

# 脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的测定

## 编制说明

### 一、方法制定的基本情况（包括简要的制定过程、主要制定单位、制定人等）

标准名称：脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的测定

标准研制类别（制定、修订）：制定

起草者：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

验证者：山东省食品药品检验研究院、伊利集团检测及校准实验室（国家市场监督管理总局重点实验室（牛羊乳肉制品风险防控与关键技术））

主要起草人：王娜、胡玲玲、赖世云、任一平、宋飞、纪赞

主要验证人：别梅、薛霞、张立佳、莫楠、刘丽君

#### 1.1 制定过程

##### 1.1.1 立项目的

随着我国社会的发展，消费水平不断地提升，对于具有营养价值高、致敏性低、易消化吸收等优点的羊乳制品备受广大消费者的追捧。而作为羊乳制品重要原料之一的脱盐羊乳清粉，目前国内仍为稀缺产品，主要依赖于进口，且销售价格普遍较高，在利益的驱使下，不乏存在往脱盐羊乳清粉中掺入脱盐牛乳清粉的现象。为确保消费者的权益，杜绝或避免此类事件的发生，需要具有能够鉴别脱盐羊乳清粉中掺入脱盐牛乳清粉的方法以作保障。

目前，国内用于脱盐羊乳清粉中牛源性成分的鉴别的方法均为 PCR 法，该方法的测定对象是牛体细胞的 DNA 片段。脱盐羊乳清粉由液体的羊乳清加工制成，而液体的羊乳清为羊奶酪生产工艺的副产品。羊奶酪的加工过程中要使用牛源性的凝乳酶，因此，微量的牛源性凝乳酶随工艺被带入液体羊乳清，进而带入到脱盐羊乳清粉中。若用 PCR 的检测方法进行检测和判定，由于凝乳酶而导致牛源性 DNA 检出，以此为依据判定脱盐羊乳清粉有掺假问题，会造成对生产企业的误伤。而 2023 年国家市场监督管理总局令第 80 号公布的《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》第三十四条规定：产品名称中有动物性来源字样的，其生乳、乳粉、乳清粉等乳蛋白来源应当全部来自该物种。因此 PCR 法的测定对象与此规定不相符。

为保障消费者的权益，同时也保证生产企业的合法利益，因此建立脱盐羊乳清粉中牛源性蛋白的测定方法既是迫切需要，也是势在必行。

### 1.1.2 前期工作

索地雅乳业商贸（上海）有限公司作为制标单位，寻找了在靶向蛋白组学领域研究多年的实验室作为方法研制单位，该单位的研究团队在国内、外专业期刊上发表学术论文已有十余篇，包含 $\alpha$ -乳白蛋白、乳铁蛋白、骨桥蛋白等功能性蛋白的测定方法。且在接受任务的第一时间，对国内外的各大标准及文献进行查询，试图找到脱盐羊乳清粉中的牛源蛋白成分含量测定的国际标准，但经过查询未能找到适合的方法。因此实验室在所查阅的资料基础之上根据脱盐羊乳清粉与脱盐牛乳清粉的各自特点，进行深度分析及大量的实践实验，最终确定了应用液相色谱串联质谱技术（LC-MS/MS）对脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白含量进行测定的方法。

### 1.1.3 实验室间验证工作

验证工作由杭州璞湃科技有限公司委托山东省食品药品检验研究院、圣元营养食品有限公司、伊利集团检测及校准实验室完成。

通过统计分析各个实验室的检测数据，验证了方法的线性、准确度、精密度以及定量限等指标。

## 二、国内国际相关标准情况

经查阅相关标准资料，国内和国际上没有成型的脱盐羊乳清粉中的牛源蛋白成分定性和定量测定通用标准。而查阅文献发现现有已报道的检测羊乳制品中的牛奶成分掺假检测的方法主要有 PCR 法、ELISA 法、LC-ESI MS 法和 MALDI-TOF MS 法。

PCR 法的主要原理是对羊奶中含有的奶牛 DNA 片段进行提取纯化与扩增后检测，进而对羊奶中是否含有奶牛源性成分进行鉴定。PCR 法主要针对的样品基质为山羊鲜奶和绵羊鲜奶中奶牛奶成分的掺假检测。PCR 法是一种高特异性和高灵敏度的定性方法。然而 PCR 法是通过间接检测奶中的 DNA 作为定性依据。奶中的 DNA 来源于体细胞，而体细胞含量受到许多干扰因素的影响，如个体奶牛的乳腺是否健康，产奶的季节等。同时在生乳加工成奶粉时，要经历高温喷雾干燥的过程，这可能导致乳中的 DNA 受到破坏，因此 PCR 法可能不适用于奶粉的检测，同时 PCR 法无法对掺假成分含量进行定量。ELISA 法利用的是抗原抗体特异结合原理，具有特异性强、灵敏度高以及操作简单，可进行现场检测等优点。然而在工业加工后的乳制品检测中，ELISA 法可能会出现大量的假阴性结果，这是因为经过热加工、酶解、添加其他原料等不同生产工艺处理，复杂的乳制品组分会不同程度地干扰 ELISA 法的测定。因此，ELISA 法主要适用于蛋白质未变性的鲜奶等样品检测，在加工后乳制品的真假鉴别中受到极大的限制。LC-ESI MS 直接检测蛋白质法的原理是通过全扫描模式对目标蛋白进行检测，根据目标蛋白的质荷比不同进行定性定量。与 ELISA 法相同，LC-ESI MS 法无法检测变性蛋白，不适用于热加工处理后的奶粉检测。MALDI-TOF MS 作为近年来新开发的生物分子分析检测技术，在蛋白指纹谱库的建立与分析中具有独特的优势，通过检测

选定的生物标记物可以获得乳制品中物种来源和地域来源等信息，是一种准确性高的快速定性方法。但 MALDI-TOF 法由于缺乏商业化的蛋白标准品，无法实现完全定量检测。同时由于 MALDI-TOF MS 仪器造价昂贵，难以在监管部门和乳品生产企业中进行普及。

由于上述方法具有不同的缺陷，从实际出发，基于方法主要用于脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白含量测定的考虑，选定乳 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白作为目标蛋白进行方法开发。基于靶向蛋白质组学检测技术和胰蛋白酶特异酶切特性，将蛋白质数据库与高分辨四极杆静电场轨道阱串联质谱(Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Q Exactive, Thermo Scientific)结合，筛选获得目标蛋白候选特异肽段，通过比较候选特异肽段的特异性、通用性、灵敏度等性质，最终确定 $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段和 $\beta$ -乳球蛋白特异肽段作为最终的生物标记肽段，并合成相应的同位素标记肽段作为内标，进一步建立定性定量检测脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的分析方法，为脱盐羊乳清粉产品质量提供技术支持。

### 三、方法的重要内容及主要研究情况

#### 3.1 方法原理

试样中的 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白经二硫苏糖醇、碘代乙酰胺变性还原，以重组胰蛋白酶酶解成特异性肽段后，以稳定同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定目标蛋白的特异肽段，内标法定量。根据乳清蛋白换算系数，换算出脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的含量，最终计算出样品蛋白中牛源乳清蛋白的占比。

#### 3.2 主要技术路线

羊奶主要分为山羊奶和绵羊奶，基于靶向蛋白质组学检测技术，开发脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的测定方法。针对脱盐乳清粉基质，选用 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白作为检测对象，利用靶向蛋白质组学，确定牛羊的特异肽段。通过对不同种类牛乳清粉数据进行分析，得出牛源乳清蛋白的换算系数，最终根据换算系数，计算得到脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的含量，主要技术路线如图 1 所示。

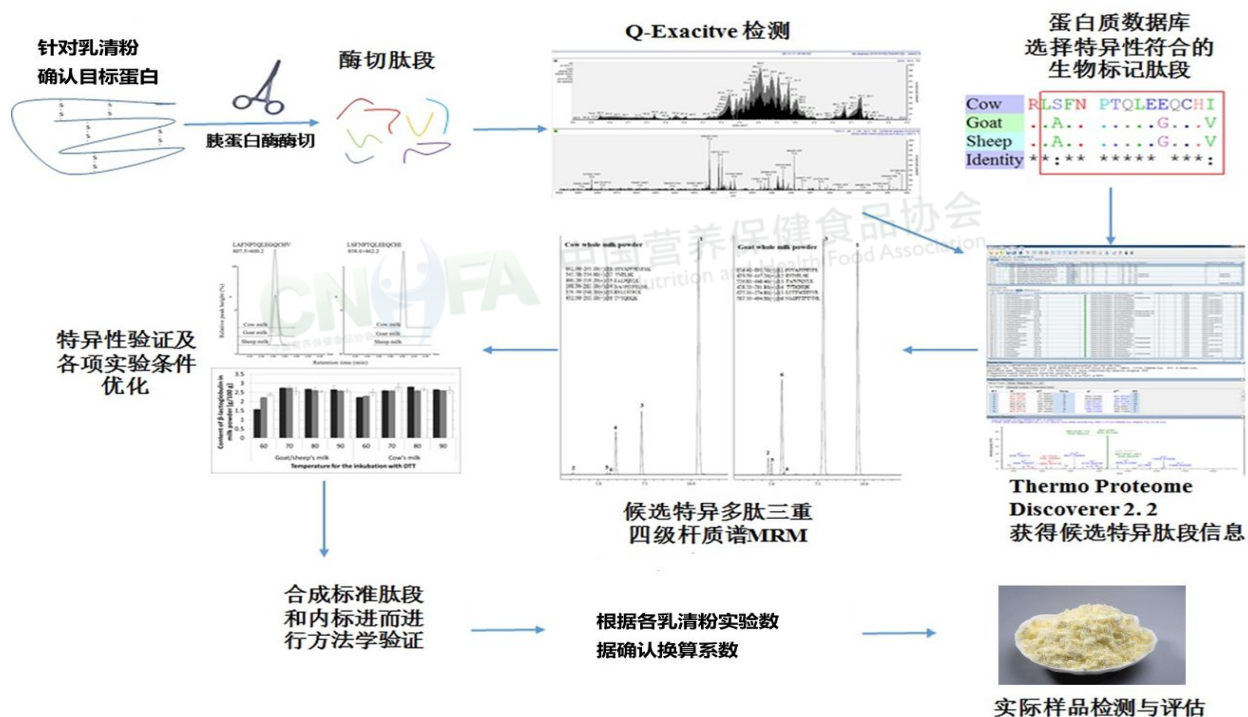


图1 技术路线图

### 3.3 方法研究

#### 3.3.1 定量蛋白和特异肽段的确定

牛与羊乳清蛋白中的 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白具有同源性，它们的氨基酸序列相似度在 90%以上，因此直接检测羊乳清粉中的牛乳清蛋白具有较大的难度。因此，本方法基于靶向蛋白质组学技术，从肽段层面出发，利用胰蛋白酶对肽段进行特异性酶切，利用蛋白质组学数据库与高分辨质谱采集数据，从 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白中筛选出合适的特异肽段，通过特异肽段和相应蛋白之间的对应关系，从而实现确定 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的含量。

从蛋白数据库 (<https://www.uniprot.org>) 中查询到奶牛，山羊和绵羊对应的蛋白数据库，见图 2 和图 3，图 2 为 $\alpha$ -乳白蛋白蛋白序列，图 3 为 $\beta$ -乳球蛋白的蛋白序列。首先筛选出合适长度（10 个氨基酸左右）的肽段，可得出理论上可用于牛、羊（山羊和绵羊）区分的 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白的特异肽段（图 2 和图 3 中标红部分肽段）。在 $\beta$ -乳球蛋白中，有两条肽段（LIVTQTMK 和 IIVTQTMK）含有甲硫氨酸（M），极易被氧化，导致定量结果偏差，故舍去。最终，选择氨基酸序列 NICNISCDK 为羊 $\alpha$ -乳白蛋白的特异性肽段，氨基酸序列 LAFNPTQLEGQCHV 为羊 $\beta$ -乳球蛋白的特异性肽段，氨基酸序列 CEVFR 为牛 $\alpha$ -乳白蛋白的特异性肽段，氨基酸序列 LSFNPTQLEEQCHI 为牛 $\beta$ -乳球蛋白的特异性肽段。

奶牛 MMSFVSLLLVGILFHATQAEQLTK**CEVFR**ELKDLKGYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAI  
山羊 MMSFVSLLLVGILFHATQAEQLTKCEVFQKLKDKDYGGVSLPEWVCTAFHTSGYDTQAI  
绵羊 MMSFVSLLLVGILFHATQAEQLTKCEVFQELKDLKDYGGVSLPEWVCTAFHTSGYDTQAI  
奶牛 VQNNNSTEYGLFQINNKIWCKDDQNP~~HS~~SNICNISCDFLDDDLTDDIMCVKKILDKVGI  
山羊 VQNNNSTEYGLFQINNKIWCKDDQNP~~HS~~R**NICNISCDF**FLDDDLTDDI VCAKKILDKVGI  
绵羊 VQNNNSTEYGLFQINNKIWCKDDQNP~~HS~~R**NICNISCDF**FLDDDLTDDIMCVKKILDKVGI  
奶牛 NYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL  
山羊 NYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL  
绵羊 NYWLAHKALCSEKLDQWLCEKL

图2 α-乳白蛋白蛋白序列

奶牛 MKCLLLALALTCGAQA**LIVTQTMK**GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVY  
山羊 MKCLLLALGLALACG I QA**IIVTQTMK**GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVY  
绵羊 MKCLLLALGLALACGVQA**IIVTQTMK**GLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVY  
奶牛 VEELKPTPEGDLEILLQKWENGECQAQKKIAEKTIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKY  
山羊 VEELKPTPEGNLEILLQKWENGECQAQK IAEKTIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKY  
绵羊 VEELKPTPEGNLEILLQKWENGECQAQKKIAEKTIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYKKY  
奶牛 LLFCMENSAEPEQSLACQCLVRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIR**LSFNPTQLEEQCHI**  
山羊 LLFCMENSAEPEQSLACQCLVRTPEVDKEALEKFDKALKALPMHIR**LAFNPTQLEGQCHV**  
绵羊 LLFCMENSAEPEQSLACQCLVRTPEVDNEALEKFDKALKALPMHIR**LAFNPTQLEGQCHV**

图3 β-乳球蛋白蛋白序列

选取纯羊和纯牛乳清粉对这一理论结果进行确认，对这两个乳清粉样品进行酶解处理后，用高分辨质谱进行分析。数据用 Proteome Discoverer 2.2 软件进行处理，得到两种乳清粉中α-乳白蛋白和β-乳球蛋白的肽段信息，见表 1。由表 1 可证实，图 2 和图 3 中的特异肽段，在实际样品处理后，也能被发现。

表 1 高分辨质谱分析后肽段信息

| 样品基质   | α-乳白蛋白来源肽段序列                    | β-乳球蛋白来源肽段序列               |
|--------|---------------------------------|----------------------------|
| 脱盐牛乳清粉 |                                 | VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR |
|        | DDQNP <del>HS</del> SNICNISC DK | LSFNPTQLEEQCHI             |
|        | FLDDDLTDDIMCVK                  | VYVEELKPTPEGDLEILLQK       |
|        | VGINYWLAHK                      | TPEVDDEALEK                |
|        | LDQWLCEK                        | VLVLDTDYK                  |
|        | CEVFR                           | WENGECQAQK                 |
|        |                                 | IDALNENK                   |
| 脱盐羊乳清粉 |                                 | GLDIQK                     |
|        |                                 | VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR |
|        | FLDDDLTDDIMCVK                  | LAFNPTQLEGQCHV             |
|        | NICNISC DK                      | VLVLDTDYK                  |
|        | CEVFQELK                        | WENGECQAQK                 |
|        | DDQNP <del>HS</del> R           | IDALNENK                   |
|        |                                 | GLDIQK                     |
|        |                                 | TPEVDNEALEK                |

### 3.3.2 特异肽段特异性验证

对 3.3.1 中确定的特异肽段进行色谱质谱条件优化后，对其特异性进行验证。以 $\beta$ -乳球蛋白为例，选取 3 种样品，分别为脱盐牛乳清粉，脱盐羊乳清粉和混合脱盐乳清粉（牛和羊脱盐乳清粉 1:1 混合）。按优化好的条件进样分析后，3 种脱盐乳清粉样品色谱图见图 4。由图 4 可知，在脱盐牛乳清粉中只有牛 $\beta$ -乳球蛋白色谱峰出现，在脱盐羊乳清粉中只有羊 $\beta$ -乳球蛋白色谱峰出现，而在混合脱盐乳清粉中，两个色谱峰均出现。因此，可以确认所选特异肽段具有特异性。

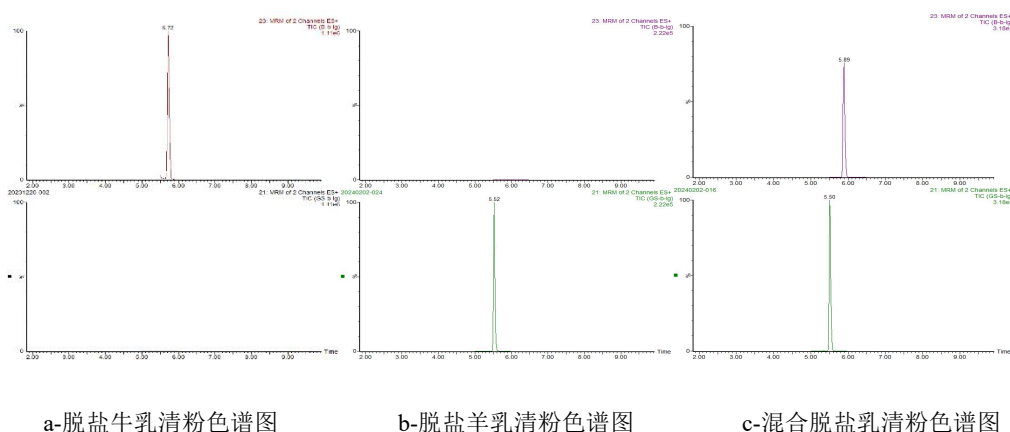


图 4 3 种脱盐乳清粉色谱图

（从上到下依次为牛 $\beta$ -乳球蛋白特异肽段和羊 $\beta$ -乳球蛋白特异肽段）

### 3.3.3 还原温度的优化

作为一种球蛋白， $\beta$ -乳球蛋白具有比较致密的三维空间结构，这使得其被酶解的难度要高于 $\alpha$ -乳白蛋白。在 $\beta$ -乳球蛋白的整个氨基酸序列中一共存在 7 个半胱氨酸，其空间结构主要通过半胱氨酸之间形成的二硫键以及其他的非共价键维持。如果不破坏 $\beta$ -乳球蛋白的空间结构，使其酶切位点暴露出来，则酶切无法完全进行。本文设计了一套 DTT 浓度和还原温度的正交实验来优化还原反应条件。其中 DTT 配制成 100、250 和 500 mmol/L 的溶液，还原反应的温度为 60、70、80、90 °C，IAA 溶液的浓度也须与 DTT 溶液保持一致，保证过量的 DTT 溶液不会对后续的酶解过程产生影响。结果如图 5 所示，由此结果可以推论，提高 DTT 浓度也可提高还原效率，但是通过提高反应温度所带来的还原效率影响更明显。在 70-90 °C 的反应温度范围内， $\beta$ -乳球蛋白的测得量略微有所波动，可能是由实验误差引起的。考虑到高温可能导致多肽的破坏，且主要用于测定牛乳的特异肽段，最终本文选择 500 mmol/L 的 DTT 溶液和 70 °C 来进行蛋白质还原反应。

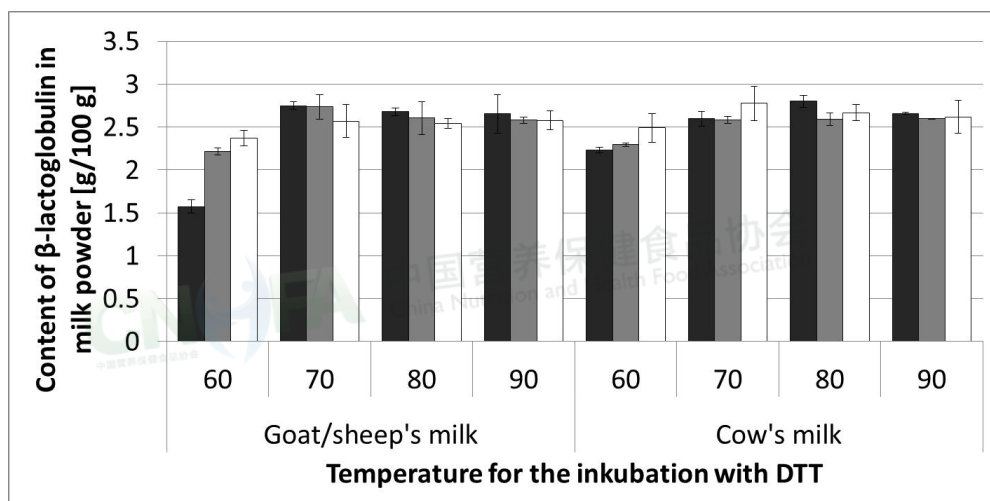


图5 DTT 反应浓度与温度的比较

(黑: DTT 浓度为 100 mmol/L; 灰: DTT 浓度为 250 mmol/L; 白: DTT 浓度为 500 mmol/L)

### 3.3.4 酶解时间的确定

酶解反应是前处理过程中的重要环节, 因此本方法设计了以酶解时间为变量, 寻找最优的酶解条件。酶解时间分别设计为 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h、3.5h、4.0h 和 8.0h, 按标准操作规程中的步骤进行前处理, 酶解结束的溶液使用液质检测分析。以酶解时间为横坐标, 肽段浓度为纵坐标, 制作曲线, 结果见图 6。结果显示, 牛的β-乳球蛋白在 2.0h 时, 已基本酶解完全, 而牛α-乳白蛋白在 3.0h 达到酶解完全, 且后续时间保持稳定。因此, 最终选择 3h 作为本方法的酶解时间。

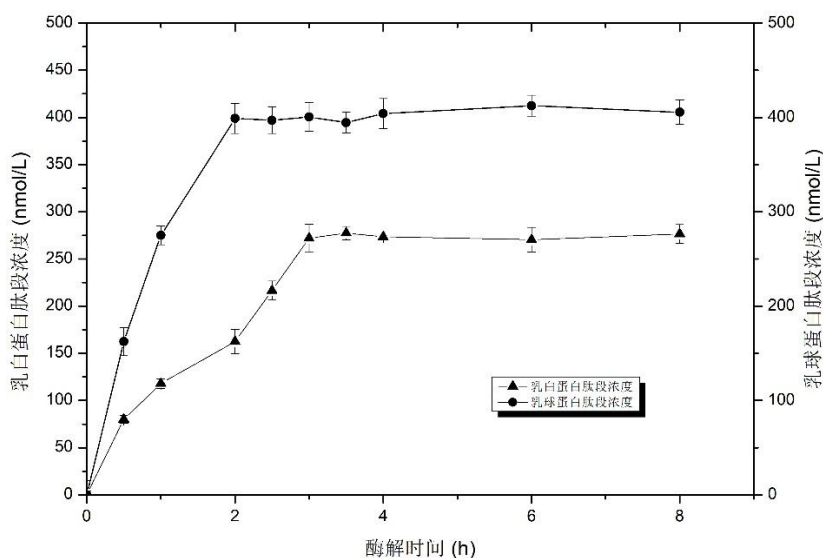


图6 酶解时间曲线

### 3.3.5 酶解终止试剂的选择

终止酶解反应的机理是将酶解溶液的 pH 值调至酸性(pH 约为 2), 在此环境下, 胰蛋白酶处于失活状态。多数文献报道的终止酶解所用的试剂为 200mM 盐酸溶液, 盐酸酸性极强, 调 pH 的效果显著。考虑

强酸环境对色谱柱的使用寿命影响较大，且盐酸对质谱检测器的影响也非常大，故而尝试了用甲酸或三氟乙酸作为终止酶解试剂，经对比实验表明，使用甲酸或三氟乙酸作为终止酶解试剂亦能达到相同效果。结合色谱分离所用试剂，最终选择甲酸作为终止酶解的试剂。

3.3.6 同位素内标合成

由于肽段在不同样品中基质效应不同，因此通过外标法测得的峰面积响应值差异较大，使用同位素氨基酸替代普通氨基酸合成的同位素标记肽段是一种简单而有效的内标。因此本文合成了同位素标记肽段 LSFNPTQL\*EEQCHI\*和 CEV\*F\*R 分别作为相应生物标记肽段的同位素内标，用来校正样品中存在的基质效应，其中 L\* 为同位素标记的亮氨酸(Leu-OH-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N)，I\*为同位素标记的异亮氨酸(Ile-OH-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N)，V\*为同位素标记的缬氨酸(Val-OH-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>,<sup>15</sup>N)，F\*为同位素标记的苯丙氨酸(Phe-OH-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N)。

3.3.7 质谱条件的确定

研究中主要对 6 条肽段（牛羊α-乳白蛋白和β-乳球蛋白）及其牛的同位素肽段进行质谱条件的优化。以牛β-乳球蛋白为例，取牛β-乳球蛋白肽段标准品，用超纯水稀释至 2μmol/L。先用全扫描模式确定其母离子（m/z=858.6），用 SIR 模式进行验证，优化锥孔电压参数，以获得最佳灵敏度；然后用子离子扫描模式对肽段子离子进行进一步分析，参考 Proteome Discoverer 2.2 软件中得到的二级质谱图信息（图 7），经对比确定相应子离子（1254.6 和 462.2），再通过优化子离子的碰撞电压，确定特异肽段的最优质谱条件。其余特异肽段均采用本方法优化，最终确定其质谱条件，具体见表 2。

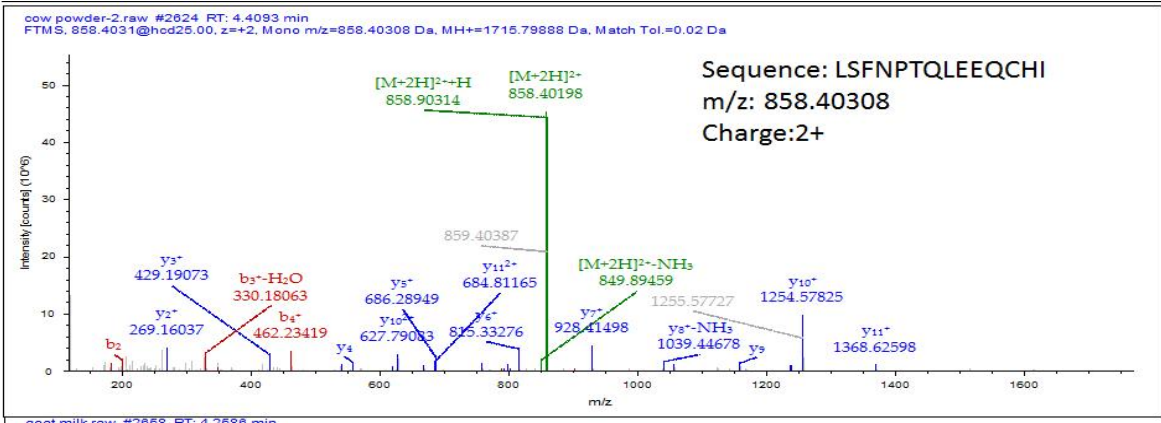


图 7 牛β-乳球蛋白特异肽段的二级质谱图

表 2 牛羊特异肽段质谱参数

| 化合物名称          | 母离子(m/z)<br>[M+2H] <sup>2+</sup> | 子离子<br>(m/z) | 碰撞能量(eV) |
|----------------|----------------------------------|--------------|----------|
| 牛α-乳白蛋白特异肽段    | 355.8                            | 322.4*       | 15       |
| CEVFR          |                                  | 174.9        | 18       |
| 牛α-乳白蛋白同位素特异肽段 | 363.9                            | 332.4*       | 15       |

|                  |       |        |    |
|------------------|-------|--------|----|
| CEV*F*R          |       | 174.9  | 18 |
| 牛β-乳球蛋白特异肽段      | 858.6 | 1254.6 | 27 |
| LSFNPTQLEEQCHI   |       | 462.2* | 26 |
| 牛β-乳球蛋白同位素特异肽段   | 865.7 | 1268.9 | 27 |
| LSFNPTQL*EEQCHI* |       | 462.2* | 26 |
| 羊α-乳白蛋白特异肽段      | 562.2 | 228.1  | 18 |
| NICNISCDK        |       | 509.2* | 15 |
| 羊β-乳球蛋白特异肽段      | 807.5 | 600.2* | 26 |
| LAFNPTQLEGQCHV   |       | 1168.4 | 27 |

### 3.3.8 牛源蛋白换算系数确认

乳清蛋白主要由α-乳白蛋白、β-乳球蛋白、血清白蛋白和免疫球蛋白等组成，对于用凝乳酶生产的乳清蛋白粉，还含有较高水平的酪蛋白糖巨肽，其为κ-酪蛋白经凝乳酶作用产生的含 64 个氨基酸残基的多肽。其中α-乳白蛋白和β-乳球蛋白是乳清蛋白的主要组成成分，约占总乳清蛋白含量的 75%左右，血清白蛋白和免疫球蛋白的含量相对于α-乳白蛋白和β-乳球蛋白则较低，而酪蛋白糖巨肽的含量则与生产工艺相关，最理想化的方法为将 5 种物质全部测定，然后加合即为总乳清蛋白的含量。然而，按测定 5 种物质计算的工作量巨大且也较为繁琐，不易于后期方法的推广与应用，因此探讨是否能测定其中主要的α-乳白蛋白和β-乳球蛋白，然后根据α-乳白蛋白和β-乳球蛋白占总乳清蛋白的比例计算总乳清蛋白的含量。

为验证上述理论，选取了三种类型的牛乳清蛋白粉：脱盐乳清粉，浓缩乳清蛋白粉和乳清蛋白粉（α-乳白蛋白粉），然后测定其中的α-乳白蛋白、β-乳球蛋白、牛血清白蛋白、免疫球蛋白和酪蛋白糖巨肽的含量，计算α-乳白蛋白和β-乳球蛋白占总乳清蛋白的比值，结果如表 3 所示，脱盐乳清粉中（α-乳白蛋白+β-乳球蛋白）/总乳清蛋白在 71.2~78.9%之间，其平均值为 76.0%，相对标准偏差为 3.5%；浓缩乳清蛋白粉中（α-乳白蛋白+β-乳球蛋白）/乳清蛋白在 72.3~78.8%之间，其平均值为 77.2%，相对标准偏差为 3.2%；乳清蛋白粉（α-乳白蛋白粉）中（α-乳白蛋白+β-乳球蛋白）/乳清蛋白在 78.9~82.5%之间，其平均值为 80.1%，相对标准偏差为 1.8%；各类乳清粉中（α-乳白蛋白+β-乳球蛋白）/乳清蛋白在 71.2~82.5%之间，其平均值为 77.5%，相对标准偏差为 3.6%，与文献值（75%）基本一致，即牛乳清蛋白含量=（α-乳白蛋白+β-乳球蛋白）/0.775。

表 3 牛乳清粉中折算系数计算

| 样品名称  | α-乳白蛋白<br>g/100g | β-乳球蛋白<br>g/100g | 免疫球蛋白<br>g/100g | 酪蛋白糖巨肽<br>g/100g | 血清白蛋白<br>g/100g | 总乳清蛋白<br>g/100g | (α-乳白蛋白+β-乳球蛋白)/乳清蛋白<br>% |
|-------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| 脱盐乳清粉 | 1.94             | 6.13             | 0.27            | 2.41             | 0.28            | 11.0            | 73.4                      |
|       | 2.26             | 6.98             | 0.56            | 2.12             | 0.34            | 12.3            | 75.1                      |
|       | 2.08             | 6.32             | 0.37            | 2.68             | 0.34            | 11.8            | 71.2                      |
|       | 1.97             | 6.73             | 0.35            | 2.33             | 0.29            | 11.7            | 74.4                      |
|       | 1.87             | 7.03             | 0.44            | 1.81             | 0.25            | 11.4            | 78.1                      |

|                                     |       |       |      |       |      |      |      |
|-------------------------------------|-------|-------|------|-------|------|------|------|
|                                     | 1.60  | 7.54  | 0.55 | 1.56  | 0.33 | 11.6 | 78.8 |
|                                     | 2.25  | 7.21  | 0.44 | 2.05  | 0.25 | 12.2 | 77.5 |
|                                     | 2.07  | 8.35  | 0.41 | 2.12  | 0.25 | 13.2 | 78.9 |
|                                     | 2.08  | 7.59  | 0.44 | 2.23  | 0.26 | 12.6 | 76.7 |
| 浓缩乳清<br>蛋白粉                         | 13.00 | 39.77 | 2.68 | 14.75 | 2.79 | 73.0 | 72.3 |
|                                     | 13.12 | 40.04 | 1.93 | 11.60 | 2.18 | 68.9 | 77.2 |
|                                     | 12.80 | 39.39 | 1.67 | 10.62 | 2.10 | 66.6 | 78.4 |
|                                     | 13.41 | 40.94 | 1.80 | 11.51 | 2.16 | 69.8 | 77.9 |
|                                     | 14.10 | 44.54 | 1.58 | 11.91 | 2.39 | 74.5 | 78.7 |
|                                     | 13.30 | 46.03 | 1.81 | 11.75 | 2.37 | 75.3 | 78.8 |
| 乳清蛋白<br>粉<br>( $\alpha$ -乳白<br>蛋白粉) | 39.94 | 18.40 | 0.08 | 15.22 | 0.13 | 73.8 | 79.1 |
|                                     | 44.30 | 20.51 | 0.14 | 15.44 | 0.22 | 80.6 | 80.4 |
|                                     | 43.23 | 18.30 | 0.05 | 16.31 | 0.08 | 78.0 | 78.9 |
|                                     | 42.07 | 20.54 | 0.05 | 15.70 | 0.11 | 78.5 | 79.8 |
|                                     | 48.50 | 24.11 | 0.07 | 15.14 | 0.15 | 88.0 | 82.5 |

### 3.4 实验室内方法学验证

#### 3.4.1 标准曲线

依次取不同体积的混合标准工作液于 2ml 塑料离心管中, 按建立方法进行酶解反应, 供液相色谱串联质谱分析, 计算结果绘制出标曲。结果如表 5 所示, 线性相关系数  $R^2$  均在 0.995 以上。

表 5 标准曲线及线性范围

| 名称               | 线性范围                | 线性方程                  | 相关系数 $R^2$ |
|------------------|---------------------|-----------------------|------------|
| 牛 $\alpha$ -乳白蛋白 | 0.6~6.0 $\mu$ g/mL  | $y=2.27596X-0.428203$ | 0.9982     |
| 牛 $\beta$ -乳球蛋白  | 1.8~18.0 $\mu$ g/mL | $y=2.03675X-0.885122$ | 0.9978     |

#### 3.4.1 准确度和精密度

通过对已知脱盐牛乳清粉添加量的脱盐羊乳清粉进行测定来评估准确度和精密度。添加量分别为 2.0%, 15.0%和 30.0%, 根据建立方法, 对每个样品进行测定, 每次测定平行 6 次实验, 连续重复三天实验, 结果如表 6 所示。由结果知, 在脱盐牛乳清粉添加量在 2.0%~30.0%的样品, 结果的准确度在 90.7%~105.0%之间, 完全满足准确定量的要求; 样品的日内精密度在 1.0%~3.7%, 日间精密度在 2.6%~3.2%之间。所有日内和日间精密度均在 10%之内。

表 6 样品的准确度和精密度

| 添加量<br>(%) | 天数   | 牛源乳清蛋白占比% |      |      |      |      |      | 日内相<br>对标准<br>偏差% | 日间相<br>对标准<br>偏差% | 结果准确<br>度% |
|------------|------|-----------|------|------|------|------|------|-------------------|-------------------|------------|
|            |      | 1         | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |                   |                   |            |
| 2.0        | DAY1 | 1.9       | 2.0  | 1.9  | 2.0  | 1.9  | 1.9  | 2.3               | 3.2               | 95.0~105.0 |
|            | DAY2 | 2.0       | 1.9  | 1.9  | 2.1  | 1.9  | 1.9  | 3.4               |                   |            |
|            | DAY3 | 2.0       | 1.9  | 2.0  | 2.1  | 2.0  | 1.9  | 3.7               |                   |            |
| 15.0       | DAY1 | 14.3      | 14.1 | 14.6 | 14.0 | 14.9 | 14.9 | 2.8               | 3.0               | 90.7~99.3  |

|      |      |      |      |      |      |      |      |     |     |            |
|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------------|
|      | DAY2 | 14.4 | 14.2 | 15.5 | 14.3 | 14.4 | 14.6 | 3.2 |     |            |
|      | DAY3 | 14.4 | 14.5 | 14.4 | 13.8 | 13.6 | 14.9 | 3.2 |     |            |
|      | DAY1 | 29.1 | 28.6 | 30.0 | 28.8 | 28.8 | 29.1 | 1.7 |     |            |
| 30.0 | DAY2 | 28.5 | 28.4 | 28.0 | 28.6 | 28.7 | 28.1 | 1.0 | 2.6 | 93.3~100.0 |
|      | DAY3 | 28.6 | 30.4 | 30.0 | 29.6 | 30.5 | 29.2 | 2.5 |     |            |

### 3.4.3 方法定量限 LOQ

按 GB/T 27417-2017 中 5.4.2.2 规定，对加入最低可接受浓度的样品空白独立测定 10 次，计算测定结果的标准偏差(s)，以 10s 作为定量限（LOQ）。由实验(表 7)可知， $\alpha$ -乳白蛋白的定量限为 5.0 mg/100g， $\beta$ -乳球蛋白的定量限为 10.0mg/100g，计算得牛乳清蛋白的定量限为 20.0mg/100g，按脱盐羊乳清粉的蛋白质含量为 14 g/100g 计算，则本方法牛源乳清蛋白的定量限为 0.14 %。

考虑脱盐羊乳清粉的传统生产工艺会使用牛源凝乳酶，以及各实验室配置的仪器水平有高低，建议方法的定量限设置为 1.0%，既能满足真伪鉴别的要求，又可避免因工艺中的微量带入而误判。

表 7 方法定量限

| $\alpha$ -乳白蛋白 | 平均值     | 标准偏差(s) | LOQ     | $\beta$ -乳球蛋白 | 平均值     | 标准偏差(s) | LOQ     |
|----------------|---------|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|
| mg/100g        | mg/100g | mg/100g | mg/100g | mg/100g       | mg/100g | mg/100g | mg/100g |
| 5.3            |         |         |         | 15.9          |         |         |         |
| 4.0            |         |         |         | 16.2          |         |         |         |
| 4.5            |         |         |         | 13.9          |         |         |         |
| 5.4            |         |         |         | 14.4          |         |         |         |
| 4.8            | 4.9     | 0.50    | 5.0     | 15.3          | 15.0    | 1.00    | 10.0    |
| 4.6            |         |         |         | 14.6          |         |         |         |
| 5.5            |         |         |         | 15.4          |         |         |         |
| 5.2            |         |         |         | 14.3          |         |         |         |
| 5.3            |         |         |         | 13.5          |         |         |         |
| 4.5            |         |         |         | 16.4          |         |         |         |

### 3.4.4 方法应用

总计收集脱盐羊乳清粉 39 个批次，合计 56 个样品，取样方式包括随机取样（每批次 1 个样品）和同批次不同阶段取样（前段、中段、末段）。然后按文本方法进行牛源乳清蛋白的测定，结果如表 8 所示，在 56 个样品中，有 3 个样品检出牛源乳清蛋白，分别是脱盐羊乳清粉 12，含量为 39.90%；脱盐羊乳清粉 10，含量为 7.84%和脱盐羊乳清粉 13，含量为 0.82%，其中脱盐羊乳清粉 12 和脱盐羊乳清粉 10 是同一批用于生产线清洗的前段和末端取样，而脱盐羊乳清粉 13 是下一批的清洗样，此结果与实际情况相符合。

表 8 脱盐羊乳清粉中牛源蛋白的含量

| 样品名称     | 样品类型 | 牛源蛋白占比 |
|----------|------|--------|
| 脱盐羊乳清粉 1 | D90  | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 2 | D90  | <0.14% |

|           |     |        |
|-----------|-----|--------|
| 脱盐羊乳清粉 3  | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 4  | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 5  | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 6  | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 7  | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 8  | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 9  | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 10 | D70 | 7.84%  |
| 脱盐羊乳清粉 11 | D70 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 12 | D70 | 39.90% |
| 脱盐羊乳清粉 13 | D70 | 0.82%  |
| 脱盐羊乳清粉 14 | D70 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 15 | D70 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 16 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 17 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 18 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 19 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 20 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 21 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 22 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 23 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 24 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 25 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 26 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 27 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 28 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 29 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 30 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 31 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 32 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 33 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 34 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 35 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 36 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 37 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 38 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 39 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 40 | D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 41 | D90 | <0.14% |

|           |        |        |
|-----------|--------|--------|
| 脱盐羊乳清粉 42 | D90    | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 43 | D90    | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 44 | D90    | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 45 | 山羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 46 | 山羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 47 | 山羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 48 | 绵羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 49 | 绵羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 50 | 绵羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 51 | 绵羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 52 | 绵羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 53 | 绵羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 54 | 绵羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 55 | 绵羊 D90 | <0.14% |
| 脱盐羊乳清粉 56 | 绵羊 D90 | <0.14% |

### 3.5 实验室间方法学验证

#### 3.5.1 线性

三家验证单位试验的线性方程和相关系数如表 9 所示，由表中数据可见，两种物质的线性相关系数  $R^2$  均  $>0.995$ ，符合要求。

表9 标准曲线及相关系数

| 验证单位名称       | 牛 $\alpha$ -乳白蛋白       |        | 牛 $\beta$ -乳球蛋白       |        |
|--------------|------------------------|--------|-----------------------|--------|
|              | 线性方程                   | $R^2$  | 线性方程                  | $R^2$  |
| 山东省食品药品检验研究院 | $Y=2.08945X-0.0493492$ | 0.9990 | $Y=1.55556X+0.106127$ | 0.9998 |
| 圣元营养食品有限公司   | $Y=2.05646X+0.0595762$ | 0.9996 | $Y=1.54992X+0.271034$ | 0.9975 |
| 伊利集团检测及校准实验室 | $Y=12.7592X-0.0613627$ | 0.9993 | $Y=10.0471X+1.17114$  | 0.9986 |

#### 3.5.2 精密度

各实验室对相同的含高、中、低牛乳蛋白的三个样品进行独立的测定，每个样品均平行测定 6 次，通过计算各实验室结果间的相对平均标准偏差来考查不同实验室间的方法精密度，结果如表 10 所示。三家实验室间的偏差为 1.1%~4.3%，完全满足  $<10\%$  的要求。

表 10 各实验室测定结果比对表

| 试验室名称               | 检测结果(%) |      |      |
|---------------------|---------|------|------|
|                     | 样品 1    | 样品 2 | 样品 3 |
| 山东省食品药品检验研究院        | 1.9     | 14.1 | 28.2 |
| 实验室内相对标准偏差 (RSD, %) | 1.1     | 1.0  | 1.0  |
| 圣元营养食品有限公司          | 2.0     | 14.2 | 29.7 |
| 实验室内相对标准偏差 (RSD, %) | 1.3     | 2.6  | 1.0  |
| 伊利集团检测及校准实验室        | 1.9     | 13.9 | 27.3 |
| 实验室内相对标准偏差 (RSD, %) | 2.6     | 2.1  | 2.7  |

|                 |      |      |      |
|-----------------|------|------|------|
| 平均值             | 1.9  | 14.1 | 28.4 |
| 标准偏差 (S)        | 0.06 | 0.15 | 1.21 |
| 相对标准偏差 (RSD, %) | 3.0  | 1.1  | 4.3  |

### 3.5.3 准确度

各实验室通过对已知牛乳含量的三个样品的测定,然后计算测定结果与理论含量的偏差来考查方法的准确度。各实验室的测定结果如表 11 所示。三家实验室的准确度在 91.0%~100.0%之间。

表 11 准确度实验

| 样品   | 理论含量 | 实验室          | 测定结果% | 准确度%  |
|------|------|--------------|-------|-------|
| 样品 1 | 2%   | 山东省食品药品检验研究院 | 1.9   | 95.0  |
|      |      | 圣元营养食品有限公司   | 2.0   | 100.0 |
|      |      | 伊利集团检测及校准实验室 | 1.9   | 95.0  |
| 样品 2 | 15%  | 山东省食品药品检验研究院 | 14.1  | 94.0  |
|      |      | 圣元营养食品有限公司   | 14.2  | 94.7  |
|      |      | 伊利集团检测及校准实验室 | 13.9  | 92.7  |
| 样品 3 | 30%  | 山东省食品药品检验研究院 | 28.2  | 94.0  |
|      |      | 圣元营养食品有限公司   | 29.7  | 99.0  |
|      |      | 伊利集团检测及校准实验室 | 27.3  | 91.0  |

### 3.5.4 定量限

取空白样品,加入牛 $\alpha$ -乳白蛋白和牛 $\beta$ -乳球蛋白的标准,使其含量分别为 25mg/100g 和 75mg/100g,然后按照方法文本中 5.1 和 5.2 处理,经高效液相色谱-串联质谱分析,计算各物质的信噪比,然后以 10 倍信噪比为定量限,结果如表 12 所示。三家实验室的定量限均满足方法文本中的要求。

表 12 实验室间定量限信噪比结果

| 实验室          | 蛋白名称           | 信噪比 1  | 信噪比 2  | 信噪比 3  | 定量限<br>mg/100g |
|--------------|----------------|--------|--------|--------|----------------|
| 山东省食品药品检验研究院 | $\alpha$ -乳白蛋白 | 216.7  | 257.9  | 205.7  | 1.2            |
|              | $\beta$ -乳球蛋白  | 571.0  | 538.7  | 548.9  | 1.4            |
| 圣元营养食品有限公司   | $\alpha$ -乳白蛋白 | 764.9  | 622.0  | 801.8  | 0.4            |
|              | $\beta$ -乳球蛋白  | 1413.8 | 1286.7 | 1756.2 | 0.6            |
| 伊利集团检测及校准实验室 | $\alpha$ -乳白蛋白 | 2575   | 2674   | 2417   | 0.1            |
|              | $\beta$ -乳球蛋白  | 4585   | 6745   | 4851   | 0.2            |

注:定量限以 3 个信噪比中最小值计算

### 3.5.5 结论

经开发的用于羊乳清粉中牛源蛋白测定的方法,线性相关系数均在 0.995 以上,日内精密度为 1.0%~3.6%,日间精密度为 2.6%~3.2%,准确度为 90.7%~105.0%,牛 $\alpha$ -乳白蛋白与牛 $\beta$ -乳球蛋白的定量限均满足方法文本中要求,若以脱盐乳清粉蛋白质 14 g/100g 计算,牛源蛋白的定量限为 0.14%。

经山东省食品药品检验研究院、圣元营养食品有限公司、伊利集团检测及校准实验室的验证,在给定的线性范围内,线性相关系数均在 0.995 以上;方法的精密度在 1.1%~4.3%;方法准确度 91.0%~100.0%;

三家实验室均满足脱盐羊乳清粉蛋白质以 14 g/100g 计，牛源乳清蛋白定量限为 0.14%的要求。

#### 四、其他需要说明的事项

无

