
团体标准

《牛奶碱性蛋白的测定 高效液相色谱法》

(征求意见稿)

编制说明

黑龙江飞鹤乳业有限公司

目录

1、标准制定背景及任务来源.....	4
1.1 背景（标准制定的重要性和必要性）.....	4
1.2 任务来源.....	4
2 标准研制过程.....	5
2.1 前期准备.....	5
2.2 制定标准实施方案.....	5
2.3 标准制定和研究.....	5
2.4 起草标准文本.....	5
2.5 复核验证与修订完善.....	6
3 标准编写原则和技术参数确定依据.....	6
3.1 标准编写原则.....	6
3.2 技术参数确定依据.....	6
4 标准技术内容.....	6
4.1 标准文本结构.....	6
4.2 标准检测原理.....	6
4.3 标准试验方法.....	7
4.3.1 色谱柱的选择.....	7
4.3.2 检测波长的选择.....	8
4.3.3 流动相的选择.....	8
4.3.4 不同等电点蛋白色谱条件测试.....	9
4.3.5 积分区域的选择.....	9
4.3.6 方法交叉验证.....	10

4.4 方法验证.....	11
4.4.1 方法线性范围.....	11
4.4.2 重复性（精密度、正确度）.....	12
4.5 碱性蛋白原料主成分确认.....	13
4.6 实际样品测定.....	13
4.7 三家实验室验证.....	14
5 综合评价.....	15
6 国内外同类标准对比情况.....	16
7 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系.....	16
8 重大分歧意见的处理经过和依据.....	16
9 标准作为强制性标准或推荐性标准发布的建议.....	16
10 废止现行有关标准的建议.....	16
11 其他应予说明的事项.....	16
参考文献.....	17

牛奶碱性蛋白的测定 高效液相色谱法

标准编制说明

1、标准制定背景及任务来源

1.1 背景（标准制定的重要性和必要性）

牛奶碱性蛋白是以鲜牛乳为原料，经脱脂、过滤、浓缩、去除酪蛋白等酸性蛋白，经阳离子层析、冷冻干燥等工艺而制成的产品。根据《中华人民共和国食品安全法》和《新资源食品管理办法》的规定，2009年批准牛奶碱性蛋白为新资源食品。

近几年，国内外的学者对牛奶碱性蛋白的研究日渐深入，很多功能逐渐显露出来，有研究表明，牛奶碱性蛋白能促进成骨细胞形成和调节破骨细胞代谢，预防骨质疏松；维持肠道菌群平衡，改善消化功能；改善认知功能障碍，修复记忆损伤；调节机体的免疫反应，具有抵御感染和炎症的作用；由于其丰富的生物学功能，牛奶碱性蛋白受到了众多食品厂商的青睐，添加牛奶碱性蛋白的功能性食品正成为研究的热点。目前缺少检测牛奶碱性蛋白原料的标准，国内外对其检测方面的研究很少，参考文献不多，方法也并不成熟，因此，有必要建立一种牛奶碱性蛋白的检测方法，一旦建立可以规范牛奶碱性蛋白原料的检测、扩大其未来的应用场景、为乳蛋白原料生产工艺的优化和加工等方面提供有力支持，同时还可以为各乳制品企业、检测机构提供新的检测参考，进一步为国家标准的建立提供参考意见。

1.2 任务来源

2024年4月黑龙江飞鹤乳业有限公司收到邀请参加中国营养保健食品协会团体标准工作会议的函，完成了《牛奶碱性蛋白的测定 高效液相色谱法》标准草案和标准文本内容等书面材料，4月18日批准项目立项，项目名称为《牛奶碱性蛋白的测定 高效液相色谱法》。2024年6月7日，根据协会团体标准工作安排，对团体标准《牛奶碱性蛋白的测定 高效液相色谱法》进行讨论，起草组代表对团

体标准进行介绍，参会人员进行交流并给出相关意见。该团体标准由黑龙江飞鹤乳业有限公司负责牵头起草。

2 标准研制过程

根据国家有关标准制定和修订工作的要求，在标准的起草编制过程中，主要做了以下几个方面的工作：

2.1 前期准备

2024年4月，项目研制团队召开第一次工作会议，制定技术实施方案，确定项目总体框架，分配相关人员负责相应工作；项目研制团队成立标准编制小组，对国际、国内相关标准情况和文献进行了查询和研究，对牛奶碱性蛋白的测定方法进行了广泛调研，形成方案初稿。

2.2 制定标准实施方案

标准制定小组于2024年5月制定了详细的实施方案和技术路线，组建了标准起草小组，参与单位黑龙江飞鹤乳业有限公司、中国食品发酵工业研究院、中柏兴业食品科技(北京)有限公司。

2.3 标准制定和研究

2023年12月-2024年6月，标准编制小组开展牛奶碱性蛋白含量测定的方法开发，确立方法线性范围、准确度、精密度、并对实际样品进行检测与分析等，进行标准制定研究工作。

2.4 起草标准文本

2024年4月，制标单位利用建成的牛奶碱性蛋白检测体系充分验证了检测体系的准确、稳定和可重复性后，按照《GB/T 1.1-2020 标准化文件的结构和起草规则》和《GB/T 20001.4-2015 标准编写规则》起草编写标准文本内容和编制说明内容。

2.5 复核验证与修订完善

由制标单位制定检测方法复核验证方案和提供实验材料,委托中优乳检测技术(天津)有限公司、农业农村部奶及奶制品质量检验检测中心(北京)、锐德检测技术(天津)有限公司三家检测机构对标准草案的检测方法的线性范围、准确度、精密度、实际样品进行复核验证实验。经过复核单位的独立、科学和严格的复核验证后,提供了三份复核验证报告。并根据验证报告对标准文本进行了进一步完善,形成了标准文本和编制说明征求意见稿。

3 标准编写原则和技术参数确定依据

3.1 标准编写原则

(1) 本标准以现行法律法规为依据,符合《中华人民共和国农产品质量安全法》有关规定。

(2) 本标准以有利于解决农产品质量安全突出问题,满足我国农产品安全工作需要为原则。

3.2 技术参数确定依据

本标准按照 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》和 GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则 第4部分:试验方法标准》中的有关规定编写。

4 标准技术内容

4.1 标准文本结构

标准文本结构为 1.范围 2.规范性引用文件 3.术语和定义 4.原理 5.试剂或材料 6.仪器设备 7.样品制备 8.试验步骤 9.试验数据处理 10.精密度

4.2 标准检测原理

试样溶解后,经弱阳离子交换色谱柱分离,蛋白在其等电点时呈电中性,与色谱柱离子交换基团无相互作用,样品中的碱性蛋白在对应等电点下被洗脱,紫

外检测器检测，面积归一化法定量。

4.3 标准试验方法

4.3.1 色谱柱的选择

实验选取 TSKgel SP-STAT 阳离子交换色谱柱和 ProPac™Elite WCX 色谱柱比较浓度为 10 mg/mL 的牛奶碱性蛋白原料的分离效果。

TSKgel SP-STAT 和 TSKgel CM-STAT 阳离子交换色谱柱能够快速平衡和分离。其表面由多层阳离子交换基团组成加上相对较大的颗粒尺寸，具有较强的负载能力和较低的操作压力，能够实现蛋白质的快速分离。

ProPac™Elite WCX 色谱柱具有稳定的机械性能，宽 pH 耐受范围，较好的分离度，高回收率，低残留，是一款弱阳离子交换色谱柱，通过蛋白质或糖蛋白的表面电荷与色谱柱的羧基官能团作用，提高了蛋白质之间分离的速度、分离度。

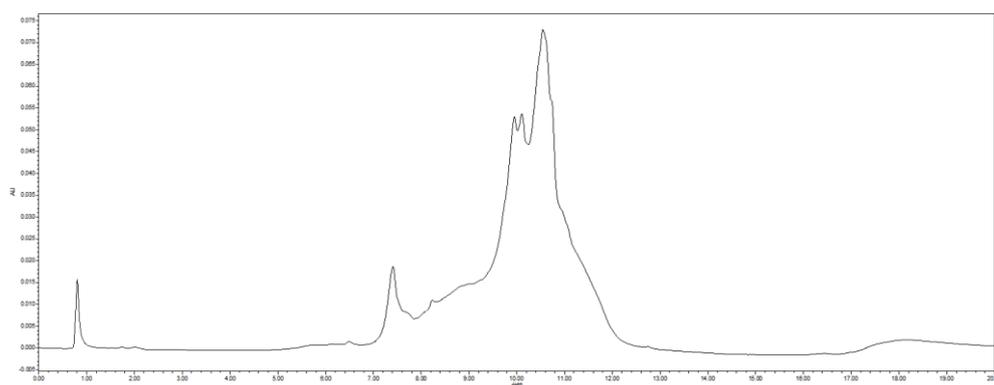


图 1 牛奶碱性蛋白原料在 TSKgel SP-STAT 色谱柱上的色谱图

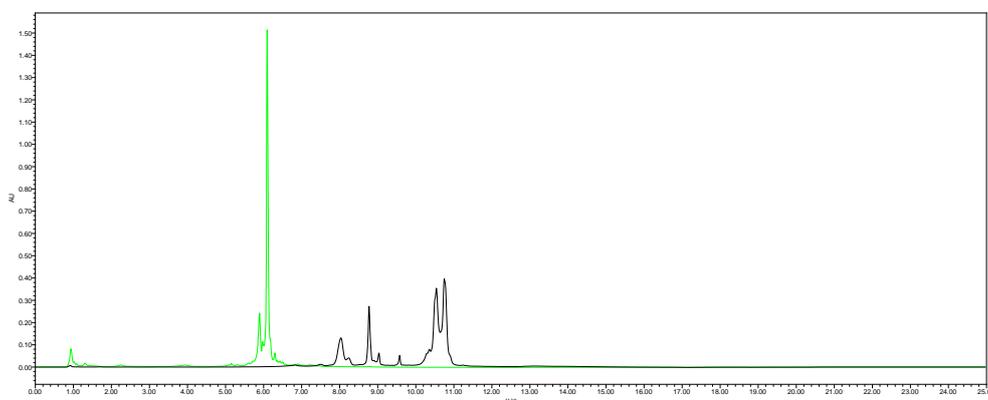


图 2 牛奶碱性蛋白原料在 ProPac™Elite WCX 色谱柱上的色谱图

实验显示,牛奶碱性蛋白原料在弱阳离子色谱柱上能够较好的分离且峰型尖锐对称,故选择 ProPac™Elite WCX 色谱柱。

4.3.2 检测波长的选择

由于蛋白分子中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键,因此蛋白质具有吸收紫外光的性质,不同文献中有报道利用液相色谱法对蛋白进行检测,采用的检测波长有 210 nm 到 280 nm,为了选择待测物的最大吸收波长,本试验比较了上述不同波长下牛奶碱性蛋白检测的色谱图。牛奶碱性蛋白在 280 nm 时进行检测,基线平稳,因此本试验采用 280 nm 作为后续牛奶碱性蛋白的检测波长。

4.3.3 流动相的选择

借鉴药典方法,实验初期选择了 4 mmol/L 的咪唑、哌嗪和三羟甲基氨基甲烷溶液做为流动相,只用 pH 梯度,使用强阳离子色谱柱,发现实验时间过长 40min,之后更换弱阳离子交换柱,洗脱时间有所变短,但是时间还是过长。

时间	流速 (毫升/分钟)	%A	%B	%C	%D	曲线	
1	初始	0.800	95.0	0.5	0.0	4.5	初始
2	5.00	0.800	95.0	0.5	0.0	4.5	6
3	15.00	0.800	0.0	10.0	0.0	90.0	6
4	25.00	0.800	0.0	10.0	0.0	90.0	6
5	25.10	0.800	50.0	5.0	20.0	25.0	6
6	30.00	0.800	50.0	5.0	20.0	25.0	6
7	31.00	0.800	95.0	0.5	0.0	4.5	6
8	40.00	0.800	95.0	0.5	0.0	4.5	6
9							
10							
11							
12							
13							
14							

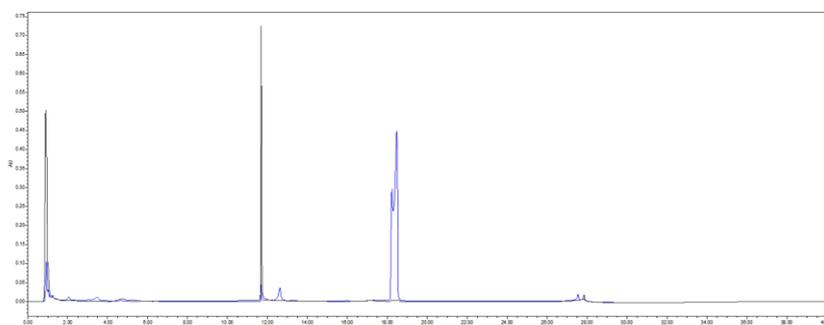


图 3 pH 梯度牛奶碱性蛋白的色谱图 (10 mg/mL)

后期选择了 40 mmol/L 的咪唑、哌嗪和三羟甲基氨基甲烷溶液流动相 B 调 pH 为 11.4,选择 4 mol/L 氯化钠做为流动相 C,采用盐梯度,加快洗脱速度,实验时间控制在 25 分钟,缩短了色谱分析的时间,分离效果较好。

梯度表	时间	流速 (毫升/分钟)	%A	%B	%C	%D	曲线
1	初始	0.800	95.0	0.5	0.0	4.5	初始
2	2.00	0.800	95.0	0.5	0.0	4.5	6
3	12.00	0.800	0.0	10.0	1.0	89.0	6
4	20.00	0.800	0.0	10.0	1.0	89.0	6
5	20.10	0.800	95.0	0.5	0.0	4.5	6
6	30.00	0.800	95.0	0.5	0.0	4.5	6
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							

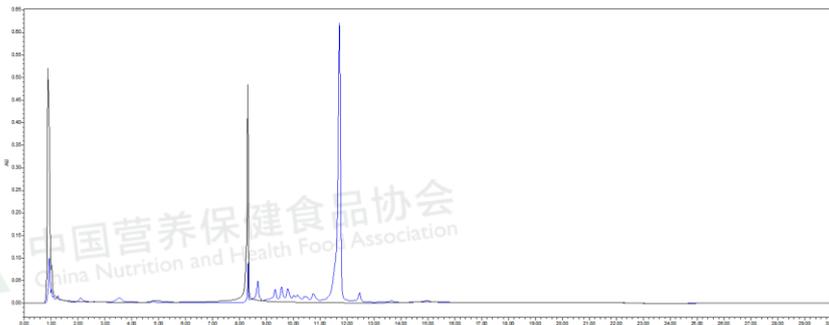


图 4 盐梯度牛奶碱性蛋白的色谱图（10 mg/mL）

4.3.4 不同等电点蛋白色谱条件测试

由于碱性蛋白原料会还有部分酸性蛋白，因此需要测试不同蛋白在色谱条件下出峰的情况，是否能够分离，不被干扰，本试验比较了浓度为 10 mg/mL 等电点标记溶液和 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、BSA、乳铁蛋白、过氧化物酶、骨桥蛋白在色谱条件下的分离效果。如图 5，碱性蛋白乳铁蛋白、过氧化物酶在等电点标记溶液（pI 7.55）右侧出峰，其余蛋白在左侧出峰，蛋白之间能够较好的分离，互不干扰。

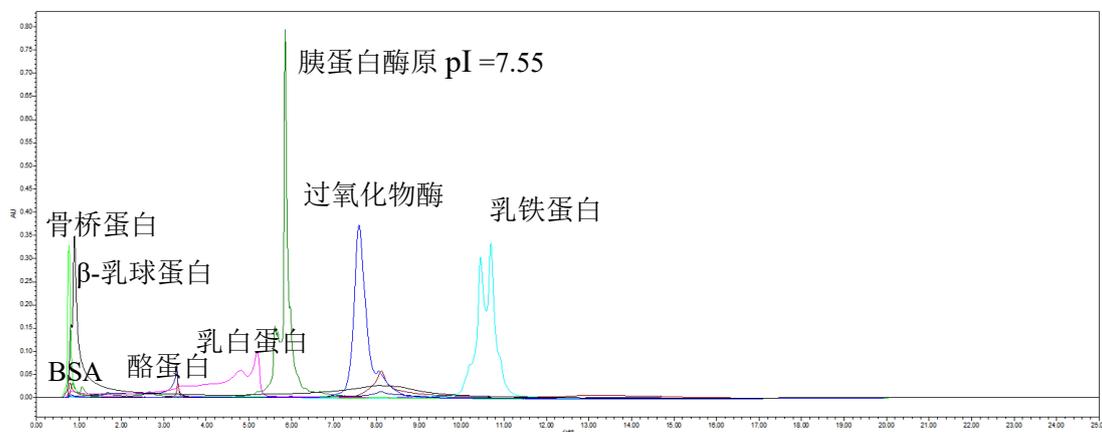


图 5 不同等电点蛋白色谱条件测试的色谱图

4.3.5 积分区域的选择

胰蛋白酶原的等电点（pI）为 7.55，酸性蛋白在胰蛋白酶原左侧出峰，碱性蛋白在胰蛋白酶原右侧出峰，因此选择胰蛋白酶原的峰谷（约 7 min 左右）为碱性蛋白自动积分的起点，选择保留时间 15 min 为其自动积分的终点，计算碱性蛋白峰面积为 A_c ；从梯度初始至 15 min 时间内对所有峰进行自动积分，计算

总蛋白峰面积 A_n 。采用面积归一化法进行牛奶碱性蛋白比例计算。

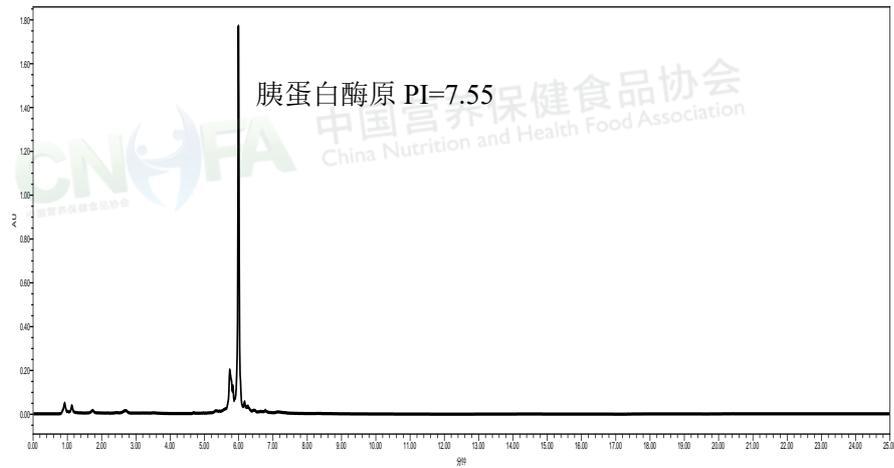


图 6 等电点标记溶液(10 mg/mL)高效液相叠加色谱图

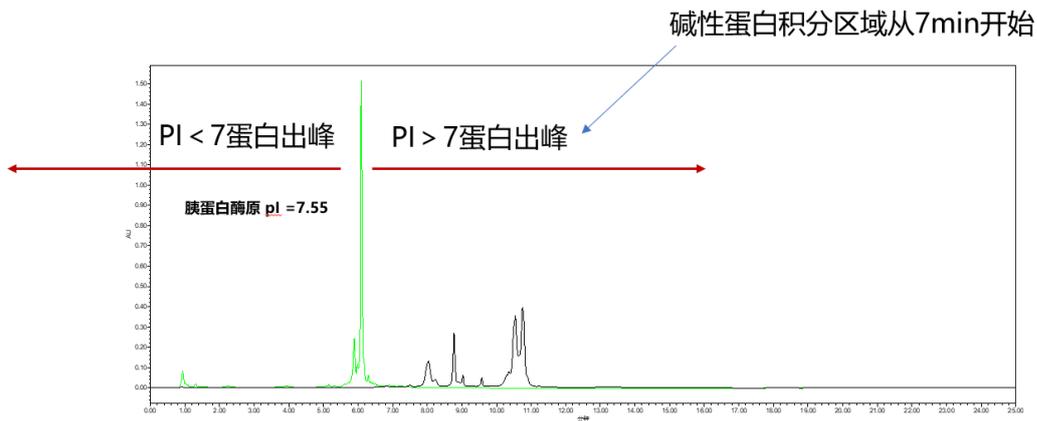


图 7 等电点标记溶液(10 mg/mL)和试样溶液高效液相叠加色谱图

4.3.6 方法交叉验证

为了验证实验对碱性蛋白检测的准确性,采用生物药常用的等电聚焦(CIEF)方法对样品进行进一步验证。

等电聚焦的特点就在于它利用了一种称为两性电解质载体的物质在电场中构成连续的 pH 梯度,使蛋白质或其他具有两性电解质性质的样品进行聚焦,从而达到分离、测定和鉴定的目的。

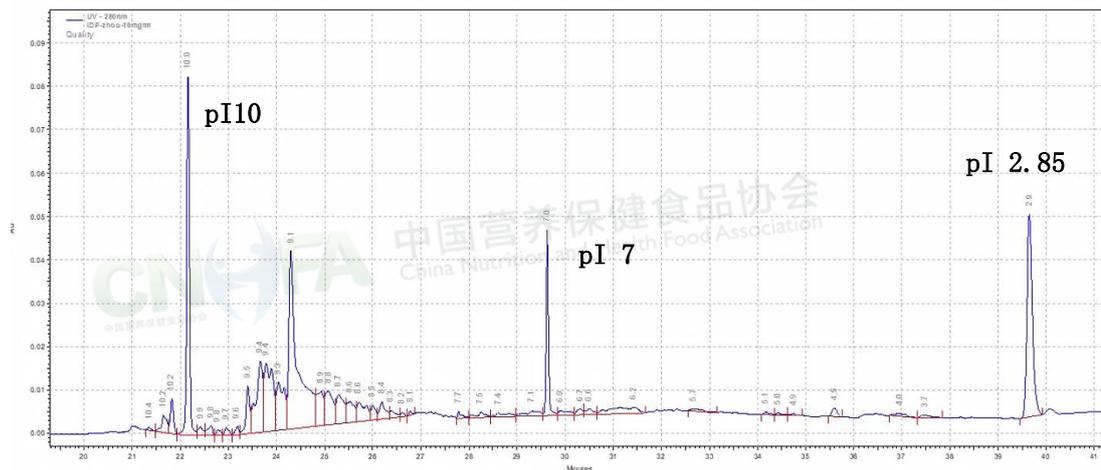


图 8 毛细管电泳 CIEF 谱图

牛奶碱性蛋白原料碱性蛋白的等电点是在 PI 7~10 之间，结果也是和液相方法可以对得上进一步佐证了高效液相方法计算的准确性。

4.4 方法验证

4.4.1 方法线性范围

表 1 样品浓度线性范围

名称	浓度范围 %	最低浓度点色谱图	最高浓度点色谱图
牛奶碱性蛋白样液浓度	0.1~1		

经验证，牛奶碱性蛋白样液浓度在 0.1%~1% 范围内，样品可完全溶解，无团聚现象，色谱峰峰型完整，满足仪器灵敏度要求。

4.4.2 重复性（精密度、正确度）

1、精密度

称取牛奶碱性蛋白原料，按一定比例添加 α -乳白蛋白，得到牛奶碱性蛋白含量为 100%、70%、50% 三水平待检测样品，按照提供的方法进行实验，每个样品平行测定 6 次，计算精密度，测定结果见表 2。

表 2 精密度检测结果

样品	参考值 (牛奶 碱性蛋 白原料 添加比 例) (%)	牛奶碱性蛋白检测结果 (%)						平均结果 (%)	RSD (%)
Sample-1	100%	96.2	96.5	96.1	95.2	96.1	96.7	96.1	0.54
Sample-2	70%	73.5	73.2	72.1	74.2	71.9	71.3	72.7	1.52
Sample-3	50%	49.8	49.7	51.8	50.3	47.9	48.8	49.7	2.67

2、正确度的测定

称取牛奶碱性蛋白原料，按一定比例添加 α -乳白蛋白，得到牛奶碱性蛋白含量为 100%、70%、50% 三水平待检测样品，按照提供的方法进行实验，每个样品平行测定 6 次，计算回收率，测定结果见表 3，其中牛奶碱性蛋白原料及脱脂乳粉蛋白含量参照 GB 5009.5 进行检测。

表 3 回收率检测结果

样品	参考值 (牛奶碱性 蛋白理论添加量) (%)	平均结果 (%)	回收率 (%)
Sample-1	100	96.1	96.1
Sample-2	70	72.7	103.9
Sample-3	50	49.7	99.4

4.5 碱性蛋白原料主成分确认

利用高效液相色谱法，依据 GB 1903.17-2016 食品安全国家标准 食品营养强化剂 乳铁蛋白，在 280 nm 波长条件下，对乳铁蛋白标准品、过氧化物酶标准品、牛奶碱性蛋白原料进行检测，经色谱分析，从谱图中可以看出牛奶碱性蛋白原料中主成份色谱峰与乳铁蛋白、过氧化物酶标准品色谱峰一一对应，经保留时间与光谱图双重确认，牛奶碱性蛋白原料主成分为乳铁蛋白、过氧化物酶。牛奶碱性蛋白原料色谱图与乳铁蛋白标准品色谱图、过氧化物酶标准品色谱图见图 9。

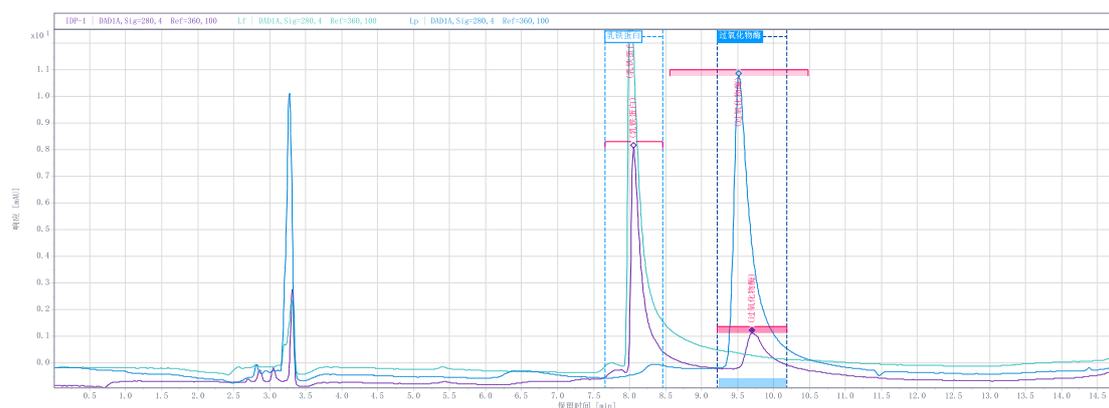


图 9 牛奶碱性蛋白原料色谱图与乳铁蛋白标准品色谱图、过氧化物酶标准品色谱图

4.6 实际样品测定

运用建立好的方法及理化指标中给定的方法，对实际样品进行 3 平行检测，具体结果见表 4。

表 4 牛奶碱性蛋白原料中牛奶碱性蛋白及其他理化指标的测定结果

样品名称	蛋白质含量 %	牛奶碱性蛋白含量 %
IDP-1	99.8	96.1
IDP-2	99.6	96.8
IDP-3	99.6	97.1

4.7 三家实验室验证

表 5 三家实验室精密度检测结果

实验室	参考值（牛奶碱性蛋白原料添加比例）（%）	牛奶碱性蛋白检测结果（%）						平均结果（%）	RSD（%）
Lab-1	100%	93.9	90.1	90.1	89.9	89.8	89.4	90.5	1.84
	70%	67.4	70.1	75.2	74.9	66.1	66.8	70.1	5.82
	50%	51.8	47.9	51.1	48.3	49.9	52.8	50.3	3.88
Lab-2	100%	89.2	89.2	89.1	89.1	89.2	89.2	89.2	0.06
	70%	70.1	71.6	71.2	71.8	70.1	71.1	71.0	1.03
	50%	49.8	52.0	48.9	53.2	51.2	50.1	50.9	3.10
Lab-3	100%	96.4	95.8	96.9	92.2	97.1	96.7	95.9	1.92
	70%	72.1	71.6	73.1	75.8	77.9	71.3	73.6	3.60
	50%	50.1	51.6	53.1	55.8	47.9	51.3	51.6	5.19

如表所示，三家实验室精密度结果在 0.06%-5.82 之间，满足 GB/T 27404 要求。

表 6 三家实验室回收率检测结果

实验室	样品	参考值（牛奶碱性蛋白理论添加量）（%）	平均结果（%）	回收率（%）
Lab-1	Sample-1	100	90.5	90.5
	Sample-2	70	70.1	100.1
	Sample-3	50	50.3	100.6
Lab-2	Sample-1	100	89.2	89.2
	Sample-2	70	71.0	101.4
	Sample-3	50	50.9	101.7
Lab-3	Sample-1	100	95.9	95.9
	Sample-2	70	73.6	105.2
	Sample-3	50	51.6	103.3

如表所示,三家实验室回收率在 89.2%-105.2%之间,满足 GB/T 27404 要求。

表 7 三家实验室实际样品检测

样品名称	实验室	蛋白质含量 %	牛奶碱性蛋白含量 %	牛奶碱性蛋白含量三家结果 RSD%
IDP-1	Lab-1	99.1	90.5	3.87
	Lab-2	99.7	89.2	
	Lab-3	99.1	95.9	
IDP-2	Lab-1	98.9	91.1	3.11
	Lab-2	99.1	91.1	
	Lab-3	98.9	96.1	
IDP-3	Lab-1	99.0	90.1	3.44
	Lab-2	99.2	91.9	
	Lab-3	98.8	96.3	

三家实验室在实际样品检测中,同一样品实验时间精密度均小于 6%,满足满足 GB/T 27404 要求。

三家实验室根据《牛奶碱性蛋白的测定 高效液相色谱法》进行了方法学验证。样品浓度在 0.1%~1%浓度范围内具有较好的线性,精密度检测结果 RSD 在 1.92%~5.19%之间,符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测标准》中相关要求,准确度验证过程中验证结果在 95.9%~105.2%之间,满足 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测标准》中相关要求。

5 综合评价

本标准起草过程中,对色谱柱、检测波长、流动相梯度、线性范围、精密度、准确度,试验结果符合 GB/T 27404-2008《食品安全理化检测实验室质量控制规范》的相关规定。

试验用到的仪器设备包括高速冷冻离心机、分析天平、液相色谱,属于检测机构的通用设备;试验用到的试剂耗材包括胰蛋白酶原、二乙烯二胺、1,3-二氮

杂-2,4-环戊二烯、三羟甲基氨基甲烷、弱阳离子交换色谱柱等，也属于检测机构常用的试剂和耗材，标准的实施预期不会给检测机构增加太多经济负担。

6 国内外同类标准对比情况

本标准在制定过程中未采用国际标准或国外先进标准。

7 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

在标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准、行业标准和团体标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。

8 重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

9 标准作为强制性标准或推荐性标准发布的建议

本标准检测方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文的八项要求之一，因此建议将其作为推荐性团体标准颁布实施。

10 废止现行有关标准的建议

目前我国尚无牛奶碱性蛋白测定的相关标准，无现行标准需废止。

11 其他应予说明的事项

本标准在编制过程中，得到很多专家的指导和帮助，特此表示感谢！

二零二四年六月

参考文献

- [1]张怡然,毕然,李依璇,等.牛初乳碱性蛋白对低钙饮食大鼠骨骼健康的作用[J].中国奶牛,2023,(07):69-74.DOI:10.19305/j.cnki.11-3009/s.2023.07.010.
- [2]Ishida Y, Chacrabati R, Ono-Ohmachi A, et al. Milk basic protein increases ghrelin secretion and bone mineral density in rodents[J]. Nutrition, 2017, 39: 15-19.
- [3]Uenishi K, Ishida H, Toba Y, et al. Milk basic protein increases bone mineral density and improves bone metabolism in healthy young women[J]. Osteoporosis international, 2007, 18: 385-390.
- [4]Ono-Ohmachi A, Ishida Y, Morita Y, et al. Bone mass protective potential mediated by bovine milk basic protein requires normal calcium homeostasis in mice[J]. Nutrition, 2021, 91: 111409.
- [5]刘利娟.UPLC 法测定乳及乳制品中乳清蛋白的研究[J].轻工标准与质量,2022,(02):69-72.DOI:10.19541/j.cnki.issn1004-4108.2022.02.014.
- [6]王玉堂,迟涛,程涛.高效液相色谱法测定羊乳中的乳铁蛋白[J].食品工业科技,2014,35(15):293-296.DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.15.056.
- [7]李纲,张一帆,陈奔,等.平台化高通量 pH 梯度阳离子色谱法在单克隆抗体电荷异质性分析中的应用研究[J].药物分析杂志,2018,38(02):293-302.DOI:10.16155/j.0254-1793.2018.02.15.