

高效液相色谱法测定钙片中酪蛋白磷酸肽的含量

张帅^{1,2}, 刘飞³, 罗珍³, 郭斌³, 彭维⁴, 曹庸²

(1.肇庆学院化学化工学院, 广东肇庆 526061) (2.华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

(3.无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665) (4.广州医科大学公卫学院, 广东广州 510182)

摘要:采用高效液相色谱(HPLC)法测定了5种钙片中酪蛋白磷酸肽(CPP)的含量。在流动相为水+1%TFA(水相)和乙腈+1%TFA(有机相),检测波长215 nm,流速1 mL/min,进样体积10 μ L下,通过HPLC色谱图分析,优选了梯度洗脱条件为有机相5%~35%,45 min。在此条件下,CPP分离效果良好,回收率介于96.75%~104.07%,比较接近真实值,说明这5种钙片中CPP添加效果良好。同时,结果也表明,HPLC法处理快速简便,准确度和灵敏度较高,检测限为6.81 μ g/mL,可作为检测钙片中CPP含量的优良方法。另外,为了将HPLC法与其他检测方法进行比较,还采用应用较普遍的钡-乙醇沉淀法对相同的5种钙片中的CPP含量进行了测定,结果表明,5种钙片样品中的CPP回收率均超过了220%,偏差较大,因而此法不宜作为钙片中CPP的检测方法。

关键词:酪蛋白磷酸肽;高效液相色谱;钙片;梯度洗脱;回收率

文章编号:1673-9078(2014)7-258-262

Determination of Casein Phosphopeptides in Calcium Tablets by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Shuai^{1,2}, LIU Fei³, LUO Zhen³, GUO Bin³, PENG Wei⁴, CAO Yong²

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China) (2.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (3.Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510665, China) (4.Institute of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

Abstract: The contents of casein phosphopeptides (CPP) from five kinds of calcium tablet were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) method. Mobile phase, detection wavelength, velocity and injection volume were the mixture of 1% TFA aqueous solution and 1% TFA acetonitrile solution, 215 nm, 1 mL/min, and 10 μ L, respectively. The optimal condition of gradient elution was obtained by HPLC chromatogram analysis as organic phase of 5%~35% and elution for 45 min. Under the optimal conditions, CPP can be well separated, and its recovery was between 96.75%~104.07%, which was close to the true value. This method was proved to be simple with high accuracy and sensitivity, and its detection limit was 6.81 μ g/mL, which could be regarded as an excellent method to determine CPP in calcium tablets. In order to compare this HPLC method with the other methods, Barium-ethanol precipitation was used to determine the CPP contents in the same five calcium tables. Result showed that the recoveries of CPP in five samples were all more than 220%, which was inappropriate to determine the content of CPP in calcium tablets for the great deviation.

Key words: casein phosphopeptides; high performance liquid chromatography; calcium tablets; gradient elution; recovery

酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides, CPP),是以牛乳酪蛋白为原料,经特定蛋白酶水解、分离纯化得到的含有磷酸丝氨酸簇的天然生物活性短肽^[1],其核心结构一般表示为:-Pse-Pse-Pse-Glu-Glu-(Pse表示磷酸丝氨酸残基)^[2]。CPP可在小肠中性至弱碱性环境中通过其磷酸丝氨酸簇与钙螯合成可溶性钙盐,

收稿日期:2013-12-24

基金项目:广东省产学研合作企业科技特派员工作站项目(1333010400002)

作者简介:张帅(1978-),男,硕士,副教授,研究方向为食品化学

通讯作者:曹庸(1966-),男,博士,教授,研究方向为天然活性产物及功能性食品

阻止磷酸钙沉淀的生成,保持钙的溶解状态并促进钙在小肠壁吸收,故又称为促钙吸收因子^[3-4]。除钙元素外, CPP还能促进机体肠黏膜对铁、锌及硒元素的吸收和利用,故又被誉为“矿物质载体”^[5]。另外, CPP还具有促进动物体外受精、增强机体免疫力、促进肿瘤细胞凋亡及促进体内益生菌增殖等生理作用^[6]。CPP是迄今为止发现的唯一具有促进钙吸收作用的活性肽,日本和德国已将 CPP列入重点推荐的功能性食品,我国也将 CPP作为食品添加剂广泛应用于婴幼儿奶粉和保健食品中^[1,7]。

据文献报道,关于产品中 CPP含量的测定方法较

多,如钡-乙醇沉淀法^[8]、高效毛细管区带电泳法(HPCE)^[9~10]以及高效液相色谱法(HPLC)^[1, 11~12]等,此外庞广昌等^[13]还采用 SDS-PAGE、IEF 和测定产品中的磷酸含量等方法对产品中 CPP 进行了定量测定,但迄今国内尚无权威的、统一的检测方法。目前,随着仪器分析技术的发展,HPLC 法因其具有方便、快捷、准确度和灵敏度高等其他方法无法比拟的优点,已逐渐成为测定产品中 CPP 含量的主要方法。钙片是一种常用的补钙保健品,钙片在加工过程中常添加一定量的 CPP,用于促进钙的吸收,但添加效果即产品钙片中的 CPP 实际含量有待确定。本研究采用 HPLC 法和钡-乙醇沉淀法首次对保健品钙片中的 CPP 含量进行了测定,并对检测结果进行了分析和对比,不仅为钙片中 CPP 的含量测定提供了一条便捷可行的有效方法,而且对于指导同类产品中 CPP 含量的检测具有一定参考价值。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器设备料

1.1.1 原料与试剂

钙片,共 5 种(1#,批号 20121201;2#,批号 20121202;3#,批号 20121203;4#,巧克力味;5#,橘子味),各种钙片在生产过程中均添加了一定量的 CPP,将钙片碾成粉末后作为待测样品装袋密封后备用;酪蛋白磷酸肽(CPP),广州绿萃生物科技有限公司,纯度为 95%;实验用水均为超纯水,乙腈和三氟乙酸(TFA)为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

日本岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪,配有 SPD-10A 紫外检测器,岛津公司;迪马 C₁₈反相硅胶液相色谱柱(5 μ m,4.6 \times 250 mm),迪马公司;KQ-250 台式超声波清洗器,苏州江东精密仪器有限公司;TDL-16C 型高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;DHG-9030A 型电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;G5 砂芯漏斗。

1.2 实验方法

1.2.1 HPLC 法

高效液相色谱(HPLC),根据使用的固定相和流动相极性不同,分为正相液相色谱(NP-HPLC)和反相液相色谱(RP-HPLC)。NP-HPLC 是指以亲水性(极性)填料作为固定相,以疏水性溶剂(非极性)作为流动相的液相色谱;RP-HPLC 是指以疏水性(非极性)填料作为固定相,以亲水性(极性)溶剂作为流动相

的液相色谱^[14]。RP-HPLC 目前多以硅胶基质键合 C₁₈ 或 C₈ 烷基作为固定相,是 HPLC 最重要和最普遍的一种模式。小分子物质 CPP 即是利用 RP-HPLC 法测定,以 CPP 标准品保留时间定性,外标法定量。

1.2.1.1 酪蛋白磷酸肽(CPP)标准母液的配制

准确称取 CPP 标准品 100 mg,加适量超纯水使其完全溶解,定容至 100 mL 棕色容量瓶中,浓度为 1 mg/mL。标准液须当天配置,72 h 内有效,冰箱 4 $^{\circ}$ C 保存,临用时稀释至不同浓度。

1.2.1.2 样品液的配制

准确称取 1.00 g 样品,超纯水溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,过 0.3 μ m 有机微孔滤膜后待测。

1.2.1.3 色谱条件的选择

SPD-10A 紫外检测器,CBM-10A 控制器,流动相为水+1% TFA(水相)和乙腈+1% TFA(有机相),检测波长 215 nm,室温下,流速 1 mL/min,进样体积 10 μ L。采用二元高压梯度洗脱,依据前期的预实验和经验积累设置梯度洗脱条件并进行优选。

1.2.1.4 标准曲线的制作

取 CPP 标准母液,分别配制成浓度为 0.05 mg/mL、0.10 mg/mL、0.20 mg/mL、0.30 mg/mL 及 0.40 mg/mL 的 CPP 标准液,在最优梯度洗脱条件下进行 HPLC 检测,以各浓度 CPP 标准液色谱图的峰面积为纵坐标,以相应浓度为横坐标,制作 CPP 的 HPLC 检测标准曲线。

1.2.2 钡-乙醇沉淀法

采用应用较普遍的钡-乙醇沉淀法测定钙片中 CPP 含量,并与 HPLC 法进行对比分析。钡-乙醇沉淀法是指在一定浓度的 CPP 溶液中加入 Ba²⁺离子,使 CPP 分子间通过 Ba²⁺离子形成桥连,然后再加入一定浓度的乙醇,使桥连状的 CPP 沉淀,再将 CPP 沉淀分离、干燥并称重,便可计算产品中 CPP 含量^[1]。参照陈雪香^[15]的方法并加以改进:准确称取 2.00 g 样品并充分溶于 20 mL 水中,盐酸调 pH 值至 4.6,于 8000 r/min 离心 15 min,取上清液,NaOH 溶液调 pH 值至 6.8,然后移入 50 mL 比色管中,加入 4.5 mL 10% 氯化钡溶液,水定容至 25 mL,再以无水乙醇定容至 50 mL。4 $^{\circ}$ C 下静置 24 h 后用已干燥恒重的 G5 砂芯漏斗抽滤,用 20 mL 50% 乙醇洗涤比色管及沉淀物 3 次,继续抽滤至滤液澄清。将装有沉淀物的 G5 砂芯漏斗于 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 法测定结果

2.1.1 最优梯度洗脱条件

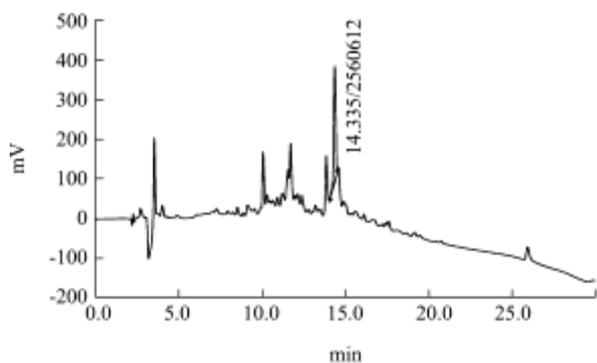


图1 条件1下 CPP 标准液的 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of CPP standard liquid under condition 1

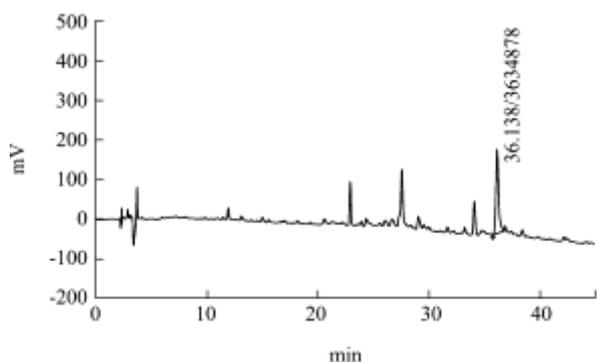


图2 条件2下 CPP 标准液的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of CPP standard liquid under condition 2

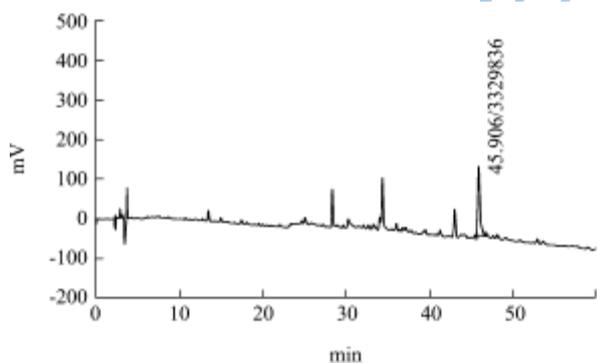


图3 条件3下 CPP 标准液的 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of CPP standard liquid under condition 3

配制 5 mg/mL 的 CPP 标准液待测。设置 HPLC 梯度洗脱条件分别为：有机相 10%~50%，20 min（条件 1）；有机相 5%~35%，45 min（条件 2）；有机相 5%~35%，60 min（条件 3）；有机相 5%~35%，75 min（条件 4）；有机相 10%~40%，45min（条件 5）。上述梯度洗脱条件下，所得 CPP 标准液 HPLC 检测色谱图分别见图 1~图 5。

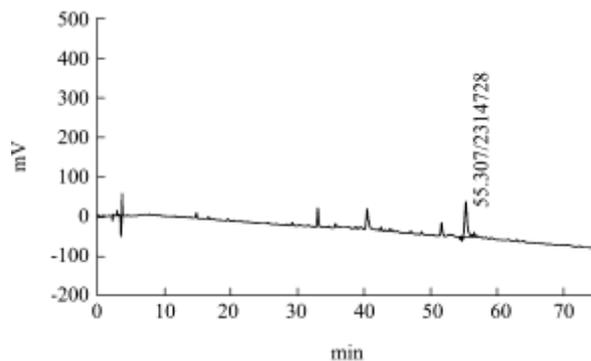


图4 条件4下 CPP 标准液的 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of CPP standard liquid under condition 4

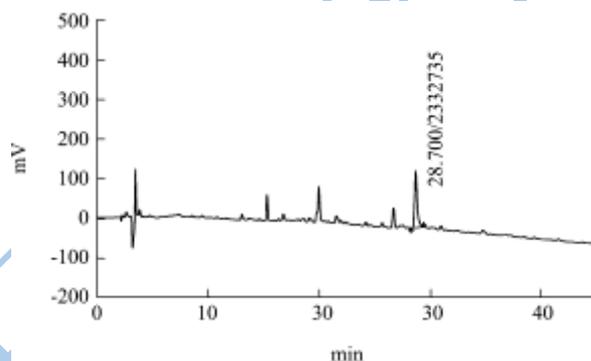


图5 条件5下 CPP 标准液的 HPLC 色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of CPP standard liquid under condition 5

由以上色谱图可以看出，条件 1 下的 CPP 分离效果较差（色谱峰密集），未达到分离的目的，影响结果分析；条件 5 下的 CPP 分离效果比条件 1 下的 CPP 分离效果好，与条件 2 下的 CPP 分离效果接近，但条件 5 下有毒溶剂乙腈的用量多于条件 2；条件 2 下的 CPP 分离效果与条件 3 和条件 4 下的 CPP 分离效果相差不大，但后两种条件下分离时间较长，工作效率低。因此，综合考虑 CPP 分离效果、分离时间及乙腈用量三个因素，确定条件 2，即有机相 5% 到 35%，45 min，为最优梯度洗脱条件。

2.1.2 标准曲线

在最优梯度洗脱条件即有机相 5%~35%，45 min（条件 2）下，分别对 CPP 不同浓度标准液进行 HPLC 测定，色谱图见图 6，建立的标准曲线见图 7。曲线回归方程为 $y=6.84193e+5x-0.50573$ ，决定系数 $R^2=0.99937$ ，表明该曲线拟合良好。

2.1.3 回收率

5 种钙片样品经碾碎处理后，配制成一定浓度的溶液，在最优梯度洗脱条件下测定各样品液中 CPP 含量。HPLC 色谱图见图 8。根据标准曲线回归方程，

可由峰面积计算出各样品液中的 CPP 检测浓度,从而计算出各样品中 CPP 的回收率(见表 1)。回收率计算公式:回收率/%=CPP 检测浓度/CPP 理论浓度×100,其中 CPP 理论浓度是指样品配制成为一定浓度后,根据每种样品中 CPP 的质量百分含量(生产过程中添加)而计算出的 CPP 浓度。

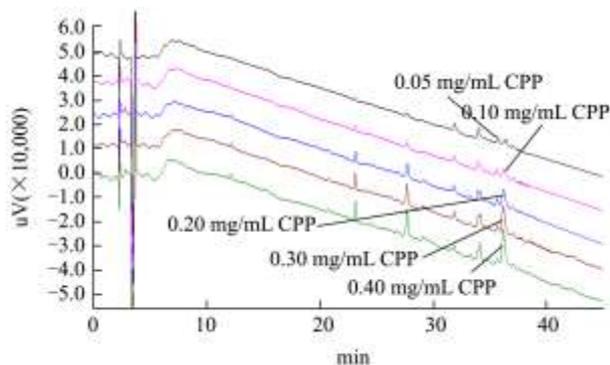


图 6 不同浓度 CPP 标准液的 HPLC 色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of CPP standard liquids with different concentrations

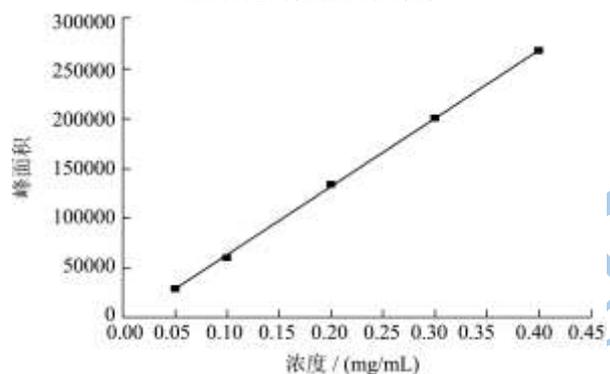


图 7 CPP 标准液的 HPLC 测定标准曲线

Fig.7 HPLC determination standard curve of CPP standard liquids

由表 1 可看出,样品中 CPP 的检测浓度与其理论

表 1 5 种样品中 CPP 的回收率

Table 1 Recovery of CPP in five samples

样品	样品质量/mg	样品中 CPP 质量百分含量/%	样品配制浓度/(mg/mL)	CPP 检测浓度/(mg/mL)	CPP 理论浓度/(mg/mL)	回收率/%
1#	500.80	1.50	99.75	1.45	1.49	96.75
2#	500.60	1.50	100.09	1.51	1.50	100.25
3#	500.30	1.50	98.79	1.34	1.48	91.69
4#	401.10	3.80	79.64	3.15	3.03	104.07
5#	402.10	3.80	81.76	3.04	3.11	97.72

图 9 显示,5 个样品中 CPP 回收率均高于 220%,其中 2#钙片中测得的 CPP 回收率最高,达 238.75%。由于钡-乙醇沉淀法原理是沉淀可以和 Ba²⁺离子形成络合物的组分,因而样品中其他可以和 Ba²⁺离子络合

浓度非常接近,回收率在 96.75%~104.07%之间。HPLC 法针对 CPP 纯度进行测定,目标性较强,几乎不受其他组分干扰,因此测得的 CPP 含量能较好的反映真实值。可见,HPLC 法是一种检测产品中 CPP 含量的高准确度和灵敏度的优良方法,同时也说明这 5 种钙片在生产过程中, CPP 的添加效果良好。

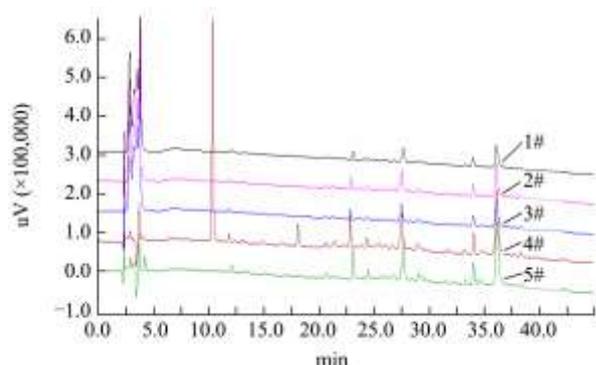


图 8 5 种样品中 CPP 的 HPLC 检测色谱图

Fig.8 HPLC chromatogram of CPP in five samples

2.1.4 精密度

对 5 种钙片样品中的 CPP 分别进行 3 次平行测定试验,计算其精密度。相对标准偏差(RSD)分别为 2.32%、1.65%、3.06%、1.88%及 2.25%。

2.1.5 检测限

参照 GB/T 5009.1-2003^[6],检测限=S/b, S 为仪器噪音的 3 倍,即仪器能辨认的最小的物质信号; b 为标准曲线回归方程中的斜率。本实验中, S 为 4656, b 为 6841937,故计算得检测限为 6.81 μg/mL。

2.2 钡-乙醇沉淀法测定结果

钡-乙醇沉淀法测定的 5 中钙片样品中 CPP 含量结果见图 9。

的组分对结果可能会产生较大影响,导致回收率有较大偏高。因此,相比于 HPLC 法,钡-乙醇沉淀法检测结果偏差较大,一般仅适用于单一 CPP 产品的含量测定,不适用于添加 CPP 的含有多种组分的保健品或

食品中的 CPP 测定。

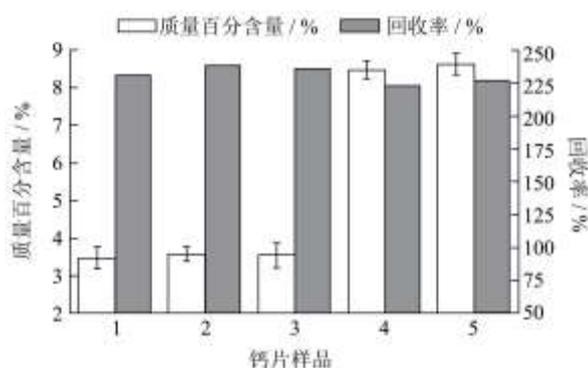


图9 钡-乙醇沉淀法测定的5种样品中CPP含量

Fig.9 CPP content in five samples determined by Barium-ethanol precipitation method

注:1#、2#及3#样品添加的CPP质量百分含量均为1.50%; 4#和5#样品添加的CPP质量百分含量均为3.80% (见表1)。

3 结论

钙片生产过程中,添加一定量CPP对于发挥促进钙吸收这一生理作用至关重要,而CPP添加效果如何可以通过测定钙片中CPP的回收率进行评价。本研究建立了一条通过HPLC法检测钙片中CPP含量的方法,在色谱条件为流动相为水+1%TFA(水相)和乙腈+1%TFA(有机相),检测波长215nm,流速1mL/min,进样体积10μL下,优选了梯度洗脱条件为有机相5%~35%,45min。在此条件下进行HPLC检测,5中钙片样品中CPP分离效果好,回收率介于96.75%~104.07%,比较接近真实值,说明这5种钙片中CPP添加效果良好,同时也表明,HPLC法是一种适合检测钙片中CPP含量的快速、准确、方便的优良方法。同时,还采用钡-乙醇沉淀法对钙片中的CPP进行了测定,结果表明,测得的5种钙片样品中CPP回收率均超过了220%,偏差较大,因而不宜作为钙片这类添加CPP的保健品中CPP含量的测定方法。

参考文献

- [1] 冯凤琴,陈闽军,杜永盛,等.高效液相色谱法测定奶粉中酪蛋白磷酸肽(CPP)含量[J].中国食品学报,2006,6(3): 128-132
FENG Feng-qin, CHEN Min-jun, DU Yong-sheng, et al. Determination of casein phosphopeptides (CPPs) in milk powder by HPLC [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, 6(3): 128-132
- [2] Cross K J, Huq N L, Reynolds E C. Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like

cells [J]. Current Pharmaceutical Design, 2007, 13(8): 793-800

- [3] Zhao W, Xu G, Yang R, et al. Preparation of casein phosphopeptides using a novel continuous process of combining an enzymatic membrane reactor with anion-exchange chromatography [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117(1): 105-112
- [4] 徐曼,何东平,卫娜,等.酪蛋白磷酸肽持钙能力的研究[J].现代食品科技,2012,28(3):278-281
XU Man, HE Dong-ping, WEI Na, et al. The calcium holding capacity of casein phosphopeptide [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(3): 278-281
- [5] Perego S, Zabeo A, Marasco E, et al. Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(2): 847-857
- [6] Donida B M, Mrak E, Gravaghi C, et al. Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells [J]. Peptides, 2009, 30(12): 2233-2241
- [7] 田随安,张向兵,李永利.HPLC法测定保健食品中酪蛋白磷酸肽[J].中国卫生检验杂志,2007,12(2):273,306
TIAN Sui-an, ZHANG Xiang-bing, LI Yong-li. Method of HPLC to detect content of CPP in health food [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2007, 12(2): 273, 306
- [8] 焦宇知,王璋,许时婴.酪蛋白磷酸肽新工艺及其体外功能性质[J].无锡轻工大学学报,2004,23(1):89-93
JIAO Yu-zhi, WANG Zhang, XU Shi-yin. CPP produced by a novel processing technology and its functional properties [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2004, 23(1): 89-93
- [9] 牟光庆,张丽萍,王立民,等.毛细管区带电泳测定酪蛋白磷酸肽方法的研究[J].中国食品学报,2002,2(2):21-24
MU Guang-qing, ZHANG Li-ping, WANG Li-min, et al. A study on the determination method of casein phosphopeptides using capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2002, 2(2): 21-24
- [10] Adamson N, Riley P F, Reynolds E C. The analysis of multiple phosphoserine-containing casein peptides using capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 1993, 646(2): 391-396
- [11] Miquel E, Gómez J A, Alegría A, et al. Identification of

- casein phosphopeptides in β -casein and commercial hydrolysed casein by mass spectrometry [J]. Food Science and Technology International, 2006, 12(5): 379-384
- [12] Kosalková K, García-Estrada C, Barreiro C, et al. Casein phosphopeptides drastically increase the secretion of extracellular proteins in *Aspergillus awamori*. Proteomics studies reveal changes in the secretory pathway [J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 1-15
- [13] 庞广昌,朱文欣,陈庆森.酪蛋白磷酸肽(CPPs)测定方法的研究[J].食品科学,2001,22(5):49-52
PANG Guang-chang, ZHU Wen-xin, CHEN Qing-sen. Study on determination method of casein phosphopeptides (CPPs) [J]. Food Science, 2001, 22(5): 49-52
- [14] 刘约权.现代仪器分析(第二版)[M].北京:高等教育出版社,2010
LIU Yue-quan. Modern Instrumental Analysis (2nd edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2010
- [15] 陈雪香,罗珍,刘飞,等.酪蛋白磷酸肽的质量评价方法研究[J].食品工业科技,2012,33(8):75-77,82
CHEN Xue-xiang, LUO Zhen, LIU Fei, et al. Study on the quality evaluation method on casein phosphopeptide (CPP) products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(8): 75-77, 82
- [16] GB/T 5009.1-2003,食品卫生检验方法理化部分总则[S]
GB/T 5009.1-2003, Methods of food hygienic analysis-Physical and chemical section-General principles [S]