

中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA XXX—XXXX

羊乳基婴儿配方食品乳清蛋白含量检测 毛细管凝胶电泳法

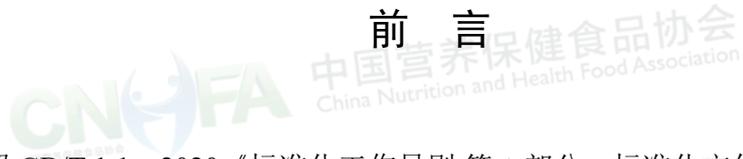
Quantification of Whey Protein Content in Goat Milk-based Infant Formulas
(Capillary Gel Electrophoresis Method)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 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。

有关专利的说明（参考 GB/T 1.1-2020 附录 D）

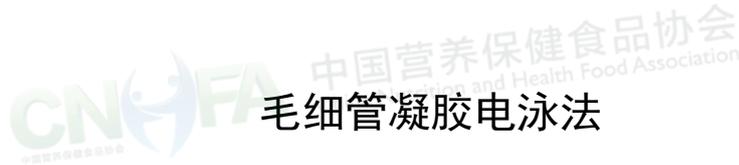
本文件由海普诺凯营养品有限公司提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：XXX

本文件主要起草人：XXX

羊乳基婴儿配方食品乳清蛋白含量检测



1 范围

本文件规定了羊乳基婴儿配方食品和羊乳基较大婴儿配方食品中乳清蛋白含量定量检测方法。

本文件适用于羊乳基婴儿配方食品乳清蛋白含量定量检测，适用的产品类别包括未加入了植物蛋白的羊乳基婴儿配方食品、羊乳基较大婴儿配方食品等。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 毛细管凝胶电泳 Capillary gel electrophoresis (CGE)

将起分子筛作用的凝胶聚合物灌注于毛细管中，以高压直流电场为驱动力的对生物大分子进行分析检测的技术。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

4.1 kD: kilodalton, 千道尔顿。

4.2 SDS: Sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠。

4.3 Tris: Tris (Hydroxymethyl) aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷。

5 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全和防止污染，应由具备资格的工作人员检测，所有生物安全防护的设施、设备和安全管理的基本要求按照GB 19489有关规定执行。

6 方法原理

基于毛细管凝胶电泳的羊乳基婴幼儿配方乳粉乳清蛋白含量测定原理是在婴幼儿配方食品中，加入SDS和 β -巯基乙醇，对样品中蛋白质组分进行变性和附加电荷的处理。采用毛细管电泳仪在电压的驱动下对蛋白质组分进行分离并在214 nm处检测。由于羊乳中乳清蛋白和乳酪蛋白出峰时间存在差异且相对独立，经系数换算，计算出乳清蛋白在婴幼儿配方食品总蛋白质中的百分含量。

7 仪器设备

7.1 毛细管电泳仪：配备紫外检测器或相同功能的仪器。

7.2 分析天平：精度0.1 mg。

7.3 水浴锅。

7.4 离心机：离心力 $\geq 12000 g$ 。

7.5 微量移液器：0.5 μL ~10 μL ，10 μL ~100 μL ，20 μL ~200 μL ，100 μL ~1000 μL 。

7.6 涡旋混匀仪。

7.7 恒温孵育器。

7.8 pH计。

8 毛细管凝胶电泳测定方法

8.1 方法提要

婴幼儿配方食品乳清蛋白与乳酪蛋白在毛细管电泳分析中的迁移时间不同，形成三个相对独立的区间，依次为小分子量乳清蛋白区域、乳酪蛋白区域、大分子量乳清蛋白区域。根据乳清蛋白和乳酪蛋白的峰面积，以及乳清蛋白对酪蛋白的质量对面积校正系数，利用峰面积归一化法，计算出乳清蛋白在婴幼儿配方食品总蛋白质中的百分含量。

8.2 试剂和材料

8.2.1 β -巯基乙醇。

8.2.2 SDS。

- 8.2.3 SDS-MW 凝胶缓冲溶液：pH=8，0.2% SDS 140 mL。
- 8.2.4 SDS-MW 样品缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)，1% SDS 50 mL。
- 8.2.5 10 kD 蛋白内标，5 mg/mL，0.4 mL。
- 8.2.6 分子量标记蛋白组标样（10 kD~225 kD），16 mg/mL，100 μ L。
- 8.2.7 0.1 mol/L HCl 溶液：100 mL，室温避光贮存。
- 8.2.8 0.1 mol/L NaOH 溶液：100 mL，室温避光贮存。
- 8.2.9 毛细管电泳分析预备液：以 SDS-MW 样品缓冲液与 10 kD 蛋白内标为 84:1 的体积比例，按照当天准备分析样品数量加一的量配制毛细管电泳分析预备液。

8.3 制样

8.3.1 样品制备

- a) 质控样品：称取 135mg 脱脂奶粉，置于 10 mL 离心管中，加入水至 5 mL 刻度，涡旋振荡，至充分溶解并混合均匀。
- b) 待测样品：称取 500 mg 婴儿配方食品样品，置于 10 mL 离心管中，加入水至 5 mL 刻度，涡旋振荡，至充分溶解并混合均匀。

8.3.2 反应液配制

将 10 μ L 样品溶液移入至 2.0 mL 离心管中，加入 85 μ L 毛细电泳分析预备液、5 μ L β -巯基乙醇，涡旋混匀。

8.3.3 沸水浴

反应液置于 100°C 水浴中加热 5 min，冷却至室温，涡旋混匀后快速离心。

8.3.4 上样

将 90 μ L 反应液转移至内衬管中，盖紧瓶盖。

8.3.5 样品检测时限

样品在 24 h 内可以保持稳定。

8.4 电泳参数

- 8.4.1 非涂层石英毛细管：50 μ m \times 30 cm（有效长度：20 cm）。
- 8.4.2 检测器：紫外检测器（UV），检测波长：214 nm。
- 8.4.3 运行电压：-15 kV（484 V/cm）。

8.4.4 毛细管温控：20 °C ± 2°C。

8.4.5 样品温控：20 °C ± 2°C。

8.4.6 电进样：-5 kV，20 s。

8.4.7 窗口狭缝：2 (100 μm×200 μm)。

8.5 电泳程序

8.5.1 平衡程序

- a) 70 psi 下 0.1 mol/L NaOH 洗 3 min。
- b) 50 psi 下 0.1 mol/L HCl 洗 2 min。
- c) 50 psi 下去离子水洗 2 min。
- d) 70 psi 下 SDS 凝胶灌注 10 min。
- e) -5.0 kV 电压分离 10 min。
- f) 在 4 °C 条件下，采用 UV 检测器获取数据。

8.5.2 样品测试程序

- a) 70 psi 下 0.1 mol/L NaOH 洗 3 min。
- b) 50 psi 下 0.1 mol/L HCl 洗 2 min。
- c) 50 psi 下去离子水洗 2 min。
- d) 70 psi 下 SDS 凝胶灌注 10 min。
- e) -5.0 kV 电压上样 20 s。
- f) -15.0 kV 电压分离 30 min。
- g) 在 4°C 条件下，采用 UV 检测器获取数据。

8.6 结果计算

8.6.1 积分方法

按照附录A所示，对小分子量乳清蛋白、乳酪蛋白、大分子量乳清蛋白分别进行手动积分，获取峰面积。

8.6.2 乳清蛋白含量计算

按照公式（1）和（2）计算乳清蛋白在婴幼儿配方食品中的含量，计算结果以平行测定值的算术平均值表示：

$$A_{c.w.}=1.6\times A_w \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中： $A_{c.w.}$ - 乳清蛋白校正峰面积；

A_w - 总乳清蛋白实测峰面积；

1.6 - 换算系数。

$$\text{乳清蛋白含量 (\%)} = A_{c.w.}/(A_{c.w.}+A_{c.n})\times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中： $A_{c.n}$ - 总乳酪蛋白实测峰面积

8.6.3 每个样品平行测试两次，计算结果以平行测定值的算术平均值表示，保留两位有效数字。

8.7 质量控制

a) 用分子量标记蛋白组标样测试系统适用性：

- 1) 系统适用性的验收条件为：蛋白内标的迁移时间应该在 $12.3 \text{ min} \pm 0.5 \text{ min}$
- 2) 七个分子量标记蛋白（10 kD、20 kD、35 kD、50 kD、100 kD、150 kD 和 225 kD）应该在 30 min 内彻底分离。

b) 分别在样品检测序列前、后运行质控样品。脱脂乳粉图谱与附录 A 一致。

c) 单针运行可接受标准：内标峰的迁移时间应在 $12.3 \text{ min} \pm 0.5 \text{ min}$ 。

d) 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%。

9 防止污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27403 附录 D 的规定。

附录 A

(规范性)

毛细管电泳标准图谱

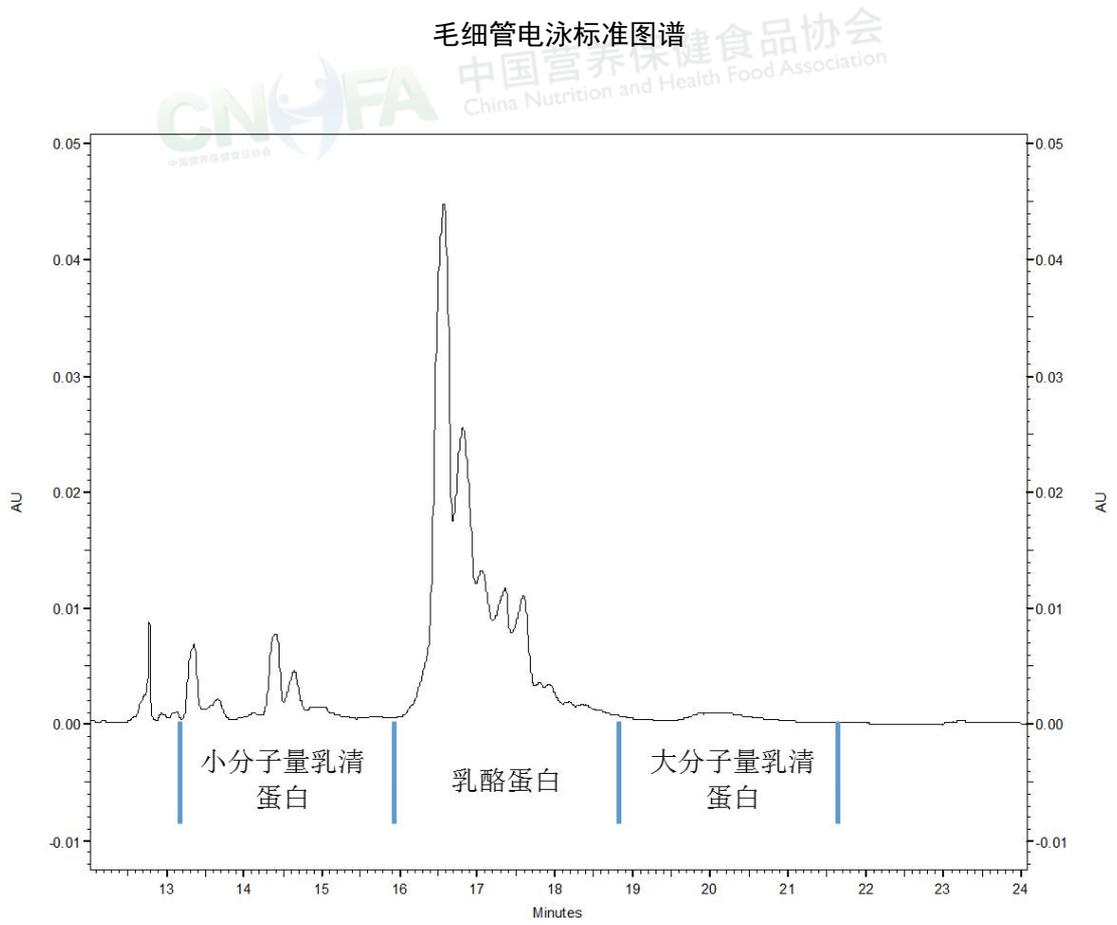


图 A.1 毛细管电泳标准图谱