

# 牛乳中 $\beta$ -乳球蛋白检测方法的建立

杨爱君, 纪坤发, 杨美丰, 李志锋, 邢益俊, 何瑛

(广东燕塘乳业股份有限公司, 广东广州 510700)

**摘要:** 检测牛乳中  $\beta$ -乳球蛋白含量可以判断牛乳热处理程度。本文利用 UPLC 检测速度快、灵敏度高的特点, 选择 210 nm 检测波长进行检测, 建立超高效液相色谱法 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) 来测定巴氏杀菌乳和超高温灭菌乳中  $\beta$ -乳球蛋白的含量。结果表明: 采用校准曲线法定量, 检测到标准工作溶液变异系数 (CV) 在 0.04%~0.23% 之间,  $R^2=1.00$ ; 超高温灭菌乳  $\beta$ -乳球蛋白的平均加标回收率在 97.15%~99.11% 之间, 变异系数 (CV) 在 0.53%~0.71% 之间; 巴氏杀菌乳  $\beta$ -乳球蛋白的平均加标回收率在 96.56%~98.43% 之间, 变异系数 (CV) 在 0.04%~0.15% 之间;  $\beta$ -乳球蛋白方法检出限为 20.41 mg/kg (S/N=3), 方法定量限为 61.23 mg/kg, 符合 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》标准要求。该方法简便易行、定量准确、精密度高, 可用于液态乳中  $\beta$ -乳球蛋白的定量分析测定。

**关键词:**  $\beta$ -乳球蛋白; 超高效液相色谱法; 牛乳

文章编号: 1673-9078(2021)08-333-339

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0666

## Ultra Performance Liquid Chromatography Detection of $\beta$ -Lactoglobulin in Milk

YANG Ai-jun, JI Kun-fa, YANG Mei-feng, LI Zhi-feng, XING Yi-jun, HE Ying

(Guangdong Yantang Dairy Co. Ltd., Guangzhou 510700, China)

**Abstract:** The heat treatment degree of milk can be determined by measuring its  $\beta$ -lactoglobulin content. In this paper, rapid and sensitive ultra performance liquid chromatography was used to determine the  $\beta$ -lactoglobulin contents in pasteurized milk and ultra-high temperature processed milk at a 210 nm detection wavelength. Results show that, when the calibration curve method is used for quantitative analysis, the coefficients of variation (CV) of the standard working solutions lie between 0.04% and 0.23%, and  $R^2=1.00$ . The average spiked recovery of  $\beta$ -lactoglobulin in ultra-high temperature processed milk is 97.15%~99.11%, and the CV is between 0.53% and 0.71%. Meanwhile, the average spike recovery of  $\beta$ -lactoglobulin in pasteurized milk is between 96.56% and 98.43%, and the CV lies within 0.04%~0.15%. For the proposed method, the detection limit of  $\beta$ -lactoglobulin is 20.41 mg/kg (S/N=3), and the limit of quantification is 61.23 mg/kg. These meet the standard requirements listed in GB/T 27417-2017, Guidelines for validation and verification of chemical analysis methods for conforming assessments. In short, the proposed method is simple, relatively easy to implement, accurate, precise and can be used for the quantitative analysis and determination of  $\beta$ -lactoglobulin in liquid milk.

**Key words:**  $\beta$ -lactoglobulin; ultra performance liquid chromatography (UPLC); milk

引文格式:

杨爱君, 纪坤发, 杨美丰, 等. 牛乳中  $\beta$ -乳球蛋白检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2021, 37(8): 333-339

YANG Ai-jun, JI Kun-fa, YANG Mei-feng, et al. Ultra performance liquid chromatography detection of  $\beta$ -lactoglobulin in milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 333-339

牛乳中蛋白质的营养价值很高, 是人类不可缺少的营养食品。牛乳蛋白质主要有酪蛋白和乳清蛋白, 其中酪蛋白成分约 80%, 乳清蛋白成分约 20%; 乳清蛋白中的  $\beta$ -乳球蛋白是主要组分, 约占乳清蛋白的 50%<sup>[1]</sup>。牛乳中的  $\beta$ -乳球蛋白分子量约为 180000 u,

收稿日期: 2021-06-12

基金项目: 广州市民生科技攻关计划项目 (201903010015)

作者简介: 杨爱君 (1970-), 女, 高级工程师, 研究方向: 乳品质量检测和质量保证

等电点为 5.1~5.3, 一共由 162 个氨基酸残基组成, 有 2 个遗传变异体。 $\beta$ -乳球蛋白在牛乳中主要以二聚体形式存在, 由非共价键连接的 2 个单位亚基组成。在 pH<3.5 或 pH>8.0 时,  $\beta$ -乳球蛋白二聚体解离成单体。每个单体含有 2 个二硫键 Cys66-Cys160 和 Cys106-Cys199, 还有 1 个 Cys121 自由巯基<sup>[2]</sup>。 $\beta$ -乳球蛋白具有多种生物学活性, 在食品加工中有一定的应用; 同时还具有降血压、抗菌、抗氧化、抗癌、免疫调节、降胆固醇等功效<sup>[3]</sup>。研究发现,  $\beta$ -乳球蛋白是牛乳中

主要的热敏感蛋白质, 过度加热会造成 $\beta$ -乳球蛋白变性并与乳中其他蛋白质形成大分子结构<sup>[4-6]</sup>。因此, 检测牛乳中 $\beta$ -乳球蛋白含量可以判断牛乳热处理程度, 对研究牛乳热处理方式的选择具有重大的意义。

目前, 检测牛乳中 $\beta$ -乳球蛋白含量还没有国家标准, 已发布的标准中有农业行业标准 NY/T 1663-2008《乳与乳制品中 $\beta$ -乳球蛋白的测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳法》<sup>[7]</sup>和团体标准 T/TDSTIA 007-2019《奶及奶制品中 $\beta$ -乳球蛋白的测量 液相色谱法》<sup>[8]</sup>。其中《乳与乳制品中 $\beta$ -乳球蛋白的测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳法》试样用 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 用光密度计对 $\beta$ -乳球蛋白进行测定分析而求得 $\beta$ -乳球蛋白的含量, 该标准液态样品的检出限为 240 mg/L, 固态和固体样品的检出限为 2400 mg/kg<sup>[7]</sup>;《奶及奶制品中 $\beta$ -乳球蛋白的测量 液相色谱法》通过对样品进行调酸到 pH 至 4.60 时, 酪蛋白及变性的乳清蛋白可以通过沉淀去除, 滤液中未变性的 $\beta$ -乳球蛋白经离心后在高效液相色谱仪上, 经蛋白质分离柱分离, 选择 210 nm 检测波长, 紫外光检测, 外标法定量, 该标准生乳、液态奶的定量限为 25.0 mg/kg, 乳粉的定量限为 50.0 mg/kg<sup>[8]</sup>。前者操作方法繁杂, 检出限高, 后者检测时间长, 均不适用于企业日常快速分析检测。

本文主要是开发用超高效液相色谱法 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) 来测定牛乳中 $\beta$ -乳球蛋白的含量的方法<sup>[9-19]</sup>。该方法前处理简便、分析时间短、测定结果准确、精密度好, 能够准确而又快速检测牛乳中 $\beta$ -乳球蛋白含量。根据 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》<sup>[20]</sup>通过加标试验结果从线性范围、精密度、正确度三个方面来验证方法的可行性。该方法为乳及乳制品中 $\beta$ -乳球蛋白检测提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

Waters H-CLASS 超高效液相色谱仪 (配有 PDA 检测器), 美国 Waters 公司; Waters BEH C4 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7  $\mu$ m 粒径), 美国 Waters 公司; Mettler Tledo XSR205DU 电子分析天平, 瑞士 Mettler Tledo 公司; Minipole 超纯水系统, 默克化工; Sigma 2-16KL 冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; 移液器, 德国 Brand 公司; Waters GHP 针式滤膜, 美国 Waters 公司。

乙腈、三氟乙酸 (色谱纯), 德国 Merck 公司; 冰醋酸 (优级纯), 广州化学试剂厂;  $\beta$ -乳球蛋白 (L-046-100 MG), 纯度: 97.23%, Sigm a-Aldrich 公

司; 本试验中用水符合 GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》<sup>[21]</sup>中一级水的规定。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 试验原理

牛乳中酪蛋白的等电点为 4.60, 因此当牛乳试样 pH 至 4.60 时, 酪蛋白及变性的乳清蛋白可以通过沉淀去除, 滤液中未变性的 $\beta$ -乳球蛋白经超高效液相色谱仪分离, 经 PDA 检测器测定, 外标法标准曲线定量<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.2 试样前处理

准确称取 5 g 试样于 50 mL 离心管, 加水至 25 mL, 混匀后再加入冰醋酸调节 pH 为 4.60±0.05, 涡旋震荡 1 min, 然后室温静置 60 min, 待试样沉淀分层, 将试样高速离心 (10000 r/min, 4  $^{\circ}$ C, 15 min), 取 1 mL 上清液, 稀释至适当浓度, 过 0.20  $\mu$ m 针式滤膜, 进行 UPLC 检测<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.3 溶剂的配制

流动相① (0.1%三氟乙酸水溶液): 取 900 mL 一级水倒入 1 L 的容量瓶中, 加入 1 mL 三氟乙酸后立即盖上盖子, 轻摇至三氟乙酸全部溶解没有雾气, 用一级水定容至刻度线, 将容量瓶中的溶液全部转移至棕色蓝盖瓶中, 超声脱气 10 min; 流动相② (0.085%三氟乙酸乙腈溶液): 取 900 mL 乙腈倒入 1 L 的容量瓶中, 加入 0.85 mL 三氟乙酸后立即盖上盖子, 轻摇至三氟乙酸全部溶解没有雾气, 用乙腈定容至刻度线, 将容量瓶中的溶液全部转移至棕色蓝盖瓶中, 超声脱气 10 min; 强洗溶液 (90%乙腈水溶液): 取 900 mL 乙腈倒入 1 L 的容量瓶中, 用一级水定容至刻度线, 将容量瓶中的溶液全部转移至棕色蓝盖瓶中, 超声脱气 15 min; 弱洗溶液 (10%乙腈水溶液): 取 100 mL 乙腈倒入 1 L 的容量瓶中, 用一级水定容至刻度线, 将容量瓶中的溶液全部转移至棕色蓝盖瓶中, 超声脱气 15 min。

#### 1.2.4 色谱条件

表 1 洗脱梯度

Table 1 Elution gradient

| 序号 | 时间/min | 流速/(mL/min) | 流动相①/% | 流动相②/% |
|----|--------|-------------|--------|--------|
| 1  | 0      | 0.5         | 95.0   | 5.0    |
| 2  | 1.5    | 0.5         | 62.0   | 38.0   |
| 3  | 2.5    | 0.5         | 62.0   | 38.0   |
| 4  | 5.5    | 0.5         | 59.0   | 41.0   |
| 5  | 5.6    | 0.5         | 60.0   | 40.0   |
| 6  | 7.0    | 0.5         | 60.0   | 40.0   |
| 7  | 7.1    | 0.5         | 95.0   | 5.0    |
| 8  | 9.0    | 0.5         | 95.0   | 5.0    |

经过测试,超高效液相色谱仪的色谱条件如表 1。

色谱柱: Waters BEH C4 100 mm×2.1 mm, 1.7 μm 粒径; 进样量: 10 μL; 柱温: 60 °C; 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 210 nm; 流动相: 流动相①为 0.1% 三氟乙酸水溶液、流动相②为 0.085% 三氟乙酸乙腈溶液; 洗脱梯度: 见表 1。

### 1.3 标准工作曲线的制作

#### 1.3.1 β-乳球蛋白标准溶液 (9211.57 mg/L) 的配制

准确称取 94.74 mg 的 β-乳球蛋白标准品 (纯度: 97.23%) 于 50 mL 的烧杯中, 记录称样量, 用少量一级水进行溶解, 并转移定容到 10 mL 容量瓶中, 得到浓度为 9211.57 mg/L 的 β-乳球蛋白标准溶液;

#### 1.3.2 β-乳球蛋白标准工作溶液的配制

取 2 mL 超高效液相色谱仪进样瓶 5 个, 用移液器分别准确吸取 8.14 μL、16.28 μL、24.42 μL、32.56 μL、65.12 μL β-乳球蛋白标准溶液 (9211.57 mg/L), 用一级水定容至 1.5 mL, 配置成浓度为 50、100、150、200、400 mg/L 的标准工作溶液。

#### 1.3.3 β-乳球蛋白标准工作曲线的制作

β-乳球蛋白标准工作溶液通过超高效液相色谱仪分析, 以标准工作溶液色谱峰面积为横坐标, 标准工作溶液浓度为纵坐标绘制标准工作曲线。

### 1.4 计算

#### 1.4.1 试样检测

将待测溶液上机检测, 根据计算公式得到试样中 β-乳球蛋白的含量。

#### 1.4.2 计算公式

试样中的 β-乳球蛋白的含量 X 按以下公式计算:

$$X = \frac{c \times V}{m} \times F$$

式中: X 表示试样中 β-乳球蛋白的含量, mg/kg; c 表示待测样液中 β-乳球蛋白浓度, mg/L; V 表示加入水后定容体积, mL; m 表示吸取试样的质量, g; F 表示待测上清液稀释倍数; β-乳球蛋白的含量以 β-乳球蛋白 A 和 β-乳球蛋白 B 含量之和计。

#### 1.4.3 数据处理

本方法所有试验均重复测定 6 次, 采用 Waters Empowe 3 (版本号: 7.30.00.00) 软件进行数据处理。

## 2 结果与分析

根据 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法 确认和验证指南》<sup>[20]</sup>通过加标试验结果从线性范围、

精密度、正确度三个方面来验证方法的可行性。

### 2.1 浓度范围、变异系数、回归方程、相关系数

对 β-乳球蛋白标准工作溶液进行上机检测, 标准工作溶液每个浓度点按 1.2.4 的色谱条件重复测定 6 次, 得到标准工作溶液每个浓度点的色谱平均峰面积及其变异系数 (CV), 标准工作溶液色谱平均峰面积如表 2, 标准工作溶液色谱图如图 1。

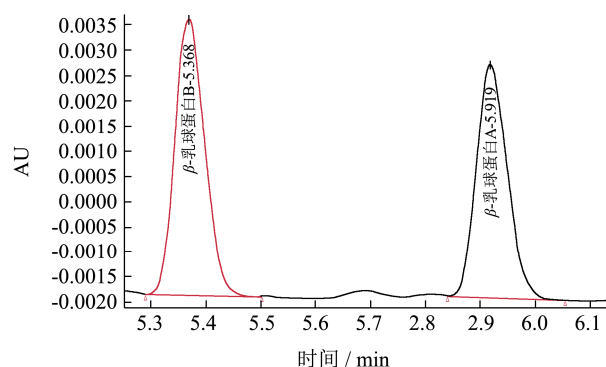


图 1 β-乳球蛋白标准品色谱图 50 (mg/L)

Fig.1 Standard working solution chromatogram 50 (mg/L)

表 2 标准工作溶液色谱平均峰面积

Table 2 Average peak area of standard working solution chromatography

| 检测波长/nm | 标准工作溶液浓度/(mg/L) | 峰面积平均值/(μV·s) | 变异系数 CV/% |
|---------|-----------------|---------------|-----------|
| 210     | 50              | 759058.33     | 0.23      |
|         | 100             | 1610779.50    | 0.17      |
|         | 150             | 2476552.00    | 0.09      |
|         | 200             | 3324806.00    | 0.10      |
|         | 400             | 6677689.00    | 0.04      |

从表 2 可知, 本方法采用校准曲线法定量, 标准工作曲线的浓度范围为 50~400 mg/L, 标准工作溶液每个浓度点重复测定 6 次, 变异系数 (CV) 在 0.04%~0.23% 之间符合标准要求, 适合用于实际分析检测。

以 β-乳球蛋白标准工作溶液色谱平均峰面积为横坐标, 标准工作溶液浓度为纵坐标绘制标准曲线, 做线性回归方程, 得到 β-乳球蛋白测定标准工作曲线浓度范围、回归方程、相关系数。β-乳球蛋白标准工作曲线浓度范围、回归方程、相关系数如表 3, 标准工作曲线如图 2。

从表 3、图 2 得到 β-乳球蛋白标准工作曲线的浓度范围 (50~400 mg/L)、回归方程 ( $y=6E-05x+4.2877$ )、相关系数 ( $R^2=1.00$ )。本方法用校准曲线法定量, 标准工作曲线在 50~400 mg/L 的浓度范围内线性良好,  $R^2$  等于 1.00, 符合 GB/T 27417-2017《合格评定 化学

分析方法确认和验证指南》<sup>[20]</sup>采用校准曲线法定量,线性回归方程的相关系数不低于 0.99 的要求,可用于实际分析检测。

表 3 标准工作曲线浓度范围、回归方程、相关系数

Table 3 Standard working curve concentration range, regression equation, correlation coefficient

| 检测波长/nm | 浓度范围/(mg/L) | 回归方程            | 相关系数 R <sup>2</sup> |
|---------|-------------|-----------------|---------------------|
| 210     | 50~400      | y=6E-05x+4.2877 | 1.00                |

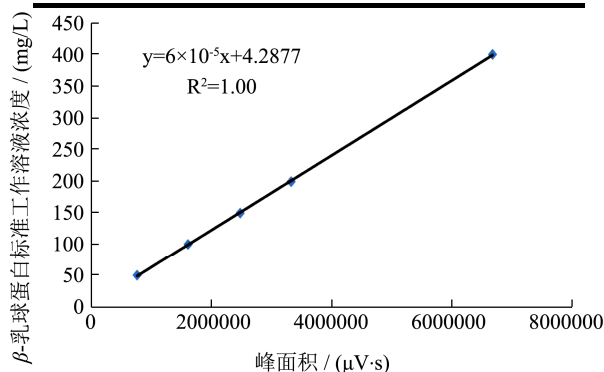


图 2 β-乳球蛋白的标准工作曲线

Fig.2 Standard working curve for-lactoglobulin

## 2.2 准确性和精密度

### 2.2.1 试样的检测

因为高温加热会使牛乳中 β-乳球蛋白失去活性,所以分别使用某公司生产的超高温灭菌乳和巴氏杀菌乳按 1.2 的试验方法进行检测,每个样品设置 6 个平行试验,并与第三方检测机构(北京畜牧研究所)的结果对比,检测结果见表 4,超高温灭菌乳、巴氏杀菌乳 β-乳球蛋白色谱图见图 3、图 4。

表 4 超高温灭菌乳、巴氏杀菌乳 β-乳球蛋白含量

Table 4 The content of ultra-high temperature sterilization milk and pasteurized milk-lactoglobulin

| 检测波长/nm | 试样名称   | 序号 | 待测上清液稀释倍数 F | 试样浓度/(mg/kg) | 试样浓度平均值/(mg/kg) | 变异系数 CV/% | 第三方机构检测结果/(mg/kg) | 偏差/% |
|---------|--------|----|-------------|--------------|-----------------|-----------|-------------------|------|
| 210     | 超高温灭菌乳 | ①  | 1           | 25.39        | 25.39           | 0.92      | 25.80             | 0.80 |
|         |        | ②  | 1           | 25.29        |                 |           |                   |      |
|         |        | ③  | 1           | 25.46        |                 |           |                   |      |
|         |        | ④  | 1           | 25.28        |                 |           |                   |      |
|         |        | ⑤  | 1           | 25.83        |                 |           |                   |      |
|         |        | ⑥  | 1           | 25.06        |                 |           |                   |      |
|         | 巴氏杀菌乳  | ①  | 10          | 3536.39      | 3541.39         | 0.14      | 3535.70           | 0.08 |
|         |        | ②  | 10          | 3534.29      |                 |           |                   |      |
|         |        | ③  | 10          | 3540.46      |                 |           |                   |      |
|         |        | ④  | 10          | 3546.28      |                 |           |                   |      |
|         |        | ⑤  | 10          | 3547.83      |                 |           |                   |      |
|         |        | ⑥  | 10          | 3543.06      |                 |           |                   |      |

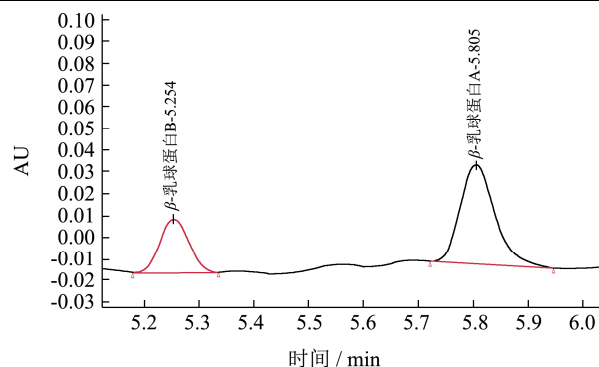


图 3 超高温灭菌乳 β-乳球蛋白色谱图

Fig.3 Chromatogram of high temperature sterilization milk

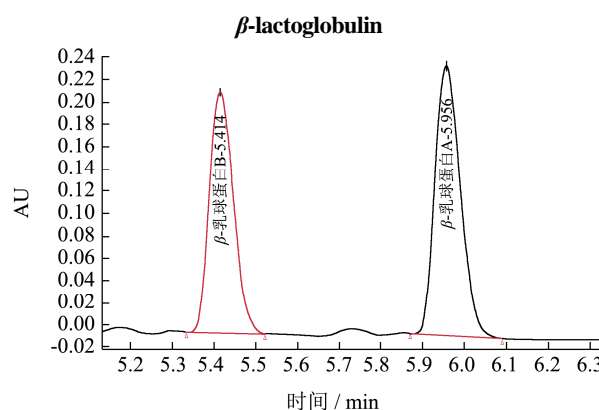


图 4 巴氏杀菌乳 β-乳球蛋白色谱图

Fig.4 Chromatogram of pasteurized milk β-lactoglobulin

从图 3、图 4、表 4 可知超高温灭菌乳的 β-乳球蛋白含量为 25.39 mg/kg, 变异系数为 0.92%, 巴氏杀菌乳的 β-乳球蛋白含量为 3541.39 mg/kg, 变异系数为 0.14%, 两种杀菌乳的重复测试稳定性较好, 变异系数 <1%, 符合实际分析的要求; 两种杀菌乳的检测方法与第三方机构检测结果无显著差异, 偏差 <1%。

表 5 阳性试样添加回收试验结果

Table 5 Positive sample addition recovery test results

| 检测<br>波长/nm | 阳性试样<br>本底值<br>/(mg/kg) | 阳性试样<br>添加浓度<br>/(mg/kg) | 序号      | 待测上液<br>稀释倍数<br>F | 阳性试样<br>检测值<br>/(mg/kg) | 阳性试样<br>检测平均值<br>/(mg/kg) | 阳性试样<br>加标<br>回收率/% | 阳性试样<br>加标平均<br>回收率/% | 变异系数<br>CV/% |
|-------------|-------------------------|--------------------------|---------|-------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|--------------|
| 210         | 25.61                   | 200                      | ①       | 1                 | 223.74                  | 223.82                    | 99.07               | 99.11                 | 0.53         |
|             |                         |                          | ②       | 1                 | 224.91                  |                           |                     |                       |              |
|             |                         |                          | ③       | 1                 | 221.99                  |                           |                     |                       |              |
|             |                         |                          | ④       | 1                 | 224.97                  |                           |                     |                       |              |
|             |                         |                          | ⑤       | 1                 | 222.53                  |                           |                     |                       |              |
|             |                         |                          | ⑥       | 1                 | 224.8                   |                           |                     |                       |              |
|             | ①                       | 1                        | 319.05  | 317.07            | 97.81                   | 97.15                     | 0.62                |                       |              |
|             | ②                       | 1                        | 318.44  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ③                       | 1                        | 315.99  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ④                       | 1                        | 313.21  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ⑤                       | 1                        | 318.15  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ⑥                       | 1                        | 317.57  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ①                       | 1                        | 411.1   | 415.93            | 96.37                   | 97.58                     | 0.71                |                       |              |
|             | ②                       | 1                        | 419.27  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ③                       | 1                        | 418.45  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ④                       | 1                        | 413.05  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ⑤                       | 1                        | 416.12  |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ⑥                       | 1                        | 417.6   |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ①                       | 1                        | 5985.28 | 5992.47           | 97.76                   | 98.04                     | 0.07                |                       |              |
|             | ②                       | 10                       | 5996.74 |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ③                       | 10                       | 5993.09 |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ④                       | 10                       | 5989.31 |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ⑤                       | 10                       | 5993.77 |                   |                         |                           |                     |                       |              |
|             | ⑥                       | 10                       | 5996.61 |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ①           | 10                      | 6633.85                  | 6631.37 | 96.64             | 96.56                   | 0.04                      |                     |                       |              |
| ②           | 10                      | 6633.09                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ③           | 10                      | 6626.55                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ④           | 10                      | 6630.02                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ⑤           | 10                      | 6632.72                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ⑥           | 10                      | 6632                     |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ①           | 10                      | 7468.35                  | 7478.56 | 98.17             | 98.43                   | 0.15                      |                     |                       |              |
| ②           | 10                      | 7491.06                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ③           | 10                      | 7465.03                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ④           | 10                      | 7495.79                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ⑤           | 10                      | 7474.63                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |
| ⑥           | 10                      | 7476.47                  |         |                   |                         |                           |                     |                       |              |

2.2.2 回收率和变异系数

从 2.2.1 的试验结果默认超高温灭菌乳为低本底 β-乳球蛋白含量, 巴氏杀菌乳为高本底 β-乳球蛋白含量, 添加 β-乳球蛋白标准溶液进行回收率测定, 超

温灭菌乳 β-乳球蛋白的具体添加量为 200, 300, 400 mg/kg, 巴氏杀菌乳 β-乳球蛋白的具体添加量为 2500, 3200, 4000 mg/kg, 每个浓度的阳性试样设置六个平行试验, 计算阳性试样的加标回收率及变异系数

(CV), 以评估方法精密度和正确度。阳性试样的加标回收率及变异系数(CV), 见表5。

根据 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》附录 A 要求, 当被测组分加标浓度 >100 mg/kg 时, 被测组分加标回收率范围在 95%~105%之间; 标准的附录 B 要求, 被测组分含量在 100 mg/kg~1000 mg/kg 时, 测试结果的变异系数 <3.8%; 当被测组分含量在 0.1%~1%时, 测试结果的变异系数 <2.7%<sup>[6]</sup>。

从表 5 可知, 低本底的超高温灭菌乳  $\beta$ -乳球蛋白阳性试样的平均加标回收率在 97.15%~99.11%之间, 变异系数(CV)在 0.53%~0.71%之间; 高本底的巴氏杀菌乳  $\beta$ -乳球蛋白阳性试样的平均加标回收率在 96.56%~98.43%之间, 变异系数(CV)在 0.04%~0.15%之间。可见阳性试样的本底值无论高还是低, 本方法的精密度和正确度均符合上述标准要求。本方法加标回收率稳定, 重现性高, 可作为实际试样的准确定量检测方法。

### 2.3 讨论

目前测定  $\beta$ -乳球蛋白含量的方法很多, 高星等建立的超高效液相色谱法可以快速检测牛乳中  $\beta$ -乳球蛋白含量, 该方法标准曲线线性 ( $R^2=0.99$ ), 方法回收率 (70%~90%), 变异系数 (CV=0.93%~3.22%), 检出限为 40.0 mg/kg<sup>[22]</sup>; 赵大伟等研究设计了可用于分析牛乳中  $\beta$ -乳球蛋白的高效液相色谱法, 该方法分析时间长 ( $t=30$  min), 标准曲线线性 ( $R^2=0.99$ ), 暂无写出方法回收率, 变异系数 (CV=2.9%)<sup>[23]</sup>; 孙国庆等研究设计了可分析牛乳中  $\beta$ -乳球蛋白的毛细管电泳法, 该方法标准曲线线性 ( $R^2=0.99$ ), 方法回收率 (75.2%~105.2%), 变异系数 (CV=1.09%~3.1%)<sup>[24]</sup>。而我们建立的使用超高效液相色谱法对牛乳中  $\beta$ -乳球蛋白进行检测的方法, 其标准曲线线性 ( $R^2=1.00$ ), 方法回收率 (96.56%~99.11%), 变异系数 (CV=0.04%~0.71%), 分析检测时间 ( $t=9$  min), 检出限为 20.41 mg/kg, 方法定量限为 61.23 mg/kg, 均比上述方法有一定的优势, 具有前处理简便、分析时间短、测定结果准确、精密度好等优点, 能够准确而又快速检测牛乳中  $\beta$ -乳球蛋白含量。

### 3 结论

本文建立了超高效液相色谱法检测巴氏杀菌乳和超高温灭菌乳中  $\beta$ -乳球蛋白含量的方法。通过验证表明, 该方法线性关系良好 ( $R^2=1.00$ ), 平均回收率在 96.56%~99.11%之间, 变异系数在 0.04%~0.71%之间,

$\beta$ -乳球蛋白方法检出限为 20.41 mg/kg (S/N=3), 方法定量限为 61.23 mg/kg, 符合标准 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》的要求。该方法简便易行、定量准确、精密度好, 可用于液态乳中  $\beta$ -乳球蛋白的定量分析测定。

### 参考文献

- [1] 杨W·帕克著,陈合,舒国伟,陈立,等译.乳品中生物活性物质功能与应用 [M].北京:化学工业出版社,2014  
YANG W Parker author, CHEN He, SHU Guo-wei, Chen Li, wait translation. Function and Application of Bioactive Substances in Dairy Products [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2014
- [2] 谢继志.液态乳制品科学与技术[M].北京:中国轻工出版社, 1999  
XIE Ji-zhi. Science and Technology of Liquid Dairy Products [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999
- [3] 郭成宇.现代乳品工程技术[M].北京:化学工业出版社,2004  
GUO Cheng-yu. Modern Dairy Engineering Technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004
- [4] 陈文亮,毛仁淡.牛乳加热前与加热后乳球蛋白之差异[J].科学新天地,2005,3(3):64-67  
CHEN Wen-liang, MAO Ren-dan. Difference of lactoglobulin in milk before and after heating [J]. New World of Science, 2005, 3(3): 64-67
- [5] 宋晓飞,刘彬彦.热处理后牛乳品质的变化[J].中国乳品工业,1998,26(2):32-33  
SONG Xiao-fei, LIU Bin-yan. Changes of milk quality after heat treatment [J]. China's Dairy Industry, 1998, 26(2): 32-33
- [6] New Zealand Food Standards Agency. Standard for Pasteurisation Heat Treatments MRD Standard 3 [S]. Revision 2, Wellington: Food Standards Australia New Zealand, 1993: 1-20
- [7] N/YT 1663-2008,乳与乳制品中 $\beta$ -乳球蛋白的测定 聚丙烯酰胺凝胶电泳法[S]  
N/YT 1663-2008, Determination of  $\beta$ -lactoglobulin in Milk and Dairy Products, Polyacrylamide Gel Electrophoresis Method [S]
- [8] T/TDSTIA 007-2019,奶及奶制品中 $\beta$ -乳球蛋白的测量 液相色谱法[S]  
T/TDSTIA 007-2019, Determination of Lactoglobulin in Milk and Dairy Products by Liquid Chromatography [S]
- [9] 穆垚.关于高效液相色谱技术在食品检测中的具体应用[J].中国食品,2021,5:113  
MU Yao. Application of high-performance liquid

- chromatography in food detection [J]. Chinese Food, 2021, 5: 113
- [10] 胡晓琴,杨群华,王智民.液相色谱技术在食品检测中的应用[J].现代食品,2019,6:178-180  
HU Xiao-qin, YANG Qun-hua, WANG Zhi-min. Application of liquid chromatography in food detection [J]. Modern Food, 2019, 6: 178-180
- [11] Singh H, Cantoria M J, Malave P, et al. Standardization of RP-HPLC methods for the detection of the major peanut allergens Ara h 1, Ara h 2 and Ara h3 [J]. Food Chem, 2016, 194: 383-390
- [12] Damm I, Enger E, Chrubasik-Hausmann S, et al. Fast and comprehensive analysis of secondary metabolites in cocoa products using ultrahigh-performance liquid chromatography directly after pressurized liquid extraction [J]. J Sep Sci, 2016, 39(16): 3113-3122
- [13] 杨晓广.超高效液相色谱法在食品检测分析中的应用[J].食品安全导刊,2021,15:117-119  
YANG Xiao-guang. Application of ultra-high performance liquid chromatography in food detection and analysis [J]. Food Safety Guide, 2021, 15: 117-119
- [14] John F Hardham著,宋晓梅译,张少辉校.增加 $\beta$ -乳球蛋白和乳清蛋白质含量对UHT奶保存稳定性的影响[J].乳业科学与技术,2000,93(4):16-22  
JOHN F Hardham author, SONG Xiao-mei translation, ZHANG Shao-hui school. Effect of increasing lactoglobulin and whey protein content on the preservation stability of UHT milk [J]. Dairy Science and Technology, 2000, 93(4): 16-22
- [15] 袁水林,鼎熊,陈红兵,等.间接竞争ELISA法检测牛乳中 $\beta$ -乳球蛋白含量的准确性评价[J].食品科学,2014,35(18):100-104  
YUAN Shui-lin, DING Xiong, CHEN Hong-bing. Accuracy evaluation of Indirect competitive ELISA for detection of lactoglobulin content in milk [J]. Food Science, 2014, 35(18): 100-104
- [16] Kinghorn N M, Norris C S, Paterson G R, et al. Comparison of capillary electrophoresis with traditional methods to analysis bovine whey proteins [J]. Chromatogr A, 1995, 700: 111-123
- [17] 李慧,陈敏,李赫,等.反相高效液相色谱法测定乳清蛋白中的 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白[J].色谱,2007,25(1):116-117  
LI Hui, CHEN Min, LI He, et al. Determination of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in whey protein by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. Chromatography, 2007, 25(1): 116-117
- [18] 王莹,屈玉霄,刘春红,等.高效液相色谱法测定 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白[J].食品研究与开发,2013,10(2):57-60  
WANG Ying, QU Yu-xiao, LIU Chun-hong, et al. Determination of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin by high performance liquid chromatography [J]. Food Research and Development, 2013,10(2): 57-60
- [19] 何圣发,陈红兵,龙彩云,等.牛乳过敏原 $\beta$ -乳球蛋白检测方法的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2019,10(4):1763-1769  
HE Sheng-fa, CHEN Hong-bing, LONG Cai-yun, et al. Research progress on detection methods of milk allergen  $\beta$ -lactoglobulin [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2019, 10(4): 1763-1769
- [20] GB/T 27417-2017,合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S]  
GB/T 27417-2017, Guide to the Validation and Verification of Chemical Analytical Methods for Conformity Assessment [S]
- [21] GB/T 6682-2008,分析实验室用水规格和试验方法[S]  
GB/T 6682-2008, Specifications and Test Methods for Water Used in Analytical Laboratories [S]
- [22] 高星,乔为仓,张雪林,等.超高效液相色谱法快速检测牛乳中 $\beta$ -乳球蛋白[J].中国奶牛,2021,15(5):31-33  
GAO Xing, QIAO Wei-cang, ZHANG Xue-lin, et al. Rapid determination of  $\beta$ -lactoglobulin in milk by ultra-performance liquid chromatography [J]. Chinese Cow, 2021, 15(5): 31-33
- [23] 赵大伟,刘玲,肖诗英.高效液相色谱分析乳清蛋白方法研究[J].食品研究与开发,2011,32(11):93-95  
ZHAO Da-wei, LIU Ling, XIAO Shi-ying. Study on analysis of whey protein by high performance liquid chromatography [J]. Food Research and Development, 2011, 32(11): 93-95
- [24] 孙国庆,康小红,刘卫星.利用毛细管电泳法测定乳品中 $\beta$ -乳球蛋白含量的研究[J].中国食品卫生杂志,2010,22(5):414-417  
SUN Guo-qing, KANG Xiao-hong, LIU Wei-xing. Study on determination of  $\beta$ -lactoglobulin in dairy products by capillary electrophoresis [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2010, 22(5): 414-417