

巴氏杀菌乳中乳铁蛋白的提取与检测—食品中乳铁蛋白的测定（2021 征求意见稿）

背景

乳铁蛋白作为一种具备抗病毒、抑制游离基形成、调节人体铁质转移、促进细胞生长并提高免疫力等重要作用的功能性蛋白，目前已广泛添加在乳制品中以期发挥其功能。此前对于乳铁蛋白含量的检测尚未形成统一的方法，《食品安全国家标准 食品中乳铁蛋白的测定（2021 征求意见稿）》的出台，加速了乳铁蛋白检测向标准化方向发展的进程，本文完全按照此标准的操作流程，使用纳谱分析研发的 SelectCore Heparin 肝素亲和柱进行了柱容量验证及加标回收率测定，使用 ChromCore 300Å C4-T 色谱柱进行色谱分析，结果均符合国标要求，为乳制品中牛乳铁蛋白的检测提供了全套的整体解决方案。

适用范围

本方法适用于巴氏杀菌乳、调制乳、含乳饮料、乳基婴幼儿配方食品中牛乳铁蛋白含量的测定。

实验步骤

1、试剂的准备

磷酸盐缓冲液I：称取 7.10 g 磷酸氢二钠，58.40 g 氯化钠，加适量水溶解，用磷酸调 pH 至 8.0 ± 0.2 ，加水稀释至 1000 mL。

磷酸盐缓冲液II：称取 28.40 g 磷酸氢二钠，加 800 mL 水溶解，用磷酸调节 pH 至 7.5 ± 0.2 ，加水稀释至 1000 mL。

三氟乙酸溶液（0.1%）：吸取 1 mL 三氟乙酸，加水稀释至 1000 mL，过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜。

2、样品的制备

2.1 液态试样（巴氏杀菌乳、调制乳、含乳饮料）

称取 5 g（精确至 0.01 g）试样于烧杯中，加入适量磷酸盐缓冲液II混匀，分次将样品转移至 25 mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲液II定容至刻度，充分混匀后转入离心管，在 4°C 下以 10000 r/min 转速离心 12-15 min，取上清液于另一 50 mL 离心管中， 4°C 下以 10000 r/min 转速离心 12-15 min，取样液待净化。

2.2 固态试样（乳基婴幼儿配方食品）

称取 5 g（精确至 0.01 g）试样于烧杯中，加入温热（温度不超过 50°C ）的磷酸盐缓冲液II，搅拌使样品溶解，分次将样品转移至 50 mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲液II定容至刻度后，充分混匀后转入离心管，在 4°C 下以 10000 r/min 转速离心 12-15 min，取上清液于另一 50 mL 离心管中， 4°C 下以 10000 r/min 转速离心 12-15 min，取样液待净化。

3、固相萃取方法

活化：SelectCore Heparin 肝素亲和柱 1 mL，加入 5.0 mL 磷酸盐缓冲液II活化；

上样：准确移取步骤 2 中制备好的样液 10.0 mL，控制流速在 1 mL/min-3 mL/min，弃去流出液；

淋洗：使用 10.0 mL 磷酸盐缓冲液II淋洗，弃去全部流出液；

洗脱：用 5.0 mL 磷酸盐缓冲液I洗脱，收集全部洗脱液，用磷酸盐缓冲液I定容至 5.0 mL，过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜，供上机检测分析用。

4、柱容量验证

在 20.0 mL 磷酸盐缓冲液 II 中添加 2 mg 牛乳铁蛋白标准储备溶液，充分混匀，分别取同一批次 3 根肝素亲和柱，每根柱的上样量为 20.0 mL，经上样，淋洗，洗脱，磷酸盐缓冲液 I 定容至 5.00 mL，用高效液相色谱仪测牛乳铁蛋白的含量。

结果判定：牛乳铁蛋白回收率 $\geq 80\%$ ，为可使用的商品。

5、液相色谱仪器条件

Column: ChromCore 300Å C4-T, 5 μm

Dimension: 4.6 \times 250 mm

Mobile Phase: A) 三氟乙酸溶液 (0.1%)

B) 乙腈

Gradient: t(min)	A	B
0	85	15
20	15	85
22	85	15
25	85	15

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 30 $^{\circ}\text{C}$

Injection: 50 μL

Detection: UV 280 nm

实验谱图

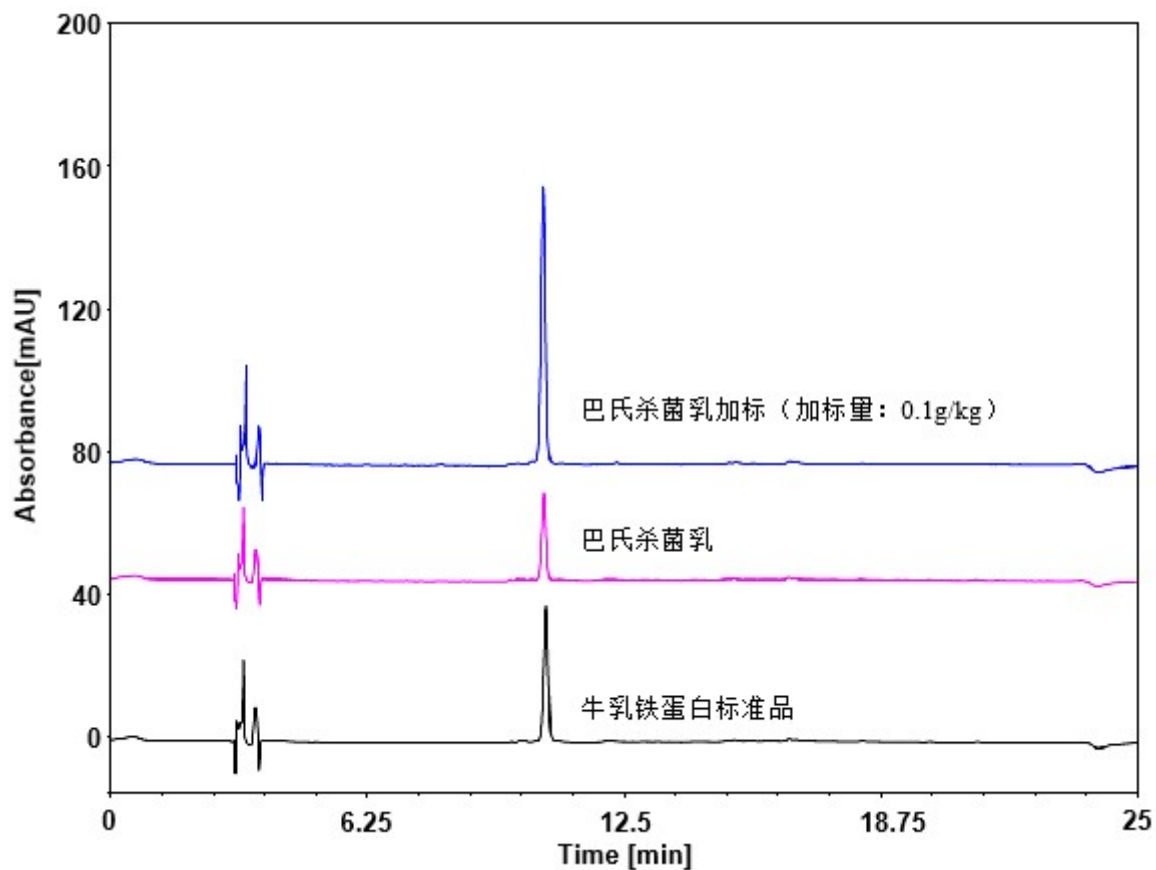


图 1 牛乳铁蛋白标准品、巴氏杀菌乳、巴氏杀菌乳加标对比图

柱容量验证回收率

SelectCore Heparin 肝素亲和柱 编号	牛乳铁蛋白回收率
1	93.26%
2	92.67%
3	92.85%

加标回收率

加标量	加标回收率
0.1g/kg	102.21%

实验结论

由色谱图结果可以看出 SelectCore Heparin 肝素亲和柱对于牛乳铁蛋白的专属性较高，即使巴氏杀菌乳这种成分比较复杂的样品，目标物周围也无杂质干扰，搭配使用 ChromCore 300Å C4-T 色谱柱，可以做到准确积分、精确计算。

SelectCore Heparin 肝素亲和柱柱容量验证回收率均在 90%以上，远大于标准中规定的 80%，并且回收率稳定性良好，RSD 仅为 0.3%，做此验证时，同时对比了其他厂家的肝素亲和柱柱容量验证结果，其中厂家 M 柱容量验证回收率仅有 75%，不符合国标要求。

在使用 SelectCore Heparin 肝素亲和柱进行固相萃取操作时，也同样选择厂家 M 肝素亲和柱进行了相同的实验操作，在上样这一步，10 mL 的上样液，由于纳谱分析采用单分散聚丙烯酸酯为基球，SelectCore Heparin 肝素亲和柱只需 5 分钟即可全部过柱，并且滴速稳定，而厂家 M 肝素亲和柱则需要 10 分钟以上才能完全过柱，滴速会随着上样液体积的增加而变慢。

加标回收率实验也同时对比了厂家 M 的结果，SelectCore Heparin 肝素亲和柱加标回收率为 102.21%，符合检测要求，而厂家 M 加标回收率仅为 87%。综合以上实验现象及结果，选择纳谱分析的 SelectCore Heparin 肝素亲和柱，并搭配使用 ChromCore 300Å C4-T 色谱柱，可以高效、准确的进行牛乳铁蛋白含量的测定。