



中华人民共和国国家标准

GB XXXX—XXXX

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)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-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

食品中酪蛋白磷酸肽的测定

1 范围

本标准规定了食品中酪蛋白磷酸肽的 2 种肽段测定方法。

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组分测定。

2 原理

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。

3 试剂和材料

水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

3.1.2 浓盐酸（HCl）：优级纯，质量分数为 37%。

3.1.3 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

3.2 试剂配制

3.2.1 盐酸溶液（1 mol/L）：量取 9.0 mL 浓盐酸，用水稀释至 100 mL，混匀。

3.2.2 甲酸溶液（0.5%）：量取 5.0 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL，混匀。

3.2.3 甲酸乙腈溶液（0.5%）：量取 5.0 mL 甲酸，用乙腈稀释至 1000 mL，混匀。

3.3 标准品

3.3.1 酪蛋白磷酸肽的肽段 1 标准品（序列：YKVPQLEIVPN_pSAEER，分子量 1951.0Da）：纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.2 酪蛋白磷酸肽的肽段 2 标准品（序列：IVPN_pSAEERLHSM，分子量 1561.8Da）：纯度≥98%，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 标准储备液（1000 μg/mL）：分别各准确称取酪蛋白磷酸肽的肽段 1 和酪蛋白磷酸肽的肽段 2 标准品约 10 mg（准确至 0.1 mg），用甲酸溶液溶解、转移至 10 mL 容量瓶中并定容至刻度，混匀。将溶液转移至棕色玻璃容器中，于 4℃ 避光保存，保存期 4 周。

3.4.2 混合标准中间液（100 μg/mL）：吸取标准储备液（1000 μg/mL）各 5.0 mL 至 50 mL 容量瓶中，用甲酸溶液定容至刻度，混匀。临用现配。

3.4.3 混合标准系列工作液：分别吸取混合标准中间液（100 μg/mL）0.5 mL、1 mL、2 mL、4 mL、和 6 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲酸溶液定容至刻度，混匀。混合标准系列工作液的浓度分别为 5.0

μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL 和 60 μg/mL。临用现配。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-质谱/质谱仪：配备电喷雾离子源（ESI）。

4.2 天平：感量分别为 0.01 g 和 0.0001 g。

4.3 pH 计：精度为 0.01。

4.4 涡旋混合器。

4.5 超声波发生器。

4.6 离心机：转速不低于 4500 r/min。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

5.1.1 试样制备

液态样品摇匀；基质均匀的固态样品和半固态样品直接测定。制备好的试样于 0℃~5℃ 保存，尽快测定。

5.1.2 试样提取

称取 5 g（精确至 0.01 g）固体或半固体试样或 10 g（精确至 0.01 g）液体试样于 100 mL 塑料离心管中，加入 40 mL 水将试样充分溶解，搅拌均匀后，超声处理 5 min。用盐酸溶液调节样品溶液 pH 至 4.60±0.05，超声处理 10 min 后，以 4500 r/min 转速离心 10 min，将上清液经滤纸过滤至 100 mL 容量瓶中。再向离心管中加入 25 mL 水，溶解沉淀后，漩涡振荡成均匀溶液，再次按上述方法调节 pH、离心、上清液滤纸过滤等重复操作并合并提取液后，用甲酸溶液定容至刻度。取 2 mL 上述待测液用 0.22 μm 滤膜过滤，供液相色谱-质谱/质谱仪检测。

5.1.3 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件列出如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 3.5 μm，或同等性能的色谱柱；
- b) 流速：0.30 mL/min；
- c) 柱温：40℃；
- d) 进样量：5 μL；
- e) 流动相 A：0.5% 甲酸水溶液；流动相 B：0.5% 甲酸乙腈溶液。梯度洗脱条件见表 1。

表1 梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.00	97.0	3.0
1.00	97.0	3.0
5.00	25.0	75.0
9.00	25.0	75.0
9.10	97.0	3.0
12.00	97.0	3.0

5.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件列出如下：

- a) 离子化方式：电喷雾电离；
- b) 离子源喷雾电压：5500 V；
- c) 离子源温度：500℃；
- d) 电离方式：ESI+；
- e) 检测方式：多反应监测，参数详见表 2。

表2 MRM的质谱参数

化合物 名称	双电荷母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
酪蛋白磷酸肽的肽段 1 (序列：YKVPQLEIVPNpSAEER)	976.5	882.3*	35
		784.4	25
酪蛋白磷酸肽的肽段 2 (序列：IVPNpSAEERLHSM)	781.9	675.8*	35
		626.8	37

注：*为定量离子。

5.3 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液从低浓度到高浓度分别注入液相色谱-质谱/质谱仪中，测定相应的峰面积。以标准溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。酪蛋白磷酸肽的肽段液相色谱-质谱/质谱图见附录 A 的图 A.1。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱-质谱/质谱仪中，测得峰面积，根据标准曲线得到待测液中酪蛋白磷酸肽的肽段的浓度。

6 分析结果的表述

试样中酪蛋白磷酸肽的肽段的含量由公式 (1) 计算：

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

式中：

X——试样中酪蛋白磷酸肽的肽段的含量，单位为克每千克 (g/kg)；

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中酪蛋白磷酸肽的肽段的浓度，单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$)；

V ——试样溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的取样量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

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 15%。

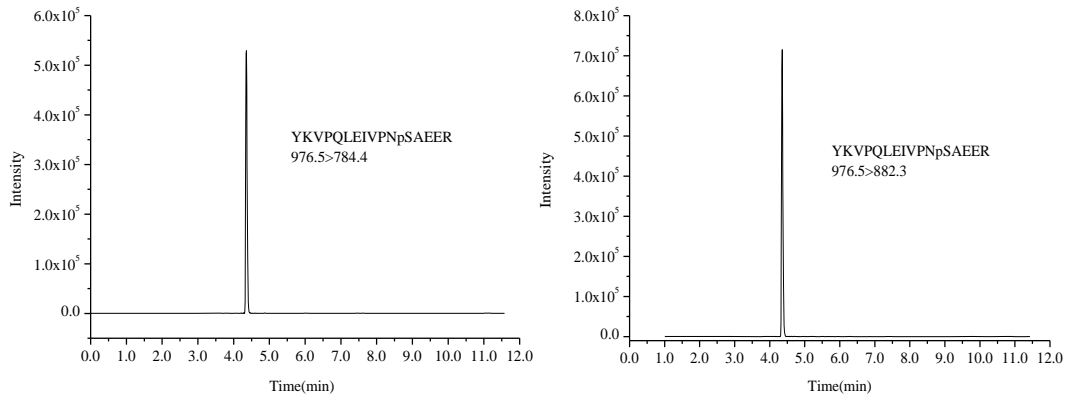
8 其他

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。

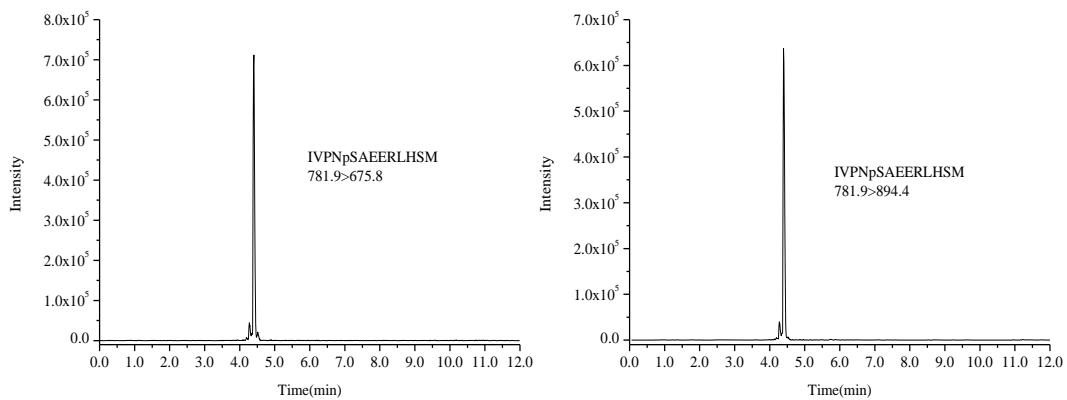
附录 A

酪蛋白磷酸肽的肽段液相色谱-质谱/质谱图

A.1 酪蛋白磷酸肽的肽段液相色谱-质谱/质谱图见图 A.1。



a) 酪蛋白磷酸肽的肽段 1 (序列: YKVPQLEIVPNpSAEER) 标准溶液选择离子流图



b) 酪蛋白磷酸肽的肽段 2 (序列: IVPNpSAEERLHSM) 标准溶液选择离子流图

图A.1 酪蛋白磷酸肽的肽段标准溶液 (10.0 μ g/mL) 的液相色谱-质谱/质谱图