

《食品安全国家标准 食品中酪蛋白磷酸肽的测定》（征求意见稿）编制说明

一、标准起草基本情况

本标准制定任务来源于国家卫生健康委员会委托制定的食品安全国家标准项目，由哈尔滨海关技术中心（原黑龙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心）、浙江清华长三角研究院、农业部谷物及制品质量监督检验测试中心（哈尔滨）负责起草 SPAQ-2016-176《食品安全国家标准 食品中酪蛋白磷酸肽的测定》。按照研究进度，标准起草小组于 2017 年 2 月至 6 月完成了方法的开发，7 月完成了实验室内部验证、标准文本和编制说明的撰写；8 月至 9 月组织了实验室间的验证工作。2017 年 12 月在方法验证的基础上，形成讨论稿，并通过信函的方式向有关机构和专家广泛征求意见，期间未收到重大分歧意见，经整理归纳后，形成送审稿。2021 年 7 月 14 日经第二届食品安全国家标准审评委员会理化检验方法与规程专业委员会第七次会议审查通过。

二、标准的主要技术内容

1. 技术路线确定

起草小组对现有原料进行了 HPLC 以及 HPCE 分析方法进行研发，从实际检测结果来看，主要存在特异性不强、灵敏度偏低以及样品前处理过程控制难度较大等主要问题，HPLC 及 HPCE 作为分析食品中酪蛋白磷酸肽的检测手段并不适用。

由于 CPP 的生产工艺主要是将牛乳酪蛋白的经水解、分离纯化而得到的一类富含磷酸丝氨酸的小分子肽，不同厂家的酶解工艺（动物蛋白酶、植物蛋白酶）不同导致 CPP 原料的肽段表现形式也各不相同，因此，在 HPLC 与 HPCE 方法建立过程中并未找到共有的特异性组分，这也可能与 HPLC 及 HPCE 技术自身灵敏度及定性手段的局限性有关。为了解决上述问题，起草小组通过技术论证决定采用 HPLC-QTOF 与 HPLC-MS/MS 相结合的方式开展食品中酪蛋白磷酸肽的检测方法研究工作。

首先，将牛乳酪蛋白的一级结构（ α -S1-casein、 α -S2-casein、Beta-casein、 κ -casein）中含有丝氨酸基团的肽段序列输入 ProteinPilotTM 数据库中，对 CPP 的原料进行 LC-QTOF，通过对采集数据的检索，寻找在丝氨酸基团上被磷酸化修饰的特异性肽段，利用 QTOF 的准确定性能力，解析特异性肽段的化学结构。经过 QTOF 定性确认的特异性肽段，再建立 LC-MS/MS 的 QQQ 分析方法，保证所建立方法的适用性和可操作性。

2. 方法原理及验证

本标准适用于婴幼儿配方食品、婴幼儿辅助食品、调制乳、风味发酵乳、固体饮料（含蛋白类）、粮食制品中酪蛋白磷酸肽的肽段的测定。

本标准从提取溶剂、提取次数、样品pH调节、色谱条件、质谱条件等方面对于酪蛋白磷酸肽的肽段的提取进行分析。最终选取用水溶解提取试样中酪蛋白磷酸肽的肽段组分，在pH 4.6条件下两次沉淀蛋白净化后，经液相色谱-质谱/质谱仪测定，外标法定量。

当固体或半固体样品取样量为 5g 时，本方法的检出限为 0.03 g/kg，定量限为 0.10 g/kg；当液体样品取样量为 10g 时，本方法的检出限为 0.02 g/kg，定量限为 0.05 g/kg。当酪蛋白磷酸肽的肽段的浓度在 5 µg/mL-60 µg/mL 范围内时，线性关系良好。实验平均回收率为 77.0%~110.1%，相对标准偏差为 1.7%~13.2%。

四家实验室间的方法验证结果指标均符合检测方法确认的技术要求。因此，本方法灵敏度高、准确性好、精密度高，可满足日常检测的要求。

三、国内外相关法规标准情况

目前，我国仅有 GB 31617-2014 《食品安全国家标准 食品营养强化剂 酪蛋白磷酸肽》中，对其商品化制剂的含量的检测方法，并不适用于食品中该物质肽段的检测。GB 14880-2012《食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准中酪蛋白磷酸肽》的适用范围及最大使用量见表 2。

标准起草小组在联合国粮农组织和世界卫生组织下的食品添加剂联合专家委员会（JECFA）和美国食品化学法典 Food Chemicals Codex（FCC）中均未查到相应的检测方法标准。

表 2 GB 14880-2012 对酪蛋白磷酸肽的规定

营养强化剂	食品分类号	食品类别	使用量
酪蛋白磷酸肽	13.01	婴幼儿配方食品	≤3.0 g/kg
	13.02	婴幼儿辅助食品	≤3.0 g/kg
	01.01.03	调制乳	≤1.6 g/kg
	01.02.02	风味发酵乳	≤1.6 g/kg
	06.0	粮食及粮食制品，包括大米、面粉、杂粮、淀粉等（06.01 及 07.0 涉及品种除外）	≤1.6 g/kg
	14.0	饮料类（14.01 涉及品种除外）	≤1.6 g/kg （固体饮料按冲调倍数增加使用量）

四、其他需要说明的事项

无。