ICS 67.050
CCS X04

T/CNHFA

团 体 标 准

T/CNHFA 4310—2026

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 formula foods for infant and young children, whey powder and whey protein powder by LC-MS/MS

2026-11-11 发布　　2026-12-11 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标准化检验检测专业委员会提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：中国营养保健食品协会标准化检验检测专业委员会、内蒙古伊利实业集团股份有限公司金山分公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、陕西和氏乳业集团有限公司、新东康营养科技有限公司、杭州璞湃科技有限公司。

本文件主要起草人：赖世云、胡玲玲、黄百芬、任一平、张卫民、赵云峰、金绍明、周博雅、刘彪、孟根花、张立佳、蔺婷娟、王洪丽、徐海青、蒋士龙、鄂志强、张亮、王金翠、韩丽丽、刘萍、魏敏、李凯娟、王薇、罗健、范佳。

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。本方法不适用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-乳球蛋白的含量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 11674 食品安全国家标准 乳清粉和乳清蛋白粉

GB 10765 食品安全国家标准 婴儿配方食品

GB 10766 食品安全国家标准 较大婴儿配方食品

GB 10767 食品安全国家标准 幼儿配方食品

GB 5009.295 化学分析方法验证通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文

3.1 **特异性** Specificity

分析方法区分目标分析物与干扰物质的能力

3.2 **特征肽段** Signature Peptide

目标蛋白所特有的肽段。

3.2 **同位素特征肽** Isotopic Signature Peptide

肽段中的部分氨基酸用同位素氨基酸取代。

3.3 **定性方法** Qualitative Methods

根据目标分析物特定性质鉴定其在样品中是否存在的分析方法。

3.4 **定量方法** Quantitative Methods

在满足规定的精密度与正确度的条件下，测定目标分析物的浓度或量的分析方法。

3.5 **检出限** Limit of Detection

在一定的置信水平下，样品中目标分析物能被测定的最低浓度或量。

3.6 **定量限** Limit of Quantitation

在满足规定的正确度与精密度条件下，样品中目标分析物能被测定的最低浓度或量。

3.7 **重复性** Repeatability

在同一实验室，由同一人操作，使用相同的设备，用同样方法检测同一样品获得独立测量结果的精密度。

4 方法原理

试样中的α-乳白蛋白和β-乳球蛋白经烷基化和酶解后，经高效液相色谱-质谱/质谱仪分离、测定其中的α-乳白蛋白和β-乳球蛋白的特征肽段，使用α-乳白蛋白和β-乳球蛋白标准溶液与试样同步烷基化和酶解处理，选用同位素标记的α-乳白蛋白和β-乳球蛋白特征肽段为内标，制作系列工作曲线，内标法定量。

5 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。

5.1 试剂

5.1.1 碳酸氢铵（NH_4HCO_3），纯度≥99%。

5.1.2 二硫苏糖醇（$C_4H_{10}O_2S_2$，DTT），纯度≥99%。

5.1.3 碘代乙酰胺（ICH_2CONH_2，IAA），纯度≥99%。

5.1.4 乙酸（CH_3COOH），色谱纯。

5.1.5 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.6 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

5.1.7 碱性胰蛋白酶：蛋白组学级或更高级别。

5.2 材料

5.2.1 聚丙烯材质离心管：2 mL 。

5.2.2 聚丙烯材质试剂瓶：10 mL。

5.2.3 聚丙烯材质进样瓶：2 mL。

5.2.4 注射器：1-5 mL。

5.2.5 水系针式过滤器：0.22 μm。

5.2.6 微量移液器吸头：200 μL，1000 μL。

5.3 标准品

5.3.1 牛源α-乳白蛋白标准品（CAS 号：9051-29-0）：分子量 14178 Da，蛋白纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2 牛源β-乳球蛋白标准品（CAS 号：9045-23-2）：分子量 18320 Da，蛋白纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.3 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≥95%。

5.3.4 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≥95%。

注：1、若有市售羊乳来源的α-乳白蛋白和β-乳球蛋白，则羊乳基产品需用此蛋白作为标准品。

2、5.3.3 和 5.3.4 肽段序列中注有*的氨基酸为同位素标记氨基酸， L*为 Leu-OH-$^{13}C_6$,^{15}N;；I*为 Ile-OH-$^{13}C_6$,^{15}N。

5.4 试剂配制

5.4.1 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。

5.4.2 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。

5.4.3 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。

5.4.4 乙酸溶液（1%，V/V）：移取 1 mL 乙酸，用水稀释至 100 mL，混匀后使用。

5.4.5 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（5.4.4）溶解后稀释至 10 mL。分装后置－20℃冰箱保存，有效期 6 个月。

5.4.6 甲酸水溶液（0.1%，V/V）：吸取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL，超声脱气后使用。

5.4.7 甲酸乙腈溶液（0.1%，V/V）：吸取 1 mL 甲酸，用乙腈稀释至 1000 mL，超声脱气后

使用。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 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（按照纯度折算，精确至 0.01 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到聚丙烯试剂瓶中，于-20 ℃保存，有效期 6 个月。

5.5.2 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（按照纯度折算，精确至 0.01 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀。将溶液转转移到聚丙烯试剂瓶中，于-20 ℃保存，有效期 6 个月。

5.5.3 同位素标记的 α-乳白蛋白特征肽段储备溶液（500 μg/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，并定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到聚丙烯试剂瓶中，于-20 ℃保存，有效期 6 个月。

5.5.4 同位素标记的 β-乳球蛋白特征肽段储备溶液（500 μg/mL）：称取同位素标记的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。将溶液转移到聚丙烯试剂瓶中，于-20 ℃保存，有效期 6 个月。

5.5.5 蛋白标准中间混合溶液（α-乳白蛋白 150 μg/mL，β-乳球蛋白 450 μg/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。将溶液转移到聚丙烯试剂瓶中，于-20 ℃保存，有效期 3 个月。

5.5.6 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（1 μg/mL）：分别准确吸取 50 μL 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 25 mL，混匀。将溶液分装到聚丙烯试剂瓶中，于-20 ℃保存，有效期 3 个月。

5.5.7 系列标准工作溶液：准确吸取蛋白标准中间混合溶液（5.5.5）0 μL、20 μL、50 μL、75 μL、100 μL、150 μL、200 μL，分别用水定容至 1.0 mL，按照 **7.3** 与试样同时进行烷基化、酶解和加入同位素特征肽段混合溶液。所得系列标准工作溶液的浓度：α-乳白蛋白为 0 μg/mL、3.00 μg/mL、7.50 μg/mL、11.25μg/mL、15.00 μg/mL、22.50 μg/mL 和 30.00 μg/mL；β-乳球蛋白为 0 μg/mL、9.00 μg/mL、22.50 μg/mL、33.75μg/mL 、45.00 μg/mL、67.50 μg/mL 和 90.00 μg/mL。

6 设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源；质量数范围，2 ~ 2048 质荷比（m/z）；质量准确度，0.1 原子质量单位（AMU）。

6.2 天平：感量 0.01 g；0.1 mg；0.01 mg。

6.3 涡流混合器。

6.4 超声波清洗器。

6.5 恒温水浴锅。

6.6 恒温混匀仪：温度控制精度≤0.1℃。

6.7 微量移液器：1~10 μL、10~100 μL、20~200 μL、100~1000 μL

7 分析步骤

7.1 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℃~4℃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。

7.2 试样溶解

婴幼儿配方食品：称取固体试样约 1.0 g 或液体试样约 10 g（精确至 0.1 mg）于 50 mL 烧杯中，用水充分溶解后（固体试样可先用少量 40 ℃~45 ℃温水溶解），转移至 1000 mL 容量瓶，用水定容至刻度，摇匀后待测。

乳清粉：称取试样约 0.5 g（精确至 0.1 mg）于 50 mL 烧杯中，用 40 ℃~45 ℃温水溶解后，转移至 1000 mL 容量瓶，用水定容至刻度，摇匀后待测。

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 ℃~45 ℃温水溶解后，转移至 1000 mL 容量瓶，用水定容至刻度，摇匀后待测。

7.3 烷基化与酶解

准确移取 200 μL 系列标准工作溶液（5.5.7）或试样溶液（7.2）于 2 mL 聚丙烯材质的离心管中，加入 200 μL 碳酸氢铵溶液（5.4.1）和 10 μL 二硫苏糖醇溶液（5.4.2），混匀后置于恒温仪于 70 ℃下恒温反应 30 min；恢复至室温，加入 20 μL 碘代乙酰胺溶液（5.4.3），混匀后于暗处静置 30 min；反应完成后加入 10 μL 胰蛋白酶溶液（5.4.5），充分混匀后于 37 ℃下恒温酶解 5 小时。酶解完成后，加入 10 μL 甲酸（5.1.5）终止反应，混匀后置于室温下静置 15 min，再加入 100 μL 同位素标记特征肽段混合溶液（5.5.6）、450 μL 水（总体积为 1 mL），混匀。用 0.22 μm 水系针式过滤器过滤至聚丙烯材质进样瓶中，供液相色谱-质谱/质谱仪检测。

注：乳清蛋白含量高样品可再稀释后取样，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。

7.4 仪器参考条件

7.4.1 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 1.7 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 ℃。

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

7.4.2 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 ℃；

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；质谱参数优化可购买商品化的α-乳白蛋白特征肽段（序列：VGINYWLAHK，分子量 1200.24 Da，纯度≥95%）和β-乳球蛋白特征肽段（序列：IDALNENK，分子量 915.58 Da，纯度≥95%）。

7.5 标准工作曲线的制作

将标准系列工作溶液（5.5.7）由低至高浓度依次注入液相色谱-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。标准溶液的谱图参见图 A.1 。

7.6 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溶液中α-乳白蛋白和β-乳球蛋白的浓度。

7.7 空白试验

不称取试样，按 7.2~7.3 的分析步骤操作，应不含有干扰待测组分的物质。

7.8 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。所有定性离子均满足检出限要求（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%

8 分析结果的表述

8.1 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：

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

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（μg/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：液态婴幼儿配方食品计算结果保留至小数点后第一位；固态婴幼儿配方食品、乳清粉、乳清蛋白粉计算结果保留至整数位。

9 重复性

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%。

10 检出限与定量限

固态婴幼儿配方食品，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。

液态婴幼儿配方食品，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。

乳清粉，α-乳白蛋白的检出限为 12 mg/100g，定量限为 40 mg/100g；β-乳球蛋白的检出限为 16 mg/100g，定量限为 50 mg/100g。

乳清蛋白粉，α-乳白蛋白的检出限为 60 mg/100g，定量限为 200 mg/100g；β-乳球蛋白的检出限为 80 mg/100g，定量限为 250 mg/100g。

附 录 A

标准溶液参考色谱质谱图

α-乳白蛋白（30μg/mL）、β-乳球蛋白（90μg/mL）标准溶液（30μg/mL）色谱-质谱/质谱图见图 A.1

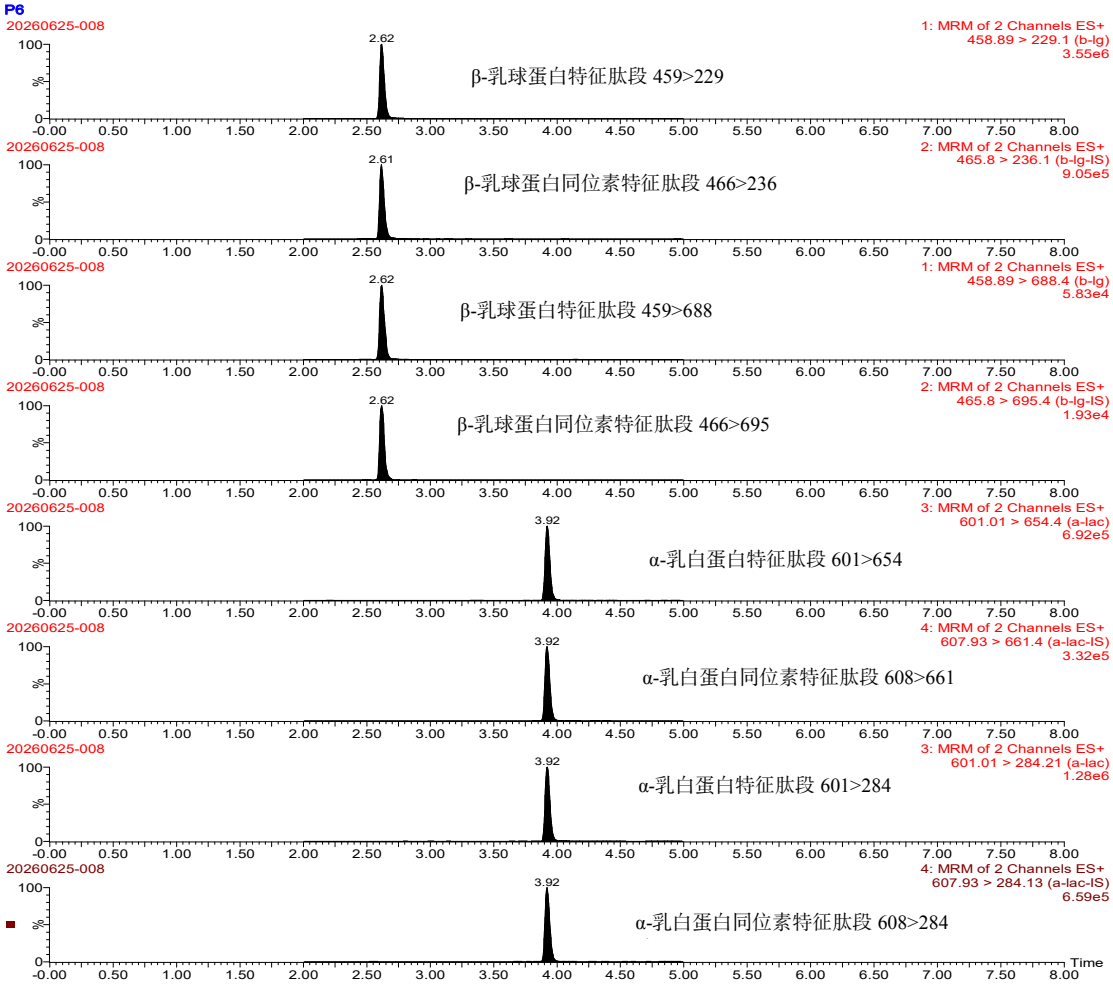


图 A.1 α-乳白蛋白（30μg/mL）、β-乳球蛋白（90μg/mL）标准溶液色谱质谱图