

《中国营养保健食品协会团体标准 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乳粉中肽分子量分布表征》编制说明

一、标准起草基本情况

本标准制定任务来源于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乳粉中肽分子量分布的测定项目。北京食品检验研究院(北京市食品安全监控和风险评估中心)于2020年12月22日与中国营养保健食品协会签订任务书,于2021年3月起开展《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乳粉中肽分子量分布的测定》检测方法的制定工作,并进行方法学研究。2021年3月-8月广泛收集、阅读、研究国内外相关方法、标准和文献资料,确定技术路线,并深入相关检测机构,了解相关标准的实施情况及存在的问题,同时购买相关标准物质、色谱柱、安装GPC数据采集分析系统等,为后续研究工作奠定基础。2021年9月-2022年5月进行方法的研究和开发、方法学验证及样品检测,包括标准品的选择和标准曲线的检测、前处理方法的选择和优化、色谱条件的选择和优化、计算方法确定、检测的精密度、回收率以及实际样品的检测等。2022年6月-8月起草制定《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乳粉中肽分子量分布的测定》实验室间验证报告、标准文本及编制说明初稿。2022年9月-2023年1月组织实施方法实验室间验证工作,同时向15家单位发出征求意见,共收到8家单位的回函,其他单位回复无意见。2023年2月根据意见回复以及验证结果进一步修正和改进标准文本和编制说明。2024年3月开展中期答辩会,根据专家意见进一步修改和改进标准文本和编制说明的相关内容。

参考《GB 25596-2010 特殊医学用途婴儿配方食品通则》对蛋白质过敏特殊医学状况的要求,确定了本标准的适用范围,并据此确定了技术路线和方法性能参数,进行了相应的标准化研究,通过方法学指标验证确认了本标准的合理性。

二、标准的主要技术内容

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,适用于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情况表征。针对配套标准的适用范围,选取了多种特医乳粉基质的样品进行方法学的研究,同时开展了包括样品前处理方法、测定条件的选择等实验环节和方法性能指标的研究,技术路线为乳蛋白部分水解、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。具体前处理条件为: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±0.1。静置 90 min 后, 用 2 mol/L 盐酸溶液调回至 pH 7.0±0.1, 在 4 °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。最终确定的色谱条件为: a) 色谱柱: TSKgel G2000SWXL 30 cm × 7.8 mm, 5 μm 及其保护柱 TSKgel guardcolumn SWXL 4 cm × 6 mm, 7 μm, 或性能相当者。b) 流动相: 乙腈+水+三氟乙酸 (体积比为 30+70+0.1); c) 流速: 0.5 mL/min; d) 柱温: 25 °C; e) 进样量: 10 μL; f) 检测器波长: 220 nm; g) 洗脱时间: 30 min。本方法邀请了三家实验室进行实验室间验证, 蛋白加标回收率为 93.8%-102.5%, 精密度 RSD 为 0.2%-1.6%。

三、国内外相关法规标准情况

目前国内尚无针对特殊医学用途婴儿配方乳粉中蛋白质/肽分子量分布测定的方法。与肽分子量分布测定相关的共有七项国家标准和行业标准, 其中包含了胶原蛋白肽、大豆肽、海洋鱼低聚肽、淡水鱼胶原蛋白肽、小麦低聚肽粉共5大类多肽的检测方法, 其相关标准的肽段检测范围均在10 kDa以内。该类方法均采用高效体积排阻色谱法和高效凝胶过滤色谱法, 都是以多孔性填料为固定相, 依据样品组分分子体积大小的差别进行分离的一种方法, 流动相采用乙酸-三氟乙酸或缓存盐体系, 在肽键的紫外吸收波长220 nm条件下检测, 使用相对分子质量分布测定的专用数据处理软件 (GPC软件), 对色谱图及数据进行处理, 从而得到肽分子量大小及分布范围。为更好的落实《“健康中国2030”规划纲要》和《国民营养计划 (2017—2030年)》, 建立特殊医学用途婴儿配方乳粉中蛋白质/肽分子量分布测定的方法具有重大意义。

国际食品法典委员会 (Codex Alimentarius Commission, CAC) 在Codex Stan 72-1981中规定了部分水解乳蛋白可作为普通婴儿配方乳粉原料, 深度水解乳蛋白可作为特殊医学用途配方食品的原料。截至目前, 国内外尚未形成部分水解蛋白和深度水解蛋白的定义及二者不同的蛋白质/肽分子量大小区别的一般性共识。欧洲国家欧盟委员会要求PHF乳粉中肽段分子量范围在3-10 kDa, 大部分肽段应小于5 kDa; 要求EHF乳粉中小于3 kDa的肽段和游离氨基酸的质量分数大于90%。美国儿科学会 (American Academy of Pediatrics, AAP) 要求PHF乳粉中肽段分子量均应小于5 kDa; 要求EHF乳粉中小于3 kDa的肽段占比应大于90%。英国过敏和临床免疫学学会 (British Society for Allergy and Clinical Immunology, BSACI) 则要求EHF乳粉中肽段分子量小于1 kDa。

四、其他需要说明的事项

无。