

TB

团 体 标 准

T/QDIFST 001—2024

牛乳及牛乳制品中 A1 和 A2 型 β -酪蛋白
的测定 毛细管电泳法

Determination of A1 and A2 β -casein in bovine milk and dairy
products—Capillary electrophoresis method

2018.5.5

2024-11-18 发布

2024-12-18 实施

青岛市食品科学技术学会

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。

本文件的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由青岛市食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：青岛农业大学、山东得益乳业股份有限公司、青岛市畜牧兽医研究所（青岛市畜牧工作站）、青岛农业大学海都学院、青岛新希望琴牌乳业有限公司、山东安牧乳业有限公司、青岛荷斯坦奶牛养殖有限公司。

本文件主要起草人：杨永新、栾庆刚、王建华、于忠娜、刘佳、陈明君、王义坚、范荣波、韩荣伟、姜洪宁、都启晶、邓春霞。



牛乳及牛乳制品中 A1 和 A2 型 β -酪蛋白的测定 毛细管电泳法

1 范围

本文件规定了毛细管电泳技术测定牛乳及牛乳制品中A1和A2型 β -酪蛋白方法。

本文件适用于生牛乳、液态乳和乳粉中A1和A2 β -酪蛋白含量的检测。

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

3.1

A1型 β -酪蛋白 A1 β -casein

氨基酸序列第67位氨基酸为组氨酸的 β -酪蛋白。

3.2

A2型 β -酪蛋白 A2 β -casein

氨基酸序列第67位氨基酸为脯氨酸的 β -酪蛋白。

4 原理

乳中酪蛋白胶粒在尿素溶液中解离为蛋白质单体，在高压电场作用下，不同乳蛋白在羟丙基甲基纤维素酸性缓冲液中的迁移速率呈现差异。基于A1型和A2型 β -酪蛋白在分离过程中的保留时间差异，通过紫外（或二极管阵列）检测器在波长214 nm处进行检测。

5 试剂或材料

除非另有规定，所用试剂仅为分析纯，

5.1 水：GB/T 6682，二级。

- 5.2 1 mol/L氢氧化钠溶液：称取 4.00 g 氢氧化钠，加水溶解，转移至 100 mL容量瓶，定容。
- 5.3 1 mol/L盐酸溶液：量取8.60 mL浓盐酸，加水稀释，转移至100 mL容量瓶，定容。
- 5.4 4 mol/L磷酸溶液：量取24.60 mL浓磷酸，加水稀释，转移至100 mL容量瓶，定容。
- 5.5 8 mol/L尿素溶液：称取96.10 g尿素，加水溶解，转移至200 mL容量瓶，定容。
- 5.6 磷酸盐溶液：磷酸盐溶液（pH 2.50 ± 0.02）：称取磷酸二氢钠34.50 mg、羟丙基甲基纤维素12.50 mg、量取尿素溶液（5.5）18.80 mL，转移至25 mL容量瓶，用磷酸溶液（5.4）调节pH至2.50，定容。
- 5.7 样品还原缓冲液（pH 8.00 ± 0.02）：称取柠檬酸三钠365.00 mg、二硫苏糖醇190.00 mg、量取尿素溶液（5.5）187.50 mL，溶解于水中，用氢氧化钠溶液（5.2）调节pH至8.00，定容至250 mL，混匀。
- 5.8 A1型和A2型β-酪蛋白标准储备溶液（10 mg/mL）：将A1型和A2型β-酪蛋白标准品按其纯度换算后称量，分别用样品还原缓冲液（5.7）定容至10 mL。于-20℃保存，有效期1个月。
- 5.9 A1型和A2型β-酪蛋白标准中间溶液（200 mg/L）：分别准确移取A1型和A2型β-酪蛋白标准储备溶液200 μL，用样品还原缓冲液（5.7）定容至10 mL。现用现配。
- 5.10 A1型和A2型β-酪蛋白标准系列溶液：准确移取一定量的标准中间溶液（5.9），用样品还原缓冲液（5.7）稀释定容，分别配制成A1型和A2型β-酪蛋白浓度分别为0.0 mg/L、40.0 mg/L、80.0 mg/L、120.0 mg/L、160.0 mg/L和200.0 mg/L的标准工作溶液，现用现配。
- 5.11 微孔滤膜：水系，0.22 μm。

6 仪器设备

- 6.1 毛细管电泳系统：配紫外或二极管阵列检测器。
- 6.2 低温离心机：4℃，转速不低于10000 r/min。
- 6.3 天平：精度0.01 g、0.1 mg。
- 6.4 pH计：精度为0.01。
- 6.5 涡旋混合仪。
- 6.6 超声波震荡器。

7 样品

- 7.1 生牛乳、液态乳：取混合均匀的样品约200 g，装入洁净容器，密封并做好标识，于0℃ ~ 4℃保存。
- 7.2 乳粉：取有代表性样品约200 g，混匀，装入洁净容器，密封并做好标识，常温下干燥保存。

8 试验步骤

8.1 提取

- 8.1.1 生牛乳、液态乳：平行做两份试验，取试样2.00 g到离心管中，5000 g 4℃离心20 min，移除上层脂肪，取中间层脱脂乳与样品还原缓冲液（5.7）按1:4混合，涡旋后500 W超声处理3 min，室温孵育1 h，取上清液，过微孔滤膜。
- 8.1.2 乳粉：平行做两份试验，试样与水以1：8比例复溶，5000 g 4℃离心20 min，移除上层脂肪，取中间层脱脂乳与样品还原缓冲液（5.7）按1:4混合，涡旋后500 W超声处理3 min，室温孵育1 h，取上清液，过微孔滤膜。

8.2 电泳分析

毛细管电泳参考条件如下：

- a) 毛细管柱：未涂层熔融石英管柱，柱长60 cm，有效长度50 cm，柱内径50 μm；
- b) 样品室温度：8℃；
- c) 毛细管柱温度：35℃；
- d) 检测波长：214 nm；
- e) 毛细管电泳分离程序，见表1。

表1 毛细管电泳分离程序

项目	内容	参数
进样条件	进样电压/psi	自动进样
	进样时间/s	7
分析条件	分离电压/kV	25
	检测时间/min	50

8.3 定性

根据A1型和A2型β-酪蛋白保留时间与待测样品中组份的保留时间进行定性，A1型和A2型β-酪蛋白电泳图见附录A。

8.4 定量

取标准系列溶液（5.10）和试样溶液（8.1）上机测定。分别以A1型和A2型β-酪蛋白的峰面积为纵坐标，以标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，得到标准曲线回归方程。根据标准曲线得到试样溶液中A1型和A2型β-酪蛋白的浓度。

9 试验数据处理

试样中A1、A2型β-酪蛋白含量为 X_i ，以毫克每千克（mg/kg）表示，按式（1）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times V_i \times n}{m_i} \times 1000 \quad \dots\dots (1)$$

式中：

C_i ——标准曲线查得试样溶液中 A1 型或 A2 型 β-酪蛋白的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V_i ——试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m_i ——试样的质量，单位为克（g）；

n ——样液稀释倍数；

1 000——换算系数；

测定结果以平行试验测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的10%。

11 检出限和定量限

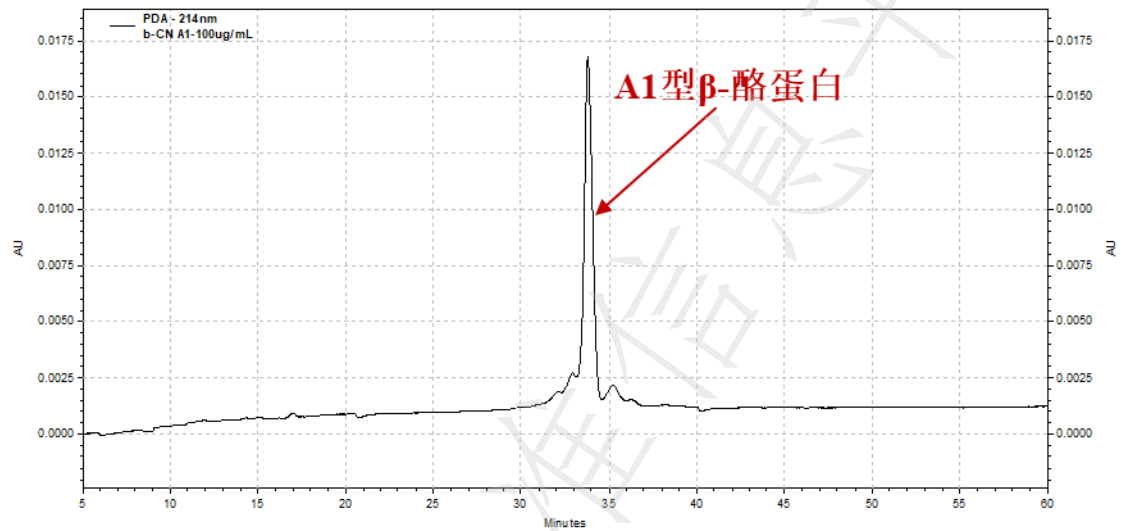
本方法对生牛乳和液态乳中A1型β-酪蛋白检出限为4.7 mg/kg、定量限为15.7 mg/kg，乳粉中A1型β-酪蛋白检出限为6.8 mg/kg、定量限为22.8 mg/kg。

本方法对生牛乳和液态乳中A2型β-酪蛋白检出限为4.2 mg/kg、定量限为13.8 mg/kg，乳粉中A2型β-酪蛋白检出限为4.9 mg/kg、定量限为16.5 mg/kg。

附录A
(资料性)

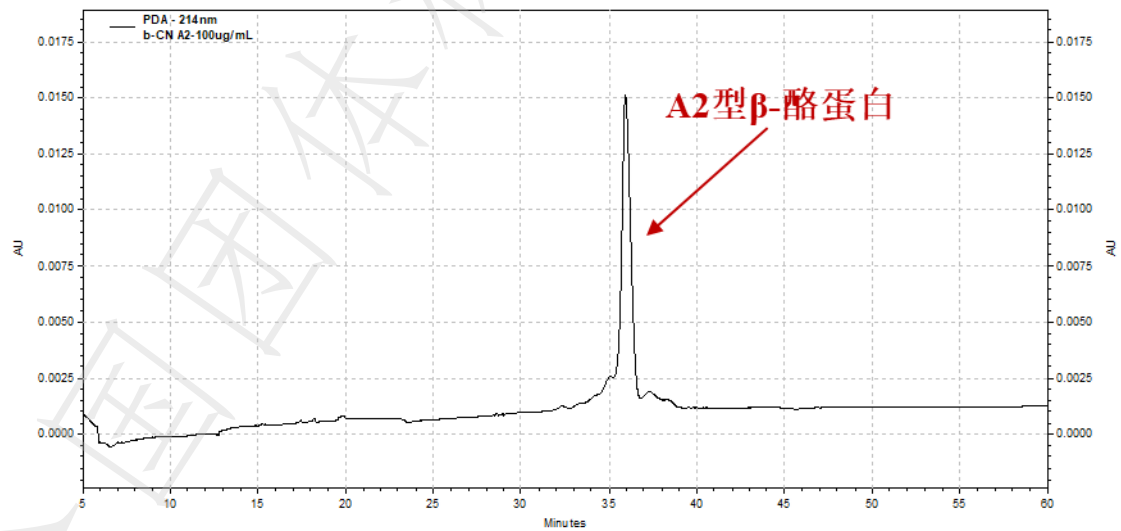
A1型和A2型 β -酪蛋白标准溶液毛细管电泳图

A1型 β -酪蛋白标准溶液毛细管电泳图见图A.1。



图A.1 A1型 β -酪蛋白标准溶液毛细管电泳图

A2型 β -酪蛋白标准溶液毛细管电泳图见图A.2。



图A.2 A2型 β -酪蛋白标准溶液毛细管电泳图