

ICS 67.100.10

C



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××
代替GB/T 5413.2—1997

婴幼儿食品和乳品中乳清蛋白的测定

Determination of whey protein in foods for infants and young children,

raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替GB/T 5413.2—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 乳清蛋白的测定》。

本标准与GB/T 5413.2—1997相比，主要变化如下：

——增加了第一法高效液相色谱—质谱联用法；

——第二法仅测定婴幼儿食品和乳品中 α -乳清蛋白的含量，不是测定婴幼儿食品和乳品中乳清蛋白的总量；

——第二法采用高效液相色谱-胶渗透色谱法，而不再使用聚丙烯酰胺平板凝胶电泳法(SDS-PAGE)。

本标准附录A、附录B、附录C、附录D均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 5413—1985、GB/T 5413.2—1997。

婴幼儿食品和乳品中乳清蛋白的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中乳清蛋白的测定方法。

本标准第一法适用于婴幼儿食品和乳粉中非变性的牛乳 α -乳白蛋白和牛乳 β -乳球蛋白的遗传变异体— β b-乳球蛋白和 β a-乳球蛋白的测定；第二法适用于婴幼儿食品和乳品中 α -乳白蛋白的测定。

本标准第一法中 α -乳白蛋白、 β b-乳球蛋白和 β a-乳球蛋白的检出限均为5 mg/100g，定量测定范围均为5~50 mg/100g；第二法检出限为50mg/100g。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准；然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

第一法 高效液相色谱—质谱联用法

3 原理

用氯化钠溶液溶解试样，三氟乙酸调整pH，沉淀试液中的酪蛋白，离心、过滤。滤液中的乳清蛋白经反相色谱柱分离，电喷雾离子源离子化。按离子的质荷比（m/z）分离离子，测定各种乳清蛋白色谱峰的离子强度。以人乳 α -乳白蛋白为内标物质，采用内标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 氯化钠。

4.2 辛基苯基聚氧乙烯醚（Triton X-100）：纯度不低于99%。

4.3 三氟乙酸。

4.4 乙腈：色谱纯。

4.5 标准物质：

a) 牛乳 α -乳白蛋白，纯度不低于85%；

b) 牛乳 β -乳球蛋白，纯度不低于90%。其中的 β b-乳球蛋白和 β a-乳球蛋白应经液相色谱分离（6.2），在波长280 nm处检测吸收强度。根据色谱峰的面积，由面积归一法分别确定各自的含量比值。见附录A中的图A.1。

4.6 内标物质：人乳 α -乳白蛋白，纯度不低于85%。

4.7 试验用溶液

4.7.1 2%三氟乙酸溶液：吸取 2 mL 三氟乙酸，用水稀释至 100 mL。

4.7.2 0.08%三氟乙酸溶液：吸取 0.8 mL 三氟乙酸，用水稀释至 1000 mL。

4.7.3 0.08%三氟乙酸/乙腈溶液：吸取 0.8 mL 三氟乙酸，用乙腈稀释至 1000 mL。

4.7.4 0.3 mol/L 氯化钠/辛基苯基聚氧乙烯醚溶液：称取 17.53 g 氯化钠，用水溶解，加入 2 mL 辛基苯基聚氧乙烯醚（4.2），用水稀释至 1000 mL。

4.7.5 待测试样空白基质溶液（不含牛乳 α -乳白蛋白和牛乳 β -乳球蛋白）：称取 1.00 g 待测试样于 100 mL 烧杯中，用约 70 mL 0.3 mol/L 氯化钠/辛基苯基聚氧乙烯醚溶液（4.7.4）溶解，2%三氟乙酸溶液（4.7.1）调整 pH 至 4.6，移入 100 mL 容量瓶中，并用 0.3 mol/L 氯化钠/辛基苯基聚氧乙烯醚溶液（4.7.4）定容至刻度。转移至烧杯中，用均质机（5.6）均质 10 min，静置 30 min，移入微波消解管中，在微波消解仪中消解（控制条件：功率 250 w、温度 150 °C、时间 10.5 min）。冷却至室温移入 50 mL 离心管中，离心 15 min（温度 4°C，转速 15000 r/min）。取上清液，用 0.22 μ m 微孔滤膜的一次性滤头（5.9）过滤。滤液用液相色谱—质谱联用仪分离检测。

获得色谱—质谱图后，对照附录 A 中的图 A.2，在相应的保留时间处，应不含牛乳 α -乳白蛋白、牛乳 β -乳球蛋白和牛乳 β a-乳球蛋白。将滤液转移到塑料瓶中，在约-20°C 电冰箱内保存，备用。

4.7.6 牛乳 α -乳白蛋白标准储备溶液：称取牛乳 α -乳白蛋白 10 mg（准确至 0.1 mg）于 10 mL 容量瓶中，用水定容，配制成 1 mg/mL 的储备溶液。将溶液转移到塑料瓶中，在约-20°C 电冰箱内保存，备用。

4.7.7 牛乳 β -乳球蛋白标准储备溶液：称取牛乳 β -乳球蛋白 10 mg（准确至 0.1 mg），以下同 4.7.6 的操作和保存。

4.7.8 牛乳 α -乳白蛋白、牛乳 β -乳球蛋白混合标准储备溶液：分别用 1 mL、2 mL 移液管吸取 1 mL 牛乳 α -乳白蛋白标准储备溶液（4.7.6）和 2 mL 牛乳 β -乳球蛋白标准储备溶液（4.7.7）于 10 mL 容量瓶中。用待测试样空白基质溶液（4.7.5）稀释为牛乳 α -乳白蛋白 100 μ g/mL、牛乳 β -乳球蛋白 200 μ g/mL（牛乳 β -乳球蛋白和牛乳 β a-乳球蛋白的准确含量由 4.5 获得）的混合标准储备溶液。在 0°C~4°C 电冰箱内保存。

4.7.9 人乳 α -乳白蛋白内标溶液：准确称取人乳 α -乳白蛋白 10 mg（精确至 0.1 mg）于 10 mL 容量瓶中，用待测试样空白基质溶液（4.7.5）稀释为人乳 α -乳白蛋白 1 mg/mL 的内标溶液。溶液转移至塑料瓶后，在约-20°C 电冰箱内保存。

4.7.10 标准系列溶液：临用前，用待测试样空白基质溶液（4.7.5）将牛乳 α -乳白蛋白、牛乳 β -乳球蛋白混合标准储备溶液（4.7.8）分别稀释为 5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、30 μ g/mL、40 μ g/mL、50 μ g/mL 的标准系列溶液。定容前分别加入人乳 α -乳白蛋白内标溶液（4.7.9）。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-质谱联用仪：带电喷雾离子源；质量范围，1 质荷比（m/z）~3000 质荷比（m/z）；分辨率，0.1 原子质量单位（AMU）。

5.2 色谱柱：硅烷基 C18 柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.7 μ m，孔径 30 nm（300 Å）。

注：市场购入的色谱柱，将孔径 30 nm 标识为 300 Å。

- 5.3 天平：感量 0.01 g；0.0001 g。
- 5.4 微波消解仪：配有大于 100 mL 的消解管。
- 5.5 旋涡混合器：振荡转速不低于 2400 r/min。
- 5.6 均质机：转速不低于 13500 r/min。
- 5.7 离心机：转速不低于 15000 r/min。
- 5.8 具塞塑料离心管：1.5 mL，50 mL。
- 5.9 一次性微孔滤头：带 0.22 μm 微孔滤膜（水相系）。
- 5.10 台式 pH 计：精度 0.01pH。

6 分析步骤

6.1 试液的制备

称取试样 0.2 g（精确至 0.1 mg，约含乳清蛋白 0.2 mg）于 50 mL 烧杯中。准确加入 500 μL 人乳 α -乳白蛋白内标溶液（4.7.9）和 8 mL（约）0.3 mol/L 氯化钠 / 辛基苯基聚氧乙烯醚溶液（4.7.4）。用玻璃棒搅拌至完全溶解，再用 0.08 % 三氟乙酸溶液（4.7.2）调整 pH 至 4.60。移入 10 mL 容量瓶中，用 0.3 mol/L 氯化钠 / 辛基苯基聚氧乙烯醚溶液（4.7.4）定容至刻度。转移至烧杯中，用均质机（5.6）均质 10 min，静置 30 min，移入 30 mL 离心管中，离心（温度 4 $^{\circ}\text{C}$ ，转速 15000 r/min）15 min。吸取上清液，用 0.22 μm 微孔滤膜的一次性滤头（5.9）过滤。保留滤液，备测。

6.2 液相色谱参考条件

- 6.2.1 流动相：A相，0.08% 三氟乙酸溶液（4.7.2）；B相，0.08%三氟乙酸 / 乙腈溶液（4.7.3）。
- 6.2.2 梯度洗脱：按表1给出的条件洗脱。

表1 （色谱分离）梯度洗脱条件

时间（min）	流动相 A	流动相 B	梯度变化曲线
0	62%	38%	0
2.0	60%	40%	6
5.4	57%	43%	6
5.5	0%	100%	6
5.9	0%	100%	1
6.0	62%	38%	6

6.2.3 流动相流动速度：0.25 mL/min。

6.2.4 色谱柱柱温：40 ℃。

6.2.5 试液温度：20 ℃。

6.2.6 进样体积：1 μL。

6.3 质谱参考条件

6.3.1 离子源控制条件：按表2给出的数值控制。

表2 离子源控制条件

控制项目	控制数值
毛细管电压 (kV)	3.50
锥孔电压 (V)	90
射频透镜1电压 (V)	40
射频透镜2电压 (V)	0.5
离子源温度 (℃)	120
锥孔反吹气流量 (L/h)	50
脱溶剂气温度 (℃)	350
脱溶剂气流量 (L/h)	600
电子倍增电压 (V)	650

6.3.2 扫描方式

6.3.2.1 全扫描（定性）：质荷比（m/z）范围，800（m/z）～3000（m/z）；质谱全扫描图见附录B。

6.3.2.2 选择区间扫描（定量）：按表3给出的质量数范围扫描。

表3 各种乳清蛋白的选择区间扫描质量数范围

乳清蛋白的种类	质量数范围（质荷比，m/z）
牛乳α-乳白蛋白	2357～2368

人乳 α -乳白蛋白（内标）	2340~2350
牛乳 β b-乳球蛋白	1656~1666
牛乳 β a-乳球蛋白	1665~1675

6.4 标准曲线的绘制

分别配制标准系列溶液5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ （4.7.10）。以标准系列溶液的浓度为横坐标，对应色谱质谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线图；或计算回归方程式。牛乳 α -乳白蛋白、人乳 α -乳白蛋白（内标）、牛乳 β b-乳球蛋白、牛乳 β a-乳球蛋白色谱—质谱图见附录A中的图A.3。

6.5 试液的测定

6.5.1 按照 6.2 和 6.3 确立的条件，测定试液（6.1）和标准系列溶液（4.7.10）的离子强度，内标法分别定量试样中的牛乳 α -乳白蛋白、牛乳 β b-乳球蛋白和牛乳 β a-乳球蛋白。

牛乳 α -乳白蛋白、人乳 α -乳白蛋白、牛乳 β b-乳球蛋白、牛乳 β a-乳球蛋白的色谱—质谱图，见附录A中的图A.3。

色谱保留时间：牛乳 α -乳白蛋白 2.42 min，人乳 α -乳白蛋白 4.76 min，牛乳 β b-乳球蛋白 5.09 min，牛乳 β a-乳球蛋白 5.53 min。

6.5.2 测定试液时，所得色谱峰的丰度响应值应在标准曲线线性范围内。如超越线性范围，应重新按6.1步骤制备试液，直至丰度响应值出现在标准曲线线性范围内。

6.6 空白试验

不称取试样，按 6.5 的步骤做空白，确认不含有干扰待测组分的物质。

7 结果计算和表示

试样中非变性牛乳 α -乳白蛋白、牛乳 β b-乳球蛋白和牛乳 β a-乳球蛋白的含量，以质量分数 X 计，数值以毫克每百克（ $\text{mg}/100\text{g}$ ）表示，按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V}{m \times 1000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C —— 试样溶液中三种乳清蛋白的含量值，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V —— 试样的定容体积的数值，单位为毫升（ mL ）；

m —— 试样的质量的数值，单位为克（ g ）。

结果计算到小数点后两位。

7 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 10 %。

第二法 凝胶渗透色谱法

8 原理

本方法描述了使用液相色谱（HPLC）对原材料和婴儿配方奶粉样品中 α -乳清蛋白进行定量分析的过程。其分离方式为凝胶渗透色谱（GPC）。该方法使用 6M 盐酸胍缓冲液作为样品溶解液和 HPLC 流动相。用巯基乙醇作为还原试剂，破坏蛋白质中的硫-硫（S-S）化学键，形成展开的单体结构。样品由 10 mg 蛋白质当量的物质溶解于流动相中。将两根 TSK-GEL G3000SW_{XL}（7.8 mm×30.0 cm）柱和一根保护柱串联，足以分离原料中的主要蛋白质。用紫外检测法在 280 nm 对洗脱物进行分析。

9 试剂和材料

本方法所用水为 GB/T 6682 规定的一级水。

9.1 NaH₂PO₄ ACS 试剂纯。

9.2 Na₂HPO₄ 分析纯。

9.3 EDTA ACS 试剂纯。

9.4 NaOH, 50%溶液 分析纯。

9.5 盐酸, 36.5-38.0% 试剂纯。

9.6 盐酸胍 试剂纯。

9.7 α -乳清蛋白参比标样 分析纯。

9.8 β -乳球蛋白参比标样 分析纯。

9.9 2-巯基乙醇试剂纯。

9.10 乙腈, HPLC 级。

10 仪器和设备

10.1 配有以下配件的由惰性材料组成的液相色谱系统或类似的稳定的 HPLC:

10.1.1 带有 seal wash 功能的 HPLC 泵, 能维持 0.1 mL/min ~ 0.5 mL/min 的流速。

10.1.2 系统控制器。

10.1.3 自动进样器, 能反复注射 50 μ L 和 1.5 mL 小瓶的装置。

10.1.4 紫外-可见光检测器, 能在 280 nm 监控柱的洗提液。

10.1.5 脱气装置。

10.1.6 能产生定量报告的计算机软件。

10.1.7 分析柱: 两根 TSK-GEL G3000SW_{XL} (7.8×300 mm, P/N: 08541) 或 Phenomenex Biosep 柱: SEC S3000 (P/N 00H-2146-K0)。

10.1.8 保护柱: TSK-保护柱 SW_{xL} (6.0×40 mm, P/N: 08543) 或 Phenomenex 保护柱 (7.8×75 mm; P/N 03C-2146-K0)。

10.1.9 HPLC 流动相再循环器。(首选。如果没有, 无须循环流动相。)

10.2 天平

10.2.1 分析天平, 感量 0.01 mg。

10.2.2 托盘天平, 感量 0.01 g。

10.3 玻璃仪器/材料

- 10.3.1 10, 1000, 2000 mL 容量瓶。
- 10.3.2 0.5 mL, 1.0 mL 和 2.0 mL 玻璃“A”级容量移液管。
- 10.3.3 微量移液器, 10-100 μL 。
- 10.3.4 1000 mL 量筒。
- 10.3.5 孔径 0.45 μm 的尼龙-66 滤膜, 或其它类似产品。
- 10.3.6 2000 mL 阔口锥形瓶, 或其它类似产品。
- 10.3.7 2 mL 棕色瓶。
- 10.3.8 涡流发生器。
- 10.4 溶剂过滤系统。
- 10.4.1 溶剂贮器。
- 10.4.2 带有夹子和过滤架的 1000 mL 烧瓶。
- 10.4.3 水性滤膜 (0.45 μm)。
- 10.4.4 真空泵。

11 分析步骤

11.1 流程图 (参见附录 D)

11.2 贮存缓冲溶液

11.2.1 称取 56.6 g Na_2HPO_4 , 3.5 g NaH_2PO_4 和 2.9 g EDTA, 并转移至 1000 mL 烧杯中。用 800 mL 水溶解。

11.2.2 测量 pH 值。如有必要, 用盐酸 (减小 pH) 或氢氧化钠 (增加 pH) 调节至 7.5 ± 0.1 。

11.2.3 移至 1000 mL 容量瓶中, 并用水稀释至刻度。

11.3 6 M 盐酸胍流动相

11.3.1 称取 1146 g 盐酸胍于 2000 mL 阔口锥形瓶中, 加入 200 mL 贮存缓冲溶液。

11.3.2 用磁力搅拌杆搅拌, 用水将该溶液稀释至大约 1600 mL。

11.3.3 用氢氧化钠将 pH 值调节至 7.5 ± 0.1 (NaOH, 50% 溶液)。

11.3.4 使用带 0.45 μm 滤膜的溶剂过滤装置进行过滤。如果要更换滤膜一至两次, 则可提高过滤时的流速。

11.3.5 转移到 2000 mL 容量瓶中, 并用水稀释至刻度。

11.4 校准标准

11.4.1 分别准确称取 (至 0.01 mg) 约 25 mg 的 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白参比标准物质至 10 mL 容量瓶中, 并分别用 10 mL 水溶解。如有必要, 可用超声波处理器处理, 但不要加热。这些溶液分别是 α -乳清蛋白 (α -S1) 和 β -乳球蛋白 (β -S1) 标准贮存溶液。

11.4.2 用移液管分别移取 0.25 mL α -S1 和 β -S1 至 10 mL 容量瓶中, 并用流动相稀释至刻度。这些就是低浓度标准工作溶液 WS1。

11.4.3 用移液管分别移取 0.5 mL α -S1 和 β -S1 至 10 mL 容量瓶中, 并用流动相稀释至刻度。这些就是中间浓度标准工作溶液 WS2。

11.4.4 用移液管分别移取 1.0 mL α -S1 和 β -S1 至 10 mL 容量瓶中, 并用流动相稀释至刻度。这些就是高浓度标准工作溶液 WS3。

11.4.5 用一次性刻度移液管分别移取 1.5 mL WS1、WS2 和 WS3 至不同的自动采样小瓶中, 并在每个小瓶中加入 10 μL 2-巯基乙醇。剧烈震荡这些溶液 10 秒钟, 室温下静置 2 小时。准备进行注射。

11.4.6 按下列公式计算 WS1、WS2 和 WS3 中的 α -乳清蛋白的浓度:

$$\text{WS1 (mg/mL)} = [\text{wt (mg)/10 mL}] \times \text{P1} \times \text{P2} \times [0.5 \text{ mL}/10 \text{ mL}]。$$

$$WS2 \text{ (mg/mL)} = [\text{wt (mg)/10 mL}] \times P1 \times P2 \times [1 \text{ mL/10 mL}]。$$

$$WS3 \text{ (mg/mL)} = [\text{wt (mg)/10 mL}] \times P1 \times P2 \times [2 \text{ mL/10 mL}]。$$

式中：

P1 ——用紫外吸收法测得总蛋白的含量，以小数表示（从化验证书上得到）。

P2 ——聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得的 α -乳清蛋白的标准纯度，以小数表示（从化验证书上得到）。

Wt (mg) —— α -S1 中， α -乳清蛋白参比标准物的重量，以 mg 为单位。

如需了解样品的校正标准效价计算，请参阅附录 C。

注：样品的所有面积计数均在校正标准的面积计数范围内，只允许使用内插法，不允许使用外插法，这一点是非常重要的。如有必要，可以使用更低的标准工作浓度来分析 α -乳清蛋白的“天然”含量。

11.5 样品制备

11.5.1 如果不知道蛋白质浓度，则使用 LECO 或凯式定氮法，以 $N \times 6.25$ 来测量蛋白质的百分含量（% P）。

11.5.2 按照下列方程称取含 10 mg 当量蛋白质的原料或婴儿配方乳粉至 10 mL 容量中：

$$\text{样品重量 (mg)} \equiv \frac{1000}{\%P}$$

11.5.3 加入大约 8 mL 流动相，用超声波处理样品约 30 分钟或直到样品完全溶解。冷却至室温，并加入流动相至刻度。

11.5.4 使用移液枪移取 1.5 mL 该溶液至自动采样瓶，加入 10 μ L 2-巯基乙醇并盖好。剧烈震荡该溶液 10 秒钟。

11.5.5 室温下静置样品约 2 小时，备用。

11.6 色谱法

11.6.1 在分析之前，保证 HPLC 系统在附录 C 中的“通用方法参数”声明的参数条件下进行操作。这些方法信息是基于用以控制 Shimadzu LC10Ai 设备的 Shimadzu CLASS-VP 软件提出的。在不同的软件和设备中，参数可能会发生变化。

11.6.2 设定系统的停止时间为 60 分钟，紫外检测波长为 280 nm。

11.6.3 柱平衡

11.6.3.1 按顺序串联 GPC 保护柱和两根 GPC 分析柱。

11.6.3.2 新柱在运输时，通常保留在磷酸盐缓冲液中。用水流过新柱，在 30 至 60 分钟内，使流速从 0.1 mL/min 逐渐增加到 0.5 mL/min。连续冲洗大约 1 小时。

11.6.3.3 将流速由 0.5 mL/min 逐渐减少至 0.1 mL/min，并更换贮器中的流动相。

11.6.3.4 在 30 至 60 分钟内，使柱的流速从 0.1 mL/min 逐渐增加到 0.5 mL/min，避免压力剧烈波动，保持流速在 0.5 mL/min。

11.6.3.5 注射 10 组样品，使柱达到饱和，等待进行洗脱的峰值。这有助于柱平衡的调节。该步骤在进行过程中，无须等待每次注射都完成后再进行下一次注射。

11.6.3.6 柱和设备的长期护理，请参阅 6.9。请注意不要让流动相在柱内或泵内沉淀。

11.6.4 当达到稳定的基线时，注射 50 μ L 标准溶液（WS2，请参阅 6.4.3）来检查其色谱功能。按式(2)计算 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白的分辨因子 R：

$$R = 1.177x \frac{(t_2 - t_1)}{(w_{(1/2)1} + w_{(1/2)2})} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

t_2 和 t_1 —— α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白各自的保留时间，分钟。

$w_{(1/2)1}$ 和 $w_{(1/2)2}$ ——测得的这两个峰的相应半峰宽。

11.6.5 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白之间的分辨因子“R”应大于 1.0，以达到最佳分析效果。如果未大于 1.0，在调整之前，请勿运行。只有在对数据进行仔细的核查后，略低的分辨率才能得到可靠的数据。

11.6.6 再注射 WS2 至少两次，直到保留时间和面积可重复。当连续三次测得面积的相对标准偏差 RSD < 2%时，则认为该系统可以进行校准了。

11.7 校准及样品注入

11.7.1 当达到满意的分离效果时，分别注射 50 μ L WS1、WS2 和 WS3 校准标准溶液。 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白的大致保留时间为 33 分钟和 35 分钟。

11.7.2 通过多点外标法标定软件，根据面积画出一条线性的标定曲线。不要通过零点。标定曲线的测定系数， R^2 ，至少应为 0.990。

11.7.3 顺序注入 50 μ L 原料或婴儿配方奶粉样品。

11.7.4 在结束运行前及各组样品数量测试完成后，重复进行标定。其斜率 m 的变化，应小于 3.0%（标准精度效果判据）。只有当满足该标准精度效果判据时，样品的结果方可接受。

11.7.5 所有的样品均须进行一式两份的测试，除非个别位点的测试表明，重复测得的数据间没有显著差异。所有的对照样也须进行一式两份的测试。只有当对照样的结果满足对照限定值（通过一段时间内的数据收集建立），样品的结果方可接受。

11.8 积分

11.8.1 记录标准 α 乳清蛋白积分结束的准确时间。如果 α 乳清蛋白峰后有一个峰，则该终点时间将用于成品样品的分析。如果出现了该峰，则应将其清除。

11.9 系统维护

11.9.1 在连续使用时，可以用流动相以 0.2 mL/min 的流速循环，维持系统。

11.9.2 若 1 至 2 周不使用时，应用水对系统进行洗涤，避免盐酸胍沉淀。洗涤时断开柱之间的连接，因为柱不能用水进行洗涤。为再平衡系统，用流动相进行冲洗；当所有的水都被洗出后，重新连接各柱。使流速逐渐从 0.1 mL/min 增加到 0.5 mL/min，以避免压力激变，连续循环至少 24 小时，并确认在样品注入前，恢复了仪器的分辨率。

11.9.3 通过流速的缓慢变化来避免以聚合物为基础的柱的压力激变。

11.9.4 在大约每 100 次样品注入后，或系统表现出反压力显著增加时（例如，从 70 bar 增加至 85 bar），保护柱应进行翻转清洗。清洗步骤包括：先用水进行完全冲洗，再以 100%乙腈或甲醇冲洗 2 至 3 小时，流速逐渐从 0.1 mL/min 增加至 0.5 mL/min。分析和保护柱上样品注入的次数应可追溯，以利于系统维护。

11.9.5 在长期贮存时，请使用制造商推荐的缓冲液（含有 0.05%叠氮钠和 0.1 M Na_2SO_4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH 6.7)）来替代柱中的溶剂。

11.9.6 回收利用流动相最多两次，应设定一个回收利用程序，只进行“良好的”流动相回收利用。不能使用回收的流动相来制备标准溶液和样品溶液。

11.10 安全注意事项

11.10.1 在实施本方法时，需要适当的个人防护设备（PPE），譬如安全眼镜、实验服和手套等。特别值得注意的是，应避免皮肤接触盐酸胍和巯基乙醇。

11.10.2 在该过程中操作酸、碱和试剂的实验室工作人员应了解其潜在的危害和PPE的正确使用方法。实验室工作人员应查询相关的材料安全性数据表（MSDS），了解相关信息。

11.10.3 在使用前，确保所有的玻璃器具无碎片和细微裂纹。

12 结果计算和表示

12.1 按式（3）校准斜率计算样品中 α 乳清蛋白的含量。可以通过色谱仪软件自动进行：

$$\frac{g\alpha-lac}{100mL/g} = \frac{(A_{SPL} - C) \times 10mL \times 100mL/g}{斜率 \times wtSpl(mg)} \dots\dots\dots(3)$$

式中：

C ——校准方程的截距；

A_{SPL} ——样品峰面积；

$wtSpl$ ——样品重量，单位为毫克（mg）。

12.2 样品中 α 乳清蛋白的按式（4）计算。报告结果应以 g/100g 为单位表示。

$$\frac{g\alpha-lac}{100g} = \frac{(A_{SPL} - C) \times 10mL \times 100g}{斜率 \times wtSpl(mg)} \dots\dots\dots(4)$$

式中：

C ——校准方程的截距；

A_{SPL} ——样品峰面积；

$wtSpl$ ——样品重量，单位为毫克（mg）。

附录 A

(资料性附录)

牛乳 β b-乳球蛋白和牛乳 β a-乳球蛋白的色谱—光谱图
待测试样空白基质溶液色谱—质谱图和内标物质色谱—质谱图

A.1 牛乳 β b-乳球蛋白和牛乳 β a-乳球蛋白的色谱—紫外光谱图，见图 A.1。

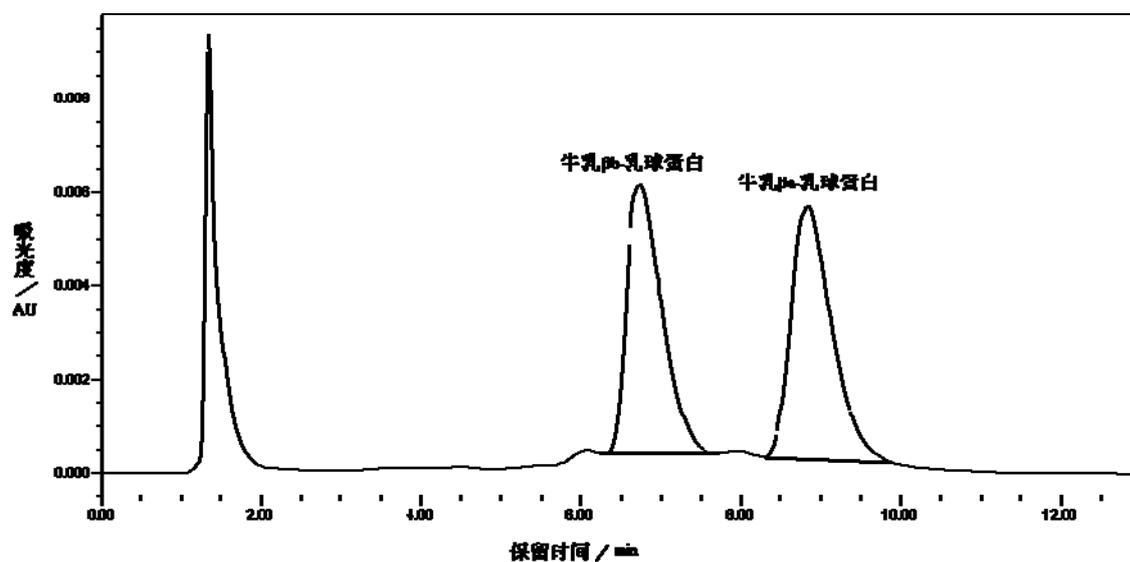


图 A.1 牛乳 β b-乳球蛋白和牛乳 β a-乳球蛋白的色谱—紫外光谱图

A.2 待测试样空白基质溶液色谱—质谱图，见图 A.2。

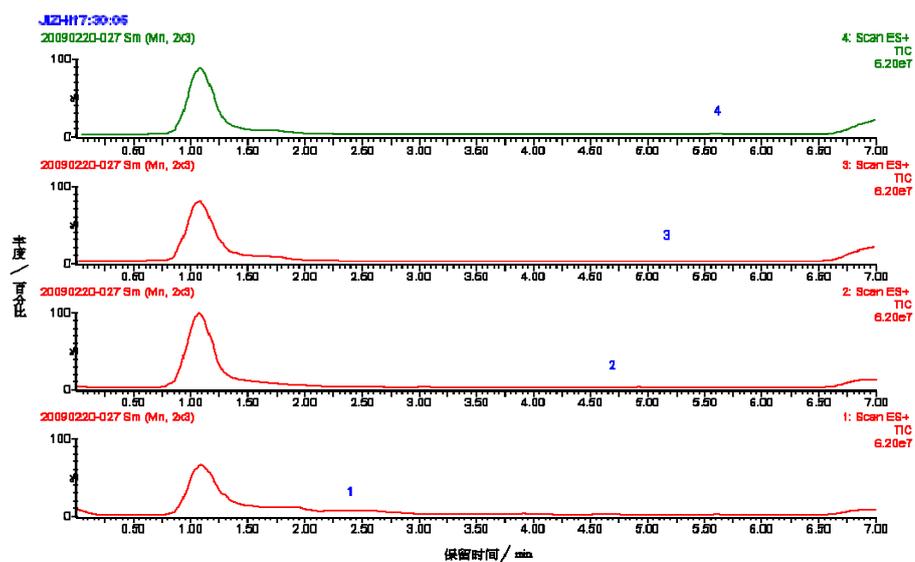
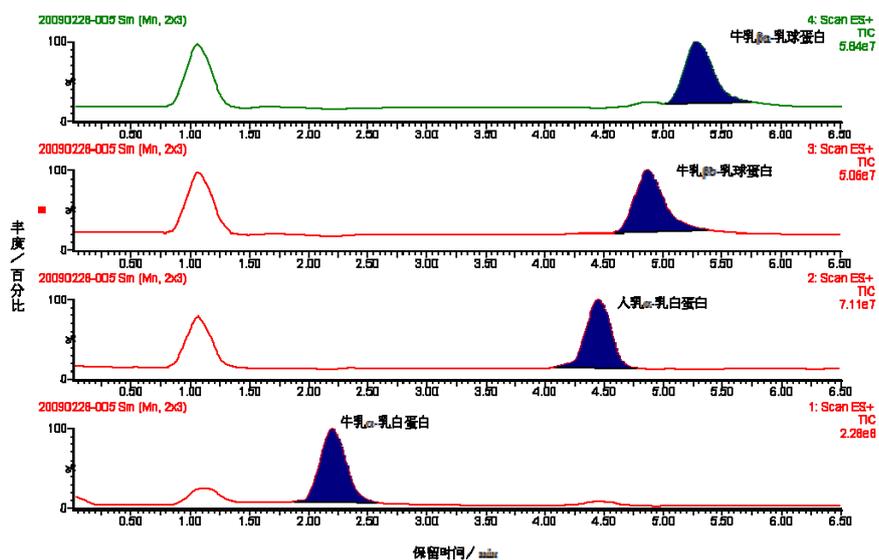


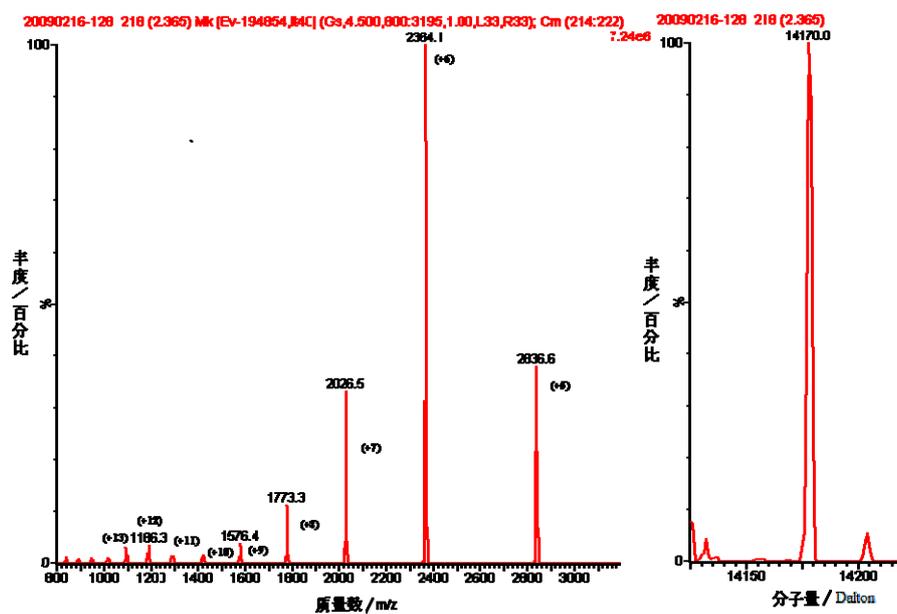
图 A.2 待测试样空白基质溶液色谱-质谱图

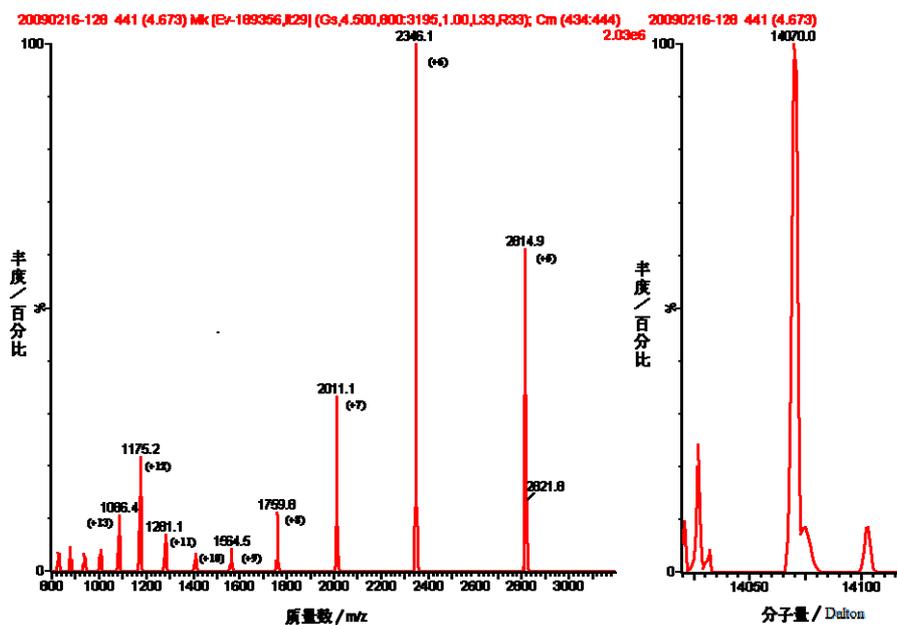
A.3 牛乳 α -乳白蛋白、人乳 α -乳白蛋白（内标）、牛乳 β b-乳球蛋白、牛乳 β a-乳球蛋白色谱-质谱图，见图 A.3。

图 A.3 牛乳 α -乳白蛋白、人乳 α -乳白蛋白（内标）、牛乳 β b-乳球蛋白、牛乳 β a-乳球蛋白色谱-质谱图

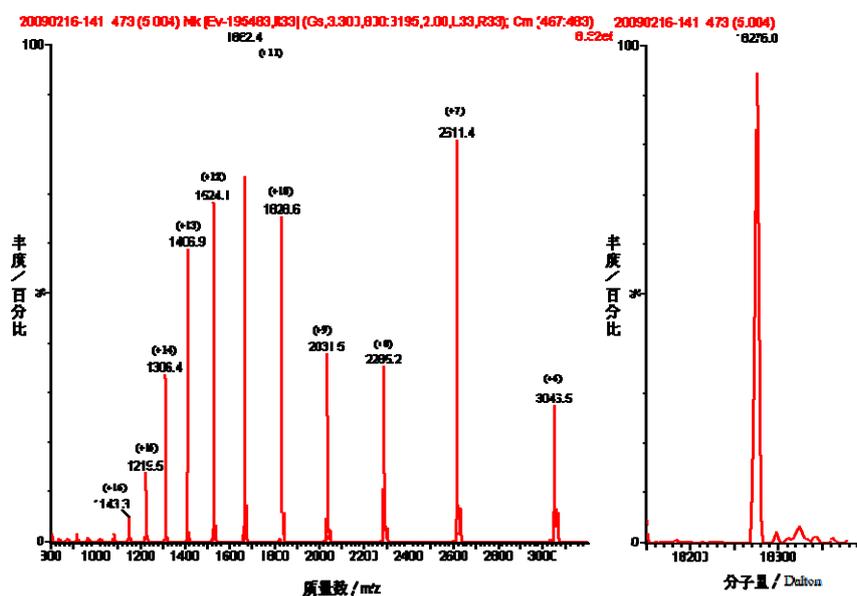
附录 B

(资料性附录)

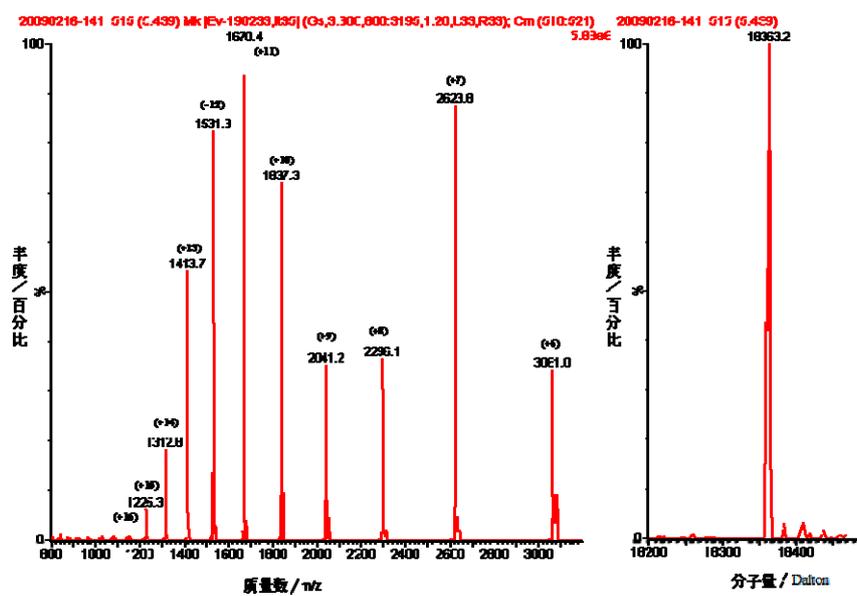
牛乳 α -乳白蛋白、人乳 α -乳白蛋白 (内标)牛乳 β -乳球蛋白、牛乳 β a-乳球蛋白全扫描质谱图和分子量计算图B.1 牛乳 α -乳白蛋白全扫描质谱图和分子量计算图, 见图 B.1。图 B.1 牛乳 α -乳白蛋白全扫描质谱图和分子量计算图B.2 人乳 α -乳白蛋白 (内标) 全扫描质谱图和分子量计算图, 见图 B.2。

图 B.2 人乳 α -乳白蛋白（内标）全扫描质谱图和分子量计算图

B.3 牛乳 β b-乳球蛋白全扫描质谱图和分子量计算图，见图 B.3。

图 B.3 牛乳 β b-乳球蛋白全扫描质谱图和分子量计算图

B.4 牛乳 β a-乳球蛋白全扫描质谱图和分子量计算图，见图 B.4。

图 B.4 牛乳 β -乳球蛋白全扫描质谱图和分子量计算图

附录 C

(资料性附录)

 α -乳清蛋白标准样的标准效价计算试例

批号= 095K7005

P1 = 0.91 (由化验证书而得)

P2 = 0.98 (由化验证书而得)

重量 = 25.00 mg $\frac{\text{wt} \times P1 \times P2 \times (0.25, 0.50, 1.00)}{10 \times 10} = \text{mg/mL}$

标准样:

	25%	50%	100%
α - 乳清蛋白	0.055738	0.111475	0.222950

