

凝胶色谱法检测特医配方婴儿乳粉中肽分子量分布

葛鸽¹, 孙海波¹, 王玉梅², 齐云肖¹, 杨彦丽¹, 何瑞云¹, 林立^{1*}

(1.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,国家市场监督管理总局重点实验室(食品安全重大综合保障关键技术),北京 100085)(2.国家市场监督管理总局食品审评中心,北京 100070)

摘要:对特殊医学配方婴儿乳粉进行pH偏移处理测定其肽分子量分布。水解蛋白配方乳粉和氨基酸配方乳粉分别用水溶解,经碱偏移处理(pH值调至12静置90 min后调回至7)后收集上清液,采用TSK-Gel g2000WXL(7.8 mm×300 mm, 5 μm)凝胶色谱柱,流动相为30%乙腈(含0.1%三氟乙酸,体积分数),流速为0.5 mL/min,波长为220 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μL,以7种蛋白标准品的分子量对数(lgMW)与保留时间做校正曲线,并使用GPC软件进行数据处理。该法用于特医乳粉中肽分子量分布测定的线性为0.994 5,精密度为0.26%~1.29%。使用本方法检测了9种品牌共29批次特医配方乳粉。结果表明,氨基酸配方乳粉中小于500 u的组分含量可达97.48 wt.%以上,乳蛋白深度水解配方乳粉中小于3 000 u的肽含量可达98.57 wt.%以上,乳蛋白部分水解配方乳粉的肽分子量分布随品牌差异结果各异。碱偏移处理可明显改善乳蛋白部分水解配方乳粉的溶解性,有利于充分展现乳粉中肽段全貌。该法前处理简单,具有良好的重复性和稳定性,可用于特殊医学配方婴儿乳粉中肽段分布的分析。

关键词:凝胶色谱;特医配方;多肽;pH偏移处理;分子量分布

文章编号:1673-9078(2025)04-333-340

DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0167

Determination of Molecular Weight Distribution of Peptides in Infant Formula for Special Medical Purposes by Gel Chromatography

GE Ge¹, SUN Haibo¹, WANG Yumei², QI Yunxiao¹, YANG Yanli¹, HE Ruiyun¹, LIN Li^{1*}

(1.Beijing Institute of Food Inspection and Research (Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment), Key Laboratory of Key Technologies of Major Comprehensive Guarantee of Food Safety for State Market Regulation, Beijing 100085, China)
(2.Center for Food Evaluation, State Administration for Market Regulation, Beijing 100070, China)

Abstract: The peptide molecular weight distribution of infant formula for special medical purposes (FSMP) was determined by pH-shifting. The hydrolyzed protein formula and amino acid-based formula were dissolved in water and then underwent pH-shifting towards alkaline pH (pH was firstly adjusted to 12, remained at pH 12 for 90 min, then readjusted to 7) before the collection of supernatant for analysis by gel chromatography. TSK-Gel g2000WXL (7.8 mm×300 mm, 5 μm) gel chromatography column was used, with the mobile phase being 30% acetonitrile (containing 0.1% trifluoroacetic acid, volume fraction), flow rate being 0.5 mL/min, wavelength being 220 nm, column temperature was 25 ℃, and injection

引文格式:

葛鸽,孙海波,王玉梅,等.凝胶色谱法检测特医配方婴儿乳粉中肽分子量分布[J].现代食品科技,2025,41(4):333-340.

GE Ge, SUN Haibo, WANG Yumei, et al. Determination of molecular weight distribution of peptides in infant formula for special medical purposes by gel chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 333-340.

收稿日期:2024-02-04

基金项目:国家市场监督管理总局科技计划项目(2023MK009)

作者简介:葛鸽(1992-),女,博士,工程师,研究方向:食品分析与检测,E-mail:gege131700@163.com

通讯作者:林立(1977-),女,博士,教授级高工,研究方向:分析化学,E-mail:linli77422@aliyun.com

volume being 10 μL . Calibration curves were established between the logarithm of molecular weight (lgMW) and retention time of the 7 protein standards, and the data were processed by the GPC software. The linearity of this method for the determination of peptide molecular weight distribution in FSMP was 0.994 5 and the precision was 0.26%~1.29%. A total of 29 batches of 9 brands of FSMP products were tested by this method. The results showed that the amino acid-based formula had more than 97.48 wt.% of components smaller than 500 u, whilst the extensively hydrolyzed protein formula contained more than 98.57 wt.% of peptides smaller than 3 000 u. The peptide molecular weight distribution of partially hydrolyzed protein formula varied with different brands. The alkaline pH-shifting can significantly improve the solubility of the partially hydrolyzed protein formula, which is conducive to exhibiting fully the whole picture of peptide in the formula. The pretreatment of this method is simple. This method shows good repeatability and stability, and can be used for the analysis of peptide distribution in the FSMPs.

Key words: gel exclusion chromatography; formulas for special medical purposes; peptide; pH-shifting; molecular weight distribution

近年来, 婴儿蛋白过敏现象受到人们关注。初生婴儿由于胃肠道发育不健全, 摄入蛋白后无法消化吸收, 易引起湿疹、腹泻便血等过敏症状^[1]。特殊医学用途婴儿配方食品则成为了该类婴儿主要的食物来源。《特殊医学用途婴儿配方食品通则》根据过敏婴儿对蛋白质的可接受程度, 将水解蛋白配方乳粉分为乳蛋白部分水解配方 (Partially Hydrolyzed Formula, PHF)、乳蛋白深度水解配方 (Extensively Hydrolyzed Formula, EHF) 和氨基酸配方 (Amino Acid-based Formula, AAF) 乳粉^[2]。该类乳粉通常需要将蛋白原料酶解成小分子蛋白、肽段或直接由游离氨基酸为原料复配而成, 以降低蛋白致敏性^[3-7]。人们普遍认为“肽段越短, 产品的过敏原越弱”, 因此水解蛋白肽的分子量分布直接影响到乳粉的过敏风险。肽分子量分布是水解蛋白配方乳粉生产商和政府监管部门必须检测和核查的技术指标。

目前, 与肽分子量分布测定相关的国家标准有 GB 31645-2018《胶原蛋白肽》、GB/T 22492-2008《大豆肽粉》、GB/T 22729-2008《海洋鱼低聚肽粉》, 均以凝胶色谱法测定 10 000 u 以内肽分子量分布情况^[8-10]。然而, 国家标准和行业相关标准中并未涉及到水解蛋白配方乳粉。乳蛋白分子量范围较广, 因酶解工艺、不同品牌及型号等因素, 商业化的水解配方乳粉中可能同时存在氨基酸、多肽、蛋白, 肽分子量可从几百到几万道尔顿不等, 相对分子量分布范围更广。目前肽类物质检测方法的前处理多为流动相溶解提取, 所测目标肽类多为短肽^[11-14]。然而, 乳粉颗粒由非结晶状态的乳糖作为连续相, 脂肪、蛋白胶束和其他形态的蛋白/肽镶嵌其中, 其颗粒大小会影响乳粉的溶解性^[15]。此外, 蛋白经过

酶解和高温处理后, 掩埋在内部的疏水基团会暴露在蛋白表面, 增加了其溶解难度^[16,17]。用类似方法处理特医乳粉样品可能存在大分子量蛋白未能完全溶出的现象, 导致测量稳定性差, 测量结果不准确。

pH 偏移处理 (pH-shifting) 是一种简单的蛋白改性方法, 是指将蛋白暴露于远低于或高于蛋白等电点的 pH 值中, 较强的电荷排斥力将促使蛋白多肽链充分展开, 当结构展开的分子重新置于中性 pH 环境中时, 分子内电荷排斥力降低, 熔融球状结构的构象重新折叠, 从而改善蛋白的溶解度等性质^[18,19]。国内外多项研究表明, 短时间 (5~360 min) 的极端 pH 环境并不会影响蛋白质/肽的一级结构^[20]。因此, pH 偏移处理可作为测量特医乳粉中肽分子量的前处理方法, 增加大分子量蛋白的溶解度, 充分显示特医乳粉样品中肽段全貌。

为准确获取特医水解配方乳粉中肽段分布情况, 拟采用 pH 偏移作为样品前处理方法, 诱导改变乳粉中蛋白空间结构, 增强蛋白溶解度, 利用凝胶色谱法测量特殊医学用途婴儿配方食品中肽分子量分布, 科学评价该食品的质量情况。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (189 u)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (451 u)、抑肽酶 (牛肺, 6 512 u)、上海源叶生物有限公司; 溶菌酶 (14 307 u)、牛血清蛋白 (66 000 u)、卵清蛋白 (44 500 u)、乙腈 (色谱纯)、三氟乙酸 (色谱纯, TFA)、盐酸 (分析纯, HCl)、氢氧化钠 (分析纯, NaOH)、氯化钠 (分

析纯, NaCl)、BCA 蛋白定量试剂盒, 上海 Sigma 公司; 杆菌肽 (1 423 u), 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司。超纯水由 Milli-Q 纯水系统制备。实验中特医乳粉为 2020 年至 2023 年对不同生产厂家进行抽检留样的样品。

1.2 仪器与设备

1200 Series 高效液相色谱仪 (配 DAD 检测器和 GPC 系统), 美国 Agilent 公司; Multifuge X1R 高速离心机, 美国 Thermo 公司; FiveEasy Plus pH 计, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Milli-Q 去离子水发生器, 美国 Millipore 公司; Synergy Neo 2 酶标仪, 美国 BioTek 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分子量标准品溶液的制备

将乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (189 u)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (451 u)、杆菌肽 (1 423 u)、抑肽酶 (6 512 u)、溶菌酶 (14 307 u)、卵清蛋白 (44 500 u)、牛血清蛋白 (66 000 u) 分别用超纯水配制成质量浓度约 1 mg/mL 的蛋白相对分子质量标准溶液, 置于样品瓶中 4 °C 保存待测。

1.3.2 样品前处理的确定

分别称取约 0.3 g 各类乳粉样品于 50 mL 离心管中, 加入 30 mL 超纯水溶解。乳粉经充分混匀后, 用 2 mol/L NaOH 调节 pH 值至 10、11、12、13, 或用 2 mol/L HCl 调节 pH 值至 1、2、3, 静置一段时间 (10、30、60、90、120、150 min) 后将 pH 值调回至 7, 优化 pH 偏移条件和静置时间, 未经处理的样品为对照组。乳粉样品在 4 °C 下 10 000 r/min 离心 20 min, 用注射器吸取中间清液过 0.45 μm 亲水性滤膜, 收集滤液至色谱样品瓶 4 °C 保存待测。

1.3.3 蛋白浓度的测定

将待测样品使用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度, 根据蛋白浓度标准曲线计算出样品蛋白浓度。

1.3.4 色谱条件的确定

色谱柱: TSK gel G2000SWXL (30 cm×7.8 mm, 5 μm), 串联保护柱 TSKgel guardcolumn SWXL (4 cm×6 mm, 7 μm); 等度洗脱时间: 30 min; 流量: 0.5 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL; 检测器波长: 220 nm; 选择 20%、30%、40% (体积分数) 乙腈/水溶液 (含 0.1% TFA, 体积分数) 优化流动相配比。

1.3.5 分子量分布的计算

以各蛋白相对分子质量标准品的出峰时间作为横坐标, 相对分子质量对数 (lgMW) 为纵坐标绘制标准曲线, 得到相应方程。样品色谱数据由计算机采集, 使用系统自带的 GPC 软件处理数据, 计算各肽段的相对含量。本文中, AAF 乳粉计算小于 500 u 的肽分子相对百分含量; EHF 乳粉计算小于 3 000 u 的肽分子相对百分含量、PHF 乳粉计算小于 10 000 u 的肽分子相对百分含量。

1.3.6 精密度试验

选取 AAF、EHF、PHF 乳粉按照优化的前处理条件分别平行制备 7 个, 选取每类特医乳粉主要成分 (AAF 为小于 500 u, EHF 为小于 3 000 u, PHF 为小于 10 000 u) 计算各肽段相对百分含量, 同时做精密度计算。

1.3.7 样品测定

选取 AAF、EHF、PHF 乳粉共 9 种品牌 29 批次样品分别处理上样, 根据标准曲线计算 AAF 乳粉中小于 500 u、EHF 乳粉中小于 3 000 u、PHF 乳粉中小于 10 000 u 的肽分子量相对含量。

1.4 数据分析

非特殊说明, 所有实验测定至少重复三次, 数据分析使用 Origin 2019b 软件, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA, LSD) 进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示统计学上差异性显著。

2 结果与讨论

2.1 pH偏移处理

2.1.1 酸偏移处理

目前国外对 PHF 和 EHF 乳粉的分子量分布范围及各肽段的相对含量并无统一要求。我国《特殊医学用途婴儿配方食品通则》中也仅提到“EHF 乳粉中不应含有食物蛋白”^[2]。Bourdeau 等^[21]测量 PHF 乳粉肽段分布情况时认为分子量超过 10 000 u 的氨基酸序列应当作完整蛋白质来认定。参考国内外研究现状, 文中以小于 500 u、小于 3 000 u、小于 10 000 u 分别作为 AAF、EHF、PHF 乳粉分子量的界定范围^[22-24]。

酸偏移处理对 AAF、EHF、PHF 乳粉分子量分布的影响如图 1 所示。随着 pH 值从 3 降低至 2, 三类乳粉的峰形没有发生显著变化。Jiang 等^[25]也发

现酸偏移处理豌豆蛋白对蛋白质性质的改善并不明显。当酸偏移处理 pH 值为 1 时, EHF 和 PHF 的峰形发生明显改变, 说明过度的酸偏移处理可能引起了肽键的断裂, 影响乳粉自身的分子量分布。此外, 洗脱时间为 24.83 min 处出现新的响应值, 经空白对照实验证实此峰为 NaCl 引起 (图 1d), 这是因为强酸碱条件时添加的大量氢氧化钠和盐酸形成了氯化钠。因此, 在进行面积归一化处理时需去除 NaCl 的峰面积。

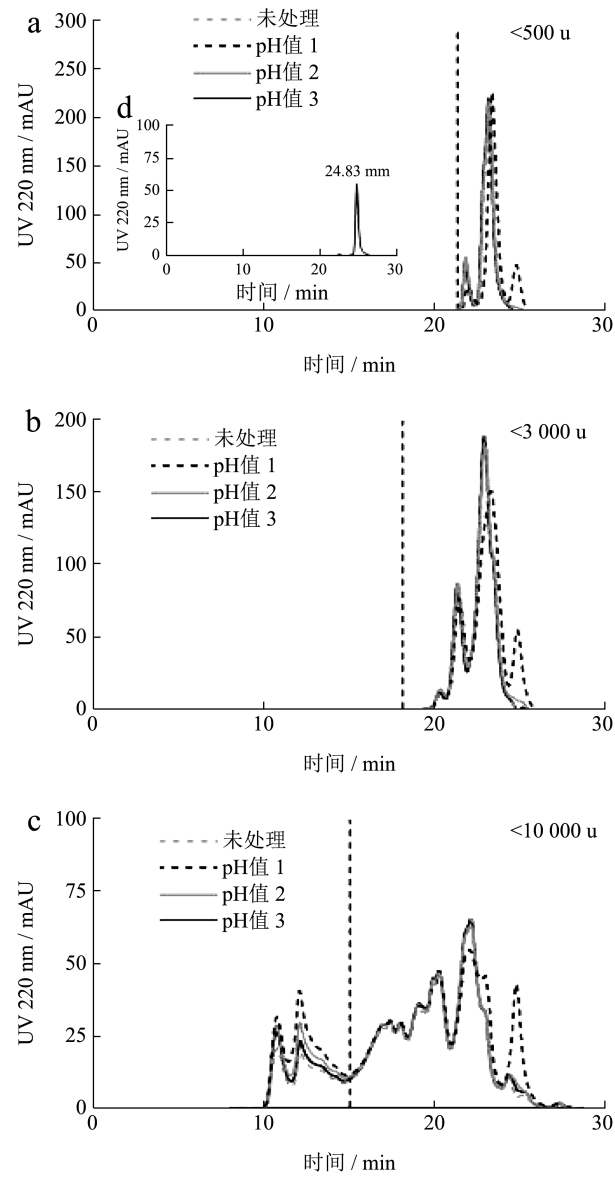


图 1 不同酸偏移处理下 AAF (a)、EHF (b)、PHF (c) 乳粉的分子量分布

Fig.1 The molecular weight distribution of AAF (a), EHF (b) and PHF (c) after acid pH-shifting

注: 内嵌图 (d) 为 0.1 mol/L NaCl 的紫外响应。

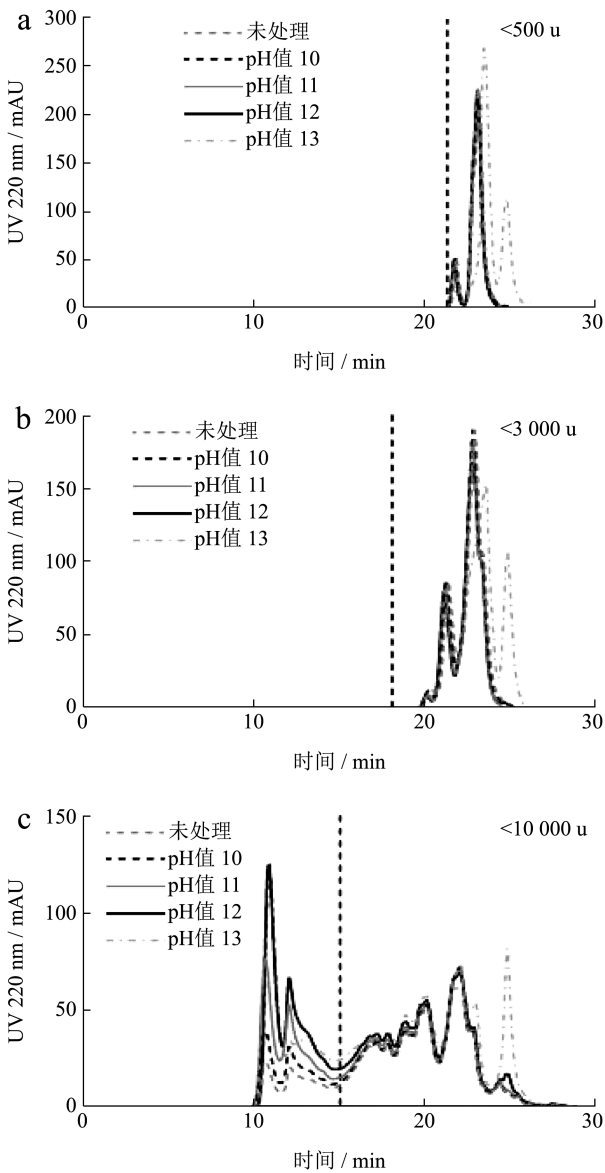


图 2 不同碱偏移处理下 AAF (a)、EHF (b)、PHF (c) 乳粉的分子量分布

Fig.2 The molecular weight distribution of AAF (a), EHF (b) and PHF (c) after alkaline pH-shifting

2.1.2 碱偏移处理

碱偏移处理对 AAF、EHF、PHF 乳粉分子量分布的影响如图 2 所示。AAF 乳粉 (图 2a) 和 EHF 乳粉 (图 2b) 经过碱偏移处理后主峰形没有发生变化, 响应值分别都出现在 500 u 和 3 000 u 以内。未处理的 AAF 乳粉小于 500 u 的相对含量为 98.98 wt.%, 碱偏移 pH 值为 12 时, AAF 乳粉小于 500 u 的相对含量为 98.78 wt.%, 二者没有显著差异 ($P>0.05$)。未处理的 EHF 乳粉小于 3 000 u 的相对含量为 99.39 wt.%, 碱偏移 pH 值为 12 时, EHF

乳粉小于 3 000 u 的相对含量为 99.74 wt.%, 二者亦没有显著差异 ($P>0.05$)。当 pH 值为 13 时, 图中出现明显的氯化钠峰, 且小分子量段的峰形发生改变, 这可能是由于氯化钠峰的干扰或强碱条件下肽链降解产生了小分子肽所致。峰形的变化说明过度碱偏移会影响乳粉自身肽段性质, 不适合乳粉分子量分布的测量, 因此选择合适的 pH 条件处理样品至关重要。

与图 1c 相比, PHF 乳粉经过碱偏移处理 (图 2c) 后大于 10 000 u 蛋白的峰面积增加比酸偏移处理明显。随着 pH 值从 10 升至 12 时, 大于 10 000 u 处响应值增加, 小于 10 000 u 的峰形和响应强弱保持不变, 说明碱偏移处理增加了 PHF 乳粉中大分子蛋白在溶剂中的含量, 且没有引起肽段进一步水解和含量变化。碱偏移处理主要破坏蛋白质的二、三级结构, 短时极端诱导不涉及一级结构变化 (肽键断裂)^[26]。赵明等^[20]处理大豆蛋白酶解聚集体时也认为 pH 偏移仅调整不溶肽聚集体的分子间作用力, 不会进一步水解肽段, 是一种安全的实验方法。

同时, 测定碱偏移处理后 AAF、EHF、PHF 样品的蛋白/肽浓度, 结果如表 1 所示。随着 pH 值增加, 三类乳粉的蛋白/肽浓度显著增加 ($P<0.05$), 说明碱偏移处理能够提高蛋白的溶解性, 这可能是因为蛋白质结构在碱性条件下形成熔融状态, 增强了蛋白质和水的相互作用, 导致其溶解性显著增加^[27]。由于 pH 值为 13 时, 肽段已发生自身性质的改变, 因此实验中 pH 值为 12 为特医乳粉前处理的最优碱偏移条件。

2.2 碱偏移时间的选择

碱偏移时间对 AAF (小于 500 u)、EHF (小于 3 000 u)、PHF (小于 10 000 u) 乳粉中多肽相对含量的影响如图 3 所示。由于 AAF 和 EHF 乳粉中氨基酸和肽段没有复杂的高级结构, 溶解效果好, 因此碱偏移时间对肽段相对含量没有显著影响 ($P>0.05$)。然而, 碱偏移时间对 PHF 乳粉影响较大, 经过 10 min 处理后, 小于 10 000 u 的肽段

相对含量出现显著降低的趋势 ($P<0.05$)。样品静置 90 min 后, 样品中小于 10 000 u 的肽段相对含量保持恒定, 体系内蛋白的组成较未处理样品更加全面。这说明通过碱偏移处理增加乳蛋白溶解度需要一定的时间, 实验中静置 90 min 为乳粉前处理的最优条件。

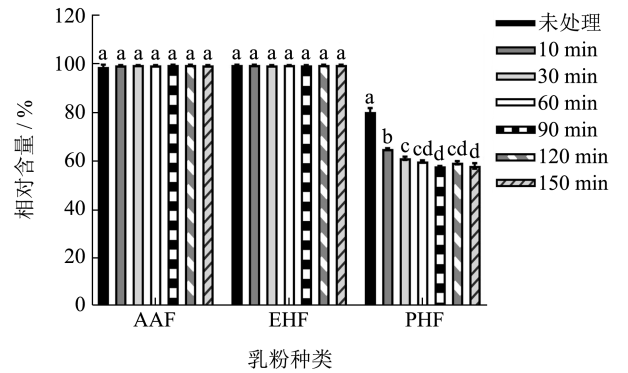


图 3 碱偏移时间对 AAF (<500 u)、EHF (<3 000 u) 与 PHF (<10 000 u) 乳粉中多肽相对含量的影响
Fig.3 The effect of pH-shifting time on the molecular weight distribution of AAF (<500 u), EHF (<3 000 u) and PHF (<10 000 u)

注: 不同小写字母代表样品在组内存在显著差异 ($P<0.05$)。

2.3 流动相的选择

通过优化乙腈比例改变流动相极性可以改善混合物质的分离度。20%、30%、40% (体积分数) 乙腈 (0.1% TFA, 体积分数) 作为流动相对三类特医配方乳粉中肽段的分离如图 4 所示, 乙腈比例明显影响了各样品的分离效果 (图 4a~4c)。如图 4a 所示, 随着乙腈比例增加, AAF 乳粉的峰形变化明显, 三个分离峰逐渐合并成一个总峰, 分离度降低。然而, AAF 乳粉中小于 500 u 相对含量没有显著变化 ($P>0.05$, 图 4d), 因此通过降低乙腈比例提高氨基酸的分离度并无意义。EHF 乳粉与 AAF 乳粉的结果相似, 其峰形也发生明显改变, 分离度降低, 但小于 3 000 u 的相对含量没有显著变化 ($P>0.05$, 图 4d)。

表1 不同碱偏移处理下AAF、EHF、PHF乳粉的蛋白质质量浓度 (mg/mL)

Table 1 The protein concentration of AAF, EHF and PHF after alkaline pH-shifting					
样品	未处理	pH 值 10	pH 值 11	pH 值 12	pH 值 13
AAF	0.68 ± 0.04 ^c	0.67 ± 0.03 ^c	0.72 ± 0.02 ^c	0.81 ± 0.04 ^b	0.92 ± 0.03 ^a
EHF	0.81 ± 0.01 ^{cd}	0.79 ± 0.02 ^d	0.85 ± 0.02 ^c	0.93 ± 0.01 ^b	1.08 ± 0.01 ^a
PHF	1.45 ± 0.04 ^c	1.59 ± 0.07 ^b	1.55 ± 0.08 ^{bc}	1.75 ± 0.07 ^a	1.81 ± 0.07 ^a

注: 不同小写字母代表样品内存在显著差异 ($P<0.05$)。

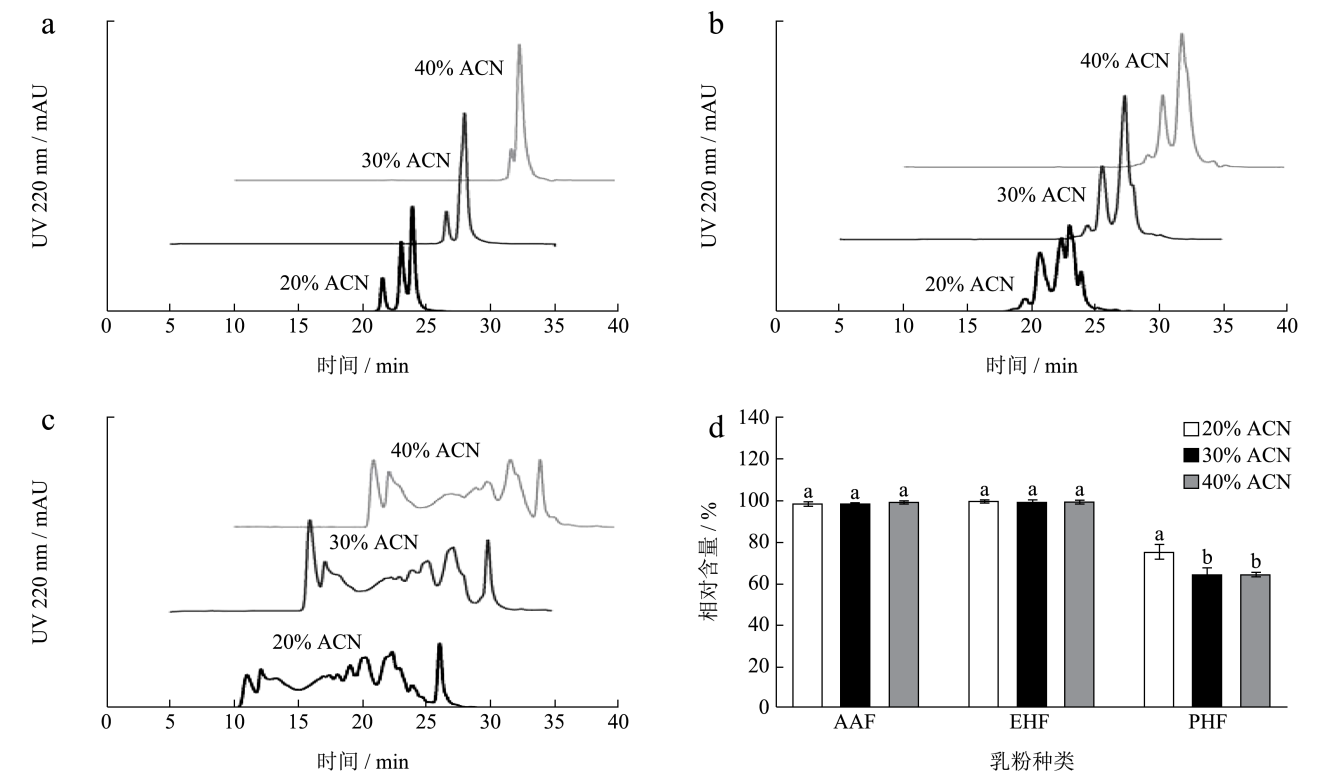


图 4 不同体积分数（20%、30%、40%）乙腈（ACN）对 AAF（a）、EHF（b）、PHF（c）乳粉色谱峰形的影响，及对 AAF（<500 u）、EHF（<3 000 u）、PHF（<10 000 u）乳粉各分子量相对含量的影响（d）

Fig.4 The effect of ACN (20%, 30% and 40%) as mobile phase on chromatography of AAF (a), EHF (b) and PHF (c), and the effect on molecular weight distribution of AAF (<500 u), EHF (<3 000 u), and PHF (<10 000 u)

注：不同小写字母代表样品内存在显著差异（ $P<0.05$ ）。

然而，低浓度乙腈作为流动相洗脱 PHF 乳粉时，蛋白/肽丢失大分子蛋白的响应（图 4c），导致样品中大分子蛋白无法参与整个分子量分布的计算。随着乙腈浓度的升高，PHF 乳粉中蛋白的响应值增加，30% 和 40% 乙腈作为流动相时的分子量分布结果已无明显变化（图 4d）。综合三类特医乳粉的结果，30% 乙腈作为流动相进行实验较为合适。当使用 30% 乙腈/水体系作为流动相时，以各蛋白标准品的保留时间为横坐标，以相对分子质量的对数（lgMW）为纵坐标，得到相对分子质量校正曲线方程 $Y=-0.242\ 6X+7.664\ 1$ ，相关系数 R^2 可达到 0.994 5。

2.4 精密度

AAF、EHF、PHF 乳粉的测量精密度如表 2 所示。该方法测得的 AAF、EHF、PHF 乳粉检测结果的变异系数（RSD）在 0.26%~1.29% 之间，表明本方法具有良好的精密度，测量重现性高，能够满足特医乳粉中肽段分子量分布测定的要求。

表 2 AAF、EHF、PHF 乳粉的测量精密度			
Table 2 The measurement accuracy of AAF, EHF and PHF			
样品（肽段范围）	AAF (<500 u)	EHF (<3 000 u)	PHF (<10 000 u)
均值 ± SD/(wt.%)	99.36 ± 0.56	99.44 ± 0.25	89.48 ± 1.16
RSD/%	0.56	0.26	1.29

注：SD 指标准偏差，RSD 指变异系数。

2.5 实际样品检测

工业中常用胃肠道蛋白水解酶（动物源胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶）和工业蛋白酶（木瓜蛋白酶、风味酶和碱性蛋白酶等）作为工作酶水解乳蛋白^[1]。水解过程因其使用的酶种类不同、酶解环境不同，酶解产物如多肽的大小及氨基酸组成也不尽相同。不同厂家生产的特医配方乳粉中多肽性质不同，即使是同一品牌，如果在生产过程中没有稳定的品控支持，不同批次的乳粉质量可能也不完全相同。因此测量特医乳粉中肽段分子量分布在

一定程度上可以表征其蛋白水解程度和产品质量。

利用本方法对市场上 9 个品牌共计 29 批特医配方乳粉样品进行了肽段分子量分布的测定,结果如图 5 所示。其中,AAF 乳粉共 2 个品牌 8 批次,其小于 500 u 肽段的占比分别为 97.48 wt.%~98.00 wt.% (A 品牌) 和 98.14 wt.%~99.24 wt.% (B 品牌),B 品牌不同批次的乳粉分子量分布稳定性 (RSD 为 0.44%) 较 A 品牌 (RSD 为 0.63%) 高。EHF 乳粉共 2 个品牌 8 批次,其小于 3 000 u 肽段的占比分别为 99.06 wt.%~99.25 wt.% (C 品牌) 和 98.57 wt.%~99.03 wt.% (D 品牌),且 C 品牌不同批次的样品稳定性 (RSD 为 0.09%) 较 D 品牌 (RSD 为 0.19%) 高。PHF 乳粉共 5 个品牌 13 批次,每个品牌小于 10 000 u 肽段的百分含量分别为 90.37 wt.% (E 品牌)、81.00 wt.% (I 品牌)、59.44 wt.% (F 品牌)、51.16 wt.% (H 品牌)、48.25 wt.% (G 品牌)。肽段分布的巨大差异来自于生产厂家使用的酶解工艺不同,G 和 H 品牌乳粉中蛋白水解程度较低,乳粉中仍旧存在大量的完整蛋白质,肽段只占约 50 wt.%. E 和 I 品牌乳粉中蛋白水解程度较高,小于 10 000 u 的肽段含量约有 80 wt.% 以上,相较于普通乳粉易于被婴儿消化吸收,蛋白过敏风险较低。

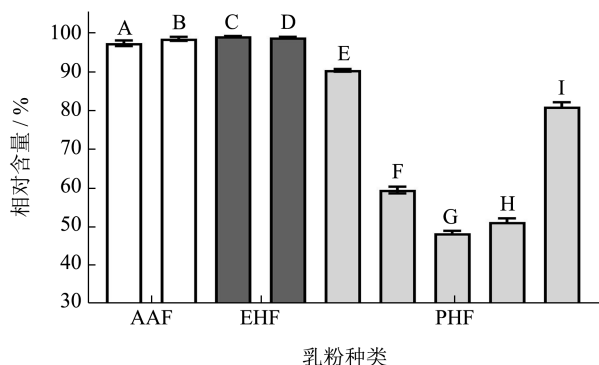


图 5 市售 AAF 乳粉中小于 500 u、EHF 乳粉中小于 3 000 u、PHF 乳粉中小于 10 000 u 的相对含量

Fig.5 The relative amounts of less than 500 u in commercial AAF, less than 3 000 u in commercial EHF, and less than 10 000 u in commercial PHF

注:柱形图中的大写字母表示不同品牌样本。

3 结论

目前我国还未制定蛋白水解配方特医乳粉中肽分子量分布的测定标准。测量乳粉中肽段分布的巨大挑战在于特医乳粉中的肽段分子量分布范围广,样品中可含有游离氨基酸到 10 000 u 左右的多肽,

甚至还存有未被水解的蛋白质,因此选取合适的提取方式和流动相对于检测的准确性至关重要。本文建立了一种应用碱偏移处理结合凝胶色谱法检测乳蛋白部分水解、乳蛋白深度水解和氨基酸配方特医乳粉中肽分子量分布的方法,蛋白分子量对数与保留时间的标准曲线的相关系数可达 0.994 5。用本方法测定了 29 批次特医乳粉样品中的肽分子量,方法简单,结果准确可靠,重现性好,可满足日常检测要求,为工业调整研发方向和质量监督部门监督产品质量提供方法依据。

参考文献

- [1] 张玉梅,毛帅,谭圣杰,等.水解乳蛋白与婴幼儿健康的研究进展[J].中国食品卫生杂志,2022,34(2):189-195.
- [2] GB 25596-2010,特殊医学用途配方食品通则[S].
- [3] 李美英,邓少伟,李雅慧,等.我国特殊医学用途婴儿配方食品现状浅析[J].食品与生物技术学报,2021,40(5):104-111.
- [4] 赵亭亭,赵伟,步子达,等.水解乳清蛋白在特殊食品中的应用[J].农产品加工,2022,21:83-87.
- [5] 秦爱荣.部分及深度水解酪蛋白的工艺及水解产物致敏性分析[D].天津:天津科技大学,2022.
- [6] 刘甜甜.深度水解婴儿配方奶粉及致敏性研究[D].天津:天津科技大学,2022.
- [7] 玄依凡,王荣春.乳清蛋白水解方法的比较研究[J].食品工业,2017,38(3):239-242.
- [8] GB 31645-2018,胶原蛋白肽[S].
- [9] GB/T 22492-2008,大豆肽粉[S].
- [10] GB/T 22729-2008,海洋鱼低聚肽粉[S].
- [11] 任娇艳,卢韵君,廖文镇,等.凝胶色谱测定核桃肽分子量方法比较[J].现代食品科技,2015,31(5):267-271.
- [12] 汪冰,肖新月,程显隆,等.凝胶排阻色谱法研究阿胶中蛋白质及多肽相对分子质量分布规律[J].药物分析杂志,2009,29(11):1886-1891.
- [13] 黄伟乾,霍玫希,罗浩,等.凝胶色谱法 (GPC) 检测特殊膳食食品中小分子肽的分子量分布的研究[J].现代食品,2021,17:192-195.
- [14] 黄伟乾,霍玫希,许丽珠,等.重量法结合氨基酸分析法测定婴幼儿配方乳粉中小分子蛋白肽含量[J].食品与机械,2023,39(3):44-48,65.
- [15] 何湘丽,湛艳红,彭喜洋,等.婴幼儿配方乳粉溶解性的影响因素探讨[J].中国乳业,2019,2:74-76.
- [16] 杨楠.热处理对牦牛乳酪蛋白性质影响的研究[D].兰州:甘肃农业大学,2013.
- [17] 范丽丽,窦博鑫,张晓琳,等.大豆 7S 球蛋白的 MTGase 条件对其表面疏水性及功能特性、溶液性质的影响及相关性分析[J].食品工业科技,2020,41(5):52-57,62.

- [18] 张唯唯,何振东,马天怡,等.极端酸碱pH偏移改善白果蛋白溶解性和乳化性[J].精细化工,2021,38(6):1204-1211.
- [19] WEIJUN C, WENJUN W, XIAOBIN M, et al. Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (-)-epigallocatechin-3-gallate [J]. Food Chemistry, 2018, 274: S0308814618315176.
- [20] 赵明,张晖,朱玲,等.pH偏移促进大豆蛋白酶解过程中聚集体解聚的研究[J].中国油脂,2021,46(6):43-47.
- [21] BOURDEAU T, AFFOLTER M, LENACK DUPUIS, et al. Peptide characterization and functional stability of a partially hydrolyzed whey-based formula over time [J]. Nutrients, 2021, 13(9): 3011.
- [22] CABANA MICHAEL D. The role of hydrolyzed formula in allergy prevention [J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2017, 70(2): 38-45.
- [23] LIFSCHITZ C, SZAJEWSKA H. Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner [J]. European Journal of Pediatrics, 2015, 174(2): 141-150.
- [24] D AURIA E, SALVATORE S, ACUNZO M, et al. Hydrolysed formulas in the management of cow's milk allergy: new insights, pitfalls and tips [J]. Nutrients, 2021, 13(8): 2762.
- [25] JIANG S S, DING J Z, ANDRADE J, et al. Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 38: 835-842.
- [26] 关玉.pH-shifting诱导蛋清蛋白结构和乳化特性变化及其在乳液中的应用研究[D].长春:吉林大学,2022.
- [27] 荣玉娟,侯雨薇,曹晓倩,等.pH值偏移对麦谷蛋白结构的修饰及溶解性的提升[J].食品科学,2023,44(20):20-27.