

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4629—2025

牛乳及其制品中免疫球蛋白IgG的测定 高效液相色谱法

Determination of immunoglobulin G in milk and dairy products—
High performance liquid chromatography

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室(北京)、农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京)、新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、中优乳业研究院(天津)有限公司、唐山市食品药品综合检验检测中心、内蒙古智慧质量中心有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司。

本文件主要起草人：刘慧敏、叶巧燕、赵艳坤、郑楠、陈岭军、张宁、屈雪寅、郭洪侠、张慧萍、王象欣。



牛乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了牛乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 测定的高效液相色谱方法。

本文件适用于生牛乳、巴氏杀菌牛乳和添加了含有免疫球蛋白 IgG 成分的牛乳基婴幼儿配方乳粉中免疫球蛋白 IgG 含量的测定。

本文件中生牛乳、巴氏杀菌牛乳中免疫球蛋白 IgG 的定量限为 10 mg/kg；添加了含有免疫球蛋白 IgG 成分的牛乳基婴幼儿配方乳粉中免疫球蛋白 IgG 的定量限为 40 mg/kg。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的免疫球蛋白 IgG 用磷酸缓冲溶液提取，经 Protein G 亲和柱富集净化，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 三氟乙酸：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 氢氧化钠溶液（10 mol/L）：称取 40 g 氢氧化钠，用 80 mL 水溶解，定容至 100 mL，混匀。

5.5 盐酸溶液（10 mol/L）：量取 250 mL 盐酸（含量 36%~38%），缓慢倒入 50 mL 水中，混匀。

5.6 三氟乙酸溶液（0.1%）：准确移取 1 mL 三氟乙酸（5.2），用水定容至 1 L，混匀。临用现配。

5.7 三氟乙酸乙腈溶液（0.1%）：准确移取 1 mL 三氟乙酸（5.2），用乙腈（5.3）定容至 1 L，混匀。临用现配。

5.8 磷酸盐缓冲溶液：称取无水磷酸二氢钾 6.8 g，加 950 mL 水溶解，混匀。用氢氧化钠溶液（5.4）调节 pH 至 7.00 ± 0.05 ，用水定容至 1 L，混匀。临用现配。

5.9 甘氨酸洗脱溶液（0.1 mol/L）：称取甘氨酸（优级纯）1.5 g，加 190 mL 水溶解，混匀。用盐酸溶液（5.5）调节 pH 至 2.50 ± 0.05 ，用水定容至 200 mL，混匀。临用现配。

5.10 免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液：8.5 mg/mL¹⁾，按照附录 A 校准；或市售有证标准物质。

5.11 免疫球蛋白 IgG 标准中间溶液（1 mg/mL）：准确移取适量牛免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液

1) 免疫球蛋白 IgG 标准品是由北京美正检测技术有限公司提供的编号为 MSL273 的产品。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对该产品的认可；如其他产品具有相同效果，则可使用这些等效产品。

(5.10),用甘氨酸洗脱溶液(5.9)稀释并定容,使其浓度为1 mg/mL。临用现配。

5.12 免疫球蛋白 IgG 标准系列溶液:准确移取一定量的免疫球蛋白 IgG 标准中间溶液(5.11),用甘氨酸洗脱溶液(5.9)稀释定容,配制成牛免疫球蛋白 IgG 浓度分别为5 mg/L、10 mg/L、40 mg/L、80 mg/L、160 mg/L 和 200 mg/L 的标准系列溶液。临用现配。

5.13 Protein G 亲和柱:2 mg protein G/mL,1 mL¹⁾;或其他性能类似的纯化柱。

5.14 微孔滤膜:水系,0.22 μm。

5.15 玻璃纤维滤纸:0.45 μm。

6 仪器设备

6.1 液相色谱仪:配紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 紫外-可见分光光度计:波长精度±2 nm。

6.3 天平:精度为0.01 g、0.1 mg 和 0.01 mg。

6.4 涡旋混合器。

6.5 离心机:转速不低于12 000 r/min。

6.6 固相萃取装置。

6.7 pH 计:精度为±0.01。

7 样品

7.1 生牛乳、巴氏杀菌牛乳

取有代表性样品约200 g,混匀,装入洁净容器中。立即测定。

7.2 牛乳基婴幼儿配方乳粉

取有代表性样品约200 g,混匀,装入洁净容器中,常温密闭保存。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取生牛乳或巴氏杀菌牛乳试样10 g(婴幼儿配方乳粉5 g),精确至0.1 mg,于50 mL离心管中,加入30 mL磷酸盐缓冲溶液(5.8),涡旋1 min,全部转移至50 mL容量瓶中,用磷酸盐缓冲溶液(5.8)少量多次清洗离心管,溶液合并至容量瓶,并定容。溶液转移至50 mL离心管中,12 000 r/min离心10 min,过滤(5.15),滤液待净化。

8.2 净化

用10 mL磷酸盐缓冲溶液(5.8)活化亲和柱(5.13),准确移取20 mL滤液(8.1)过柱,用10 mL磷酸盐缓冲溶液(5.8)淋洗,4 mL甘氨酸洗脱溶液(5.9)洗脱,收集洗脱液,用甘氨酸洗脱溶液(5.9)定容至5 mL,涡旋混匀,过膜(5.14),待测。

8.3 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:C₄色谱柱(300 Å),柱长250 mm,内径4.6 mm,粒径3.5 μm,或性能相当者;
- b) 检测波长:280 nm;
- c) 流速:1.5 mL/min;
- d) 柱温:65 ℃;
- e) 进样:30 μL;
- f) 流动相:A为三氟乙酸溶液(5.6),B为三氟乙酸乙腈溶液(5.7),梯度洗脱条件见表1。

1) Protein G 亲和柱是由美国 cytiva 公司提供的编号为 17040401 的产品。给出这一信息是为了方便本文件使用者,并不表示对该产品的认可;如其他产品具有相同效果,则可使用这些等效产品。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	A %	B %
0	95	5
6.5	62	38
10.0	62	38
12.0	40	60
15.0	40	60
15.5	95	5
20.0	95	5

8.4 测定

8.4.1 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列溶液(5.12)和试样溶液(8.2)上机测定。免疫球蛋白 IgG 标准溶液的液相色谱图见附录 B。

8.4.2 定性

以保留时间定性,试样溶液中免疫球蛋白 IgG 保留时间应与标准系列溶液(浓度相当)中免疫球蛋白 IgG 的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

8.4.3 定量

以免疫球蛋白 IgG 的浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线,其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中免疫球蛋白 IgG 的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围,应将试样溶液(8.2)用甘氨酸洗脱溶液(5.9)稀释后,重新测定。

9 试验数据处理

试样中免疫球蛋白 IgG 的含量以质量分数 ω 计,单位为毫克每千克(mg/kg),按公式(1)计算。

$$\omega = \frac{\rho \times V_3 \times V_1 \times 1\,000}{m \times V_2 \times 1\,000} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中免疫球蛋白 IgG 的质量浓度的数值,单位为毫克每升(mg/L);
- V_3 ——上机液定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_1 ——试样处理液总体积的数值,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量的数值,单位为克(g);
- V_2 ——样液过柱体积的数值,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数;
- f ——超出曲线范围后的稀释倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下,两次独立测试结果的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

附 录 A
(规范性)

免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液浓度校正方法

平行做两份试验。准确移取免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液(5.10)1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲溶液(5.8)定容,混匀,用 1 cm 石英比色杯,以磷酸盐缓冲溶液(5.8)为空白,分别在 280 nm 和 320 nm 处测定其吸光度。

免疫球蛋白 IgG 的浓度以质量浓度 X 计,单位为毫克每毫升(mg/mL),按公式(A.1)计算。

$$X = \frac{A_{280} - (1.7 + A_{320})}{1.4 \times V_2} \times V_1 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- A_{280} ——免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液在 280 nm 处的平均紫外吸光值;
- 1.7 ——校正系数;
- A_{320} ——免疫球蛋白 IgG 标准储备溶液在 320 nm 处的平均紫外吸光值;
- V_1 ——移取体积的数值,单位为毫升(mL);
- 1.4 ——免疫球蛋白 IgG 1%比色光系数;
- V_2 ——定容体积的数值,单位为毫升(mL)。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字。

附 录 B
(资料性)

免疫球蛋白 IgG 标准溶液高效液相色谱图

免疫球蛋白 IgG 标准溶液高效液相色谱图见图 B. 1。

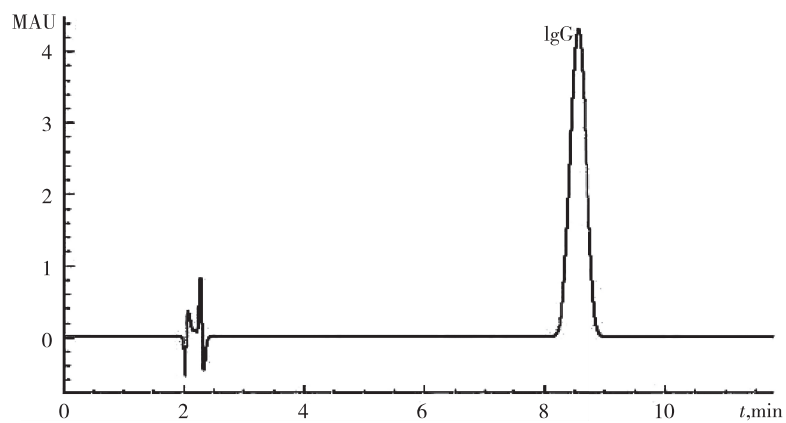


图 B. 1 免疫球蛋白 IgG 标准溶液(40 mg/L)高效液相色谱图