinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164.16

附录 B

(资料性)

16 种酚酸类化合物质谱分析参数

16 种酚酸类化合物的质谱分析参数见表 B.1。

表 B.1 16 种酚酸类化合物的质谱分析参数

序号	名称	母离子, $m/z$	子离子, $m/z$	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
1	阿魏酸	192.5	134.0, 149.0*	35	15,10
2	对羟基苯甲酸	136.5	93.0, 102.0*	40	15,15
3	对-香豆酸	163.0	119.0, 91.0*	38	12,25
4	丁香酸	197.0	182.0, 153.0	42	12,12
5	龙胆酸	153.0	108.0, 109.0	40	20,10
6	芥子酸	223.2	149.0, 164.0*	45	20,12
7	咖啡酸	179.0	135.0, 107.0*	45	10,25
8	没食子酸	169.0	79.0, 107.0*	45	12,20
9	水杨酸	136.5	93.0, 65.0*	40	20,25
10	香草酸	167.0	152.0, 123.0	35	12,10
11	异阿魏酸	193.0	178.0, 134.0	40	10,20
12	原儿茶酸	153.0	109.0, 91.0*	40	15,20
13	2-羟基肉桂酸	162.5	119.0, 117.0*	40	15,15
14	2,3-二羟基苯甲酸	153.0	109.0, 80.0*	40	20,18
15	2,3,4-三羟基苯甲酸	169.0	151.0, 125.0*	40	15,15
16	3-羟基肉桂酸	162.5	119.0, 91.0*	42	10,22

\* 为定量离子。

## 附录 C

(资料性)

## 16 种酚酸类化合物总离子流图和多反应监测色谱图

16 种酚酸类化合物总离子流图和多反应监测色谱图见图 C.1 和图 C.2。

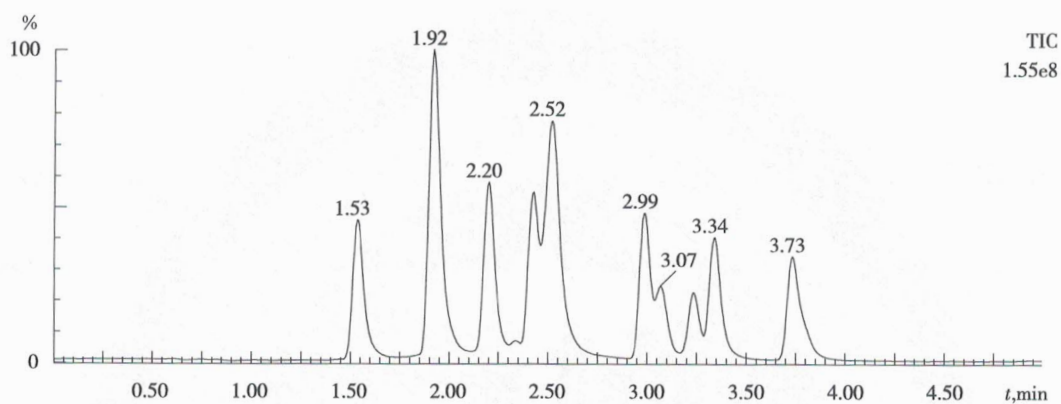


图 C.1 16 种酚酸类化合物总离子流图

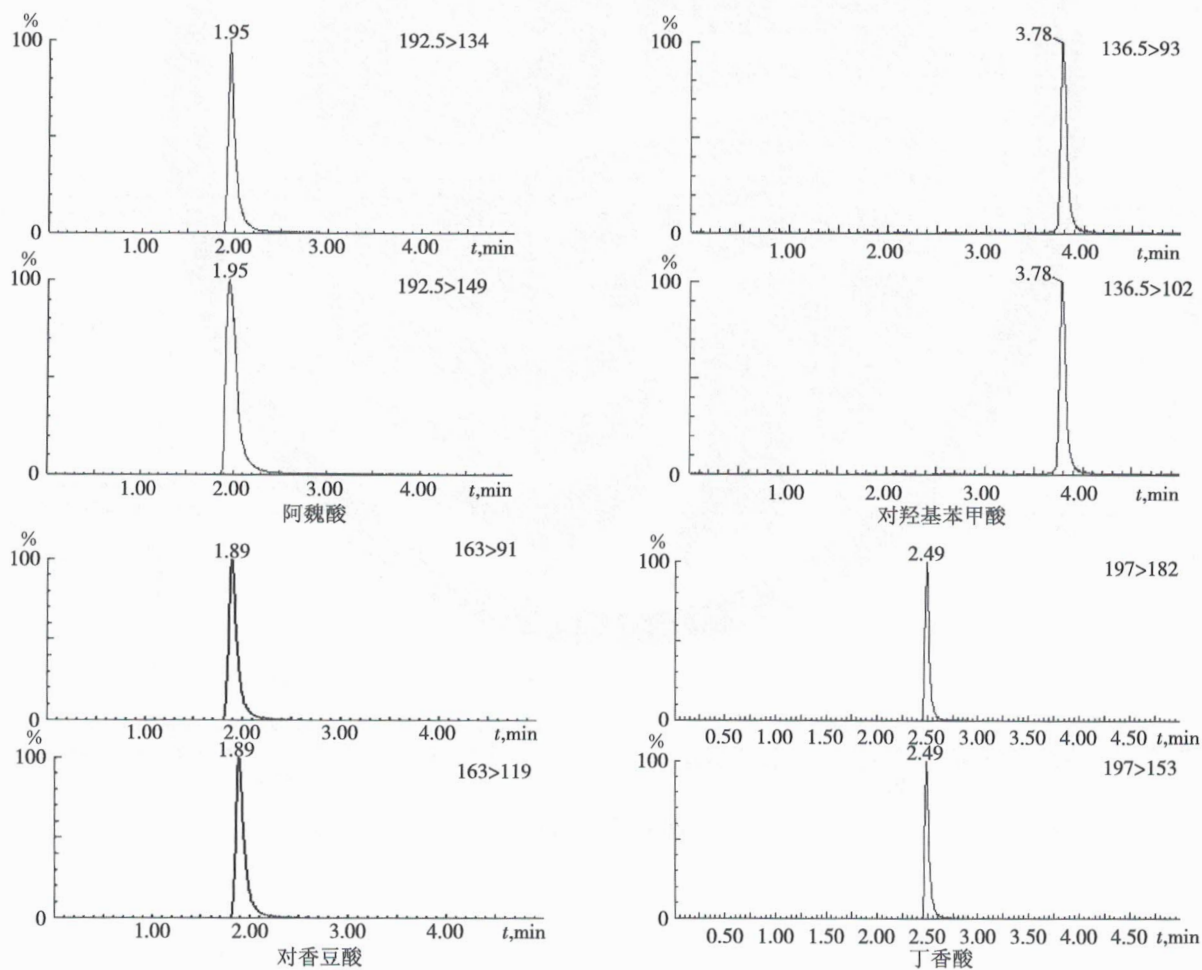


图 C.2 16 种酚酸类化合物多反应监测色谱图

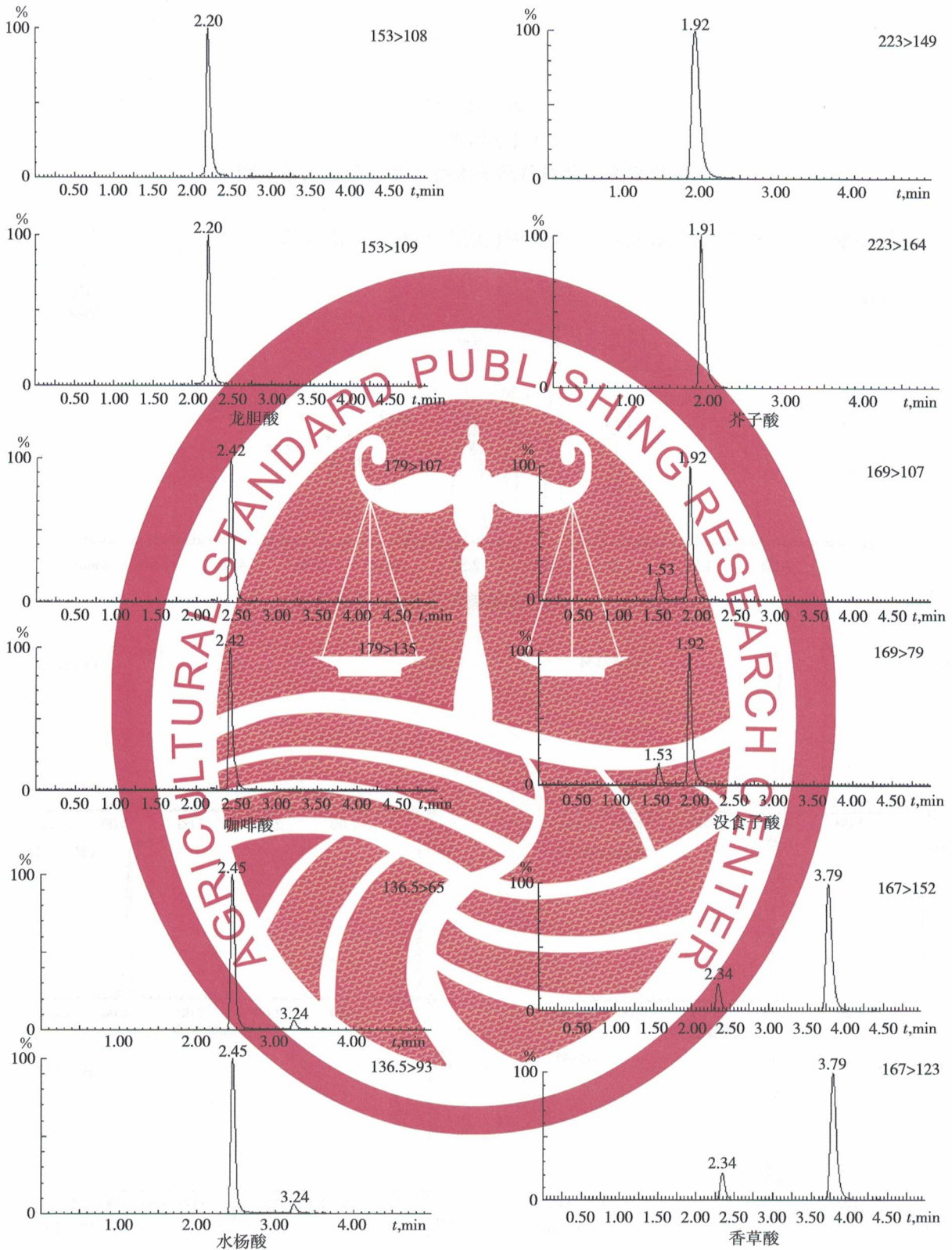


图 C.2 (续)

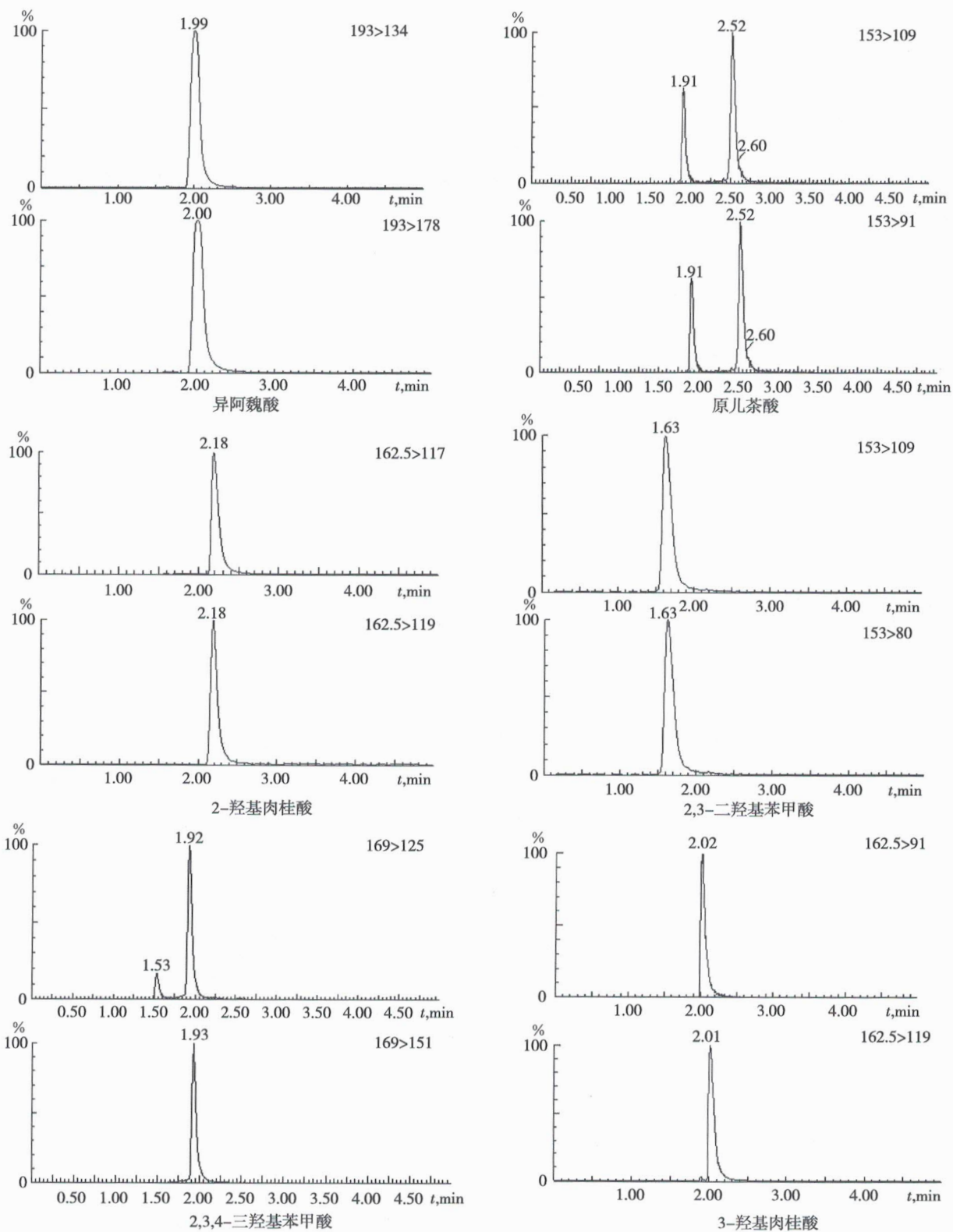


图 C.2 (续)





中华人民共和国  
农业行业标准  
植物源性食品中酚酸类化合物的测定  
高效液相色谱-串联质谱法

NY/T 3949—2021

\* \* \*

中国农业出版社出版  
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2022年2月第1版 2022年2月北京第1次印刷

书号: 16109·8814

定价: 32.00 元



NY/T 3949—2021

版权专有 侵权必究  
举报电话: (010) 59194261