

# 高效液相色谱法测定乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的含量

LC-470

**摘要：** 本文使用高效液相色谱仪建立了乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的分析方法。方法采用凝胶过滤色谱柱，使用外标法定量，免疫球蛋白 IgG 在 1.0  $\mu\text{g/mL}$ ~500.0  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内，线性相关系数大于 0.9999，仪器检出限为 0.17  $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 0.52  $\mu\text{g/mL}$ 。使用 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液分别连续进样 6 针，保留时间 RSD 为 0.18%，峰面积 RSD 为 0.98%。液态奶及婴幼儿配方乳粉中的免疫球蛋白 IgG 加标回收率在 95.49%~105.88% 范围内。该方法满足《T/SSFS0002-2021 乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的测定（高效液相色谱法）》方法要求，可为相关从业人员提供参考。

**关键词：** 高效液相色谱法 乳及乳制品 免疫球蛋白 IgG

## 技术特点：

- ❖ 与标准相比，该方法拥有更宽的线性范围，低含量样品也可以准确定量。
- ❖ 与标准相比，该方法仪器定量限为 0.52  $\mu\text{g/mL}$ ，灵敏度更高，可以达到标准要求的五分之一以下。

免疫球蛋白 IgG 具有抗体活性，它由淋巴组织产生，能与相对应的抗原发生特异性结合或化学结构与抗体极为相似的一类球体蛋白，它普遍存在于哺乳动物的体外分泌液、淋巴液、组织液和血液中，是机体液体免疫物质中最为主要的部分。IgG 具有增强机体的抗病免疫力、防止病原体入侵、活化抗体、中和毒素和杀死癌细胞等作用。在乳及乳制品加工过程中，如果控制好温度、酸碱等因素，乳制品中仍有较稳定的 IgG 存在。对于免疫球蛋白 IgG 的定性和定量检测，国内外现有的检测方法有：酶联免疫吸附法 (ELISA)、

高效液相色谱法 (HPLC)、免疫胶体金法 (IC)、免疫扩散法 (RID)、免疫比浊法 (ITM)、免疫电泳法 (IE)、毛细管电泳法 (CE) 和聚丙烯酰胺凝胶电泳法等，其中最为常用的方法是酶联免疫吸附法 (ELISA)、高效液相色谱法 (HPLC) 和免疫扩散法 (RID)

本文参考《T/SSFS0002-2021 乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的测定（高效液相色谱法）》，使用岛津高效液相色谱仪建立了乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的检测方法，可为相关从业人员提供参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪 LC-40，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-40Alite	脱气机：	DGU-403
输液泵：	LC-40D XS×2	柱温箱：	CTO-40S
自动进样器：	SIL-40C XS	检测器：	SPD-M40
色谱工作站：	Labsolutions Ver. 5.118		

### 1.2 分析条件

色谱柱：	BioCore™SEC-300 250×4.6 mm I.D., 5 $\mu\text{m}$	流速：	0.5 mL/min
流动相：	20 mmol/L 磷酸盐溶液 (pH=7.0)	波长：	214 nm
进样体积：	10 $\mu\text{L}$		
柱温：	30°C		
洗脱方式：	等度洗脱		

### 1.3 标准品溶液的配制

称取免疫球蛋白 IgG 适量，用 0.3% 乙酸溶液 (pH=3.0) 溶解，配制成 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的免疫球蛋白 IgG 标准溶液，现用现配。准确量取免疫球蛋白 IgG 标准溶液适量，用 0.3% 乙酸溶液 (pH=3.0) 配制成 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 500.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准系列工作液。

### 1.4 样品前处理

参照《T/SSFS0002-2021 乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的测定（高效液相色谱法）》（7.1 提取及 7.2 净化）。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 免疫球蛋白 IgG 标准溶液色谱图

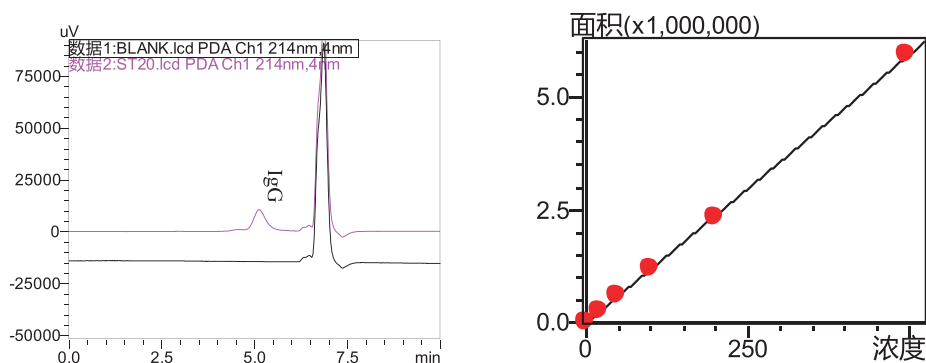


图 1 空白及免疫球蛋白 IgG 标准溶液叠加色谱图和校准曲线

### 2.2 校准曲线、检出限和定量限

按照 1.2 项下分析条件，标准系列溶液按照浓度从低到高的顺序依次上机测定，以 IgG 的质量浓度为横坐标，其对应的峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，如图 1 所示。IgG 在 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内线性关系良好，相关系数  $r$  大于 0.9999，各校准点准确度在 98.1%~103.2% 之间。根据最低浓度点标样数据，以 3 倍信噪比计算检出限，以 10 倍信噪比计算定量限，见表 1。

表 1 IgG 的校准曲线及检出限

#	化合物	校准曲线	相关系数 $r$	准确度	检测限 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	定量限 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	IgG	$Y = 11941.5X - 880.38$	0.9999	98.1%~103.2%	0.17	0.52

### 2.3 精密度

取校准曲线最低浓度标准溶液，连续进样 6 次，考察仪器的精密度，保留时间 RSD 为 0.18%，峰面积 RSD 为 0.98%，仪器精密度良好。

### 2.4 实际样品测定及准确度测定

按照 1.4 的前处理及 1.2 的分析条件，对液态奶和婴幼儿配方乳粉进行测定，其色谱图如图 2 所示。根据测定液态奶和婴幼儿配方乳粉样品的含量，向液态奶样品分别加入含量为 15.0 mg/100 g、30.0 mg/100 g、36.0 mg/100 g 的标准品，向婴幼儿配方乳粉分别加入含量为 60.0 mg/100 g、120.0 mg/100 g、144.0 mg/100 g 的标准品，按照 1.4 进行前处理，测定不同水平样品的加标回收率在 95.49~105.88% 范围内，RSD 结果如表 2 所示。

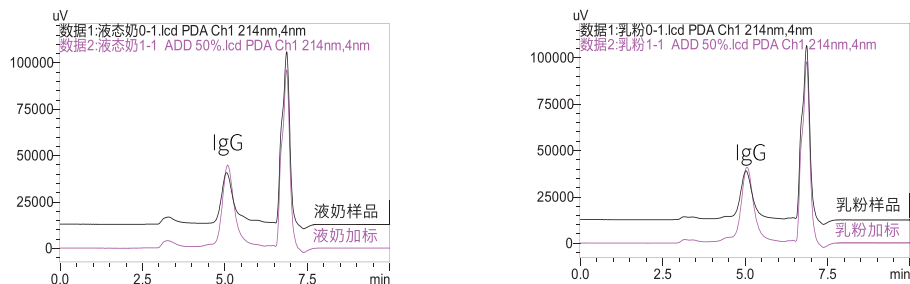


图2 样品及加标的叠加色谱图

表2 准确度结果 (n=3)

样品类型	样品本底含量 (mg/100g)	加标浓度水平 (mg/100g)	加标结果 (mg/100g)	回收率 (%)	RSD (%)
液态奶	29.7	15.0	44.2	97.25	0.32
		30.0	59.7	100.05	0.33
		36.0	65.3	98.88	0.21
婴幼儿配方乳粉	128	60.0	187	99.34	1.09
		120.0	242	95.49	0.57
		144.0	280	105.88	0.45

## 结论

本文使用岛津高效液相色谱仪，参考《T/SSF0002-2021 乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的测定（高效液相色谱法）》，建立了乳及乳制品中免疫球蛋白 IgG 的分析方法，并进行了方法学考察。实验结果表明，该方法前处理简单，专属性强，满足标准要求，可为相关从业人员提供参考。

岛津应用云

