

T/CNHFA

团 体 标 准



T/CNHFA 232—2025

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

2025 - 12 - 30 发布

2026 - 01 - 30 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。

本文件由索地雅乳业商贸（上海）有限公司提出。

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。

本文件主要起草人：王娜、胡玲玲、赖世云、任一平。

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中掺杂牛源乳清蛋白的测定，不适用于水解或酶解脱盐羊乳清粉中牛源乳清蛋白的测定。

2 方法原理

试样中的蛋白质经溶解后，加入 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白同位素标记的特异肽段，用碱性胰蛋白酶将乳清蛋白酶解成特异肽段，酶解液经液相色谱分离，串联质谱法检测牛源的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白特异肽段，内标法定量，计算获得试样中牛源的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的含量；根据 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白与乳清蛋白的换算系数，计算获得牛源乳清蛋白的含量。

3 试剂与材料

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：酶活力大于 10000 活力单位每毫克蛋白质。

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，用水溶解后稀释至 100 mL，混匀。

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稀释至 10 mL，混匀。

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稀释至 10 mL，混匀。

3.2.4 乙酸溶液（1%，体积分数）：移取 0.1 mL 乙酸，用水稀释至 10 mL，混匀。

3.2.5 胰蛋白酶溶液（1 mg/mL）：称取 10 mg 碱性胰蛋白酶，用 1% 乙酸溶液溶解后稀释至 10 mL，混匀。分装后于 -20℃ 下保存，有效期 6 个月。

3.2.6 甲酸水溶液（0.1%，体积分数）：吸取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL，混匀。

3.2.7 甲酸乙腈溶液（0.1%，体积分数）：吸取 1 mL 甲酸，用乙腈稀释至 1000 mL，混匀。

3.3 标准品

3.3.1 牛源 α -乳白蛋白标准品（CAS 号：9051-29-0）：来源于牛奶，纯度 \geq 95%，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，有效期见分析证书。

3.3.2 牛源 β -乳球蛋白标准品（CAS 号：9045-23-2）：来源于牛奶，纯度 \geq 95%，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，有效期见分析证书。

3.3.3 牛 α -乳白蛋白特异肽段（CEVFR）：分子量 652.3 Da，纯度 \geq 95%，有效期见分析证书。

3.3.4 牛 β -乳球蛋白特异肽段（LSFNPTQLEECHI）：分子量 1658.2 Da，纯度 \geq 95%，有效期见分析证书。

3.3.5 牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段（CEV*F*R）：分子量 668.8 Da，纯度 \geq 95%，有效期见分析证书。

3.3.6 牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段（LSFNPTQL*EEQCHI*）：分子量 1672.4 Da，纯度 \geq 95%，有效期见分析证书。

3.3.7 羊 α -乳白蛋白特异肽段（NICNISC DK）：分子量 1009.2 Da，纯度 \geq 95%，有效期见分析证书。

3.3.8 羊 β -乳球蛋白特异肽段（LAFNPTQLEGQCHV）：分子量 1556.8 Da，纯度 \geq 95%，有效期见分析证书。

注 1：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- $^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N}$ ；F*为 Phe-OH- $^{13}\text{C}_9,^{15}\text{N}$ ；L*为 Leu-OH- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ ；I*为 Ile-OH- $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}$ 。

注 2：3.3.7 和 3.3.8 的羊源特异肽段仅供在质谱测定时，作为羊源乳清蛋白判断使用。参见附录图 A.3。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 牛源 α -乳白蛋白标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取牛源 α -乳白蛋白标准粉末 10 mg（纯度需折算，准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL，混匀。将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于 -20℃ 保存，有效期 6 个月。

3.4.2 牛 α -乳白蛋白同位素标记内标储备溶液（500 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段粉末 5 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL，混匀。将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于 -20℃ 保存，有效期 6 个月。

3.4.3 牛源 β -乳球蛋白标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取牛源 β -乳球蛋白标准粉末 10

mg（纯度需折算，准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL，混匀。将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.4 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 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL，混匀。将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.5 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 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL，混匀。将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.6 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 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL，混匀。将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.7 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 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL，混匀。将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.8 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 mg（准确至 0.01 mg），用水溶解后定容至 10 mL，混匀。将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.9 蛋白标准中间混合溶液（牛源 α -乳白蛋白 30 $\mu\text{g/mL}$ ，牛源 β -乳球蛋白 90 $\mu\text{g/mL}$ ）：分别准确吸取 300 μL 牛源 α -乳白蛋白标准储备液和 900 μL 牛源 β -乳球蛋白标准储备液，用水稀释并定容至 10 mL，混匀，将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 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，混匀，将溶液转移至聚丙烯材质塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 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（3.4.9）0 μL 、20 μL 、50 μL 、75 μL 、100 μL 、150 μL 、200 μL ，再分别加入 200 μL 、180 μL 、150 μL 、125 μL 、100 μL 、50 μL 、0 μL 的水，每个浓度点加入 50 μL 的同位素标记内标中间混合溶液（3.4.10），按照 5.2 与试样同时进行烷基化与酶解（最后加水体积 490 μL ，使总体积为 1 mL），得到牛源 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 $\mu\text{g/mL}$ ；牛源 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 18.00 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作溶液。使用前配制。

3.5 材料

3.5.1 10 mL 聚丙烯材质塑料瓶。

3.5.2 微孔滤膜：0.22 μm 。

3.5.3 一次性注射器：5 mL。

3.5.4 2 mL 聚丙烯材质塑料离心管。

3.5.4 2 mL 聚丙烯材质塑料进样瓶。

4 仪器与设备

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。

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 恒温水浴锅。

4.6 震动恒温金属浴：温度显示精度 $\leq 0.1^{\circ}\text{C}$ 。

4.7 微量移液器：1~10 μL 、10~100 μL 、100~1000 μL 。

5 分析步骤

5.1 试样制备与保存

取有代表性的样品至少 100 g，储存于密封容器中作为试样，常温下干燥保存，备用。

5.2 试样提取

称取试样 1 g（精确至 0.001 g）于 50 mL 烧杯中，用 20 mL 水分 2 次将试样溶解，转移到 25 mL 容量瓶中，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 聚丙烯材质塑料离心管中，加入 50 μL 同位素标记内标中间混合溶液，待烷基化与酶解。

5.3 烷基化与酶解

向上述样液中加入 200 μL 碳酸氢铵溶液、调整 pH 值至 8.0 ± 0.5 ，加入 10 μL 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 70°C 下恒温水浴 30 min；冷却至室温，加入 20 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°C 恒温水浴中酶解 3 小时。加入 10 μL 甲酸混匀，室温下静置 15 min，再加入 590 μL 水，涡旋混匀，用 0.22 μm 滤膜过滤至 2 mL 聚丙烯材质塑料进样瓶中，供高效液相色谱-串联质谱仪检测。

5.4 仪器参考条件

5.4.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：硅烷基 C_{18} 柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.8 μm ，孔径 30 nm（300 Å）或等效者；

- b) 流动相 A: 0.1%甲酸水溶液; 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈溶液;
- c) 梯度洗脱: 参考洗脱梯度参见表 1;
- d) 流速: 0.3 mL/min;
- e) 柱温: 40 °C。
- f) 进样体积: 5 μ L。

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

5.4.2 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 V;
- 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	单电荷母离子 (m/z)	双电荷母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
牛 α -乳白蛋白特异肽段	710.6	355.8	322.4*	15
			174.9	18
牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段	726.8	363.9	332.4*	15
			174.9	18
牛 β -乳球蛋白特异肽段	1716.2	858.6	1254.6	27
			462.2*	26
牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段	1730.4	865.7	1268.9	27
			462.2*	26
羊 α -乳白蛋白特异肽段	1123.4	562.2	509.2	15
			228.1*	18
羊 β -乳球蛋白特异肽段	1614.0	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；优化质谱参数用肽段需烷基化处理。

5.5 标准曲线的制作

将系列标准工作溶液（3.4.11）的酶解液依次注入高效液相色谱-串联质谱仪，测定相应蛋白的特征肽段峰面积，液相色谱串联质谱 MRM 图见附录 A.1。以 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准系列工作溶液的浓度为横坐标，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.4。

5.6 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源 α -乳白蛋白和牛源 β -乳球蛋白的浓度，样品的液相色谱串联质谱 MRM 图见附录 A.2。

5.7 空白试验

移取 150 μL 水，按 5.3 步骤做空白试验，空白试验溶液的液相色谱串联质谱 MRM 图中应不含有干扰待测组分的物质。

5.8 蛋白质测定

样品中蛋白质的测定参照《GB 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》执行。

6 分析结果的表述

6.1 牛源 α -乳白蛋白及 β -乳球蛋白测定结果计算

试样中牛源 α -乳白蛋白及 β -乳球蛋白的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times 10}{m \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中牛源 α -乳白蛋白，或 β -乳球蛋白的含量，单位为毫克每百克（ $\text{mg}/100\text{g}$ ）；

ρ ——根据标准曲线计算得到的试样酶解液中牛源 α -乳白蛋白，或 β -乳球蛋白的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）；

V ——试样的定容体积，单位为毫升（ mL ）；

10——试样溶液酶解过程的稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（ g ）；

1000——微克（ μg ）换算成毫克（ mg ）；

100——毫克每克（ mg/g ）换算成毫克每百克（ $\text{mg}/100\text{g}$ ）

6.2 牛源乳清蛋白含量的计算

试样中牛源乳清蛋白的含量按式（2）计算：

$$X_w = \frac{X_\alpha + X_\beta}{0.76} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

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

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 α-乳白蛋白的检出限为 1.5 mg/100g，定量限为 5 mg/100g；牛源 β-乳球蛋白的检出限为 3 mg/100g，定量限为 10 mg/100g。

附 录 A

(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液相色谱串联质谱 MRM 图

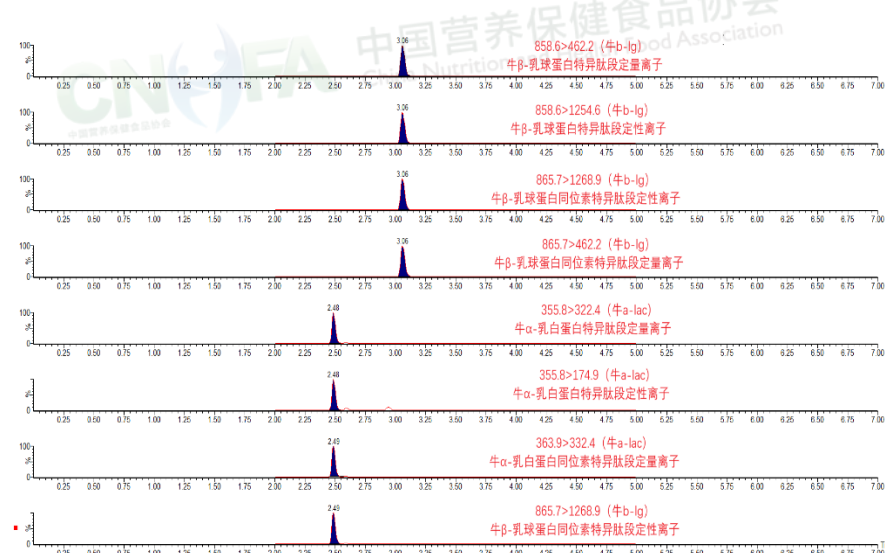


图 A.1 牛源 α -乳白蛋白 (6.0 μ g/mL)、 β -乳球蛋白 (18.0 μ g/mL) 特异肽标准溶液的液相色谱串联质谱 MRM 图

图 A.2 脱盐羊乳清粉阳性样品的液相色谱串联质谱 MRM 图

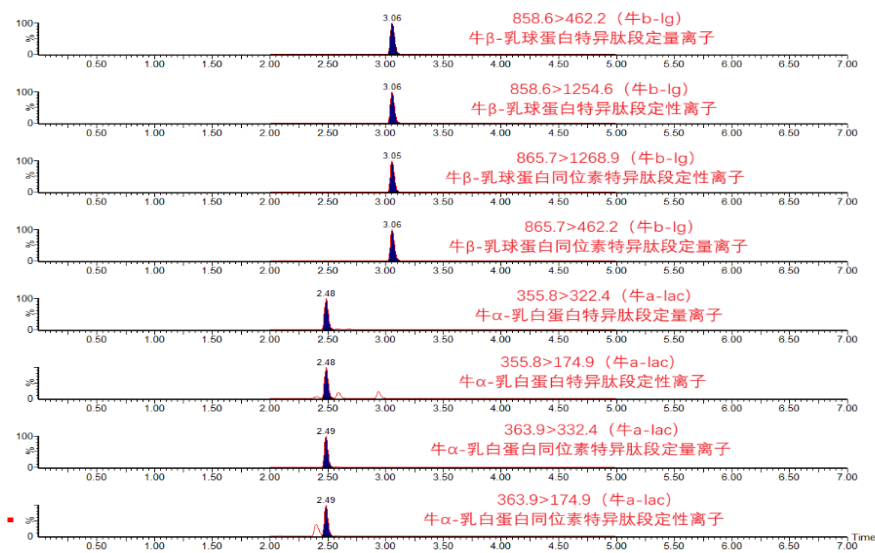


图 A.2 脱盐羊乳清粉阳性样品的液相色谱串联质谱 MRM 图

图 A.3 脱盐羊乳清粉阳性样品的液相色谱串联质谱 MRM 图（用于定性鉴别）

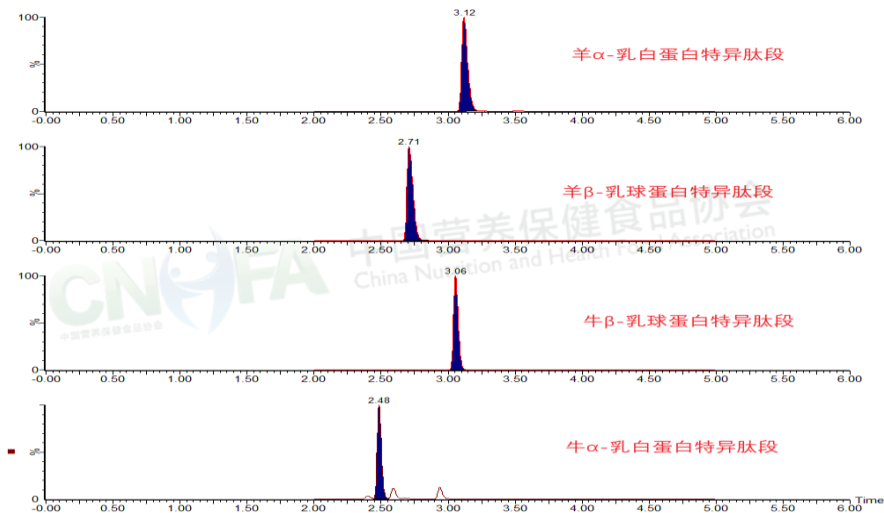


图 A.3 脱盐羊乳清粉阳性样品的液相色谱串联质谱 MRM 图（用于定性鉴别）

图 A.4 牛 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白标准曲线图

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

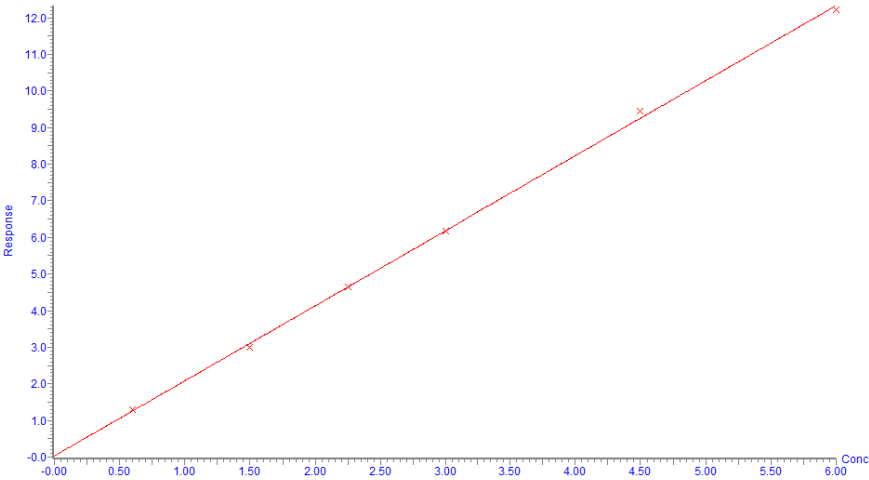


图 A.4.1 牛源 α -乳白蛋白标准曲线图

Compound name: B-b-lg
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

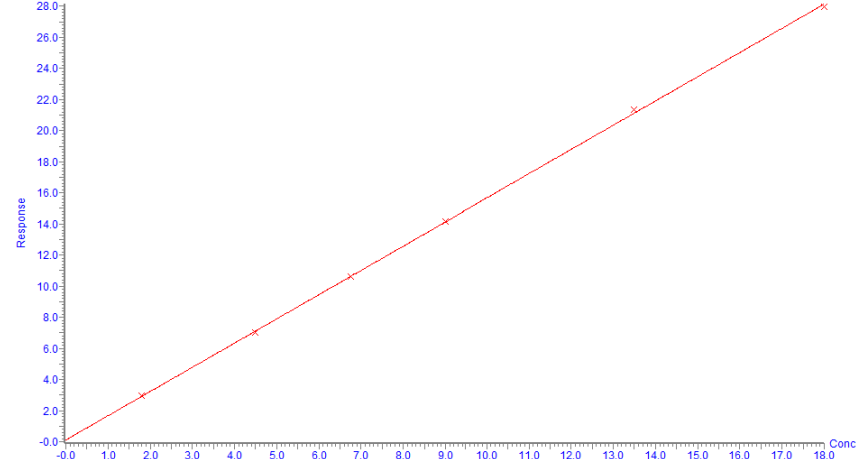


图 A.4.2 牛源 β -乳球蛋白标准曲线图

附录 B

(规范性)

附录 B.1 蛋白质测定结果计算

试样中蛋白质的含量由公式 (3) 计算获得。

$$X_p = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 0.0140 \times 100}{m \times V_3} \times 6.38 \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- X_p ——试样中蛋白质的含量，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 ——硫酸或盐酸标准溶液浓度，单位为摩尔每升 (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)

附录 B.2 牛源乳清蛋白占蛋白质比率的计算

试样中牛源乳清蛋白占蛋白质的比率由公式 (4) 计算得。

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

式中：

- R ——试样中牛源乳清蛋白占蛋白质的比率，%；
 X_w ——试样中牛源乳清蛋白的含量，单位为克每百克 (mg/100g)；
 X_p ——试样中蛋白质的含量，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。

计算结果保留至小数点第一位。

附录 B.3 结果表述

根据附录 B.2 计算获得的牛源乳清蛋白占蛋白质比率 $\leq 1\%$ 时，表述为未检出；牛源乳清蛋白占蛋白质比率 $> 1\%$ 时，按具体数值出具测定结果。