

精准捕捉乳铁蛋白：新标准如何革新奶制品检测？

前言

乳铁蛋白，这一名字中的“蛋白”源自拉丁文“proteios”，寓意着它在自然界中的至关重要的地位。它是天然存在于哺乳动物乳汁中的一种特殊蛋白质。在人体内，蛋白质是构建身体组织、调节生理功能的重要物质，而乳铁蛋白更是其中的佼佼者，作为一种非血红素铁结合糖蛋白，它的重要性不言而喻。

近年来，乳铁蛋白应用越来越广泛，不仅是牛奶中的营养宝藏，还因为其强大的抗菌、抗病毒和免疫调节作用，在保健品、婴幼儿配方奶粉及护肤品领域中崭露头角。然而，乳铁蛋白对外部环境，尤其是温度的变化非常敏感。一旦温度过高，就极易破坏其稳定性，进而影响其功能的正常发挥。

为了解决这一技术难题，[农业农村部发布了新的行业标准 NY/T 4439-2023（2024.5.1 实施）](#)，[该标准详细介绍了一种高效液相色谱法用于奶及奶制品中乳铁蛋白的测定](#)。这一方法的实施，将有助于我们更准确地检测牛奶中未变性的乳铁蛋白含量，从而为奶业的高质量发展提供有力支持。

实验部分

色谱条件



赛里安 LC6000 超高效液相色谱

表 1. 方法参数

色谱柱:	反相 C4 (孔径 300Å) (4.6×250mm, 3.5μm)		
柱温:	60°C		
流动相:	A: 0.1%三氟乙酸; B: 0.1%三氟乙酸乙腈		
洗脱程序:	时间 min	A%	B%
	0	95	5
	6.5	62	38
	10	62	38
	12	40	60
	15	40	60
	15.5	95	5
	20.0	95	5
流速:	1.5mL/min		
检测波长:	280 nm		
进样量:	30 μL		

试剂及标准品配置

乙腈 (HPLC 级); 三氟乙酸 (HPLC 级);

牛乳铁蛋白 (编号: CDAA-200251)

①磷酸盐缓冲液 I: 称取 7.1 g 磷酸氢二钠、58.4 g 氯化钠, 加 900 mL 水溶解, 用磷酸调 pH 至 8.0 ± 0.2 , 加水定容至 1000 mL, 临用现配。

②磷酸盐缓冲液 II: 称取 28.4 g 磷酸氢二钠, 加 800 mL 水溶解, 用磷酸调节 pH 至 7.5 ± 0.2 , 再加入 20 mL 乳铁蛋白结合液 A, 加水稀释至 1000 mL。

Tip: 使用磷酸盐缓冲液来配制标准品溶液和稀释待测样品, 提取其中乳铁蛋白。这一步的原理是乳铁蛋白在适当的 pH 值和离子强度条件下具有良好的溶解性。而磷酸氢二钠可以通过调节溶液的 pH 值和离子强度, 有助于乳铁蛋白从食品基质 (如牛乳、乳粉等) 中溶解出来。在提取过程中, 磷酸氢二钠提供的缓冲环境能够保护乳铁蛋白不受酸碱变化的影响, 从而保持其稳定性和生物活性。提取后的离心操作, 将溶解了乳铁蛋白的缓冲液与食品基质中的不溶物分离, 以便后续纯化和检测。

结果

示例图谱

乳铁蛋白分离度好, 出峰尖锐, 详见图 1。

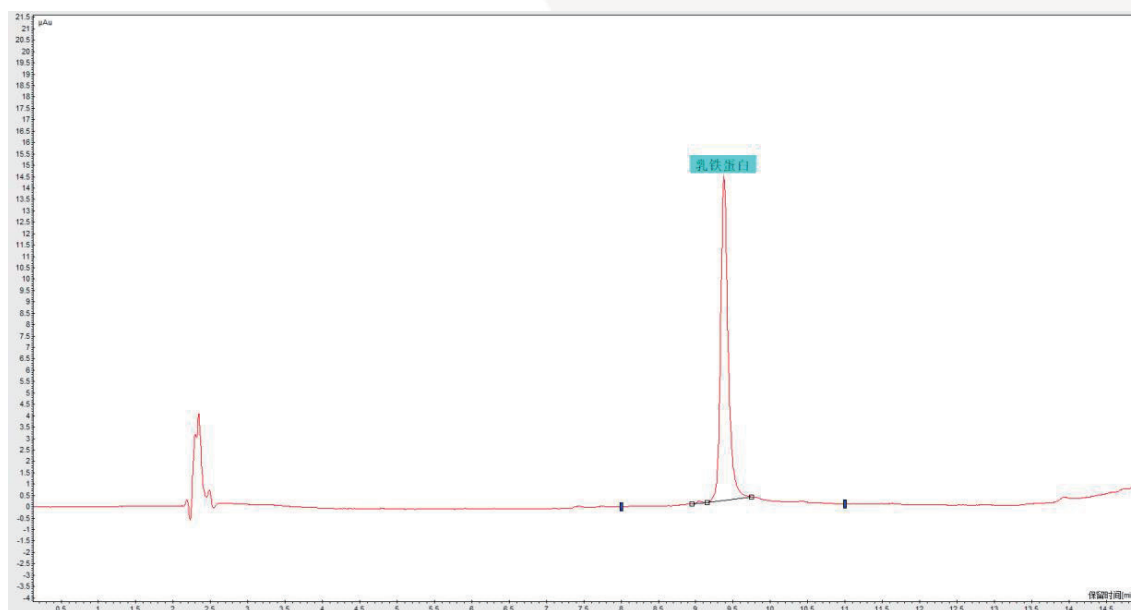


图 1 乳铁蛋白 50mg/L 示例色谱图

标准曲线

将乳铁蛋白标准溶液依次稀释为 0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0mg/L 使用外标法进行标准定量，以浓度为横坐标峰面积为纵坐标作外标工作曲线；乳铁蛋白响应值和浓度呈良好的线性关系，所得到的相关系数在 0.9990 以上，详见图 2。

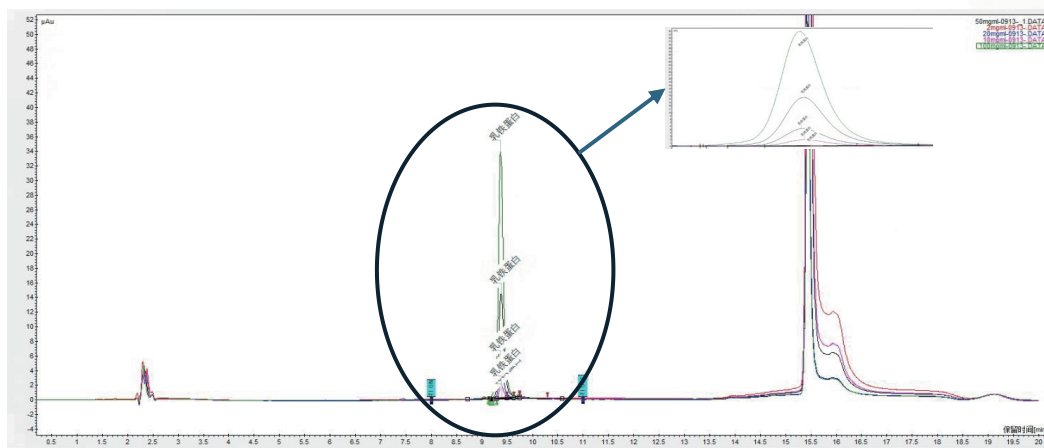


图 2 乳铁蛋白 0-100mg/L 重叠图

重现性

乳铁蛋白峰面积 RSD%=1.66 (n=6) 保留时间 RSD%=0.03 (n=6) 结果见表 3。

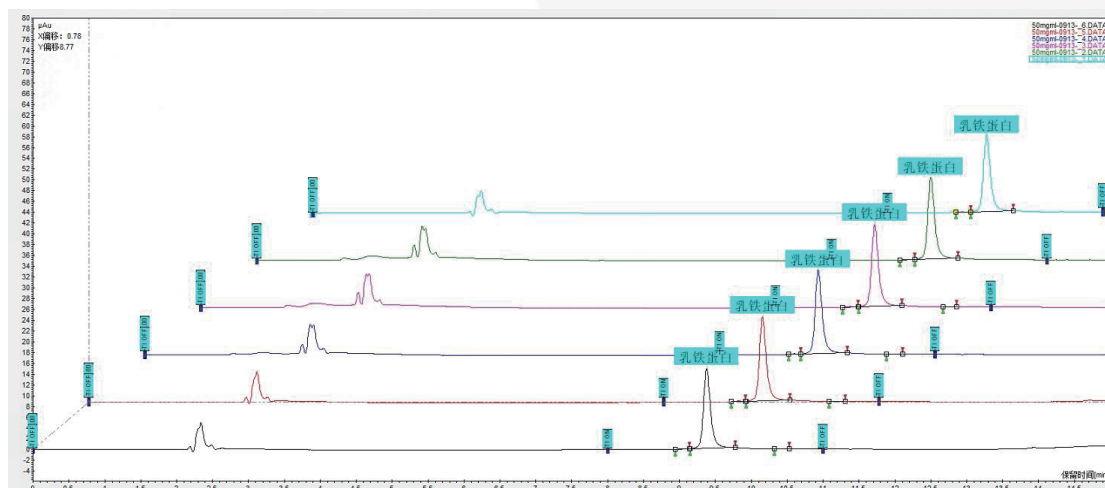


图 3 乳铁蛋白 50mg/L 重叠图 (n=6)

结论

由实验结果可以看出，采用赛里安 LC6000 UHPLC 系统可以实现对乳铁蛋白的检测，灵敏度、稳定性、线性均满足需求。

实验总结

- ①乳铁蛋白结合液 A 放置时间过长可能会出现沉淀，使用前摇匀即可。
- ②配制磷酸盐缓冲液 II 时，调 pH 前的溶液 pH 值应在 9.00 以上，否则提取效率会降低。调完 pH 后加乳铁蛋白结合液 A 然后定容，定容后混匀即可，不需要剧烈搅拌；
- ③首次使用 ChromCore 300 C4-T 色谱柱时，可能会出现色谱峰型不对称或响应低的情况，此时需要使用高浓度牛乳铁蛋白对照品（400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进样 100 μL ）对色谱柱进行钝化处理，钝化后将色谱柱冲洗至无牛乳铁蛋白的目标峰后，再进行样品分析；
- ④因为蛋白在 C4 分析柱上会有一定残留，建议在做柱容量测试后，空针进样两次把蛋白残留降低后再进行后续测试
- ⑤色谱柱使用结束后，需用纯乙腈冲洗 30 min 对色谱柱进行保存，保证下次色谱柱可以正常使用。

写在最后

检测乳铁蛋白含量的实验并不复杂，但是也是食品安全防线中的一部分。除了乳铁蛋白的检测，赛里安还有多种产品和方案用于食品科学研究，这些产品方案在默默守护健康安全的餐桌的同时，也不断助力食品科学的发展。

推荐阅读：

用于检测维生素 A、D、E 的二维阀切方案

用于原料乳及乳制品中的三聚氰胺

分析复杂基质中的水溶性维生素和脂溶性维生素

参考文献：

- [1]. Lactoferrin: a review. Veterinarni Medicina. 2008, 53: 457 [2011-07-31].
- [2]. Chen, MeixiaWen, FangZhang, YangdongLi, PengZheng, NanWang, Jiaqi. (2019). Determination of native lactoferrin in milk by HPLC on hitrap heparin hp column. Food analytical methods, 12(11).
- [3]. GB5009.299—2024. 食品中乳铁蛋白的测定
- [4]NY_T 4439-2023 奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 高效液相色谱法
- [5] 食品中乳铁蛋白的提取与检测（第二代肝素亲和柱+乳铁蛋白结合液）
- [6] 新标准今日实施！赛里安带你全面解读维生素 D 测定新方法！
- [7] 热点应用 | 赛里安 LC6000-高效液相色谱法检测原料乳及乳制品中的三聚氰胺 GB/T 22388-2008
- [8] 热点应用 | 赛里安 LC6000 HPLC 搭配 DAD 检测器分析复杂基质中的水溶性维生素