

ICS 67.050  
CCS X04

**T/CNHFA**

**团 体 标 准**



中国营养保健食品协会  
China Nutrition and Health Food Association

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  $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -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  $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白特异肽段，内标法定量，计算获得试样中牛源的  $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白的含量；根据  $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -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 ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )。

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 ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )。

3.1.5 甲酸 ( $\text{HCOOH}$ )：色谱纯。

3.1.6 乙腈 ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )：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°C 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  $\alpha$ -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  $\beta$ -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  $\alpha$ -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  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段 (LSFNPTQLEEQCHI) : 分子量 1658.2 Da, 纯度  $\geq 95\%$ , 有效期见分析证书。

3.3.5 牛  $\alpha$ -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  $\beta$ -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  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段 (NICNISCDK) : 分子量 1009.2 Da, 纯度  $\geq 95\%$ , 有效期见分析证书。

3.3.8 羊  $\beta$ -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  $\alpha$ -乳白蛋白标准储备溶液 (1 mg/mL) : 准确称取牛源  $\alpha$ -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 °C 保存, 有效期 6 个月。

3.4.2 牛  $\alpha$ -乳白蛋白同位素标记内标储备溶液 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) : 准确称取牛  $\alpha$ -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 °C 保存, 有效期 6 个月。

3.4.3 牛源  $\beta$ -乳球蛋白标准储备溶液 (1 mg/mL) : 准确称取牛源  $\beta$ -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  $\beta$ -乳球蛋白同位素标记内标储备溶液 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) : 准确称取牛  $\beta$ -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  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段储备溶液 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) : 准确称取牛  $\alpha$ -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  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段储备溶液 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) : 准确称取牛  $\beta$ -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  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段储备溶液 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) : 准确称取羊  $\alpha$ -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  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段储备溶液 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) : 准确称取羊  $\beta$ -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  $\alpha$ -乳白蛋白 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 牛源  $\beta$ -乳球蛋白 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) : 分别准确吸取 300  $\mu\text{L}$  牛源  $\alpha$ -乳白蛋白标准储备液和 900  $\mu\text{L}$  牛源  $\beta$ -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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) : 分别准确吸取 40  $\mu\text{L}$  牛  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -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  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、75  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、150  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ , 再分别加入 200  $\mu\text{L}$ 、180  $\mu\text{L}$ 、150  $\mu\text{L}$ 、125  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、0  $\mu\text{L}$  的水, 每个浓度点加入 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ , 使总体积为 1 mL), 得到牛源  $\alpha$ -乳白蛋白的浓度分别为 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 6.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 牛源  $\beta$ -乳球蛋白的浓度分别为 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、9.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、13.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 18.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{m}$ 。

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≤0.1℃。

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  $8.0 \pm 0.5$ , 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<sub>18</sub> 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 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

#### 5.4.2 质谱参考条件

a) 电喷雾模式: ESI<sup>+</sup>;  
 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  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -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  $\alpha$ -乳白蛋白和牛源  $\beta$ -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 空自试验

移取 150  $\mu$ L 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 $\alpha$ -乳白蛋白及 $\beta$ -乳球蛋白测定结果计算

试样中牛源  $\alpha$ -乳白蛋白及  $\beta$ -乳球蛋白的含量按式 (1) 计算:

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

式中：

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

$\rho$ ——根据标准曲线计算得到的试样酶解液中牛源  $\alpha$ -乳白蛋白, 或  $\beta$ -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);

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 ( $\mu\text{g}$ ) 换算成毫克

100——毫克每克 (mg/g) 换算成毫克每

### 3.3 乳清蛋白含量的计算

### 3.2 了解并消除云部署的计划

试作一个冰制的清蛋白的管型模子 (2) 计算。

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

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);

$X_a$ —试样中牛源  $\alpha$ -乳白蛋白的含量, 单位为毫克每百克 (mg/100g);

$X_{\beta}$ —试样中牛源  $\beta$ -乳球蛋白的含量, 单位为毫克每百克 (mg/100g);

0.76——将试样源牛  $\alpha$ -乳白蛋白与  $\beta$ -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  $\alpha$ -乳白蛋白的检出限为 1.5 mg/100g, 定量限为 5 mg/100g; 牛源  $\beta$ -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)

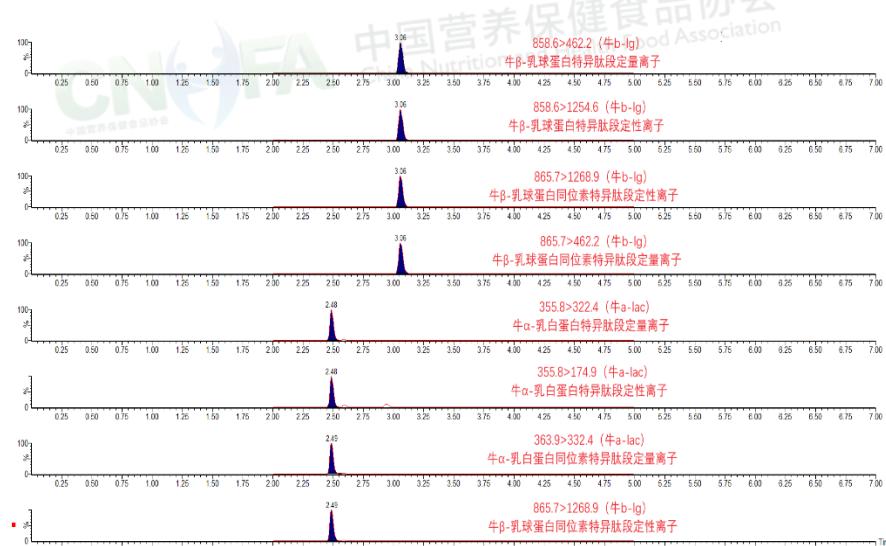
图 A.1 牛  $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白特异肽标准溶液的液相色谱串联质谱 MRM 图图 A.1 牛源  $\alpha$ -乳白蛋白 (6.0 $\mu$ g/mL)、 $\beta$ -乳球蛋白 (18.0 $\mu$ g/mL) 特异肽标准溶液的液相色谱串联质谱 MRM 图

图 A.2 脱盐羊乳清粉阳性样品的液相色谱串联质谱 MRM 图

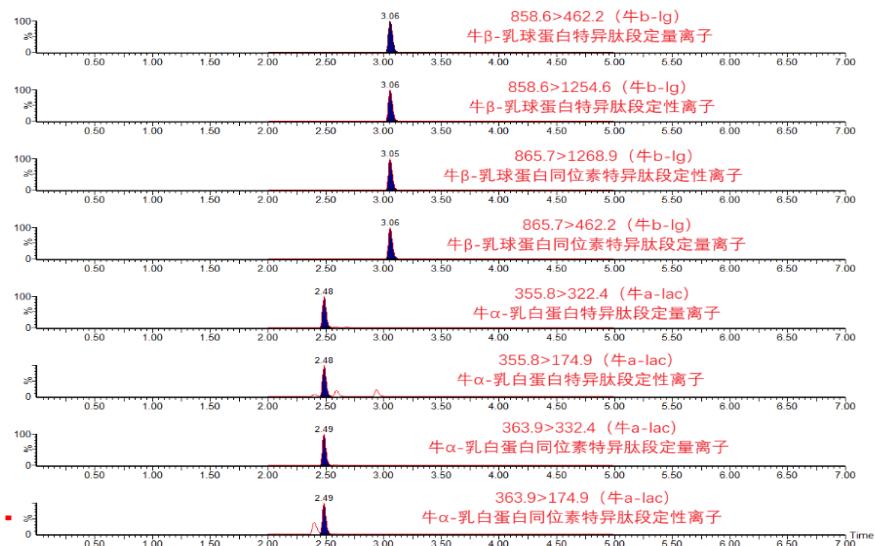


图 A.2 脱盐羊乳清粉阳性样品的液相色谱串联质谱 MRM 图

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)

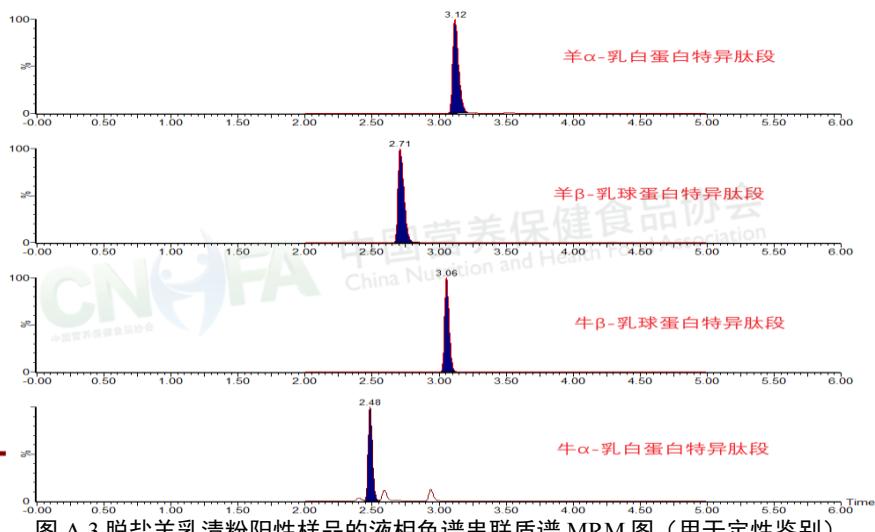


图 A.3 脱盐羊乳清粉阳性样品的液相色谱串联质谱 MRM 图 (用于定性鉴别)

图 A.4 牛 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白标准曲线图

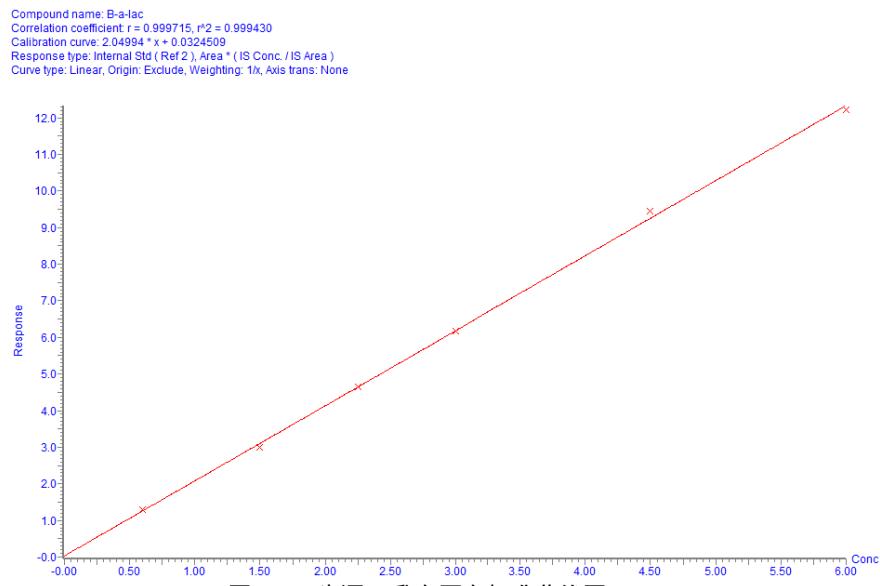


图 A.4.1 牛源 α-乳白蛋白标准曲线图

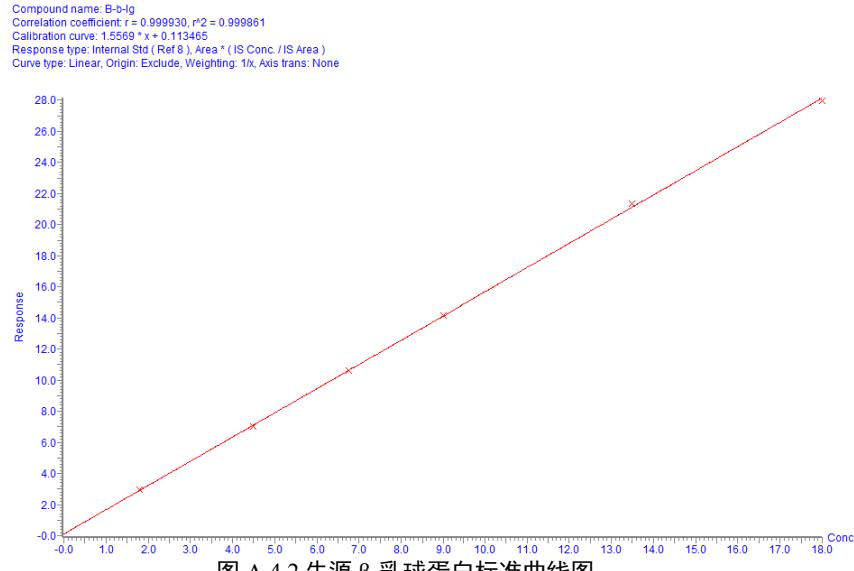


图 A.4.2 牛源 β-乳球蛋白标准曲线图

## 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。

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

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。

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

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。