

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4439—2023

奶及奶制品中乳铁蛋白的测定
高效液相色谱法

Determination of lactoferrin in milk and dairy products—High performance
liquid chromatography

2023-12-22 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、福建长富乳品有限公司、河南花花牛乳业集团股份有限公司、农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室(北京)、农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京)。

本文件主要起草人：郑楠、刘慧敏、叶巧燕、郭梦薇、蔡永康、杨永、何水双、王小鹏、王加启、张养东、张宁、郭洪侠、迟雪露。



奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了奶及奶制品中乳铁蛋白的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于牛的生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳和乳粉中乳铁蛋白的测定。

本文件中牛的生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳的检出限为 2.5 mg/kg,定量限为 5.0 mg/kg;乳粉的检出限为 5.0 mg/kg,定量限为 10.0 mg/kg。

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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的乳铁蛋白用磷酸盐缓冲液提取,经肝素亲和柱富集净化,以反相蛋白质分离柱分离,紫外检测器或二极管阵列检测器检测,外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2 氢氧化钠溶液(5 mol/L):称取 200.0 g 氢氧化钠,加 800 mL 水溶解,定容至 1 L,混匀。

5.3 三氟乙酸溶液:量取 1 mL 三氟乙酸(色谱纯),用水定容至 1 L,混匀。

5.4 三氟乙酸乙腈溶液:量取 1 mL 三氟乙酸(色谱纯),用乙腈(色谱纯)定容至 1 L,混匀。

5.5 磷酸盐缓冲溶液:称取无水磷酸氢二钠 23.85 g、无水磷酸二氢钠 4.99 g,加 800 mL 水溶解,用氢氧化钠溶液(5.2)调节 pH 至 7.50 ± 0.05 ,定容至 1 L,混匀。

5.6 淋洗溶液:称取无水磷酸氢二钠 5.96 g、无水磷酸二氢钠 0.96 g、氯化钠 5.84 g,加 800 mL 水溶解,用氢氧化钠溶液(5.2)调节 pH 至 7.50 ± 0.05 ,定容至 1 L,混匀。

5.7 洗脱溶液:称取无水磷酸氢二钠 5.96 g、无水磷酸二氢钠 2.50 g、氯化钠 119.30 g,加 800 mL 水溶解,用氢氧化钠溶液(5.2)调节 pH 至 7.50 ± 0.05 ,定容至 1 L,混匀。

5.8 乳铁蛋白标准储备溶液(10 mg/mL):将乳铁蛋白标准品(CAS号:146897-68-9,纯度 $\geq 95\%$)¹⁾按标准品证书提供的纯度换算后称量,用水定容至 10 mL。于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 4 个月。

5.9 乳铁蛋白标准中间溶液(200 mg/L):准确移取乳铁蛋白标准储备溶液(5.8)200 μL ,用水定容至 10 mL,混匀。现用现配。

5.10 乳铁蛋白标准系列溶液:准确移取一定量的乳铁蛋白标准中间溶液(5.9),用洗脱溶液(5.7)稀释定容,配制成乳铁蛋白浓度分别为 0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、50.0 mg/L 和

1) 乳铁蛋白标准品是由 Supelco 提供的 CAS 号 146897-68-9,货号 L-047-50MG 的产品。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对该产品的认可,如其他产品具有相同效果,则可使用这些等效产品。

100.0 mg/L 的标准工作溶液,现用现配。

5.11 肝素亲和柱:1 mL。

5.12 微孔滤膜:水系,0.22 μm 。

5.13 玻璃纤维滤纸:0.45 μm 。

6 仪器设备

6.1 液相色谱仪:配紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 天平:感量 0.01 g、0.01 mg。

6.3 涡旋混合器。

6.4 离心机:转速不小于 12 000 r/min。

6.5 固相萃取装置。

6.6 pH 计:精度为 ± 0.01 。

7 样品

7.1 生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳:取有代表性样品约 200 g,混匀,装入洁净容器作为试样,密封并做好标识,于 0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。

7.2 乳粉:取有代表性样品约 200 g,混匀,装入洁净容器作为试样,密封并做好标识,于常温下干燥保存。

8 试验步骤

8.1 提取

8.1.1 生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳

平行做 2 份试验。称取试样 10 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 烧杯中,加入磷酸盐缓冲溶液(5.5),转移至容量瓶中定容至 50 mL,混匀。转移至离心管中离心 10 min,上清液经玻璃纤维滤纸(5.13)过滤,收集滤液待净化。

8.1.2 乳粉

平行做 2 份试验。称取试样 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 烧杯中,加入磷酸盐缓冲溶液(5.5)溶解,转移至容量瓶中定容至 50 mL,混匀。转移至离心管中离心 10 min,上清液经玻璃纤维滤纸(5.13)过滤,收集滤液待净化。

8.2 净化

肝素亲和柱(5.11)用 10 mL 淋洗溶液(5.6)活化,准确移取 10 mL 上清液(8.1)过柱,用 10 mL 淋洗溶液(5.6)淋洗,抽干,用 5 mL 洗脱溶液(5.7)洗脱,收集全部流出液,用洗脱溶液(5.7)定容至 5.0 mL,涡旋混匀,过微孔滤膜(5.12)至样品瓶中,供高效液相色谱仪测定。

8.3 测定步骤

8.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱:反相 C_4 柱(孔径 300 \AA),柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 3.5 μm ,或性能相当者。

流动相:A 为三氟乙酸溶液(5.3),B 为三氟乙酸乙腈溶液(5.4)。

检测波长:280 nm。

流速:1.5 mL/min。

柱温:60 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样量:30 μL 。

梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间, min	A, %	B, %
0	95	5
6.5	62	38
10	62	38
12	40	60
15	40	60
15.5	95	5
20.0	95	5

8.3.2 测定

8.3.2.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列溶液(5.10)和试样溶液(8.2)上机测定。乳铁蛋白标准溶液高效液相色谱图见附录 A。

8.3.2.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中乳铁蛋白保留时间应与标准系列溶液(浓度相当)中乳铁蛋白的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

8.3.2.3 定量

以乳铁蛋白的浓度为横坐标、色谱峰面积(响应值)为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于0.99。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围,应将试样溶液用洗脱溶液稀释后,重新测定(或重新试验)。

9 试验数据处理

试样中乳铁蛋白的含量以质量分数 ω 计,单位为毫克每千克(mg/kg),按公式(1)计算。

$$\omega = \frac{\rho \times V_3 \times V_1 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——被测组分曲线计算浓度的数值,单位为毫克每升(mg/L);

V_3 ——上机液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

V_1 ——试样处理液总体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——试样质量的数值,单位为克(g);

V_2 ——样液过柱体积的数值,单位为毫升(mL);

1 000 ——换算系数;

f ——稀释倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的 15%。

附录 A

(资料性)

乳铁蛋白标准溶液高效液相色谱图

乳铁蛋白标准溶液高效液相色谱图见图 A.1。

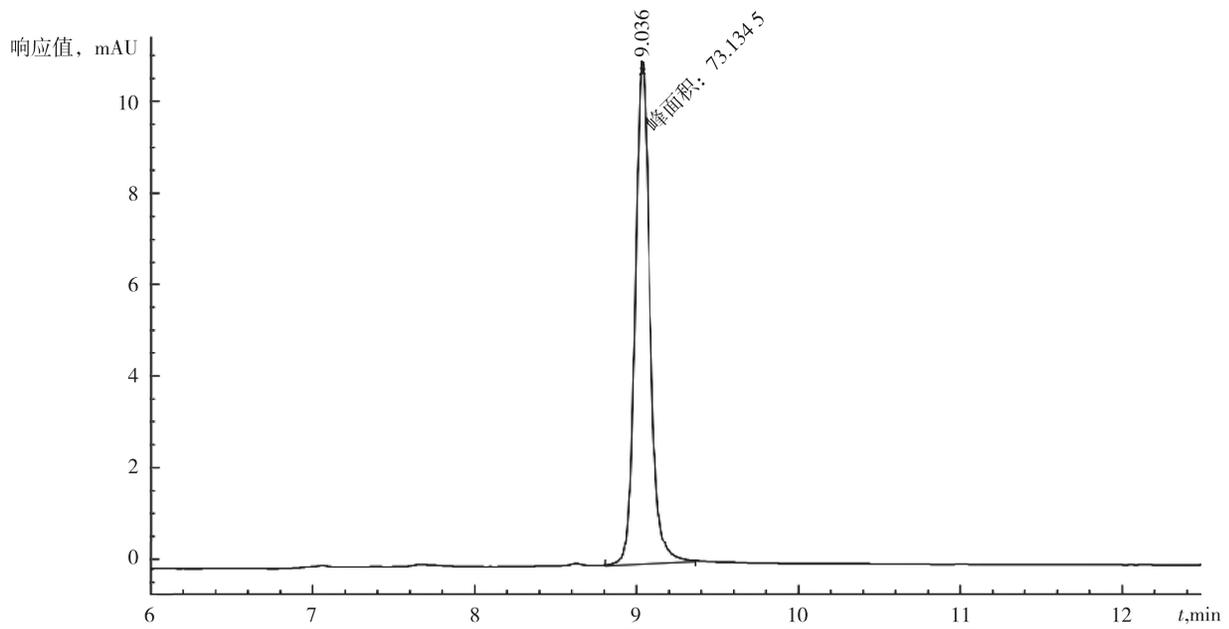


图 A.1 乳铁蛋白标准溶液(50 mg/L)高效液相色谱图