



中华人民共和国国家标准

GB xxxxx—202x

食品安全国家标准 食品中色氨酸的测定

(征求意见稿)

202x-xx-xx 发布

202x-xx-xx 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

食品安全国家标准

食品中色氨酸的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿配方食品、特殊医学用途婴儿配方食品、特殊医学用途配方食品、婴幼儿谷类辅助食品中色氨酸的测定方法。

本标准适用于婴幼儿配方食品、特殊医学用途婴儿配方食品、特殊医学用途配方食品、婴幼儿谷类辅助食品中色氨酸的测定。

第一法 酶水解-液相色谱法

2 原理

试样以蛋白酶酶解，经甲醇-水稀释后，用反相液相色谱柱分离，荧光检测器或紫外检测器检测，外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682中规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇（ CH_3OH ），色谱纯。

3.1.2 甲醇（ CH_3OH ）。

3.1.3 乙酸（ $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ），色谱纯。

3.1.4 盐酸（ HCl ）。

3.1.5 乙酸铵（ $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ ），色谱纯。

3.1.6 Tris 碱（2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇）（ $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ）。

3.1.7 灰色链霉菌蛋白酶（XIV 型；来源于灰色链霉菌）：活力 ≥ 3.5 U/mg。

3.2 试剂配制

3.2.1 盐酸溶液（1.0 mol/L）：量取 83 mL 盐酸，注入 300 mL 水中，混匀后加水稀释至 1 L。

3.2.2 Tris 缓冲液（0.1 mol/L, pH =8.5）：称取 6.06 g Tris 碱于 1000 mL 烧杯中，加水 500 mL 溶解，用 1.0 mol/L 盐酸溶液调节溶液 pH 到 8.5 ± 0.05 。室温下保存，保存期 6 个月。

3.2.3 蛋白酶溶液（17.5 U/mL）：称取 0.05 g 灰色链霉菌蛋白酶，用 Tris 缓冲液溶解并定容至 10 mL，使蛋白酶浓度为 17.5 U/mL，临用现配。

3.2.4 乙酸铵溶液（10 mmol/L, pH =4.0）：称取 0.77 g 乙酸铵加入 900 mL 水溶解，用乙酸调节溶液 pH 到 4.0 ± 0.1 后加水至 1000 mL，经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤后备用。

3.3 标准品

3.3.1 L-色氨酸标准品（ $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ，CAS号：73-22-3）：纯度 $\geq 99\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 L-色氨酸标准储备液 (1.00 mg/mL)：准确称取25 mg (精确至0.1 mg) L-色氨酸标准品于25 mL容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。于4 °C下保存，保存期6个月。

3.4.2 L-色氨酸标准中间液 (100 µg/mL)：吸取L-色氨酸标准储备液1 mL于10 mL容量瓶中，加水定容至刻度，混匀。于4 °C下保存，保存期6个月。

3.4.3 L-色氨酸标准系列工作液：分别移取L-色氨酸标准中间液20.0 µL、100 µL、500 µL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL于10 mL容量瓶中，各加入2.40 mL甲醇 (3.1.1)，加水定容至刻度，混匀。L-色氨酸标准系列工作液的浓度分别为0.200 µg/mL、1.00 µg/mL、5.00 µg/mL、10.0 µg/mL、20.0 µg/mL、50.0 µg/mL。临用现配。

3.5 材料

3.5.1 螺纹带盖的离心管。

3.5.2 微孔滤膜：0.22 µm，有机相。

3.5.3 微孔滤膜：0.22 µm，水相。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪：带有荧光检测器或紫外检测器。

4.2 分析天平：感量分别为0.01 g、0.001 g、0.0001 g。

4.3 恒温培养箱，50°C ± 0.5°C。

4.4 超声波发生器。

4.5 pH计：精度为±0.01。

4.6 涡旋混合器。

5 分析步骤

5.1 试样处理

准确称取混合均匀的试样0.200 g (精确到0.001 g) 于50 mL螺纹带盖的离心管中，依次加入0.5 mL蛋白酶溶液、3.0 mL Tris缓冲液、200 µL甲醇 (3.1.2)，涡旋混匀后超声溶解，于50 °C恒温培养箱中酶解16 h~20 h。

取出样品，冷却至室温，加入12 mL甲醇 (3.1.2)，用水将样品转移并定容至50 mL容量瓶中，混匀，经0.22 µm微孔滤膜过滤，滤液供液相色谱测定。

5.2 液相色谱参考条件

5.2.1 色谱柱：C₁₈柱，柱长150 mm，内径4.6 mm，填料粒径3.5 µm，或相当者；

5.2.2 柱温：35 °C；

5.2.3 流动相：甲醇+乙酸铵溶液=10+90；

5.2.4 流速：0.8 mL/min；

5.2.5 荧光检测器：激发波长为280 nm；发射波长为346 nm；紫外检测器：检测波长280 nm；

5.2.6 进样量：5 µL。

5.3 空白试验

除不加试样外，其他操作与试样的操作一致。

5.4 标准曲线的制作

将L-色氨酸标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测得相应的色谱峰面积，以标准系列工作液中L-色氨酸的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，L-色氨酸标准溶液的色谱图参见附录A图A.1和A.2。

5.5 试样溶液的测定

将空白溶液和试样溶液分别注入液相色谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测溶液中色氨酸的含量。

6 分析结果的表述

试样中色氨酸的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中色氨酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中色氨酸的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

ρ_0 ——由标准曲线得到的空白溶液中色氨酸的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

100——换算系数；

1000——换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

7 精密度

在重复性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10%。

8 其他

当称样量为0.200 g时，方法的检出限为1.5 mg/100g，定量限为5.0 mg/100 g。

第二法 碱水解-液相色谱法

9 原理

试样在碱性条件下水解，水解液用盐酸调至中性，经反相液相色谱柱分离，荧光检测器检测，内标法定量。

10 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

10.1 试剂

- 10.1.1 甲醇 (CH₃OH), 色谱纯。
- 10.1.2 乙酸 (C₂H₄O₂), 色谱纯。
- 10.1.3 盐酸 (HCl)。
- 10.1.4 乙酸铵 (C₂H₇NO₂), 色谱纯。
- 10.1.5 氢氧化锂 (LiOH H₂O)。

10.2 试剂配制

- 10.2.1 盐酸溶液 (3 mol/L): 量取 100 mL 盐酸, 注入 300 mL 水中, 混匀。
- 10.2.2 氢氧化锂溶液 (4 mol/L): 称取 167.8 g 氢氧化锂加入适量水溶解, 用水定容至 1000 mL。
- 10.2.3 乙酸铵溶液 (10 mmol/L, pH =4.0): 称取 0.77 g 乙酸铵加入 900 mL 水溶解, 用乙酸调节溶液 pH 值至 4.0±0.1, 用水定容至 1000 mL, 摇匀, 经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤备用。

10.3 标准品

- 10.3.1 L-色氨酸标准品 (C₁₁H₁₂N₂O₂, CAS号: 73-22-3): 纯度≥99%, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 10.3.2 α-甲基-色氨酸标准品 (C₁₂H₁₄N₂O₂, CAS号: 110117-83-4): 纯度≥98%。

10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 L-色氨酸标准储备液 (1.00 mg/mL): 准确称取 25 mg (精确至 0.1 mg) L-色氨酸标准品于 25 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 混匀。于 4 °C 下保存, 保存期 6 个月。
- 10.4.2 L-色氨酸标准中间液 (100 μg/mL): 吸取 L-色氨酸标准储备液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 混匀。于 4 °C 下保存, 保存期 6 个月。
- 10.4.3 内标工作液 (1 mg/mL): 称取 10 mg α-甲基-色氨酸标准品于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 混匀。于 4 °C 下保存, 保存期 6 个月。
- 10.4.4 L-色氨酸标准系列工作液: 分别移取 L-色氨酸标准中间液 (100 μg/mL) 20 μL、100 μL、500 μL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中, 各加入 100 μL 内标工作液, 加水定容至刻度, 混匀。L-色氨酸标准系列工作液的浓度分别为 0.20 μg/mL、1.00 μg/mL、5.00 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、50.0 μg/mL。临用现配。

10.5 材料

- 10.5.1 水解管: 聚四氟乙烯材质, 带螺纹口外盖, 内衬聚四氟乙烯密封垫。
- 10.5.2 微孔滤膜: 0.22 μm, 水相。

11 仪器和设备

- 11.1 高效液相色谱仪: 带有荧光检测器。
- 11.2 分析天平: 感量分别为 0.01 g、0.001 g、0.0001 g。
- 11.3 电热干燥箱, 110 °C ± 0.5 °C。
- 11.4 超声波发生器。
- 11.5 涡旋混合器。
- 11.6 pH计: 精度为 ±0.01。

12 分析步骤

12.1 试样处理

准确称取混合均匀的试样0.200 g（精确到0.001 g）于水解管中，依次加入0.5 mL内标工作液、5 mL氢氧化锂溶液，涡旋混匀后于超声波振荡器中震荡5 min，置于110 °C电热干燥箱中水解20 h。

取出水解管，待冷却至室温后，用盐酸溶液调pH值至6~8，将水解液全部转移至50 mL容量瓶中并用水定容至刻度，混匀后经0.22 μm微孔滤膜过滤备用。

12.2 液相色谱参考条件

12.2.1 色谱柱：C₁₈柱，柱长150 mm，内径4.6 mm，填料粒径3.5 μm，或相当者；

12.2.2 流动相：A相：甲醇，B相：乙酸铵溶液，参考梯度洗脱程序见表1；

12.2.3 流速：0.8 mL/min；

12.2.4 柱温：35 °C；

12.2.5 荧光检测器：激发波长为280 nm；发射波长为346 nm；

12.2.6 进样量：5 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	流动相 A %	流动相 B %
0	0.8	10	90
10	0.8	10	90
10.1	0.8	20	80
23	0.8	20	80
23.1	0.8	10	90
28	0.8	10	90

12.3 空白试验

除不加试样外，其他操作与试样的操作一致。

12.4 标准曲线的制作

将L-色氨酸标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测得相应的色谱峰面积，以标准系列工作液中L-色氨酸的浓度为横坐标，以L-色氨酸峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标，绘制标准曲线，标准溶液的色谱图参见附录A图A.3。

12.5 试样溶液的测定

将空白溶液和试样溶液分别注入液相色谱仪中，得到的空白溶液和试样溶液中目标化合物的峰面积与内标化合物峰面积的比值，根据标准曲线得到相应的色氨酸含量。

13 分析结果的表述

试样中L-色氨酸的含量按公式（2）计算：

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X——试样中L-色氨酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

ρ——由标准曲线得到的试样测定液中L-色氨酸的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

ρ₀——由标准曲线得到的空白测定液中L-色氨酸的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

100——换算系数。

1000——换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

14 精密度

在重复性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10%。

15 其他

当称样量为0.200 g时，方法的检出限为1.5 mg/100g，定量限为5.0 mg/100 g。

附 录 A

L-色氨酸标准溶液色谱图

A.1 L-色氨酸标准溶液（5 μg/mL）荧光检测器色谱图见图A.1。

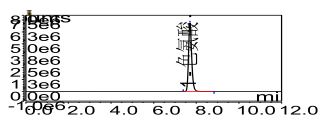


图 A.1 L-色氨酸标准溶液（5 μg/mL）荧光检测器色谱图

A.2 L-色氨酸标准溶液（5 μg/mL）紫外检测器色谱图见图A.2。

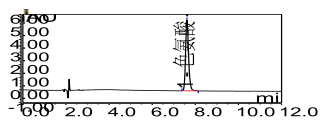


图 A.2 L-色氨酸标准溶液（5 μg/mL）紫外检测器色谱图

A.3 加内标的L-色氨酸标准溶液（5 μg/mL）荧光检测器色谱图见图A.3。

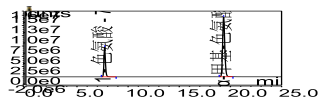


图 A.3 加内标的L-色氨酸标准溶液（5 μg/mL）荧光检测器色谱图