

DBS

江 苏 省 地 方 标 准

DBS 32/011—2016

食品安全地方标准
婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白的测定 凝
胶色谱法

2016 - 12 - 23 发布

2017 - 02 - 01 实施

江苏省卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准系首次发布。

食品安全地方标准

婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白的测定 凝胶色谱法

1 范围

本标准规定了用凝胶色谱法测定婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白含量的方法。

本标准适用于以牛乳和羊乳为原料的婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白含量的检测，不适用于含水解蛋白的样品。

2 术语和定义

2.1 α -乳白蛋白 (α -Lactalbumin) 是指乳清蛋白中的 α -乳白蛋白。

2.2 β -乳球蛋白 (β -Lactoglobulin) 是指乳清蛋白中的 β -乳球蛋白。

3 原理

以盐酸胍为变性剂，以2-巯基乙醇为还原剂，断开蛋白质中的硫-硫 (S-S) 化学键，形成展开的 α -乳白蛋白的单体结构。采用高效液相色谱法检测，经凝胶渗透色谱柱分离，用紫外检测器在280nm测定，以色谱峰保留时间定性，以峰面积定量。

4 试剂和材料

4.1 总则

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.2 试剂

4.2.1 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)。

4.2.2 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)。

4.2.3 乙二胺四乙酸 (EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)。

4.2.4 50%氢氧化钠溶液：称取 250g 氢氧化钠，加入适量水（400mL 以内）溶解，冷却至室温，定容至 500mL；或市售成品。

4.2.5 盐酸（36.5%–38.0%）(HCl)。

4.2.6 盐酸胍 (CH_6ClN_3)。

4.2.7 2-巯基乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)：化学纯。

4.2.8 牛 α -乳白蛋白标准品，含量 $\geq 90\%$ 。使用时根据证书折算。

4.2.9 牛 β -乳球蛋白标准品，含量 $\geq 90\%$ 。使用时根据证书折算。

4.3 试剂配制

4.3.1 缓冲溶液

称取56.6g磷酸氢二钠、3.5g磷酸二氢钠和2.9g乙二胺四乙酸，将其溶解到800mL水中，测量pH，如有必要，用氢氧化钠（4.2.4）或盐酸（4.2.5）将pH调节到 7.5 ± 0.1 。将溶液转移至1000mL容量瓶，用水定容至1000mL。

4.3.2 流动相

称取573g盐酸胍，置于1000mL广口锥形瓶中，添加100mL缓冲溶液（4.3.1），再用水将该溶液稀释到约900mL，同时不停搅拌，用氢氧化钠溶液（4.2.4），将pH调节到 7.5 ± 0.1 。将溶液转移至1000mL容量瓶中，并用水定容至刻度。过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。

注1：为避免吸入盐酸胍粉末，使用时应戴防护面罩。

4.3.3 标准溶液配制

准确称取25mg（精确到0.1mg） α -乳白蛋白标准品和25mg（精确到0.1mg） β -乳球蛋白标准品，置于10mL容量瓶，用水充分溶解后定容，作为 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白混合标准储备液，浓度为2.5mg/mL。分别移取混合标准储备液0.05mL、0.1mL、0.5mL、1mL、2mL至10mL容量瓶中，用流动相溶解并定容至刻度，配成浓度为0.0125、0.025、0.125、0.25、0.5mg/mL的标准工作溶液。标准工作溶液应现用现配。分别加入 $10 \mu\text{L}$ 2-巯基乙醇，旋紧瓶盖，剧烈振荡10s，置于室温下2h后再进行仪器分析。制备好的样品应在48h内测定。

注2：标准溶液中加入 β -乳球蛋白是为确保 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白达到基线分离。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪（配泵头清洗装置、紫外检测器或二极管矩阵检测器）。

5.2 天平（称量精度0.1mg和0.01g）。

5.3 溶剂过滤系统。

5.4 微量移液器。

6 分析步骤

6.1 试样制备

根据样品的蛋白质含量，称取含有10mg蛋白质的乳粉样品（精确到0.1mg），置于10mL刻度试管中，加入8mL流动相，使样品完全溶解，如需超声应保持样品温度不高于 30°C ，转移至10mL容量瓶，用流动相定容至刻度。取1.5mL该溶液转移到具塞玻璃瓶中，加入 $10 \mu\text{L}$ 2-巯基乙醇，旋紧瓶盖，剧烈振荡10s，置于室温下2h后再进行仪器分析。制备好的样品应在48h内测定。

注3：2-巯基乙醇有毒，应在通风橱中进行操作。

6.2 仪器参考条件

6.2.1 凝胶渗透色谱保护柱：TSK-保护柱 SWxL (6.0 mm×40 mm)或相当者；凝胶渗透色谱柱：两根 TSK-GEL G3000SWXL (7.8 mm×300 mm) 或相当者；使用时将保护柱和2根色谱柱顺序串联。色谱柱长期不使用时，用0.05%叠氮化钠溶液保存¹⁾。

1) 非商业性声明：本方法所用凝胶色谱柱和保护柱均为 TSK 公司生产，此处列出仅供参考，不涉及商业目的。

6.2.2 进样量：50 μ L。

6.2.3 流速：0.5mL/min。

6.2.4 检测器：紫外检测器或二极管矩阵检测器，检测波长 280nm。

6.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，应保证 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的色谱峰达到基线分离。测定 α -乳白蛋白的峰面积，以标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积响应值为纵坐标，绘制标准曲线。

6.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，测定样品中 α -乳白蛋白的峰面积，根据标准曲线得到待测液中 α -乳白蛋白的浓度。

7 分析结果的表述

试样中 α -乳白蛋白（以牛 α -乳白蛋白计）含量按式(1)计算：

$$X = \frac{C \times V \times 100}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中 α -乳白蛋白（以牛 α -乳白蛋白计）的含量，g/100g；

C ——从标准工作曲线得到的试样测定液中 α -乳白蛋白的含量，mg/mL；

V ——试样实际稀释液总体积，mL；

m ——试样质量，g。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留至小数点后2位。

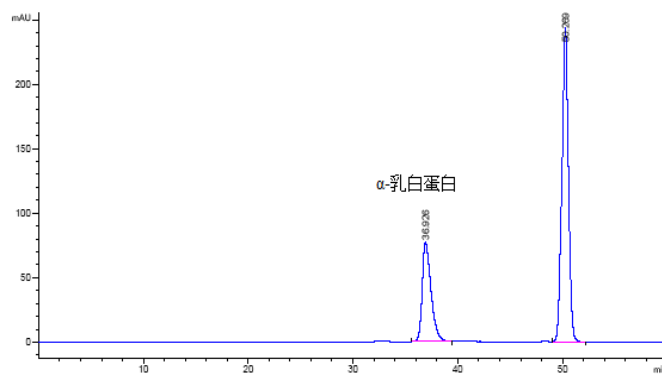
8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的5.0%。

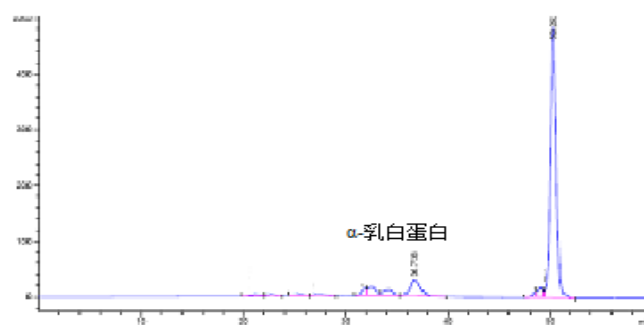
9 其他

方法定量限为0.03g/100g。

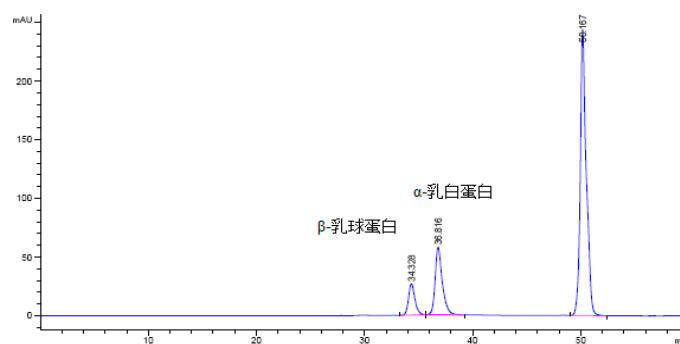
附录 A
(资料性附录)
 α -乳白蛋白的液相色谱图



图A.1 α -乳白蛋白标准品的液相色谱图(RT:36.9min)



图A.2 样品中 α -乳白蛋白的液相色谱图(RT:36.7min)



图A.3 α -乳白蛋白标准品与 β -乳球蛋白标准品的液相色谱图