

新国标应对—GB 5009.299-2024 食品中乳铁蛋白的测定

原创飞飞 [赛默飞色谱与质谱中国](#)

关注我们，更多干货和惊喜好礼



胡金胜 朱桃玉

引言

生牛乳中富含多种天然活性蛋白，如 α -乳白蛋白 (α -Lactalbumin)、 β -乳球蛋白 (β -Lactoglobulin)、乳铁蛋白 (Lactoferrin, LF)、免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG) 和乳过氧化物酶 (Lactoperoxidase, LP) 等，这些天然活性蛋白在抵抗细菌、病毒入侵，增强免疫力，促进组织修复和生长发育等方面发挥着重要作用。其中乳铁蛋白能够参与机体铁代谢，促进体内铁元素的吸收和运输，具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤和增强免疫力的功能。不同的热处理方式 (巴氏杀菌、超高温 (UHT) 灭菌、蒸发浓缩及喷雾干燥等)，会导致乳制品中乳铁蛋白出现不同程度的变性失活，从而影响其营养价值及市场售价。



赛默飞新国标应对方案亮点

1. 本试验参考 GB 5009.299-2024、NY/T 4439-2023 以及相关团体标准和企业标准，对巴氏杀菌乳、超高温灭菌乳和婴幼儿配方奶粉中乳铁蛋白的含量进行测定。
2. 为获得良好的峰形和分离度，试验对样品前处理和液相色谱条件进行了适当优化，在柱温 30 °C、流速 1.0 mL/min 条件下，以 **0.1% 三氟乙酸水-0.1% 三氟乙酸乙腈** 作为流动相进行梯度洗脱，系统最大压力值不超过 106 bar。
3. 试验结果表明：乳铁蛋白标准品溶液 (50.0 μ g/mL) 色谱峰不对称因子 1.00，峰形良好，理论塔板数 30549，柱效优异；连续三次进样，保留时间和峰面积的 RSD 均小于 1%，方法重现性好；线性低点 (1.00 μ g/mL) 信噪比为 8.2，方法灵敏度较高；线性范围 1.00-200 μ g/mL，线性相关系数 $r^2 \geq 0.9998$ ，线性良好。
4. 在反相液相色谱法测定乳制品中乳铁蛋白含量的试验中，BioBasic 4 色谱柱（孔径 300 Å）配合 Vanquish Core 高效液相色谱系统，表现出了良好的重现性和优异的稳定性，方法检出限和定量限均满足标准要求，可供乳制品企业及食品检测实验室参考。

向下滑动查看所有内容

GB 5009.299-2024 赛默飞完整应用解决方案

01

样品前处理

1.1 试样提取

1.1.1 液体试样：低温奶（生牛乳、巴氏杀菌乳）/常温奶（超高温（UHT）灭菌乳）

称取试样 5 g（精确到 0.1 mg）于 50 mL 带刻度旋盖离心管中，用磷酸盐缓冲液 II 定容至 25.0 mL，涡旋振荡提取 3 min，12000 rpm 4 °C 离心 15 min。室温静置，去除上层浮脂，取上清液待净化。

1.1.2 固体试样：乳粉（婴幼儿配方奶粉）

称取试样 2 g（精确到 0.1 mg）于 50 mL 带刻度旋盖离心管中，加适量磷酸盐缓冲液 II 温热振摇溶解，用磷酸盐缓冲液 II 定容至 50.0 mL，涡旋震荡提取 3 min，静置 30 min 以上，12000 rpm 4 °C 离心 15 min。室温静置，去除上层浮脂，取上清液待净化。

向下滑动查看所有内容

1.2 试样净化

1.2.1 活化：HyperSep 肝素亲和柱 (P/N: 60105-110-B) 下端 Luer 接头连接至固相萃取装置，上端通过适配器 (P/N: 60104-259) 串联 10 mL 注射器空筒，加入 2×5 mL 磷酸盐缓冲液 II 活化肝素亲和，控制滴速 2d/3s；

1.2.2 上样：待活化步骤液面接近小柱筛板时，准确移取 10.0 mL 上述样液至注射器空筒 (P/N: S7510-10) 中，控制滴速 2d/3s，弃去流出液；

1.2.3 淋洗：待上样步骤液面接近小柱筛板时，加入 2×5 mL 磷酸盐缓冲液 II 淋洗小柱，弃去流出液，移除适配器和注射器空筒，负压抽干小柱 2 min；

1.2.4 洗脱：加入 2×2.5 mL 磷酸盐缓冲液 I 洗脱，收集全部洗脱液，并用磷酸盐缓冲液 I 定容至 5.00 mL，过 0.2 μm 亲水性 PTFE 针式过滤器 (P/N: 42213-NPL)，滤液待上机测试。

向下滑动查看所有内容

02

仪器配置及色谱条件

Thermo Scientific™ Vanquish Core™ 高效液相色谱系统，配置：泵 Quaternary Pump C (VC-P20-A)，自动进样器 Split Sampler CT (VC-A12-A)，柱温箱 Column Compartment C (VC-C10-A)，检测器 Diode Array Detector CG (VC-D11-A)，数据处理 Chromeleon™ 7.3

色谱柱：BioBasic 4, 5 μm, 4.6×250 mm (P/N: 72305-254630)

流动相：A: 0.1% 三氟乙酸水 B: 0.1% 三氟乙酸乙腈

流速：1.0 mL/min

梯度洗脱程序：

Time (min)	A (%)	B (%)
-2	85	15
0	85	15
20	15	85
22	85	15
30	85	15

进样量：50 μL

柱温：30 °C

检测器：DAD, 采集波长: 280 nm; 采集频率: 5 Hz; 光谱采集: 190-400 nm

向下滑动查看所有内容

谱图及数据

3.1 乳铁蛋白标准品溶液的分离谱图及数据

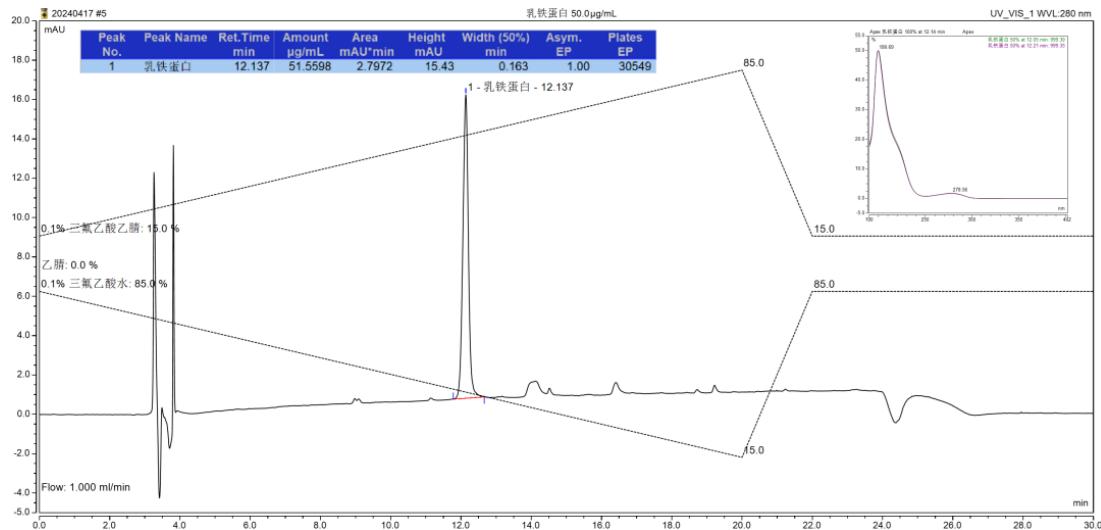


图 1 乳铁蛋白标准品溶液的分离谱图及数据 (50.0 µg/mL) (点击查看大图)

如图 1 所示, 乳铁蛋白标准品溶液 (50.0 µg/mL) 保留时间为 12.137 min, 色谱峰形良好, 不对称因子 1.00, 柱效优异, 理论塔板数 30549。乳铁蛋白在 280 nm 处有特征吸收峰。

3.2 乳铁蛋白标准品溶液连续进样叠加谱图

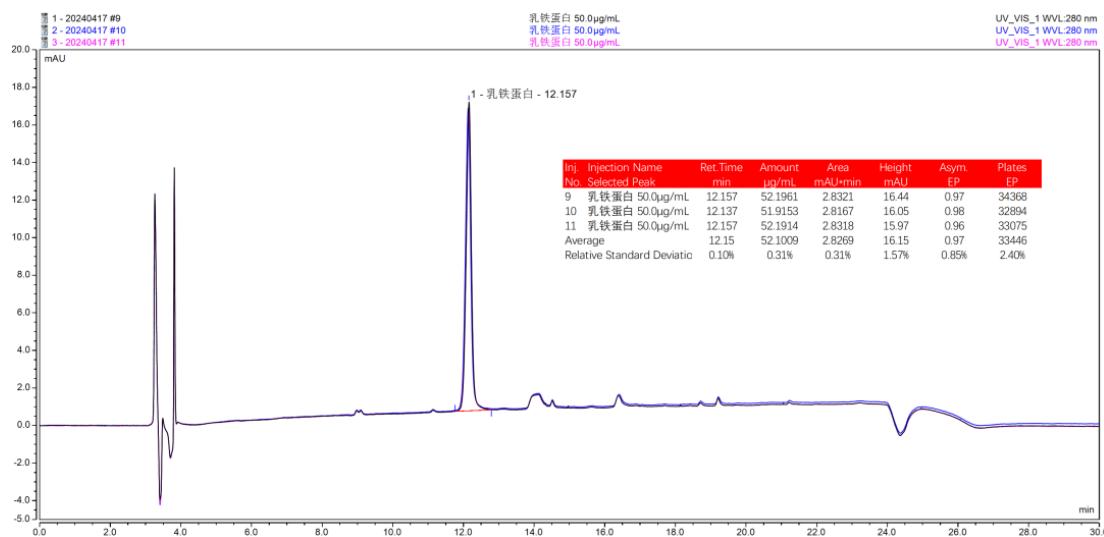


图 2 乳铁蛋白标准品溶液连续进样叠加谱图 (50.0 µg/mL, n=3) (点击查看大图)

乳铁蛋白标准品溶液 (50.0 µg/mL) 连续三次进样, 保留时间和峰面积的 RSD 均小于 1%, 方法重现性好, 分离谱图及数据详见图 2。

3.3 乳铁蛋白标准品溶液校准曲线叠加谱图

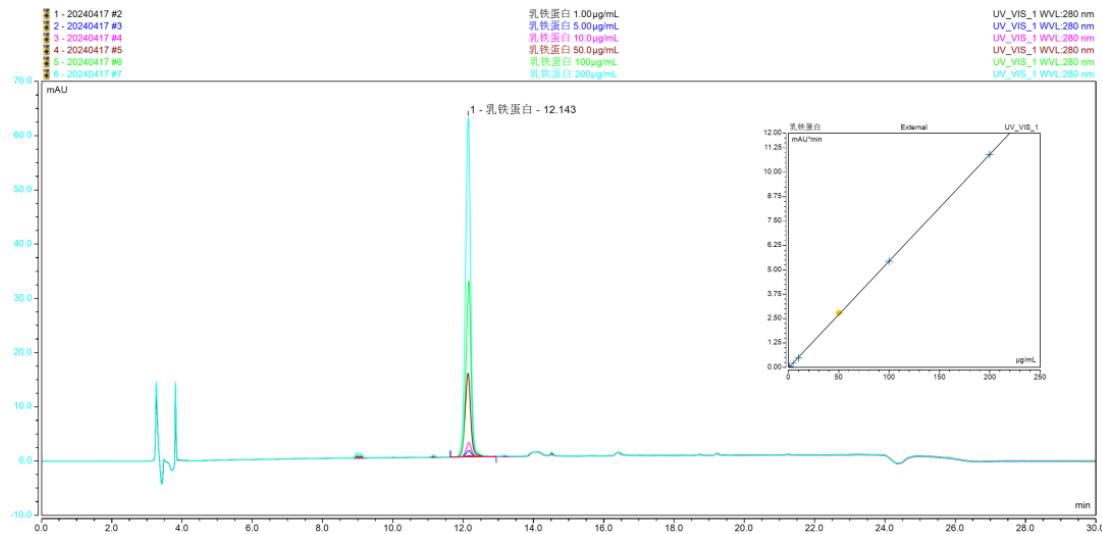


图 3 乳铁蛋白标准品溶液校准曲线叠加谱图 (1.00/5.00/10.0/50.0/100/200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
(点击查看大图)

如图 3 所示, 乳铁蛋白标准品溶液线性范围 1.00-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 线性相关系数 $r^2 \geq 0.9998$, 线性良好。

3.4 乳铁蛋白标准品溶液线性最低点与空白溶液叠加谱图

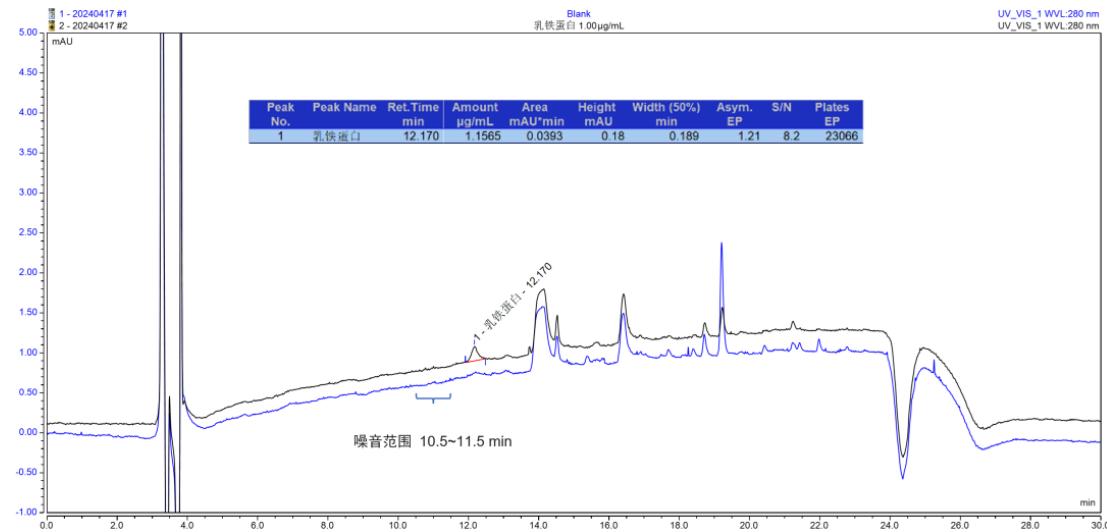


图 4 乳铁蛋白标准品溶液线性最低点 (1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与空白溶液叠加谱图 (点击查看大图)

当进样体积为 50 μL 时, 以乳铁蛋白 (1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的峰高为 S, 选取 10.5-11.5 min 基质噪音的平均值为 N, 线性低点信噪比 $S/N=8.2$, 如图 4 所示, 乳铁蛋白测定方法灵敏度相对较高。

3.5 在 0.1% 三氟乙酸水-乙腈流动相体系下，乳铁蛋白的标准品溶液的峰形及响应

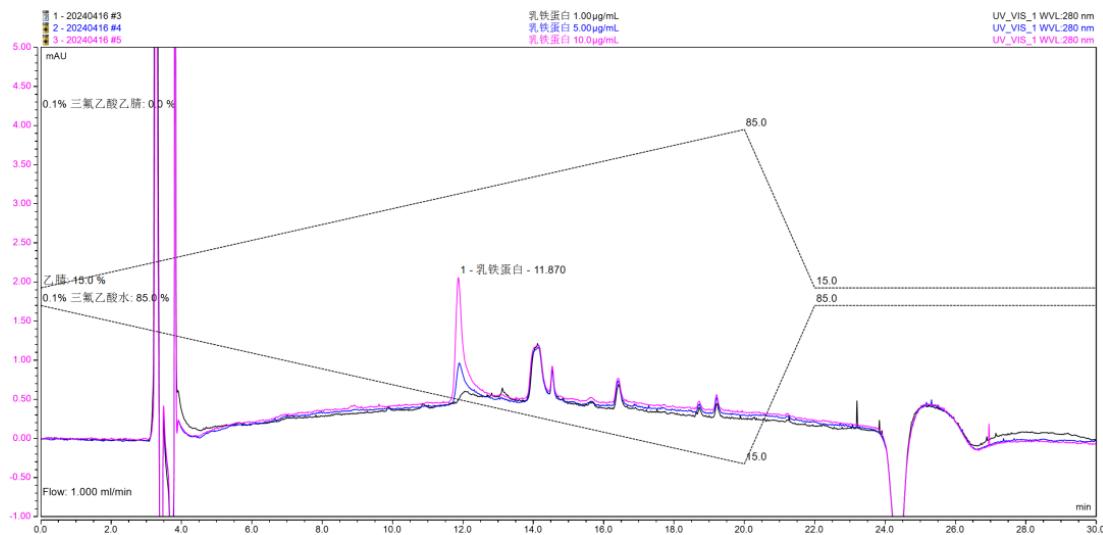


图 5 在 0.1% 三氟乙酸水-乙腈流动相体系下，乳铁蛋白的标准品溶液叠加谱图（点击查看大图）

如图 5 所示，当流动相 B 为纯乙腈时，乳铁蛋白峰形会出现严重拖尾，导致线性最低点 (1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 响应较差，无法自动积分，方法检出限不能满足标准要求。综合乳铁蛋白行业标准 NY/T 4439-2023 和团体标准 T/TDSTIA 006-2019 推荐的色谱条件，本试验最终选择 0.1% 三氟乙酸水-0.1% 三氟乙酸乙腈作为流动相进行梯度洗脱，且系统最大压力值不超过 106 bar。

3.6 巴氏杀菌乳（低温奶）、超高温灭菌乳（常温奶）及婴幼儿配方奶粉样品溶液分离谱图

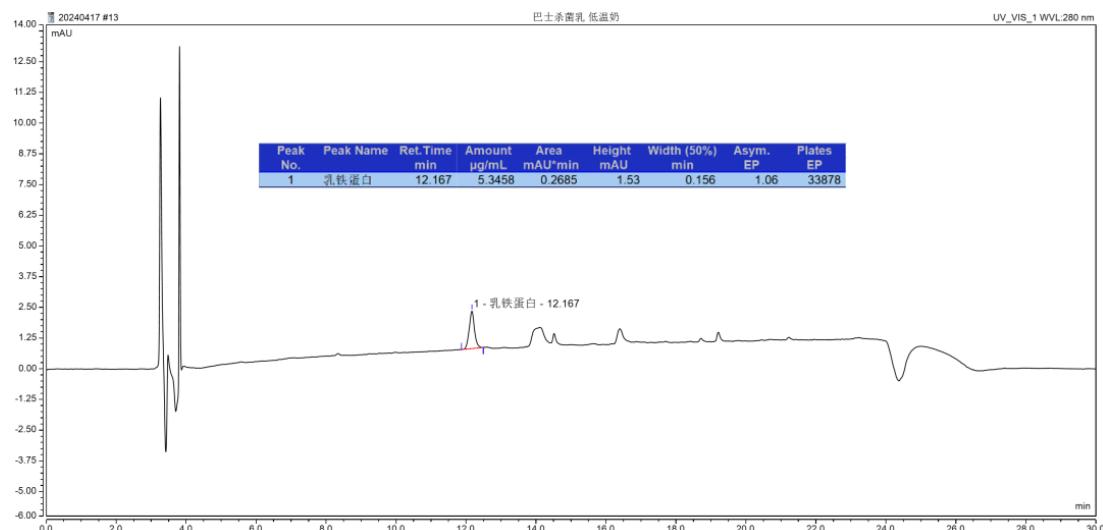


图 6 巴氏杀菌乳（低温奶）样品溶液分离谱图

（点击查看大图）

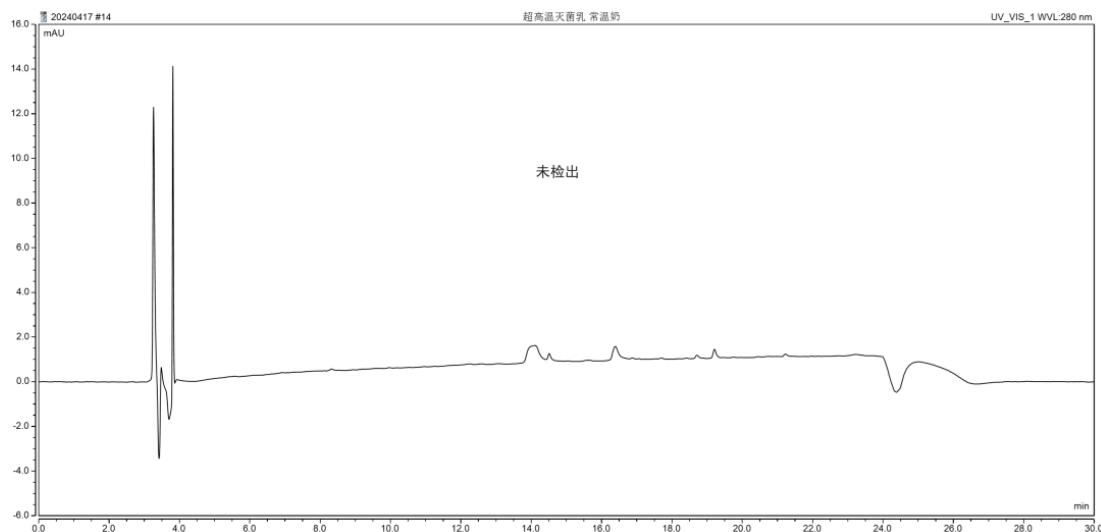


图 7 超高温灭菌乳（常温奶）样品溶液分离谱图

（点击查看大图）

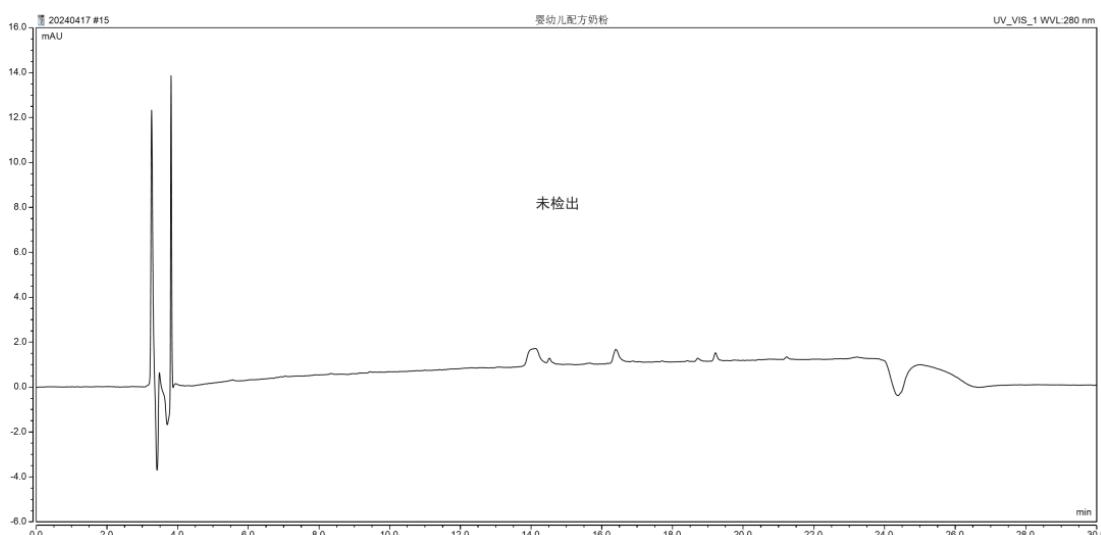


图 8 婴幼儿配方奶粉样品溶液分离谱图及数据

（点击查看大图）

滑动查看更多

乳铁蛋白对温度非常敏感，高温会破坏其化学结构及生物活性，使得肝素亲和柱无法有效富集。如图 6-8 所示，巴氏杀菌乳（低温奶）中乳铁蛋白含量为 13.4 mg/kg；而超高温灭菌乳（常温奶）和婴幼儿配方奶粉中乳铁蛋白均为未检出。

04

GB 5009.299-2024 相关色谱耗材推荐

分析柱及保护柱

BioBasic 4, 5 μm , 4.6×250 mm

(P/N: 72305-254630)

BioBasic 保护柱柱芯, 5 μm , 4.0×10 mm, 4 pk

(P/N: 72305-014001)

Uniguard 直连式保护柱柱套

(P/N: 850-00)

样品前处理

HyperSep 肝素亲和柱, 3 mg, 10/pk

(P/N: 60105-110-B)

HyperSep 玻璃室真空气固相萃取装置, 16 位

(P/N: 60104-232)

适配器, 适用于 1 mL、3 mL、6 mL SPE 小柱转接, 15/pk

(P/N: 60104-259)

National Target 全塑料一次性注射器, Luer-Slip, 10 mL, 100/pk

(P/N: S7510-10)

Titan 3 亲水性 PTFE 针式过滤器, 17 mm, 0.2 μm , 200/pk

(P/N: 42213-NPL)

向下滑动查看所有内容

05

参考文献

- [1] GB 5009.299-2024 食品安全国家标准 食品中乳铁蛋白的测定
- [2] NY/T 4439-2023 奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 高效液相色谱法
- [3] T/TDSTIA 006-2019 奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 液相色谱法
- [4] T/CCAA 70-2023 牛乳基婴儿配方奶粉中乳铁蛋白含量的测定 液相色谱-串联质谱法



想要了解更多应用详情, 请扫描二维码下载

如需合作转载本文, 请文末留言。

ThermoFisher
SCIENTIFIC



长按图片识别二维码

热线电话

800 810 5118

400 650 5118