

应用分享：奶制品中乳铁蛋白的测定（团体标准 TTDSTIA 006-2019）

背景

近日,天津市奶业科技创新协会发布了《团体标准 T/TDSTIA 006-2019 奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 液相色谱法》, 我们根据标准要求的前处理方法进行了奶制品中乳铁蛋白的测定验证, 纳谱分析提供的 SelectCore Heparin 肝素亲和 SPE 柱和 ChromCore 300 C4-T 分析柱, 不仅能满足此标准的检测要求, 相比标准所列的 GE HiTrap Heparin 前处理柱和 Waters 的 Xbridge Protein BEH C4 分析柱, 前处理更加方便快捷, 色谱分析时间更快更准确, 可以更加快速高效的检测乳铁蛋白的含量。



适用范围

该方法参考团体标准 奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 液相色谱法（T/TDSTIA 006-2019），用于测定生乳、液态奶和乳粉中乳铁蛋白的含量。

实验步骤

1、试剂准备

氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 4.0 g 氢氧化钠，加水溶解，定容至 100 mL。

磷酸缓冲盐溶液 1：称取磷酸氢二钠 23.85 g，磷酸二氢钠 4.99 g，加水溶解，用氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.50，定容至 1 L，混匀备用。

磷酸缓冲盐溶液 2: 称取磷酸氢二钠 5.96 g, 磷酸二氢钠 0.96 g, 氯化钠 5.84g, 加水溶解, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.50, 定容至 1 L, 混匀备用。

磷酸缓冲盐溶液 3: 称取磷酸氢二钠 5.96 g, 磷酸二氢钠 2.50 g, 氯化钠 119.30 g, 加水溶解, 用氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.50, 定容至 1 L, 混匀备用。

乳铁蛋白标准品: 乳铁蛋白母液, 浓度 10 mg/mL, 称取 1.0 g 乳铁蛋白加水溶解, 定容至 100 mL。

2、样品制备

生乳、液态奶: 称取 10.0 g 试样于 50 mL 离心管中, 加入磷酸缓冲盐溶液 1 定容至 50 mL, 混匀, 离心 15 min, 吸取 25 mL 中间层试液于另一 50 mL 离心管中, 离心 15 min。吸取上清液, 待净化。

乳粉: 称取 5.0 g 试样于 50 mL 离心管中, 加入磷酸缓冲盐溶液 1 定容至 50 mL, 混匀, 离心 15 min, 吸取 25 mL 中间层试液于另一 50 mL 离心管中, 离心 15 min。吸取上清液, 待净化。

3、净化

SPE 柱活化: SelectCore Heparin 肝素亲和柱 1mL, 加入 10 mL 磷酸缓冲盐溶液 2 进行活化;

上样: 准确移取 10 mL 步骤 2 中制备好的上清液;

淋洗: 待上清液完全流出后, 再用 10 mL 磷酸缓冲盐溶液 2 淋洗, 弃去全部淋洗液;

洗脱: 用 4.5 mL 磷酸缓冲盐溶液 3 洗脱, 收集全部洗脱液, 用磷酸缓冲盐溶液 3 定容至 5.0 mL。将收集溶液涡旋混匀, 过滤膜后供液相色谱分析。

4、液相色谱仪器条件

色谱柱: ChromCore 300 C4-T 5 μ m, 4.6 \times 250mm

检测波长: 280 nm

柱温: 30 $^{\circ}$ C

进样体积: 20 μ L

流速: 1.0 mL/min

流动相: A 相: 0.1%三氟乙酸水溶液; B 相: 乙腈

洗脱梯度:

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1.000	70	30
15	1.000	40	60
16	1.000	70	30
26	1.000	70	30

实验谱图及加标回收率数据

实验谱图

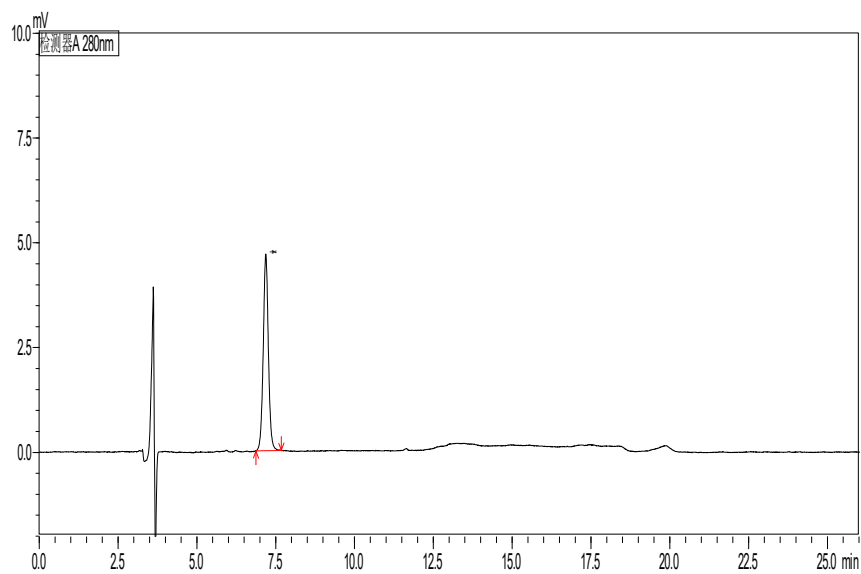


图 1 乳铁蛋白标准品色谱图

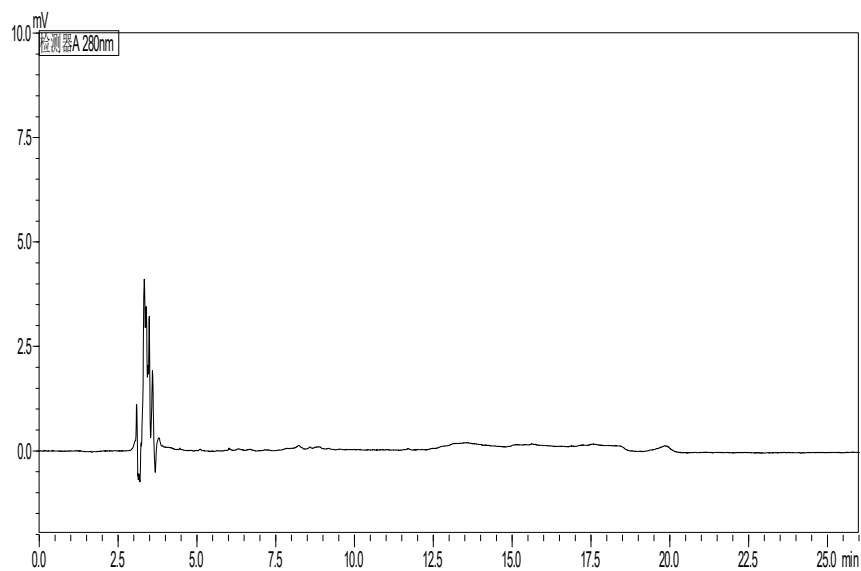


图 2 奶粉基质色谱图

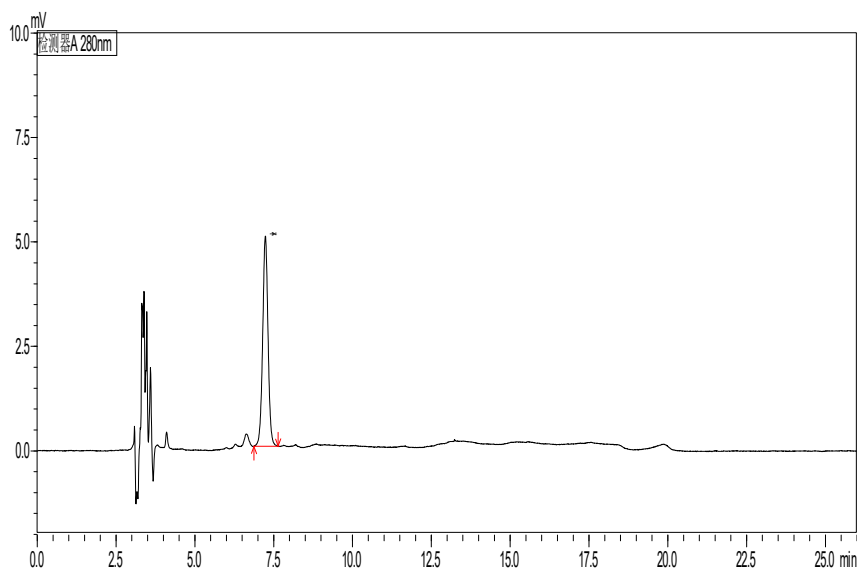


图3 奶粉基质加标色谱图

加标回收率数据

加标量	加标回收率
100 mg/Kg	107.97%

由图3可知，经过 SelectCore Heparin 固相萃取柱净化的奶粉样品，目标物峰型优良，无杂质干扰，并且加标回收率符合检测要求。

Tips 1: 在配制磷酸盐缓冲溶液的时候，标准要求用 10 mol/L 来进行调节 pH，但是我们在做的时候，发觉氢氧化钠溶液浓度较高时，调节磷酸盐缓冲溶液 pH 较为困难并且会影响其他蛋白的共洗脱，因此我们建议氢氧化钠溶液浓度为 1 mol/L 最佳；

Tips 2: 标准要求的分析柱规格是 Xbridge Protein BEH C4 3.5 μ m, 4.6 \times 250mm，流速 1.5ml/min，柱温 60 $^{\circ}$ C，试验证明，这个流速柱压压力较高，并且长期在这么高的柱温下对色谱柱寿命不太好，我们选择纳谱分析的 ChromCore 300 C4-T 5 μ m, 4.6 \times 250mm，经过验证后的流动相梯度程序，流速是 1.0ml/min，柱温是 30 $^{\circ}$ C，这个方法相比标准方法来说，系统压力较小、分析柱寿命提高、分离度满足要求，更重要的是，出峰速度比标准图谱也快了 3 分钟，可以加快样品分析时间。