

酶联免疫吸附法快速检测婴儿配方奶粉中 乳铁蛋白含量

吴春香¹, 刘志楠¹, 赵源¹, 宋晓东^{2*}, 喻东威², 刘萍萍²,
王俊英¹, 莎日娜¹, 张利珍¹

(1. 内蒙古欧世蒙牛乳制品有限公司, 呼和浩特 011500; 2. 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

摘要: **目的** 采用乳铁蛋白快速检测试剂盒, 通过酶联免疫吸附法定量测定婴儿配方奶粉中的乳铁蛋白含量, 并验证该方法的准确性、稳定性和可靠性。**方法** 按照试剂盒操作说明制作标准曲线, 选取乳铁蛋白阴性样品进行添加回收实验, 验证方法的准确性; 选取一个乳铁蛋白阳性样品, 重复检测 6 次, 计算结果偏差, 验证方法的稳定性; 选取 12 个乳铁蛋白阳性样品, 分别采用试剂盒方法和高效液相色谱法进行检测, 对比 2 种方法的检测结果, 验证试剂盒方法的可靠性。**结果** 试剂盒检出限为 2 mg/100 g; 试剂盒检测方法回收率在 101.6%~109%; 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 5.34%; 试剂盒方法检测结果与标签值的偏差为-6.90%~6.45%, 和高效液相色谱法检测结果的偏差为-6.45%~6.9%, 说明试剂盒方法具有很好的可靠性。**结论** 乳铁蛋白试剂盒检测方法灵敏度高、操作简单, 能快速准确地测定婴儿配方奶粉中的乳铁蛋白含量。**关键词:** 酶联免疫吸附法; 乳铁蛋白; 快速检测

Rapid detection of lactoferrin content in infant formula by enzyme-linked immunosorbent assay

WU Chun-Xiang¹, LIU Zhi-Nan¹, ZHAO Yuan¹, SONG Xiao-Dong^{2*}, YU Dong-Wei²,
LIU Ping-Ping², WANG Jun-Ying¹, SHA Ri-Na¹, ZHANG Li-Zhen¹

(1. Inner Mongolia Mengniu Arla Dairy Products Co., Ltd., Huhhot 011500, China; 2. Inner Mongolia Mengniu Dairy Industry (Group) Limited Company, Huhhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To detect the content of lactoferrin in infant formula by enzyme-linked immunosorbent assay with lactoferrin rapid detection kit, and verify the accuracy, stability and reliability of the method. **Methods** The standard curve was made according to the instruction of the kit. The lactoferrin negative sample was selected for the spiking recovery experiment to test the accuracy of the method. A lactoferrin positive sample was repeated 6 times to verify the stability of the method. Twelve lactoferrin positive samples were selected and tested by the kit and HPLC. The test results of the 2 methods were compared to verify the reliability of the kit method. **Results** The limit of detection of the kit was 2 mg/100 g. The recovery rate of the kit method was 101.6%~109%. The relative standard

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2013YQ14037108)

Fund: Supported by National Major Scientific Instruments and Equipment Development Special(2013YQ14037108)

*通讯作者: 宋晓东, 硕士, 工程师, 主要研究方向为乳品检测技术和产品质量控制研究。E-mail: songxiaodong@mengniu.cn

*Corresponding author: SONG Xiao-Dong, Master, Engineer, Inner Mongolia Mengniu Dairy Industry (Group) Limited Company, Huhhot 011500, China. E-mail: songxiaodong@mengniu.cn

deviation was 5.34%. The deviation between the kit result and the label value was -6.90%~6.45% and the deviation between the kit result and the HPLC result was -6.45%~6.9%, which indicated that the kit method had good reliability. **Conclusion** Lactoferrin kit detection method has high sensitivity and simple operation, which can quickly and accurately determine the lactoferrin content in infant formula.

KEY WORDS: enzyme-linked immunosorbent assay; lactoferrin; rapid detection

1 引言

母乳是婴儿营养的最好来源,因此母乳是配方奶粉的最佳参照标准。乳铁蛋白、免疫球蛋白和核苷酸等活性物质成份在母乳中存在而普通配方奶粉中含量甚微^[1]。

早在1939年,人们从牛乳中发现了一种红色蛋白,即乳铁蛋白(lactoferrin, LF)^[2,3],在1959年从牛乳中分离获得。它是一种具有多种生物学功能的铁离子结合糖蛋白,主要存在于哺乳动物的乳汁当中。人乳中乳铁蛋白浓度约为1.0~3.2 mg/mL,是牛乳中的10倍(牛乳中含量为0.02~0.35 mg/mL),占普通母乳总蛋白的20%^[4]。研究表明,乳铁蛋白具有广谱抗菌,抗病毒感染作用,能调节体内铁的平衡,调节骨髓细胞的生成,促进细胞的生长,调节机体免疫功能,增强机体抗病能力,乳铁蛋白已作为食品添加剂被广泛应用于婴幼儿配方奶粉及各种功能性食品中。

婴幼儿配方乳粉生产企业必须对婴幼儿配方乳粉中的配方成分进行全项目检测,因而婴幼儿配方乳粉有多达几十种的成分需要检测,因此对于检测效率有很高的要求,快速、高效的检测方法更适合企业检测的需求。目前常用的检测LF的方法主要有免疫扩散法^[5-7]、电泳法^[8,9]和高效液相色谱法^[10-15]。免疫扩散法操作简单,但只适用于检测LF含量较高的样品;电泳法因操作步骤繁琐,所以不适于大量样品的同时检测;高效液相色谱法能快速测定LF,但针对婴幼儿配方乳粉类的样品,因其本身所含有的元素非常多,必须进行前处理,其过程会影响到LF。我国已经对添加乳铁蛋白婴幼儿配方奶粉进行了深入开发和研究,本研究应用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA),采用市售乳铁蛋白检测试剂盒快速检测婴幼儿配方奶粉中乳铁蛋白含量,以期为用户提供快速检测试剂盒测定乳铁蛋白含量的相关人员提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LF30211 乳铁蛋白酶联免疫检测试剂盒(中检葆泰生物技术有限公司); BIO-RAD-608 酶标仪(美国伯乐公司); BS224S 电子天平(德国塞多利斯公司); GENIU S3 圆周振荡器(德国 IKAR VORTEX 公司); 移液器(200、1000 μ L, 德国 Eppendorf 公司)。

12 批次不同品类婴幼儿配方乳粉。

2.2 实验方法

2.2.1 试剂盒检测原理

试剂盒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抗体(一抗),加入乳铁蛋白标准品或样品后,乳铁蛋白标准品或样品中的乳铁蛋白与微孔板中抗体结合,用洗液洗去未结合的标准品或样品后加入酶标记的乳铁蛋白抗体(二抗),最后用洗液洗去未结合的二抗,加入底物试剂显色,加入酸性终止液后颜色由蓝色变为黄色,用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度值,样品的吸光度值与样品中的乳铁蛋白含量成正比。以标准品的OD值为纵坐标,标准品中乳铁蛋白浓度为横坐标,做标准曲线。根据样品的OD值,从标准曲线中读取样品中乳铁蛋白的浓度。由于样品经过稀释处理,因此样品中乳铁蛋白的最终浓度为从标准曲线中读取浓度乘以稀释倍数。

2.2.2 样品的制备

首先将试剂盒中的20倍浓缩洗液,用双蒸水稀释20倍待用。准确称取0.50 g奶粉样品于15 mL离心管中,加10 mL双蒸水溶解,混合均匀(此为稀释20倍),然后用洗液将上述溶解的奶粉溶液稀释200倍,混匀后即可用于检测(最终稀释倍数为4000)。如果稀释后样品中乳铁蛋白含量在试剂盒标准曲线范围之外,则可以适当降低或者提高样品的最终稀释倍数。

2.2.3 试剂盒检测方法的建立

首先将试剂盒中的20倍浓缩洗液,用双蒸水稀释20倍待用。取出所需数量的微孔条置于微孔架上,吸取100 μ L各个浓度的标准品溶液和稀释后的奶粉样品溶液,分别加入微孔板中,每个标准品和样品设置复孔,25 $^{\circ}$ C孵育40 min;孵育结束后洗板5次,加入100 μ L酶标记物,25 $^{\circ}$ C孵育40 min;孵育结束后洗板5次,加入100 μ L底物试剂,25 $^{\circ}$ C暗处孵育20 min;孵育结束后加入50 μ L终止液,使用酶标仪读取450 nm波长处的吸光值,使用酶标仪自带软件建立乳铁蛋白标准曲线。

2.2.4 试剂盒方法检出限验证

试剂盒说明书规定方法检出限为10 ng/mL,对应于样品的检出限为2 mg/100 g。选取乳铁蛋白阴性的婴儿乳粉作为添加回收检测样品,向其中添加乳铁蛋白标准品,添加量为2 mg/100 g,总进行6组添加,每组做复孔平行样,检测并记录结果。

2.2.5 试剂盒方法的准确性验证

选取乳铁蛋白阴性的婴儿乳粉作为添加回收检测样品,向其中添加乳铁蛋白标准品,添加浓度分别为2、20、40和80 mg/100 g,每个浓度添加2组,按照试剂盒方法进行检测。

2.2.6 试剂盒方法的稳定性验证

选取一个添加一定浓度乳铁蛋白的婴幼儿配方乳粉A,采用试剂盒方法进行检测,重复检测6次,计算检测结果的平均值、标准偏差(standard deviation, *sd*)、相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.2.7 试剂盒方法的可靠性验证

选取12种不同乳铁蛋白阳性婴儿乳粉样品,分别采用试剂盒方法和高效液相色谱法进行检测,每种样品重复检测2次,对比试剂盒方法以及高效液相色谱法检测结果,验证试剂盒方法的可靠性。

3 结果与分析

3.1 试剂盒方法标准曲线的建立

将试剂盒中配备的标准品(0、10、30、60、120、240 ng/mL)按2.2.3测定步骤进行测定,共建立4组标准曲线,每组曲线做2个复孔平行,所测得OD值及变异系数(CV),见表1。以乳铁蛋白浓度为横坐标,OD值为纵坐标,使用酶标仪内置计算软件作出4组标准曲线图,线性关系见表1。

表1 乳铁蛋白标准溶液浓度及OD值
Table 1 The standard solution concentration and OD of lactoferrin

标准品(ng/mL)	检测结果							
	OD ₁	CV ₁ (%)	OD ₂	CV ₂ (%)	OD ₃	CV ₃ (%)	OD ₄	CV ₄ (%)
0	0.054	5.2	0.050	6.7	0.056	6.7	0.053	5.1
10	0.147	8.2	0.135	2.1	0.153	1.8	0.138	1.5
30	0.313	0.5	0.301	2.5	0.332	1.9	0.316	2.6
60	0.521	0.5	0.503	1.5	0.552	1.3	0.533	1.1
120	0.862	2.7	0.815	1.2	0.887	0.3	0.885	0.5
240	1.387	3.2	1.326	0.3	1.402	0.5	1.396	0.5
线性 r^2	$r_1^2=1.0000$		$r_2^2=0.9997$		$r_3^2=1.0000$		$r_4^2=0.9999$	

表2 样品检出限结果
Table 2 Results of the limit of detection of sample

添加组	1	2	3	4	5	6
检测值(mg/100 g)	2.11	2.05	1.89	1.96	2.08	2.13
平均值(mg/100 g)	2.04					
<i>sd</i> (%)	8.7					
RSD(%)	4.3					

如表1所示,4组标准曲线相关系数分别为 $r_1^2=1.0000$; $r_2^2=0.9997$; $r_3^2=1.0000$; $r_4^2=0.9999$,说明乳铁蛋白浓度在10~240 ng/mL范围内线性关系良好。

3.2 试剂盒方法检出限实验

在试剂盒检测分析中,检出限对于实际检测尤为重要,样品检出限为实际样品检测中能够准确检测到目标物的最低浓度。本试剂盒方法中,样品的检出限为2 mg/100 g。选取乳铁蛋白阴性的婴儿乳粉作为添加回收检测样品,向其中添加乳铁蛋白标准品,添加量为2 mg/100 g,总共进行6组添加,每组做复孔平行样,检测并记录结果。结果见表2。

从表2结果可知,6组添加检测的平均值为2.04 mg/100 g, *sd*为8.7%, RSD为4.3%,说明在样品浓度2 mg/100 g时试剂盒能准确地测出结果,试剂盒的检出限为2 mg/100 g。能满足企业对于乳铁蛋白检测的需求。

3.3 试剂盒方法回收率实验

在试剂盒检测分析中,方法的准确度用样品添加回收率衡量。按照步骤2.2.2进行样品处理,2.2.3步骤进行检测,计算检测含量、变异系数以及回收率。

结果如表3所示,添加浓度为0 mg/100 g的检出值为本底中乳铁蛋白的含量,其主要来源于乳类原料中,检测结果的CV为1.1%~8.3%,回收率为101.6%~109%,结果表明在标准曲线不同浓度点均有较好的回收率。

3.4 试剂盒方法稳定性实验

采用多次重复检测同一个样品,比较每次所测结果的差异,用以衡量检测结果的稳定性。选取1个添加乳铁蛋白婴幼儿配方乳粉A,重复检测6次,计算平均值、标准偏差(*sd*)、相对标准偏差(RSD)。

结果如表4所示,检测平均值为59.33 mg/100 g, *sd*为3.17%, RSD为5.34%,结果表明该检测方法具有良好的稳定性。

3.5 试剂盒方法可靠性实验

乳铁蛋白的国标检测方法是高效液相色谱法,为了

验证试剂盒检测方法的可靠性,选取不同批次12个乳铁蛋白阳性的婴幼儿配方乳粉(已知标签标示含量),分别采用高效液相色谱法和试剂盒方法进行检测,每个样品每种方法测量2次,取平均值。将试剂盒方法测得结果分别与标签值和高效液相色谱法检测结果进行比较,计算偏差,验证试剂盒方法的可靠性。

结果如表5所示,试剂盒检测方法参比样品的标签值,偏差范围在-6.90%~6.45%,1/4的样品检测值偏差为0;试剂盒检测方法参比高效液相色谱法检测结果,偏差范围在-6.45%~6.9%;由此可以看出,试剂盒检测方法具有

表3 乳铁蛋白回收率检测结果
Table 3 Recovery test results of lactoferrin

添加浓度 mg/100 g	稀释因子	检测值		平均值 mg/100 g	CV %	回收率 %
		1	2			
0	100	0.71	0.73	0.72	2.8	/
2	2000	2.78	3.02	2.9	8.3	109.0
2	2000	2.71	2.8	2.755	3.3	101.8
20	4000	21.61	21.37	21.496	1.1	103.9
40	4000	41.23	43.29	42.26	4.9	103.9
80	4000	83.95	80.02	81.985	4.8	101.6

表4 同一样品检测统计数值
Table 4 The test statistic value for the same sample

乳粉 A	1	2	3	4	5	6
检测值(mg/100 g)	55.64	57.18	61.6	59.97	57.48	64.12
平均值(mg/100 g)	59.33					
<i>sd</i> (%)	3.17					
RSD(%)	5.34					

表5 不同样品检测结果统计
Table 5 The test statistics in different samples

添加乳铁蛋白的婴幼儿 配方乳粉	产品 代码	标签值 mg/100 g	ELISA 检测平均值 mg/100 g	ELISA 与标签 值偏差%	HPLC 检测平 均值 mg/100 g	ELISA 与 HPLC 值偏差%
金装幼儿配方奶粉	073024	30	32	6.45	31	3.17
金装较大婴儿配方奶粉	073123	30	32	6.45	30	6.45
金装较大婴儿配方奶粉	072701	30	28	-6.90	28	0
金装婴儿配方奶粉	082611	30	28	-6.90	29	-3.51
超级金装较大婴儿配方奶粉	082671	30	30	0.00	32	-6.45
超级金装幼儿配方奶粉	092964	30	28	-6.90	28	0
超级金装婴儿配方奶粉	122723	30	28	-6.90	29	-3.51
超级金装较大婴儿配方奶粉	122983	30	30	0.00	31	-3.28
金装较大婴儿配方奶粉	133123	30	32	6.45	30	-6.45
金装幼儿配方奶粉	133024	30	30	0.00	28	6.9
金装婴儿配方奶粉	142611	30	32	6.45	33	-3.08
超级金装幼儿配方奶粉	142964	30	30	0.00	29	3.39

良好的可靠性。

4 结 论

ELISA 快速检测乳铁蛋白方法,线性关系良好。试剂盒检出限为 2 mg/100 g,能够满足企业对于检测的需求。以婴幼儿乳粉为本底的回收率为 101.6%~109%。检测重复性良好,RSD 值为 5.34%。试剂盒检测结果与标签值相比较,偏差范围在-6.90%~6.45%,其中 1/4 的样品检测值与标签值一致,而试剂盒检测结果与高效液相色谱法结果相比较,偏差范围在-6.45%~6.9%。实验结果表明,该试剂盒具有灵敏度高、重复性好、准确性好的优点,适用于婴幼儿配方乳粉中乳铁蛋白含量的快速检测。

参考文献

- [1] 顾瑞霞, 骆承庠. 乳与乳制品的生理功能特性[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
Gu RX, Luo CX. The physiological function of milk and dairy products [M]. Beijing: China light Industry Press, 2000.
- [2] 郭本恒, 程玉倩. 乳铁蛋白[J]. 中国乳品工业, 1995, 23(3): 117-120.
Guo BH, Chen YQ. Lactoferrin [J]. Chin Dairy Ind, 1995, 23(3): 117-120.
- [3] Kawakami H, Shinmoto H, Dosako S, *et al.* One-step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies [J]. J Dairy Sci, 1987, 70(4): 752-759.
- [4] 曹阳, 包永明, 安利佳, 等. 乳铁蛋白研究现状[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 132-138.
Cao Y, Bao YM, An LJ, *et al.* Research status of lactoferrin [J]. Food Sci, 2002, 23(12): 132-138.
- [5] 张英华, 董平. 酶联免疫法测定牛初乳中乳铁蛋白含量[J]. 中国乳品工业, 1999, (6): 19-20.
Zhang YH, Dong P. The content of lactoferrin in colostrum was determined by enzyme-linked immunoassay [J]. Chin Dairy Ind, 1999, (6): 19-20.
- [6] Indyk HE. Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis [J]. Int Dairy J, 2005, 15(5): 429-438.
- [7] 夏明, 应铁进. 原子吸收分光光度法间接测定奶粉中的乳铁蛋白含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(1): 173-175.
Xia M, Ying TJ. The atomic absorption spectrophotometry indirectly measures the milk protein content in formula [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(1): 173-175.
- [8] 孙国庆, 康小红, 刘卫星, 等. 利用毛细管电泳法测定乳品中乳铁蛋白含量[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(1): 115-117.
Sun GQ, Kang XH, Liu WX, *et al.* The content of lactoferrin in milk was determined by capillary electrophoresis [J]. Food Res Dev, 2009, 30(1): 115-117.
- [9] 杜凌, 任璐, 苏米亚. 婴儿奶粉中乳铁蛋白的检测方法的研究[J]. 乳业科学与技术, 2008, 31(3): 121-122.
Du L, Ren L, Su MY. Study on the detection method of lactoferrin in infant milk powder [J]. Dairy Sci Technol, 2008, 31(3): 121-122.
- [10] 程静, 高学军, 刘晓飞, 等. 反相高效液相色谱法检测牛初乳乳铁蛋白的方法研究[J]. 乳业科学与技术, 2009, 32(1): 30-32.
Cheng J, Gao XJ, Liu XF, *et al.* A method for the determination of lactoferrin in cows by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. Dairy Sci Technol, 2009, 32(1): 30-32.
- [11] 贾云虹, 宋晓青, 杨凯, 等. 高效液相色谱法测定婴儿配方奶粉中乳铁蛋白含量[J]. 中国奶牛, 2015, (3): 12-15.
Jia YH, Song XQ, Yang K, *et al.* The content of lactoferrin in infant formula was determined by HPLC [J]. Chin Dairy Cattl, 2015, (3): 12-15.
- [12] 王飞, 窦文渊, 石燕丽, 等. 反相高效液相色谱法测定婴儿奶粉中乳铁蛋白的含量[J]. 中国酿造, 2012, 31(7): 49-52.
Wang F, Dou WY, Shi YL, *et al.* Determination of lactoferrin in infant milk powder by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. China Brew, 2012, 31(7): 49-52.
- [13] 章寅, 高磊, 郑隽, 等. 乳制品中乳铁蛋白的测定[J]. 现代农业科技, 2013, (16): 291-292.
Zhang Y, Gao L, Zhen X, *et al.* Determination of lactoferrin in dairy products [J]. Mod Agric Technol, 2013, (16): 291-292.
- [14] 任璐, 龚广予, 杭锋, 等. 采用 HPLC 测定乳铁蛋白质量浓度的方法研究[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(2): 49-52.
Ren L, Gong GY, Hang F, *et al.* Determination of the quality concentration of lactoferrin by HPLC [J]. Chin Dairy Ind, 2009, 37(2): 49-52.
- [15] 陈晓旭, 宋桂雪, 富玉, 等. 高效亲和色谱法检测液体奶和奶制品中乳铁蛋白的质量浓度[J]. 中国乳品工业, 2013, (12): 40-42.
Chen XX, Song GX, Fu Y, *et al.* Determination of lactoferrin in milk and milk products by high performance affinity chromatography [J]. Chin Dairy Ind, 2013, (12): 40-42.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



吴春香, 分析研究员, 主要研究方向为生物技术。

E-mail: wuchunxiang@yashili.cn



宋晓东, 工程师, 硕士, 主要研究方向为乳品检测技术和产品质量控制研究。

E-mail: songxiaodong@mengniu.cn