

三种鲜牛奶中免疫球蛋白 IgG 的提取与检测

背景

免疫球蛋白因其独特的功能活性，备受乳制品行业的关注，但目前乳品中免疫球蛋白的定量检测依然是难点，GB/T 5009.194-2003 中使用到的 HiTrap 1mL Protein G HP 柱在实际检测中会出现目标物与杂蛋白难以分离、积分不准确的问题，会造成检测结果偏高；而采用我们创新性的 SelectCore Protein G 亲和固相萃取后，再用高效体积排阻色谱法进行分析，峰型对称、重现性好，检测结果准确可靠。本实验研究对比了两个方法的谱图及测定的数据，并且对方法的精密度、准确度进行了总结，另外也对亲和柱的使用次数进行了初步验证。

适用范围

参照 GB/T 5009.194-2003 保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定，采用亲和固相萃取结合高效体积排阻色谱法。本方法适用于鲜牛奶中免疫球蛋白 IgG 含量的测定。

实验步骤

1、试剂的准备

0.05 mol/L pH6.5 的 PBS 缓冲溶液：使用 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 进行配置；

冰乙酸溶液：准确吸取 3 mL 冰乙酸定容至 1 L 水中，再使用低浓度的 NaOH 溶液调节 pH 至 3.0。

2、样品的制备

光明鲜牛奶、光明优倍鲜牛奶、光明致优全鲜乳：准确称取试样 2.0 g（精确至 0.001 g），用 0.05 mol/L pH6.5 的 PBS 缓冲溶液稀释至 25 mL，摇匀，通过 0.45 μm 微孔滤膜后备用。

3、固相萃取方法

活化：SelectCore Protein G 亲和柱，依次使用 5.0 mL 水、10.0 mL 0.05 mol/L pH6.5 的 PBS 缓冲溶液活化；

上样：取步骤 2 中制备好的光明鲜牛奶溶液 10 mL 或光明优倍鲜牛奶、光明致优全鲜乳溶液 5 mL 上样至固相萃取柱上，弃去流出液；

淋洗：使用 5.0 mL 0.05 mol/L pH6.5 的磷酸盐缓冲溶液淋洗，弃去淋洗液；

洗脱：用 4 mL 冰乙酸溶液洗脱，收集全部洗脱液，并用冰乙酸溶液定容至 5.0 mL，混匀；

洗脱液直接使用高效液相色谱仪进行测定。

4、高效体积排阻液相色谱仪器条件

Column: BioCore SEC-300, 5 μm

Dimension: 4.6×250 mm

Mobile Phase: 150 mmol/L 氯化钠溶于 20 mmol/L PBS 缓冲溶液中 (pH7.0)

Flow rate: 0.5 mL/min

Temperature: 30 °C

Injection: 10 μL

Detection: UV 214 nm

5、GB/T 5009.194-2003 方法液相色谱仪器条件

Column: HiTrap 1mL Protein G HP

Mobile Phase: A) 50 mmol/L PBS 缓冲溶液 (pH6.5)

B) 50 mmol/L 甘氨酸盐酸缓冲溶液 (pH2.5)

Gradient: t(min)	A	B
0	100	0
4.5	100	0
5.5	0	100
15	0	100
15.5	100	0
22	100	0

Flow rate: 0.4 mL/min

Injection: 20 μ L

Detection: UV 280 nm

实验谱图

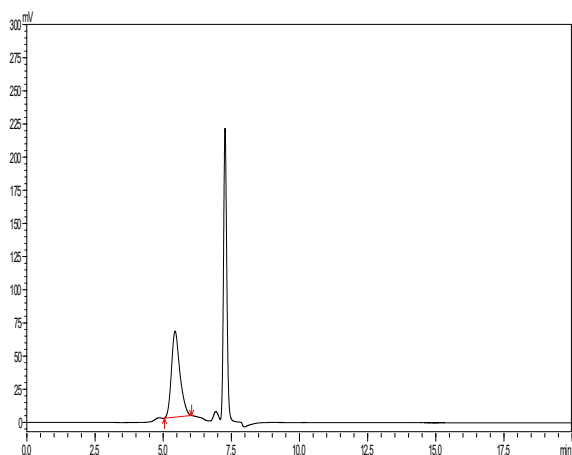


图 1: 免疫球蛋白 IgG 标准品高效体积排阻色谱图

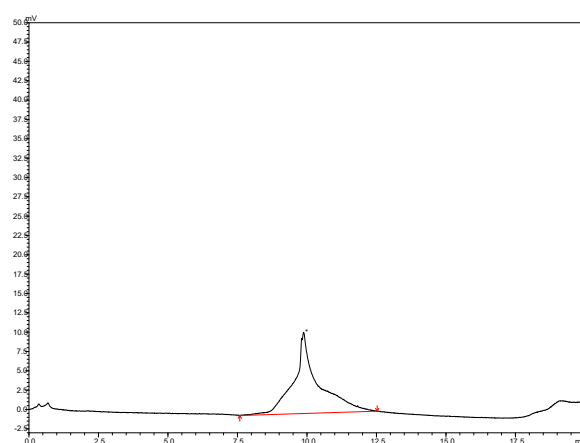


图 2: 免疫球蛋白 IgG 标准品 GB/T 5009.194-2003 方法色谱图

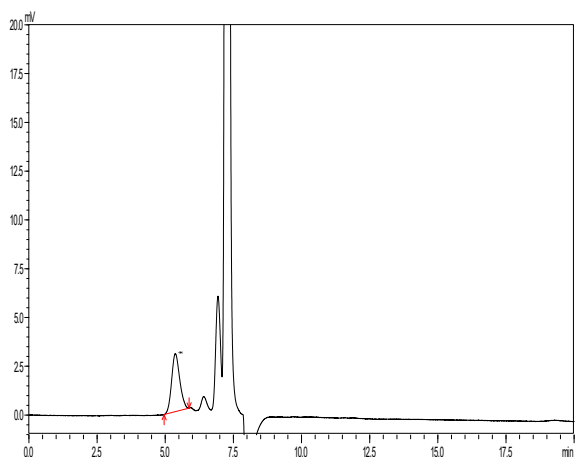


图 3: 光明鲜牛奶高效体积排阻色谱图

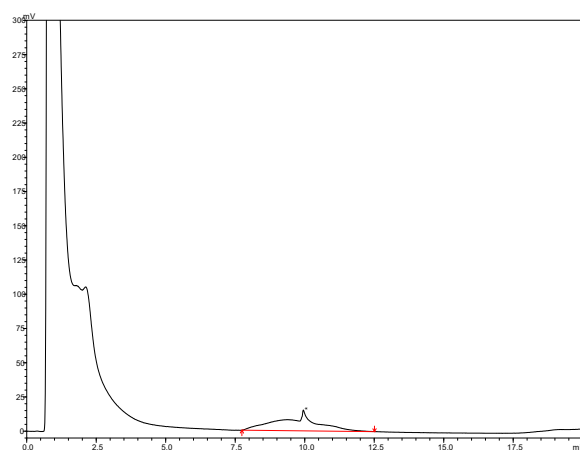


图 4: 光明鲜牛奶 GB/T 5009.194-2003 方法色谱图

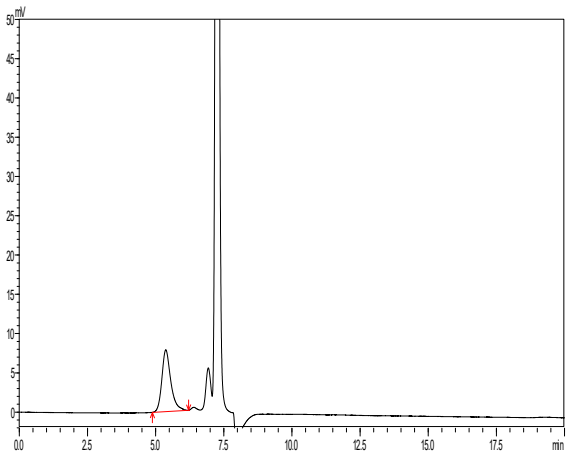


图 5: 光明优倍鲜牛奶高效体积排阻色谱图

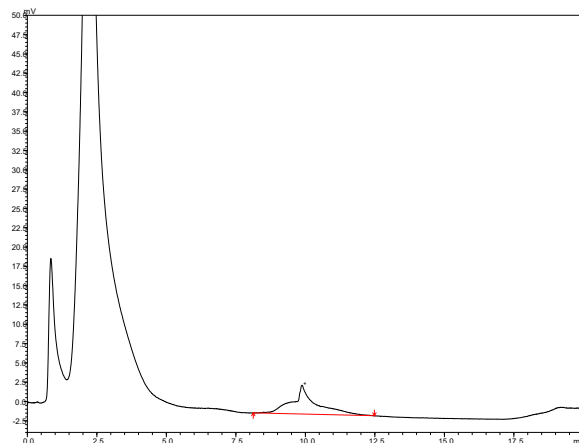


图 6: 光明优倍鲜牛奶 GB/T 5009.194-2003 方法色谱图

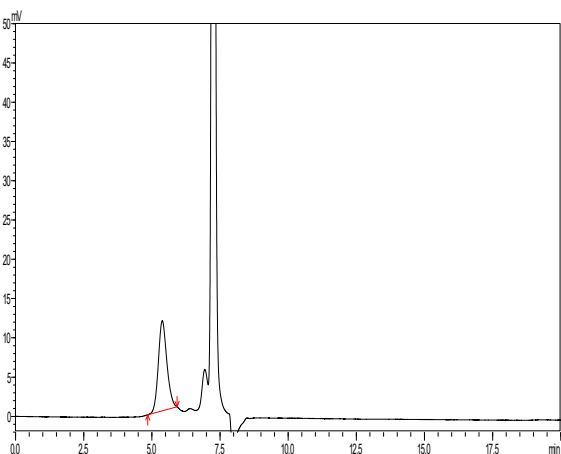


图 7: 光明致优全鲜乳高效体积排阻色谱图

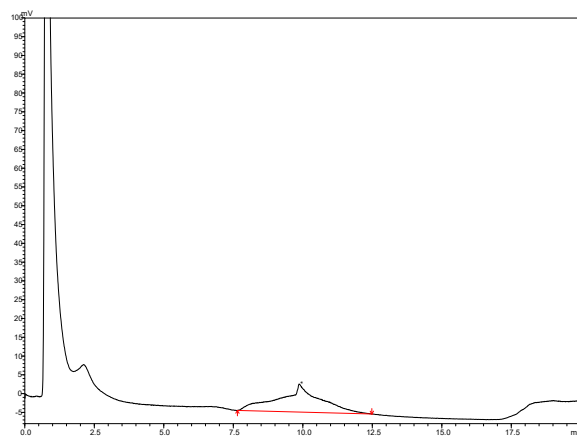


图 8: 光明致优全鲜乳 GB/T 5009.194-2003 方法色谱图

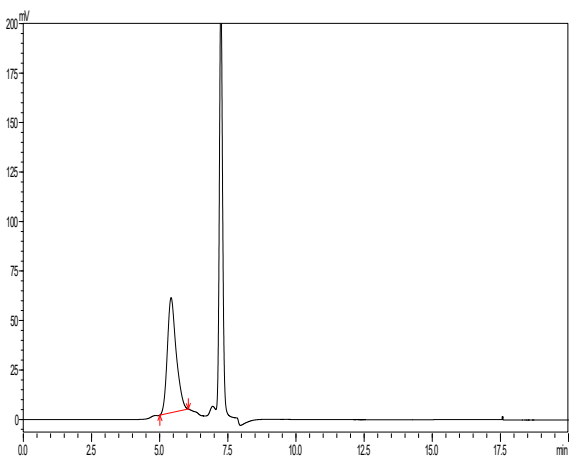


图 9: 光明致优全鲜乳加标 (加标量: 1.25 mg/g) 高效体积排阻色谱图

免疫球蛋白 IgG 含量测定结果

样品名称	标示量	亲和固相萃取结合 高效体积排阻色谱 法测得含量	GB/T 5009.194-2003 方法 测得含量
光明鲜牛奶	—	58 mg/L	105 mg/L
光明优倍鲜牛奶	180 mg/L	218 mg/L	432 mg/L
光明致优全鲜乳	220 mg/L	282 mg/L	496 mg/L

加标回收率

样品	加标量	加标回收率
光明致优全鲜乳	1.25 mg/g	101.77%

进样精密度考察

实验过程中，高效体积排阻色谱法使用经 SelectCore Protein G 亲和固相萃取柱处理后光明致优全鲜乳进行连续进样 6 次处理，该分析方法的 RSD 为 0.5%，GB/T 5009.194-2003 方法使用制备好的光明优倍鲜牛奶溶液进行连续进样 6 次处理，该分析方法的 RSD 为 4.3%。

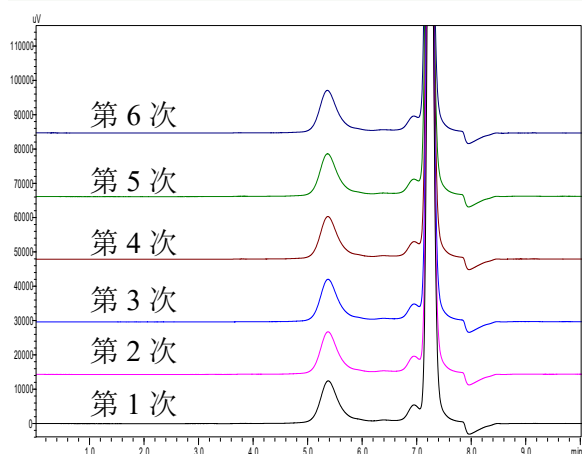


图 10: SelectCore Protein G 亲和固相萃取柱结合高效体积排阻色谱法 6 次进样精密度色谱

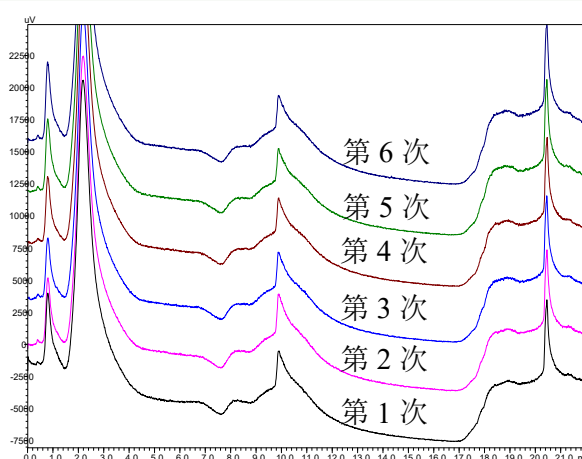


图 11: GB/T 5009.194-2003 方法 HiTrap Protein G HP 6 次进样精密度色谱图

可重复使用次数考察

选取同一支 SelectCore Protein G 亲和固相萃取柱，连续使用制备好的光明致优全鲜乳溶液进行 5 次上样、淋洗、洗脱、高效体积排阻色谱分析操作，测定 5 次重复上样峰面积的 RSD 为 0.7%，说明亲和固相萃取柱在重复使用的情况下峰型正常、杂蛋白干扰少，保证了测定结果的重现性。

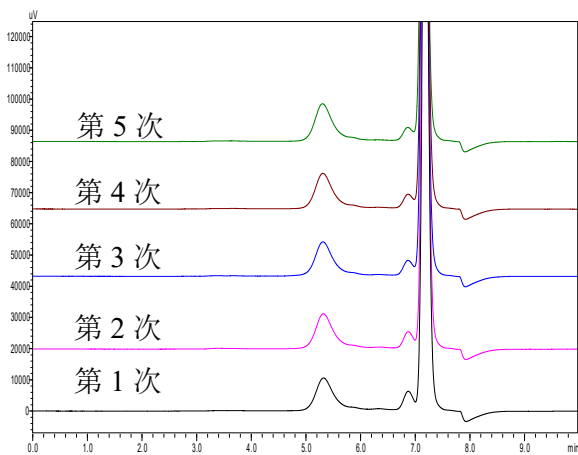


图 12: SelectCore Protein G 亲和固相萃取柱可重复使用次数色谱图


实验讨论

(1) 由图 1-8 中两种不同方法的液相色谱结果可以看出，采用亲和固相萃取处理后的样品使用高效体积排阻色谱法进行分析的色谱结果，目标物基线平稳、峰型优良、与杂蛋白分离度高、可进行准确的积分操作；相比之下 GB/T 5009.194-2003 方法基线波动较大、峰型展宽严重、峰型对称性较差，因目标物与杂蛋白难以分离导致积分操作时可能会将杂蛋白默认为目标物，从而影响后续的含量计算。

(2) 在免疫球蛋白 IgG 含量测定结果表格中可以看出，GB/T 5009.194-2003 方法测得的样品中免疫球蛋白 IgG 含量约为实际含量的两倍，而亲和固相萃取结合高效体积排阻色谱法测得的样品中免疫球蛋白 IgG 含量几乎与样品标示量一致，并且 SelectCore Protein G 亲和固相萃取柱加标回收率符合检测要求，更加确保了检测结果的准确可靠。


(3) 在免疫球蛋白 IgG 含量测定结果表中，光明鲜牛奶这个样品中免疫球蛋白 IgG 含量相对较低，如果选择 GB/T 5009.194-2003 方法可能会无法积分进行测定，而选择纳谱分析的 SelectCore Protein G 亲和固相萃取柱的亲和富集，才能使得低含量的样品也能被准确定量分析。

PP柱在线分析



- 峰型不好
- 杂蛋白共洗出，含量不准确
- 无法知道方法回收率
- 填料有IgG残留
- 柱接头容易崩开

自重力柱前处理后SEC高效体积排阻色谱分析



- 峰型尖锐和对称
- 杂蛋白可以分离开，测定较准确
- 可以知道方法回收率
- 分析柱没有IgG残留
- 色谱接头稳定