

高效液相色谱法测定婴幼儿奶粉中乳铁蛋白的含量

LC-299

摘要： 本文将肝素免疫亲和柱应用到乳铁蛋白检测前处理的净化过程中，利用岛津 Essentia LC-16 液相色谱仪建立一种高效、快捷的婴幼儿奶粉中乳铁蛋白的测定方法。参照《食品安全国家标准食品中乳铁蛋白的测定》（征求意见稿）对样本进行前处理并上机测定。结果表明：乳铁蛋白在 1~200 mg/L 浓度范围内线性关系良好，相关系数在 0.9998 以上，方法检出限在 0.20 mg/L；10 mg/L 标准品溶液连续 6 针进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.027% 和 0.48%；不同浓度的加标回收率结果在 70.57~76.16% 之间。

关键词： 高效液相色谱仪 肝素免疫亲和柱 乳铁蛋白 婴幼儿奶粉

乳铁蛋白是一种可以结合铁的糖蛋白，具有 700 多个氨基酸残基序列的单体糖蛋白，并连接 1~2 个配体糖（配体糖成分约占 7%），等电点为 8.2 左右，分子量在 80 KDa 左右。乳铁蛋白一共有两个铁离子结合位，每个结合位可以与一个铁离子结合，能高效促进铁的吸收，具有广谱抗菌作用、抗病毒作用、抗氧化作用、抗癌作用、调节机体免疫反应等功能。

乳铁蛋白是近年来国内外研究速度较快的一种营养添加剂，对婴幼儿或者成人的健康具有重要意义。GB14880-2012 我国《食品营养强化剂使用标准》中规定婴幼儿配方食品中乳铁蛋白的最大允许使用量为 1.0 g/kg。

现已有多篇文献研究报道用高效液相色谱方法检测乳制品中的乳铁蛋白含量，前处理方法包括：（1）样品采用脱脂，酸法去除酪蛋白，硫酸铵沉淀富集，

纤维素滤膜过滤净化等方法进行预处理；（2）通过额外加入二价铁离子使乳铁蛋白的构型更利于沉淀，然后用体积分数 60% 乙醇溶液沉淀蛋白除去糖分，再用醋酸盐缓冲液提取乳铁蛋白并分离掉酪蛋白进行预处理；（3）样品采用 0.5 mol/L 氯化钠溶液溶解，稀释至适当浓度作为预处理方法。

肝素是一种含硫酸酯的酸性多糖，有文献报道乳铁蛋白可与这类多负电荷分子糖胺多糖通过亲和层析结合。本法中采用 SHIMSEN 肝素免疫亲和柱作为目标化合物纯化和浓缩的前处理步骤。

《食品安全国家标准食品中乳铁蛋白的测定》（征求意见稿）中规定固态试样中乳铁蛋白的检出限为 0.006 g/kg 定量限为 0.02 g/kg。本文采用岛津高效液相色谱仪建立了乳铁蛋白的测定方法，灵敏度高、重现性好，适用于婴幼儿奶粉中乳铁蛋白的检测。

实验部分

1.1 仪器、试剂与试剂

1.1.1 仪器

岛津 Essentia LC-16 高效液相色谱仪，配置信息如下：

系统控制器：CBM-16

自动进样器：SIL-16

柱温箱：CTO-16

输液泵：LC-16

脱气机：DGU-20A 5R

紫外检测器：SPD-16

色谱工作站：Labsolutions Essentia Ver. 5.98

1.1.2 试剂与试剂

牛乳铁蛋白（纯度 95%）；磷酸氢二钠（分析纯）；氯化钠（分析纯）；三氟乙酸（HPLC 级）；乙腈（HPLC 级）；Milli-Q 纯净水；肝素免疫亲和柱 1 mL（柱容量 \geq 3 mg）。

1.2 试剂配制

三氟乙酸溶液 (0.05%)：吸取 0.5 mL 三氟乙酸，用纯净水定容到 1000 mL。

磷酸盐缓冲液 I：称取 7.10 g 磷酸氢二钠，58.40 g 氯化钠，加适量纯净水溶解，用磷酸调节 pH 至 8.0 ± 0.2 ，加纯净水稀释至 1000 mL。

磷酸盐缓冲液 II：称取 28.40 g 磷酸二氢钠，加 800 mL 纯净水溶解，用磷酸调 pH 至 6.0 ± 0.2 ，用纯净水定容到 1000 mL。

1.3 分析条件

色谱柱：ShimNex WP C4-S (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm; 岛津 (上海) 实验器材有限公司; P/N: 380-01236-19)

流动相初始比例：乙腈 -0.05% 三氟乙酸 (15 : 85, v : v)

流速：1.0 mL/min

进样量：50 μL

波长：280 nm

柱温：30 °C

表 1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
0	Pump	B.Conc	15
20	Pump	B.Conc	85
22	Pump	B.Conc	15
30	Controller		

1.4 混合标准溶液的制备

牛乳铁蛋白标准储备液 (5 mg/mL)：精密称取乳铁蛋白 50 mg (精确至 0.1 mg)，加入纯净水溶解，定容至 10 mL 容量瓶，配成浓度为 5 mg/mL 的标准储备液，0-4 °C 保存。

牛乳铁蛋白标准中间液 (0.5 mg/mL) 吸取 1.0 mL 的乳铁蛋白标准储备液，用磷酸盐缓冲液 I 定容至 10 mL，现用现配。

牛乳铁蛋白标准系列工作液：移取一定量的标准中间液，用磷酸盐缓冲液 I 稀释定容，配置成浓度分别为 1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 的标准系列工作溶液。

■ 样品前处理

称取混合均匀的 5 g (精确至 0.01 g) 奶粉样品于烧杯中，加入温热 (温度不超过 50 °C) 的磷酸缓冲盐 II，搅拌使样品溶解，分次将样品转移至 50 mL 容量瓶中，用磷酸缓冲盐 II 定容至刻度后，充分混匀后转移至离心管，在 4 °C 条件下，10000 r/min 离心 12~15 min，取中间液于另一支 50 mL 离心管中，在 4 °C 条件下，10000 r/min 离心 12~15 min，取中间液待净化。

肝素免疫亲和柱先加入 5 mL 磷酸盐缓冲液 II 活化后，准确移取 10.0 mL 样液，靠重力下滴，待样液完全流出后，用 10.0 mL 磷酸盐缓冲液 II 淋洗，弃去全部流出液。用 5.0 mL 磷酸盐缓冲液 I 洗脱，收集全部流出液，用磷酸盐缓冲液 I 定容至 5 mL，过 0.22 μm 滤膜，上机测试。

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

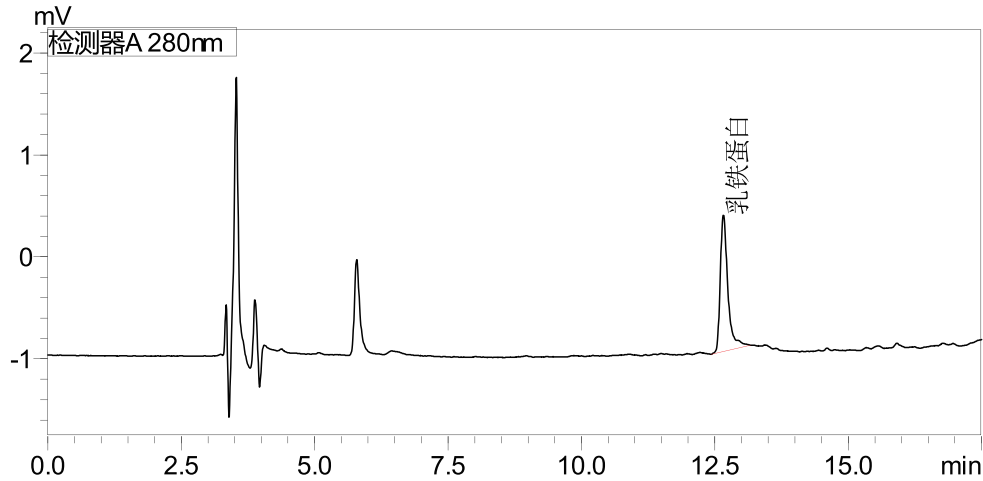


图1 5 mg/L 乳铁蛋白标准溶液色谱图

3.2 校准曲线、检出限和定量限

将乳铁蛋白标准工作溶液，按“1.3 分析条件”进行测定，使用外标法定量。以峰面积为纵坐标，对应的标准工作溶液浓度为横坐标，绘制校准曲线，如图 2 所示。校准曲线线性关系良好，相关系数均大于 0.9998，准确度在 87.1%~112.5% 之间。LabSolutions 软件依据信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)。校准曲线方程、相关系数、检出限及定量限结果见表 2。

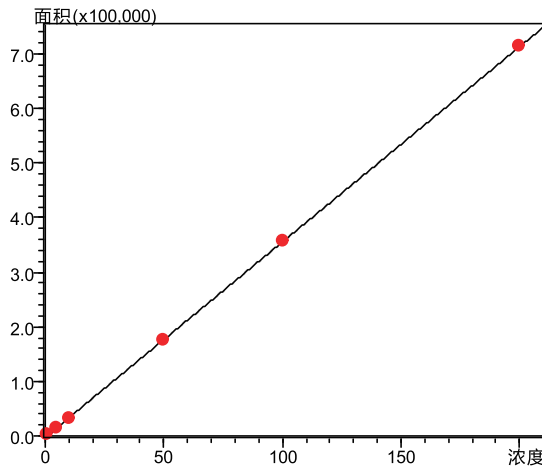


图2 乳铁蛋白校准曲线

表2 校准曲线、检出限和定量限结果

化合物	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (mg/L)	准确度 %	检出限 (mg/L)	定量限 (mg/L)
乳铁蛋白	$Y = 3578.36X - 2313.2$	0.9998	1 - 200	87.1-112.5	0.20	0.60

3.3 精密度

取 10 mg/L 标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。结果显示：乳铁蛋白保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.027%，0.48%，表明仪器精密度良好。

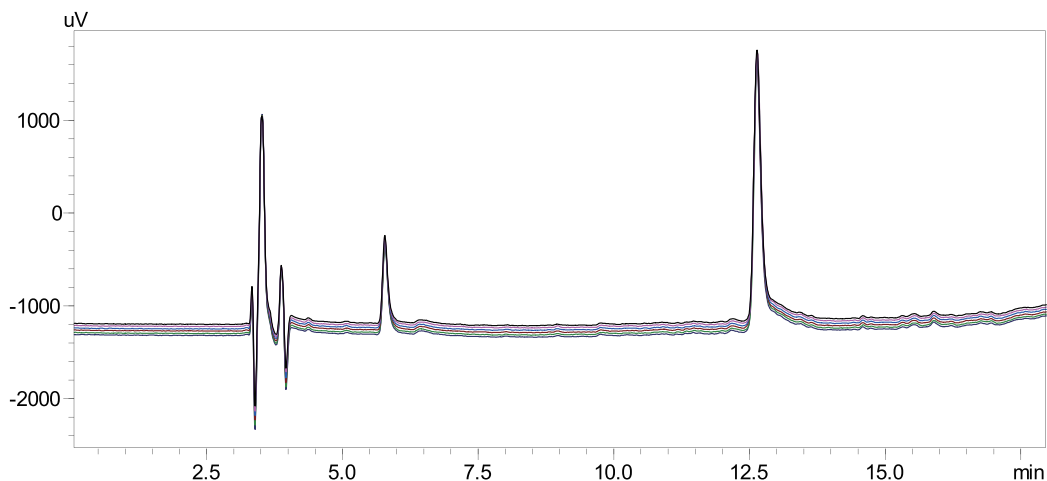


图 3 10 mg/L 乳铁蛋白重复性

表 3 乳铁蛋白标准溶液（10 mg/L）峰面积和保留时间重复性结果（n=6）

	乳铁蛋白	
	峰面积	保留时间
1	33824	12.638
2	34025	12.636
3	33907	12.643
4	33793	12.635
5	33092	12.638
6	33643	12.643
RSD (%)	0.48	0.027

3.4 加标回收率

将所建立的方法用于实际样品分析，同时在此样品中添加浓度为 20 mg/kg，250 mg/kg，500 mg/kg 的乳铁蛋白标准储备液，按照“2. 样品前处理”方法处理后制备供试品溶液，上机分析，考察加标回收率。添加浓度及加标回收率具体结果如表 4 所示，乳铁蛋白不同浓度的加标回收率在 70.57~76.16% 之间。

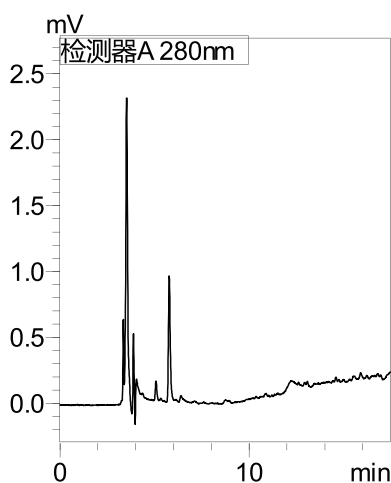


图4 奶粉样品色谱图

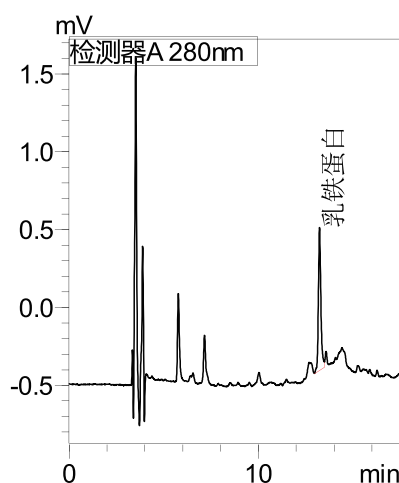


图5 加标 (20 mg/kg) 样品色谱图

表4 乳铁蛋白添加回收率结果

名称	样品中含量 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	加标样品中测得总量 (mg/kg)			平均回收率 (%)
			样品 1	样品 2	样品 3	
	0.00	20	15.18	15.29	15.23	76.16
乳铁蛋白	0.00	250	182.12	182.96	181.75	72.91
	0.00	500	354.11	353.17	351.26	70.57

■ 结论

本文采用岛津高效液相色谱仪 Essentia LC-16，参考《食品安全国家标准食品中乳铁蛋白的测定》（征求意见稿）中规定的检测方法，建立了一种测定婴幼儿奶粉中乳铁蛋白的方法。该方法检测灵敏度高、重复性好，系统精密度良好。实验表明，该方法满足标准中的各项规定，可用于婴幼儿奶粉中乳铁蛋白的检测。

岛津应用云

