

反相高效液相色谱法快速测定乳铁蛋白含量

王德伟*, 游景水, 黄远英

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立一种反相高效液相色谱法(RP-HPLC)快速测定乳铁蛋白在乳原料及乳制品中含量的方法。**方法** 根据酪蛋白在等电点(pH 4.6)凝聚沉淀特点, 采用 RP-HPLC 法, 用 pH4.6 醋酸盐缓冲液溶解分离乳铁蛋白, 用 C₁₈ 色谱柱快速分离, 用流动相 A 为 0.1%三氟乙酸水溶液, 流动相 B 为含有 0.09%(V:V)三氟乙酸的 90%(V:V)乙腈水溶液, 进行梯度洗脱, 检测波长 214 nm, 流速 0.7 mL/min。**结果** 乳铁蛋白在 10~500 mg/L 之间呈现良好的线性, 相关系数为 0.9999, 平均回收率为 98.0%, RSD=0.8% (n=9)。**结论** 该方法推广性高、快速、简便、准确, 可用于乳铁蛋白原料、奶粉、牛奶及保健品等中乳铁蛋白的含量检测。**关键词:** 乳铁蛋白; 反相高效液相色谱法; 快速测定; 乳制品

Rapid determination of lactoferrin by reversed-phase high performance liquid chromatography

WANG De-Wei*, YOU Jing-Shui, HUANG Yuan-Ying

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid determination of the content of lactoferrin in raw material milk and dairy products by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). **Methods** The RP-HPLC method was used in this method. According to the characteristics that lactoferrin precipitated at the isoelectric point (pH 4.6), lactoferrin was dissolved and separated by acetate buffer with pH 4.6. A C₁₈ column was used for rapid separation of protein, with the mobile phase A of 0.1% trifluoroacetic acid aqueous solution, and the mobile phase B of 90% (V:V) acetonitrile solution with 0.09% trifluoroacetic acid (:V). The detection wavelength was 214 nm and the flow rate was 0.7 mL/min. **Results** Lactoferrin showed a good linearity between 10~500 mg/L and the correlation coefficient was 0.9999. The average recovery rate was 98.0%, with RSD of 0.8% (n=9). **Conclusion** The method was wide used, rapid, simple and accurate, it could be used in the determination of lactoferrin in lactoferrin raw material, milk powder, milk and health products. **KEY WORDS:** lactoferrin; reversed-phase high performance liquid chromatography; rapid determination; dairy

1 引言

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种相对分子量为 80 kDa 的铁结合性糖蛋白, 乳铁蛋白广泛分布于哺

乳动物乳汁和其他多种组织及其分泌液中(包括泪液、精液、胆汁、滑膜液等内、外分泌液和嗜中性粒细胞)。乳铁蛋白属于先天免疫系统的成分物质^[1,2], 除了能够结合和运输铁离子的主要功能外, 乳铁蛋

*通讯作者: 王德伟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 790007532@qq.com

*Corresponding author: WANG De-Wei, Licensed Pharmacist, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 790007532@qq.com

白还具有抗菌、抗病毒、抗寄生虫、防癌抗癌、抗过敏和辐射防护的功能和属性^[3-8]。2012 年 3 月 30 日发布的《食品安全国家标准——食品营养强化剂使用标准》将乳铁蛋白列入 GB 14880-2012, 认定其为食品营养强化剂。但迄今为止对乳铁蛋白还没有国家检测标准和行业检测标准。已报道的乳铁蛋白的检测方法有酶联免疫法^[9]、毛细管电泳法^[10-12]、原子吸收分光光度法^[13]、高效液相色谱法^[14-17]等。现有方法采用 C₄ 色谱柱, 存在分析时间长、分离度不高、色谱柱不常用等不足。本方法采用高效液相色谱法, 选用常用、可快速重复分离蛋白质和多肽的 ZORBAX 300 SB-C₁₈ 色谱柱, 分析时间短, 添加可分离蛋白的三氟乙酸溶液为流动相, 使用外标法进行定量分析, 建立乳铁蛋白的含量测定方法, 本方法推广性高、快速、简便、准确, 可用于乳铁蛋白原料、奶粉、牛奶及保健品等中乳铁蛋白的含量检测。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(带紫光检测器, 美国安捷伦仪器有限公司); KQ-500E 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); XW-80A 型旋转混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); XP-205 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

三氟乙酸(色谱纯, 安谱科技有限公司); 乙腈(色谱纯, 安谱科技有限公司); 醋酸钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 冰醋酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 乳铁蛋白对照品(Sigma; 批号: 081M7021V; 含量: 85.0%)。汤臣倍健乳矿物盐复合粉 20130401S、20130402S、20130402S。(含乳矿物盐、乳铁蛋白、奶粉、其他辅料等)。

2.2 色谱条件

色谱柱: 安捷伦 ZORBAX 300 SB-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 3.5 μm); 流速: 0.7 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL; 检测器: 紫外检测器 214 nm; 流动相 A: 0.1%(V:V)三氟乙酸水溶液; 流动相 B: 0.09%(V:V)三氟乙酸, 90%体积比的乙腈水溶液;

2.3 溶液的制备

2.3.1 pH 4.6 醋酸盐缓冲液:

称取 18 g 醋酸钠, 加水溶解, 再加 9.5 mL 冰醋酸, 用水定容至 1000 mL, 用氢氧化钠溶液或醋酸溶

液调 pH 值至 4.6。

表 1 流动相洗脱梯度表
Table 1 Mobile phase elution gradient tables

时间(min)	流动相 A	流动相 B
0	80	20
10	20	80
12	80	20
15	80	20

2.3.2 标准储备液:

精确称取乳铁蛋白对照品 10.0 mg 于 10 mL 容量瓶中, 加少量超纯水溶解, 再用醋酸盐缓冲液定容至刻度, 摇匀, 于 2~8 °C 冰箱保存。

2.3.3 标准工作液:

分别取标准储备液 0.1、1、2、4、5 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 制成系列标准工作溶液。

2.3.4 供试品制备:

精确称取 0.25 g 混合均匀的样品, 置于 50 mL 容量瓶中, 加入少量超纯水溶解, 再加 pH 4.6 醋酸盐缓冲液定容至刻度, 摇匀, 取适量至离心管中, 以 5000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液, 进样量为 20 μL。

2.4 线性试验

分别取标准储备液 0.1、1.0、2.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加纯化水定容至刻度, 配制成系列标准工作溶液。按照程序进样, 记录色谱图, 以标准品浓度为(X)横坐标, 标准品的峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 求得回归方程。

2.5 精密度实验

精密称取样品 6 份, 按 2.3.4 供试品制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其相对标准偏差 RSD(%)。

2.6 加标回收实验

称取约 0.25g 混合均匀的样品 9 份, 置于 50 mL 容量瓶中, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每 3 组中分别精密加入乳铁蛋白标准品 4.0、6.0、8.0 mg, 加入少量超纯水溶解, 再加 pH 4.6 醋酸盐缓冲液定容至刻度, 摇匀, 取适量至离心管中, 以 5000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清液, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液, 进样量为 20 μL。

3 结果与讨论

3.1 标准曲线确证结果

乳铁蛋白的标准曲线方程为 $Y=18607.8X+249.3$ 。乳铁蛋白的相关系数 $r=0.9999$ 。浓度在 10 ~ 500 mg/L 的范围内均具有良好的线性。

3.2 检出限和定量限

分析方法的检出限 LOD 和定量限 LOQ 由信噪比(S/N)计算。LOD 定义为 $S/N = 3$ 时对应的待分析物浓度, LOQ 定义为 $S/N = 10$ 时对应的待分析物浓度。

3.2.1 检出限

精确量取浓度为 0.02 mg/mL 的乳铁蛋白工作标准溶液 1~100 mL 容量瓶中, 即得浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液, 检测限 $\text{LOQ}=3$ 浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2.2 定量限

精确量取浓度为 0.05 mg/mL 的乳铁蛋白工作标准溶液 1~100 mL 容量瓶中, 即得浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液, 检测限 $\text{LOD}=3$ 浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3 精密度实验

乳铁蛋白的精密度结果见表 2, 6 个样品的相对标准偏差(RSD)均小于 1.0%, 表面该方法有良好的精密度。

表 2 精密度实验结果($n=6$)
Table 2 Result of precision experiment ($n=6$)

名称	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
乳铁蛋白	2.622	2.620	0.6
	2.602		
	2.618		
	2.645		
	2.611		
	2.624		

3.4 回收率实验

乳铁蛋白在 3 个不同添加水平下浓度的回收率结果见表 3, 3 个浓度下样品中的乳铁蛋白的平均回收率为 98.0%, 相对标准偏差(RSD)均小于 1.0%。

3.5 实际样品的测定

在 2.3.4 条件下, 与乳铁蛋白标准品色谱峰相对应的位置上, 可以分离出乳铁蛋白, 如图 1 所示, 分离效果良好, 同时也不会受到杂质峰的影响。

表 3 加标回收率实验($n=9$)
Table 3 Result of standard addition recovery experiment ($n=9$)

序号	样品称样(g)	样品含(g/100 g)	加标量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.2367	4.329	4.09	98.9%	98.0	0.8
2	0.2325	4.440	4.33	97.7%		
3	0.2397	4.303	4.11	98.1%		
4	0.2154	5.343	6.01	97.6%		
5	0.2014	5.398	5.77	97.0%		
6	0.2207	5.333	6.13	97.7%		
7	0.2043	6.523	8.07	98.8%		
8	0.2012	6.488	8.02	97.0%		
9	0.231	6.421	8.19	98.9%		

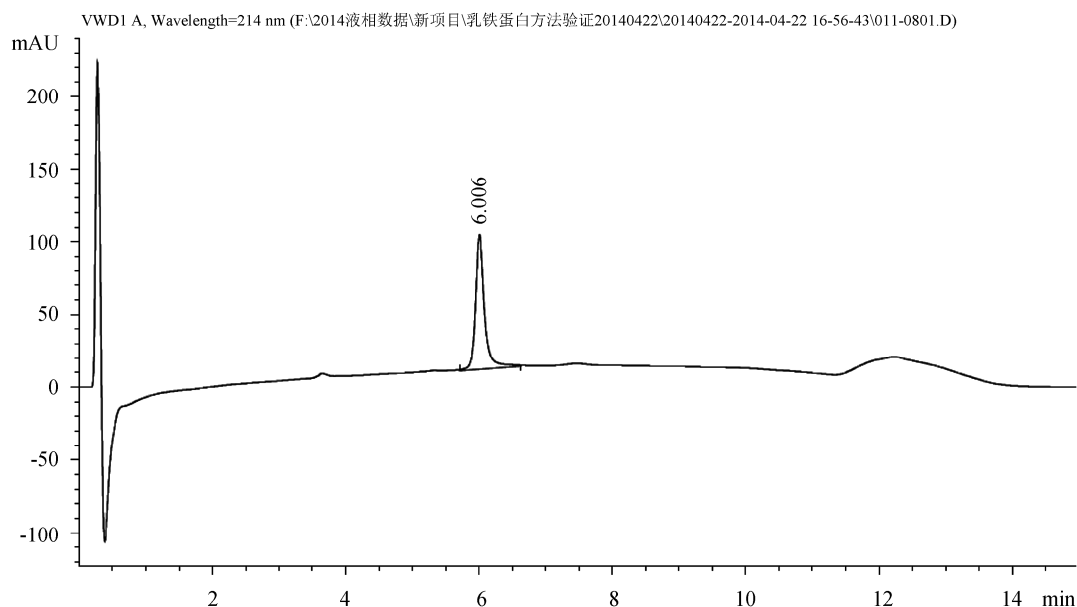


图 1 样品的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of sample

4 结 论

本试验采用 RP-HPLC 法, 由于乳制品中含有较多酪蛋白, 根据酪蛋白在等电点(pH 4.6)凝聚沉淀的特点, 采用 pH 4.6 的醋酸盐缓冲液, 沉淀、离心分离操作后排除了酪蛋白的干扰, 保证了其重现性。不需要每批调节 pH 值来去除酪蛋白, 适合批量化检测。运用安捷伦 ZORBAX 300 SB-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 3.5 μm)色谱柱, 可快速重复分离蛋白质和多肽, 保证了分离效果同时, 又缩短了检测时间, 操作简单、快速、高效、准确、推广性高, 适用于乳铁蛋白原料、奶粉、牛奶及保健品等中乳铁蛋白的含量等的检测。

参考文献

- [1] 程德勇, 孙建华. 乳铁蛋白对机体免疫功能的影响[J]. 临床儿科杂志, 2009, (2): 88-90.
Cheng DY, Sun JH. The effect of lactoferrin on immune function [J]. Clin Pediatr J, 2009, (2): 88-90.
- [2] 李娜, 胡志和, 庞广昌, 等. 乳铁蛋白免疫调节功能初探[J]. 食品科学, 2007, (9): 208-511.
Li N, Hu ZH, Pang GC, et al. Immunoregulatory function of lactoferrin [J]. Food Sci, 2007, (9): 208-511.
- [3] 高树新, 韩玉国, 苏道, 等. 乳铁蛋白及其生理机能的研究进展[J]. 中国牛业科学, 2008, (2): 48-51.
Gao SX, Han YG, Su D, et al. Research progress of lactoferrin and its physiological function [J]. Chin Cattle Ind Sci, 2008, (2): 48-51.
- [4] 孙晶, 张昊, 郭慧媛, 等. 乳铁蛋白抑菌功能的研究进展[J]. 中国乳业, 2012, (10): 41-44.
Sun J, Zhang H, Guo HY, et al. Research progress of antibacterial function of lactoferrin [J]. China Dairy, 2012, (10): 41-44.
- [5] 凌雪萍, 庞广昌, 李国强. 乳铁蛋白的最新研究进展[J]. 食品科学, 2003, (1): 143-146.
Ling XP, Pang GC, Li GQ. The latest research progress of lactoferrin [J]. Food Sci, 2003, (1): 143-146.
- [6] 庞广昌, 胡志和, 陈庆森. 乳铁蛋白的抗病毒活性[J]. 食品科学, 2006, (1): 231-235.
Pang GC, Hu ZH, Chen QS. The antiviral activity of lactoferrin [J]. Food Sci, 2006, (1): 231-235.
- [7] 胡源媛, 张守文. 乳铁蛋白的功能特性及其国内外的应用情况[J]. 中国乳品工业, 2005, (12): 32-36.
Hu YY, Zhang SW. The functional properties of lactoferrin and its application [J]. Chin Dairy Ind, 2005, (12): 32-36.
- [8] 陆苏丹. 乳铁蛋白的功能与用途[J]. 乳业科学与技术, 2000, (4): 25-26.
Lu SD. Function and application of lactoferrin [J]. Dairy Sci Technol, 2000, (4): 25-26.
- [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, (3): 24–25.
- Du L, Ren L, Su MY. Study on detection method of lactoferrin in the infant formula [J]. Dairy Sci Technol, 2008, (3): 24–25.
- [10] 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, (1): 122–124.
- Sun GQ, Kang XH, Liu WX, *et al.* Determination of lactoferrin in milk product by capillary electrophoresis[J]. Food Res Dev, 2009, (1): 122–124.
- [11] 顾媛, 程利花, 姜金斗, 等. 毛细管电泳法检测婴幼儿奶粉中乳铁蛋白的质量分数[J]. 中国乳品工业, 2011, (5): 54–56.
- GU Y, Cheng LH, Jiang JD, *et al.* The mass fraction of lactoferrin detection by capillary electrophoresis in infant milk powder [J]. Chin Dairy Ind, 2011, (5): 54–56.
- [12] 柳雨军, 胡新宇. 利用毛细管电泳法测定牛乳中乳铁蛋白含量[J]. 农产品加工(学刊), 2009, (2): 82–84.
- Liu YJ, Hu XY. Determination of lactoferrin in milk by capillary electrophoresis[J]. Farm Prod Process (J), 2009, (2): 82–84.
- [13] 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, (1): 173–175.
- Xia M, Ying TJ. Indirect determination of lactoferrin in milk powder by atomic absorption spectrophotometry [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, (1): 173–175.
- [14] 王飞, 龚文渊, 石燕丽, 等. 反相高效液相色谱法测定婴儿奶粉中乳铁蛋白中乳铁蛋白的含量[J]. 中国酿造, 2012, (7): 167–168.
- Wang F, Dou WY, Shi YL, *et al.* Determination of content of infant formula lactoferrin lactoferrin in RP-HPLC [J]. Chin Brew, 2012, (7): 167–168.
- [15] 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, (1): 30–34.
- Cheng J, Gao XJ, Liu XF, *et al.* Study on the method of detection of bovine colostrum lactoferrin by RP-HPLC [J]. Dairy Sci Technol, 2009, (1): 30–34.
- [16] 夏明, 应铁进. 高效液相色谱法检测乳制品中的乳铁蛋白含量[J]. 食品科学, 2010, (2): 165–167.
- Xia M, Ying TJ. Lactoferrin content by HPLC detection in dairy products [J]. Food Sci, 2010, (2): 165–167.
- [17] 张林田, 陈小雪, 魏建华, 等. 反相高效液相色谱法检测食品添加剂乳铁蛋白[J]. 食品研究与开发, 2010, (8): 130–132.
- Zhang LT, Chen XX, Wei JH, *et al.* Detection of food additives lactoferrin RP-HPLC [J]. Food Res Dev, 2010, (8): 130–132.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



王德伟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量控制。
E-mail: 790007532@qq.com