

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240219006

高效液相色谱法检测奶及奶制品中未变性乳铁蛋白

张宁^{1,2}, 叶巧燕¹, 郑百芹², 郑楠¹, 王加启¹, 王磊², 周鑫², 刘慧敏^{1*}

[1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶及奶制品质量检验检测中心(北京), 北京 100193;
2. 唐山市食品药品综合检验检测中心, 唐山 063000]

摘要: **目的** 建立一种基于高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定奶及奶制品中未变性乳铁蛋白的分析方法。**方法** 本研究探索了奶及奶制品前处理方法、分析未变性乳铁蛋白的方法的液相色谱条件、检出限、定量性、线性范围、重复性、再现性等关键参数。**结果** 利用磷酸盐缓冲液对样品进行稀释, 用1 mL规格的HiTrap™ Heparin HP肝素亲和柱进行富集和纯化为简单有效的前处理方法, 分析未变性乳铁蛋白的液相色谱条件为: XBridge Protein BEH C₄色谱柱(4.6 mm×250 mm, 3.5 μm), 柱温60°C。针对液态奶样品, 本方法的检出限为2.5 mg/kg、定量限为5.0 mg/kg, 回收率为106.0%~107.5%; 针对乳粉样品, 本方法的检出限为5.0 mg/kg、定量限为10.0 mg/kg, 回收率为103.5%~107.7%。奶及奶制品中未变性乳铁蛋白的定量上限为100 mg/kg, 在线性范围内具有良好的线性关系($r^2 > 0.999$)。平行性实验、日间实验、日内实验和实验室间比对实验表明, 本方法具有良好的重复性和再现性。**结论** 本方法前处理简单、检测速度快, 可以实现对不同类型奶及奶制品中未变性乳铁蛋白的定量分析, 可为企业和质检机构评价奶及奶制品品质提供标准。

关键词: 奶; 奶制品; 未变性乳铁蛋白; 高效液相色谱法

Detection of native lactoferrin in milk and dairy products using high performance liquid chromatography

ZHANG Ning^{1,2}, YE Qiao-Yan¹, ZHENG Bai-Qin², ZHENG Nan¹, WANG Jia-Qi¹,
WANG Lei², ZHOU Xin², LIU Hui-Min^{1*}

[1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences Milk and Milk Products Inspection Center of Agriculture and Rural Affairs (Beijing), Beijing 100193, China; 2. Tangshan Food and Drug Comprehensive Testing Center, Tangshan 063000, China]

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the determination of native lactoferrin in milk and dairy products based on high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Key parameters such as the pretreatment methods of milk and dairy products, the liquid chromatography conditions for the analysis of native lactoferrin, limit of detection, limit of quantification, linear range, repeatability, and reproducibility were

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1301003)、新疆自治区重大科技专项(2022A02006-3-1)、产业技术体系项目(CARS-36)、创新工程项目(ASTIP-IAS12)、河北省现代农业产业技术体系建设专项(HBCT2024230206)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1301003), the Major Science and Technology Projects in Xinjiang Autonomous Region (2022A02006-3-1), the Industrial Technology System (CARS-36), the Innovation Engineering (ASTIP-IAS12), and the Special Fund for the Construction of Modern Agricultural Industry Technology System in Hebei Province (HBCT2024230206)

*通信作者: 刘慧敏, 博士, 副研究员, 主要研究方向为牛奶质量安全与营养品质。E-mail: liuhuiming521@163.com

*Corresponding author: LIU Hui-Min, Ph.D, Associate Professor, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences Milk and Milk Products Inspection Center of Agriculture and Rural Affairs (Beijing), Beijing 100193, China. E-mail: liuhuiming521@163.com

explored. **Results** Phosphate buffer was used to dilute the samples, and a 1 mL HiTrap™ Heparin HP affinity column was used for enrichment and purification, which was a simple and effective pretreatment method. The liquid chromatography conditions for the analysis of native lactoferrin were: XBridge Protein BEH C₄ column (4.6 mm×250 mm, 3.5 μm), with a column temperature of 60°C. For liquid milk samples, the detection limit of this method was 2.5 mg/kg, the quantitative limit was 5.0 mg/kg, and the recovery rate ranged from 106.0% to 107.5%. For milk powder samples, the detection limit of this method was 5.0 mg/kg, the quantitative limit was 10.0 mg/kg, and the recovery rate ranged from 103.5% to 107.7%. The quantitative upper limit of native lactoferrin in milk and dairy products was 100 mg/kg, and it showed a good linear relationship ($r^2>0.999$) within the linear range. Parallel tests, inter-day experiments, intra-day experiments, and comparisons between laboratories indicated that this method had good repeatability and reproducibility. **Conclusion** This method features simple pretreatment and fast detection speed, enabling quantitative analysis of native lactoferrin in different types of milk and dairy products. It can provide standards for enterprises and quality inspection agencies to evaluate the quality of milk and dairy products.

KEY WORDS: milk; dairy; non-denatured lactoferrin; high performance liquid chromatography

0 引言

乳铁蛋白是母乳中含量丰富的天然成分, 占人乳总蛋白的 20% 以上^[1-2], 其营养价值至少包括两个方面: 一为氨基酸的膳食蛋白来源^[3]; 二为促进铁的生物利用^[4]。牛奶中的乳铁蛋白亦可促进人体中铁的生物利用^[5], 对人体发挥重要的“活性营养”功能^[6], 是婴幼儿配方粉中重要的添加剂之一^[7]。同时, 乳铁蛋白可与病毒的包膜蛋白紧密结合抑制病毒感染^[8], 可促进胃肠道有益菌群的建立, 并可促进人和动物的生长^[5,9]。最新研究表明, 乳铁蛋白对新冠肺炎病毒有显著的抑制效果, 添加乳铁蛋白对新冠肺炎患者进行协同治疗, 病毒核酸转阴时间由标准治疗的 27.13 d 缩短至 14.25 d^[10]。

乳铁蛋白, 分子量约为 80 kDa, 含有约 690 个氨基酸残基^[11-13], 由两个具有 4 个结构域的同源球状裂片组成^[14]。作为转铁蛋白家族的成员, 乳铁蛋白也被认为是一种铁结合糖蛋白^[15-17], 因为它能够结合 Fe^{3+} 离子^[18-19]。开创性工作表明, 乳铁蛋白对三价铁具有很高的亲和力 (K_D 约为 10^{-20} mol/L^[20]), 在调节体液中游离铁水平方面起主要作用^[21-23]。尽管乳铁蛋白与其他转铁蛋白有许多相似之处, 但已观察到乳铁蛋白和血清转铁蛋白之间糖基化位点的定位差异^[24-26]。乳铁蛋白的天冬酰胺残基 137 和 490 被糖基化, 而血清转铁蛋白在 Asn-Lys-Ser(残基 428-430) 和 Asn-Val-Thr(残基 635-637) 上具有糖基化残基^[27-28]。此外, 人转铁蛋白在两个半胱氨酸残基(氨基酸 331 和 339) 处具有二硫键, 而乳铁蛋白上没有这种键^[29-30]。此外, 乳铁蛋白和转铁蛋白的铁输送机制不同。母乳的乳铁蛋白具有比血清转铁蛋白高得多的铁结合平衡能力^[31], 并且能够在比转铁蛋白家族中的其他蛋白低得多的 pH(约 3.0) 下保持铁。这可能归因于分子结构中 N 环和 C 环之间的协同作

用^[20]。当与铁结合时, 乳铁蛋白的 C 环具有比人转铁蛋白更高的旋转度, 因此增强与铁的结合能力。

可见, 乳及乳制品中的乳铁蛋白处于活性状态才有意义^[19,32]。然而, 乳铁蛋白对“热”较为敏感^[33-34], 热处理温度超过 70°C 就容易发生变性, 进而影响其功能^[35-36], 导致奶及奶制品失去了原有的“活性营养功能”。因此, 建立检测奶及奶制品中未变性乳铁蛋白的方法对于评价乳及乳制品的质量控制和营养评价及技工工艺研究具有至关重要意义。本研究建立一种基于高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定奶及奶制品中未变性乳铁蛋白的分析方法, 采用磷酸盐缓冲液提取试样中的乳铁蛋白, 利用肝素亲和柱富集未变性乳铁蛋白、净化杂质, 以反相蛋白质分离柱分离, 紫外检测器检测, 最后利用外标法定量样品中未变性乳铁蛋白的含量, 以期为企业和质检机构评价奶及奶制品品质提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂

牛源乳铁蛋白标准品(纯度 ≥ 85%, CAS: 116897-68-9)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠(分析纯)(美国 Sigma 公司); 三氟乙酸(纯度 99.9%, 北京百灵威科技有限公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); AL204 型电子天平[精度 0.01 g、0.1 mg, 瑞士 Mettler Toledo(上海)公司]; CR22GIII 型离心机(日本 Hitachi 公司); BT100-1L 型蠕动泵(英国 Langer 恒流泵有限公司); PB-10 型 pH 计(德国 Sartorius 公司); 肝素亲和柱(5 mL×1 mL, 美国 Cytiva 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制

磷酸盐缓冲溶液: 无水磷酸二氢钠 4.99 g, 无水磷酸氢二钠 23.85 g, 加 800 mL 水溶解, 用 5 mol/L 氢氧化钠水溶液调节 pH 至 7.50±0.05, 定容至 1 L, 混匀。

淋洗溶液: 无水磷酸二氢钠 0.96 g, 无水磷酸氢二钠 5.96 g, 氯化钠 5.84 g, pH 为 7.50±0.05, 定容至 1 L, 混匀。

洗脱溶液: 无水磷酸二氢钠 2.50 g, 无水磷酸氢二钠 5.96 g, 氯化钠 119.30 g, pH 为 7.50±0.05, 定容至 1 L, 混匀。

1.3.2 色谱条件

XBridge Protein BEH C₄ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 3.5 μm), 检测波长 280 nm, 进样量 30 μL, 流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸水溶液(V:V), 流动相 B 为 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液(V:V), 流速 1.5 mL/min, 柱温 60°C, 线性梯度洗脱。洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	0	6.5	10	12	15	15.5	20
A 相/%	95	62	62	40	40	95	95
B 相/%	5	38	38	60	60	5	5

1.3.3 标准曲线的绘制

将乳铁蛋白标准品按标准品证书提供的纯度换算后称量, 用水配制成 10 mg/mL 的乳铁蛋白标准储备溶液; 准确移取储备溶液 200 μL, 用水定容至 10 mL 混匀配制成 200 mg/L 标准中间溶液; 取乳铁蛋白标准中间溶液, 用洗脱溶液配制成乳铁蛋白系列标准工作溶液, 质量浓度分别为 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 mg/L。用 HPLC 检测, 以乳铁蛋白的质量浓度为横坐标, 色谱峰面积(响应值)为纵坐标, 绘制标准曲线, 其相关系数应不低于 0.99。

1.3.4 样品处理

(1) 样品提取

生乳、巴氏杀菌乳或灭菌乳样品: 准确称取试样 10 g, 加入磷酸盐缓冲溶液定容至 50 mL。12000 r/min 离心 10 min, 取上清液经玻璃纤维滤纸过滤, 收集滤液待净化。

乳粉样品: 准确称取试样 5 g, 加入磷酸盐缓冲溶液定容至 50 mL, 混匀。12000 r/min 离心 10 min, 取上清液经玻璃纤维滤纸过滤, 收集滤液待净化。

(2) 样品净化

肝素亲和柱用 10 mL 淋洗溶液活化, 取 10 mL 上清液过柱, 然后用 10 mL 淋洗溶液淋洗一次, 最终用 5 mL 洗脱溶液洗脱, 过微孔滤膜至样品瓶中, 供高效液相色谱仪测定。

1.3.5 重复性实验

为评估本方法在不同性质样品中的重复性, 制备乳

铁蛋白终浓度为 5.0、20.0 和 50.0 mg/kg 的灭菌乳样品, 同时, 制备乳铁蛋白终浓度为 10.0、50.0 和 100.0 mg/kg 的乳粉样品, 分别计算不同样品的加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 每个浓度进行 3 个样品的重复测定。

1.4 数据处理

实验结果采用 Microsoft Office 2010 和 Waters Empower 3 软件进行统计分析和图像分析。

2 结果与分析

2.1 乳铁蛋白标准品的选择

选择合适的标准品, 是建立可靠检测方法的前提。为此, 对市售“乳铁蛋白标准品”产品调研, 研究比较了相关产品质量证书。结果显示: 目前国内市场上所谓“乳铁蛋白标准品”产品超过 25 种, CAS 号主要包括 3 种, 分别为 936541-36-5、146897-68-9 和 112163-33-4。

不同 CAS 号“乳铁蛋白标准品”分子量差别较大, 来源不同。CAS 号为 936541-36-5 的“乳铁蛋白标准品”, 目前有两种, 一种为水稻细胞重组表达的人乳铁蛋白, 分子量为 80 kDa(翌圣生物品牌), 另一种为来源于牛初乳的乳铁蛋白, 分子量约 90 kDa (Sigma 品牌)。CAS 号为 146897-68-9 的“乳铁蛋白标准品”, 目前有两种, 一种为来源于牛乳的乳铁蛋白, 分子量为 82.4 kDa (Supelco 品牌), 另一种为源自牛乳, 分子量为 80 kDa(源叶品牌)。CAS 号为 112163-33-4 的“乳铁蛋白标准品”因存在产品信息存在明显错误而被舍弃。不同品牌“乳铁蛋白标准品”的峰面积比较结果见表 2。

表 2 不同品牌“乳铁蛋白标准品”的峰面积比较
Table 2 Comparison of peak area of different brands of “lactoferrin standard”

品牌	50 mg/L 溶液峰面积	RSDs/%
Sigma	62094±807.22	33.8
Supelco	100037±800.30	
翌圣生物	52995±741.93	
源叶	52259±783.89	

由表 2 可知, Supelco 的标准品经肝素亲和柱结合除杂后, 得到的峰面积最大, 说明其未变性的乳铁蛋白含量最高, 可用于对未变性乳铁蛋白的定量。因此, 本研究使用的乳铁蛋白标准品为 Supelco 品牌, CAS 号 146897-68-9(货号为 L-047-50MG)。

2.2 色谱柱的选择

实验选取 BEH C₁₈ 和 BEH C₄ 色谱柱对质量浓度为 100 mg/L 的免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、牛血

清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、乳铁蛋白、 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的色谱峰进行比较。如图 1 所示, 在应用 BEH C₄ 色谱柱时, 乳铁蛋白标准品的色谱峰与 IgG、BSA、 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的色谱峰具有较高的区分度, 峰型尖锐对称, 而应用 BEH C₁₈ 色谱柱不能实现上述效果, 所以本研究选择 BEH C₄ 色谱柱用于后续的方法开发。

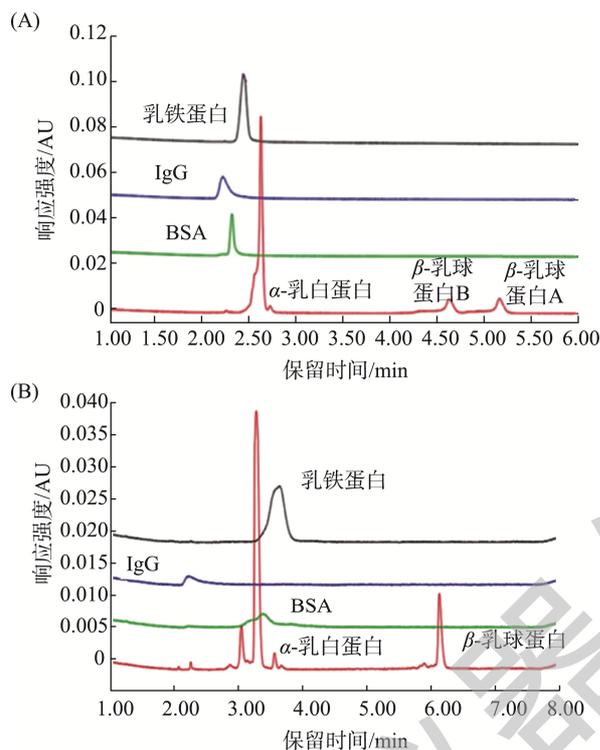


图1 应用(A) BEH C₄和(B) BEH C₁₈色谱柱检测乳铁蛋白标准溶液的色谱图

Fig.1 Chromatograms of lactoferrin standard solution detected using (A) BEH C₄ and (B) BEH C₁₈ columns

2.3 检测波长的选择

为了提高本研究方法的灵敏度, 本研究探索了乳铁蛋白的最大吸收波长, 分别利用波长 210 nm 和 280 nm 对乳铁蛋白进行分析。由图 2 可知, 在 280 nm 检测波长下, 乳铁蛋白色谱峰的信噪比更高, 且基线更加平稳, 因此本研究后续的开发, 均采用 280 nm 作为乳铁蛋白的最佳检测波长。

2.4 色谱柱柱温的确定

色谱柱柱温是影响物质分离效果和检测周期的关键因素。为确定检测乳铁蛋白的合适柱温, 本研究分别探索了质量浓度为 50 mg/L 乳铁蛋白标准品在不同柱温条件下的分析结果, 柱温分别为 25、30、35、40、50、60°C。结果如图 3 所示, 柱温为 60°C 时, 乳铁蛋白的峰型最好, 尖锐对称且响应值最大, 因此确定最佳色谱柱柱温为 60°C。

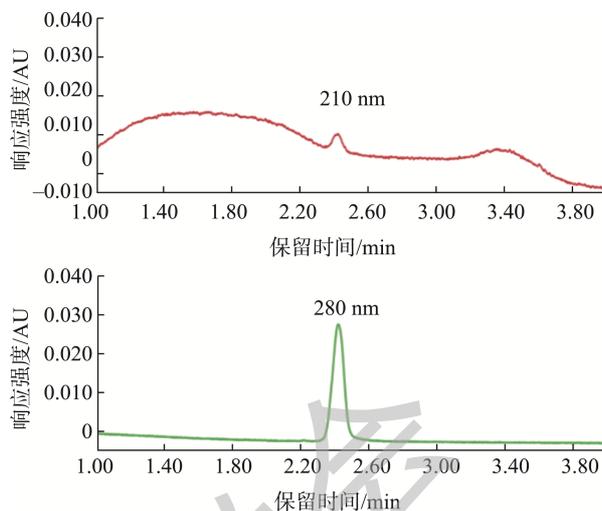


图2 不同检测波长下乳铁蛋白典型色谱图(100 mg/L)
Fig.2 Typical chromatograms of lactoferrin at different detection wavelengths (100 mg/L)

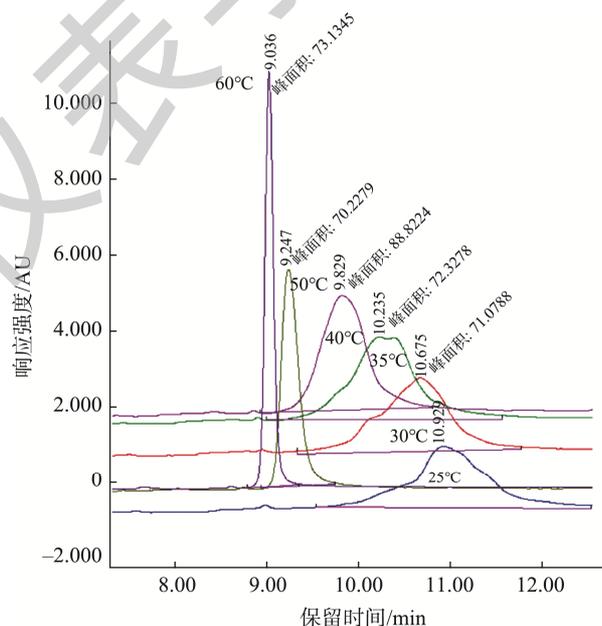


图3 不同柱温下乳铁蛋白典型色谱图

Fig.3 Typical chromatograms of lactoferrin at different column temperatures

2.5 固相萃取柱的确定

目前较常见的固相萃取柱主要为 C₁₈ 柱, 但由于仅通过疏水性吸附牛奶中的蛋白, 对蛋白的选择性不强, 导致牛奶中的其他乳清蛋白会与乳铁蛋白形成竞争性吸附, 造成乳铁蛋白的流失, 使乳铁蛋白含量回收率不高, 故 C₁₈ 固相萃取柱不适用于富集牛奶样品中的乳铁蛋白。肝素属于糖胺聚糖家族的硫酸化多糖, 含有高密度的负电荷, 可特异性吸附牛奶中未变性的乳铁蛋白, 适合乳铁蛋白的富集、净化和后续分析。因此选择肝素亲和柱对牛奶进行前处理, 用于牛奶中非变性乳铁蛋白的富集、纯化。

2.6 肝素亲和柱规格的选择

尽管肝素亲和柱可有效富集牛奶中未变性乳铁蛋白,但需要选择规格合适的肝素亲和柱。如果肝素亲和柱的载量低于牛奶中乳铁蛋白的含量,会造成部分乳铁蛋白的流穿,导致测量的结果偏低。而载量过大,会提高肝素亲和柱的成本,造成不必要的浪费。因此,选择合适规格的肝素亲和柱十分重要。经测算,10 mL 牛奶中的乳铁蛋白总量不会超过 8 mg。本研究探索了 1 mL 规格的 HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱的载量。如图 4 所示,8 mg 乳铁蛋白过柱回收率达到 101.27%,满足实验要求。因此,本研究选择 1 mL 规格的 HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱,用于后续实验。

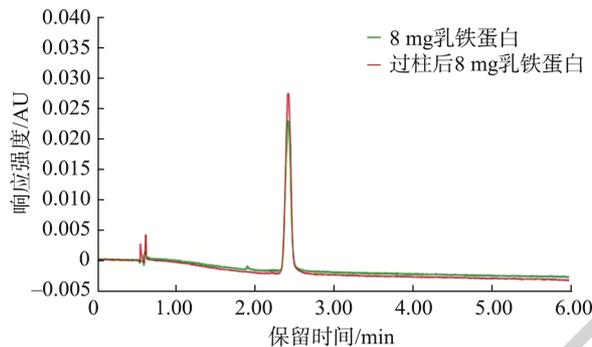


图4 肝素亲和柱承载量的测定色

Fig.4 Chromatogram for determination of the loading capacity of heparin affinity column

2.7 肝素亲和柱洗脱体积的确定

为保证实验的准确性,本研究探索完全洗脱乳铁蛋白的洗脱液体积。利用 1 mL HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱,分别用 5 mL 洗脱溶液对其洗脱 3 次,分析乳铁蛋白的含量。由图 5 可知,仅第 1 次 5 mL 含有乳铁蛋白,其他两次洗脱,均未检测到乳铁蛋白,说明 5 mL 的洗脱液即可将乳铁蛋白完全洗脱,本方法后续的洗脱体积均为 5 mL。

2.8 检出限、定量限和线性范围

为确定本方法的检出限、定量限和线性范围,本研究首先确定了乳铁蛋白标准曲线的适用范围,即用洗脱溶液配制成乳铁蛋白系列标准工作溶液,质量浓度分别为 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 mg/L。用 HPLC 检测,以乳铁蛋白的质量浓度(X , mg/L)为横坐标,色谱峰面积(响应值)(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明乳铁蛋白的质量浓度在 2.0~100.0 mg/L 之间呈良好线性关系,相关系数 $r^2=0.9999$,如图 6 所示,计算得到回归方程 $Y=1414.632X-1401.239$ 。

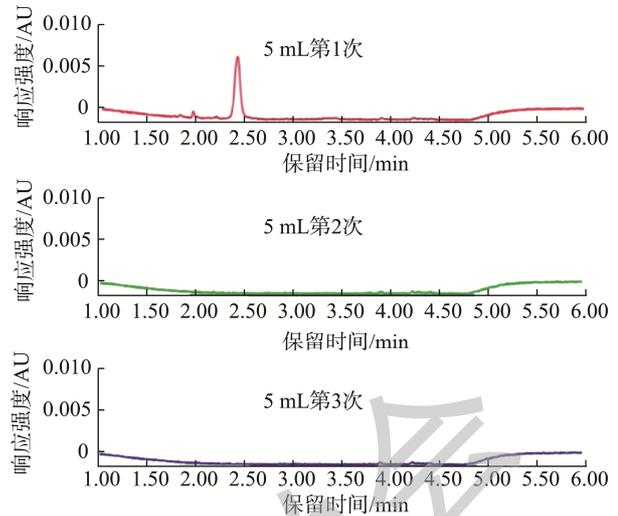


图5 肝素亲和柱洗脱体积的测定色谱图

Fig.5 Chromatogram for determination of elution volume of heparin affinity column

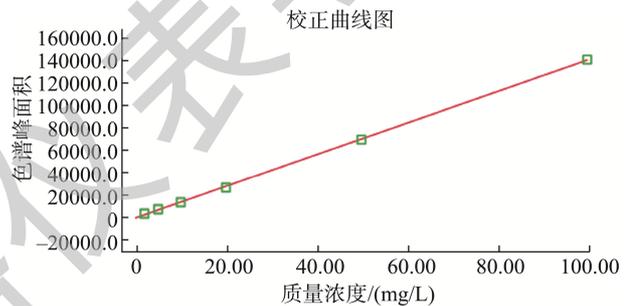


图6 乳铁蛋白标准曲线

Fig.6 Standard curve of lactoferrin

为确定乳品中未变性乳铁蛋白的检出限、定量限和线性范围,本研究选用不同的种类的样品进行相关参数的确立。样品类型包括液态奶和乳粉。为研究液态奶中未变性乳铁蛋白的检出限和定量限,选择不含乳铁蛋白的灭菌乳,进行乳铁蛋白标准品添加实验,添加终浓度分别为 2.5 mg/kg 和 5.0 mg/kg,结果表明,上述浓度的液态奶样品中检出乳铁蛋白的信噪比分别大于 3 和 10,回收率均在 90%~110%,说明液态奶中未变性乳铁蛋白的检出限和定量限分别为 2.5 mg/kg 和 5.0 mg/kg。为研究乳粉中乳铁蛋白的检出限和定量限,选择不含乳铁蛋白的乳粉,进行乳铁蛋白标准品添加实验,添加量添加终浓度为 5.0 mg/kg 和 10.0 mg/kg,结果表明,两种样品中检出乳铁蛋白的信噪比分别大于 3 和 10,回收率均在 90%~110%,说明乳粉中未变性乳铁蛋白的检出限和定量限分别为 5.0 mg/kg 和 10.0 mg/kg。液态奶和乳粉的定量上限均为 100 mg/kg。

2.9 重复性

为测定方法的重复性,本研究选用不同的种类的样品进行相关参数的确立。样品类型包括液态奶和乳粉。由表 3 可知,对灭菌乳样品,添加后终浓度为 5.0、20.0 和

表 3 回收率实验结果
Table 3 Recovery rate experiment results

高温灭菌乳样品			乳粉样品		
加标终浓度/(mg/kg)	实测值/(mg/kg)	回收率/%	加标终浓度/(mg/kg)	实测值/(mg/kg)	回收率/%
5.0	5.33±0.10	106.7±2.08	10.0	10.77±0.25	107.7±2.52
20.0	21.20±0.36	106.0±1.80	50.0	52.67±1.61	105.3±3.21
50.0	54.05±0.64	107.5±1.28	100.0	103.5±1.50	103.5±1.50

50.0 mg/kg 的乳铁蛋白时, 回收率为 106.0%~107.5%; 对乳粉样品, 添加后终浓度为 10.0、50.0 和 100.0 mg/kg 的乳铁蛋白时, 回收率为 103.5%~107.7%。综上, 针对于乳品样品, 本方法具有良好的重复性。

为进一步验证本方法的重复性, 本研究分析了日内和日间精密度。在灭菌乳、乳粉中分别添加不同浓度的乳铁蛋白标准品, 按照上述前处理方法对牛奶进行处理, 每个水平重复 3 次测得日内精密度, 连续 2 d 进行实验测定方法的日间精密度, 最终结果见表 4 和表 5。结果表明, 本方法的日内和日间 RSD 低于 10%, 满足一般分析方法对精密度的规定。

2.10 重现性

本方法分别在 3 家实验室开展比对实验, 探索其重现性。针对巴氏杀菌乳样品, 分别加入终浓度为 5.0、20.0 和 50.0 mg/kg 的乳铁蛋白标准品; 针对乳粉样品, 分别加入终浓度为 10.0、50.0 和 100.0 mg/kg 的乳铁蛋白标准品, 每个样品进行 3 个水平的重复。如表 6~8 所示, 回收率的 RSDs 均小于 7%, 说明本方法具有良好的重现性。

表 4 灭菌乳样品的日内和日间精密度

Table 4 Inter-days and intra-days precision of the sterilized milk samples

乳铁蛋白浓度/(mg/kg)	日内精密度		日间精密度	
	实测值/(mg/kg)+SD	RSDs/%	实测值/(mg/kg)+SD	RSDs/%
5.0	5.33±0.10	2.0	5.4±0.07	1.3
20.0	21.20±0.36	1.7	20.17±0.51	2.5
50.0	54.05±0.64	1.2	50.05±0.92	1.8

表 5 乳粉样品中日内和日间精密度实验结果

Table 5 Inter-days and intra-days precision of the mild powder samples

乳铁蛋白浓度/(mg/kg)	日内精密度		日间精密度	
	实测值/(mg/kg)+SD	RSDs/%	实测值/(mg/kg)+SD	RSDs/%
10.0	10.77±0.25	2.3	10.34±0.48	4.6
50.0	52.67±1.63	3.1	52.39±0.82	1.6
100.0	103.5±1.45	1.4	100.58±2.97	3.0

表 6 实验室 1 的回收率和精密度验证实验

Table 6 Recovery rates and precisions validation test of Lab 1

加标终浓度/(mg/kg)	样品编号	上机测定质量浓度/(mg/L)	理论上机质量浓度/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%	RSDs/%
/	巴氏未添加	8.688	/	/	/	/
5.0	巴氏 5+1	10.586	2.0	95.0	96.7	3.0
	巴氏 5+2	10.692		100.0		
	巴氏 5+3	10.584		95.0		
20.0	巴氏 20+1	16.870	8.0	102.5	98.8	3.3
	巴氏 20+2	16.480		97.5		
	巴氏 20+3	16.425		96.3		
50.0	巴氏 50+1	28.527	20.0	99.0	100	1.0
	巴氏 50+2	28.741		100.0		
	巴氏 50+3	28.904		101.0		
/	乳粉未添加	0	/	/	/	/
10.0	乳粉 10+1	2.004	2.0	100.2	100.4	0.1
	乳粉 10+2	2.146		107.3		
	乳粉 10+3	2.030		101.5		
50.0	乳粉 50+1	9.344	10.0	93.4	101.9	1.3
	乳粉 50+2	9.442		94.4		
	乳粉 50+3	9.228		92.3		
100.0	乳粉 100+1	18.794	20.0	94.0	100.8	1.1
	乳粉 100+2	19.662		98.3		
	乳粉 100+3	18.698		93.5		

注: /表示无此项, 表 7、8 同。

表 7 实验室 2 回收率和精密度验证实验
Table 7 Recovery rates and precisions validation test of Lab 2

加标终浓度/(mg/kg)	样品编号	上机测定质量浓度/(mg/L)	理论上机质量浓度/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%	RSDs/%
/	巴氏未添加	10.377	/	/	/	/
	巴氏 5+1	12.371		99.7		
5.0	巴氏 5+2	12.325	2.0	97.4	99.2	1.6
	巴氏 5+3	12.384		100.4		
	巴氏 20+1	18.131		96.9		
20.0	巴氏 20+2	18.369	8.0	99.9	98.2	1.6
	巴氏 20+3	18.190		97.7		
	巴氏 50+1	29.612		96.2		
50.0	巴氏 50+2	29.373	20.0	95.0	95.5	0.6
	巴氏 50+3	29.469		95.5		
/	乳粉未添加	0	/	/	/	/
	乳粉 10+1	2.007		100.4		
10.0	乳粉 10+2	2.011	2.0	100.6	100.4	0.1
	乳粉 10+3	2.006		100.3		
	乳粉 50+1	10.298		103.0		
50.0	乳粉 50+2	10.034	10.0	100.3	101.9	1.3
	乳粉 50+3	10.231		102.3		
	乳粉 100+1	20.203		101.0		
100.0	乳粉 100+2	19.934	20.0	99.7	100.8	1.1
	乳粉 100+3	20.354		101.8		

表 8 实验室 3 回收率和精密度验证实验
Table 8 Recovery rates and precisions validation test of Lab 3

加标终浓度/(mg/kg)	样品编号	实测结果/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	RSDs/%
/	样品未加标	0	/	/	/
	5-1	5.4	107.0		
5.0	5-2	5.4	108.5	107.3	1.0
	5-3	5.3	106.5		
	20-1	19.3	96.3		
20.0	20-2	21.3	106.6	103.2	5.8
	20-3	21.3	106.6		
	100-1	46.2	92.4		
50.0	100-2	50.9	101.9	98.7	5.6
	100-3	50.9	101.9		
/	样品未加标	18.7	/	/	/
	10-1	28.6	98.5		
10.0	10-2	28.5	98.0	99.5	2.2
	10-3	28.9	102.0		
	50-1	69.7	102.0		
50.0	50-2	71.9	106.4	104.5	2.2
	50-3	71.3	105.2		
	100-1	114.3	95.6		
100.0	100-2	127.7	109.0	103.8	6.9
	100-3	125.7	107.0		

3 结 论

本研究利用 HPLC 建立了奶及奶制品中未变性乳铁蛋白的检测方法。本方法前处理过程简单, 仅需对样品进行稀释、离心、净化、过滤, 大大缩短实验周期。本方法的色谱条件如下: XBridge Protein BEH C₄ 液相色谱柱, 检测波长为 280 nm。本方法建立的标准曲线具有良好的线性关系, 相关系数(r^2)>0.999, 线性范围为 2.0~100.0 mg/L; 针对不同性质的样品, 回收率在 103.5%~107.7%之间; 再现性的 RSDs 小于 7%, 表明该方法具有良好的稳定性和重复性。综上, 本方法适用于不同类型的奶及奶制品样品中未变性乳铁蛋白的快速分析, 为生产企业和质检机构对奶及奶制品品质的评估提供了技术保障。

参考文献

- [1] NIAZ B, SAEED F, AHMED A, *et al.* Lactoferrin (LF): A natural antimicrobial protein [J]. *Int J Food Propert*, 2019, 22(1): 1626–1641.
- [2] NAGASAWA T, KIYOSAWA I, KUWAHARA K. Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk [J]. *J Dairy Sci*, 1972, 55(12): 1651–1659.
- [3] DONOVAN SM. Human milk proteins: Composition and physiological significance [J]. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 2019, 90: 93–101.
- [4] SUPERTI F. Lactoferrin from bovine milk: A protective companion for life [J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2562.
- [5] HAO L, SHAN Q, WEI J, *et al.* Lactoferrin: Major physiological functions and applications [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2019, 20(2): 139–144.
- [6] ZHANG Y, LU C, ZHANG J. Lactoferrin and its detection methods: A review [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2492.
- [7] 赵飒, 张晓梅, 鲍蕾, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛乳基婴幼儿配方奶粉中的乳铁蛋白[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(24): 9326–9333.
ZHAO S, ZHANG XM, BAO L, *et al.* Determination of lactoferrin in milk-based infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(24): 9326–9333.
- [8] ALBAR AH, EL-FAKHARANY EM, ALMEHDAR HA, *et al.* *In vitro* exploration of the anti-HCV potential of the synthetic spacer peptides derived from human, bovine, and camel lactoferrins [J]. *Prot Pept Lett*, 2017, 24(10): 909–921.
- [9] Retraction note to: Lactoferrin promote primary rat osteoblast proliferation and differentiation via up-regulation of insulin-like growth factor-I expression [Z].
- [10] CAMPIONE E, LANNA C, COSIO T, *et al.* Lactoferrin as antiviral treatment in COVID-19 management: Preliminary evidence [J]. *Int J Environ Res Pub Health*, 2021, 18(20): 10985.
- [11] TELANG S. Lactoferrin: A critical player in neonatal host defense [J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1228.
- [12] LI HY, LI M, LUO CC, *et al.* Lactoferrin exerts antitumor effects by inhibiting angiogenesis in a HT29 human colon tumor model [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(48): 10464–10472.
- [13] BROOKS CL, ARUTYUNOVA E, LEMIEUX MJ. The structure of lactoferrin-binding protein B from *Neisseria meningitidis* suggests roles in iron acquisition and neutralization of host defences [J]. *Acta Crystall Section F Struct Bio Commun*, 2014, 70(10): 1312–1317.
- [14] BAKER EN, BAKER HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin [J]. *Cell Molecul Life Sci*, 2005, 62(22): 2531–2539.
- [15] NAKANO M, SUZUKI M, WAKABAYASHI H, *et al.* Synergistic anti-candida activities of lactoferrin and the lactoperoxidase system [J]. *Drug Discov Therap*, 2019, 13(1): 28–33.
- [16] JIANG R, LONNERDAL B. Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways [J]. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95(1): 99–109.
- [17] KANYSHKOVA TG, BABINA SE, SEMENOV DV, *et al.* Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin [J]. *Europ J Biochem*, 2003, 270(16): 3353–3361.
- [18] GRAMMATIKOVA NE, REZVAN SP, NEMTSOVA ER, *et al.* *In vitro* study of antimicrobial activity of lactoferrins from various sources [J]. *Antibiot Khimioter*, 2010, 55(7-8): 4–9.
- [19] GONZÁLEZ-CHÁVEZ SA, ARÉVALO-GALLEGOS S, RASCÓN-CRUZ Q. Lactoferrin: Structure, function and applications [J]. *Int J Antim Agent*, 2009, 33(4): 301.e301–301.e308.
- [20] BAKER HM, BAKER EN. Lactoferrin and Iron: structural and dynamic aspects of binding and release [J]. *Biometals*, 2004, 17(3): 209–216.
- [21] NAGASAKO Y, SAITO H, TAMURA Y, *et al.* Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution [J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76(7): 1876.
- [22] BROCK JH. Lactoferrin in human milk: Its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant [J]. *Arch Dis Child*, 1980, 55(6): 417–421.
- [23] MASSON PL, HEREMANS JF, SCHONNE E. Lactoferrin, an iron-binding protein Ni neutrophilic leukocytes [J]. *J Exp Med*, 1969, 130(3): 643–658.
- [24] BRIANA DD, PAPADOPOULOU A, SYRIDOU G, *et al.* Early human milk lactoferrin during SARS-CoV-2 infection [Z].
- [25] LIU ZS, LIN CF, LEE CP, *et al.* A single plasmid of nisin-controlled bovine and human lactoferrin expressing elevated antibacterial activity of lactoferrin-resistant probiotic strains [J]. *Antibiotics*, 2021, 10(2): 120.
- [26] ADLEROVA L, BARTOSKOVA A, FALDYNA MJVM. Lactoferrin: A review [J]. 2008, 53(9): 457–468.
- [27] LEVAY P F, VILJOEN M. Lactoferrin: A general review [J]. *Haematologica*, 1995, 80(3): 252–267.
- [28] METZ-BOUTIGUE MH, JOLLÈS J, MAZURIER J, *et al.* Human lactotransferrin: Amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins [J]. *Europ J Biochem*, 1984, 145(3): 659–676.
- [29] WALLY J, BUCHANAN SK. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin [J]. *BioMetals*, 2007, 20(3): 249.
- [30] VÍGH R, CSER L, KILÁR F, *et al.* Different segmental flexibility of

- human serum transferrin and lactoferrin [J]. Arch Biochem Biophys, 1989, 275(1): 181–184.
- [31] COLONETTI T, CARVALHO FI, FIGUEIREDO P, *et al.* Colostrum use and the immune system of premature newborns: A systematic review and meta-analysis [J]. J Human Lactat, 2022, 38(3): 487–500.
- [32] VALK-WEEBER RL, ESHUIS-DE RUITERT, DIJKHUIZEN L, *et al.* Dynamic temporal variations in bovine lactoferrin glycan structures [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(2): 549–560.
- [33] XIONG L, LI C, BOEREN S, *et al.* Effect of heat treatment on bacteriostatic activity and protein profile of bovine whey proteins [J]. Food Res Int, 2020, 127: 108688.
- [34] TEIXEIRA AG, BICALHO ML, MACHADO VS, *et al.* Heat and ultraviolet light treatment of colostrum and hospital milk: Effects on colostrum and hospital milk characteristics and calf health and growth parameters [J]. Vet J, 2013, 197(2): 175–181.
- [35] CHATTERTON DEW, AAGAARD S, HESSELBALLE HT, *et al.* Bioactive proteins in bovine colostrum and effects of heating, drying and irradiation [J]. Food Funct, 2020, 11(3): 2309–2327.
- [36] LI Q, ZHAO Z. Interaction between lactoferrin and whey proteins and its influence on the heat-induced gelation of whey proteins [J]. Food Chem, 2018, 252: 92–98.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)

作者简介



张宁, 硕士, 高级兽医师, 主要研究方向为畜产品检测和食品安全检测。
E-mail: zhangning1112023@163.com



刘慧敏, 博士, 副研究员, 主要研究方向为牛奶质量安全与营养品质。
E-mail: liuhuiming521@163.com

中国仪器仪表学会