

# 《保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定》国家标准（征求意见稿）编制说明

## 一、工作简况

### （一）任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2023 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发〔2023〕37 号），《保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定》（计划号 20230867-T-424）列入修订计划，由全国特殊食品标准化技术委员会归口，由中国食品发酵工业研究院有限公司等单位共同组织完成起草修订工作。

### （二）研究背景

免疫球蛋白（Ig）指具有抗体（Ab）活性或化学结构，与抗体分子相似的球蛋白，为 Y 字型结构，过去常被称为 $\gamma$ -球蛋白。免疫球蛋白是由两条相同的轻链和两条相同的重链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。Ig 根据其亚基、电泳迁移率及重链恒定区的不同可以分为五类，即：免疫球蛋白 IgG、免疫球蛋白 IgA、免疫球蛋白 IgM、免疫球蛋白 IgD 和免疫球蛋白 IgE。其中，免疫球蛋白 IgG 是最主要的免疫因子，并且在人体内占总血清免疫球蛋白含量的 70%~80%左右。IgG 是一种母体给幼崽传递特异性免疫力的主要载体，IgG 能够结合、凝集抗原，具有中和毒素和病原微生物（如病毒）的作用。其他研究表明，IgG 对人体和犊牛的免疫功能有益影响，如防止腹泻、促进非特异性免疫、增强细胞免疫功能、体液免疫功能等。牛初乳中高浓度的免疫球蛋白主要来自血液的转移特别是 IgG。牛初乳是主要免疫球蛋白的来源。所以，在保健食品中，以 IgG 为主要营养成分的产品多以牛初乳为原料。

IgG 存在多种亚型，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，在牛初乳中富含 IgG1 和 IgG2。因此，在使用 GB/T 5009.194-2003 检测时，亲和吸附后洗脱解吸附时会造成 IgG 混合峰型分叉，较大峰宽，前延、拖尾明显，且无法与其他杂质峰分开，造成积分困难，导致无法准确定量。

为了提高结果精确度，对 GB/T 5009.194-2003《保健食品中免疫球蛋白 IgG 检测》标准进行修订，以确保牛初乳原料的质量控制以及保健食品中功效成分含量的精准测定，为企业提供检测依据，为保健食品品质监管提供有利技术手段。

### （三）主要工作过程

2023年8月~2023年10月，成立标准修订组，确定标准制修订方案和工作计划，并开展了方法学验证。

2023年11月，全国特殊食品标准化技术委员会在北京召开《14项保健食品分析方法标准启动会》修订工作启动会，会上讨论了《保健食品中免疫球蛋白IgG的测定》的修订方案。

2023年11月~2024年11月，开展方法研究及实验室内方法验证工作。

2024年11月~2024年12月，开展新修订保健食品中免疫球蛋白IgG测定方法的实验室间方法验证工作。

2025年1月，起草工作组在前期工作基础上形成标准征求意见稿。

## 二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

### （一）标准编制原则

本标准修订遵循“先进性、实用性、统一性、规范性”的总原则，注重标准的通用性、适用性、先进性和可操作性。本标准修订以去除杂蛋白干扰、优化仪器条件、细化样品提取方法，以提高测试方法的准确度、精密度为基本原则，严格按照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》的要求进行编写。本标准编写过程中力求做到技术内容的叙述正确无误，文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理，内容编排、层次划分符合逻辑与规定。

### （二）标准主要内容及其确定依据

#### 1. 标准名称

为《保健食品中免疫球蛋白IgG的测定》，与原标准一致。

#### 2. 适用范围

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。

#### 3. 测定原理

第一法：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。

第二法：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

#### 4. 标准溶液的制备

##### 4.1 第一法

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°C 冰箱中保存，保质期 1 个月。

标准系列工作溶液：分别准确吸取不同体积的标准储备液，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。

##### 4.2 第二法

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，用磷酸盐缓冲溶液溶解并定容至 25 mL，于 4°C 冰箱中保存，保质期 1 个月。

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，待 Protein G 亲和柱内原有液体流尽后，依次使用 5 mL 水、10 mL 磷酸盐缓冲溶液活化 Protein G 亲和柱，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。

免疫球蛋白 IgG 标准系列工作溶液：分别移取 IgG 标准中间溶液 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  $\mu$ g/mL、80.00  $\mu$ g/mL、160.0  $\mu$ g/mL、320.0  $\mu$ g/mL、480.0  $\mu$ g/mL、640.0  $\mu$ g/mL、800.0  $\mu$ g/mL 的标准工作溶液。临用现配。

#### 5. 高效液相色谱检测条件的优化

##### 5.1 第一法

高效液相色谱检测条件及说明：

色谱柱：Bio-Monolith Protein G 柱

波 长：220 nm

流动相：A：50 mmol/L 磷酸盐缓冲液

流动相：B：50mmol/L磷酸盐与0.5mol/L氯化钠缓冲溶液

流动相：C：12 mmol/L盐酸氯化钠水溶液

温 度：30°C

流 速：1 mL/min

进样量：5 $\mu$ L

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

(1) 修改了色谱柱的型号，原型号为HI-Trap Protein G柱，1mL，耐压为0.5MPa；Bio-Monolith Protein G色谱柱工作流速为0.2-2.0mL/min，耐压为150bar（15MPa），能够快速完成检测。

(2) 色谱柱为亲和色谱柱，固定相配基为大肠杆菌的免疫球蛋白G，在流动相A条件下结合免疫球蛋白G上的Fc片段，流动相B为高盐缓冲液，利用离子强度，去除表面携带的正电荷蛋白，pH为2.0的盐酸氯化钠水溶液流动相C将IgG洗脱下来。

修订后A相与国标pH有差异，是由色谱柱本身的适宜条件确定；洗脱液为由甘氨酸改为盐酸，可以有效杜绝细菌滋生、降低基线，试验中加入氯化钠可以有效的保护色谱柱；修订后增加高盐流动相去除表面携带的正电荷蛋白（例如乳铁蛋白），更好的保护色谱柱。

(3) 不同方法中，流动相不同，检测波长不同，需要依据检测条件确定。修订过程对比了214nm、220nm和280nm波长条件下响应情况。信号214nm条件下，响应强度最大，但噪音干扰也最大，最终选择220nm条件下检测。

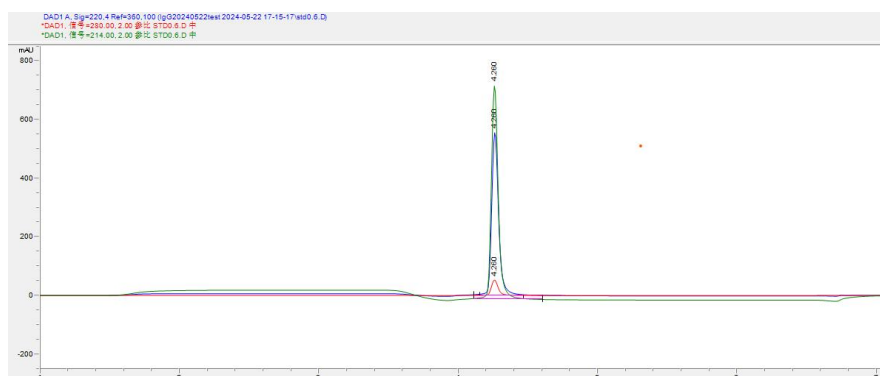


图 1 免疫球蛋白 IgG 不同波长信号响应的色谱图

## 5.2 第二法

色谱柱的选择：

通过文献和标准查询，筛选了 3 款用于免疫球蛋白 IgG 测定的色谱柱。试验选取 Watershed Symmetry300 C4、BioCore SEC-300 和 HI-Trap Protein G，1mL 三个类型的色谱柱进行测试比较。不同色谱柱参考相关文献色谱条件，分别测定免疫球蛋白 IgG 标准品，出峰情况如图 2~图 4 所示。由图可知，BioCore SEC-300 色谱柱所出图谱基线平整，分离度、峰形较好，没有明显拖尾。BioCore SEC-300 为分子排阻色谱柱，分子排阻色谱作为凝胶色谱的一种形式，是利用填料中固定相的孔隙来限制溶剂和溶质分子的进入，从而实现分子的分离。在分子排阻色谱中，较大的分子能够顺利通过更大的孔隙，流速较快；而较小的分子则受到孔隙的限制，流速较慢。分子排阻色谱可以用于分离蛋白质、聚合物、核酸等。分子排阻色谱柱又考察了 Amber SEC300 plus 和不同批次的 BioCore SEC-300，结果理想。最终选择 BioCore SEC-300 作为本项目检测用色谱柱。

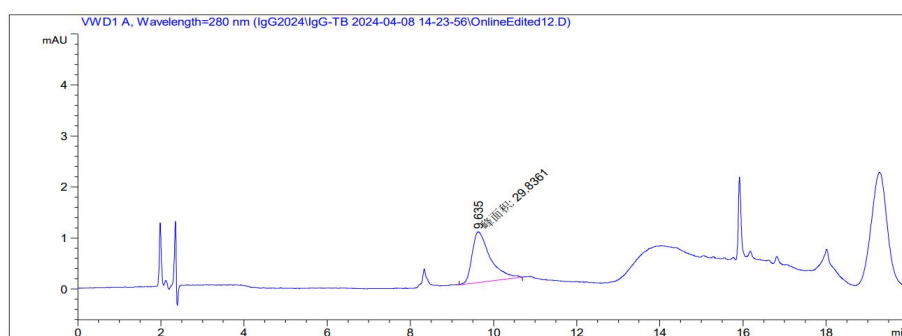


图 2 免疫球蛋白 IgG 在 C4 色谱柱上的色谱图

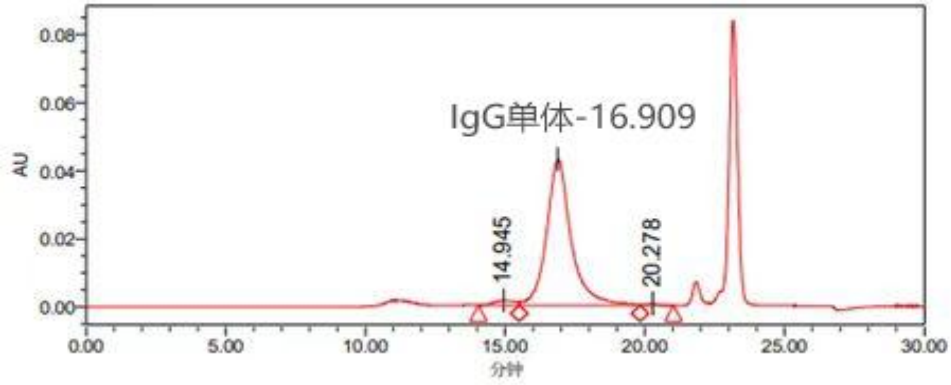


图 3 免疫球蛋白 IgG 在 SEC-300 色谱柱上的色谱图

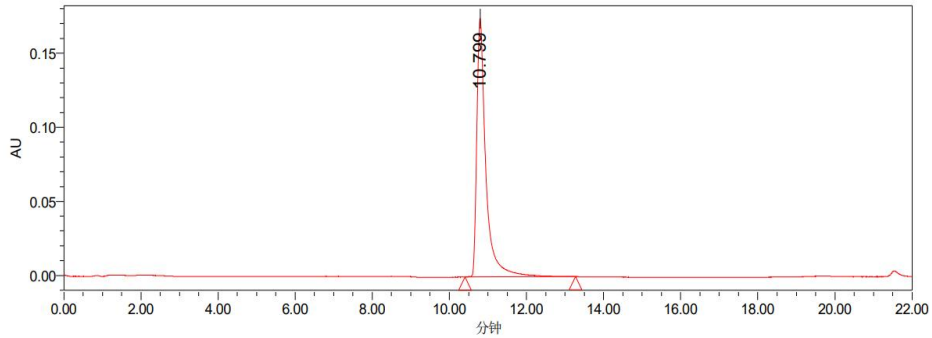


图 4 免疫球蛋白 IgG 在 HI-Trap Protein G, 1mL 色谱柱上的色谱图

特征吸收波长选择:

不同文献中有报道利用液相色谱法对免疫球蛋白 IgG 进行检测，采用的检测波长有 214 nm 及 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免疫球蛋白 IgG 检测的色谱图（图 5）。由图可知，免疫球蛋白 IgG 在 214 nm 时进行检测，基线平稳、响应信号大，检出浓度低，峰形对称性较好，因此本试验采用 214 nm 作为后续免疫球蛋白 IgG 的检测波长。

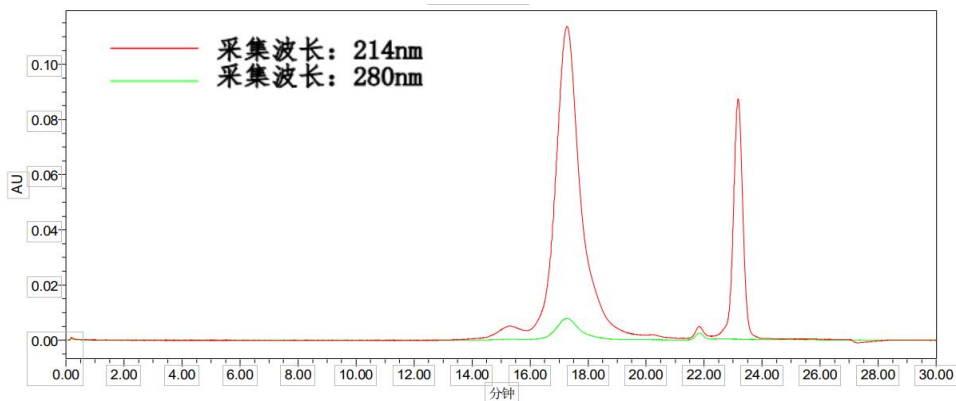


图 5 不同检测波长下免疫球蛋白 IgG 色谱图 (400 $\mu$ g/mL)

流动相的选择:

BioCore SEC-300 色谱柱推荐磷酸盐缓冲溶液作为流动相进行样品的分离，

在流动相中加入 NaCl 有助于优化盐离子强度，加强 IgG 的分离，促进分析信号的增强。本标准组在阅读大量文献和实验验证的基础上，确定了 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 (含有 0.15mol/L NaCl)作为流动相。在该流动相下基线平稳，IgG 目标峰峰形尖锐，对称性好，分离度高。

色谱柱柱温的考察：

原有国标未规定柱温。分别在柱温 25 °C、30 °C、35 °C 的条件下检测 IgG 标准品，结果详见表 2，结果表明不同柱温下 IgG 的峰面积差异不大，考虑到季节变化以及实验室环境，将柱温确定为 30 °C。

表 2 色谱柱柱温考察结果

柱温 (°C)	25	30	35
IgG 单体峰面积	17187220	17232536	17395074

经过方法优化，仪器参考检测条件为：

色谱柱：SEC-300（粒径 5 $\mu$ m，7.8mm $\times$ 300mm），或相当者；

流动相：20 mmol/L 磷酸盐溶液（pH7.0）；

流速：0.5mL/min；

柱温：30°C；

进样量：10 $\mu$ L；

检测器：紫外检测器；

检测波长：214nm。

## 6. 试样前处理的优化

### 6.1 第一法

本方法检测根据样品特点，对制样、称量、离心转速均做出了明确要求，试验过程简单易操作。

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°C 下 8000 r/min 离心 10 min，通过 0.45  $\mu$ m 聚醚砜滤膜后进样。

低温高速离心可以很好的去除脂肪等杂质；聚醚砜达到净化效果的同时，可以避免对免疫球蛋白的吸附。

## 6.2 第二法:

### 试样制备:

近年保健食品的剂型不断增加,根据市场调查,目前含免疫球蛋白 IgG 的保健食品剂型包括片剂、胶囊、粉剂、液体饮料、凝胶糖果等。本方法根据不同的剂型分别规定了前处理方法。

### 试样的净化:

目前保健食品中的免疫球蛋白 IgG 主要来自于牛初乳,乳制品基质复杂,干扰蛋白成分多,样品如果未经前处理,检测方法将受到很大的杂质干扰。此外,不同剂型的产品在加工过程中还可能加入全脂乳粉、D-甘露糖醇、微晶纤维素、羧甲基淀粉钠、羟丙基甲基纤维素、二氧化硅、硬脂酸镁、琼脂、柠檬酸、香精等辅料成分。根据文献可知, Protein G 亲和层析介质可与免疫球蛋白 IgG 通过亲和层析相结合, IgG 将特异性吸附在亲和柱上,用淋洗液将亲和柱上的杂质除去后,用洗脱液通过亲和柱,将 IgG 与其他杂质分离开。经验证, Protein G 亲和柱净化效果显著(见图 6、图 7)。因此本方法加入了 Protein G 亲和柱净化步骤。

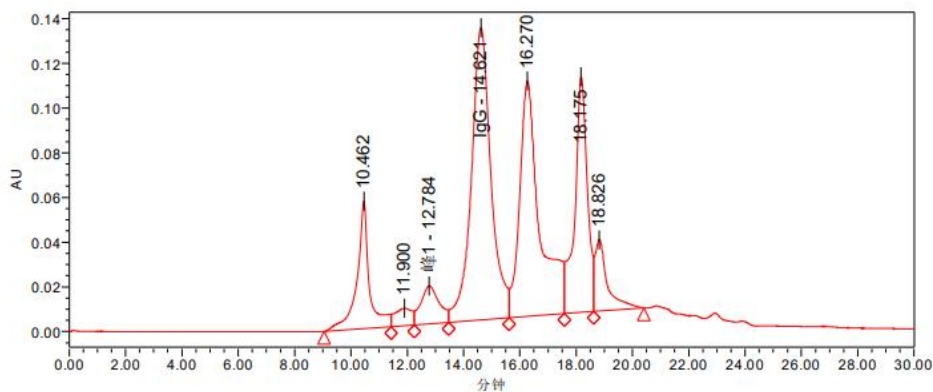


图 6 未净化样品色谱图

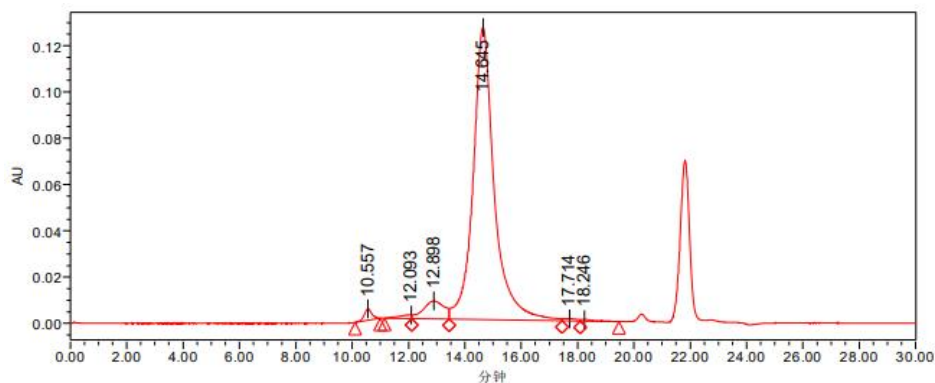


图 7 净化后样品色谱图



注：不同品牌的 Protein G 亲和柱的淋洗要求和洗脱液成分、pH 值可能有一定的差异。通过实验证实，按照 Protein G 亲和固相萃取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。

#### Protein G 亲和柱回收率验证：

由于 Protein G 亲和柱对免疫球蛋白 IgG 的承载量对于方法的准确度有很大的影响，故在本方法中进行了 1 mL 规格的 Protein G 亲和柱回收率验证试验。

选用市售的 SelectCore Protein G 1 mL 亲和柱（柱容量为 5 mg/支）进行试验。取同一批次 3 根 Protein G 亲和柱，分别使用 5 mg 免疫球蛋白 IgG 标品过柱，经 4.0 mL 洗脱液洗脱后，用洗脱液定容至 5 mL 后上机测定，结果见表 3。结果表明，上柱 5 mg 免疫球蛋白 IgG 时，回收率 96.21%~99.36%（回收率 > 90%），因此该规格的 Protein G 亲和柱的承载量可满足实际样品检测的需要。

表 3 Protein G 亲和柱承载量

标准品 IgG 单体峰面积（洗脱前）		17203798	
序号	洗脱后峰面积	回收率（%）	平均回收率（%）
1	16551726	96.21	
2	17094091	99.36	97.9
3	16888555	98.17	

#### 样品提取条件优化

##### （1）磷酸盐缓冲液 pH 选择：

本次修订沿用了原标准的提取溶剂（0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液），由于免疫球蛋白 IgG 是通过与 Protein G 亲和柱相互作用进行纯化，pH 可能对其造成影响，因此本试验对提取溶剂的 pH 进行了优化选择。本试验选择 6.3、6.5、6.7、6.9 共计 4 个 pH，对样品中 IgG 进行检测。结果如表 4 所示，缓冲液 pH 在 6.5 时，免疫球蛋白 IgG 峰面积最大。因此，选择 pH 6.5 为溶液的最佳 pH 并进行后续试验。

表 4 提取液（0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液）pH 值考察

pH 值	6.3	6.5	6.7	6.9
IgG 单体峰面积	5914617	6187232	6107945	6118708

##### （2）提取时间优化选择

采用超声提取 5min、10min、15min、20min 对样品进行提取，结果见表 5。结果显示，超声提取 10min 时，即可达到最高的提取效率。

表 5 超声提取时间考察

提取时间 (min)	5	10	15	20
IgG 单体峰面积	6063343	6187232	6171321	6146455

### 三、试验验证分析、总述报告

第一法：以免疫球蛋白 IgG 为定量外标，在 0.1 mg/mL~1mg/mL 浓度范围内，相关系数大于 0.999，方法线性关系良好。该方法的空白样品加标回收率为硬胶囊剂 99.2 %~103.3 %、片剂 98.7%~104.2%、粉剂 97.5 %~104.2 %，6 次平行实验结果的 RSD 在 0.51 %~1.85 %范围区间，说明该方法精确度和正确度较好，能够满足相关保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定。在方法验证基础上，起草工作组组织 4 家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。具体方法验证情况见附件一。

第二法：以免疫球蛋白 IgG 单体为定量外标，在 20.00 µg/mL~1000 µg/mL 浓度范围内，相关系数大于 0.999，方法线性关系良好。该方法的空白样品加标回收率为片剂 93.8 %~97.6 %、粉剂 92.7%~99.7 %、软胶囊 90.6 %~97.8 %、液体奶 93.6 %~95.9 %、凝胶糖果 91.0 %~97.3 %，6 次平行实验结果的 RSD 在 0.49 %~2.91 %范围区间，说明该方法精确度和正确度较好，能够满足保健食品中免疫球蛋白 IgG 单体的测定。在方法验证基础上，起草工作组组织 4 家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。具体方法验证情况见附件一。

### 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

无。

### 五、以国际标准为基础的起草情况

本标准没有采用国际标准。

### 六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准与现行法律法规和强制性国家标准协调一致。

### 七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中无重大分歧意见。

## **八、涉及专利的有关说明**

本标准不涉及专利。

## **九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和 实施日期的建议**

建议本标准发布 6 个月后实施，由归口单位组织行业相关单位 积极开展宣贯工作。

## **十、其他应当说明的事项**

本标准发布实施后，GB/T 5009.194-2003 废止。

## **附件一：方法学验证内容**

附件一：

# 保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定 方法学验证

## （一）第一法

### 1. 特异性

按检测方法称取空白样品并依法操作，按检测方法的仪器条件测定空白溶剂、空白样品、空白加标样品及标准品，典型色谱图见图 8~图 16。出峰附近无其他目标峰，空白溶剂为非零检测值，空白样品与空白溶剂比较接近，对检测结果无影响。

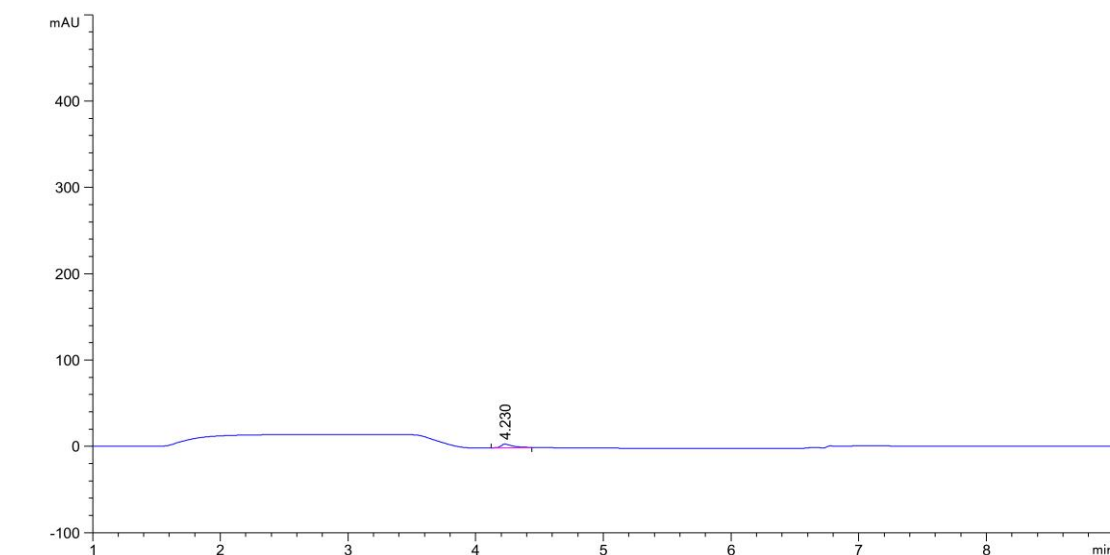


图 8 溶剂空白谱图

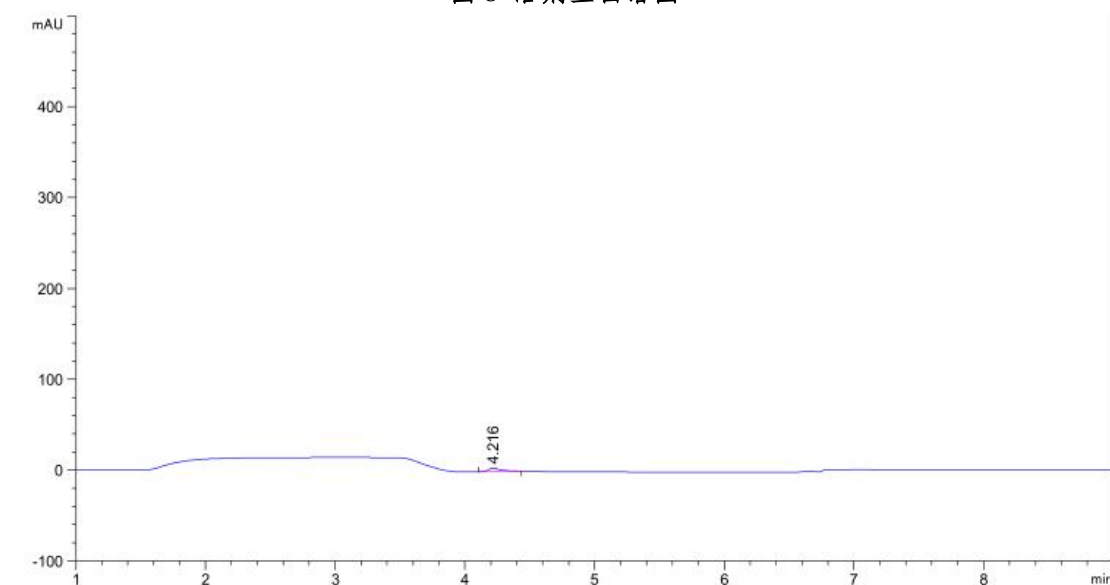


图 9 硬胶囊剂空白谱图

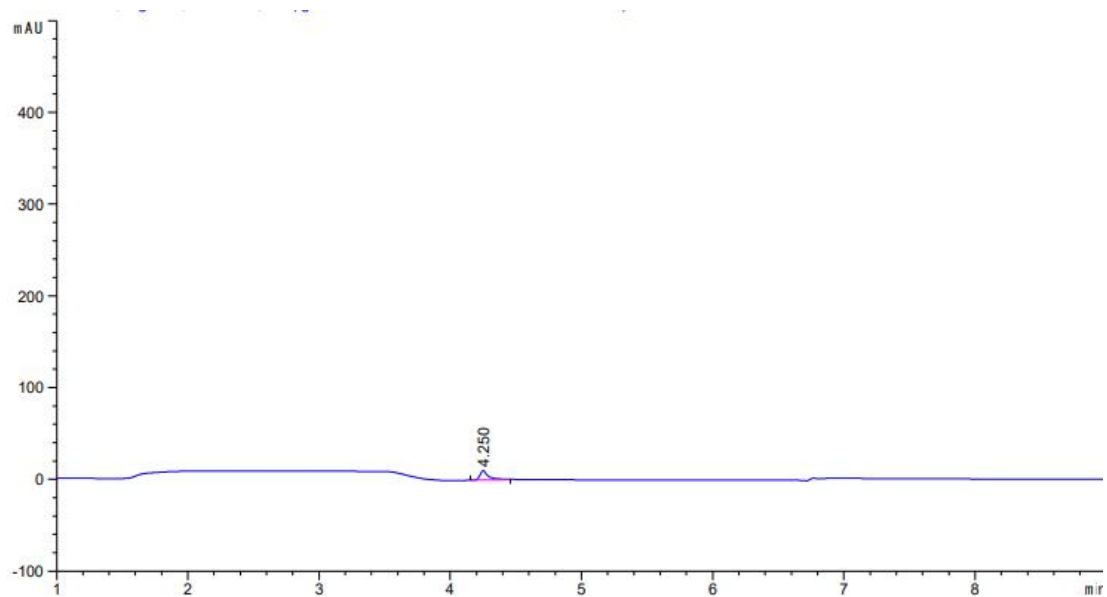


图 10 片剂空白谱图

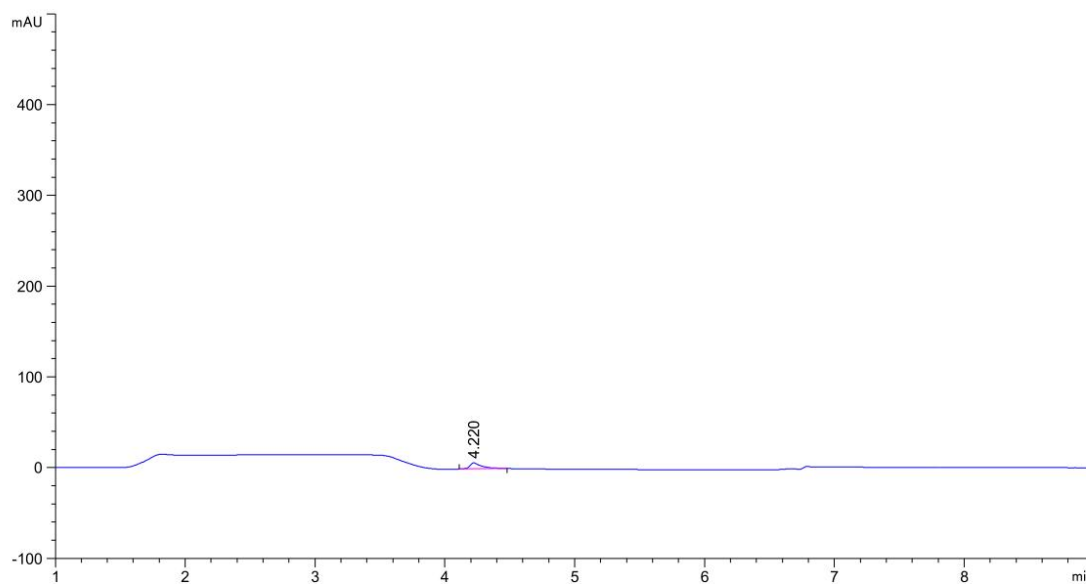


图 11 粉剂空白谱图

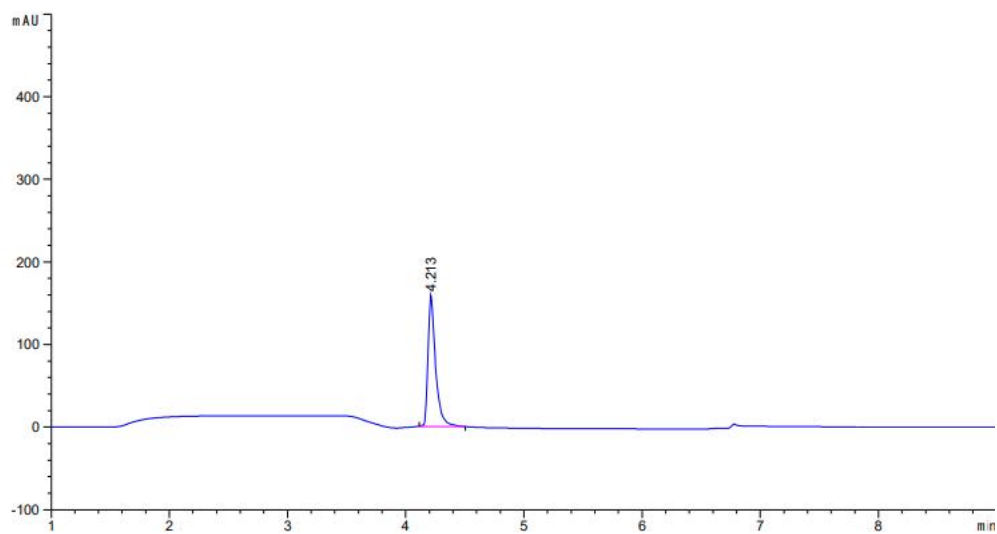


图 12 硬胶囊剂加标谱图

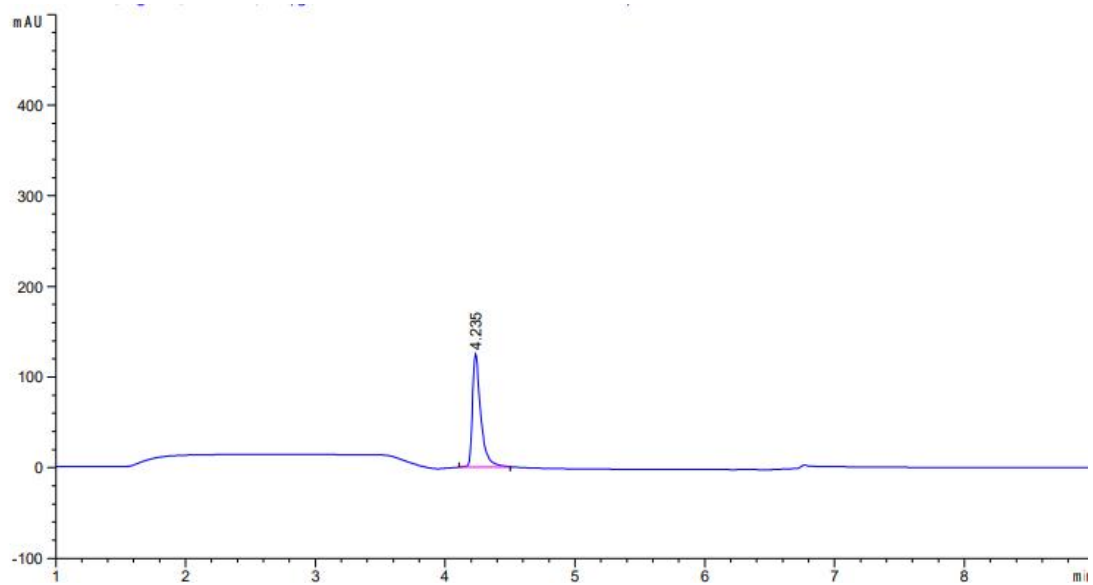


图 13 片剂加标谱图

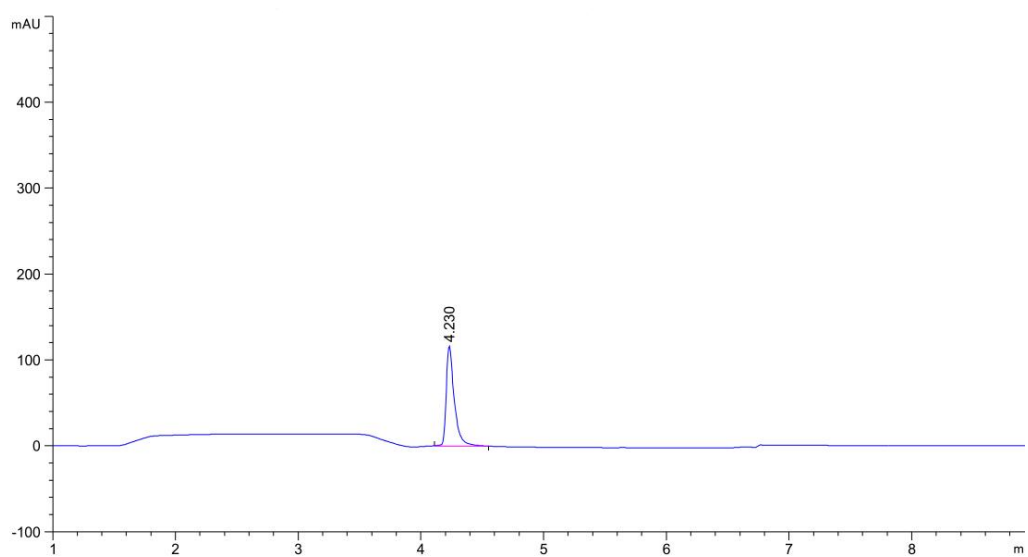


图 14 粉剂加标谱图

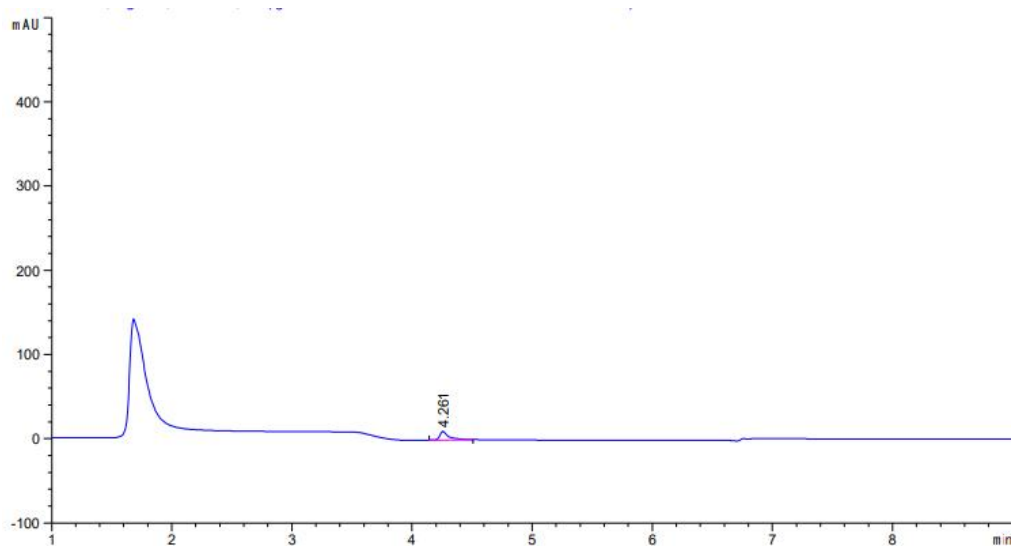


图 15 乳铁蛋白谱图

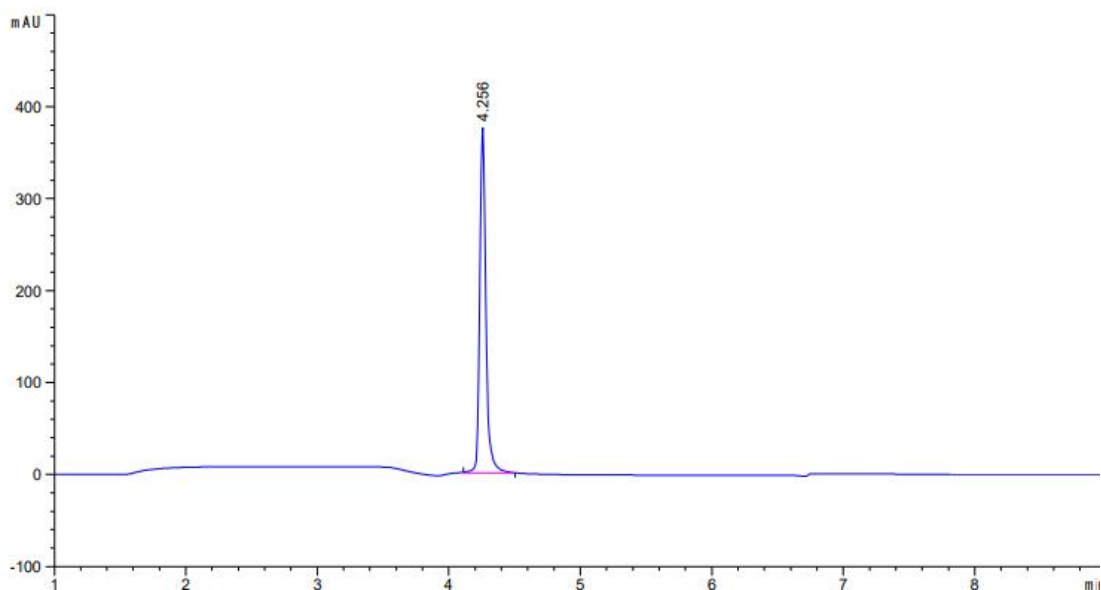


图 16 标准溶液谱图

## 2. 检出限

采用空白标准偏差法进行估算，分析 10 个空白基质，计算空白响应的标准偏差，样品空白响应的平均值加上 3 倍标准偏差对应的浓度进行估算。

结果显示，硬胶囊剂、片剂和粉剂空白基质平均值分别为 0.0185mg/mL、0.0247mg/mL 和 0.0264mg/mL，标准偏差分别为 0.00201mg/mL、0.00125mg/mL 和 0.00171mg/mL，检出浓度估算为：0.0245mg/mL、0.0285mg/mL、0.0315 mg/mL，即：

硬胶囊剂称样量为 0.1g，定容到 50mL，检出限估算浓度为 0.0245mg/mL，检出限为 1.3 g/100g；

当片剂称样量为 1.0g，定容到 50mL，检出限估算浓度为 0.0285 mg/mL，检出限为 0.14 g/100g；

当粉剂称样量为 0.25g，定容到 50mL，检出限估算浓度为 0.0315 mg/mL，检出限为 0.65 g/100g；

## 3. 定量限

采用空白标准偏差法进行估算，分析 10 个空白基质，计算空白响应的标准偏差，样品空白响应的平均值加上 10 倍标准偏差对应的浓度进行估算。

结果显示，定量浓度估算为：0.0386mg/mL、0.0372mg/mL、0.0435 mg/mL；考虑到方法线性范围为 0.1 mg/mL~1.0mg/mL，定量限测定浓度均设定 0.1 mg/mL。

测定：选取空白样品基质至少 6 个平行样，分别添加估算定量限浓度的目标分析物进行独立检测，如目标分析物在该浓度的测定结果的正确度和精密度满

足 GB 5009.295-2023 的要求，则可将该浓度作为方法的定量限。

结果显示，硬胶囊剂、片剂、粉剂定量限浓度设为 0.1 mg/mL，均符合 GB 5009.295-2023 的要求，可将该浓度作为方法的定量限，即：

样品称样量为 1.0g 时，定量限为 0.5g/100g；称样量为 0.25g 时，定量限为 2.0g/100g；称样量为 0.1g 时，定量限为 5.0g/100g。

#### 4. 测定范围

标准曲线：IgG 在 0.1~1.0mg/mL 的浓度范围，线性良好（ $R>0.999$ ）。

表 6 方法的标准曲线

组 1	1	2	3	4	5	6
浓度 (mg/mL)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
峰面积	278.245	589.843	1230.888	1873.277	2517.245	3156.692
线性方程及 R	$Y=3198.19924X-43.03791$ ; $R=0.999996$					
组 2	1	2	3	4	5	6
浓度 (mg/mL)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
峰面积	254.432	555.244	1150.857	1766.557	2427.671	3076.189
线性方程及 R	$Y=3132.77379X-80.10829$ ; $R=0.999777$					
组 3	1	2	3	4	5	6
浓度 (mg/mL)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
峰面积	265.261	578.143	1182.797	1810.638	2461.885	3074.307
线性方程及 R	$Y=3127.78905X-53.85235$ ; $R=0.999948$					

#### 5. 正确度和重复性

选择硬胶囊剂、片剂、粉剂空白样品，在这些空白样品中添加最低浓度、中间浓度（关注浓度）和最高浓度的 IgG 标准溶液三水平试验，按照标准草案中的方法操作。每个水平平行制备 6 份，计算每个浓度的平均回收率。结果详见表 7、表 8。

表 7 正确度和重复性精密度结果

样品基质 (剂型)	称样量 (g)	添加水平 (g/100g)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
硬胶囊剂	0.1	5.0	102.8	0.51
		10.0	100.6	0.84
		25.0	100.1	0.52



片剂	0.25	2.0	102.8	1.14
		4.0	101.4	0.55
		10.0	100.0	0.82
粉剂	0.25	2.0	103.3	1.85
		4.0	100.8	0.97
		10.0	100.0	1.50

表 8 标准溶液加标回收结果

样品基质 (剂型)	称样量 (g)	添加水平 (g/100g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
硬胶囊剂	0.1	5.0	98.0	99.0
		5.0	100.0	
片剂	0.25	2.0	97.0	97.0
		2.0	97.0	
粉剂	0.25	2.0	101.0	101.0
		2.0	101.0	

#### 6. 标准溶液的稳定性

IgG 标准储备溶液 (1.00 mg/mL) 放置 2 °C~8 °C 冰箱中贮存 1 个月后, 与新配制同浓度 IgG 标准储备液峰面积无差异。

#### 7. 再现性 (实验室间方法验证)

本方法经 4 家单位根据标准草案进行实验室间方法验证 (包括检出限、定量限、测定范围、正确性和再现性), 结果符合要求, 实际样品再现性验证结果见表 9。实验室间比对数据经格拉布斯法 (Grubbs) 检验法验证排除离群值。

表 9 实际样品实验室间比对结果

编号	免疫球蛋白 IgG 含量 (g/100g)				RSD (%)
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	
IgG-2S	26.0	24.9	25.4	24.6	2.43
IgG-3S	8.86	8.46	8.80	8.87	2.22
IgG-4S	9.45	9.76	9.83	9.70	1.71

## (二) 第二法

### 1. 特异性

按检测方法称取空白样品并依法操作, 按检测方法的仪器条件测定空白溶

剂、空白样品、空白加标样品及标准品，典型色谱图见 图 17~图 25。结果显示在 IgG 单体保留时间为 16.9 min 处无色谱峰对检测造成干扰。

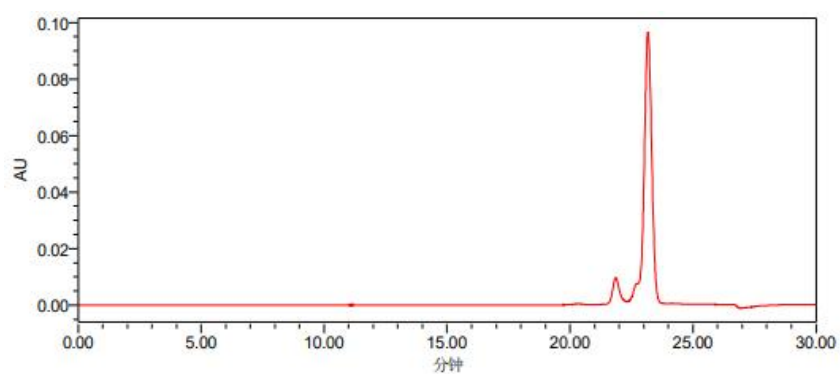


图 17 溶剂空白谱图

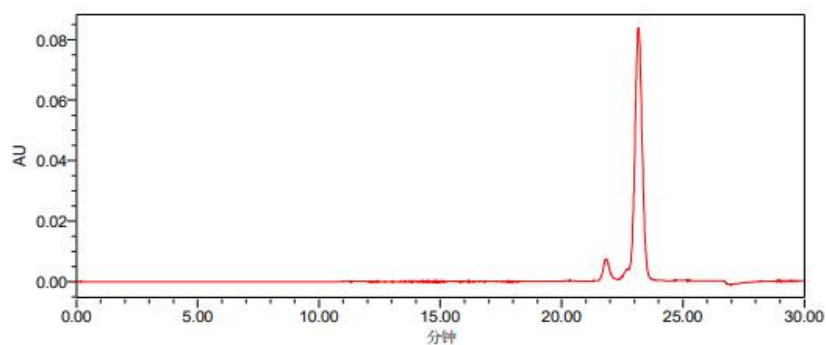


图 18 片剂空白样谱图

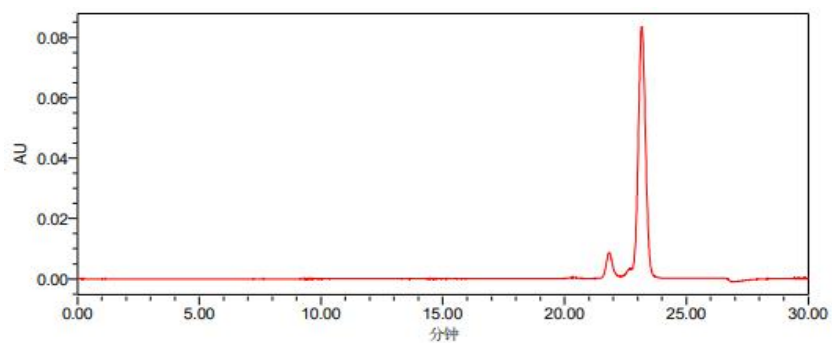


图 19 粉剂空白样谱图

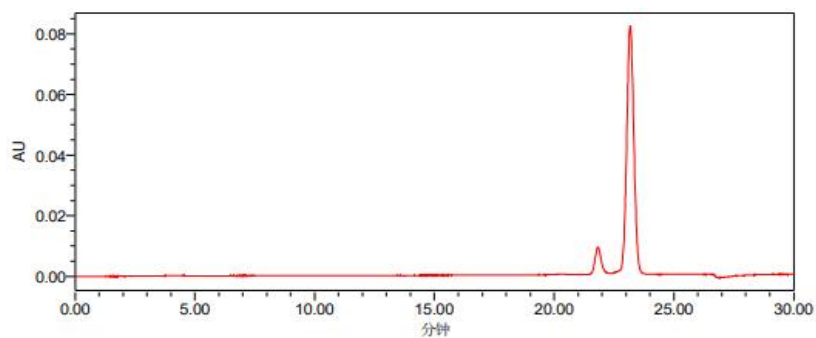


图 20 软胶囊空白样谱图

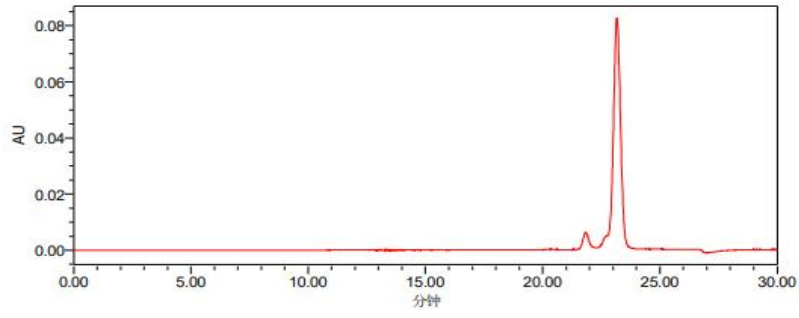


图 21 凝胶糖果空白样谱图

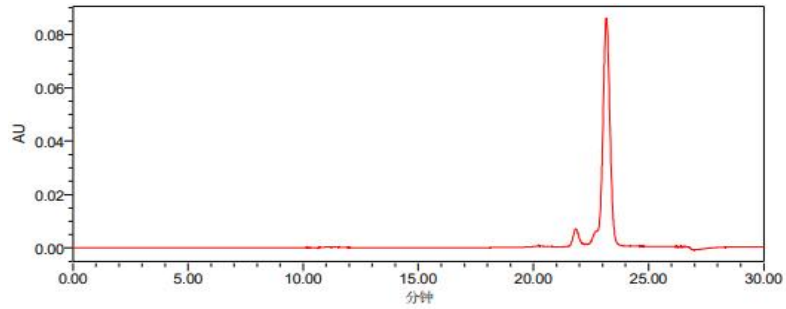


图 22 液体奶空白样谱图

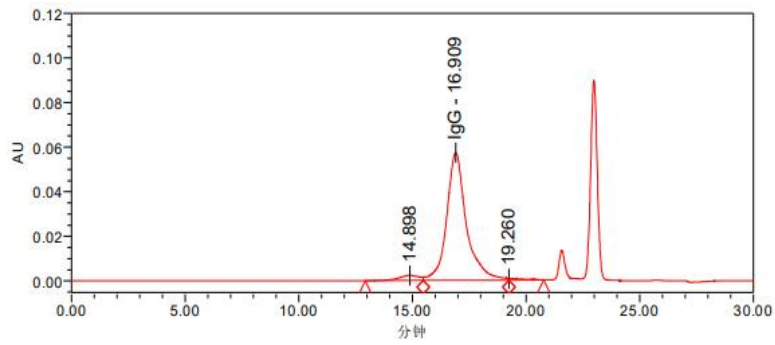


图 23 免疫球蛋白 IgG 标准谱图 (c=200 $\mu$ g/mL)

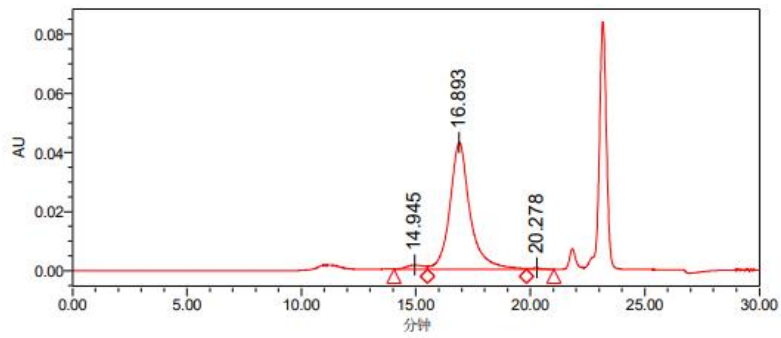


图 24 片剂空白样品加标谱图

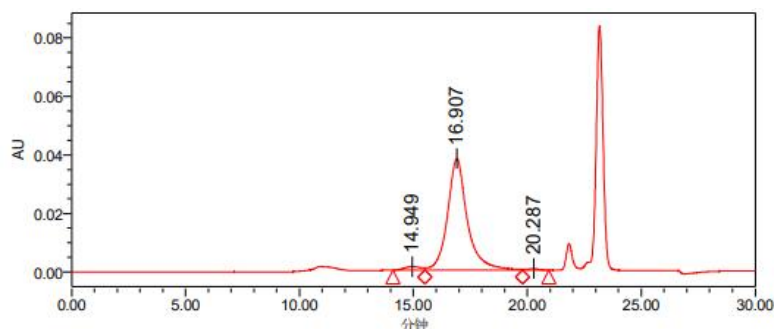


图 25 软胶囊空白样品加标色谱图

## 2. 检出限

向空白样品基质添加目标分析物,信噪比 $\geq 3$ 时的添加浓度作为估算检出限。

测定:选取空白样品基质至少 20 个平行样,分别添加估算检出限浓度的目标分析物,如目标分析物的检出概率不低于 95%,则定为检出限浓度。

结果显示,片剂、粉剂、液体样品(牛奶)和凝胶糖果的检出限浓度为 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,软胶囊的检出限浓度为 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当固体样品称样量为 0.5 g 时,检出限为 0.12 g/100g。当液体样品取样量为 5 g(或 5.00 mL)时,检出限为 0.012 g/100g(或 0.012 g/100mL)。当油状样品(软胶囊)称样量为 0.5 g 时,检出限为 0.12 g/100g。

## 3. 定量限

向空白样品基质添加目标分析物,信噪比 $\geq 10$ 时的添加浓度作为估算定量限。

测定:选取空白样品基质至少 6 个平行样,分别添加估算定量限浓度的目标分析物进行独立检测,如目标分析物在该浓度的测定结果的正确度和精密度满足 GB 5009.295-2023 的要求,则可将该浓度作为方法的定量限。

结果显示,片剂、粉剂、液体样品(牛奶)和凝胶糖果的定量限浓度为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,软胶囊的定量限浓度为 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。当固体样品称样量为 0.5g 时,定量限为 0.4 g/100g。当液体样品取样量为 5 g(或 5.00 mL)时,定量限为 0.04 g/100g(或 0.04 g/100mL)。当油状样品(软胶囊)称样量为 0.5 g 时,定量限为 0.4 g/100g。

## 4. 测定范围

标准曲线: IgG 单体在 20.00~1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围,线性良好( $R > 0.999$ )。

表 10 方法的标准曲线

序号	1	2	3	4	5	6	7	
浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	20.00	50.00	100.0	200.0	400.0	600.0	800.0	1000
IgG 单体峰面积	20.78	51.95	103.9	207.8	415.6	623.4	831.2	1039

线性方程及 R	$Y = 1.710125 \times 10^4 X - 7.835201 \times 10^4$ , $R = 0.999986$
---------	--

### 5. 正确度和重复性

选择片剂、粉剂、软胶囊、液体样品（牛奶）和凝胶糖果空白样品，在这些空白样品中添加最低浓度、中间浓度（关注浓度）和最高浓度的 IgG 标准溶液三水平试验，按照标准草案中的方法操作。每个水平平行制备 6 份，计算每个浓度的平均回收率。结果详见表 11。

表 11 正确度和重复性精密度结果

样品基质 (剂型)	添加水平 (g/100g)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
片剂	0.5	95.0	2.31
	2.0	93.8	2.11
	5.0	97.6	1.95
粉剂	0.5	99.7	0.49
	10	92.7	1.25
	20	96.3	1.46
软胶囊	1.0	90.8	2.91
	2.0	90.6	2.21
	5.0	97.8	2.49
凝胶糖果	0.1	92.7	2.74
	0.2	91.0	1.87
	1.0	97.3	2.74
液体（牛奶）	0.01	95.9	2.24
	0.02	95.1	1.64
	0.1	93.6	1.04

### 6. 标准溶液的稳定性

IgG 标准储备溶液（1.00 mg/mL）放置 2 °C~8 °C 冰箱中贮存 1 个月后，与新配制同浓度 IgG 标准储备液单体峰面积无差异。

### 7. 再现性（实验室间方法验证）

本方法经过 4 家单位根据标准草案进行实验室间方法验证（包括检出限、定量限、测定范围、正确性和再现性），结果符合要求，实际样品再现性验证结果见表 12。实验室间比对数据经格拉布斯法（Grubbs）检验法验证无离群值

表 12 实际样品实验室间比对结果

编号	免疫球蛋白 IgG 单体含量 (g/100g)				RSD (%)
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	

<b>IgG-2S</b>	<b>19.5</b>	<b>17.9</b>	<b>18.6</b>	<b>18.6</b>	<b>3.46</b>
<b>IgG-3S</b>	<b>6.96</b>	<b>6.53</b>	<b>6.83</b>	<b>6.84</b>	<b>2.67</b>
<b>IgG-4S</b>	<b>5.02</b>	<b>4.75</b>	<b>4.98</b>	<b>4.98</b>	<b>2.52</b>