

中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA 438—2025

牛奶碱性蛋白的测定 高效液相色谱法

Determination of Milk Basic Protein -High Performance Liquid Chromatography Method

2025 -03 -31 发布

2025- 04-01 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。

本文件的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由黑龙江飞鹤乳业有限公司提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：黑龙江飞鹤乳业有限公司、中柏兴业食品科技(北京)有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司。

本文件主要起草人：孙建国、刘飞、解庆刚、张亮、王象欣、崔东影、高萌、谢阳、程健博、刘亚奇、尹文辉、高红波、常迪。

牛奶碱性蛋白的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了牛奶碱性蛋白含量的测定。

本文件适用于牛奶碱性蛋白原料中牛奶碱性蛋白含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 牛奶碱性蛋白, Milk basic protein

以鲜牛乳为原料，经脱脂、过滤、浓缩、去除酪蛋白等酸性蛋白、阳离子层析、冷冻干燥等工艺制成的蛋白。

4 原理

试样溶解后，经弱阳离子交换色谱柱分离，蛋白在其等电点时呈电中性，与色谱柱离子交换基团无相互作用，样品中的碱性蛋白在对应等电点下被洗脱，紫外检测器检测，面积归一化法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 胰蛋白酶原：CAS：9002-08-8。

5.3 2-吗啉乙磺酸一水合物（ $C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$ ）：分析纯。

- 5.4 氯化钠 (NaCl)：分析纯。
- 5.5 三羟甲基氨基甲烷 (C₄H₁₁NO₃)：分析纯。
- 5.6 乙二胺四乙酸二钠盐二水合物 (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ · 2H₂O)：分析纯。
- 5.7 氢氧化钠 (NaOH)：分析纯。
- 5.8 二乙烯二胺 (C₄H₁₀N₂)：分析纯。
- 5.9 1,3-二氮杂-2,4-环戊二烯 (C₃H₄N₂)：分析纯。
- 5.10 盐酸 (HCl)：36%~38%。
- 5.11 三氟乙酸 (C₂HF₃O₂)：分析纯。
- 5.12 氢氧化钠溶液 (4 g/L)：称取 0.4 g 氢氧化钠 (5.7)，加入 90 mL 水，溶解后，用水定容至 100 mL，混匀。
- 5.13 盐酸溶液 (10%)：吸取 10 mL 盐酸 (5.10)，加入至 80 mL 水中，定容至 100 mL，混匀。
- 5.14 三氟乙酸溶液 (0.1%)：吸取 1 mL 三氟乙酸 (5.11)，加入至 800 mL 水中，定容至 1 L，混匀。
- 5.15 流动相 A (pH=5.0)：分别称取 0.35 g 二乙烯二胺 (5.8)，0.27 g 1,3-二氮杂-2,4-环戊二烯 (5.9) 和 0.49 g 三羟甲基氨基甲烷 (5.5)，加入 900 mL 水溶解，用盐酸溶液 (5.13) 或氢氧化钠溶液 (5.12) 调节 pH 值至 5.0 ± 0.1，用水定容至 1 L，混匀。
- 5.16 流动相 B (pH=11.4)：分别称取 3.5 g 二乙烯二胺 (5.8)，2.7 g 1,3-二氮杂-2,4-环戊二烯 (5.9) 和 4.9 g 三羟甲基氨基甲烷 (5.5)，加入 900 mL 水溶解，用盐酸溶液 (5.13) 或氢氧化钠溶液 (5.12) 调节 pH 值至 11.4 ± 0.1，用水定容至 1 L，混匀。
- 5.17 流动相 C：称取 233.76 g 氯化钠 (5.4)，加入 900 mL 水溶解，用水定容至 1 L，混匀。
- 5.18 流动相 D：水 (5.1)。
- 5.19 试样溶解液：分别取 950 mL 流动相 A (5.15)、5 mL 流动相 B (5.16)、45 mL 流动相 D (5.18)，混匀备用。
- 5.20 等电点标记溶液：称取 10.00 mg 的胰蛋白酶原 (5.2) (精确到 0.01 mg)，加入 1 mL 试样溶解液 (5.19) 溶解。
- 5.21 色谱柱平衡试剂 I：分别称取 1.07 g 2-吗啉乙磺酸一水合物 (5.3) 和 7.31 g 氯化钠 (5.4)，加入 200 mL 水溶解，用氢氧化钠溶液 (5.12) 调节 pH 值至 6.0 ± 0.1，将溶液转移至 250 mL 容量瓶，用水定容至刻度，混匀。
- 5.22 色谱柱平衡试剂 II：分别称取 1.07 g 2-吗啉乙磺酸一水合物 (5.3) 和 0.29 g 氯化钠 (5.4)，加入 200 mL 水溶解，用氢氧化钠溶液 (5.12) 调节 pH 值至 6.0 ± 0.1，将溶液转移至 250 mL 容量瓶，用水定容至刻度，混匀。
- 5.23 色谱柱平衡试剂 III：称取 0.61 g 三羟甲基氨基甲烷 (5.5) 和 1.86 g 乙二胺四乙酸二

钠（5.6）和 0.29 g 氯化钠（5.4），加入 200 mL 水溶解，用氢氧化钠溶液（5.12）调节 pH 值至 8.0 ± 0.1 ，将溶液转移至 250 mL 容量瓶，用水定容至刻度，混匀。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 电子天平：感量 0.01 mg、0.1 mg。

6.3 离心机：转速不低于 12000 r/min。

6.4 pH 计：精度为 0.01。

6.5 涡旋混合器。

7 样品

取有代表性样品 200 g，装入洁净容器作为试样，密封并做好标识，常温下干燥保存。

8 试验步骤

8.1 试样制备

称取试样 0.5 g（精确至 0.1 mg），加入 35 mL 试样溶解液（5.19），漩涡震荡 5 min，用试样溶解液（5.19）定容至 50 mL，混匀，室温条件下 3300 g 离心 10 min，吸取中间清液上机测定。

8.2 测定步骤

8.2.1 色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 液相色谱柱：弱阳离子交换色谱柱（柱长 150 mm，柱内径 4.0 mm，填料孔径 $5 \mu\text{m}$ ）或相当者。
- b) 流速：0.8 mL/min。
- c) 进样量：10 μL 。
- d) 柱温：30℃。
- e) 检测波长：280 nm。
- f) 色谱柱活化条件：见表 1。
- g) 梯度洗脱条件：见表 2。

表 1 色谱柱活化条件

时间 (min)	流速 mL/min	试剂
30.0	0.5	平衡试剂 I
30.0	0.5	平衡试剂 II
30.0	0.5	平衡试剂 III

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	流动相 C (%)	流动相 D (%)
0	95.0	0.5	0.0	4.5
2.0	95.0	0.5	0.0	4.5
12.0	0.0	10.0	20.0	70.0
15.0	0.0	10.0	20.0	70.0
15.1	95.0	0.5	0.0	4.5
25.0	95.0	0.5	0.0	4.5

表 2 流动相梯度洗脱条件

8.2.2 测定

8.2.2.1 等电点标记溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，等电点标记溶液（5.20）和试样溶液（8.1）分别进行上机测定。等电点标记溶液和试样溶液的色谱图见附录 A.1、A.2。

8.2.2.2 试样总蛋白含量的测定

参照 GB 5009.5，检测试样中总蛋白质含量。

8.2.2.3 积分区域的选择

胰蛋白酶原的等电点（pI）为 7.55，酸性蛋白在胰蛋白酶原左侧出峰，碱性蛋白在胰蛋白酶原右侧出峰，因此选择胰蛋白酶原的峰谷（约 7 min 左右）为碱性蛋白自动积分的起点，选择保留时间 15 min 为其自动积分的终点，计算碱性蛋白峰面积为 A_c ；从梯度初始至 15 min 时间内对所有峰进行自动积分，计算总蛋白峰面积 A_n 。采用面积归一化法进行牛奶碱性蛋白比例计算。碱性蛋白积分示例见附录 B。

9 试验数据处理

9.1 牛奶碱性蛋白占蛋白质的比例计算

试样中牛奶碱性蛋白占总蛋白质的含量以 X 计，单位为百分比（%），按式（1）计算：

$$X = \frac{A_c}{A_n} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A_c ——碱性蛋白峰面积；

A_n ——总蛋白峰面积；

计算结果保留 2 位有效数字。

9.2 牛奶碱性蛋白的计算

试样中牛奶碱性蛋白以 m_2 计，数值以克每百克（g/100 g）表示，按公式（2）计算：

$$m_2 = m_1 \times X \dots\dots\dots (2)$$

式中：

m_1 ——试样中总蛋白质含量（8.2.2.2），单位为克每百克（g/100 g）；

X ——试样中牛奶碱性蛋白占总蛋白质的百分含量，单位 %；

计算结果保留 2 位有效数字。

10 精密度

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 20%。

附录 A

(资料性)

等电点标记溶液和试样溶液高效液相色谱图

等电点标记溶液 (10 mg/mL) 高效液相色谱图见图 A.1。

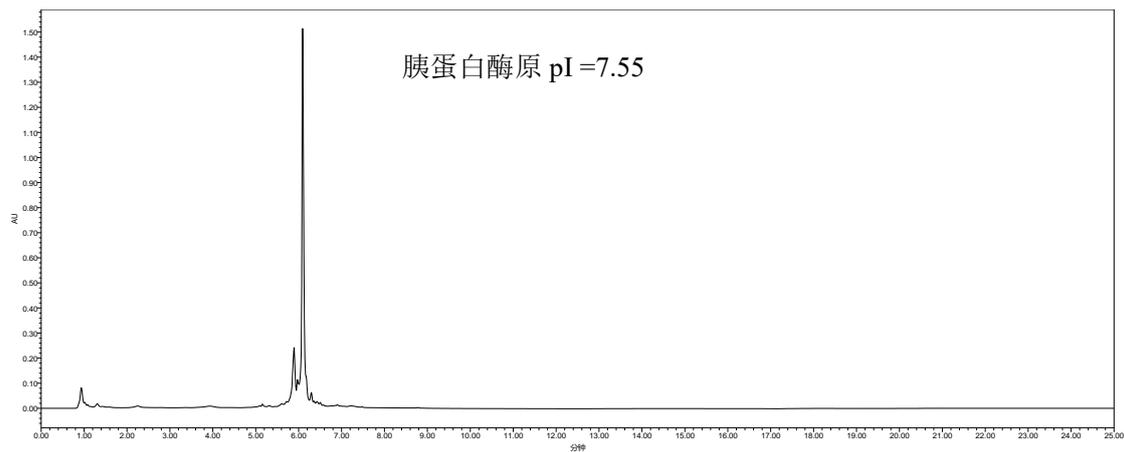


图 A.1 等电点标记溶液 (10 mg/mL) 高效液相色谱图

等电点标记溶液 (10 mg/mL) 和试样溶液的高效液相色谱图见图 A.2。

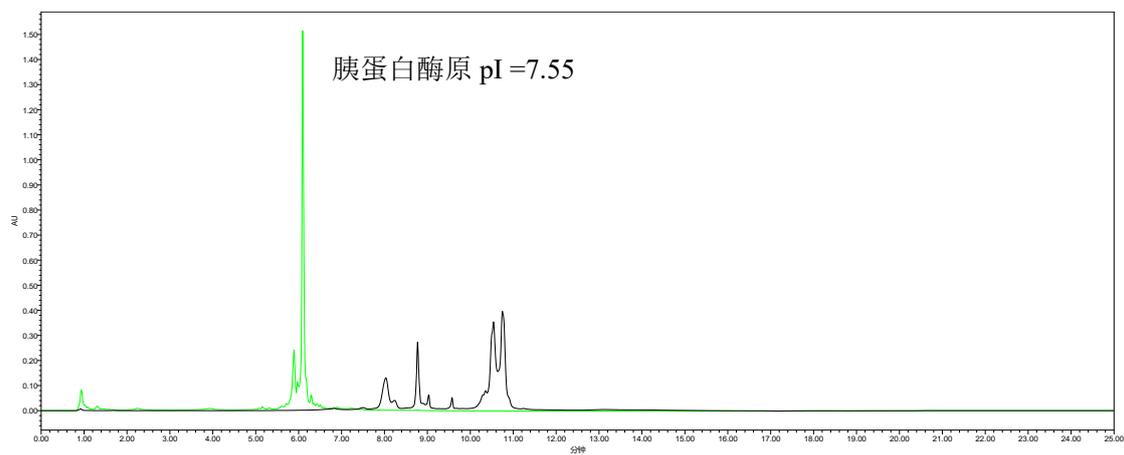


图 A.2 等电点标记溶液 (10 mg/mL) 和试样溶液高效液相叠加色谱图

附录 B

(资料性)

碱性蛋白样品积分示例

碱性蛋白样品积分示例图见图 B.1。

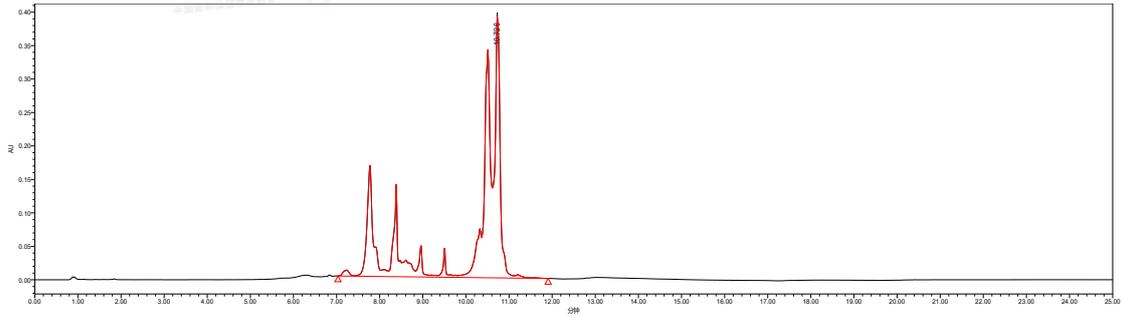


图 B.1 碱性蛋白样品积分示例图