

# T/SHNX

## 上海奶业行业协会团体标准

T/SHNX 001—2025

### 生牛乳中乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白 的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of lactoferrin,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in raw milk by  
LC-MS/MS

2025 - 04 - 03 发布

2025 - 05 - 03 实施

上海奶业行业协会 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海奶业行业协会提出并归口。

本文件起草单位：上海市农产品质量安全中心、上海市动物疫病预防控制中心、光明牧业有限公司、光明乳业股份有限公司、上海市质量监督检验技术研究院、上海奶业行业协会、上海必诺检测技术服务有限公司、上海农林职业技术学院。

本文件主要起草人：祁兵、陈柔含、马颖清、沈秀平、邓波、周雨璠、郑小平、徐致远、朱伟、王敏、卢洪秀、吴剑平、陈小弟、金佳伟。

# 生牛乳中乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白含量的测定 液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本文件规定了生牛乳中乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的液相色谱-串联质谱测定方法。本文件适用于生牛乳中乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的测定。

## 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。

## 4 原理

试样中的乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白经酶解作用水解成特征性肽段，以液相色谱-串联质谱法测定目标蛋白的特征性肽段，基质匹配标准曲线外标法定量，计算试样中乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的含量。

## 5 试剂或材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯。

### 5.1 试剂

- 5.1.1 水：GB/T 6682，一级水。
- 5.1.2 碳酸氢铵。
- 5.1.3 二硫苏糖醇。
- 5.1.4 碘代乙酰胺。
- 5.1.5 乙酸。
- 5.1.6 胰蛋白酶：序列分析纯，活力单位 $\geq 4\ 500$  U/mg，或性能相当者。
- 5.1.7 甲酸：色谱纯。
- 5.1.8 乙腈：色谱纯。
- 5.1.9 鸡蛋蛋清粉：食品级。

### 5.2 试剂配制

- 5.2.1 碳酸氢铵溶液（100 mmol/L）：称取 0.79 g 碳酸氢铵，用水溶解后稀释至 100 mL。
- 5.2.2 二硫苏糖醇溶液（500 mmol/L）：称取 0.771 g 二硫苏糖醇，用碳酸氢铵溶液（100 mmol/L）溶解后定容至 10 mL。
- 5.2.3 碘代乙酰胺溶液（500 mmol/L）：称取 0.925 g 碘代乙酰胺，用碳酸氢铵溶液（100 mmol/L）溶解后定容至 10 mL。
- 5.2.4 乙酸溶液（1%）：吸取 0.1 mL 乙酸，用水稀释并定容至 10 mL。

5.2.5 胰蛋白酶溶液（100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：称取 1 mg 胰蛋白酶，用乙酸溶液（1%）溶解后稀释至 10 mL，现用现配。

5.2.6 甲酸溶液（0.1%）：吸取 1.0 mL 甲酸，用水稀释并定容至 1 000 mL。

5.2.7 甲酸乙腈溶液（0.1%）：吸取 1.0 mL 甲酸，加入乙腈稀释并定容至 1 000 mL。

5.2.8 空白基质溶液：称取 0.10 g 鸡蛋蛋清粉，用水定容至 50 mL 备用。

### 5.3 标准品

5.3.1 乳铁蛋白标准品（CAS 号：146897-68-9）：纯度 $\geq 95\%$ ，铁含量 $\leq 35 \text{ mg}/100\text{g}$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.3.2  $\alpha$ -乳白蛋白标准品（CAS 号：9051-29-0）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.3.3  $\beta$ -乳球蛋白标准品（CAS 号：9045-23-2）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

### 5.4 标准溶液配制

5.4.1 乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白标准储备液（1  $\text{mg}/\text{mL}$ ）：分别称取 10.0 mg 乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白标准品，用水定容至 10 mL。混匀，0~4  $^{\circ}\text{C}$ 下保存，可保存 3 个月。

5.4.2 混合标准中间液（200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：分别准确移取 2.0 mL 的乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白标准储备液于 10 mL 容量瓶中，用空白基质溶液稀释至 10 mL，现用现配。

5.4.3 标准系列工作液：吸取适量的混合标准中间液，用空白基质溶液逐级稀释至 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 200.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准系列工作液，现用现配。

### 5.5 材料

5.5.1 1.5 mL 离心管：聚丙烯材质。

5.5.2 50 mL 离心管：聚丙烯材质。

5.5.3 水相微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ ，聚醚砜材质。

## 6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 天平：感量 0.01 g 和 0.01 mg。

6.3 冷冻离心机：转速 $\geq 10\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 。

6.4 涡旋混合仪。

6.5 超声波仪。

6.6 恒温振荡箱或恒温振荡水浴锅。

## 7 试样的制备与保存

### 7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的生牛乳试样，搅拌均匀。

### 7.2 试样的保存

-18  $^{\circ}\text{C}$  及以下保存。

## 8 分析步骤

### 8.1 前处理

称取 $2 \pm 0.02 \text{ g}$ 试样于 50 mL 离心管，用水混匀，转移至 50.0 mL 刻度试管，定容至刻度。移取 200  $\mu\text{L}$  样品溶液置于 1.5 mL 离心管中，依次加入 150  $\mu\text{L}$  碳酸氢铵溶液、15  $\mu\text{L}$  二硫苏糖醇溶液，混匀，于 60  $^{\circ}\text{C}$  恒温反应 1 h；冷却至室温，加入 30  $\mu\text{L}$  碘代乙酰胺溶液，暗处静置 0.5 h，加入 50  $\mu\text{L}$  胰蛋白酶溶液，混匀

后于37 °C恒温酶解过夜。冷却后加入10  $\mu\text{L}$ 甲酸终止反应，静置15 min。再加入545  $\mu\text{L}$ 水，混匀，10 000 r/min离心5 min，取上清液过0.22  $\mu\text{m}$ 水相微孔滤膜，供上机测定。

## 8.2 标准曲线的绘制

移取200  $\mu\text{L}$ 标准系列工作液置于1.5 mL离心管中，按照8.1步骤处理。将标准系列工作溶液分别注入液相色谱-串联质谱仪中，以标准系列工作溶液中乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的浓度为横坐标，对应各浓度点的定量离子峰面积为纵坐标，绘制基质匹配标准工作曲线，拟合回归方程，计算回归系数。

## 8.3 测定

### 8.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：C<sub>18</sub>柱（100 mm×2.1 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ，300 Å），或相当者；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：40 °C；
- 进样体积：10  $\mu\text{L}$ ；
- 流动相 A：0.1 %甲酸溶液；流动相 B：0.1 %甲酸乙腈溶液。梯度洗脱参数见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0	95	5
1.2	95	5
2.0	80	20
3.8	70	30
4.0	0	100
4.8	0	100
5.0	95	5
7.0	95	5

### 8.3.2 质谱参考条件

- 电离方式：正离子扫描；
- 喷雾电压：3.5 kV；
- 干燥气温度：200 °C；
- 多反应监测（MRM）模式；
- 监测离子对和碰撞能量见表2。

表2 目标化合物的多反应监测（MRM）条件

化合物名称	母离子（m/z）	子离子（m/z）	碰撞电压 (eV)
乳铁蛋白	660.8	554.3	26
		698.4	23
$\alpha$ -乳白蛋白	600.8	355.2	30
		654.4	30
$\beta$ -乳球蛋白	623.3	918.4	25
		460.3	32

#### 8.4 试样测定

在相同测试条件下，试样溶液中乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白与标准溶液中的保留时间偏差在 $\pm 0.1$  min 以内；且检测到的相对离子丰度，应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差为 $\pm 40$  %。乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白离子质量色谱图见附录 A 中图 A.1。

#### 8.5 空白试验

除不加试样外，均按8.1步骤进行测定。

### 9 结果计算

试样中各待测物含量以质量分数 $\omega$ 计，单位为毫克每100克（mg/100g），按公式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V \times f \times 100}{m \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

$\rho$  ——从标准曲线中得到的试样溶液中被测物的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$  ——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

$f$  ——试样稀释倍数；

100 ——换算为100 g样品中含量的换算系数；

$M$  ——试样的质量，单位为克（g）；

1 000 ——单位换算系数。

注：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3位有效数字。

#### 10 精密度

在重复性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

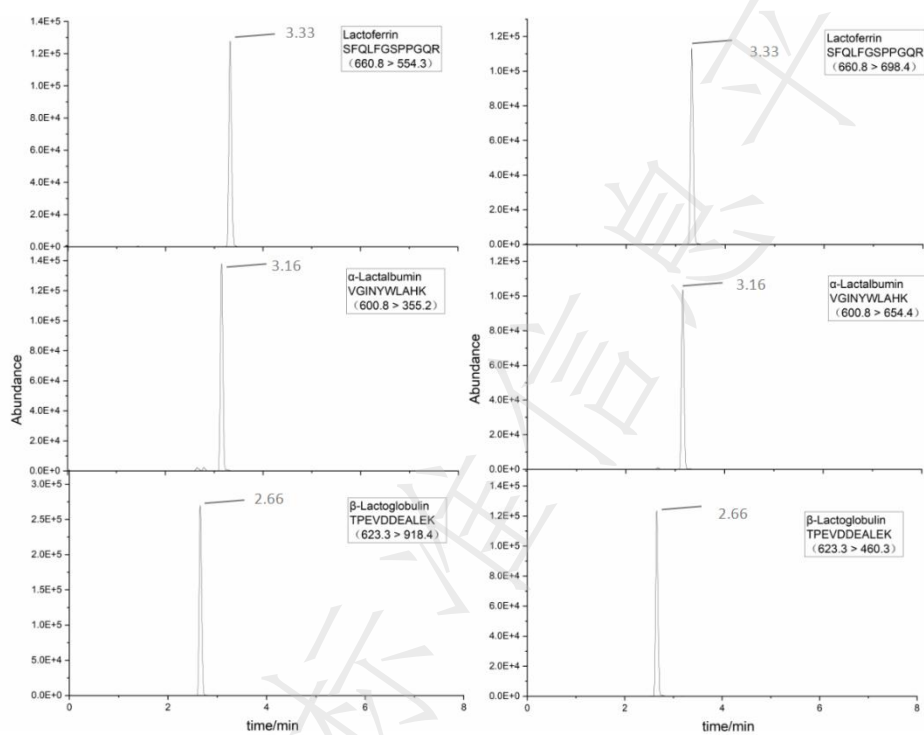
#### 11 灵敏度

当取样量2 g时，检出限为1 mg/100 g，定量限为3 mg/100 g。

## 附录 A

(资料性)

乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白离子质量色谱见附录A中的图A.1。



图A.1 乳铁蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白标准溶液离子质量色谱图 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )