

ICS : 67.100.10

中国标准文献分类号: X 16

T/SSFS

团 体 标 准

T/ SSFS 0001—XXXX

乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的测定

高效液相色谱法

(征求意见稿)

Determination of IgG in milk and dairy products- Liquid
chromatography method

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

上海市食品学会 发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1的编写规则起草。

本文件中附录A为资料性附录。

本文件由上海市食品学会提出并组织实施。

本文件由上海市食品学会归口。

本文件起草单位：光明乳业股份有限公司、华测检测认证集团北京有限公司、纳谱分析技术（苏州）有限公司、山东悟空仪器有限公司。

本文件主要起草人：董立雅、刘振民、张锋华、张勇、王惠玉、苏永红、茹晓、范维、崔芳、任艳、曹小红、朱旭东、侯玉、程子健、任璐、于鹏。

声明：本文件的知识产权归属于上海市食品学会，未经上海市食品学会同意，不得印刷、销售。任何组织、个人使用本标准开展认证、检测等活动应经上海市食品学会批准授权。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。

本文件承诺执行单位：光明乳业股份有限公司华东中心工厂、上海乳品四厂有限公司、南京光明乳品有限公司、浙江省杭江牛奶公司乳品厂、成都光明乳业有限公司、武汉光明乳品有限公司、广州光明乳品有限公司、北京光明健能乳业有限公司

乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于液态乳、乳制品及有乳蛋白来源的固体饮料。

2 原理

根据亲和色谱和凝胶过滤色谱的原理，在磷酸盐缓冲液条件下免疫球蛋白IgG与ProteinG配基结合，在pH3.0冰乙酸溶液条件下洗脱免疫球蛋白IgG，通过高效液相色谱进行分析，外标法定量。

3 试剂和材料

注：除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 氢氧化钠（NaOH）。

3.1.2 甘氨酸盐酸盐（ $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$ ）。

3.1.3 盐酸（HCl）。

3.1.4 氯化钠（NaCl）。

3.1.5 冰乙酸（ CH_3COOH ）。

3.1.6 磷酸二氢钠（ NaH_2PO_4 ）：优级纯。

3.1.7 磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ）：优级纯。

3.2 试剂配制

3.2.1 淋洗液（0.05mol/L pH6.5 磷酸盐缓冲溶液）：称取 4.11g 磷酸二氢钠，2.23g 磷酸氢二钠，加水 800 mL 溶解并定容至 1L，使用 1mol/L 氢氧化钠调整 pH 至 6.5，摇匀过膜备用。

3.2.2 洗脱液（pH3.0 冰乙酸溶液）：准确吸取 3mL 冰乙酸定容至 1L 水中，再使用 1mol/L 氢氧化钠调 pH 至 3.0，摇匀过膜备用。

3.2.3 流动相：称取 0.91g 磷酸二氢钠，1.76g 磷酸氢二钠，8.77g 氯化钠，加水 800mL 溶解，用 1mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0，定容至 1 L，摇匀过膜备用。

3.3 标准品

免疫球蛋白IgG，纯度 $\geq$ 95%。

3.4 标准溶液的配制

3.4.1 免疫球蛋白 IgG 标准储备液（1.0mg/mL）：准确称取 10.0mg 免疫球蛋白 IgG 标准物质于 10mL 容量瓶中，用洗脱液（3.2.2）溶解并定容，-20 保存，有效期 15 天。

3.4.2 免疫球蛋白 IgG 系列标准工作溶液：准确移取储备液（3.4.1）0.05mL、0.10mL、0.20mL、0.50mL、1.0mL 并用洗脱液（3.2.2）定容至 1mL，配制成免疫球蛋白 IgG 浓度分别为 50.0 μ g/mL、100.0 μ g/mL、200.0 μ g/mL、500.0 μ g/mL 和 1000.0 μ g/mL 的标准工作溶液，临用前配制。

4 仪器和设备

4.1 pH 计：测量精度 $\pm$ 0.03。

4.2 天平：感量 0.001 g、0.0001g 和 0.00001 g。

4.3 振荡器。

4.4 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.5 固相萃取柱：SelectCore Protein G 亲和柱, 1 mL，或者其他等效净化柱。

4.6 低温冷冻离心机： $\geq$ 10000r/min。

4.7 固相萃取装置。

5 分析步骤

5.1 试样制备及处理

称取液态奶 5~15g（精确到 0.001g）、奶粉 1~5g（精确到 0.001g）或者量取液态奶 5~15 mL（精确到 0.01mL）置 50 mL 离心管中，用淋洗液（3.2.1）适量溶解，常温充分振荡提取 5 分钟，将溶液转移到 50mL 容量瓶中，用少量淋洗液（3.2.1）至少洗涤 2 次，定容至刻度，然后将溶液转入离心管中，于 4℃ 10000r/min 离心 10min，去除脂肪，重复操作 1 次，澄清液备用。

5.2 净化

SelectCore Protein G 亲和柱，依次使用 5.0 mL 水、10.0 mL 淋洗液（3.2.1）平衡，精密移取 5.1 项下提取液 10.0 mL 上样至固相萃取柱上，待样液完全流出后，再用 5.0 mL 淋洗液（3.2.1）淋洗，弃去全部流出液。最后用 4.0 mL 洗脱液（3.2.2）洗脱，收集全部洗脱液，并用洗脱液（3.2.2）定容至 5.0 mL，并过 0.22μm 滤膜，供高效液相色谱检测分析用。

5.3 色谱参考条件

色谱柱: BioCore™SEC-300 4.6×250mm, 5μm, 或性能相当者;

流动相: 150 mmol/L 氯化钠溶于 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液中 (pH7.0) (3.2.3);

流速: 0.5 mL/min;

柱温: 30℃

检测波长: 214 nm;

进样量: 10 μL。

注: 建议色谱柱使用前通过对照品和空白分析比对进行残留测试。如遇到复杂基质样品无法达到分离效果, 建议可以改用 300mm 的 SEC 色谱柱达到更好的分离效果。

5.4 标准曲线制作

本法采用外标法定量。将免疫球蛋白 IgG 系列标准工作溶液（3.4.2）分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以峰面积为纵坐标，以标准测定液浓度为横坐标绘制标准曲线，计算直线回归方程。

5.5 样品测定

试样液经高效液相色谱仪分析，测得峰面积，采用外标法通过上述标准曲线计算其浓度。

6 结果计算

按式（1）计算免疫球蛋白 IgG 的含量。

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

式中：

X ——试样中免疫球蛋白 IgG 的含量，单位为毫克每百克或者毫克每百毫升，mg/100g 或 mg/100mL；

c ——根据标准曲线计算得到的试样中免疫球蛋白 IgG 的浓度，单位为微克每毫升， $\mu\text{g/mL}$ ；

m ——试样的称样量，单位克，g；或者毫升，mL；

V ——定容体积，单位毫升，mL；

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。计算结果保留三位有效数字。

7 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%。

8 检出限及定量限

本方法的检出限：当取样量为 10g 或 10mL 时，检出限为 0.75 mg/100g 或 0.75mg/100mL。

本方法的定量限：当取样量为 10g 或 10mL 时，定量限为 2.5 mg/100g 或 2.5mg/100mL。

附 录 A

(资料性)

色谱图

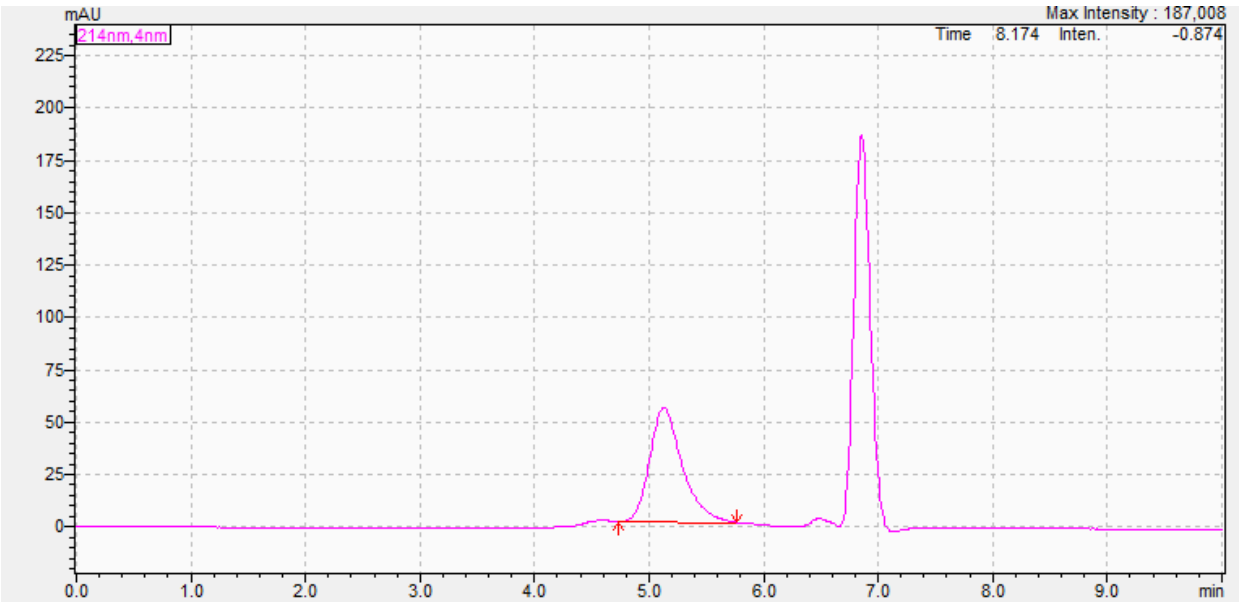


图1 免疫球蛋白IgG标准溶液色谱图