

T/CWDPA

团 体 标 准

T/CWDPA XXX—XXXX

动物蛋白肽冻干粉 活性肽含量测定 高效 液相色谱法

Technical specification for oil and gas recovery units in oil storage depots

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中国西部开发促进会 发 布

目次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

 4.1 测试原理 1

 4.2 方法适用性说明 1

5 试剂与材料 2

 5.1 试剂 2

 5.2 标准品 2

 5.3 溶液配制 2

6 仪器与设备 2

7 试样的制备与保存 2

 7.1 试样的制备 2

 7.2 试样的保存 2

8 测定步骤 3

 8.1 样品前处理 3

 8.2 测定 3

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度 3

 9.1 灵敏度 3

 9.2 准确度 3

 9.3 精密度 3

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专利的责任。

本文件由中国西部开发促进会提出。

本文件由中国西部开发促进会归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：。

动物蛋白肽冻干粉 活性肽含量测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了动物蛋白肽冻干粉 活性肽含量测定 高效液相色谱法的原理、试剂与材料、仪器与设备、试样的制备与保存、测定步骤、检测方法灵敏度、准确度和精密度。

本文件适用于动物蛋白肽冻干粉 活性肽含量测定中高效液相色谱法。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

活性肽 bioactive peptide

又称“生物活性肽”，对生物体的生命活动具有特定调控作用的肽类物质。

3.2

肽含量 peptide content

样品中肽类物质（包括低聚肽和多肽）相对于样品总质量的质量分数，以百分数（%）表示。

3.3

动物蛋白肽粉 animal protein peptide powder

以经检验检疫合格、清洁的鲜（冻、干制）可食用动物骨、壳、筋（含鞭）、腱、皮、鳞、肉、内脏、卵等富含蛋白的组织为主要原料，添加水，经前处理（包括破碎、均质、蒸煮等一种或多种工艺）、添加蛋白酶酶解、精制（包括离心、过滤、脱色、脱盐、脱腥等一种或多种工艺）、浓缩、冷冻干燥（冻干）、包装等工艺加工制成的相对分子质量小于10000的粉末或颗粒状动物蛋白肽粉。

4 原理

4.1 测试原理

活性肽是由2~20个氨基酸残基组成的聚合物，具有特定的生物活性（如抗氧化、ACE抑制、抗菌等）。高效液相色谱法（HPLC）以其重复性好、分辨率高等优势，成为多肽类物质分离分析最有效、最常用的方法。

本方法采用反相高效液相色谱原理进行分离测定。样品经适当处理后，注入以C18烷基键合硅胶为固定相的色谱柱。流动相为含0.1%三氟乙酸（或甲酸）的乙腈-水体系，采用梯度洗脱方式。在此条件下，活性肽依据其疏水性差异在固定相与流动相之间进行分配：疏水性较弱的肽段极性较强，优先被流动相洗脱；疏水性较强的肽段与固定相作用力更强，保留时间更长，从而实现不同肽段的分离。

活性肽分子中的肽键在紫外光区有特征吸收，可在214 nm或280 nm波长下进行检测。在214 nm处，肽键的吸收系数较高，适用于低浓度肽段的定量分析；在280 nm处，主要检测含色氨酸和酪氨酸残基的肽段。供试品色谱图中，与对照品溶液特征肽峰保留时间一致的色谱峰，采用外标法计算含量。

4.2 方法适用性说明

本方法适用于动物蛋白肽冻干粉中活性肽含量的测定。动物来源的蛋白肽（如鱼类、禽畜、贝类等经酶解工艺制得的肽粉），其主要成分为相对分子质量低于5000 Da的肽类物质。采用反相高效液相色谱法可有效分离样品中的活性肽组分，实现专属性定量分析。

对于需要更高专属性测定的情况，可采用液相色谱-质谱联用法（LC-MS/MS），结合多反应监测（MRM）模式对特征肽段进行准确定量。

5 试剂与材料

5.1 试剂

- 乙腈（CH₃ CN）：色谱纯。
 - 甲酸（HCOOH）：色谱纯。
 - 三氟乙酸（TFA）：色谱纯。
 - 磷酸二氢钠（NaH₂ PO₄ ）。
 - 磷酸氢二钠（Na₂ HPO₄ ）。
 - 盐酸（HCl）。
 - 氢氧化钠（NaOH）。
- 除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.2 标准品

- 活性肽标准品：经结构鉴定的特征肽段，纯度≥95%。
- 可选：同位素内标（如¹³C、¹⁵N标记的特征肽段），用于LC-MS/MS定量。

5.3 溶液配制

- 流动相A：0.1%（v/v）甲酸水溶液，经0.22 μm滤膜过滤。
- 流动相B：0.1%（v/v）甲酸乙腈溶液，经0.22 μm滤膜过滤。
- 标准品储备液：精密称取活性肽标准品适量，用水溶解并稀释至刻度，配制成浓度为1.0 mg/mL的溶液，临配新制。

6 仪器与设备

按表1。

表 1 仪器与设备

仪器名称	要求
高效液相色谱仪	配有紫外检测器或二极管阵列检测器
液相色谱-质谱联用仪	配有三重四级杆质量分析器 (可选，用于更高专属性测定)
分析天平	感量0.0001 g
pH计	精度±0.01
超声波清洗器	—
离心机	转速≥10000 r/min
涡旋混合器	—
0.22 μm/0.45 μm微孔滤膜	水系/有机系

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取冷冻的蜂毒干粉试样，混合均匀后待处理。

7.2 试样的保存

- 20℃储存备用。

8 测定步骤

8.1 样品前处理

称取干粉样品0.15 g(精确至0.001 g)于50 mL容量瓶中,加入30 mL纯水,涡旋使其完全溶解,纯水定容至刻度。溶液经滤膜过滤后,待液相色谱分析。

8.2 测定

8.2.1 液相色谱参考条件

见表2。

表 2 紫外检测法条件

参数	推荐条件
色谱柱	C18柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)或等效柱
柱温	30℃~40℃
检测波长	214 nm或280 nm
流动相	A: 0.1% TFA水溶液 B: 0.1% TFA乙腈溶液
流速	1.0 mL/min
进样量	10~20 μL
洗脱方式	梯度洗脱

8.2.2 定性及定量

分别精密吸取标准品溶液和供试品溶液各10~20 μL(紫外法)或5~10 μL(LC-MS/MS法),标准工作液及试样液中待测物质的响应值均应在仪器检测的线性范围内,超过线性范围时,应根据测定浓度进行适当倍数稀释后再进行分析。

8.2.3 结果计算和表述

试样中活性肽含量,以质量分数毫克每克(mg/g)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——试样液中对应的活性肽的质量浓度,单位为微克每毫升(g/mL);

V ——溶解试样所用溶液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)

测定结果用重复性条件下两次独立测定后的算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本文件检测限为1.5 mg/mL,定量限为5.0 mg/mL。

9.2 准确度

本文件在50 mg/g~600 mg/g添加浓度范围内,其回收率范围为86.9%~98.4%。

9.3 精密度

本文件的批内相对标准偏差≤10%,批间相对标准偏差≤15%。