



# 中华人民共和国国家标准

GB xxxx—xxxx

## 食品安全国家标准 食品中乳铁蛋白的测定

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会  
国家市场监督管理总局 发布

# 食品安全国家标准

## 食品中乳铁蛋白的测定

### 1 范围

本标准规定了食品中乳铁蛋白的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于巴氏杀菌乳、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。

本标准不适用于风味发酵乳、豆基婴幼儿配方食品中牛乳铁蛋白的测定。

### 2 原理

试样中的牛乳铁蛋白经磷酸盐缓冲液提取，肝素亲和柱富集净化后，反相高效液相色谱柱分离，紫外检测器于280 nm处检测，外标法定量。

### 3 试剂和材料

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。

#### 3.1 试剂

3.1.1 乙腈（ $\text{CH}_3\text{CN}$ ）：色谱纯。

3.1.2 三氟乙酸（ $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ）：色谱纯。

3.1.3 氯化钠（ $\text{NaCl}$ ）。

3.1.4 磷酸（ $\text{H}_3\text{PO}_4$ ）。

3.1.5 磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ）。

#### 3.2 试剂配制

3.2.1 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  $\pm$  0.2，加水稀释至 1000 mL。

3.2.2 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 pH 至 7.5  $\pm$  0.2，加水稀释至 1000 mL。

3.2.3 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。

#### 3.3 标准品

3.3.1 牛乳铁蛋白标准品（CAS号：146897-68-9）：纯度  $\geq$  95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

注：标准品可以使用满足溯源要求的商品化标准溶液。

#### 3.4 标准溶液配制

3.4.1 牛乳铁蛋白标准储备溶液（5.0 mg/mL）：称取 50 mg（精确至 0.1 mg）乳铁蛋白标准品用水溶解，定容至 10 mL 容量瓶中，混匀。置于 0  $^{\circ}\text{C}$  ~ 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存，可保存三个月。

3.4.2 牛乳铁蛋白标准中间溶液（0.50 mg/mL）：吸取 1.0 mL 乳铁蛋白标准储备溶液（5.0 mg/mL），用磷酸盐缓冲液 I 定容至 10 mL，现配现用。

3.4.3 牛乳铁蛋白标准系列工作溶液：准确移取一定量的标准中间溶液（0.50 mg/mL），用磷酸盐缓

冲液 I 稀释定容，配制成乳铁蛋白浓度分别为 0.001mg/mL、0.005 mg/mL、0.010mg/mL、0.050 mg/mL、0.10 mg/mL 和 0.20 mg/mL 的标准工作液，临用现配。

### 3.5 材料

3.5.1 肝素亲和柱：1 mL，柱容量 $\geq$ 2mg，或性能相当者（验证方法见附录 B）。

3.5.2 滤膜：水相，0.22  $\mu$ m（应采用标准溶液检验确认无吸附现象）。

3.5.3 滤膜：水相，0.45  $\mu$ m。

## 4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.2 天平：感量分别为 0.01 g 和 0.1 mg。

4.3 冷冻离心机：转速 $\geq$ 10000 r/min。

4.4 pH计：精度为0.01。

4.5 涡旋振荡器。

4.6 恒温水浴锅。

4.7 固相萃取柱装置。

## 5 分析步骤

### 5.1 样品前处理

#### 5.1.1 试样制备

取有代表性的样品至少200 g，液态样品摇匀后储存于容器中作为试样，于0  $^{\circ}$ C~4  $^{\circ}$ C保存，备用；固态样品混匀后储存于容器作为试样，常温下干燥保存，备用。

#### 5.1.2 试样提取

##### 5.1.2.1 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  $^{\circ}$ C 下以 10000 r/min 转速离心 12-15 min，取上清液于另一 50mL 离心管中，4  $^{\circ}$ C 下以 10000 r/min 转速离心 12-15 min，取样液待净化。

##### 5.1.2.2 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  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C 下以 10000 r/min 转速离心 12-15 min，取上清液于另一 50mL 离心管中，4  $^{\circ}$ C 下以 10000 r/min 转速离心 12-15 min，取样液待净化。

#### 5.1.3 试样净化

肝素亲和柱先加入 5.0 mL 磷酸盐缓冲液 II 活化后，准确移取 10.0 mL 样液，控制流速在 1 mL/min~3 mL/min，待样液完全流出后，用 10.0 mL 磷酸盐缓冲液 II 淋洗，弃去全部流出液。用 5.0 mL 磷酸盐缓冲液 I 洗脱，收集全部流出液，用磷酸盐缓冲液 I 定容至 5.00 mL，过 0.22  $\mu$ m 滤膜，供上机检测分析用。

注：可根据样品中乳铁蛋白的含量调整稀释倍数。

## 5.2 仪器参考条件

5.2.1 色谱柱：C<sub>4</sub>，5 μm，300Å，250 mm×4.6 mm（内径）或相当者。

5.2.2 检测波长：280 nm。

5.2.3 柱温：30 ℃。

5.2.4 进样体积：50 μL。

5.2.5 流速：1.0 mL/min。

5.2.6 流动相：三氟乙酸溶液（0.1%）和乙腈，梯度洗脱参数见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱参考程序表

时间 (min)	乙腈 (%)	0.1%三氟乙酸溶液 (%)
0	15	85
20	85	15
22	15	85
25	15	85

## 5.3 标准曲线的制作

将牛乳铁蛋白标准系列工作溶液分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以标准工作液中牛乳铁蛋白的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。牛乳铁蛋白标准溶液的色谱图见附录 A 图 1。

## 5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到试样中牛乳铁蛋白的浓度。

## 6 分析结果的表述

试样中牛乳铁蛋白含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{c}{m} \times V \times f \times \frac{1}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X—试样中牛乳铁蛋白的含量，单位为克每千克（g/kg）；

C—从标准工作曲线中得到的被测组分溶液浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V—样品溶液定容体积，单位为毫升（mL）；

m—试样的质量，单位为克（g）；

f—稀释倍数；

1000—换算系数。

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，结果保留三位有效数字。

## 7 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得超过算术平均值的10%。

## 8 其他

当取样量为5.00 g，本方法中液态试样检出限为0.003 g/kg，定量限为0.01 g/kg；固态试样检出限为0.006 g/kg，定量限为0.02 g/kg。

## 附录 A

## 牛乳铁蛋白标准溶液和样品高效液相色谱图

A.1 0.050 mg/L 牛乳铁蛋白标准溶液高效液相色谱图见图 A.1。

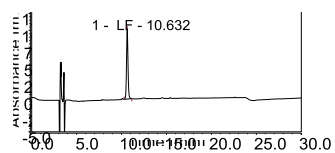


图 A.1 0.05 mg/mL 牛乳铁蛋白标准溶液色谱图

## 附录 B

## 肝素亲和柱验证方法

## B.1 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。

---