

上海奶业行业协会团体标准

T/SHNX 001—2021

巴氏杀菌鲜牛乳

Pasteurized fresh milk

2021-07-20 发布

2021-08-20 实施

上海奶业行业协会 发布

目 次

前 言	IV
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	2
4 技术要求.....	2
5 生产加工过程的要求.....	3
6 检验规则	3
7 标识、标签、包装、运输及贮存要求	3
附 录 A（ 规 范 性 ） 乳过氧化物酶含量的测定	5
附 录 B（ 规 范 性 ） 乳铁蛋白含量的测定	7
附 录 C（ 规 范 性 ） 免疫球蛋白 IgG 含量的测定	9
附 录 D（ 规 范 性 ） α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白含量的测定	11
参 考 文 献.....	16

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。

本文件由上海奶业行业协会提出并归口。

本文件起草单位：光明乳业股份有限公司、上海市农产品质量安全中心、华测检测认证集团股份有限公司、上海乳品一厂分厂。

本文件主要起草人：刘振民、陆洪、王惠铭、钱建国、张锋华、陈小弟、于鹏、苏永红、任璐、董立雅、韩奕奕、杨菊香、冯晓、谢朋军、李建中。

巴氏杀菌鲜牛乳

1 范围

本文件规定了巴氏杀菌鲜牛乳的术语和定义、技术要求、生产加工过程的卫生要求、检验规则及标识、标签、包装、运输和贮存等要求。

本文件适用于以生牛乳为原料，经过滤、均质、巴氏杀菌、洁净灌装等工艺而制成的产品。

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 191 包装储运图示标志
- GB 2761 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量
- GB 2762 食品安全国家标准 食品中污染物限量
- GB 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定
- GB 5009.6 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定
- GB 5009.239 食品安全国家标准 食品酸度的测定
- GB 5413.39 食品安全国家标准 乳和乳制品中非脂乳固体的测定
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则
- GB 12693 食品安全国家标准 乳制品良好生产规范
- GB/T 18706 液体食品保鲜包装用纸基复合材料
- GB 19301 食品安全国家标准 生乳
- GB 19645 食品安全国家标准 巴氏杀菌乳
- GB/T 27590 纸杯
- GB 28050 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则
- NY/T 800 生鲜牛乳中体细胞的测定方法
- NY/T 3799 牛乳及其制品中碱性磷酸酶活性的测定 发光法
- QB/T 2357 聚酯（PET）无汽饮料瓶
- QB/T 4622 玻璃容器 牛奶瓶
- JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则
- T/TDSTIA 006 奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 液相色谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 巴氏杀菌

在有效杀灭生牛乳中病原性微生物的同时,产生最低程度的化学、物理以及感官变化的热处理操作,热杀菌强度以消毒为限。也称巴氏消毒。

3.2 巴氏杀菌鲜牛乳

以生牛乳为原料,经过滤、标准化、均质、巴氏杀菌、洁净灌装等工序制得的液体产品。

4 技术要求

4.1 原料要求

生牛乳应符合GB 19301的规定,蛋白质、菌落总数和体细胞指标应符合表1规定。投料前生乳的菌落总数应控制在 1×10^5 CFU/mL以内。

表1 生牛乳蛋白质、菌落总数和体细胞指标

项 目	指 标	检验方法
蛋白质/(g/100g)	≥ 3.1	GB 5009.5
菌落总数/(CFU/mL)	$\leq 5.0 \times 10^4$	GB 4789.2
体细胞/(个/mL)	$\leq 3.0 \times 10^5$	NY/T 800

4.2 感官要求

应符合 GB 19645 的规定。

4.3 理化指标

应符合表 2 的规定。

表2 理化指标

项 目	要 求				检验方法
	全脂	减脂	低脂	脱脂	
脂肪/(g/100g)	≥ 3.3	1.5~2.3	≤ 1.4	≤ 0.5	GB 5009.6
蛋白质/(g/100g)	≥ 3.2				GB 5009.5
非脂乳固体/(g/100g)	≥ 8.5				GB 5413.39
酸度/(°T)	12~18				GB 5009.239
乳过氧化物酶/(U/L)	≥ 1500				附录A
碱性磷酸酶*	阴性				NY/T 3799
乳铁蛋白/(mg/kg)	≥ 45				T/TDSTIA 006或附录B
免疫球蛋白IgG/(mg/kg)	≥ 180				附录C
α -乳白蛋白/(mg/kg)	≥ 1000				附录D
β -乳球蛋白/(mg/kg)	≥ 2700				附录D

*碱性磷酸酶应在灌装前的待装罐中采样并及时测定,合格后灌装。

4.4 污染物限量

应符合 GB 2762 的规定。

4.5 真菌毒素限量

应符合 GB 2761 的规定。

4.6 微生物限量

应符合 GB 19645 的规定。

4.7 净含量及允差

应符合“国家质量监督检验检疫总局令[2005]第75号《定量包装商品计量监督管理办法》”的规定。检验方法按JJF 1070规定执行。

5 生产加工过程的要求

应符合 GB 12693 的规定。

6 检验规则

6.1 出厂检验

每批产品须经生产企业检验部门检验。出厂每批应检感官指标、脂肪、蛋白质、非脂乳固体、酸度、碱性磷酸酶、净含量等项目。国家另有规定的应符合相关的规定。

6.2 型式检验

型式检验包括本标准的所有项目，正常生产时至少每半年进行一次，有下列情况下之一时，亦应进行型式检验：

- a) 产品定型投产时；
- b) 停产半年以上恢复生产时；
- c) 生产工艺有较大改变，可能影响产品质量时；
- d) 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时；
- e) 相关监管部门提出要求时。

6.3 组批

同一生产日期、同一品种的产品为一批。

7 标识、标签、包装、运输及贮存要求

7.1 标识、标签

应在产品包装主要展示面上紧邻产品名称的位置，使用不小于产品名称字号且字体高度不小于主要展示面高度五分之一的汉字标注“鲜牛奶”或“鲜牛乳”。

产品标识标签应符合GB 7718的规定，营养标识标签应符合GB 28050的规定。包装储运图示标志应符合GB/T 191的规定。

7.2 包装

包装材料和容器应密封无洞，封口牢固。玻璃瓶包装应符合QB/T 4622的规定；新鲜杯包装应符合GB/T 27590的规定；屋型纸盒包装应符合GB/T 18706的规定；PET塑料瓶包装应符合QB/T 2357的规定；其他包装形式，其材质应符合食品包装材料相关规定。

7.3 运输

运输产品的车辆应用制冷车或保温车。运送工具、车辆应清洁、卫生，备有防雨、防晒设施。不得与有毒、有害、有异味或影响产品品质的物品混运。运输温度控制在不高于6℃。

7.4 贮存

产品在2℃~6℃下贮存。

附录 A (规范性) 乳过氧化物酶含量的测定

A.1 范围

本文件规定了乳中乳过氧化物酶的比色法测定方法。

A.2 原理



试样中的乳过氧化物酶是通过乳过氧化物酶活性测定试剂盒测定。该试剂盒以酶促反应为基础，将样品或标准品加入微孔板中，随后加入底物。样品或标准品中的LPO将LPO底物转化，形成蓝色产物。然后加入终止液，溶液由蓝色变为黄色，在450nm测定吸光度值。样品中LPO的浓度与吸光度值成正比。

A.3 试剂和材料

- A.3.1 微孔板：共96个微孔（12条、8孔/条）
- A.3.2 LPO标准品：白盖，琥珀色玻璃瓶，用前稀释，400U/L，1mL
- A.3.3 样品稀释液：白盖，即用型，6mL
- A.3.4 LPO底物：棕盖，即用型，6mL
- A.3.5 终止液：红盖，即用型，含0.18mol/L硫酸，12mL
- A.3.6 样品处理溶液：即用型，60mL

A.4 仪器和设备

- A.4.1 装载450nm滤光片的酶标仪
- A.4.2 离心机
- A.4.3 移液器及枪头：10~1000μL
- A.4.4 多道移液器：50~300μL
- A.4.5 加样槽（可选）
- A.4.6 恒温振荡器
- A.4.7 Whatman1#滤纸

A.5 样品前处理

移取10mL牛奶样品至离心管中，恢复至室温。缓慢加入0.6mL样品处理溶液，同时缓慢振荡，混匀，室温放置5~10分钟。于3000×g离心10分钟，用滤纸过滤上清液，收集滤液。用样品稀释液从1:5~1:10开始稀释滤液，使样品的LPO在标准曲线范围内，待测。

A.6 标准品制备

制备200U/L、100U/L、50U/L和25U/L的标准品溶液：使用样品稀释溶液1:2（1+1）连续稀释LPO标准品（400U/L）。样品稀释溶液作为空白（0U/L）。

A.7 检测步骤

使用前将试剂和微孔板回温至室温（20°C~25°C）。

A.7.1 准备

取出需要数量的微孔置于微孔架上（每个标准品或待测样品对应一个微孔），记录标准品和样品位置（建议所有样品和标准品做平行样）。

A.7.2 加样

向微孔中加入50μL标准品（0U/L、25U/L、50U/L、100U/L、200U/L和400U/L）或样品，每加一个标准品或样品要更换一个新的枪头。

A.7.3 加底物液

向每个微孔中加入50μL底物（建议使用多道移液器），短暂混合。

A.7.4 孵育

盖上盖板膜，室温（20°C~25°C）孵育10分钟。

A.7.5 终止和读数

小心揭开盖板膜，向每个微孔中加入100μL终止液，在水平面轻轻振荡混合。加入终止液30分钟内，在450 nm下读取并记录每个微孔的OD值。

试剂和微孔板使用后置于2°C~8°C保存。

A.8 结果分析

以标准品与空白的吸光度值之差为Y轴，标准品的浓度为X轴构建标准曲线。根据样品的吸光度值，从标准曲线中读取样品中LPO的浓度（U/L），然后乘以稀释倍数，即为样品中乳过氧化物酶（LPO）含量。

A.9 检出限

本方法的检出限：25 U/L。

附 录 B
(规范性)
乳铁蛋白含量的测定

B.1 范围

本文件规定了乳中乳铁蛋白的酶联免疫（ELISA）的测定方法。

B.2 原理

试样中的乳铁蛋白是通过乳铁蛋白ELISA试剂盒测定。本试剂盒是利用双抗夹心酶联免疫分析方法进行检测。微孔板中包被有抗乳铁蛋白的抗体，加入乳铁蛋白标准品或样品后，游离的乳铁蛋白与微孔板上预包被的抗乳铁蛋白抗体结合，已被捕获的乳铁蛋白再与酶标记的抗乳铁蛋白的抗体结合，用TMB底物显色，加入酸性终止液后颜色由蓝色变黄色，用酶标仪在450 nm波长下进行测定吸光度值，吸光度值与样品中的乳铁蛋白的含量成正比。比较样品的吸光值与样品试剂盒提供的标准品的吸光值即可获得检测结果。

B.3 试剂和材料

- B.3.1 微孔：置于微孔板中，包被牛乳铁蛋白抗体，共96个微孔（8孔/条，12条）；
- B.3.2 乳铁蛋白标准品：即用型，浓度依次为：0、20、50、125、250、500ng/mL，每瓶1mL；
- B.3.3 酶标物：绿盖，即用型，12mL；
- B.3.4 浓缩洗涤液：60mL，20×浓缩；
- B.3.5 底物试剂：棕盖，稳定的四甲基联苯胺，即用型，12mL；
- B.3.6 终止液：红盖，即用型，0.18mol/L H₂SO₄，12mL；
- B.3.7 去离子水或蒸馏水；

B.4 仪器和设备

- B.4.1 装载450nm滤光片的酶标仪
- B.4.2 离心机（≥8000×g）
- B.4.3 移液器及相应吸头（100μL、200μL、300μL和1000μL），多道移液器，加样槽（可选）
- B.4.4 洗板机（可选）
- B.4.5 天平

B.5 分析步骤**B.5.1 试样制备**

直接用1×洗涤溶液稀释，使样品中乳铁蛋白的浓度在标准曲线范围内。使用100μL稀释的样品进行检测。

B.5.2 检测步骤**B.5.2.1 实验准备**

B.5.2.1.1 使用前将所有试剂恢复至室温（20℃ ~25℃）。

B.5.2.1.2 使用后应立即将所有试剂放置于2℃ ~8℃。

B.5.2.1.3 各操作步骤间请勿使用微孔完全干燥。避免延长各步骤间的时间间隔。

B.5.2.1.4 实验的重现性在很大程度上取决于洗板的连续性。请按下方建议的洗板顺序洗板。

B.5.2.1.5 所有孵育步骤应避免阳光直射。建议盖上微孔板盖，请勿使用铝箔或金属膜。

B.5.2.1.6 请勿交互使用不同批次试剂盒中的试剂。

B.5.2.2 测定程序

A.5.2.2.1 制备1×洗涤溶液：将20×洗涤溶液20倍稀释，如30mL浓缩洗涤溶液（20×）+570 mL蒸馏水。该体积足够用于整块微孔板。

a) 注：如果冷藏过程中出现结晶，稀释前请将浓缩液37℃ 放置15min。

A.5.2.2.2 根据样品检测数将足够数量的酶标板微孔插入反应支架上，建议所有标准品和样品做平行。

A.5.2.2.3 向标准品孔中加入100μL乳铁蛋白标准品（0μg/mL、20μg/mL、50μg/mL、125μg/mL、250μg/mL、500μg/mL），向样品孔中加入100μL稀释后的样品溶液，盖上微孔板盖，室温孵育30min。

A.5.2.2.4 温育结束后，弃去微孔中的液体，向每孔加入200μL稀释后的洗涤液洗涤微孔板，重复洗涤4次，共洗涤5次。最后一次洗涤后，倒掉液体后再吸水纸上拍打酶标板，去除残留洗涤液。

A.5.2.2.5 向微孔中分别加入100μL酶标物（推荐使用多通道移液器），盖上微孔板盖，室温避光孵育30min。

A.5.2.2.6 温育结束后，按照步骤C.5.2.2.4共洗涤5次微孔板。

A.5.2.2.7 向微孔中分别加入100μL底物试剂，室温避光反应15min。

A.5.2.2.8 显色结束后向每孔加入100μL终止液。

A.5.2.2.9 在水平面轻轻振荡微孔板，用酶标仪测定450nm的吸光度值。

B.6 实验结果的判定

计算标准品和稀释的样品的平均吸光度值，将其减去空白值（0μg/mL标准品的平均吸光度值）。

以标准品与空白的OD值之差为纵坐标，标品中乳铁蛋白浓度值为横坐标，构建半对数曲线。根据样品的OD值，从标准曲线中读取稀释后样品中乳铁蛋白的浓度，将其乘以稀释倍数即获得样品中的乳铁蛋白浓度。

B.7 检出限

本方法的检出限：10 mg/kg。

附 录 C
(规范性)
免疫球蛋白 IgG 含量的测定

C.1 范围

本文件规定了乳中免疫球蛋白IgG的高效液相色谱测定方法。

C.2 原理

根据高效亲和色谱的原理,在磷酸盐缓冲液条件下免疫球蛋白IgG与配基连接,在pH 2.5的盐酸甘氨酸条件下洗脱免疫球蛋白IgG,然后通过高效液相色谱进行分析,外标法定量。

C.3 试剂和材料

C.3.1 试剂

流动相A (0.05mol/L磷酸盐缓冲液 (pH 6.5)): 称取磷酸二氢钾6.8g, 加入1mol/L氢氧化钠 15.2 mL, 加水800mL溶解并定容至1L, 用pH计确定pH, 如有误差调整至6.5, 然后摇匀过膜即得。

流动相B (0.05mol/L甘氨酸盐缓冲液 (pH 2.5)): 称取甘氨酸3.7535g, 加入800mL水溶解, 用盐酸调整溶液pH至2.5, 然后摇匀过膜即得。

C.3.2 标准品及储备液的配制

标准物质: 免疫球蛋白IgG, 来源于牛血清;

标准储备液: 称取10mg免疫球蛋白IgG标准物质于10mL容量瓶中, 用流动相A溶解并定容。

注: 除非另有说明, 本标准所用试剂均为分析纯, 水为GB/T 6682规定的一级水。

C.4 仪器和设备

C.4.1 pH计: 测量精度 ± 0.02 ;

C.4.2 天平: 感量0.001g和0.00001g;

C.4.3 超声波振荡器, 80Hz;

C.4.4 高效液相色谱仪: 带紫外检测器或二极管阵列检测器;

C.4.5 色谱分离柱: Pharmacia HI-Trap Protein G柱, 1mL;

C.4.6 离心机, 10000r/min;

C.5 分析步骤

C.5.1 试样制备及处理

精密称定样品20g (精确到0.001 g) 置50mL容量瓶中, 流动相A适量, 超声提取20分钟, 冷却至室温, 用流动相定容至刻度, 摇匀离心。

然后取2.5mL过滤液, 通过Pharmacia HI-Trap Protein G柱进行净化, 最后定容至1.5mL, 上液相色谱进行分析。

C.5.2 色谱参考条件

色谱柱: CAPCELL PARK C18, 4.6mmI.D.×250mm×5 μ m;

流动相：乙腈：0.1%三氟乙酸=6:4；
 流速：1 mL/min；
 检测波长：280nm；
 进样量：5 μ L~20 μ L；
 柱温：30 $^{\circ}$ C。

C.6 结果计算

按式（1）计算免疫球蛋白IgG的含量。

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X---试样中免疫球蛋白IgG的含量，单位为毫克每升（mg/kg）；

c---根据标准曲线计算得到的试样中免疫球蛋白IgG的浓度，单位为微克每毫升（ μ g/mL）；

m---试样的称样量，单位为克（g）；

V---定容体积，单位为毫升（mL）；

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示。计算结果保留三位有效数字。

C.7 精密度

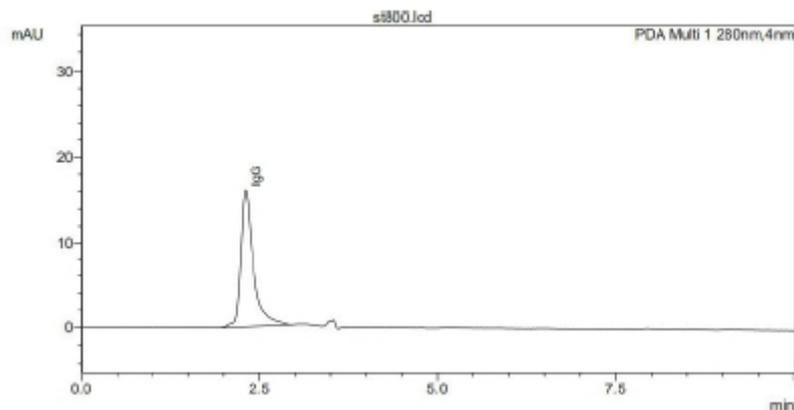
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

C.8 检出限及定量限

本方法的检出限：液态乳，当取样量为20g时，检出限为15mg/kg；

本方法的定量限：液态乳，当取样量为20g时，定量限为50mg/kg；

C.9 色谱图



附录 D

(规范性)

 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白含量的测定

D.1 范围

本文件规定了乳中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白含量的测定方法。

D.2 原理

试样以牛胰蛋白酶酶解成特异性肽段后，以稳定同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定目标蛋白的特异肽段，内标法定量。依据一摩尔目标蛋白酶解生成一摩尔特异肽段的原则，测得试样中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白含量。

D.3 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682 规定的一级水。

D.3.1 试剂

D.3.1.1 碳酸氢铵 (NH_4HCO_3)。

D.3.1.2 二硫苏糖醇 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, DTT)。

D.3.1.3 碘代乙酰胺 ($\text{ICH}_2\text{CONH}_2$, IAA)。

D.3.1.4 氯化钙 (CaCl_2)。

D.3.1.5 乙酸 (CH_3COOH)。

D.3.1.6 甲酸 (HCOOH)：色谱纯。

D.3.1.7 乙腈 (CH_3CN)：色谱纯。

D.3.1.8 碱性胰蛋白酶：活力大于10000 BAEE 每毫克蛋白质。

D.3.1.9 牛 α -乳白蛋白特异肽段（序列：VGINYWLAHK，分子式 $\text{C}_{58}\text{H}_{85}\text{N}_{15}\text{O}_{13}$ ，分子量1199.7Da，纯度 $\geq 99\%$ ）。

D.3.1.10 牛 β -乳球蛋白特异肽段（序列：IDALNENK，分子式 $\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_{11}\text{O}_{15}$ ，分子量915.5 Da，纯度 $\geq 99\%$ ）。

D.3.1.11 牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段（序列：VGI*NYWL*AHK，分子式 $^{13}\text{C}_{12}\text{C}_{46}\text{H}_{8515}\text{N}_2\text{N}_{13}\text{O}_{13}$ ，分子量1214.4 Da，纯度 $\geq 95\%$ ）。

D.3.1.12 牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段（序列：I*DAL*NENK，分子式 $^{13}\text{C}_{12}\text{C}_{26}\text{H}_{6515}\text{N}_2\text{N}_9\text{O}_{15}$ ，分子量929.5 Da，纯度 $\geq 95\%$ ）

D.3.2 试剂配制

D.3.2.1 碳酸氢铵溶液（500 mmol/L）：称取3.95 g 碳酸氢铵，用水溶解后定容至100 mL。

D.3.2.2 二硫苏糖醇溶液（500 mmol/L）：称取0.771 g 二硫苏糖醇，用500 mmol/L的碳酸氢铵溶液溶解后定容至10 mL。

D.3.2.3 碘代乙酰胺溶液（500 mmol/L）：称取0.925 g 碘代乙酰胺，用500 mmol/L的碳酸氢铵溶液溶解后定容至10 mL。

D.3.2.4 氯化钙溶液（100 mmol/L）：称取0.111 g 氯化钙，用水溶解后定容至10 mL。

D.3.2.5 乙酸溶液（1%，V/V）：移取0.1 mL 乙酸，用水稀释并定容至10 mL。

D.3.2.6 胰蛋白酶溶液（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：称取5 mg 碱性胰蛋白酶，用1%乙酸溶液溶解后定容至10 mL。

D. 3. 2. 7 甲酸水溶液 (0.1%, V/V) : 吸取1 mL 甲酸, 用水稀释并定容至1000 mL。

D. 3. 2. 8 甲酸乙腈溶液 (0.1%, V/V) : 吸取1 mL 甲酸, 用乙腈稀释并定容至1000 mL。

D. 3. 3 质谱检测质量数调谐溶液配制

D. 3. 3. 1 牛 α -乳白蛋白特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$) : 准确称取牛 α -乳白蛋白特异肽段粉末6.00 mg (准确至0.01 mg), 用水溶解后定容至10 mL。将溶液转移到塑料瓶中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D. 3. 3. 2 牛 β -乳球蛋白特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$) : 准确称取牛 β -乳球蛋白特异肽段粉末4.60 mg (准确至0.01 mg), 用水溶解后定容至10 mL。将溶液转移到塑料瓶中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D. 3. 3. 3 牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$) : 准确称取牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段粉末6.06 mg (准确至0.01 mg), 用水溶解后定容至10 mL。将溶液转移到塑料瓶中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D. 3. 3. 4 牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$) : 准确称取牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段粉末16.70 mg (准确至0.01 mg), 用水溶解后定容至10 mL。将溶液转移到塑料瓶中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D. 3. 3. 5 牛 α -乳白蛋白特异肽段质量数调谐溶液 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) : 准确吸取50 μL 牛 α -乳白蛋白特异肽段标准储备液, 用水稀释并定容至10 mL。

D. 3. 3. 6 牛 β -乳球蛋白特异肽段质量数调谐溶液 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) : 准确吸取50 μL 牛 β -乳球蛋白特异肽段标准储备液, 用水稀释并定容至10 mL。

D. 3. 3. 7 牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段质量数调谐溶液 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) : 准确吸取50 μL 牛 α -乳白蛋白同位素特异肽段储备液, 用水稀释并定容至10 mL。

D. 3. 3. 8 牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段质量数调谐溶液 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) : 准确吸取50 μL 牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段储备液, 用水稀释并定容至10 mL。

D. 3. 4 标准品与同位数内标

D. 3. 4. 1 牛 α -乳白蛋白标准品 (CAS 号: 9051-29-0) : 分子量14178 Da, 纯度 $\geq 85\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。配制溶液称量时需按纯度折算。

D. 3. 4. 2 牛 β -乳球蛋白标准品 (CAS 号: 9045-23-2) : 分子量18320 Da, 纯度 $\geq 85\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。配制溶液称量时需按纯度折算。

D. 3. 4. 3 牛 α -乳白蛋白同位素标记内标 (序列: VKKILDKVGI*NYWL*AHKALCSEKL, 分子量2784Da, 纯度 $\geq 95\%$)。

D. 3. 4. 4 牛 β -乳球蛋白同位素标记内标 (序列: EGTKIPAVFKI*DAL*NENKVLVLDTDYKKV, 分子量3347Da, 纯度 $\geq 95\%$)。

注: 上述3.1.11、3.1.12、3.4.3 和3.4.4 中所示肽段序列中注有*的氨基酸为同位素标记氨基酸。

D. 3. 5 标准溶液配制

D. 3. 5. 1 牛 α -乳白蛋白标准储备溶液 (1 mg/mL) : 准确称取牛 α -乳白蛋白标准粉末10.0 mg (需按纯度折算, 准确至0.01 mg), 用水溶解后定容至10 mL。将溶液转移到塑料瓶中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D. 3. 5. 2 牛 α -乳白蛋白同位素标记内标储备溶液 (500 $\mu\text{mol/L}$) : 准确称取牛 α -乳白蛋白同位素标记内标粉末14.40 mg (准确至0.01 mg), 用水溶解后定容至10 mL。将溶液转移到塑料瓶中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D. 3. 5. 3 牛 β -乳球蛋白标准储备溶液 (1 mg/mL) : 准确称取牛 β -乳球蛋白标准粉末10.0 mg (需按纯度折算, 准确至0.01 mg), 用水溶解后定容至10 mL。将溶液转移到塑料瓶中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D. 3. 5. 4 牛 β -乳球蛋白同位素标记内标储备溶液 (500 $\mu\text{mol/L}$) : 准确称取牛 β -乳球蛋白同位素标记内标粉末16.70 mg (准确至0.01 mg) 于10 mL 容量瓶中, 用水定容, 配制成500 $\mu\text{mol/L}$ 的储备溶液。将溶液转移到塑料瓶中, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D. 3. 5. 5 蛋白标准中间混合溶液（牛 α -乳白蛋白25 $\mu\text{g/mL}$ ，牛 β -乳球蛋白75 $\mu\text{g/mL}$ ）：分别准确吸取250 μL 牛 α -乳白蛋白标准储备液和750 μL 牛 β -乳球蛋白标准储备液，用水稀释并定容至10mL。

D. 3. 5. 6 位素标记内标中间混合溶液（2 $\mu\text{mol/L}$ ）：分别准确吸取40 μL 牛 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的同位素标记内标储备液，用水稀释并定容至10 mL。

D. 3. 5. 7 系列标准工作溶液 准确吸取蛋白标准中间混合溶液8 μL 、20 μL 、40 μL 、80 μL 、120 μL 、160 μL 、200 μL ，再分别加入192 μL 、180 μL 、160 μL 、120 μL 、80 μL 、40 μL 、0 μL 超纯水，每个浓度点加入50 μL 的同位素标记内标中间混合溶液，按照5.2 与试样同时进行烷基化与酶解，得到牛 α -乳白蛋白的浓度分别为0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 、4.0 $\mu\text{g/mL}$ 和5.0 $\mu\text{g/mL}$ ；牛 β -乳球蛋白的浓度分别为0.6 $\mu\text{g/mL}$ 、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 、6.0 $\mu\text{g/mL}$ 、9.0 $\mu\text{g/mL}$ 、12.0 $\mu\text{g/mL}$ 和15.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作溶液。

D. 4 仪器和设备

D. 4. 1 高效液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源；质量数范围，1~2000 质荷比（m/z）；分辨率，0.1 原子质量单位（AMU）；

D. 4. 2 天平：感量0.01 g； 0.01 mg；

D. 4. 3 涡旋混合器：振荡转速不低于2400 转/分钟；

D. 4. 4 超声波振荡器，80Hz；

D. 4. 5 恒温水浴摇床；

D. 4. 6 微量移液器：1~10 μL 、10~100 μL 、100~1000 μL ；

D. 4. 7 微孔滤膜：0.22 μm ；

D. 4. 8 一次性注射器：5 mL。

D. 5 分析步骤

D. 5. 1 试样制备

称取试样约10 g（精确至0.01 g，内含蛋白质约200 mg 左右）于500 mL 烧杯中，用900 mL 水依次将试样充分溶解并转移到1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，必要时置于涡旋混合器上充分涡旋溶解，准确移取试样溶解液200 μL 于2 mL 离心管中，加入50 μL 同位素标记内标中间混合溶液，待酶解。

D. 5. 2 烷基化与酶解

向上述样液中加入150 μL 碳酸氢铵溶液、10 μL 二硫苏糖醇溶液，混匀后于75 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温水浴30min；冷却至室温，加入30 μL 碘代乙酰胺溶液，暗处静置30 min；再加入10 μL 氯化钙溶液、50 μL 胰蛋白酶溶液，充分混匀后于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中酶解5 h。加入10 μL 甲酸混匀，室温下静置15 min，再加入490 μL 水，涡旋混匀，用0.22 μm 滤膜过滤，供高效液相色谱-串联质谱仪检测。

D. 5. 3 仪器参考条件

D. 5. 3. 1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：硅烷基C18 柱，柱长100 mm，柱内径2.1 mm；填料粒径1.7 μm ，孔径30 nm（300 \AA ）

或等效者；

- b) 流动相A: 0.1%甲酸水溶液；流动相B: 0.1%甲酸乙腈溶液；
- c) 梯度洗脱: 参考洗脱梯度参见表D.1；
- d) 流速: 0.3 mL/min；
- e) 柱温: 40 °C；
- f) 进样体积: 5 μL。

表D.1 梯度洗脱参考条件

时间 (min)	流动相A	流动相B	梯度变化曲线
0	95	5	初始状态
0.8	95	5	保持不变
1.2	90	10	线性变化
2.5	83	17	线性变化
2.6	77	23	线性变化
3.8	77	23	保持不变
4.0	0	100	线性变化
4.8	0	100	保持不变
5.0	95	5	线性变化

D.5.3.2 质谱参考条件

- a) 电喷雾模式: ESI⁺；
- b) 质谱扫描方式: 多反应监测 (MRM)；
- c) 毛细管电压: 3.5 kV；
- d) 锥孔电压: 35 v；
- e) 脱溶剂温度: 500 °C；
- f) 脱溶剂气流量: 800 L/h；

D.5.4 标准曲线的制作

将标准系列工作溶液酶解液依次注入高效液相色谱-串联质谱仪，测定相应的峰面积。以标准系列的浓度为横坐标，各浓度点中特异肽段与对应同位素特异肽段的峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线。

D.5.5 试液的测定

将试样酶解液注入高效液相色谱-串联质谱仪，测得相应分析物的峰面积，根据标准曲线得到待测试样溶液中牛α-乳白蛋白和β-乳球蛋白的浓度。

D.5.6 空白试验

不称取试样，按同一操作方法做空白试验，空白试验溶液的色谱质谱图中应不含待测组分的干扰峰。

D.6 分析结果的表述

试样中 α-乳白蛋白或 β-乳球蛋白的含量按式 (2) 计

$$X = \frac{cxv \times 100 \times 10000}{m \times 1000000} \times f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中牛 α -乳白蛋白或 β -乳球蛋白的含量，单位为毫克每升（mg/L）；

v ——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

c ——试样的蛋白质含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

f ——待测试样溶液的稀释倍数；

100、10000、1000000——浓度的换算系数；

D.7 精密度

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15%。

D.8 检出限

本方法牛 α -乳白蛋白的定量限为200mg/kg，牛 β -乳球蛋白的定量限为250mg/kg。

参 考 文 献

- [1] 国家质量监督检验检疫总局令[2005]第75号《定量包装商品计量监督管理办法》
-