



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX
代替 GB/T 5009.194-2003

保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定

Determination of immunoglobulin in health foods

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照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》的规定起草。

本文件替代GB/T 5009.194-2003《保健食品中免疫球蛋白IgG的测定》。

本文件与GB/T 5009.194-2003相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 检测方法分为第一法和第二法；
- 修改了适用范围；
- 增加了试样制备；
- 修改了前处理条件和色谱条件；
- 修改了方法的检出限和定量限。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：略。

本文件主要起草人：略。

保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中免疫球蛋白IgG的测定方法。
本文件第一法适用于保健食品中免疫球蛋白IgG的测定。
本文件第二法适用于保健食品中免疫球蛋白IgG单体的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

第一法 高效液相色谱法

4 原理

试样经磷酸盐缓冲溶液超声提取、低温离心处理后，根据高效亲和色谱原理，使目标物通过磷酸盐缓冲溶液与蛋白 G 柱结合，经盐酸氯化钠水溶液洗脱后，根据色谱峰的保留时间定性，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 试剂

5.1.1 水，按 GB/T 6682 规定的一级水

5.1.2 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液：称取 14.68g 十二水合磷酸氢二钠（相当于 41 mmol 磷酸氢二钠）和 1.40g 二水合磷酸二氢钠（相当于 9 mmol 磷酸二氢钠），用水溶解并定容至 1L，用磷酸调节 pH 值为 7.4-7.5。

5.1.3 12 mmol/L 盐酸氯化钠水溶液：称取氯化钠 2.92g，加入 0.5 mL 浓盐酸（优级纯），再加水定容至 0.5 L。

5.1.4 50 mmol/L 磷酸盐与 0.5mol/L 氯化钠缓冲溶液：称取 7.34g 十二水合磷酸氢二钠和 0.70g 二水合磷酸二氢钠，同时加入 14.61g 氯化钠，用水定容至 0.5 L，过水系滤膜、脱气后上机使用。

注1：不同水合度磷酸盐，摩尔质量不同，称样量需做适当调整。

5.2 标准物质或标准样品

免疫球蛋白IgG标准品（来自牛血清或牛乳），纯度 $\geq 90\%$ ，或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 标准储备溶液（1.0 mg/mL）：准确称取 10 mg（精确至 0.01 mg）免疫球蛋白 IgG 标准品，用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液溶解并定容至 10 mL，于 4℃ 冰箱中保存，保质期 1 个月。

5.3.2 标准系列工作溶液：分别准确吸取不同体积的标准储备溶液，用 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液配制成浓度分别为 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL 的标准工作溶液。临用现配。

5.4 材料

5.4.1 聚醚砜滤膜：0.45 μm ，用于样品过滤。

5.4.2 水相微孔滤膜：0.45 μm ，用于流动相过滤。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或相当者。

6.2 分析天平：感量为 0.01 mg。

6.3 pH 计：精度为 0.01。

6.4 超声波清洗器。

6.5 涡旋振荡器。

6.6 低温冷冻离心机，转速 $\geq 10\ 000\text{r/min}$ 。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 片剂：取不少于 20 片或不低于 10 g 样品，经研钵磨成粉状，封存备用。

7.1.2 粉剂：取不少于 10 g 样品，混匀后，封存备用。

7.1.3 硬胶囊：取不少于 20 粒或不低于 10g 样品，取其内容物，混匀，封存备用。

注2：免疫球蛋白IgG受热后极易变性，在试样制备时，注意温度应控制在50℃以下。由于粉碎机粉碎样品时会产生高温，可能导致免疫球蛋白变性，所以必要时用研钵将样品研细。

7.2 试样处理

称取约0.1 g-1.0 g 试样，加入适量50 mmol/L磷酸盐缓冲溶液，涡旋至溶解，超声提取15 min，转移至50 mL容量瓶中，用50 mmol/L磷酸盐缓冲溶液定容至刻度，移取约25 mL试样溶液于50 mL离心管中，5℃下8000 r/min离心10 min，通过0.45 μm聚醚砜滤膜后进样。

7.3 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：Bio-Monolith Protein G 柱或等效柱；
- b) 流动相：A相为50 mmol/L 磷酸盐缓冲液（5.1.2），B相为50 mmol/L磷酸盐与0.5mol/L氯化钠缓冲溶液（5.1.4），C相为12 mmol/L盐酸氯化钠水溶液（5.1.3），梯度洗脱条件见表1；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：30℃；
- e) 进样量：5μL；
- f) 检测波长：220 nm。

表1 梯度洗脱条件

时间	A (%)	B (%)	C (%)
0.00	100	0	0
1.00	100	0	0
1.01	0	100	0
3.00	0	100	0
3.01	0	0	100
5.00	0	0	100
5.01	100	0	0
9.00	100	0	0

7.4 标准曲线的制作

将标准系列工作溶液（5.3.2）分别注入高效液相色谱仪中，测定其峰面积（标准品色谱图见附录B图B.1），以相应标准工作溶液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

7.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到相应峰面积（样品色谱图见图B.2），根据标准曲线，以外标法计算待测试样溶液中免疫球蛋白IgG的浓度。

注3：可根据试样中组分的含量，适当增加稀释倍数*f*，使其不超出标准曲线测定范围。

8 分析结果的表述

试样中免疫球蛋白IgG的含量按式（1）计算：

$$x = \frac{C \times V \times f}{m \times 10} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

x ——试样中免疫球蛋白 IgG 的含量，单位为 g/100g；

C ——测得的试样中免疫球蛋白 IgG 的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V ——试样定容体积，单位为毫升（mL）；

f ——稀释倍数；

m ——称取试样的质量，单位为克（g）；

10——单位换算系数。

结果保留三位有效数字。

9 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%。

10 其他

当称样量为1.0 g时，检出限为0.14 g/100g，定量限为0.5 g/100g；当称样量为0.25 g时，检出限为0.65 g/100g，定量限为2.0 g/100g；当称样量为0.1g时，检出限为1.3 g/100g，定量限为5.0 g/100g。

第二法 固相萃取—高效液相色谱法

11 原理

试样经 Protein G 亲和柱净化后，经高效分子排阻色谱柱分离、紫外检测器检测，以保留时间定性，外标法定量。

12 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

12.1 试剂

12.1.1 水，按 GB/T 6682 规定的一级水。

12.1.2 石油醚：沸程 30 °C~ 60 °C。

12.1.3 氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 40 g 氢氧化钠，加适量水溶解，冷却至室温，用水定容至 1000 mL，混匀。

12.1.4 磷酸盐缓冲溶液（0.05 mol/L，pH=6.5）：称取 4.11 g 磷酸二氢钠（优级纯），2.23 g 磷酸氢二钠（优级纯），用适量水溶解并定容至 1000 mL，用氢氧化钠溶液（1 mol/L）调 pH 至 6.5 ± 0.05 ，过 0.45 μm 微孔滤膜，备用。

12.1.5 乙酸溶液：取 3.0 mL 乙酸（色谱纯），用水定容至 1000 mL，过 0.45 μm 微孔滤膜备用。

12.1.6 磷酸盐缓冲溶液（20 mmol/L）：称取 0.91 g 磷酸二氢钠（优级纯），1.76 g 磷酸氢二钠（优级纯），8.77 g 氯化钠（优级纯），用适量水溶解并定容至 1000 mL，过 0.45 μm 微孔滤膜，备用。

12.2 标准物质或标准样品

免疫球蛋白 IgG 标准品（来自牛血清或牛奶），纯度 $\geq 90\%$ ，或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

12.3 标准溶液配制

12.3.1 免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液（1.0 mg/mL）：准确称取 25 mg（精确至 0.1 mg）免疫球蛋白 IgG 标准品，用磷酸盐缓冲溶液（12.1.4）溶解并定容至 25 mL，于 4 °C 冰箱中保存，保质期 1 个月。

12.3.2 免疫球蛋白 IgG 标准中间溶液（0.80 mg/mL）：吸取 4.00 mL 标准储备溶液（12.3.1），参照 14.3 操作，收集全部洗脱液至 5 mL 容量瓶中，用乙酸溶液定容至刻度，混匀。

12.3.3 免疫球蛋白 IgG 标准系列工作溶液：分别移取免疫球蛋白 IgG 标准中间溶液（12.3.2）0.05 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL 于 1 mL 容量瓶，用乙酸溶液定容至刻度，混匀。同时吸取 1 mL 标准中间溶液（12.3.2）用作标准系列工作溶液的最高浓度。通过以上操作得到浓度分别为 40.00 $\mu\text{g/mL}$ 、80.00 $\mu\text{g/mL}$ 、160.0 $\mu\text{g/mL}$ 、320.0 $\mu\text{g/mL}$ 、480.0 $\mu\text{g/mL}$ 、640.0 $\mu\text{g/mL}$ 、800.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液。临用现配。

12.4 材料

12.4.1 固相萃取柱：Protein G 亲和柱，柱容量 ≥ 5 mg，柱回收率 $\geq 90\%$ （柱容量、柱回收率验证方法参见附录 A）。

12.4.2 微孔滤膜，水相，0.45 μm。

13 仪器和设备

13.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或相当者。

13.2 分析天平：感量分别为 0.1 mg 和 1 mg。

13.3 pH 计：精度为 0.01。

13.4 超声波清洗器。

13.5 低温冷冻离心机：转速 \geq 10 000 r/min。

14 分析步骤

14.1 试样制备

14.1.1 片剂：取不少于 20 片或不少于 10 g 样品，经研钵磨成粉状，封存备用。

14.1.2 硬胶囊：取不少于 20 粒且不少于 5 g 样品，除去外壳取其内容物，必要时经研钵磨成粉状，封存备用。

14.1.3 粉剂、颗粒剂及固体饮料等：取不少于 20 g 样品，必要时经研钵磨成粉状，封存备用。

14.1.4 软胶囊：取不少于 20 粒且不少于 5 g 样品，除去外壳取其内容物混匀，封存备用。

14.1.5 凝胶糖果：取不少于 10 粒或不少于 10 g 样品，剪碎，备用。

14.1.6 液体试样：取不少于 20 g（或 mL）样品，混合均匀。

注4：免疫球蛋白IgG受热后极易变性，在试样制备时，注意温度应控制在50℃以下。由于粉碎机粉碎样品时会产生高温，可能导致免疫球蛋白变性，所以必要时用研钵将样品研细。

14.2 试样提取

14.2.1 固体试样（片剂、硬胶囊、粉剂、颗粒剂及固体饮料等）

准确称取混合均匀的固体试样0.1 g~1 g（精确至0.1mg）于50 mL锥形瓶中，加入约30 mL 0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（12.1.4），超声提取10 min，冷却至室温，全部转入50mL容量瓶中，用0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（12.1.4）稀释至刻度，混匀。8000 r/min离心10 min，取上清液，待净化。

14.2.2 含油试样（软胶囊等）

准确称取混合均匀的试样0.2g~1 g（精确至0.1mg）于50 mL离心管中，加入10 mL石油醚，涡旋混匀，加入25.00 mL 0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（12.1.4），手动振摇2min混匀，4000 r/min离心5 min，弃去石油醚层，吸取下层清液约15 mL于50 mL离心管中，8000 r/min离心10 min，取上清液，待净化。

14.2.3 凝胶固体试样（凝胶糖果等）

准确称取混合均匀的试样0.5 g~1 g（精确至0.1mg）于50 mL锥形瓶中，加入约30 mL 0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（12.1.4），混匀，于35℃水浴30min，其间振摇3次~5次，取出冷却至室温，全部转入50mL容量瓶中，用0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（12.1.4）定容至刻度，混匀。8000 r/min离心10 min，取上清液，待净化。

14.2.4 液体试样（口服液、乳品及饮料）

准确称取混合均匀的试样5.0 g~10.0 g（精确至1mg）或移取试样5.0 g~10.0 mL于50 mL锥形瓶中，加入约30 mL 0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（12.1.4），超声提取5min，冷却至室温，全部转入50mL容量瓶中，用0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（12.1.4）定容至刻度，混匀。将溶液转入离心管中，于4℃ 8000 r/min离心10 min，取上清液，待净化。

14.3 净化

待Protein G 亲和柱内原有液体流尽后，依次使用5 mL水、10 mL磷酸盐缓冲溶液（12.1.4）活化Protein G 亲和柱（12.4.1），取5.00 mL上清液，上样至亲和柱，待样液全部流出后，用5.0 mL 0.05 mol/L磷酸盐缓冲溶液（12.1.4）淋洗亲和柱，弃去全部流出液，用4.0 mL乙酸溶液洗脱，收集全部洗脱液至5 mL容量瓶中，用乙酸溶液稀释至刻度，混匀，待测。

注5：不同品牌的Protein G亲和柱的淋洗液和洗脱液成分、pH值可能有一定的差异。须按照所用Protein G亲和柱的使用说明书要求配制淋洗液和洗脱液，并进行样品净化处理。

14.4 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：SEC-300（粒径5 μm，7.8 mm×300 mm）或等效柱；
- b) 流动相：20 mmol/L磷酸盐溶液（12.1.6）；
- c) 流速：0.5 mL/min；
- d) 柱温：30℃；
- e) 进样量：10 μL；
- f) 检测波长：214nm。

14.5 标准曲线的制作

将标准系列工作溶液（12.3.3）分别注入高效液相色谱仪中，测定其峰面积（标准品色谱图见附录C图C.1），以相应标准工作溶液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

14.6 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到相应峰面积（样品色谱图见图C.2），根据标准曲线，以外标法计算待测试样溶液中免疫球蛋白IgG的浓度。

注6：可根据试样中组分的含量，适当增加稀释倍数 f ，使其不超出标准曲线测定范围。

15 分析结果的表述

试样中免疫球蛋白IgG单体的含量按式（2）计算：

$$X = \frac{c \times V_1 \times V_3 \times 100}{m \times V_2 \times 10^6} \times f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中 IgG 单体的含量，单位为克每百克或每百毫升（g/100g 或 g/100mL）；

c ——从标准曲线得到的测定溶液中 IgG 单体的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V_1 ——试样提取液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——洗脱液定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的取样量，单位为克或毫升（g 或 mL）；

V_2 ——过亲和柱的提取液体积，单位为毫升（mL）；

100, 10^6 ——单位换算系数；

f ——稀释倍数。

计算结果保留三位有效数字。

16 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%。

17 其他

固体试样，当称样量为0.5 g，定容体积为50 mL时，检出限为0.12 g/100g，定量限为0.4 g/100g。

液体试样，当称样量为5 g（或 mL）时，定容体积为50 mL时，检出限为0.012 g/100g（或g/100mL），定量限为0.04 g/100g（或g/100mL）。

含油试样，当称样量为0.5g，定容体积为25 mL时，检出限为0.12 g/100g，定量限为0.4 g/100g。

附录 A
(规范性附录)
Protein G 亲和柱验证方法

A.1 柱容量验证

准确称取 25.0 mg 免疫球蛋白 IgG 标准品于 25mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲溶液（12.1.4）溶解并定容至刻度，充分混匀，制成浓度为 1.0 mg/mL 免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液。分别取同一批次 3 根 Protein G 亲和柱，每根柱的上样量为 5 mL。经上样、淋洗、洗脱，收集洗脱液，用洗脱液定容至 5mL，得待测液。按照本标准方法的色谱条件测定过亲和柱前储备液和待测液中免疫球蛋白 IgG 单体的峰面积。

结果要求：同一批次，3 根亲和柱重复试验，过亲和柱后免疫球蛋白 IgG 单体的峰面积均值应 $\geq 90\%$ 过亲和柱前免疫球蛋白 IgG 单体的峰面积。

A.2 柱回收率验证

准确称取 25.0 mg 免疫球蛋白 IgG 对照品于 25mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲溶液（12.1.4）溶解并定容至刻度，充分混匀，制成浓度为 1.0 mg/mL 免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液。分别取同一批次 3 根 Protein G 亲和柱，每根柱的上样量为 5 mL。经上样、淋洗、洗脱，收集洗脱液，用洗脱液定容至 5 mL，得待测液。按照本标准方法的色谱条件测定过亲和柱前储备液和待测液中免疫球蛋白 IgG 单体的峰面积。

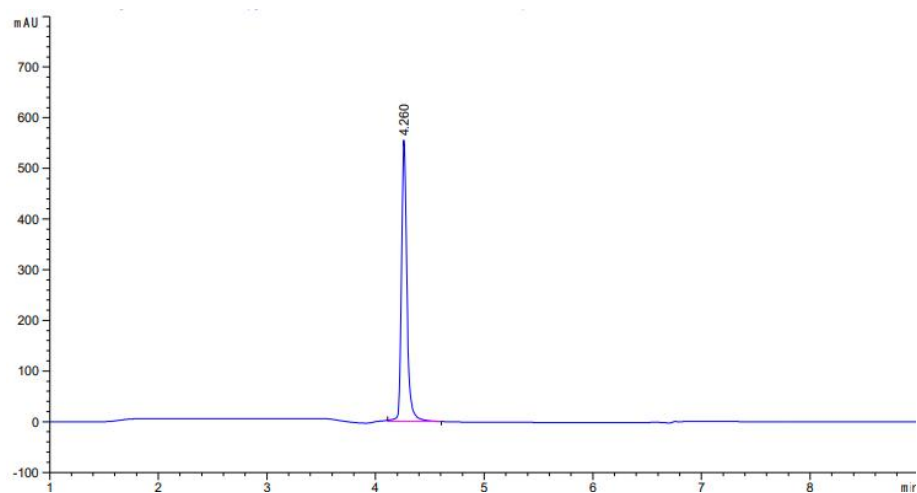
结果要求：同一批次，3 根亲和柱重复试验，过亲和柱后 IgG 单体的峰面积均值应 $\geq 90\%$ 过亲和柱前 IgG 单体的峰面积，即回收率 $\geq 90\%$ 。

附录 B

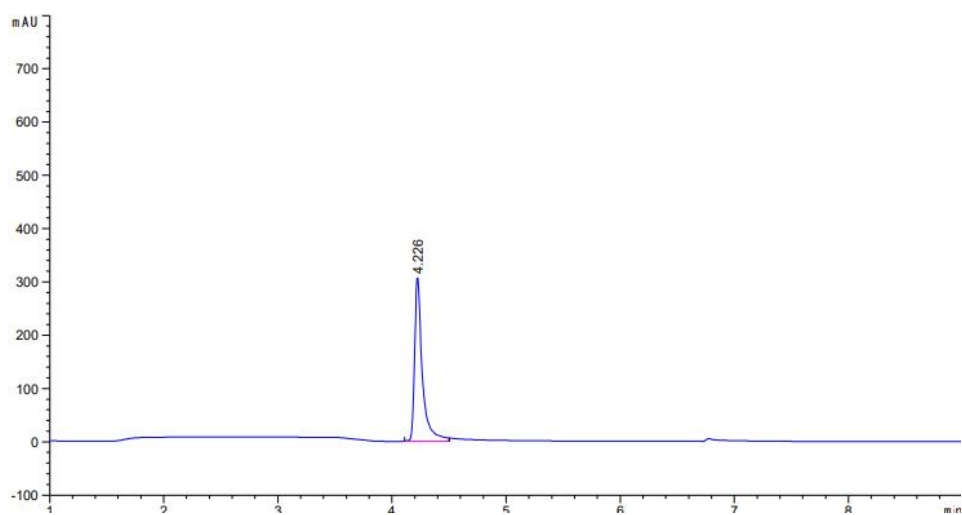
(资料性附录)

高效液相色谱法—免疫球蛋白IgG标准品和样品色谱图

免疫球蛋白IgG标准品和样品色谱图分别见图B.1和图B.2。



图B.1 免疫球蛋白IgG标准品色谱图 (c=0.6mg/mL)



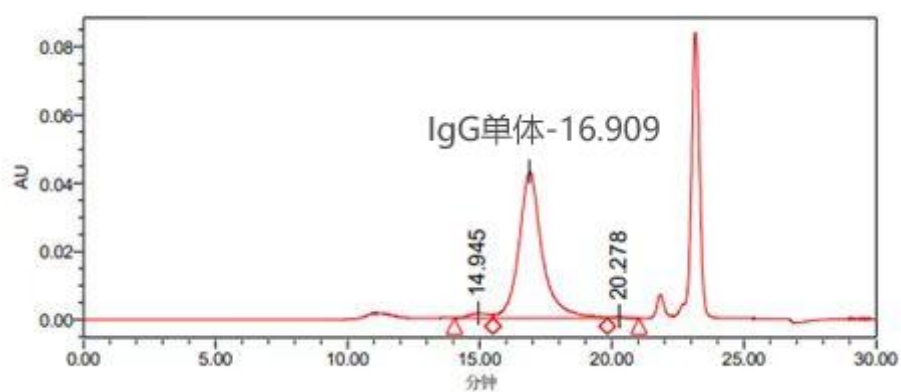
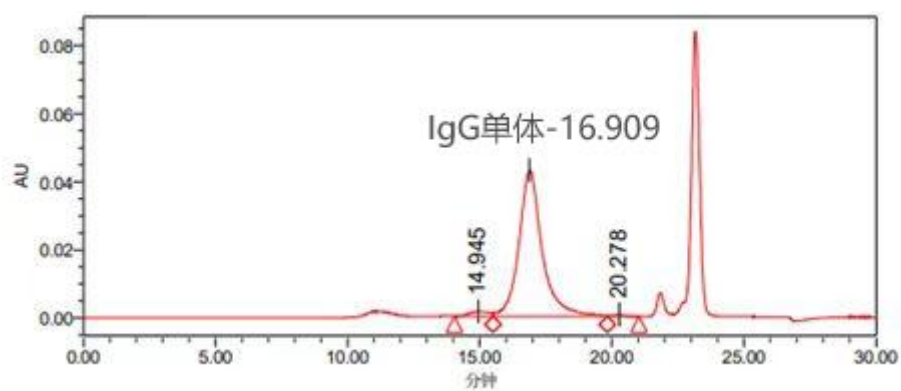
图B.2 免疫球蛋白IgG样品色谱图

附录 C

(资料性附录)

固相萃取-高效液相色谱-免疫球蛋白IgG标准品和样品色谱图

免疫球蛋白IgG标准品和样品色谱图分别见图C.1和图C.2。

图C.1 免疫球蛋白IgG标准品色谱图 (c=200 μ g/mL)

图C.2 免疫球蛋白IgG样品色谱图