

TB

团 体 标 准

T/TDSTIA 007—2019

奶及奶制品中 β -乳球蛋白的测定 液相色谱法

Determination of β -lactoglobulin in milk and dairy products - Liquid chromatography method

2019-11-26 发布

2019-12-01 实施

天津市奶业科技创新协会

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准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。

本标准由国家奶业科技创新联盟提出，适用于联盟内部实施优质乳工程的企业，其他单位可参考。

本标准起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室（北京），农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心（北京）。

本标准主要起草人：郑楠，李鹏，张养东，王加启，钟建萍，叶巧燕。



奶及奶制品中 β -乳球蛋白的测定 液相色谱法

1 范围

本标准规定了奶及奶制品中 β -乳球蛋白的液相色谱测定方法。

本标准适用于生乳、液态奶和乳粉。

本标准生乳、液态奶的定量限为25.0 mg/kg；乳粉的定量限为50.0 mg/kg。

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

3 原理

试样溶液调节至pH 4.6，使酪蛋白和变性的乳清蛋白沉淀，而未变性的 β -乳球蛋白仍保留在溶液中，离心后可以在高效液相色谱仪上，经反相蛋白质分离柱分离，紫外光检测，外标法定量。

4 试剂或材料

除非另有说明，所有试剂均为分析纯和符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 乙酸（ CH_3COOH ）。

4.2 三氟乙酸溶液：量取 1 mL 三氟乙酸（色谱纯），用水定容至 1 L，混匀。

4.3 三氟乙酸乙腈溶液：量取 1 mL 三氟乙酸（色谱纯），用乙腈（色谱纯）定容至 1 L，混匀。

4.4 β -乳球蛋白对照品：CAS：9045-23-2，纯度 $\geq 90.0\%$ 。

4.5 β -乳球蛋白标准储备溶液（10 mg/mL）：将 β -乳球蛋白对照品按对照品证书提供的纯度换算后称量，用水定容至 10 mL。于-20 ℃ 保存，有效期 3 个月。

4.6 β -乳球蛋白标准中间溶液（200 mg/L）：准确移取 β -乳球蛋白标准储备溶液（4.4）200 μL ，用水定容至 10 mL。现用现配。

4.7 β -乳球蛋白标准系列工作溶液：准确移取一定量的标准中间溶液（4.5），用水稀释定容，配制成 β -乳球蛋白浓度分别为 0 mg/L、40.0 mg/L、80.0 mg/L、120.0 mg/L、160.0 mg/L 和 200.0 mg/L 的标准工作溶液，现用现配。

4.8 微孔滤膜：水系，0.22 μm 。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.2 天平：感量0.01 g、0.1 mg。

5.3 容量瓶：10mL、25 mL。

5.4 旋涡混合器。

5.5 离心机：转速不低于10000 r/min。

5.6 pH计：精度为0.01。

6 样品制备

6.1 生乳、液态奶：取有代表性样品约200 g，混匀，装入洁净容器作为试样，密封并做好标识，于0℃~4℃冰箱内保存。

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

7 试验步骤

7.1 生乳、液态奶

称取试样5 g（精确到0.01g），加水定容至25.0 mL，混匀，加入乙酸调节pH为4.60，混匀静置1 h。离心15 min。吸取上清液，过微孔滤膜后待测。

7.2 乳粉

称取试样2 g（精确到0.01g），加水定容至25.0 mL，混匀，加入乙酸调节pH为4.60，混匀静置1 h。离心15 min。吸取上清液，过微孔滤膜后待测。

7.3 测定步骤

7.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱：Xbridge Protein BEH C4柱（柱长250 mm，柱内径4.6 mm，填料粒径3.5 μm），或相当者。

流动相：A：三氟乙酸溶液（4.2），B：三氟乙酸乙腈溶液（4.3）。

检测波长：210 nm。

梯度洗脱条件见表1。

流速：1.5 mL/min。

柱温：60℃。

进样量：30 μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间/（min）	A/（%）	B/（%）
0	95	5
6.5	62	38
10	62	38
22	59	41

22.5	40	60
27.5	40	60
28	95	5
35	95	5

7.3.2 测定

取标准系列溶液（4.7）和试样溶液（7.1或7.2）上机测定。以β-乳球蛋白B和β-乳球蛋白A的峰面积之和为纵坐标，以标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，得到标准曲线回归方程。β-乳球蛋白B和β-乳球蛋白A标准溶液的液相色谱图参见附录A。

8 试验数据处理

试样中β-乳球蛋白含量为 X ，数值以毫克每千克(mg/kg)表示，按下式计算：

$$X = \frac{c \times V_1 \times 1000}{m \times 1000} \times f$$

式中：

c —被测组分曲线计算浓度，单位为毫克每升(mg/L)；

V_1 —样液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m —试样质量，单位为克(g)；

f —稀释倍数

1 000—换算系数

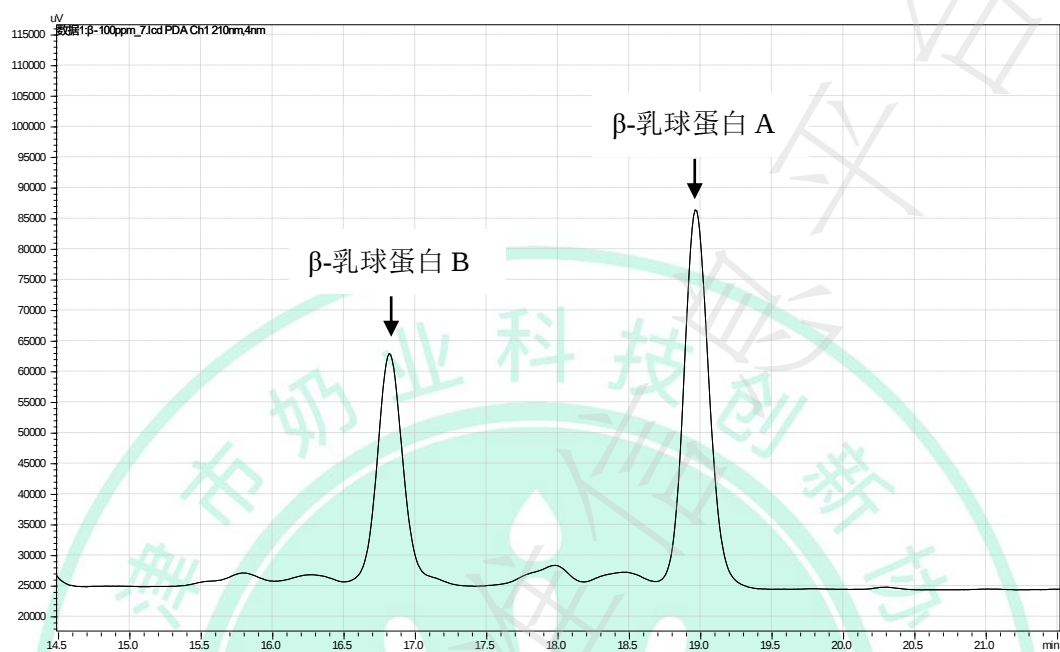
计算结果保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的15%。

附录A

(资料性附录)

 β -乳球蛋白高效液相色谱图图 A β -乳球蛋白溶液 (100 mg/L) 高效液相色谱图