

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4630—2025

牛乳及其制品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定 高效液相色谱法

Determination of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in milk and dairy products—High performance liquid chromatography

2025-01-09 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、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检验检测中心(北京)、中优乳业研究院(天津)有限公司、唐山市食品药品综合检验检测中心、内蒙古智慧质量中心有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司。

本文件主要起草人：郑楠、刘慧敏、张宁、叶巧燕、陈岭军、周淑萍、屈雪寅、郭洪侠、张慧萍、王象欣。

牛乳及其制品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了牛乳及其制品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白测定的高效液相色谱方法。

本文件第一法适用于生牛乳和巴氏杀菌牛乳中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定；第二法适用于高温杀菌牛乳、灭菌牛乳、牛乳粉和牛乳基婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定。

本文件生牛乳和巴氏杀菌牛乳中 α -乳白蛋白定量限为 25 mg/kg, β -乳球蛋白定量限为 100 mg/kg；高温杀菌牛乳和灭菌牛乳中 α -乳白蛋白定量限为 50 mg/kg, β -乳球蛋白定量限为 100 mg/kg；牛乳粉和牛乳基婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白定量限为 250 mg/kg, β -乳球蛋白定量限为 500 mg/kg。

注：本文件仅适用于未变性的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定。

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。

第一法 反相液相色谱法

4 原理

试样用水溶解，调节 pH 至 4.60，使酪蛋白和变性的乳清蛋白沉淀，未变性的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白仍保留在溶液中，离心后用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 三氟乙酸：色谱级。

5.3 乙酸：优级纯。

5.4 乙腈：色谱级。

5.5 三氟乙酸溶液(0.1%)：准确移取 1 mL 三氟乙酸(5.2)，用水定容至 1 L，混匀，临用现配。

5.6 三氟乙酸乙腈溶液(0.1%)：准确移取 1 mL 三氟乙酸(5.2)，用乙腈(5.4)定容至 1 L，混匀，临用现配。

5.7 混合标准储备溶液(10 mg/mL)：准确称取适量 α -乳白蛋白标准品(CAS 号：9051-29-0，纯度 $\geq 95\%$)和 β -乳球蛋白标准品(CAS 号：9045-23-2，纯度 $\geq 95\%$)于 10 mL 容量瓶中，用水稀释并定容，混匀。
—20℃以下保存，有效期 3 个月。

5.8 混合标准中间溶液(200 mg/L)：准确移取 200 μ L 混合标准储备溶液(5.7)，用水稀释并定容至 10 mL，混匀。临用现配。

5.9 混合标准系列溶液：准确移取一定量的混合标准中间溶液(5.8)，用水稀释并定容，配制成浓度分别

为 1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L 混合标准系列溶液。临用现配。

5.10 微孔滤膜：水系，0.22 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：精度为 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 旋涡混合器。

6.4 离心机：转速不低于 12 000 r/min。

6.5 pH 计：精度为±0.01。

7 样品

取生牛乳或巴氏杀菌牛乳约 200 g，混匀，装入洁净容器中。立即测定。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做 2 份试验。称取试样 5 g(精确至 0.1mg)于 50 mL 离心管中，加 15 mL 水混匀，用乙酸(5.3)调节 pH 为 4.60±0.05 后，转移至 25 mL 容量瓶中，用水定容，混匀。转移至离心管中，静置 10 min 以上，12 000 r/min 离心 10 min。准确移取上清液 1 mL 于 5 mL 容量瓶中，用水定容，混匀。过膜(5.10)为试样溶液，待测。

8.2 反相液相色谱参考条件

反相液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₄ 色谱柱(300 Å)，柱长 250 mm，内径 4.6 mm，粒径 3.5 μm，或性能相当者。
- b) 检测波长：210 nm。
- c) 流速：1.5 mL/min。
- d) 柱温：60 ℃。
- e) 进样量：30 μL。
- f) 流动相：A 为三氟乙酸溶液(5.5)，B 为三氟乙酸乙腈溶液(5.6)；梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	95	5
6.5	62	38
10	62	38
22	59	41
22.5	40	60
27.5	40	60
28	95	5
35	95	5

8.3 测定

8.3.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列溶液(5.9)和试样溶液(8.1)上机测定。α-乳白蛋白和 β-

乳球蛋白标准溶液的液相色谱图见附录 A, β -乳球蛋白有 β -乳球蛋白 A 和 β -乳球蛋白 B 两个峰。

8.3.2 定性

以保留时间定性, 试样溶液中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白保留时间应分别与混合标准系列溶液(浓度相当)中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的保留时间一致, 其相对偏差为 $\pm 2.5\%$ 。

8.3.3 定量

分别以 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标(其中 β -乳球蛋白以 β -乳球蛋白 A 和 β -乳球蛋白 B 峰面积之和计), 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, 应将试样溶液用水稀释后, 重新测定。

9 试验数据处理

试样中 α -乳白蛋白或 β -乳球蛋白的含量以质量分数 ω_{1i} 计, 单位为毫克每千克(mg/kg), 按式(1)计算:

$$\omega_{1i} = \frac{\rho_{1i} \times V_3 \times V_1 \times 1000}{m_1 \times V_2 \times 1000} \times f_1 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ_{1i} ——从标准曲线查得的试样溶液中 α -乳白蛋白或 β -乳球蛋白质量浓度的数值, 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 ——试样处理液体积的数值, 单位为毫升(mL);

m_1 ——试样质量的数值, 单位为克(g);

V_2 ——吸取上清液体积的数值, 单位为毫升(mL);

1000——换算系数;

f_1 ——超出曲线范围后的稀释倍数。

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, 2 次独立测试结果的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

第二法 凝胶渗透色谱法

11 原理

试样用水溶解, 调节 pH 至 4.60, 使酪蛋白和变性的乳清蛋白沉淀, 以盐酸胍为变性剂, β -巯基乙醇为还原剂, 使未变性的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的硫—硫(S—S)化学键断开, 形成 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的单体结构。经凝胶色谱柱分离, 高效液相色谱仪测定, 外标法定量。

12 试剂或材料

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。

12.1 水: 应符合 GB/T 6682 规定的一级水。

12.2 β -巯基乙醇。

12.3 盐酸溶液: 取 450 mL 的浓盐酸(含量 36.0%~38.0%), 用水稀释定容至 500 mL, 混匀。

12.4 氢氧化钠溶液(500 g/L): 称取 250 g 氢氧化钠, 加入适量水溶解, 冷却至室温, 定容至 500 mL, 混匀。

12.5 磷酸盐缓冲溶液: 称取 56.6 g 磷酸氢二钠、3.5 g 磷酸二氢钠和 2.9 g 乙二胺四乙酸, 加入 800 mL 水溶解, 混匀。用氢氧化钠溶液(12.4)或盐酸溶液(12.3)调节 pH 至 7.5 ± 0.1 。将溶液转移至 1 L 容量瓶, 用水定容, 混匀。临用现配。

12.6 盐酸胍缓冲溶液:称取 573 g 盐酸胍,置于 1 000 mL 烧杯中,添加 100 mL 磷酸盐缓冲溶液(12.5),加水将该溶液稀释至约 900 mL,同时不停搅拌,用氢氧化钠溶液(12.4)调节 pH 至 7.5 ± 0.1 。将溶液转移至 1 L 容量瓶,用水定容,混匀。过滤膜(12.10)。临用现配。

12.7 混合标准储备溶液(10 mg/mL):准确称取适量 α -乳白蛋白标准品(CAS 号:9051-29-0,纯度 $\geq 95\%$)和 β -乳球蛋白标准品(CAS 号:9045-23-2,纯度 $\geq 95\%$)于 10 mL 容量瓶中,用水稀释并定容,混匀。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期 3 个月。

12.8 混合标准系列溶液:准确移取混合标准储备溶液(12.7),用盐酸胍缓冲溶液(12.6)稀释并定容至 10 mL,配制成浓度分别为 5 mg/L、20 mg/L、80 mg/L、150 mg/L、300 mg/L 和 600 mg/L 的标准系列溶液。临用现配。

12.9 微孔滤膜:水系,0.22 μm 。

12.10 滤膜:水系,0.22 μm 。

13 仪器设备

13.1 液相色谱仪:配紫外检测器或二极管阵列检测器。

13.2 天平:精度为 0.1 mg 和 0.01 mg。

13.3 离心机:转速不低于 12 000 r/min。

13.4 pH 计:精度为 ± 0.01 。

13.5 涡旋混合器。

14 样品

14.1 高温杀菌牛乳、灭菌牛乳

取高温杀菌牛乳或灭菌牛乳约 200 g,混匀,装入洁净容器中。立即测定。

14.2 牛乳粉、牛乳基婴幼儿配方乳粉

取牛乳粉或牛乳基婴幼儿配方乳粉约 200 g,混匀,装入洁净容器中,常温密闭保存。

15 试验步骤

15.1 提取

15.1.1 高温杀菌牛乳、灭菌牛乳

平行做 2 份试验。称取试样 12.5 g(精确至 0.1 mg)于烧杯中,加入 10 mL 水,混匀,用盐酸溶液(12.3)调节 pH 至 4.60 ± 0.05 ,转移至 25 mL 容量瓶中,加水定容,混匀。转移至离心管中,静置 2 h,12 000 r/min 离心 10 min。准确移取上清液 1 mL 于 5 mL 容量瓶中,加入盐酸胍缓冲溶液(12.6)3 mL,再加入 50 μL β -巯基乙醇(12.2),用盐酸胍缓冲溶液(12.6)定容,混匀,室温静置 2 h,摇匀后过膜为试样溶液,待测。

15.1.2 牛乳粉、牛乳基婴幼儿配方乳粉

平行做 2 份试验。称取试样 2.5 g(精确至 0.1 mg)于烧杯中,加 20 mL 水,混匀,用盐酸溶液(12.3)调节 pH 至 4.60 ± 0.05 ,转移至 25 mL 容量瓶中,加水定容,混匀。转移至离心管中,静置 2 h,12 000 r/min 离心 10 min。准确移取上清液 1 mL 于 5 mL 容量瓶中,加入盐酸胍缓冲溶液(12.6)3 mL,再加入 50 μL β -巯基乙醇(12.2),用盐酸胍缓冲液(12.6)定容,混匀。室温静置 2 h 后过膜(12.9)为试样溶液,待测。

15.2 混合标准系列工作溶液的制备

分别取 1.5 mL 标准系列溶液(12.8)于 5 mL 离心管中,加入 10 μL 巯基乙醇(12.2),剧烈振荡 1 min,室温静置 2 h 后,上机测定。

15.3 凝胶渗透色谱参考条件

凝胶渗透色谱参考条件如下：

- a) 凝胶渗透色谱柱：二醇基亲水硅胶柱，柱长 300 mm，内径 4.6 mm，粒径 2 μm ，或性能相当者；
- b) 检测波长：280 nm；
- c) 流速：0.18 mL/min；
- d) 柱温：室温；
- e) 进样量：10 μL ；
- f) 流动相：盐酸胍缓冲溶液(12.6)。

15.4 测定

15.4.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取混合标准系列工作溶液(15.2)和试样溶液(15.1)上机测定。 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准溶液的凝胶渗透色谱图见附录 B。

15.4.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白保留时间应分别与混合标准系列溶液(浓度相当)中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的保留时间一致，其相对偏差为 $\pm 2.5\%$ 。

15.4.3 定量

以 α -乳白蛋白(β -乳球蛋白)的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，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，应将试样溶液用盐酸胍缓冲液稀释后，重新测定。

16 试验数据处理

试样中 α -乳白蛋白或 β -乳球蛋白含量以质量分数 ω_{2i} 计，单位为毫克每千克(mg/kg)，按公式(2)计算。

$$\omega_{2i} = \frac{\rho_{2i} \times V_6 \times V_4 \times 1000}{m_2 \times V_5 \times 1000} \times f_2 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

ρ_{2i} ——被测组分曲线计算浓度的数值，单位为毫克每升(mg/L)；

V_6 ——上机液定容体积的数值，单位为毫升(mL)；

V_4 ——试样处理液体积的数值，单位为毫升(mL)；

m_2 ——试样质量的数值，单位为克(g)；

V_5 ——吸取上清液体积的数值，单位为毫升(mL)；

1000——换算系数；

f_2 ——超出曲线范围后的稀释倍数。

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。

17 精密度

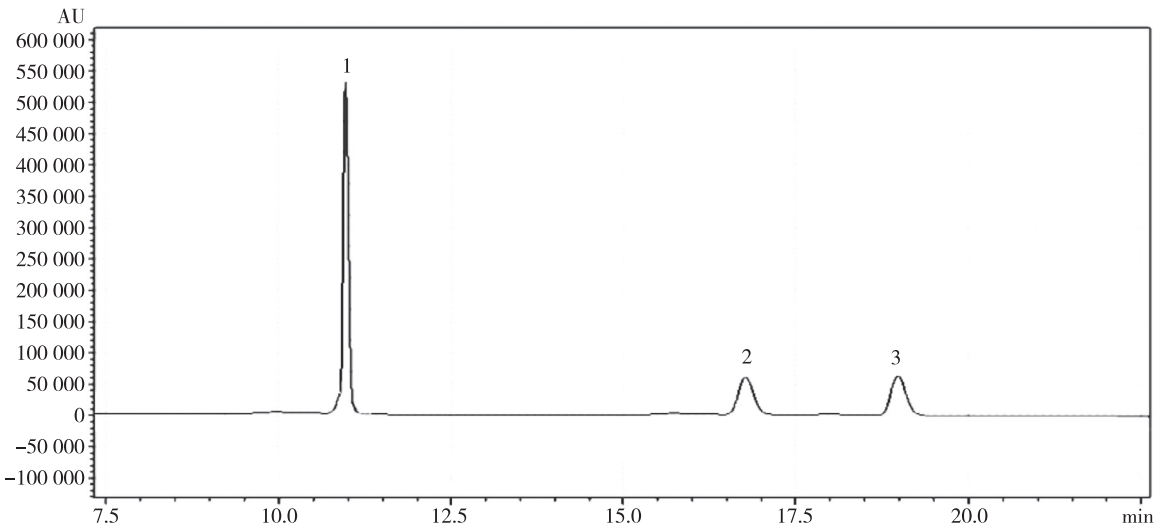
在重复性条件下，两次独立测试结果的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附 录 A

(资料性)

α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白反相液相色谱图

α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准溶液(100 mg/L)反相液相色谱图见图 A. 1。



标引序号说明:

1— α -乳白蛋白;

2— β -乳球蛋白 B;

3— β -乳球蛋白 A。

图 A. 1 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准溶液(100 mg/L)反相液相色谱图

附 录 B
(资料性)
 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白凝胶渗透色谱图

α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准溶液(300 mg/L)凝胶渗透色谱图见图 B. 1。

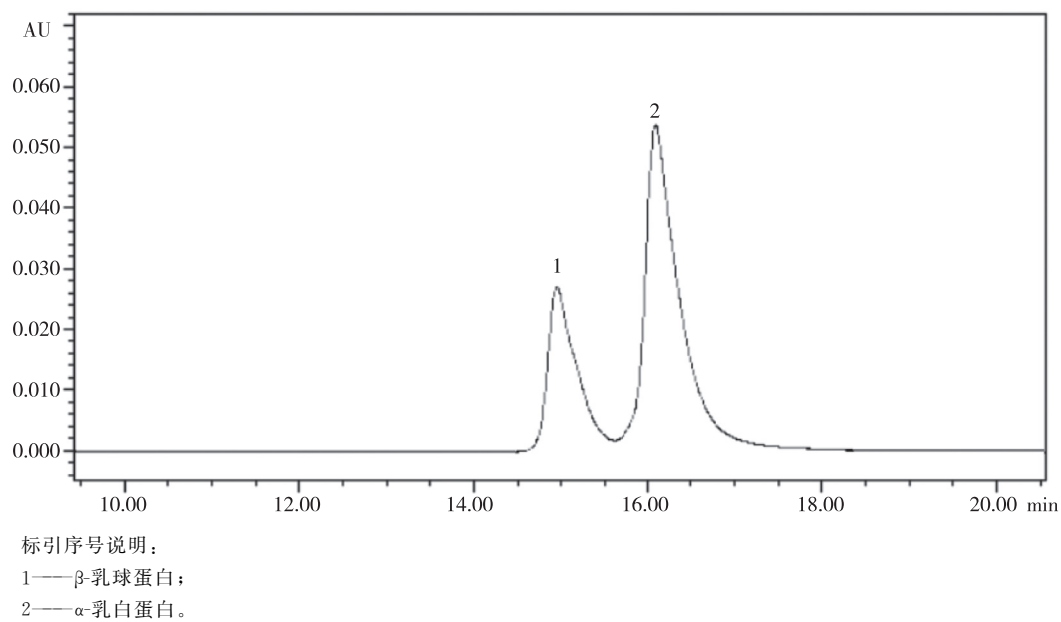


图 B. 1 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准溶液(300 mg/L)凝胶渗透色谱图