



中华人民共和国国家标准

GB 5009.309—2025

食品安全国家标准

食品中天冬酰胺和谷氨酰胺的测定

2025-09-02 发布

2026-03-02 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,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,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_3N):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 磷酸(H_3PO_4):色谱纯,含量 $\geq 85\%$ 。

3.1.10 浓盐酸(HCl)。

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 pH 至 8.0 ± 0.1 ,用水稀释至 1 000 mL。4℃ 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。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。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$,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品。

3.3.2 谷氨酰胺标准品($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$,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品。

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 0.000 1 g)天冬酰胺标准品,用 20%甲醇溶液溶解并定容至 50 mL。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 0.000 1 g)谷氨酰胺标准品,用 20%甲醇溶液溶解并定容至 50 mL。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 3 个月。

3.4.3 混合标准中间液(20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$):分别准确吸取天冬酰胺和谷氨酰胺标准储备液各 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)于 10 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,获得质量浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 0.000 1 g。

4.3 涡旋混合器。

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

4.5 pH 计:精度 0.01。

4.6 离心机:转速 $\geq 5\ 000\text{ r}/\text{min}$ 。

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

固体试样称取 5.0 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 干燥烧杯中,加适量温水(40 ℃~45 ℃)溶解,冷却至室温后转移并定容至 25 mL。准确移取 1.00 mL 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。

液体试样称取 1.0 g~5.0 g(精确至 0.001 g)于 150 mL 锥形瓶中,后续操作步骤同固体试样。

5.2.2 酶解提取法

固体试样称取 5.0 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 干燥烧杯中,加适量温水(40 ℃~45 ℃)溶解,冷却至室温后转移并定容至 25 mL。准确移取 1.00 mL 于 20 mL 螺纹带盖玻璃瓶中,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,于 37 ℃ 恒温水浴酶解 16 h。取出玻璃瓶,冷却至室温,将酶解液全部转移至 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。

液体试样称取 0.5 g~1.0 g(精确至 0.001 g)于 20 mL 螺纹带盖玻璃瓶中,后续操作步骤同固体试样。

5.3 衍生反应

准确吸取待衍生试样溶液 1.00 mL 至 15 mL 离心管中,加入 1.00 mL 碳酸钠缓冲溶液和 1.00 mL 丹磺酰氯溶液,充分混合,室温避光反应 2 h(反应约 1 h 时取出振摇均匀),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 1.00 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 仪器参考条件

色谱参考条件如下:

- 色谱柱: C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)或性能相当者;
- 流动相 A 为 10 mmol/L 磷酸氢二钠溶液,流动相 B 为甲醇,梯度洗脱条件见表 1;
- 流速: 1.0 mL/min;
- 柱温: 35 ℃;
- 检测波长: 247 nm;
- 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,以混合标准系列工作液中天冬酰胺或谷氨酰胺的质量浓度为横坐标,以天冬酰胺衍生物或谷氨酰胺衍生物的峰面积为纵坐标,分别绘制标准曲线。标准溶液衍生后的色谱图见附录 A 中图 A.1。

5.6 试样溶液的测定

将衍生后的待测液注入高效液相色谱仪中,得到相应的峰面积,根据标准曲线得到试样溶液中天冬酰胺或谷氨酰胺的质量浓度。待测液中目标化合物的响应值应在标准曲线线性范围内,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。

5.7 空白试验

除不加试样外,其他操作与样品的操作一致。

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:

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

式中:

X ——试样中游离态天冬酰胺、游离态谷氨酰胺的含量,单位为毫克每克(mg/g);

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中天冬酰胺、谷氨酰胺的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样最终定容体积,单位为毫升(mL);

f ——稀释因子;

m ——试样质量,单位为克(g);

1 000——单位换算系数。

计算结果保留 3 位有效数字。

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:

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

式中:

X ——试样中天冬酰胺总量、谷氨酰胺总量,单位为毫克每克(mg/g);

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中天冬酰胺、谷氨酰胺的质量浓度,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天冬酰胺、谷氨酰胺的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样最终定容体积,单位为毫升(mL);

f ——稀释因子;

m ——试样质量,单位为克(g);

1 000——单位换算系数。

计算结果保留 3 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 5.0 g 时,方法检出限均为 0.2 mg/g,定量限均为 0.6 mg/g;当液体试样称样量为 1.0 g 时,方法检出限均为 0.04 mg/g,定量限均为 0.12 mg/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($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$,CAS 号:70-47-3):同 3.3.1。

10.3.2 谷氨酰胺标准品($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$,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- $^{15}\text{N}_2$, $\text{C}_4\text{H}_8^{15}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$,CAS 号: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品。

10.3.4 谷氨酰胺同位素内标(谷氨酰胺- $^{15}\text{N}_2$, $\text{C}_5\text{H}_{10}^{15}\text{N}_2\text{O}_3$, CAS 号: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品。

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- $^{15}\text{N}_2$ 内标储备液(2.00 mg/mL):准确称取 114 mg(精确至 0.000 1 g)天冬酰胺水合物- $^{15}\text{N}_2$ 标准品,用 20%甲醇水溶解并定容至 50 mL。4℃避光保存,有效期 3 个月。

10.4.4 谷氨酰胺- $^{15}\text{N}_2$ 内标储备液(2.00 mg/mL):准确称取 100 mg(精确至 0.000 1 g)谷氨酰胺- $^{15}\text{N}_2$ 标准品,用 20%甲醇水溶解并定容至 50 mL。4℃避光保存,有效期 3 个月。

10.4.5 同位素内标混合溶液:分别准确吸取天冬酰胺- $^{15}\text{N}_2$ 和谷氨酰胺- $^{15}\text{N}_2$ 内标储备液各 1.00 mL 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 $\mu\text{g/mL}$):准确吸取 2.50 mL 质量浓度为 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液(3.4.3)于 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,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 $\mu\text{g/mL}$)和 1.00 mL 同位素内标混合溶液于 10 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀,即得质量浓度分别为 0 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。

注:可根据样品中实际质量浓度情况选择标准曲线范围,但至少包含 6 个质量浓度点(含 0 点)。

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 μm 。

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 0.000 1 g。

11.3 涡旋混合器。

11.4 恒温水浴装置:37℃ $\pm$ 1℃。

11.5 pH 计:精度 0.01。

11.6 离心机:转速 $\geq 5\,000$ r/min。

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。

稀释:准确移取 1.00 mL 上述待衍生试样溶液至 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。

注:可根据样品中实际浓度情况调整移取体积。

12.3 仪器参考条件

12.3.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：亲水改性 C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 2.6 μm)或性能相当者；
- b) 流动相 A 为 0.02% 甲酸溶液，流动相 B 为乙腈，梯度洗脱条件见表 2；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：35 ℃；
- e) 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：

- a) 离子化模式：电喷雾正离子电离(ESI⁺)；
- b) 扫描方式：多反应监测模式(MRM)；
- c) 雾化气温度：300 ℃；
- d) 离子源温度：250 ℃；
- e) 喷雾电压：3 500 V；
- f) 鞘气流速：12.6 L/min；
- g) 辅助气流速：3.0 L/min；
- h) 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。

表 3 质谱参数

化合物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV	透镜电压/V
天冬酰胺	132.9	73.9	15	54
		87.1 *	10	
谷氨酰胺	146.9	84.0 *	16	61
		130.0	10	
天冬酰胺- ¹⁵ N ₂	134.9	88.9 *	10	55
谷氨酰胺- ¹⁵ N ₂	149.0	85.0 *	10	61
定性和定量离子可根据仪器进行调整				
* 定量离子。				

12.4 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液分别注入液相色谱-串联质谱仪中,以混合标准系列工作液中天冬酰胺或谷氨酰胺的质量浓度为横坐标,以天冬酰胺或谷氨酰胺与其对应同位素内标的峰面积比值为纵坐标,分别绘制标准曲线。标准溶液多反应监测(MRM)色谱图见图 A.2。

12.5 试样溶液的测定

12.5.1 定性判定

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±2.5%以内,且检测到的离子的相对离子比率,应当与浓度相当的标准工作液相对离子比率一致。其允许偏差应符合表 4 的要求。

表 4 定性确证时相对离子比率的允许偏差范围

相对离子比率	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

12.5.2 定量测定

将待测液注入液相色谱-串联质谱仪中,得到相应的峰面积比值,根据标准曲线得到试样溶液中天冬酰胺或谷氨酰胺的质量浓度。

12.6 空白试验

除不加试样外,其他操作与样品的操作一致。

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:

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

式中:

- X —— 试样中天冬酰胺总量、谷氨酰胺总量,单位为毫克每克(mg/g);
 - ρ —— 由标准曲线得到的试样溶液中天冬酰胺、谷氨酰胺的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - ρ₀ —— 由标准曲线得到的空白试验溶液中天冬酰胺、谷氨酰胺的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 - V —— 试样最终定容体积,单位为毫升(mL);
 - f —— 稀释因子;
 - m —— 试样质量,单位为克(g);
 - 1 000 —— 单位换算系数。
- 计算结果保留 3 位有效数字。

14 精密度

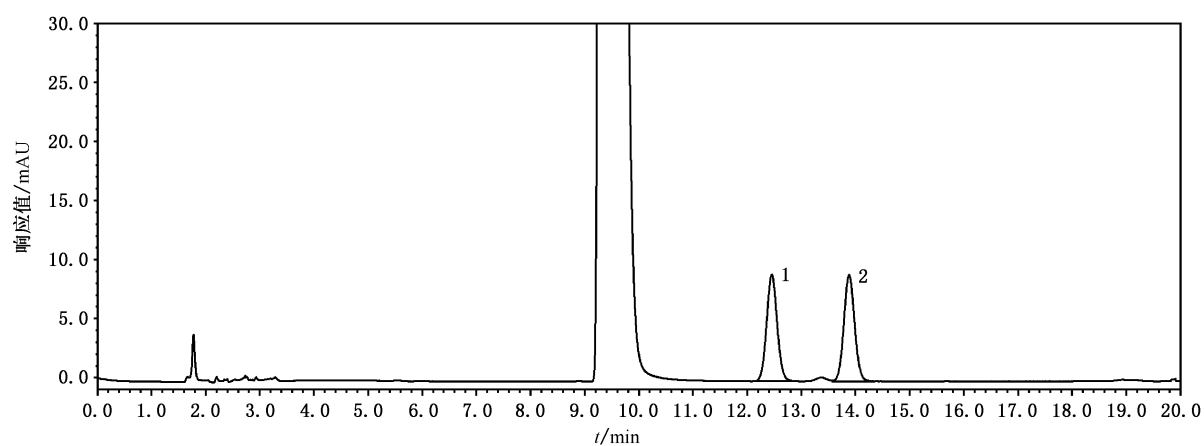
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

15 其他

当固体试样称样量为 5.0 g 时,方法检出限均为 0.04 mg/g,定量限均为 0.12 mg/g;当液体试样称样量为 1.0 g 时,方法检出限均为 0.008 mg/g,定量限均为 0.024 mg/g。

附录 A
色谱图

天冬酰胺和谷氨酰胺标准溶液衍生物的液相色谱图见图 A.1。



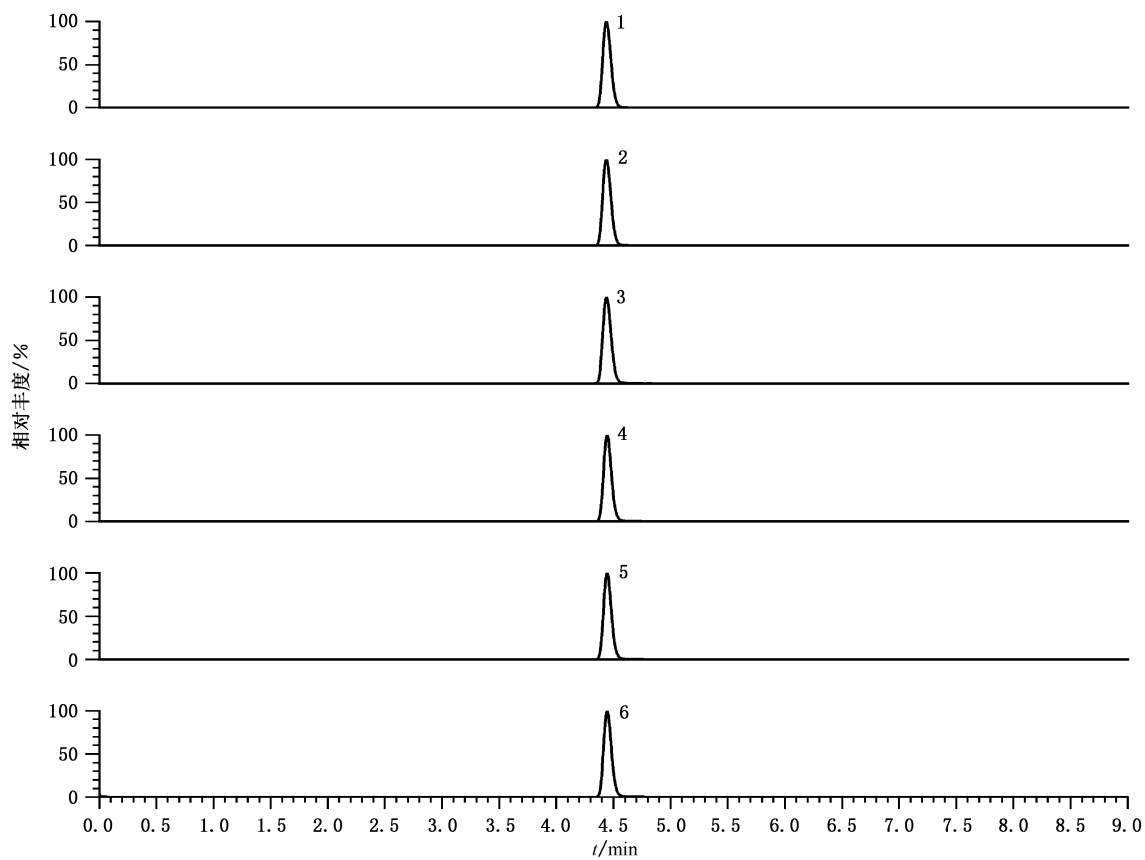
说明：

1——天冬酰胺衍生物；

2——谷氨酰胺衍生物。

图 A.1 天冬酰胺和谷氨酰胺(10 $\mu\text{g/mL}$)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 MRM 图见图 A.2。



说明：

- 1——天冬酰胺 132.9 > 73.9；
- 2——天冬酰胺 132.9 > 87.1；
- 3——天冬酰胺-¹⁵N₂ 134.9 > 88.9；
- 4——谷氨酰胺 146.9 > 84.0；
- 5——谷氨酰胺 146.9 > 130.0；
- 6——谷氨酰胺-¹⁵N₂ 149.0 > 85.0。

图 A.2 天冬酰胺和谷氨酰胺标准溶液及其内标(200 ng/mL)的液相色谱-串联质谱 MRM 图