



中华人民共和国国家标准

GB ××××—××××

食品安全国家标准

食品中天冬酰胺和谷氨酰胺的测定

(征求意见稿)

食品安全国家标准(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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

食品中天冬酰胺和谷氨酰胺的测定

1 范围

本标准规定了食品中天冬酰胺和谷氨酰胺测定的柱前衍生-高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。

第一法中直接提取法适用于特殊膳食用食品中游离态天冬酰胺和游离态谷氨酰胺的测定；第一法中酶解提取法适用于特殊膳食用食品中天冬酰胺总量和谷氨酰胺总量的测定。

第二法适用于特殊膳食用食品中天冬酰胺总量和谷氨酰胺总量的测定。

第一法 柱前衍生-高效液相色谱法

2 原理

试样经直接提取或灰色链霉菌蛋白酶酶解，天冬酰胺和谷氨酰胺与丹磺酰氯进行衍生反应，衍生物经 C_{18} 柱分离，紫外检测器检测，保留时间定性，外标法定量。

3 试剂和材料

除另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 甲醇 (CH_4O)：色谱纯。
- 3.1.2 乙腈 (C_2H_5N)：色谱纯。
- 3.1.3 丹磺酰氯 ($C_{12}H_{12}ClNO_2S$)。
- 3.1.4 无水碳酸钠 (Na_2CO_3)。
- 3.1.5 无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)。
- 3.1.6 盐酸甲胺 ($CH_5N \cdot HCl$)。
- 3.1.7 三羟甲基氨基甲烷 (Tris 碱, $C_4H_{11}O_3N$)。
- 3.1.8 灰色链霉菌蛋白酶 (XIV 型；来源于灰色链霉菌)：酶活力 ≥ 3.5 U/mg。
- 3.1.9 浓盐酸 (HCl)。
- 3.1.10 磷酸 (H_3PO_4)：色谱纯，含量 $\geq 85\%$ 。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 丹磺酰氯溶液 (2.0 g/L)：称取 0.2 g 丹磺酰氯，用乙腈溶解并定容至 100 mL，现配现用。
- 3.2.2 盐酸溶液 (1.0 mol/L)：吸取 8.3 mL 浓盐酸，加水稀释至 100 mL。
- 3.2.3 Tris 缓冲液 (0.05 mol/L)：称取 6.06 g 三羟甲基氨基甲烷于 1 000 mL 烧杯中，加水 800 mL 溶解，用 1.0 mol/L 盐酸溶液调节溶液 pH 至 8.0 ± 0.1 ，用水稀释至 1 000 mL。4°C 保

存，有效期1个月。

3.2.4 蛋白酶溶液（52.5 U/mL）：称取0.15 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52.5 U/mL。现配现用。

3.2.5 碳酸钠缓冲溶液（60 mmol/L）：称取0.318 g 无水碳酸钠，加40 mL 水溶解，用1.0 mol/L 盐酸溶液调 pH 至 9.5 ± 0.1 ，用水定容至50 mL。现配现用。

3.2.6 盐酸甲胺溶液（20 g/L）：称取2.0 g 盐酸甲胺，用水溶解并定容至100 mL。4℃保存，有效期3个月。

3.2.7 磷酸氢二钠溶液（10 mmol/L）：称取无水磷酸氢二钠1.42 g，用800 mL 水溶解，用磷酸调节 pH 至 6.5 ± 0.1 ，用水稀释至1 000 mL。

3.2.8 20%甲醇溶液：量取20 mL 甲醇，加水稀释至100 mL。

3.3 标准品

3.3.1 天冬酰胺标准品（ $C_4H_8N_2O_3$ ，CAS 号：70-47-3）：纯度 $\geq 99\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.2 谷氨酰胺标准品（ $C_5H_{10}N_2O_3$ ，CAS 号：56-85-9）：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 天冬酰胺标准储备液（2.00 mg/mL）：准确称取100 mg（精确至0.0001 g）天冬酰胺标准品，用20%甲醇溶液溶解并定容至50 mL。4℃避光保存，有效期3个月。

3.4.2 谷氨酰胺标准储备液（2.00 mg/mL）：准确称取100 mg（精确至0.0001 g）谷氨酰胺标准品，用20%甲醇溶液溶解并定容至50 mL。4℃避光保存，有效期3个月。

3.4.3 混合标准中间液（20.0 $\mu\text{g/mL}$ ）：分别吸取标准储备液各1.00 mL，用水定容至100 mL，混匀。现配现用。

3.4.4 混合标准系列工作液：分别准确吸取适量混合标准中间液（20.0 $\mu\text{g/mL}$ ）于10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，获得浓度分别为0.00 $\mu\text{g/mL}$ 、0.500 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作液。现配现用。

3.5 材料

3.5.1 螺纹带盖玻璃瓶：20 mL。

3.5.2 有机微孔滤膜：0.22 μm 。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.2 电子天平：感量0.001 g和0.0001 g。

4.3 涡旋混合器。

4.4 恒温水浴装置： $37^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ 。

4.5 pH 计：精度0.01。

4.6 离心机：最高转速 $\geq 10\ 000$ r/min。

5 分析步骤

5.1 试样制备

非粉状固体试样粉碎并混合均匀；粉状固体试样或液体试样摇匀。

5.2 试样提取

5.2.1 直接提取法

准确称取混合均匀的固体试样0.2 g ~ 1.0 g或液体试样1.0 g ~ 5.0 g（精确至0.001 g）于150 mL锥形瓶中，加入约25 mL水涡旋混匀，用1.0 mol/L盐酸溶液调节pH至4.5±0.1，然后转移至250 mL容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，离心或者过滤得到待衍生试样溶液。

注：必要时，用水进行适当的稀释，使待衍生试样溶液中天冬酰胺和谷氨酰胺的浓度为0 μg/mL ~ 20 μg/mL。

5.2.2 酶解提取法

准确称取混合均匀的固体试样约0.2 g或液体试样约0.5 g（精确至0.001 g）于20 mL螺旋带盖玻璃瓶中，依次加入0.5 mL蛋白酶溶液、3.0 mL Tris缓冲液、0.2 mL甲醇，涡旋混匀。样品溶液于37 °C恒温水浴酶解16 h~18 h。取出样品溶液，冷却至室温，将酶解液全部转移至50 mL容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。离心或者过滤得到试样清液。准确吸取1.0 mL试样清液，稀释5倍获得待衍生试样溶液。

空白试验：除不加试样外，均按上述样本分析步骤操作。

注：1、对于低蛋白含量样本，如婴幼儿罐装食品，可适当增大称样量。但固体试样称样量不大于0.5 g，液体试样称样量不大于1 g。

2、必要时，待衍生试样溶液用水进行稀释，使待衍生试样溶液中天冬酰胺和谷氨酰胺的浓度为0 μg/mL ~ 20 μg/mL。

5.3 衍生反应

准确吸取直接提取或酶解提取获得的待衍生试样溶液1.0 mL至15 mL离心管中，加入1.0 mL碳酸钠缓冲溶液和1.0 mL丹磺酰氯溶液，充分混合，室温避光反应2 h（隔1 h取出振荡），加入0.10 mL盐酸甲胺溶液涡旋混合，终止反应，避光静置至沉淀完全，经0.22 μm滤膜过滤，待测。

另准确吸取1.0 mL混合标准系列工作液，与待衍生试样溶液同步进行衍生。

5.4 液相参考色谱条件

液相参考色谱条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）或性能相当者。
- b) 流动相A：10 mmol/L磷酸氢二钠溶液；流动相B：甲醇；梯度洗脱程序见表1。
- c) 流速：1.0 mL/min。
- d) 柱温：35 °C。
- e) 检测波长：247 nm。
- f) 进样量：10 μL。

表1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0.0	70	30
17.0	70	30
17.1	20	80
19.0	20	80
19.1	70	30
24.0	70	30

5.5 标准曲线的制作

将衍生后的混合标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定各组分的峰面积，以混合标准系列工作液中天冬酰胺和谷氨酰胺的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。衍生后标准溶液的色谱图见附录A中图A.1。

5.6 试样溶液的测定

将衍生后的试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到目标化合物的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中天冬酰胺和谷氨酰胺的浓度。待测液中目标化合物的响应值应在标准曲线的线性范围内，超过线性范围则应对待衍生试样溶液进行稀释，重新按样品衍生分析步骤处理后再进样分析。

6 分析结果的表述

6.1 游离态天冬酰胺和游离态谷氨酰胺

直接提取法试样中游离态天冬酰胺、游离态谷氨酰胺的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times f \times 100}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中游离态天冬酰胺、游离态谷氨酰胺的含量，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天冬酰胺、谷氨酰胺的浓度，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 —— 试样质量，单位为克（g）；

f —— 试样上清液稀释倍数；

100、1 000—— 单位换算系数。

6.2 天冬酰胺总量和谷氨酰胺总量

酶解提取法试样中天冬酰胺总量、谷氨酰胺总量按公式（2）计算：

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times f \times 100}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X —— 试样中天冬酰胺总量、谷氨酰胺总量，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天冬酰胺、谷氨酰胺的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

ρ_0 —— 由标准曲线得到的空白试验溶液中目标化合物的浓度，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 —— 试样质量，单位为克（g）；

f —— 试样上清液稀释倍数；

100、1 000—— 单位换算系数。

计算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

当固体试样称样量为 0.2 g 时，方法检出限均为 20 mg/100 g；定量限均为 60 mg/100 g。
当液体试样称样量为 1.0 g 时，方法检出限均为 4.0 mg/100 g；定量限均为 12 mg/100 g。

第二法 液相色谱-串联质谱法

9 原理

试样经灰色链霉菌蛋白酶酶解，稀释后用液相色谱-串联质谱法测定，同位素内标法定量。

10 试剂和材料

除另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

10.1 试剂

10.1.1 甲酸（ CH_2O_2 ）：色谱纯。

10.1.2 甲醇（ CH_4O ）：色谱纯。

10.1.3 乙腈（ $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ）：色谱纯。

10.1.4 三羟甲基氨基甲烷（Tris 碱， $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$ ）。

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

10.1.6 浓盐酸（HCl）。

10.2 试剂配制

10.2.1 0.02%甲酸溶液：吸取0.2 mL甲酸，溶于1 L水中，混匀。

10.2.2 盐酸溶液 (1.0 mol/L)：同 3.2.2。

10.2.3 Tris 缓冲液 (0.05 mol/L)：同 3.2.3。

10.2.4 蛋白酶溶液 (52.5 U/mL)：同 3.2.4。

10.2.5 20% 甲醇溶液：同 3.2.8。

10.3 标准品

10.3.1 天冬酰胺标准品 ($C_4H_8N_2O_3$, CAS 号: 70-47-3)：同 3.3.1。

10.3.2 谷氨酰胺标准品 ($C_5H_{10}N_2O_3$, CAS 号: 56-85-9)：同 3.3.2。

10.3.3 天冬酰胺同位素内标 (天冬酰胺水合物- $^{15}N_2$, $C_4H_8^{15}N_2O_3 \cdot H_2O$, CAS: 287484-32-6)：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.3.4 谷氨酰胺同位素内标 (谷氨酰胺- $^{15}N_2$, $C_5H_{10}^{15}N_2O_3$, CAS: 204451-48-9)：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.4 标准溶液配制

10.4.1 天冬酰胺标准储备液 (2.00 mg/mL)：同 3.4.1。

10.4.2 谷氨酰胺标准储备液 (2.00 mg/mL)：同 3.4.2。

10.4.3 天冬酰胺- $^{15}N_2$ 内标标准储备液 (2.00 mg/mL)：准确称取 114 mg (精确至 0.0001 g) 天冬酰胺水合物- $^{15}N_2$ 标准品，用 20% 甲醇水溶解并定容至 50 mL。4 °C 避光保存，有效期 3 个月。

10.4.4 谷氨酰胺- $^{15}N_2$ 内标标准储备液 (2.00 mg/mL)：准确称取 100 mg (精确至 0.0001 g) 谷氨酰胺- $^{15}N_2$ 标准品，用 20% 甲醇水溶解并定容至 50 mL。4 °C 避光保存，有效期 3 个月。

10.4.5 同位素内标混合溶液 (天冬酰胺- $^{15}N_2$ 2.00 μ g/mL 和谷氨酰胺- $^{15}N_2$ 2.00 μ g/mL)：分别准确吸取 1.00 mL 天冬酰胺- $^{15}N_2$ 和 1.00 mL 谷氨酰胺- $^{15}N_2$ 储备液于 1 000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，现配现用。

10.4.6 混合标准中间液 (1.00 μ g/mL)：吸取浓度为 20.0 μ g/mL 的混合标准溶液 (3.4.3) 2.50 mL 用水定容至 50 mL，混匀。现配现用。

10.4.7 混合标准系列工作液：分别准确吸取适量混合标准中间液 (1.00 μ g/mL) 和 1.00 mL 同位素内标混合溶液 (10.4.5) 于 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀，即得浓度分别为 0.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 和 1 000 ng/mL 的混合标准系列工作液。现配现用。

10.5 材料

10.5.1 螺纹带盖玻璃瓶：20 mL。

10.5.2 水系微孔滤膜：0.22 μ m。

11 仪器和设备

11.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾 (ESI) 离子源。

11.2 电子天平：感量分别为 0.001 g 和 0.0001 g。

11.3 涡旋混合器。

12 分析步骤

12.1 试样制备

非粉状固体试样粉碎并混合均匀；粉状固体试样或液体试样摇匀。

12.2 试样提取

酶解：试样酶解过程同 5.2.2 酶解提取法中“准确称取混合均匀的固体试样约 0.2 g 或液体试样约 0.5 g（精确至 0.001 g）于 20 mL 螺纹带盖玻璃瓶中，……离心或者过滤得到试样清液。”

稀释：移取 200 μL 上述试样清液至 10 mL 容量瓶中，加入 1.00 mL 同位素内标混合溶液（10.4.5），用水定容至刻度。混匀后，经 0.22 μm 滤膜过滤，待测。

12.3 仪器条件

12.3.1 液相参考色谱条件

液相参考色谱条件如下：

- 色谱柱：亲水 C_{18} 色谱柱（150 mm \times 4.6 mm，2.6 μm ）或性能相当者。
- 流动相A：0.02%甲酸溶液；流动相B：乙腈；梯度洗脱程序见表2。
- 流速：0.3 mL/min。
- 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 进样体积：5 μL 。

表 2 梯度洗脱条件

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0.0	80	20
0.5	80	20
6.0	50	50
6.1	20	80
7.0	20	80
7.1	80	20
10.0	80	20

12.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 离子化模式：电喷雾正离子电离（ESI $^{+}$ ）。
- 扫描方式：多反应监测模式（MRM）。
- 雾化气温度：300 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 离子源温度：250 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 喷雾电压：3500 V。
- 鞘气流速：12.6 L/min。
- 辅助气流速：3.0 L/min。
- 天冬酰胺、谷氨酰胺及其内标物的定量和定性离子、碰撞能量和透镜电压参数见表

3。

注：对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

表 3 质谱参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)	透镜电压 (V)
天冬酰胺	132.9	73.9	15	54
	132.9	87.1*	10	54
谷氨酰胺	146.9	84.0*	16	61
	146.9	130.0	10	61
天冬酰胺- $^{15}\text{N}_2$	134.9	88.9*	10	55
谷氨酰胺- $^{15}\text{N}_2$	149.0	85.0*	10	61

注：“*”为定量离子；定性和定量离子可根据仪器进行调整。

12.4 标准曲线的制作

将标准混合系列工作液分别注入液相色谱-串联质谱仪中，以目标化合物与其同位素内标的峰面积比值为纵坐标，以标准系列工作液中目标化合物的浓度为横坐标，绘制标准曲线。标准溶液多反应监测（MRM）色谱图见附录 A 中图 A.2。

12.5 定性测定

在相同测试条件下，试样中的天冬酰胺和谷氨酰胺色谱峰保留时间与标准工作溶液相比，偏差范围在 $\pm 2.5\%$ 以内，且检测到的离子的相对丰度，应当与浓度相当的标准工作液相对丰度一致，其允许偏差不超过表4规定的范围。

表 4 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%	$\leq 10\%$
允许的相对偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

13 分析结果的表述

试样中天冬酰胺总量、谷氨酰胺总量按式（3）计算：

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times f \times 100}{m \times 1\,000 \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X ——试样中天冬酰胺总量、谷氨酰胺总量，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天冬酰胺、谷氨酰胺的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

ρ_0 ——由标准曲线得到的空白试验溶液中天冬酰胺、谷氨酰胺的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

V ——试样定容体积，单位为毫升 (mL)；

m ——试样质量，单位为克 (g)；

f ——试样上清液稀释倍数；

100、1 000 ——单位换算系数；

计算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

当固体试样称样量为 0.2 g 时，方法检出限均为 4.0 mg/100 g；定量限均为 12 mg/100 g。
当液体试样称样量为 1.0 g 时，方法检出限均为 0.8 mg/100 g；定量限均为 2.4 mg/100 g。

食品安全国家标准公开征求意见

附录 A

色谱图

天冬酰胺和谷氨酰胺标准溶液衍生物的典型液相色谱图见图 A.1。

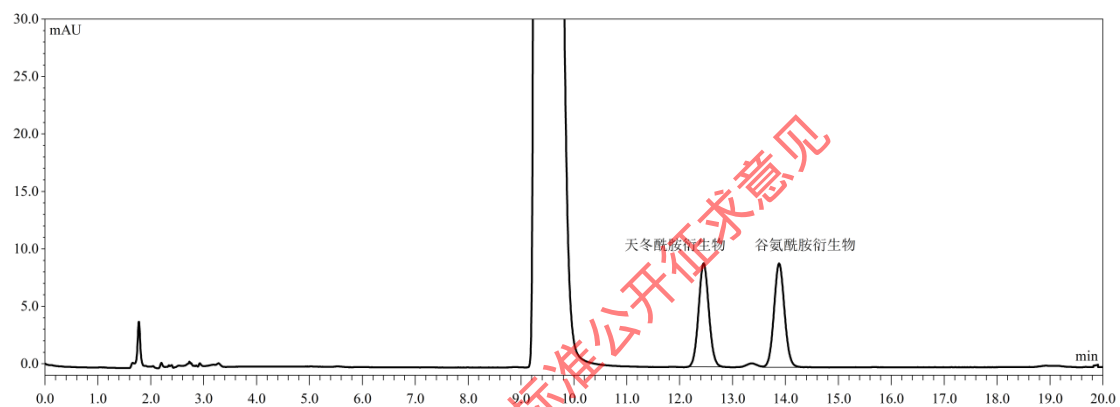


图 A.1 天冬酰胺和谷氨酰胺标准溶液衍生物的液相色谱图

天冬酰胺和谷氨酰胺标准溶液及其内标的液相色谱-串联质谱图见图 A.2。

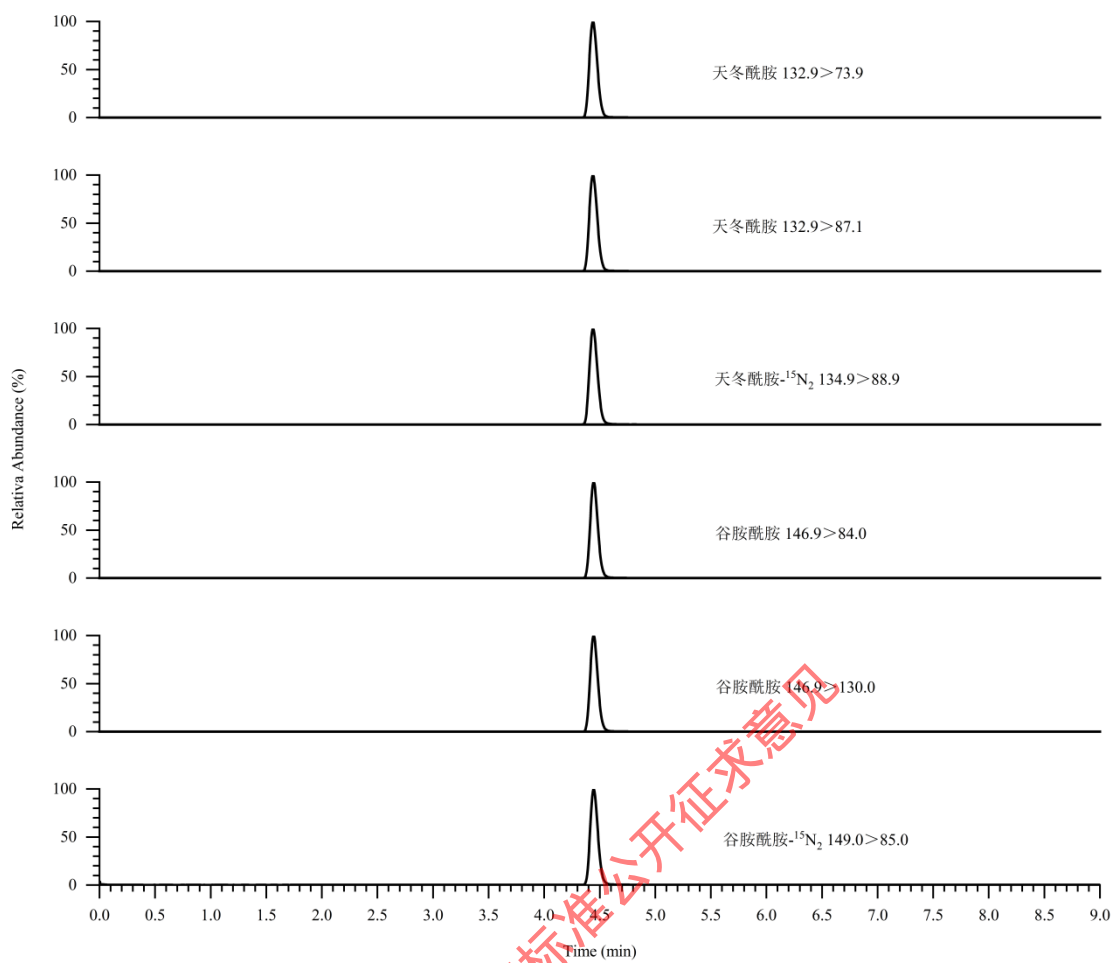


图 A. 2 天冬酰胺和谷氨酰胺标准溶液及其内标的液相色谱-串联质谱图