

中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA 00X—20XX

特殊医学用途乳蛋白部分水解、乳蛋白深度水解和氨基酸配方食品中肽分子量分布 表征(征求意见稿)

Characterization of molecular weight distribution of peptides in partially hydrolyzed formulas, extensively hydrolyzed formulas and amino acid-based formulas

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国营养保健食品协会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由北京市食品检验研究院（北京市食品安全监控和风险评估中心）提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：北京市食品检验研究院（北京市食品安全监控和风险评估中心）。

本文件主要起草人：林立、孙海波、葛鸽、李林、齐云肖、邵明媛、钟丽君。

本文件是首次发布。

特殊医学用途乳蛋白部分水解、乳蛋白深度水解和氨基酸配方食品中肽分子量分布表征

1. 范围

本标准规定了特殊医学用途配方食品中肽分子量分布的表征方法。

本标准适用于特殊医学用途（特医）乳蛋白部分水解、乳蛋白深度水解和氨基酸配方食品中肽分子量分布情况表征。

2. 原理

乳蛋白部分水解、乳蛋白深度水解和氨基酸配方等特医食品经氢氧化钠溶液提取，静置后 pH 值调回 7.0，采用高效体积排阻色谱法依据分子体积大小的差别进行分离，在紫外吸收波长 220 nm 条件下检测，使用面积归一化法计算各肽段的分布范围。

3. 试剂和材料

除非另有说明，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 乙腈 (C₂H₃N)：色谱纯。

3.1.2 三氟乙酸 (CF₃COOH)：色谱纯。

3.1.3 盐酸 (HCl)。

3.1.4 氢氧化钠 (NaOH)。

3.2 试剂配制

3.2.1 流动相：量取 300 mL 乙腈加入 700 mL 水，混匀后加入 1 mL 三氟乙酸，混合后超声 30 min。

3.2.2 盐酸溶液 (2 mol/L)：量取 10 mL 盐酸加入约 50 mL 水，混匀。

3.2.3 氢氧化钠溶液 (2 mol/L)：称取 8 g 氢氧化钠，溶于水并稀释至 100 mL，混匀。

3.3 蛋白相对分子量标准品

3.3.1 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 [相对分子质量 (MW) 189]。

3.3.2 甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW 451)。

3.3.3 杆菌肽 (MW 1422)。

3.3.4 胸腺肽 alpha 1 (MW 3108)。

3.3.5 抑肽酶 (MW 6512)。

3.3.6 10 kDa 蛋白标准品 (MW 10000)。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 蛋白相对分子质量标准品溶液：称取各蛋白相对分子质量标准品1 mg，用一级水配制成约1 mg/mL 的标准溶液，置于样品瓶中待测。

3.5 材料

3.5.1 水性滤膜针头过滤器：0.45 μm 。

4. 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪：配 DAD 检测器和 GPC 数据处理软件。

4.2 分析天平：感量 0.1 mg。

4.3 pH 计：精度为 0.01。

4.4 冷冻离心机：转速不低于 10000 r/min，4 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.5 旋涡混合器。

5. 分析步骤

5.1 样品前处理

称取约0.3 g（精确至0.1 mg）试样于50 mL离心管中，蛋白浓度约为1.5 mg/mL，加入30 mL一级水，涡旋混匀后，用2 mol/L氢氧化钠溶液调至pH 12.0 \pm 0.1。静置90 min后，用2 mol/L盐酸溶液调回至pH 7.0 \pm 0.1，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下10000 r/min离心20 min，用注射器吸取清液过0.45 μm 水性滤膜，收集滤液至样品瓶，备用。

5.2 仪器参考条件

a) 色谱柱：凝胶色谱柱 TSKgel G2000SWXL 30 cm \times 7.8 mm，5 μm 及其保护柱 TSKgel guardcolumn SWXL 4 cm \times 6 mm，7 μm ，或性能相当者；

b) 流动相：乙腈+水+三氟乙酸=30+70+0.1（体积比）；

c) 流速：0.5 mL/min；

d) 柱温：25 $^{\circ}\text{C}$ ；

e) 进样量：10 μL ；

f) 检测器波长：220 nm；

g) 洗脱时间：30 min。

5.3 标准曲线的制作

将各蛋白相对分子质量标准品溶液注入高效液相色谱仪中，以标准品的相对分子质量的对数（lgMW）为横坐标，保留时间为纵坐标绘制标准曲线。蛋白相对分子质量标准品的高效液相色谱图和标准曲线参见附录 A.1-A.2。

5.4 空白实验

向同体积的一级水中分别等量添加用于调节样品 pH 值的氢氧化钠溶液和盐酸溶液，作试剂空白，混匀后注入高效液相色谱仪中进行检测。

5.5 试样溶液的测定

将试样溶液和空白溶液分别注入高效液相色谱仪中进行检测。根据标准曲线得到各肽段的保留时间，划分各肽段的相应峰面积。特医乳粉的总峰面积应扣除空白溶液的出峰面积。乳蛋白部分水解、乳蛋白深度水解和氨基酸配方特医乳粉的肽分子量分布图及空白溶液色谱图参见附录 A.3-A.6。

6. 分析结果的表述

各肽段质量分数可按照公式（1）计算。

$$X = \frac{Y}{Y_{\text{总}}} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中特定肽段占总肽段的质量分数，%；

Y —— 试样中特定肽段的峰面积；

$Y_{\text{总}}$ —— 试样在 30 min 内总峰面积，应扣除试剂空白相应的峰面积。

计算结果保留小数点后一位。

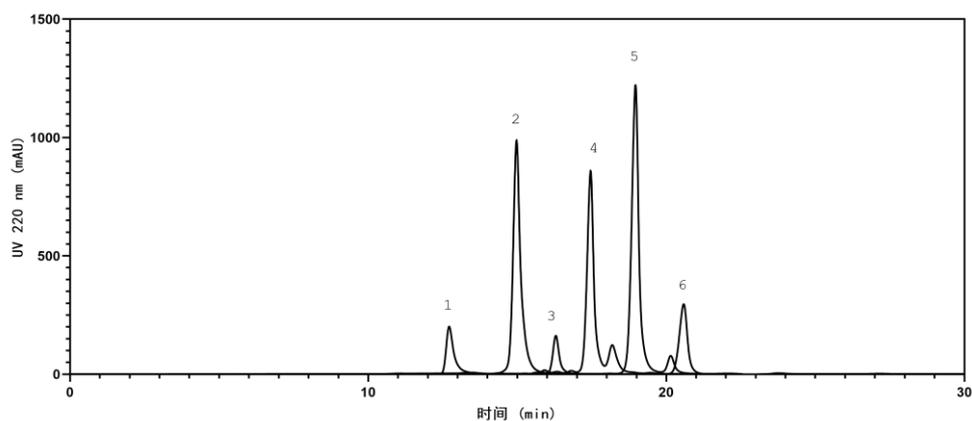
7. 精密度

在重复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 5%。

附录 A

蛋白相对分子质量标准品和各典型样品色谱图

蛋白相对分子质量标准品的色谱图见图 A.1。



1: 10 kDa 蛋白标准品, 12.72 min 2: 抑肽酶, 14.98 min 3: 胸腺肽 alpha 1, 16.29 min 4: 杆菌肽, 17.46 min 5: 甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸, 18.97 min 6: 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸, 20.59 min。

图 A. 1 蛋白相对分子质量标准品色谱图

蛋白相对分子质量标准曲线见图 A.2。

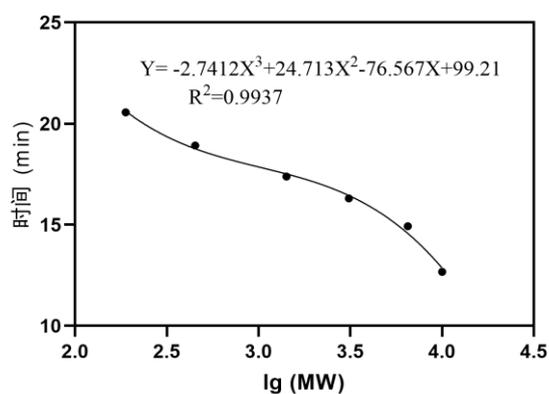


图 A. 2 蛋白相对分子质量标准曲线

典型乳蛋白部分水解、乳蛋白深度水解和氨基酸配方特医乳粉的色谱图见图 A.3-A.5。

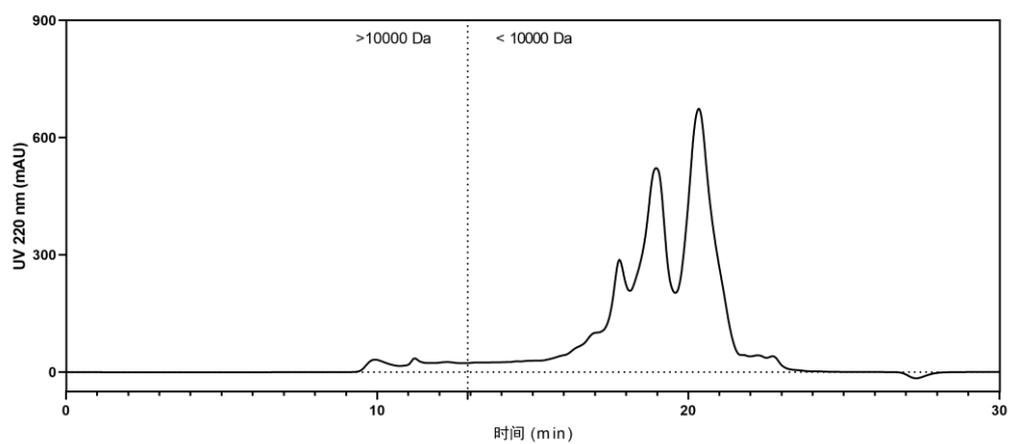


图 A. 3 乳蛋白部分水解配方特医乳粉肽分子量分布图

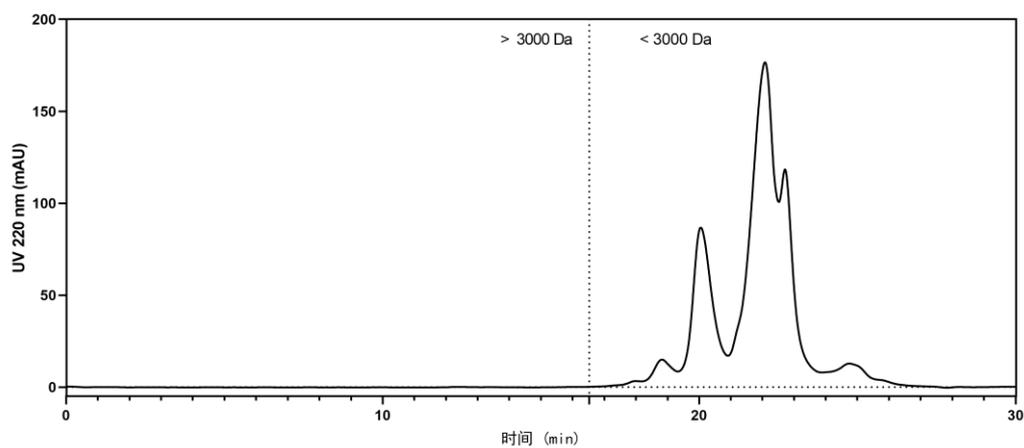


图 A. 4 乳蛋白深度水解配方特医乳粉肽分子量分布图

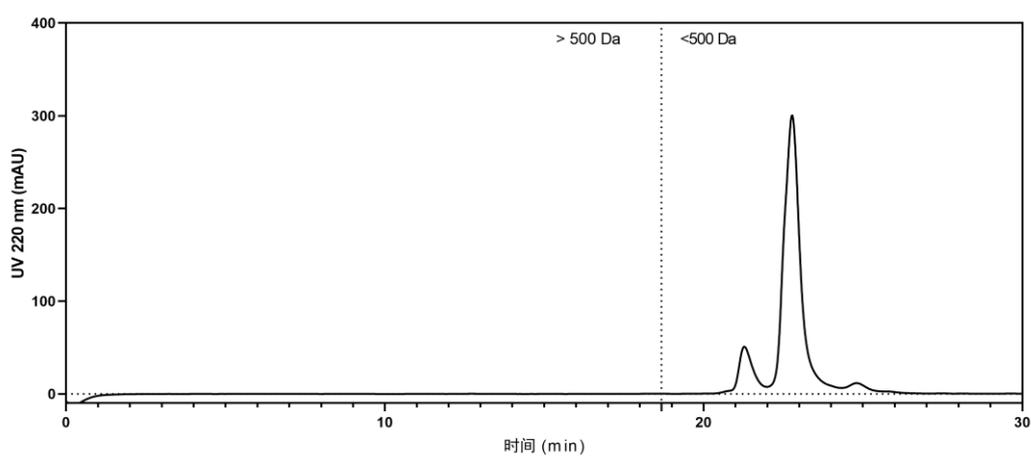


图 A. 5 氨基酸配方特医乳粉肽分子量分布图

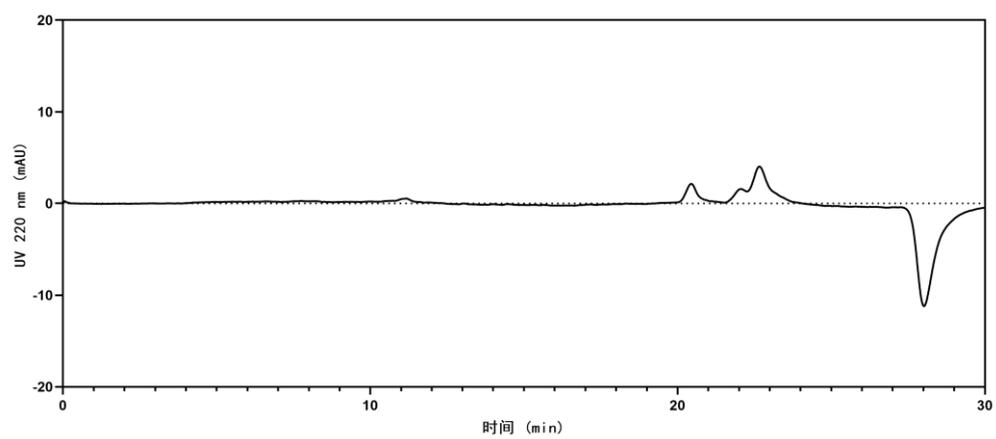


图 A. 6 空白溶液色谱图

附录 B

蛋白相对分子质量标准品信息（推荐）

表 B.1 蛋白相对分子质量标准品信息

标准品名称	分子量 (Da)	生产商	货号	纯度 (%)
乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸	189	源叶生物	S31648	98
甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸 (CAS: 70195-20-9)	451	源叶生物	B27839	96
杆菌肽(CAS: 1405-87-4)	1422	Dr. Ehrenstorfer	C10418000	81.9
胸腺肽 alpha 1(CAS: 62304-98-7)	3108	源叶生物	S80848	96
抑肽酶(CAS: 9087-70-1)	6512	源叶生物	S10089	/
10 kDa 蛋白标准品	10000	AB SCIEX	A26487	/