

《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》编制说明（征求意见稿）

一、标准起草基本情况

《食品安全国家标准 婴儿配方食品（GB 10765-2021）》、《食品安全国家标准 较大婴儿配方食品（GB 10766-2021）》规定了乳清蛋白的含量，分别为 $\geq 60\%$ 和 $\geq 40\%$ 。《婴幼儿配方食品和乳粉 乳清蛋白的测定（GB 5413.2-1997）》采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法进行乳清蛋白测定，但该方法为半定量测定方法，难以测定乳清蛋白的准确含量。《食品安全国家标准 乳清粉和乳清蛋白粉（GB 11674—2010）》采用凯氏定氮法（GB 5009.5）测定乳清粉和乳清蛋白粉总蛋白含量，无法准确获得乳清蛋白的主要成分（ α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白）含量。

2007 年国家标准化管理委员会“关于下达 2007 年第 4 批国家标准制修订计划的通知（国标委计（2007）85 号）”中将“婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定——高效液相色谱—质谱联用法”列入了制定计划（项目编号为 20071157-T-469）。2010 年原卫生部食品安全综合协调与卫生监督局（现国家卫生健康委食品安全标准与监测评估司）委托国家乳制品质量监督检验中心牵头起草修订《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中乳清蛋白的测定（项目编号:spaq-2010-100）》。起草单位建立了乳清蛋白测定的液相色谱法和 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的液相色谱-串联质谱法，删除了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法。第二届食品安全国家标准审评委员会理化检验方法与规程专业委员会第十五次会议审评认为第一法通过分析丙氨酸/脯氨酸两种氨基酸在乳清蛋白、酪蛋白等在乳蛋白中的含量及差异，根据其比值测定乳清蛋白的含量，尚缺乏理论依据与数据支撑，乳清蛋白定量标准曲线无溯源结果，且乳清蛋白和酪蛋白引用的标准适用性有待评价；第二法 液相色谱-串联质谱法测定 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白具有技术可行性，但需要进一步明确测定的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白与乳清蛋白的关系。

在 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的液相色谱-串联质谱法研制的技术基础上，提出婴幼儿配方食品及乳品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定 液相色谱-质谱/质谱法，可以解决婴幼儿配方食品、乳清粉、乳清蛋白粉中乳清蛋白重要组成成分（ α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白）的测定，为婴幼儿配方食品、乳清粉、乳清蛋白粉中乳清蛋白的质量评价提供可靠的技术手段，为《食品安全国家标准 婴儿配方食品（GB 10765-2021）》、《食品安全国家标准 较大婴儿配方食品（GB 10766-2021）》的乳清蛋白质量评价提供有力技术支撑。

二、标准的主要技术内容

本标准适用于婴幼儿配方食品、乳清粉和乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定，包括牛乳基

和羊乳基。

本标准的原理是试样中的蛋白经温水溶解、烷基化、碱性胰蛋白酶酶解。与此同时将 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白系列标准溶液与试样同步平行烷基化、酶解。在试样和标准液酶解液中加入同位素标记的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段，用于校准由复杂基质导致的离子化误差。经液相色谱分离，质谱/质谱测定试样与标准酶解液，使用 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白系列标准溶液曲线计算结果，内标法定量。

本标准对固体试样， 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。对液体试样， 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。 α -乳白蛋白的浓度在 3~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内时，线性良好； β -乳球蛋白的浓度在 9~90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内时，线性良好。平均加标回收率在 95.2%~104.2%，相对标准偏差为 0.8%~3.8%。

三、国内国际相关标准情况

目前国内用于乳清蛋白检测的仍然有效的方法为 1997 年制定的 GB 5413.2-1997《婴幼儿配方食品和乳粉乳清蛋白的测定》，该方法采用凝胶电泳法（SDS-PAGE），试样中的不同分子量蛋白在电场的作用下由于迁移率的不同而得到区分，形成不同的迁移条带，再根据经染色后条带的深浅度判别各蛋白的相对比例，此法受蛋白变性影响，染色剂与蛋白无法保证完全结合，导致检测结果存在偏差，且重现性不佳，为半定量方法，不能精确测定各种蛋白的含量。

国际上，美国国际标准化组织（ISO 23293-2020）及 AOAC 均用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶毛细管电泳（SDS-CGE）测定乳基配方奶粉中乳清蛋白的含量^[5]。使用脱脂奶粉作为标准样，确定乳清蛋白和酪蛋白的面积校正因子，然后将试样的毛细管电泳图按标准样的方式进行分段积分，根据各段的积分面积及校正因子计算乳清蛋白与酪蛋白的比值。首先，该方法依赖于脱脂奶粉的标准样，而非统一的蛋白或标准样品，没有溯源性；其次，该方法的结果是乳清蛋白与酪蛋白的比值，而非乳清蛋白的绝对含量，若试样中存在其他小分子氮，则与真实结果偏差较大；再者，若试样中掺入其他类型的蛋白（如大豆蛋白），电泳图将出现偏移，导致结果判定出现较大误差，也即无法对非乳蛋白进行鉴别。

目前文献报道的乳清蛋白的测定方法还有氨基酸折算法、高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用法。

氨基酸折算法是根据牛奶和乳清蛋白含有的独特氨基酸图谱，通过特定的氨基酸的差异来计算乳清蛋白含量的一种方法。Rae Greenberg 等人对氨基酸折算法（5 种氨基酸折算）^[6]计算奶粉中乳清蛋白含量的方法进行评估，对国内外品牌婴幼儿配方粉检测发现，一段奶粉中乳清蛋白的检测值高于标示值 5~10%，二、三段的奶粉乳清蛋白也与商品标示值有所偏差。该方法只适用于乳基婴幼儿配方粉，对含有豆基配方粉的产品不适用。氨基酸折算法易受其他添加的营养素的干扰，如添加多肽、氨基酸的产品。

HPLC 对配方乳粉中乳清蛋白的检测仅适用于某些产品，无法广泛应用于全部产品中乳清蛋白（ α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白）的检测，Xiaojing Ding 等人^[7]在实验过程中发现 α -乳白蛋白与乳铁蛋白在检测中峰形会出现重叠而干扰 α -乳白蛋白检测结果。该方法无法对复杂基质（乳基婴幼儿配方粉）进行精准定量。农业部在 2025 年发布了：《牛乳及其制品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定 高效液相色谱》（NY/T 4630—2025）^[8]，包括两个方法：反相色谱法（方法一）和凝胶渗透色谱法（方法二），方法声称：第一法适用于生牛乳和巴氏杀菌牛乳中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定；第二法适用于高温杀菌牛乳、灭菌牛乳、牛乳粉和牛乳基婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定。该方法仅可测定牛乳基婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白，不适用羊乳基质的检测，同时无法鉴别掺入植物蛋白基质样品。

液相色谱-质谱联用法是通过质谱检测酶解产生的特异性肽段对乳制品中蛋白进行鉴定和定量的方法。Cristian Piras¹ 综述了蛋白质组学应用于近几年来食品科学界对动物源性食品的关注典型范例，强调这是具有价值的、重要的学科，可作为评估食品质量和安全的工具^[9]。Rubén Agregán 等提出了蛋白质组学是一个新的研究领域，分析近几十年来在医学领域所取得的巨大的进展，并认为牛奶是一种高度异质和复杂的液体，其基质中存在大量蛋白质和肽，蛋白质组学被认为是一种可用于表征牛奶样品及其产品的强大工具。开发的技术已实现了详尽的牛奶和乳制品中蛋白质和肽的表征^[10]。Nagib Ahsan 等阐述了靶向蛋白质组学技术的最新进展，即多重反应监测（MRM）质谱（MS）结合同位素标记内标，也称为 AQUA 肽，可对食物样品进行绝对定量^[11]。杜鹃等人建立了超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱（UPLC-MS/MS）法测定乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的分析方法^[12]，其结果表明 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白分别在 40~1000 nmol/L 和 80~2000 nmol/L 范围内呈良好线性关系，定量下限(S/N=10)均为 0.020 g/100 g；加标回收率为 84.7%~95.6%，相对标准偏差(RSD, n=6)为 1.6%~5.8%。

综上，国内外目前尚未建立牛与羊乳基婴幼儿配方食品中主要乳清蛋白成分（ α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白）的准确定量的标准方法。也未建立可鉴别植物蛋白质掺假的鉴别方法。应用靶向蛋白质组学检测技术建立乳清蛋白准确定量的方法无疑是最佳、可行的路径。

四、其他需要说明的事项

无