

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/CNHFA

团体标准



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

T/CNHFA XXXX—XXXX

婴幼儿配方食品、乳清粉和乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白与 β -乳球蛋白的测定 液相色谱 质谱/质谱法

Determination of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in Infant formula, whey powder and whey protein powder by LC MS/MS

征求意见稿

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：*****、*****。

本文件主要起草人：***、***、***、***

本文件验证单位：

本文件主要验证人：

婴幼儿配方食品、乳清粉及乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定

液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件规定了婴幼儿配方食品、乳清粉及乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定方法。

本文件适用于婴幼儿配方食品、乳清粉及乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量测定，不适用于经水解或酶解的乳清粉和乳清蛋白粉及添加经水解或酶解的乳清粉、乳清蛋白粉的婴幼儿配方食品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定。

2 方法原理

试样中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白在一定条件下依次经烷基化、碱性胰蛋白酶酶解，分别被定量酶切为 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的特征肽段，再在酶解液中定量加入同位素标记的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段，经液相色谱分离，质谱/质谱检测。将 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白系列标准溶液与试样同步进行烷基化和酶解处理，并定量加入同位素标记的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段，制成 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白系列工作曲线，内标法定量。

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 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 氯化钙 (CaCl_2)。
- 3.1.6 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。
- 3.1.7 乙腈 (CH_3CN)：色谱纯。

3.1.8 碱性胰蛋白酶：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。

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。

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。

3.2.4 乙酸溶液（1%，V/V）：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（0.5 mg/mL）：称取 5 mg 碱性胰蛋白酶，用 1%乙酸溶液溶解后稀释至 10 mL。分装后置 -20℃冰箱保存，有效期 6 个月。

3.2.6 氯化钙溶液（500 mmol/L）：称取 0.555 g 氯化钙，用水溶解后稀释至 10 mL。

3.2.7 甲酸水溶液（0.1%，V/V）：吸取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL，混匀。

3.2.8 甲酸乙腈溶液（0.1%，V/V）：吸取 1 mL 甲酸，用乙腈稀释至 1000 mL，混匀。

3.3 标准品

3.3.1 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。

3.3.2 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。

3.3.3 α -乳白蛋白特征肽段（VGINYWLAHK）：分子量 1200.24 Da，纯度 \geq 95%。

3.3.4 β -乳球蛋白特征肽段（IDALNENK）：分子量 915.58 Da，纯度 \geq 95%。

3.3.5 同位素标记的 α -乳白蛋白特征肽段（VGI*NYWL*AHK）：分子量 1214.24Da，纯度 \geq 95%。

3.3.6 同位素标记的 β -乳球蛋白特征肽段（I*DAL*NENK）：分子量 929.58 Da，纯度 \geq 95%。

注：1. 3.3.3 α -乳白蛋白特征肽段和 3.3.4 β -乳球蛋白特征肽段仅供优化质谱参数和定性判别时使用。

2. 3.3.5 和 3.3.6 肽段序列中注有*的氨基酸为同位素标记氨基酸，L*为 Leu-OH- $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N ；I*为 Ile-OH- $^{13}\text{C}_6$, ^{15}N 。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 α -乳白蛋白标准储备溶液（1 mg/mL）：称取 α -乳白蛋白标准品 10.00 mg~11.76 mg（按照纯度折算，精确至 0.01 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料瓶中，于-20℃保存，有效期 6 个月。

3.4.2 β -乳球蛋白标准储备溶液（1 mg/mL）：称取 β -乳球蛋白标准品 10.00 mg~11.76 mg（按照纯度折算，精确至 0.01 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.3 α -乳白蛋白特征肽段储备溶液（500 μ g/mL）：取 α -乳白蛋白特征肽段粉末 5.00 mg（精确至 0.01 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.4 β -乳球蛋白特征肽段储备溶液（500 μ g/mL）：称取 β -乳球蛋白特征肽段标准品 5.00 mg（精确至 0.01 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.5 同位素标记的 α -乳白蛋白特征肽段固体储备溶液（500 μ g/mL）：称取同位素标记的 α -乳白蛋白特征肽段标准品 5.00 mg（精确至 0.01 mg），用水溶解后混匀，并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.6 同位素标记的 β -乳球蛋白特征肽段储备溶液（500 μ g/mL）：称取同位素标记的 β -乳球蛋白特征肽段固体 5.00 mg（精确至 0.01 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料瓶中，于-20 °C保存，有效期 6 个月。

3.4.7 蛋白标准中间混合溶液（ α -乳白蛋白 150 μ g/mL， β -乳球蛋白 450 μ g/mL）：分别准确吸取 1.5 mL α -乳白蛋白标准储备液和 4.5 mL β -乳球蛋白标准储备液，用水稀释并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料管中，于-20 °C保存，有效期 3 个月。

3.4.8 同位素标记的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段混合溶液（2 μ g/mL）：分别准确吸取 40 μ L 同位素标记的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段储备液，用水稀释并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料管中，于-20 °C保存，有效期 3 个月。

3.4.9 系列标准工作溶液：准确吸取蛋白标准中间混合溶液 0 μ L、20 μ L、50 μ L、75 μ L、100 μ L、150 μ L、200 μ L，然后用水定容至 1.0 mL，按照 5.3 与试样同时进行烷基化与酶解。所得系列标准工作溶液的浓度： α -乳白蛋白为 0 μ g/mL、3.00 μ g/mL、7.50 μ g/mL、11.25 μ g/mL、15.00 μ g/mL、22.50 μ g/mL 和 30.00 μ g/mL； β -乳球蛋白为 0 μ g/mL、9.00 μ g/mL、22.50 μ g/mL、33.75 μ g/mL、45.00 μ g/mL、67.50 μ g/mL 和 90.00 μ g/mL。

4 材料和设备

4.1 材料

4.1.1 2 mL 聚丙烯材质塑料离心管

4.1.2 一次性注射器：5 mL（带 0.22 μm 微孔滤头）

4.1.3 2 mL 聚丙烯材质塑料进样瓶

4.2 设备

4.2.1 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）。

4.2.2 天平：感量 0.01 g；0.1 mg；0.01 mg。

4.2.3 涡旋混合器：振荡转速不低于 2400 转/分钟。

4.2.4 超声波振荡器。

4.2.5 恒温水浴锅。

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

4.2.7 微量移液器：1~10 μL 、10~100 μL 、20~200 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 200g，液态样品摇匀后储存于容器中作为试样，于 0°C ~ 4°C 冰箱中保存，备用；固态样品混匀后储存于容器中作为试样，常温下干燥保存，备用。

5.2 试样提取

婴幼儿配方食品：称取固体试样约 0.1 g 或液体试样约 1.0 g（精确至 0.1 mg）于 50 mL 烧杯中，用水充分溶解后（固体试样可先用 40°C ~ 45°C 温水溶解），转移至 100 mL 容量瓶，用水定容至刻度，摇匀后待烷基化与酶解。

乳清粉：称取试样约 0.1 g（精确至 0.1 mg）于 100 mL 烧杯中，用 40°C ~ 45°C 温水溶解后，转移至 250 mL 容量瓶，用水定容至刻度，摇匀后待烷基化与酶解。

乳清蛋白粉：称取试样约 0.1 g（精确至 0.1 mg）于 50 mL 烧杯中，用 40°C ~ 45°C 温水溶解后，转移至 100 mL 容量瓶，用水定容至刻度，摇匀后移取液体 1.0 mL 至 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度并混匀，待烷基化与酶解。

5.3 烷基化与酶解

准确移取 200 μL 上述标准溶液和试样溶液于 2 mL 聚丙烯材质的塑料离心管中，加入 200 μL 碳酸氢铵溶液和 10 μL 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 70°C 下恒温反应 30 min；恢复

至室温，加入 30 μL 碘代乙酰胺溶液，混匀后于暗处静置 30 min；反应完成后加入 10 μL 氯化钙溶液和 10 μL 胰蛋白酶溶液，充分混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温酶解 5 小时。酶解完成后，加入 10 μL 甲酸终止反应，混匀后置于室温下静置 15 min，然后加入 50 μL 同位素标记特征肽段混合溶液（3.4.8）、480 μL 水混匀（总体积为 1 mL）。过 0.22 μm 滤膜于聚丙烯材质塑料进样瓶中，供液相色谱-质谱/质谱仪检测。

注：高含量样品可再稀释再取样，记录额外稀释倍数 F；加入同位素标记特征肽段溶液是用于校准质谱带来的基质效应。

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 12 nm（120 \AA ）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 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 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
初始	95	5
0.8	95	5
1.2	90	10
2.5	83	17
2.6	77	23
3.8	77	23
4.0	0	100
4.8	0	100
5.0	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：多反应离子监测（MRM）模式；
- 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 各肽段质谱参数

名称	母离子(m/z) [M+2H] ²⁺	锥孔电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
α-乳白蛋白特征肽段	601.1	35	654.4*	24
			284.4	28
α-乳白蛋白同位素特征肽段	608.1	35	661.4*	24
			284.3	26
β-乳球蛋白特征肽段	458.8	30	229.1*	30
			688.4	27
β-乳球蛋白同位素特征肽段	465.8	30	236.1*	30
			695.4	27

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。

5.5 标准工作曲线的制作

将按烷基化和酶解（5.3）处理后的标准系列工作溶液（3.4.9）依次注入液相色谱-质谱/质谱仪，测定相应的峰面积。以标准系列的相应α-乳白蛋白和β-乳球蛋白的浓度为横坐标，各浓度点中特征肽段与对应同位素特征肽段的峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线。标准溶液的谱图见图 A.1。

5.6 试液的测定

将试样烷基化和酶解的溶液注入液相色谱-质谱/质谱，测得相应目标化合物的峰面积，根据标准曲线分别计算得到待测试样进样前溶液中α-乳白蛋白和β-乳球蛋白的浓度。

5.7 空白试验

不称取试样，按 5.1 的分析步骤操作，应不含有干扰待测组分的物质。

5.8 定性判定

试样中α-乳白蛋白和β-乳球蛋白质量色谱峰的保留时间与标准工作溶液中相应的标准质量色谱峰的保留时间相比较，偏差应在±2.5%之内。所有定性离子均出现（S/N ≥ 3），且检测到的离子相对丰度应当与浓度相当的标准工作溶液相对丰度一致，其允许偏差不超过表3规定的范围。

表3 定性时相对离子比率的最大允许偏差

相对离子比率（%）	>50%	20%~50%	10%~20%	≤10%
允许相对偏差（%）	±20%	±25%	±30%	±50%

6 分析结果的表述

6.1 结果计算

试样中 α -乳白蛋白或 β -乳球蛋白的含量按式 (1) 计算:

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

式中:

X ——试样中 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 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);

F ——试样额外稀释倍数;

m ——试样质量, 单位为克 (g);

注: 计算结果保留至小数点第一位。

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

当固体试样取样量为 0.1 g 时, α -乳白蛋白的检出限为 6 mg/100g, 定量限为 20 mg/100g; β -乳球蛋白的检出限为 8 mg/100g, 定量限为 25 mg/100g。

当液体试样取样量为 1.0 g 时, α -乳白蛋白的检出限为 0.6 mg/100g, 定量限为 2.0 mg/100g; β -乳球蛋白的检出限为 0.8 mg/100g, 定量限为 2.5 mg/100g。

附录 A

(资料性)

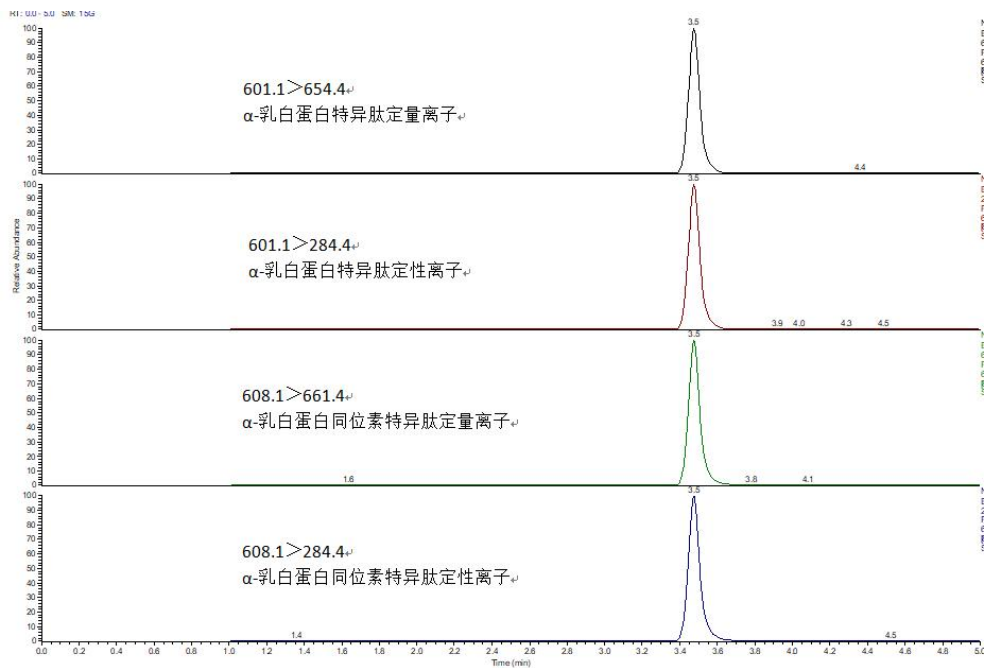
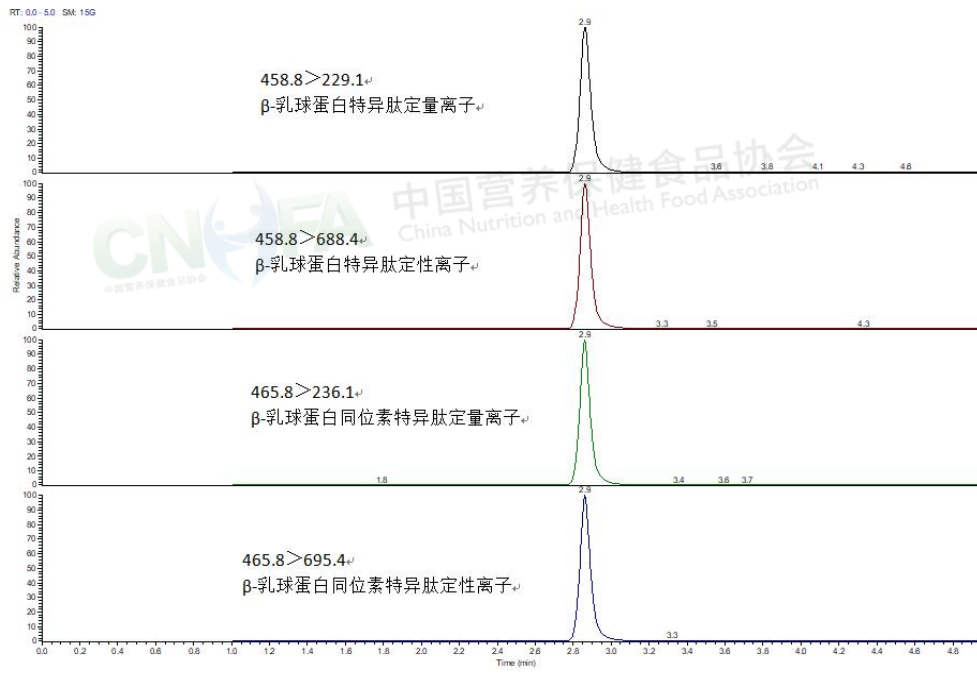
图 A.1 α -乳白蛋白特征肽段标准工作溶液的液相色谱-质谱/质谱图图 A.1 α -乳白蛋白(30.0 μ g/mL)特征肽段标准溶液的色谱质谱图

图 A.2 β -乳球蛋白特征肽段标准工作溶液的液相色谱-质谱/质谱图图 A.1 β -乳球蛋白(90.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)特征肽段标准溶液的色谱质谱图