ICS 67.050
CCS X04

T/CNHFA

团 体 标 准

T/CNHFA 233—2026

牛乳及其制品和婴幼儿配方食品中 A1 型和 A2 型β-酪蛋白的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of A1 type and A2 type β-casein in Bovine Milk, Dairy products and Infant Formula by LC- MS/MS

2026 - 11 - 12 发布 2026 - 12 - 1 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。

本文件由至初牛奶贸易（上海）有限公司提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：至初牛奶贸易（上海）有限公司、杭州璞湃科技有限公司、光明乳业有限公司。

本文件主要起草人：Andrew Clarke、张美玲、赖世云、周慧、黄百芬、任一平。

牛乳及其制品和婴幼儿配方食品中A1型和A2型β-酪蛋白的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件规定了牛乳来源的生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、乳粉、调制乳粉及婴幼儿配方食品中A1型和A2型β-酪蛋白的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本文件适用于牛乳来源的生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、乳粉、调制乳粉及婴幼儿配方食品中A1型和A2型β-酪蛋白含量的测定，不适用于添加水解或酶解的乳清粉或乳清蛋白粉为原料的乳制品中A1型和A2型β-酪蛋白的测定。

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 19301 食品安全国家标准 生乳

GB 19645 食品安全国家标准 巴氏杀菌乳

GB 25190 食品安全国家标准 灭菌乳

GB 19644 乳粉和调制乳粉

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 β-酪蛋白变异体 β-casein Variants

一种由209个氨基酸残基组成的单链磷蛋白。其编码基因为牛CSN2基因。CSN2基因中天然存在的遗传变异已鉴定出至少15种牛β-酪蛋白变体，包括 A1、A2、A3、B、C、D、E、F、G、H1、H2、I、J、K和L 型变异体。

3.2 A1型β-酪蛋白 A1 type β-casein

包含A1、B、C、F和G等酪蛋白变异体，其共性是第67位氨基酸是组氨酸（H）。

3.3 A2型β-酪蛋白 A2 type β-casein

包含A2、A3、E、D和I等酪蛋白变异体，其共性是第67位氨基酸为脯氨酸（P）。

3.4 A2型β-酪蛋白变异体I A2-type β-casein Variant I

A2型 β-酪蛋白变异体 I 属于A2型β-酪蛋白的一种，其区别在于第88位氨基酸为亮氨酸（L），其它A2型β-酪蛋白变异体第 88 位氨基酸为甲硫氨酸（M）。

4 方法原理

试样经碳酸氢铵溶解后，加入β-酪蛋白同位素特征肽段，用碱性胰蛋白酶酶解，以甲酸终止酶解反应。酶解液经液相色谱分离，质谱/质谱检测 A1β-酪蛋白、A2β-酪蛋白、Iβ-酪蛋白的特征肽段及其同位素特征肽段响应，绘制 A1 型β-酪蛋白、A2 型β-酪蛋白 I β-酪蛋白标准曲线，内标法定量，并计算试样中 A1 型β-酪蛋白和 A2 型（A2+I）β-酪蛋的含量白。

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）：纯度不低于 98%。

5.1.2 乙酸（CH_3COOH）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.4 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

5.1.5 碱性胰蛋白酶：蛋白组学级或更高级别。

5.1.6 表面活性剂：3-[(2-甲基-2-十一烷基-1,3-二氧环烷-4-基)甲氧基]-1-丙烷磺酸钠，纯度不低于 95%。

5.2 试剂配制

5.2.1 碳酸氢铵溶液（100 mmol/L）：称取 7.9 g 碳酸氢铵，用水溶解后稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.2 乙酸溶液（1%，V/V）：移取 0.1 mL 乙酸，用水稀释至 10 mL，混匀。

5.2.3 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℃保存，有效期 6 个月。

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

5.2.5 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。

5.2.6 酶解缓冲溶液：称取 100 mg 表面活性剂（5.1.6），用碳酸氢铵溶液（5.2.1）溶解并稀释至 100 mL，混匀。

5.3 标准品

5.3.1 牛源 A1 型β-酪蛋白变异体 A1（简称 A1β-酪蛋白）标准品（CAS 号：9000-71-9）：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 A2 型β-酪蛋白变异体 A2（简称 A2β-酪蛋白）标准品（CAS 号：9000-71-9）：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 牛源 A2 型β-酪蛋白变异体 I（简称 Iβ-酪蛋白）标准品（CAS 号：9000-71-9）：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。

5.3.4 A1β-酪蛋白特征肽段：IHPFAQTQSLVYPFPGPIHNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK，相对分子量 5359.28 Da，纯度≥95%。

5.3.5 A2 β-酪蛋白特征肽段：IHPFAQTQSLVYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK，相对分子量 5319.28 Da，纯度≥95%。

5.3.6 Iβ-酪蛋白特征肽段：IHPFAQTQSLVYPFPGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVLGVSK，相对分子量 5301.17 Da，纯度≥95%。

5.3.7 A1 β-酪蛋白同位素特征肽段：IHPFAQTQSL*VYPFPGPIHNSL*PQNIPPL*TQTPVVVPPFL*QPEVMGVSK，相对分子量 5387.26 Da，纯度≥95%。

5.3.8 A2 β-酪蛋白同位素特征肽段：IHPFAQTQSL*VYPFPGPIPNSL*PQNIPPL*TQTPVVVPPFL*QPEVMGVSK，相对分子量 5347.26 Da，纯度≥95%。

5.3.9 Iβ-酪蛋白同位素特征肽段：IHPFAQTQSL*VYPFPGPIPNSLPQNIPPL*TQTPVVVPPFL*QPEVLGVSK，相对分子量 5322.17 Da，纯度≥95%。

注：1. 5.3.4、5.3.5、5.3.6 特征肽段仅供优化质谱参数使用，已建方法无需购买。

2. 5.3.7、5.3.8、5.3.9 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。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 A1β-酪蛋白标准储备溶液（2 mg/mL）：称取 20 mg（精确至 0.01 mg）A1β-酪蛋白标准品，用碳酸氢铵溶液（5.2.1）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。

5.4.2 A2β-酪蛋白标准储备溶液（10 mg/mL）：称取 100 mg（精确至 0.01 mg）A2β-酪蛋白标准品，用碳酸氢铵溶液（5.2.1）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。

5.4.3 Iβ-酪蛋白标准储备溶液（2 mg/mL）：称取 20 mg（精确至 0.01 mg）I β-酪蛋白标准品，用碳酸氢铵溶液（5.2.1）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。

5.4.4 A1β-酪蛋白特征肽段储备溶液（500 μg/mL）：称取 A1β-酪蛋白特征肽段标准品 5 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 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.5 A2β-酪蛋白特征肽段储备溶液（500 μg/mL）：称取 A2β-酪蛋白特征肽段标准品 5 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 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.6 Iβ-酪蛋白特征肽段储备溶液（500 μg/mL）：称取 Iβ-酪蛋白 特征肽段标准品 5 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 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.7 A1β-酪蛋白同位素特征肽段储备溶液（500 μg/mL）：称取 A1β-酪蛋白同位素特征肽段标准品 5 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 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.8 A2β-酪蛋白同位素特征肽段储备溶液（500 μg/mL）：称取 A2β-酪蛋白同位素特征肽段标准品 5 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 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.9 Iβ-酪蛋白同位素特征肽段储备溶液（500 μg/mL）：称取 Iβ-酪蛋白同位素特征肽段标准品 5 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 ℃保存，有效期 6 个月。

5.4.10 β-酪蛋白混合溶液：移取 A1β-酪蛋白标准储备溶液、A2β-酪蛋白标准储备溶液、I β-酪蛋白变异标准储备溶液各 2 mL，用碳酸氢铵溶液（5.2.1）定容至 10 mL，获得 A1β-酪蛋白的浓度为 0.4 mg/mL， A2β-酪蛋白的浓度为 2.0 mg/mL， Iβ-酪蛋白的浓度为 0.4 mg/mL。

5.4.11 β-酪蛋白同位素特征肽段混合溶液（50 μg/mL）：移取 A1β-酪蛋白、A2β-酪蛋白和 Iβ-酪蛋白同位素特征肽段储备液各 1 mL，用水定容至 10 mL，混匀。将溶液转移到塑料管中，于-20 ℃保存，有效期 3 个月。

5.4.12 标准系列工作溶液：移取β-酪蛋白变异体混合溶液 25 μL、125 μL、250 μL、500 μL、750 μL、1000 μL，用碳酸氢铵溶液（5.2.1）定容至 1.0 mL，得 A1β-酪蛋白的浓度为 0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL；A2β-酪蛋白的浓度为 0.05 mg/mL、0.25 mg/mL、0.50 mg/mL、1.00 mg/mL、1.50 mg/mL、2.00 mg/mL；Iβ-酪蛋白的浓度为 0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL；按照 7.3 步骤与试样同时进行酶解。

5.5 材料

5.5.1 聚丙烯材质离心管：2 mL、50 mL。

5.5.2 聚丙烯材质进样瓶：2 mL。

5.5.3 聚丙烯材质塑料瓶：10 mL。

5.5.4 水系针式过滤器：0.22 μm。

5.5.5 注射器：1-5 mL。

6 设备

6. 1 液相色谱-质谱/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：振荡转速不低于 2400 转/分钟。

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

取具有代表性的样品至少 200g，液态样品摇匀后储存于容器中，于 0℃~4℃冰箱中保存；固态样品混匀后储存于容器中，常温下干燥保存。

7.2 试样提取

称取试样 0.5~2.0 g（精确至 0.1 mg）于烧杯中，用碳酸氢铵溶液充分溶解后，转移至 50 mL 容量瓶，定容至刻度，摇匀。

7.3 酶解

准确移取 100 μL 标准系列工作溶液（5.4.12）和试样溶液（7.2）于 2 mL 聚丙烯材质的塑料离心管中，加入 200 μL 酶解缓冲溶液（5.2.6）、50 μL 同位素特征肽段混合溶液（5.4.11）和 10 μL 胰蛋白酶溶液（5.2.3），充分混匀后于 37 ℃下恒温酶解 2 小时。结束后，加入 10 μL 甲酸（5.1.3），混匀后置于 37 ℃下静置 30 min，然后加入 630 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：高含量样品可稀释再取样，记录稀释倍数 f。

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 150 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.8 μm，孔径 30 nm（300 Å）或等效者，理论塔板数>3000；

b） 流动相 A：0.1%甲酸水溶液（5.2.4）；流动相 B：0.1%甲酸乙腈溶液（5.2.5）；

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（%）
0	95	5
1.0	95	5
3.0	65	35
7.0	55	45
7.5	0	100
10.5	0	100
11.0	95	5
14.0	95	5

7.4.2 质谱参考条件

a） 离子化模式：电喷雾电离正离子模式（ESI+）；

b) 扫描方式：多反应离子监测（MRM）；

c) 毛细管电压：3.5 kV；

d) 锥孔电压：40V；

e) 脱溶剂温度：300 ℃；

f) 脱溶剂气流量：800 L/h；

g) 其它质谱参数见表2。

表 2 特征肽段质谱参数

名 称	母离子(m/z) [M+4H] $^{4+}$ ** (m/z)	母离子(m/z) [M+5H] $^{5+}$ ** (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
A1 β-酪蛋白特征肽段	1340.6	1072.8	715.1*	40	30
			966.8	40	20
			1966.6	40	30
A1 β-酪蛋白同位素特征肽段	1347.3	1078.3	718.7*	40	30
			971.5	40	20
			1976.5	40	30
A2 β-酪蛋白特征肽段	1330.6	1064.8	715.1*	40	30
			953.6	40	20
			1946.2	40	30
A2 β-酪蛋白同位素特征肽段	1337.8	1070.3	718.7*	40	30
			958.3	40	20
			1955.9	40	30
I β-酪蛋白特征肽段	1326.4	1061.2	706.2*	40	28
			953.6	40	20
			1222.3	40	28
I β-酪蛋白同位素特征肽段	1331.4	1065.3	709.5*	40	30
			956.0	40	20
			1228.5	40	30

注：*为推荐定量离子；根据仪器特性择优选取母离子；由于不同型号质谱仪器，质谱参数条件的差异，会造成最佳丰度质量数的差异，测定前应将质谱条件优化，选择最佳丰度的质量数离子。子离子的质量数同理选择确定。**

7.5 标准工作曲线制作

将酶解处理后的标准系列工作溶液依次注入液相色谱-质谱/质谱仪，测定相应的峰面积。以标准系列的相应 A1β-酪蛋白、A2β-酪蛋白和 Iβ-酪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。标准溶液的监测离子谱图见附录图 A.1 。

7.6 试样溶液的测定

将酶解处理后的试样溶液注入液相色谱-质谱/质谱仪，测得相应目标化合物的峰面积，根据标准曲线分别计算，得到试样溶液中 A1β-酪蛋白、A2β-酪蛋白和 Iβ-酪蛋白的浓度，试样溶液的监测离子谱图见附录图 A.2。

7.7 空白试验

不称取试样，按 7.3 的处理步骤操作，在目标化合物保留时间处应无色谱峰。

7.8 定性判定

试样中A1β-酪蛋白、A2β-酪蛋白和Iβ-酪蛋白质量色谱峰的保留时间与标准工作溶液中相应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%

8　分析结果的表述

8.1 结果计算

试样中 A1β-酪蛋白或 A2β-酪蛋白或 Iβ-酪蛋白的含量按式（1）计算：

$$X_i = \frac{\rho \times V \times f}{m \times 1000} \times 100 \quad \text{……（1）}$$

式中：

X_i——试样中 A1β-酪蛋白或 A2β-酪蛋白或 Iβ-酪蛋白的含量，单位为克每百克（g/100g）；

ρ——根据标准曲线计算得到的试样溶液中 A1β-酪蛋白或 A2β-酪蛋白或 Iβ-酪蛋白的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

f——试样稀释倍数；

m——试样质量，单位为克（g）。

试样中 A1 型β-酪蛋白的含量即为测得的 A1β-酪蛋白含量；A2 型β-酪蛋白的含量包括测得的 A2β-酪蛋白和 Iβ-酪蛋白含量，按式（2）计算：

$$X_2 = X_{A2} + X_I \quad \text{……（2）}$$

式中：

X_2——试样中 A2 型 β-酪蛋白的含量，单位为克每百克（g/100g）；

X_{A2}——试样中 A2β-酪蛋白的含量，单位为克每百克（g/100g）；

X_I——试样中 Iβ-酪蛋白的含量，单位为克每百克（g/100g）。

计算结果保留至小数点第二位。

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

当称样量为 2.0 g 时，A1β-酪蛋白检出限为 0.02 g/100 g，定量限为 0.05 g/100 g；A2β-酪蛋白检出限为 0.03 g/100 g，定量限为 0.1 g/100 g；Iβ-酪蛋白检出限为 0.02 g/100 g，定量限为 0.05g/100 g。

附 录 A

标准溶液与试样溶液监测离子质量色谱图

A.1 标准溶液监测离子质量色谱图

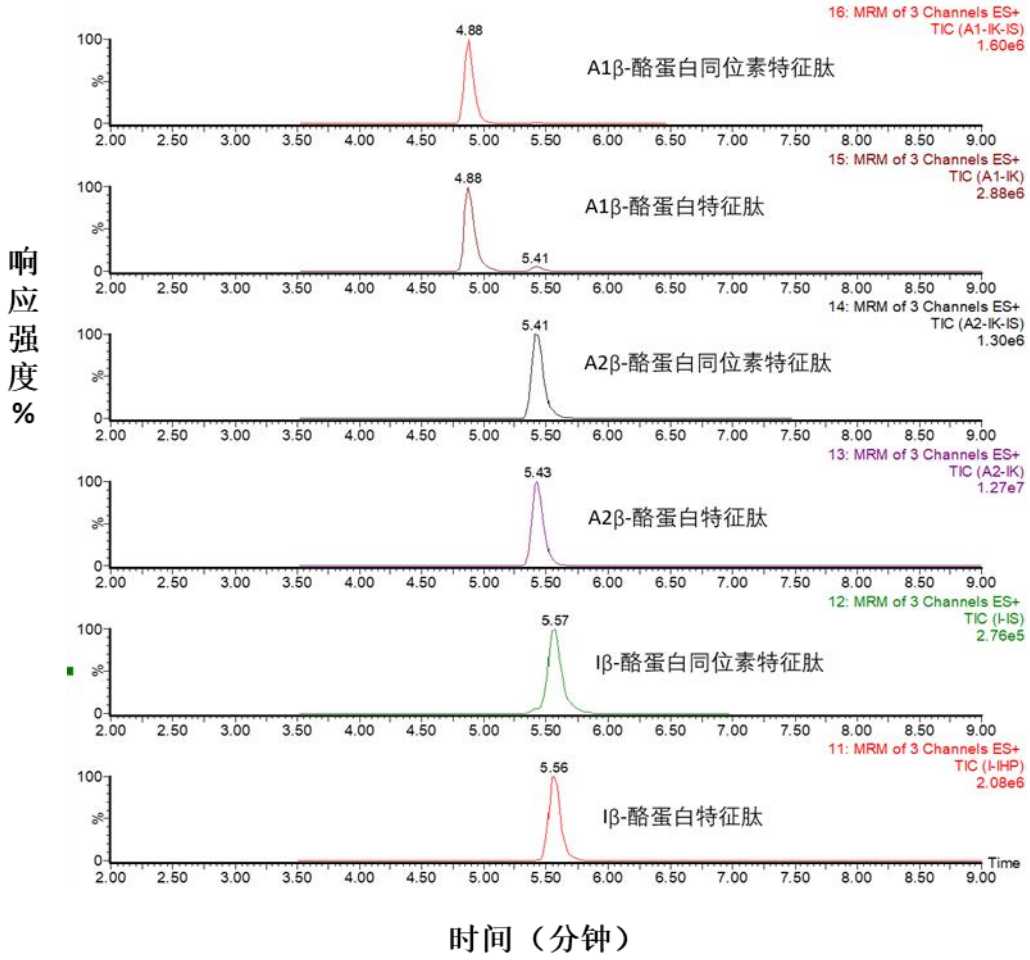


图 A.1　标准溶液中 A1β-酪蛋白（0.2 mg/mL）、A2β-酪蛋白（1.0 mg/mL）及 Iβ-酪蛋白（0.2 mg/mL）监测离子质量色谱图

A.2 试样溶液监测离子质量色谱图

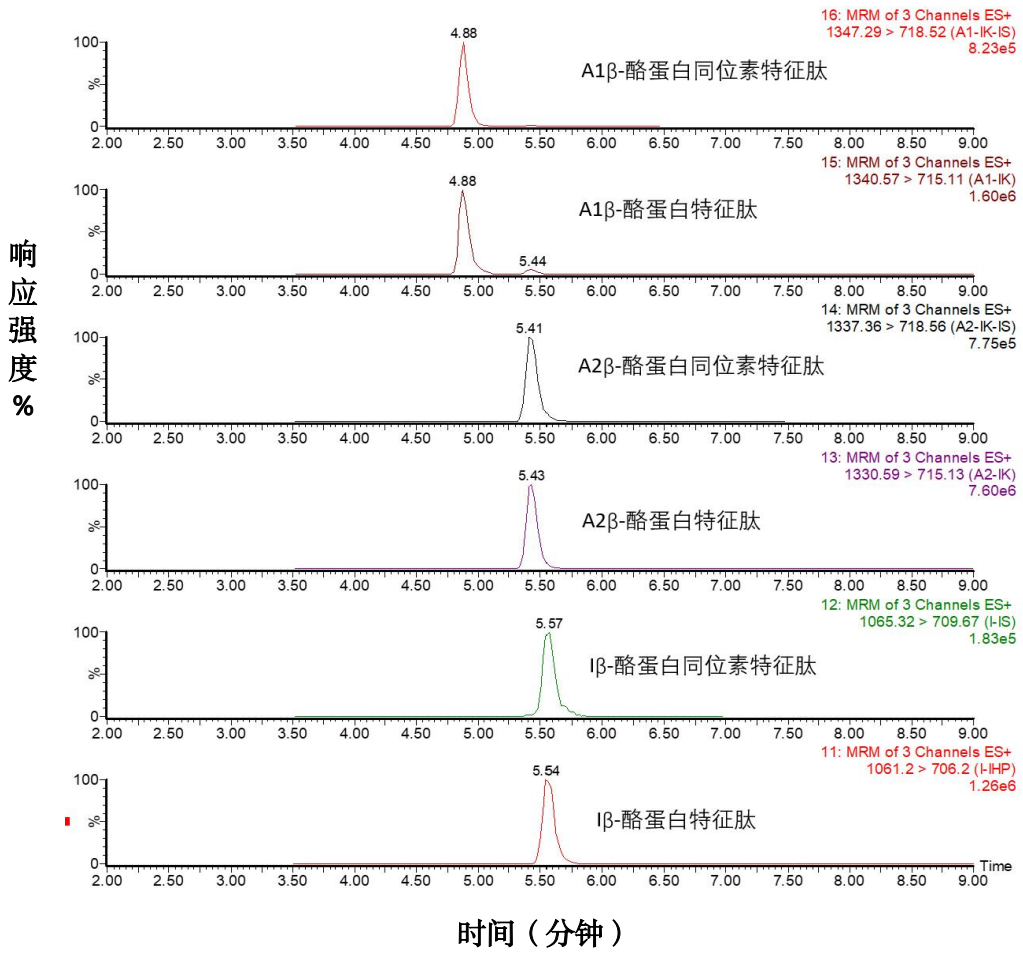


图 A.2　试样溶液中 A1β-酪蛋白、A2β-酪蛋白及 Iβ-酪蛋白监测离子质量色谱图