

## 高效液相色谱法测定奶粉中酪蛋白磷酸肽(CPP)含量

冯凤琴<sup>1</sup> 陈闽军<sup>2</sup> 杜永盛<sup>1</sup> 赖奕坚<sup>3</sup> 章春桃<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学食品科学与营养系 杭州 300027 <sup>2</sup>上海交通大学药学院 上海 200240

<sup>3</sup>上海交通大学分析测试中心 上海 200240 <sup>4</sup>杭州康源食品科技有限公司 杭州 310003)

**摘要** 建立了一种用高效液相色谱法测定奶粉中酪蛋白磷酸肽(CPP)含量的方法。结果表明:该法前处理简便,专一性好,灵敏度高,检出限为10 μg/mL。在10~200 μg/mL范围内线性回归方程为 $y = 0.1113x + 0.2131$ ,  $R^2 = 0.9994$ ,回收率为95%~105%,可用于测定奶粉中CPP的含量。

**关键词** 酪蛋白磷酸肽 高效液相色谱 奶粉  
**文章编号** 1009-7848(2006)03-0128-05

酪蛋白磷酸肽(Casein Phosphopeptides,简称CPP)是酪蛋白经适合的蛋白酶水解所得到的含有磷酸丝氨酸簇的具有生物活性的短肽<sup>[1]</sup>。由于它在小肠中性和弱碱性环境中能确保钙的溶解状态并促进肠道吸收,所以又被称为促钙吸收因子<sup>[2-3]</sup>。CPP是目前可促进钙吸收的化合物中唯一的多肽物质,所以倍受学术界和产业界的关注。在日本和德国已被列入重点推荐的功能性食品添加剂。我国现在已经有CPP产品投放市场,作为食品添加剂广泛用于婴幼儿奶粉、钙铁锌等矿物质补充食品及营养保健食品中<sup>[4-5]</sup>。

商品CPP制剂是含有多种磷酸肽、非磷酸肽及少量的游离氨基酸的混合物。测定其中磷酸肽的含量目前普遍采用乙醇沉淀法,即在一定浓度的CPP溶液中加入二价金属离子(钙或钡),使CPP分子间通过二价金属离子形成桥连,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,即可计算产品中CPP含量<sup>[6-7]</sup>。该法既可用于磷酸肽的分离,也适用于CPP产品的含量测定。近年来,也有用毛细管区带电泳测定酪蛋白磷酸肽的方法报道<sup>[8]</sup>,但这些方法仅适用于CPP产品的含量测定,不适用于添加CPP的食品及保健品中的CPP含量测定,因为

食品中的蛋白质及一些盐类成分会严重干扰测定结果。到目前为止,食品中CPP含量的测定方法尚未见报道。

随着仪器分析技术的发展,高效液相色谱技术逐渐成为食品检测中的重要分析手段。为了适应产品质量控制和检测的需要,研究了运用高效液相色谱法测定奶粉中CPP的含量,并试图建立起一套方便、快捷的检测方法。

### 1 原料与方法

#### 1.1 仪器与药品

美国Agilent公司Agilent-1100系列高效液相色谱仪。

CPP标准样品由杭州康源食品科技有限公司提供。

#### 1.2 试剂

乙睛:色谱纯,德国默克公司;醋酸:AR。水由Millipore纯水机制取。

#### 1.3 样品制备方法

准确称取CPP标准样品100 mg,定容于25 mL容量瓶中,用0.2 μm滤膜过滤后,备用。

#### 1.4 色谱条件

Zorbax C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温25°C,流速0.8 mL/min。流动相为:A相:乙睛;B相:0.1%醋酸溶液。梯度洗脱条件为:0~20 min,A由0%~>100%。进样量20 μL,紫外检测波长280 nm。

收稿日期:2004-10-13

作者简介:冯凤琴,女,1964年出生,副教授

## 2 试验结果

### 2.1 奶粉中 CPP 检测的标志峰

采用相同方法对 CPP 标准样品、不含 CPP 的空白奶粉以及添加 1.1%CPP 标准样品的奶粉进行 HPLC 分析,得色谱图(如图 1 所示)。保留时间为 6.55 min 的色谱峰是 CPP 标准样品中的主要谱峰之一,与其它峰能较好地分离。在空白奶粉中相应位置也未检测到干扰峰,故考虑将该谱峰作为测定奶粉中添加 CPP 含量的标志峰。

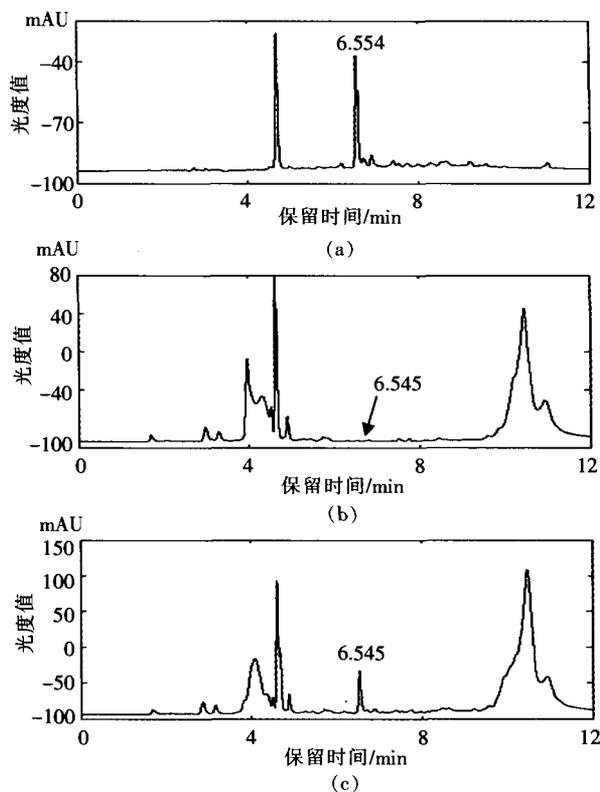


图 1 色谱图 (a) CPP 标准样品 (b) 空白奶粉 (c) 添加 CPP 标准样品的奶粉

Fig.1 Chromatograms of (a) CPP standard sample; (b) Blank milk powder; (c) Milk powder added CPP standard sample

样品中标志峰的 UV 扫描图谱如图 2a 所示。该物质分别在 222 nm 与 280 nm 处有吸收峰。在空白奶粉样品中标志峰保留时间处取 UV 扫描图,如图 2b 所示。在 222 nm 与 280 nm 处并无吸收峰,表明该标志峰具有较好的专一性,可作为奶粉中添加 CPP 含量测定的标志峰。因 222 nm 作为检测波长易受流动相干扰,故选择 280 nm 作为检测波长。

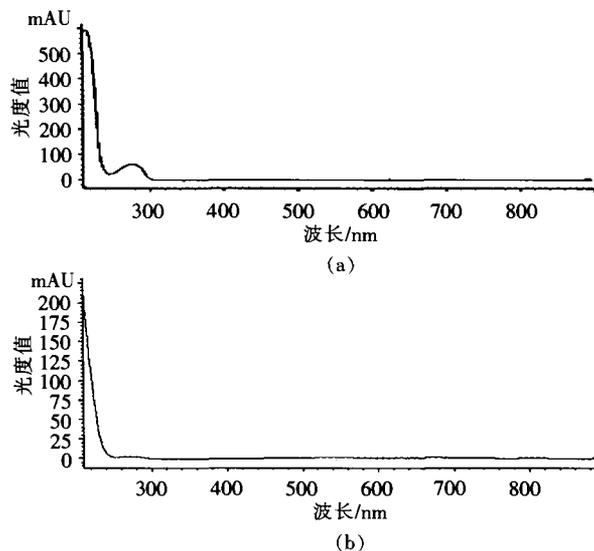
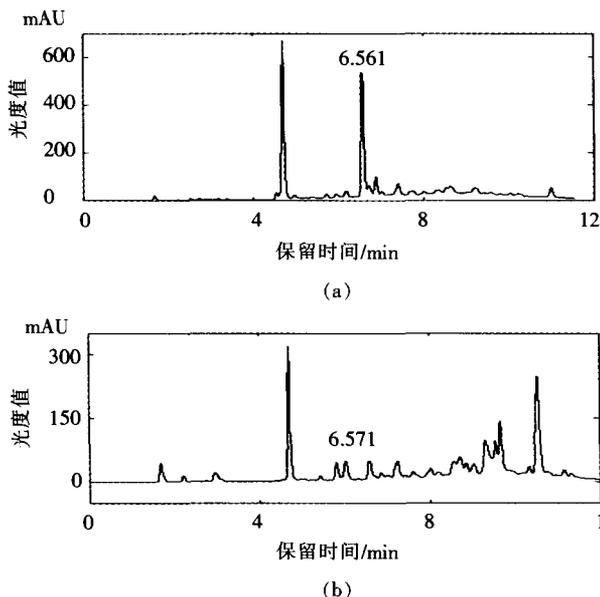
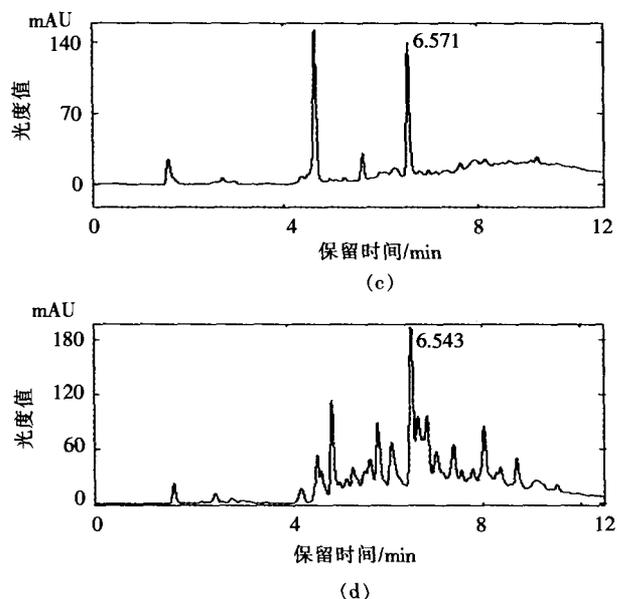


图 2 (a) 标志峰紫外谱图 (b) 奶粉标志峰位置的紫外谱图

Fig.2 (a) The ultra-violet spectrum of symbol peak (b) The ultra-violet spectrum of the corresponding position of symbol peak in milk powder

从市场上收集不同厂家生产的 CPP 产品,按本方法获取其色谱图(见图 3)。从图 3 得知,在不同厂家生产的 CPP 中都存在标志峰,但在含量上存在一定差异,这可能与所使用的原料、生产工艺等条件有关,从而提示所选标志峰作为检测奶粉中添加 CPP 的指标,具有较好的标识作用。



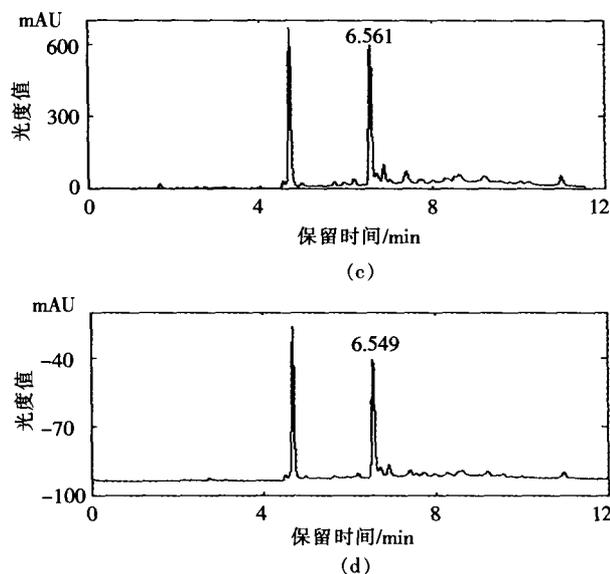


a. A厂产品 b. B厂产品 c. C厂产品 d. D厂产品

图3 不同生产厂家的CPP色谱图

Fig.3 Chromatograms of CPP produced by different company

对4次CPP样品进行分析,得色谱图4。不同批次CPP产品色谱图具有极好的相似性,表明这些CPP的化学组成相近,提示该CPP产品质量稳定,具有较好的批次间一致性。



a. 批次1 b. 批次2 c. 批次3 d. 批次4

图4 不同批次CPP的色谱图

Fig.4 The chromatograms of different batch of CPP

2.2 标准曲线

分别配制10、20、40、100、200 μg/mL的CPP标准样品溶液,按上述方法进行测定。结果表明:在10~200 μg/mL范围内,线性回归方程为  $y = 0.1113x + 0.2131$ ,相关系数0.9994,如图5所示。

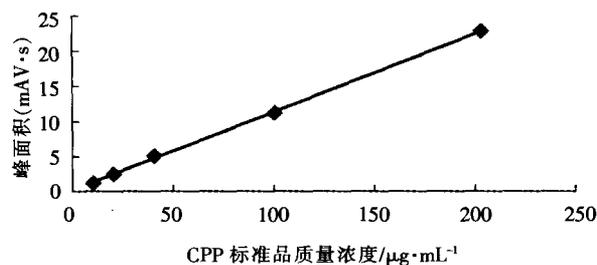
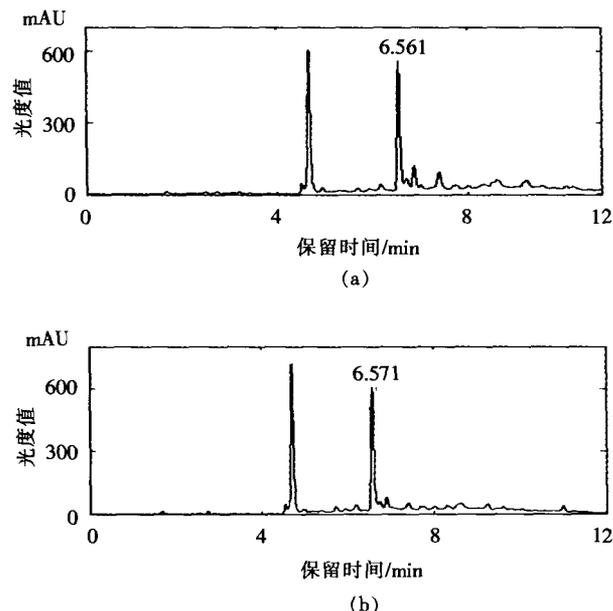


图5 线性回归曲线(10~200 μg/mL)

Fig.5 The Linear regression curve within 10~200 μg/mL



2.3 检测限

以标准曲线的端点作为检测限(10 μg/mL),约为奶粉中添加质量分数0.25%的CPP。建议奶粉中CPP的添加量为奶粉中钙含量的0.3~0.5倍。而钙在奶粉中的标称含量大于1%,故奶粉中

CPP的含量大于0.3%,因此本方法的检测限能够满足测定奶粉中CPP含量的检测要求。

#### 2.4 精密度

分别对含0.30%、0.53%和1.1%CPP的奶粉进行5次平行测定试验,计算其精密度,RSD分别为2.11%、1.64%和1.85%。

#### 2.5 回收率

在经检测不含有CPP的奶粉中分别添加0.30%、0.53%和1.1%的CPP,按上述方法分析,测得回收率见表1。

表1 不同样品的回收率试验结果

样品	添加量/%	测得量/%	回收率/%
样品1	1.1	1.141	103.7
样品2	0.53	0.5154	97.24
样品3	0.30	0.3123	104.1

#### 2.6 样品检测

检测市场上出售的标称含有CPP和不含有CPP的奶粉样品,共计3个;并取标称不含有CPP的空白奶粉样品,配制成添加CPP的样品1个,分别按上述方法进行检测,以考察该检测法的实用性,所得结果见表2。

从表2可知,此方法不仅能检测出奶粉中是否含有CPP,而且能较准确地测定其含量,因此可用于奶粉中添加CPP含量的检测。

表2 不同样品中CPP含量测定结果

Table 2 Determination result of the CPP content in different sample

样品	标称	本方法检测结果
A	有	0.067%
B	0.20%	0.073%
C	无	未检出
加样1	0.53%	0.5154%

注:A、B、C来自不同的厂家。

### 3 讨论

本实验所选标志峰在不同厂家的产品中都存在,但不同厂家的CPP产品中标志峰含量存在差异,且同一厂家不同批次的产品中标志峰含量具有较好的一致性,因此,在检测奶粉中CPP含量时,应以所使用厂家生产的CPP制作标准曲线,以便得到精确的测定结果。

研究还发现,在前处理样品时不能高速离心奶粉溶解后的样品,否则在色谱图中不能检测到标志峰,具体机理待查。由于奶粉组分复杂,建议配制好的样品立即进行检测,否则可能由于发酵等原因引起样品组成的变化,使测定结果偏离正常值。

采用本方法检测奶粉中CPP含量具有前处理简单、检测限能满足检测需求、快速简便、专一性好的特点。

该方法虽是针对添加CPP的奶粉而建立的,但由于奶粉是食品中较复杂的体系,且一般认为奶粉中的干扰测定因子多于其它食品,因此本方法也适用于其它食品。

### 参 考 文 献

1. 冯凤琴,王博诚,倪莉等.酪蛋白磷酸肽(CPP)分离纯化及分子结构的鉴定[J].无锡轻工大学学报,1999,18(4):33~37
2. 冯凤琴,王博诚,许时婴等.酪蛋白磷酸肽对切除卵巢后老龄雌性大鼠骨密度的影响[J].营养学报,2003,25(1):98~100
3. 陈亚非,陈金星,朱韶娟,徐文霞.酪蛋白磷酸肽促进人体钙吸收的作用研究[J].食品科学,2002,23(4):130~132
4. 冯凤琴,许时婴,王璋.生理活性物质酪蛋白磷酸肽的功能及应用[J].食品与发酵工业,1996,5:73~76
5. 庞广昌,陈庆森.生物活性肽-酪蛋白磷酸肽(CPPs)的研究.应用及展望[J].食品科学,1999,20(6):25~29

6. 冯凤琴, 许时婴, 王璋. 低 N/P 酪蛋白的生产制备及功能性质的研究 [J]. 中国食品学报, 1998, 2 (3): 1~5
7. 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
8. 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

### Determination of Casein Phosphopeptides (CPPs) in Milk Powder by HPLC

Feng Fengqin<sup>1</sup> Chen Minjun<sup>2</sup> Du Yongshen<sup>1</sup> Lai Yijian<sup>3</sup> Zhang Chuntao<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University

<sup>2</sup>School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University

<sup>3</sup>Instrumental Analysis Center, Shanghai Jiaotong University

<sup>4</sup>Hangzhou Kangyuan Food Science and Technology

**Abstract** A specific method was developed to determine the Casein Phosphopeptides (CPPs) in milk powder. The method was proved to be simple, specific and sensitive. The detection limit was 10  $\mu\text{g/mL}$ . Within the concentration range of 10~200  $\mu\text{g/mL}$ , the linear regression equation was  $y = 0.1113x + 0.2131$ ,  $R^2 = 0.9994$ . The recovery ranges from 95% to 105%. Thus, this method can be applied to the determination of CPP in milk powder.

**Key words** Casein phosphopeptide HPLC Milk powder

## 我国制盐工业结构将大调整

——开发 200 种新品, 淘汰 70 家定点企业

我国制盐工业结构调整大会在四川成都召开,会上公布了国家发改委《全国制盐工业结构调整指导意见》,其有关负责人表示,我国制盐业将进行最大的一次产业结构调整,国家定点食盐企业将由现在的 121 家缩减到 50 家以内。

目前,我国制盐业总体水平与发达国家相比存在很大差距,工艺技术及装备相对落后,产品品种少,劳动生产率低,产业集中度低,企业规模小。我国盐的品种只有 100 多种,而美国、日本已达 1 000 多种。澳大利亚一个 300 万吨的海盐场只有 120 多人,而我国 100 万吨的海盐场却有 4 800 人。

按《意见》要求,我国将从现在开始,鼓励大企业兼并改造中小企业,逐年关闭淘汰海盐年产 30 万吨以下、湖盐年产 10 万吨以下的企业;新建盐厂年产要达到 60 万吨以上。到 2010 年,新品盐要达到 200 种以上。

四川是我国著名的井盐产区,目前有 10 个国家定点食盐企业,每年食盐产量 400 万吨。四川省盐务管理局计划,以久大、和邦及省盐业公司等三家公司为骨干企业,积极调整食盐产业结构。

(消息来源:《中国食品报》)