

ICS XXXXXXXX
CCS XXX

T/CNHFA XXX—XXXX

 中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA XXX—XXXX

脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的测定

Determination of Bovine-derived Whey Protein in Goat/Sheep Demineralized Whey Powder

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国营养保健食品协会 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。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：索地雅乳业商贸（上海）有限公司、杭州璞湃科技有限公司、圣元营养食品有限公司。

本文件主要起草人：王娜、胡玲玲、赖世云、任一平、宋飞、纪赞。

脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的测定

1 范围

本文件规定了脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的测定方法。

本文件适用于脱盐羊乳清粉，不适用于水解脱盐羊乳清粉。

2 方法原理

试样中的蛋白经溶解后，用碱性胰蛋白酶酶解成肽段，经液相色谱分离，串联质谱测定牛源的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白特异肽段，内标法定量。再根据特异肽段与目标蛋白的一一对应关系，获得试样中牛源的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的含量；再根据 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白与乳清蛋白的关系，计算出脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的含量，最终获得试样中牛源乳清蛋白的占比。

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 碳酸氢铵 (NH_4HCO_3)。

3.1.2 二硫苏糖醇 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, DTT)。

3.1.3 碘代乙酰胺 ($\text{ICH}_2\text{CONH}_2$, IAA)。

3.1.4 乙酸 (CH_3COOH)。

3.1.5 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。

3.1.6 乙腈 (CH_3CN)：色谱纯。

3.1.7 碱性胰蛋白酶：活力大于 10000 BAEE 每毫克蛋白质。

3.2 试剂配制

3.2.1 碳酸氢铵溶液 (500 mmol/L)：称取 3.95 g 碳酸氢铵，用水溶解后定容至 100 mL。

3.2.2 二硫苏糖醇溶液 (500 mmol/L)：称取 0.771 g 二硫苏糖醇，用 500 mmol/L 的碳酸氢铵溶液溶解后定容至 10 mL。

3.2.3 碘代乙酰胺溶液 (500 mmol/L)：称取 0.925 g 碘代乙酰胺，用 500 mmol/L 的碳酸氢铵溶液溶解后定容至 10 mL。

3.2.4 乙酸溶液 (1%, V/V)：移取 0.1 mL 乙酸，用水稀释并定容至 10 mL。

3.2.5 胰蛋白酶溶液 (1 mg/mL)：称取 10 mg 碱性胰蛋白酶，用 1% 乙酸溶液溶解后定容

至 10 mL。

3.2.6 甲酸水溶液（0.1%，V/V）：吸取 1 mL 甲酸，用水稀释并定容至 1000 mL。

3.2.7 甲酸乙腈溶液（0.1%，V/V）：吸取 1 mL 甲酸，用乙腈稀释并定容至 1000 mL。

3.3 标准品

3.3.1 牛 α -乳白蛋白标准品（CAS 号：9051-29-0）：分子量 14178 Da，纯度 $\geq$ 85%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。配制溶液称量时需按纯度折算，保质期详见分析证书。

3.3.2 牛 β -乳球蛋白标准品（CAS 号：9045-23-2）：分子量 18320 Da，纯度 $\geq$ 85%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。配制溶液称量时需按纯度折算，保质期详见分析证书。

3.3.3 牛 α -乳白蛋白特异肽段（CEVFR）：分子量 652.30 Da，纯度 $\geq$ 95%，保质期详见分析证书。

3.3.4 牛 β -乳球蛋白特异肽段（LSFNPTQLEEQCHI）：分子量 1658.20 Da，纯度 $\geq$ 95%，保质期详见分析证书。

3.3.5 牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段（CEV*F*R）：分子量 668.80Da，纯度 $\geq$ 95%，保质期详见分析证书。

3.3.6 牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段（LSFNPTQL*EEQCHI*）：分子量 1672.40 Da，纯度 $\geq$ 95%，保质期详见分析证书。

3.3.7 羊 α -乳白蛋白特异肽段（NICNISCDK）：分子量 1009.17 Da，纯度 $\geq$ 95%，保质期详见分析证书。

3.3.8 羊 β -乳球蛋白特异肽段（LAFNPTQLEGQCHV）：分子量 1556.75 Da，纯度 $\geq$ 95%，保质期详见分析证书。

注：上述肽段序列中注有*的氨基酸为同位素标记氨基酸，V*为 Val-OH-13C5,15N；F*为 Phe-OH-13C9,15N；L*为 Leu-OH-13C6,15N；I*为 Ile-OH-13C6,15N。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 牛 α -乳白蛋白标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取牛 α -乳白蛋白标准粉末 10.0 mg（纯度需折算，准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL。将溶液转移到塑料瓶中，于-20℃保存，保存 6 个月。

3.4.2 牛 α -乳白蛋白同位素标记内标储备溶液（500 μ g/mL）：准确称取牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段粉末 5.00 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL。将溶液转移到塑料瓶中，于-20℃保存，保存 6 个月。

3.4.3 牛 β -乳球蛋白标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取牛 β -乳球蛋白标准粉末 10.0 mg（纯度需折算，准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL。将溶液转移到塑料瓶中，

于-20℃保存，保存6个月。

3.4.4 牛 α -乳白蛋白特异肽段储备溶液（500 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取牛 α -乳白蛋白特异肽段粉末 5.00 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL。将溶液转移到塑料瓶中，于-20℃保存，保存6个月。

3.4.5 牛 β -乳球蛋白特异肽段储备溶液（500 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取牛 β -乳球蛋白特异肽段粉末 5.00 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL。将溶液转移到塑料瓶中，于-20℃保存，保存6个月。

3.4.6 羊 α -乳白蛋白特异肽段储备溶液（500 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取羊 α -乳白蛋白特异肽段粉末 5.00 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL。将溶液转移到塑料瓶中，于-20℃保存，保存6个月。

3.4.7 羊 β -乳球蛋白特异肽段储备溶液（500 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取羊 β -乳球蛋白特异肽段粉末 5.00 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL。将溶液转移到塑料瓶中，于-20℃保存，保存6个月。

3.4.8 牛 β -乳球蛋白同位素标记内标储备溶液（500 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段粉末 5.00 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL。将溶液转移到塑料瓶中，于-20℃保存，保存6个月。

3.4.9 蛋白标准中间混合溶液（牛 α -乳白蛋白 30 $\mu\text{g/mL}$ ，牛 β -乳球蛋白 90 $\mu\text{g/mL}$ ）：分别准确吸取 300 μL 牛 α -乳白蛋白标准储备液和 900 μL 牛 β -乳球蛋白标准储备液，用水稀释并定容至 10 mL，保存3个月。

3.4.10 同位素标记内标溶液（2 $\mu\text{g/mL}$ ）：分别准确吸取 40 μL 牛 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的同位素标记内标储备液，用水稀释并定容至 10 mL，保存3个月。

3.4.11 系列标准工作溶液：准确吸取蛋白标准中间混合溶液 0 μL 、20 μL 、50 μL 、75、100 μL 、150 μL 、200 μL ，再分别加入 200 μL 、180 μL 、150 μL 、125、100 μL 、50 μL 、0 μL 超纯水，每个浓度点加入 50 μL 的同位素标记内标中间混合溶液，按照 5.2 与试样同时进行烷基化与酶解（最后加水体积 480 μL ，使总体积为 1 mL），得到牛 α -乳白蛋白的浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.60 $\mu\text{g/mL}$ 、1.50 $\mu\text{g/mL}$ 、2.25 $\mu\text{g/mL}$ 、3.00 $\mu\text{g/mL}$ 、4.50 $\mu\text{g/mL}$ 和 6.00 $\mu\text{g/mL}$ ；牛 β -乳球蛋白的浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.80 $\mu\text{g/mL}$ 、4.50 $\mu\text{g/mL}$ 、6.75 $\mu\text{g/mL}$ 、9.00 $\mu\text{g/mL}$ 、13.50 $\mu\text{g/mL}$ 和 18.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作溶液。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源；质量数范围，1~2000 质荷比（ m/z ）；分辨率，0.1 原子质量单位（AMU）。

4.2 天平：感量 0.01 g；0.01 mg。

4.3 涡旋混合器：振荡转速不低于 2400 转/分钟。

- 4.4 超声波振荡器。
- 4.5 恒温水浴摇床。
- 4.6 微量移液器：1~10 μL 、10~100 μL 、100~1000 μL 。
- 4.7 微孔滤膜：0.22 μm 。
- 4.8 一次性注射器：5 mL。

5 分析步骤

5.1 试样制备

称取试样 1 g（精确至 0.0001 g）于 50 mL 烧杯中，分次用 20 mL 水将试样充分溶解，转移到 25 mL 容量瓶中，并用水定容至刻度，必要时置于涡旋混合器上充分涡旋溶解，准确移取试样溶解液 100 μL 于 2 mL 离心管中，加入 50 μL 同位素标记内标中间混合溶液，待酶解。

5.2 烷基化与酶解

向上述样液中加入 200 μL 碳酸氢铵溶液、10 μL 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 70 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温水浴 30 min；冷却至室温，加入 30 μL 碘代乙酰胺溶液，暗处静置 30 min；再加入 20 μL 胰蛋白酶溶液，充分混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中酶解 3 h。加入 10 μL 甲酸混匀，室温下静置 15 min，再加入 580 μL 水，涡旋混匀，用 0.22 μm 滤膜过滤，供高效液相色谱-串联质谱仪检测。

5.3 仪器参考条件

5.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：硅烷基 C_{18} 柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.7 μm ，孔径 30 nm（300 $\text{\AA}$ ）或等效者；
- 流动相 A：0.1%甲酸水溶液；流动相 B：0.1%甲酸乙腈溶液；
- 梯度洗脱：参考洗脱梯度参见表 1；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 进样体积：5 μL 。

表1 梯度洗脱参考条件

时间（min）	流动相 A	流动相 B
0	95	5
1.0	95	5

4.0	40	60
4.1	0	100
6.0	0	100
6.1	95	5
8.0	95	5

5.3.2 质谱参考条件

- a) 电喷雾模式: ESI+;
- b) 质谱扫描方式: 多反应监测 (MRM);
- c) 毛细管电压: 3.5 kV;
- d) 锥孔电压: 35 kv;
- e) 脱溶剂温度: 500 °C;
- f) 脱溶剂气流量: 800 L/h;
- g) 其它质谱参数见表2。

表2 主要参考质谱参数

化合物 名 称	母离子(m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量(eV)
	$[M+2H]^{2+}$		
牛 α -乳白蛋白 特异肽段	355.8	322.4*	15
		174.9	18
牛 α -乳白蛋白 同位素特异肽段	363.9	332.4*	15
		174.9	18
牛 β -乳球蛋白 特异肽段	858.6	1254.6	27
		462.2*	26
牛 β -乳球蛋白 同位素特异肽段	865.7	1268.9	27
		462.2*	26
羊 α -乳白蛋白 特异肽段	562.2	509.2	15
		228.1*	18
羊 β -乳球蛋白 特异肽段	807.5	1168.4	27
		600.2*	26

注: *为定量离子; 不同质谱仪器, 质谱参数条件可能存在差异, 测定前应将质谱条件优化到最佳。

5.4 标准曲线的制作

将标准系列工作溶液酶解液依次注入高效液相色谱-串联质谱仪，测定相应的峰面积，标准色谱质谱图见附录 A.1。以标准系列的浓度为横坐标，各浓度点中特异肽段与对应同位素特异肽段的峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线见附录 A.3。

5.5 试液的测定

将试样酶解液注入高效液相色谱-串联质谱仪，测得相应分析物的峰面积，根据标准曲线得到待测试样溶液中牛 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的浓度，样品图谱见附录 A.2。

5.6 空白试验

不称取试样，按同一操作方法做空白试验，空白试验溶液的色谱质谱图中应不含待测组分的干扰峰。

5.7 总蛋白测定

样品中总蛋白的测定参照《GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》。

6 分析结果的表述

6.1 乳清蛋白结果计算

试样中牛 α -乳白蛋白及 β -乳球蛋白的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V}{m} \times f_1 \times 10^{-1} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中牛 α -乳白蛋白，或 β -乳球蛋白的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；
 ρ ——根据标准曲线计算得到的试样酶解液中牛 α -乳白蛋白，或 β -乳球蛋白的浓度，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）；
 m ——试样质量，单位为克（g）；
 f_1 ——待测试样溶液的稀释倍数，本标准中 $f_1=10$ ；
 10^{-1} ——将浓度单位 $\mu\text{g/mL}$ 换算为 mg/mL 的换算系数。

6.2 乳清蛋白含量的计算

试样中牛乳清蛋白的含量按式（2）计算：

$$X_w = \frac{X_\alpha + X_\beta}{f} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X_w ——试样中牛乳清蛋白的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；
 X_α ——试样中牛 α -乳白蛋白的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；
 X_β ——试样中牛 β -乳球蛋白的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；
 f ——将试样牛 α -乳白蛋白与 β -乳球蛋白的含量换算为牛乳清蛋白含量的换算系数，取

值 0.775。

6.3 总蛋白结果计算

$$X_p = \frac{(V_1 - V_0) \times c_a \times 0.0140 \times 100}{m \times V_3} \times F \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X_p ——试样中总蛋白的含量，单位为克每百克（g/100g）；

V_1 ——试样消耗硫酸或盐酸标准溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_0 ——试剂空白消耗硫酸或盐酸标准溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——吸取消化液的体积，单位为毫升（mL）；

c_a ——硫酸或盐酸标准溶液浓度，单位为纳摩尔每升（mol/L）；

0.0140——1.0 mL 硫酸或盐酸标准溶液（1.000 mol/L）相当的氮含量；

F ——氮换算成蛋白质的换算系数，脱盐羊乳清粉换算系数为 6.38。

m ——试样质量，单位为克（g）

6.4 牛乳清蛋白比率的计算

试样中牛乳清蛋白占总蛋白的比率由公式（4）计算得。

$$R = \frac{X_w}{X_p} \times 10^{-3} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

式中：

R ——试样中牛乳清蛋白占总蛋白的比率，%；

X_w ——试样中乳清蛋白的含量，单位为克每百克（mg/100g）；

X_p ——试样中总蛋白的含量，单位为克每百克（g/100g）；

10-3——将质量单位 mg 换算为 g 的换算系数。

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 15%。

8 定量限

称样量为 1 g 时，牛源乳清蛋白的检出限为 0.3 %，定量限为 1.0 %。

附录 A

(规范性) / (资料性)

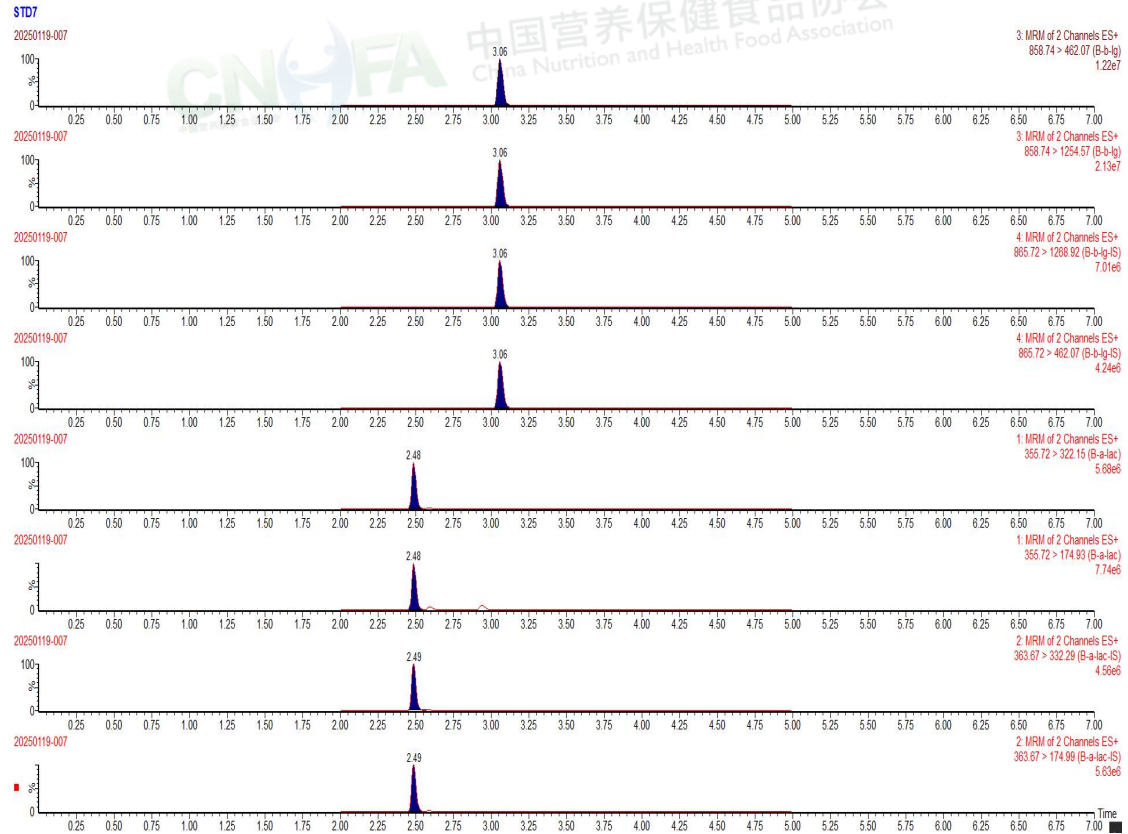
图 A.1 牛 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白特异肽标准溶液的色谱质谱图图 A.1 牛 α -乳白蛋白(6.0 μ g/mL)、 β -乳球蛋白(18.0 μ g/mL)特异肽标准溶液的色谱质谱图

图 A.2 脱盐羊乳清粉阳性样品的色谱质谱图

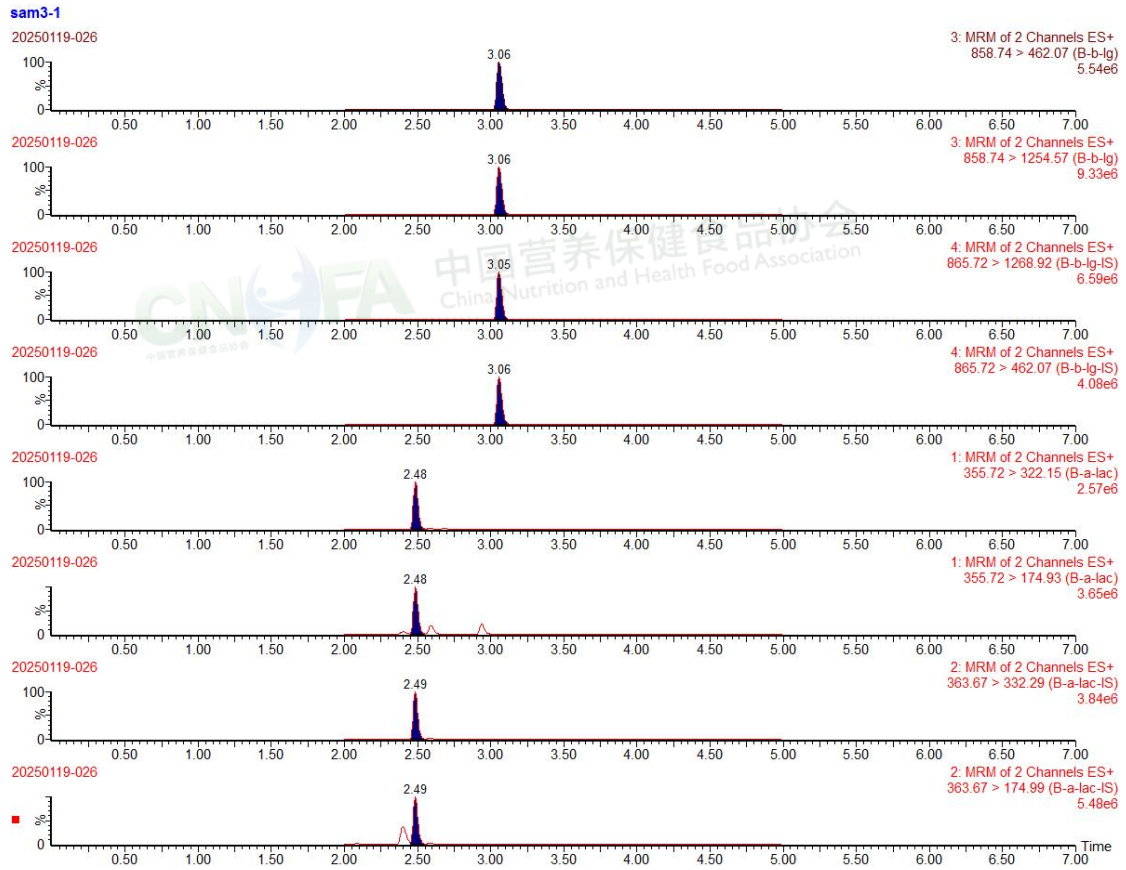
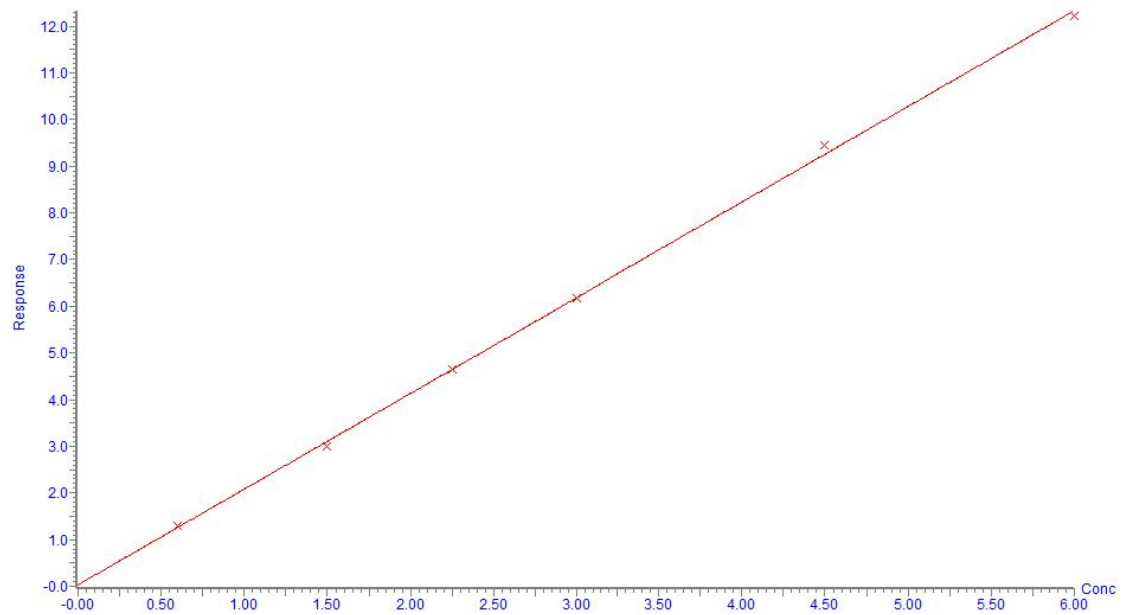


图 A.2 脱盐羊乳清粉阳性样品的色谱质谱图

图 A.3 牛 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白标准曲线图谱

Compound name: B-a-lac
 Correlation coefficient: $r = 0.999715$, $r^2 = 0.999430$
 Calibration curve: $2.04994 \times x + 0.0324509$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

图 A.3.1 牛 α -乳白蛋白标准曲线图谱

Compound name: B-b-Ig
Correlation coefficient: $r = 0.999930$, $r^2 = 0.999861$
Calibration curve: $1.5569 \times x + 0.113465$
Response type: Internal Std (Ref 8), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

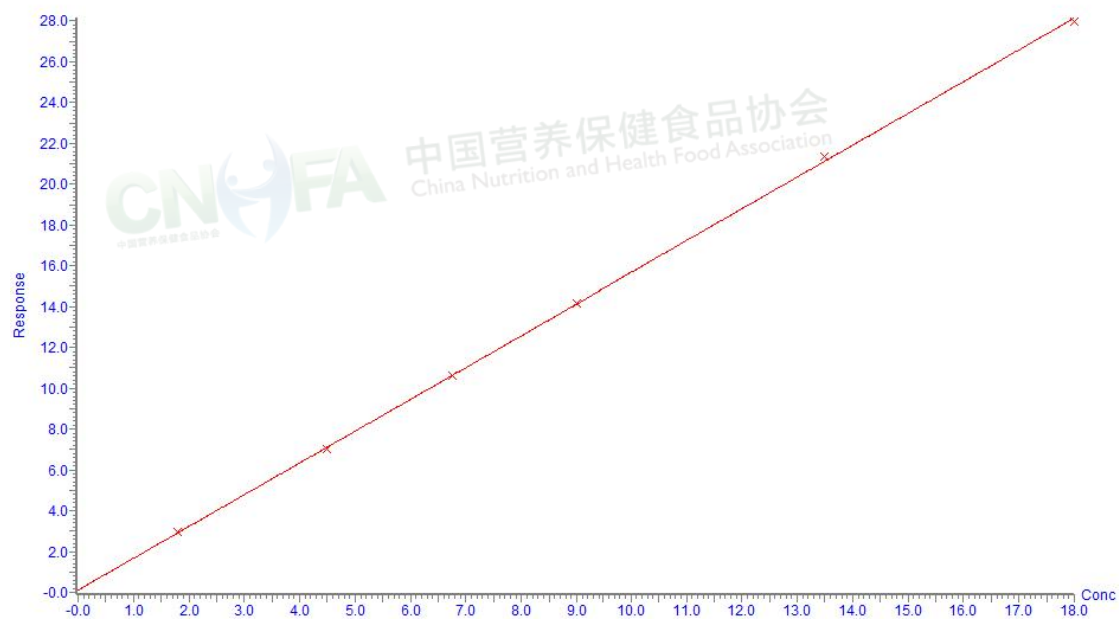


图 A.3.2 牛 β -乳球蛋白标准曲线图谱