

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240220002

高效液相色谱法检测牛奶中免疫球蛋白 G 含量

李 珊^{1,2}, 刘慧敏^{1*}, 陈岭军¹, 迟雪露¹, 叶巧燕¹, 张 宁¹, 郑 楠¹

[1. 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), 北京 100193; 2. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 青岛 266109]

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱法检测牛奶中免疫球蛋白 G 含量的分析方法。**方法** 样品加 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液提取, 于 12000 r/min 下离心 10 min, 经玻璃纤维滤纸过滤, 取滤液用 1 mL 规格的 Protein G 亲和柱净化, 用 4 mL pH 为 2.5 的洗脱液定容, 过滤膜, 以 BEH C₄ 为色谱柱, 柱温 65°C, 以三氟乙酸水溶液、三氟乙酸乙腈溶液为流动相, 流速设置为 1.5 mL/min, 进样量 30 μ L, 在波长为 280 nm 下用高效液相色谱仪进行测定。**结果** 免疫球蛋白 G 质量浓度在 5.0~200.0 mg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 r^2 大于 0.999, 方法定量限(limits of quantification, LOQs)为 10.0 mg/kg。当加标浓度在 100.0~400.0 mg/kg 范围内, 加标回收率在 97.2%~103.6%之间, 相对标准偏差在 2.5%~5.9%之间。**结论** 依据化学分析方法验证指南(GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》), 确认所建立的分析方法具有足够的准确性和重复性。该方法可为准确检测牛奶中免疫球蛋白 G 含量提供技术支持。

关键词: 高效液相色谱法; 免疫球蛋白 G; 牛奶

Determination of immunoglobulin G content in milk by high performance liquid chromatography

LI Shan^{1,2}, LIU Hui-Min^{1*}, CHEN Ling-Jun¹, CHI Xue-Lu¹, YE Qiao-Yan¹,
ZHANG Ning¹, ZHENG Nan¹

[1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Laboratory of Milk Product Quality and Safety Risk Assessment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Beijing), Milk and Dairy Product Quality Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Beijing), Beijing 100193, China;
2. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China]

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the determination of immunoglobulin G content in milk by high performance liquid chromatography. **Methods** Samples were to be extracted using phosphate buffers with pH 7.0, centrifuged at 12000 r/min for 10 min and filtered by fiberglass filter paper. Then 1 mL Protein G affinity column and 4 mL eluent at pH 2.5 were used to purify and filter the membrane. The high performance liquid chromatography

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奶牛创新团队三期建设项目(HBCT2024230206)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1301003), the Major Science and Technology Special Project of Xinjiang Autonomous Region (2022A02006-3-1), the Industrial Technology System (CARS-36), the Innovation Project (ASTIP-IAS12), and the Hebei Modern Agricultural Industrial Technology System Dairy Cow Innovation Team Phase III Construction Project (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, Milk and Dairy Product Quality Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Beijing), Beijing 100193, China. E-mail: liuhuiming521@163.com

column was BEH C₄ and set at 65°C. Mobile phases were trifluoroacetic acid solution and acetonitrile trifluoroacetic acid solution with a flow rate of 1.5 mL/min. The volume of injection was 30 μ L, and the detection wavelength was 280 nm.

Results The content of immunoglobulin G was to range from 5.0 to 200.0 mg/L, the standard curve was expected to show high linearity ($r^2 > 0.999$), the limits of quantification (LOQs) were 10.0 mg/kg. When the concentration was in the range of 100.0 to 400.0 mg/kg, the recovery rate was in the range of 97.2%–103.6%, and the relative standard deviation was in the range of 2.5%–5.9%. **Conclusion** Based chemical analysis method validation guidelines (GB/T 27417—2017 *Conformity assessment—Guidance on validation and verification of chemical analytical methods*), it is confirmed that the developed analytical method is to have sufficient accuracy and repeatability. The method can provide technical support for the accurate determination of immunoglobulin G in milk.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; immunoglobulin G; milk

0 引 言

牛奶具有丰富的营养物质, 是脂肪、蛋白质和钙的优秀来源^[1], 其中乳蛋白发挥着重要的功能作用^[2], 例如免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig), 是牛奶中的主要免疫活性物质。抗体是免疫系统在抗原的刺激下, 由 B 淋巴细胞增殖分化产生的、可与抗原发生特异性结合并介导免疫效应的球蛋白, 而 Ig 是一类具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白^[3]。牛奶中的 Ig 含量平均占牛奶中总蛋白质的 2%, 平均占乳清蛋白的 12%^[4], 包括 IgG、IgM、IgD 和 IgA^[5], 其中 IgG 具有 4 种亚类, 分别是 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄, IgG₁ 和 IgG₃ 具有较强的补体激活能力^[6]。泌乳期奶牛牛乳中 IgG 含量为 0.030–0.614 mg/mL, 平均含量为 0.322 mg/mL^[7]。IgG 具有多种生物学活性, 能与抗原结合, 具有提高免疫力、抑制细菌繁殖、减少排斥反应、抗炎等作用^[8–12]。研究表明, 食物具有特异性 IgG, 根据这一结果减少相应饮食可以改善慢性疾病症状^[13]。此外, IgG 对呼吸道及食物过敏性疾病有较明显的作用^[14–15]。因此 IgG 被广泛应用于药物开发、治疗性抗体制备以及功能性食品的开发, 而且可以间接与动物饲料相作用提高动物免疫力等^[16]。

目前, Ig 的常用测定方法主要有免疫扩散法、酶联免疫法、紫外分光光度法、电泳法和高效亲和色谱法等。吴继尧等^[17]采用单双向免疫扩散法测定牛奶中 IgG 的含量, 结果显示单向免疫扩散法线性较好, 但回收率较差, 且双向免疫扩散法变异系数离散程度较大。杜凌等^[18]采用酶联免疫法测定婴儿奶粉中 IgG 的含量, 结果表明该方法具有较好的准确性, 但是实验稳定性较差, 加样、稀释等过程中体积稍有偏差就会对结果产生较大影响。高东微等^[19]通过建立间接竞争性酶联免疫吸附法来测定牛乳中的 IgG, 回收率为 78.9%–117.5%。项新华等^[20]建立的酶联免疫吸附双抗体夹心法在牛 IgG 质量浓度为 0.031–2.500 mg/mL 时, 回收率为 88.4%, 变异系数 6.1%。HURLEY 等^[21]建立的间接的竞争性的酶联免疫吸附实验发现其具有较好的特

异性, 但更适合用于快速检测牛奶掺假, 且不适用于检测加热处理后的牛奶。刘爱国等^[22]运用火箭电泳法测 IgG 的含量, 操作简单, 线性较好, 相关系数为 0.9947, 但更适用于工业生产过程中的检测。杨祖英等^[23]利用高效亲和色谱法测定 IgG 的含量, 检出限为 0.5 mg/g, 平均回收率为 88.5%–101.0%, 相对标准差为 $\pm 1.4\%$, 但高效亲和色谱法的缺点是基质具有局限性且色谱柱不耐压、易漏液^[24]。紫外分光光度法测定 IgG 具有不稳定性, 如王森等^[25]通过实验发现紫外分光光度法的重复性不如高效亲和色谱法, 且操作烦琐。有研究者^[26]通过实验发现数字 Brix 折射仪可以用来估算预定的 IgG 浓度阈值, 但不能准确预测初乳 IgG 浓度。

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)是现代生物学和网络技术支持的一种检测技术, 用于分离、鉴别和定量各种成分^[27], 整个过程不需要复杂的前处理, 具有较高的检测效率^[28]。HPLC 是国标规定的牛初乳中 IgG 含量的检测方法, 该方法分离性好, 准确度高, 结果重复性好^[29–30]。但是牛常乳中 IgG 含量的检测方法仍在探索中, 例如任意^[31]采用 HPLC 测定牛乳中 IgG 含量, 检测方法定量限为 30.0 mg/kg。这些先前的研究证实了方法的可行性, 但是方法的定量限仍可优化。

目前已有的标准 GB/T 5009.194—2003《保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定》运用的是高效亲和色谱的原理, 适用于片剂、胶囊、粉剂类型的保健品中 IgG 的测定。而标准 NY/T 2070—2011《牛初乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 的测定分光光度法》采用的是分光光度法, 且仅适用于牛初乳及其制品中 IgG 的检测。标准 SN/T 3132—2012《出口牛乳制品中牛免疫球蛋白 G 的测定 酶联免疫吸附法》主要用于出口牛乳制品中牛 IgG 的测定, 采用的是酶联免疫吸附法, 适用于牛初乳产品和添加了牛初乳成分的牛乳制品中 IgG 的检测。本研究通过优化色谱条件和前处理条件建立一种精准检测常乳中 IgG 总量的 HPLC 方法, 将此方法应用于牛奶中 IgG 的测定, 以期对牛奶中活性蛋白类物质的测定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三氟乙酸(纯度 99.9%, 北京百灵威科技有限公司); 乙腈(质谱纯, 法国 Cleman 公司); 无水磷酸二氢钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甘氨酸(优级纯, 德国 Sigma 公司); 牛 IgG 标准溶液(8.5 mg/kg, 北京美正检测技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

1260 Infinity 型液相色谱仪(美国 Agilent 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); Protein G 亲和柱(5 mL×1 mL, 美国 Cytiva 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液配制

标准工作液: 分别移取适量牛 IgG 标准溶液, 配制成 800 mg/L 的混合标准中间液, 用甘氨酸溶液逐级稀释成标准工作液, 现用现配。

1.3.2 样品前处理

称取 10.0000 g 样品, 加入磷酸盐缓冲液(6.8 g 无水磷酸二氢钾加水调 pH 至 7.00±0.05, 定容至 1 L)定容至 50 mL, 于离心机 12000 r/min 离心 10 min。上清液用玻璃纤维滤纸过滤, 滤液备用。

Protein G 亲和柱先用 10 mL 水冲洗, 再用 10 mL 磷酸盐缓冲液活化, 移取 20 mL 滤液于离心管中过柱, 待管中

滤液见底立刻向其中加入 10 mL 磷酸盐缓冲液淋洗, 然后加入 4.0 mL 甘氨酸洗脱液洗脱, 并定容至 5.0 mL, 涡旋混匀后用针管吸取并经过滤膜移至样品瓶中, 待测。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: BEH C₄ (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm, 300 Å); 流动相 A: 三氟乙酸乙腈溶液(0.1%), 流动相 B: 三氟乙酸水溶液(0.1%); 流速: 1.5 mL/min; 柱温: 65°C; 进样体积: 30 μL; 检测器: 紫外可见光检测器/二极管阵列检测器; 检测波长: 280 nm。

1.4 数据处理

实验结果采用 Microsoft Office 2010 和 Agilent Lab Advisor LC&CE 进行统计分析和图像分析。

2 结果与分析

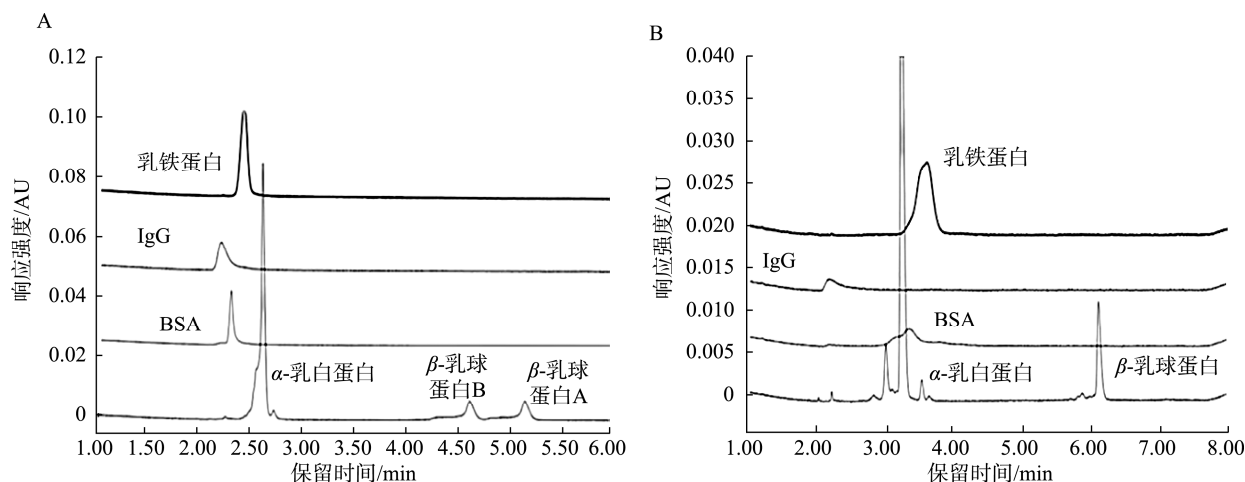
2.1 色谱条件优化

2.1.1 色谱柱的选择

实验室前期研究分别使用 BEH C₁₈ 和 BEH C₄ 这两种不同色谱柱检测相同质量浓度(100 mg/L)的 IgG、乳铁蛋白、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白溶液, 其中 IgG 都能较好分离, 且出峰时间不同, 但在 BEH C₄ 色谱柱上 IgG 峰型更尖锐, 有更好的对称性, 见图 1^[32], 故本研究选择 BEH C₄ 色谱柱。

2.1.2 检测波长的选择

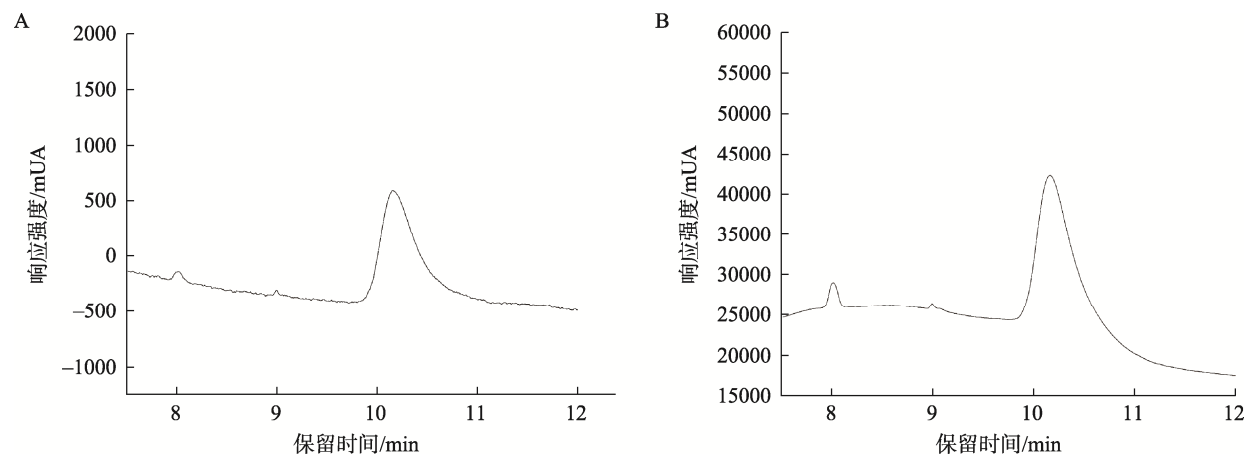
比较 IgG 标准品在 210 nm 及 280 nm 波长下的色谱图, 以确定其最佳吸收波长, 如图 2 所示。相对于检测波长 210 nm, IgG 在波长为 280 nm 时检测的基线更平稳, 而且很多物质在 210 nm 处都有出峰, 受杂质干扰较大, 280 nm 为 IgG 特征峰, 受其他因素干扰小, 且分离度较好, 因此采用 280 nm 作为 IgG 的检测波长。



注: A. C₄; B. C₁₈。

图1 不同色谱柱上的色谱图

Fig.1 Chromatograms on different columns



注: A. 280 nm; B. 210 nm。
图2 不同检测波长下IgG色谱图(100 mg/L)
Fig.2 Chromatograms of IgG at different detection wavelengths (100 mg/L)

2.1.3 柱温的选择

由于 IgG 具有明显的热不稳定性, 70℃时可能会变性^[33], 因此需要选择适宜的温度对其进行检测。设置了 25、30、40、50、60、65℃ 6 个温度梯度。牛奶中 IgG 含量检测结果如图 3、表 1 所示, 柱温为 65℃时峰面积更大且峰型狭窄尖锐, 且对称性较好, 因此确定柱温为 65℃。

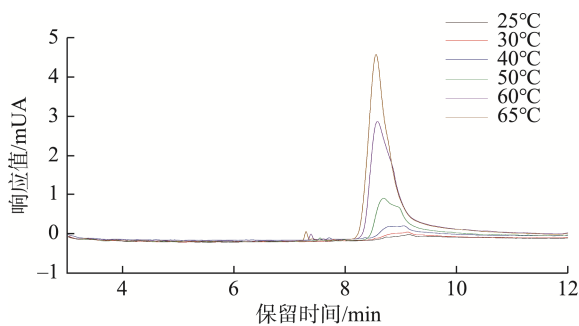


图 3 不同柱温下 IgG 的色谱图
Fig.3 Chromatograms of IgG at different column temperatures

表 1 柱温的确定				
Table 1 Determination of column temperature				
柱温/℃	峰面积	峰高	峰宽	对称因子
35	8.6	1.8e-1	0.8014	1.143
40	8.7	2.4e-1	0.6147	2.564
50	3.4	1e0	0.5251	0.444
60	92.3	3	0.4251	0.376
65	126.7	4.7	0.3766	0.514

2.1.4 流速的选择

流速的选择是洗脱程序中需要考虑的重要条件, 通常高流速梯度通过缩小时间峰获得高解析度, 而低流速梯度可以改善残余效应和峰形拖尾, 提高检测灵敏度。选取

1.0 mL/min 和 1.5 mL/min 两个检测中常用的流速梯度进行对比, IgG 色谱图如图 4、表 2 所示, 两个流速条件下 IgG 峰面积和对称因子差距不大, 但为了达到更高的检测效率, 采用流速为 1.5 mL/min。

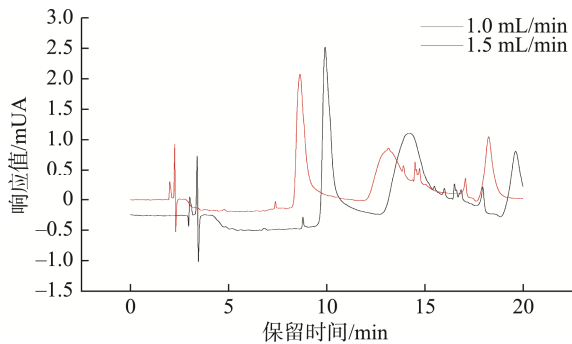


图 4 不同流速下 IgG 的色谱图
Fig.4 Chromatograms of IgG at different flow rates

表 2 流速的确定				
Table 2 Determination of flow rate				
流速/(mL/min)	峰面积	峰高	峰宽	对称因子
1.5	61.1	2.1	0.4781	0.695
1.0	79.4	2.9	0.4631	0.447

2.1.5 进样量的选择

合适的进样量既可以保证目标峰有较好的响应值, 也可以避免溶剂效应和基质效应对色谱柱的污染。选取质量浓度为 160 μg/mL 的 IgG 标品, 分别以 20、30、40 μL 为进样量进行实验。如图 5、表 3 所示, 不同进样量对峰高、峰宽影响不大, 峰面积随着进样量的增加而增加。但是为了保证目标峰有较好的响应值, 同时防止样品浓度过高对色谱柱的损伤, 故选取进样量为 30 μL。

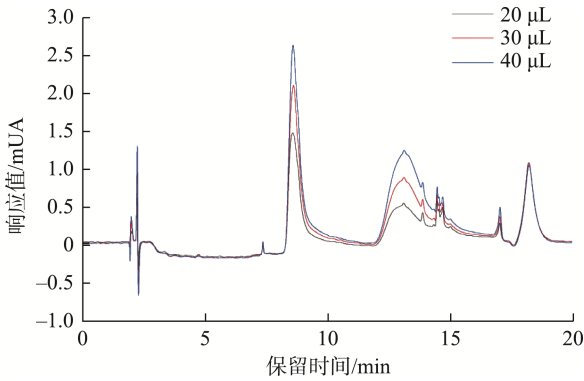


图 5 不同进样量下 IgG 的色谱图
Fig.5 Chromatograms of IgG at different injection quantities

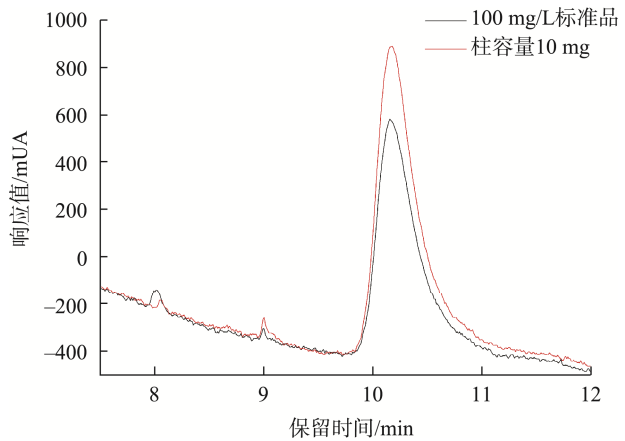


图 6 Protein G 亲和柱承载量的测定色谱图
Fig.6 Chromatograms of Protein G affinity column carrying capacity

表 3 进样量的确定
Table 3 Determination of injection volume

进样量/ μ L	峰面积	峰高	峰宽	对称因子
20	46.3	1.5	0.5069	0.593
30	61.1	2.1	0.4781	0.695
40	75.7	2.7	0.4744	0.571

表 4 Protein G 亲和柱承载量
Table 4 Protein G affinity column carrying capacity

100 mg/L 标准品峰面积	洗脱液峰面积	回收率/%
159623	169516	106

2.2 前处理条件优化

2.2.1 固相萃取柱的确定

牛乳中 IgG 含量很少, 平均约为 0.322 mg/mL, 容易受到各种条件的影响, IgG 进行纯化可以提高检测准确度。Protein G 来自 G 组链球菌的细胞表面蛋白, 并以非免疫机制结合 IgG 的恒定区^[34], 其亲和柱对 IgG 具有很强的亲和力, 但对 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、乳铁蛋白和 BSA 作用不强。因此本研究利用具有这种特性的 Protein G 纯化牛奶中的 IgG。

2.2.2 柱承载量的确定

本研究针对 1 mL 规格的 Protein G 亲和色谱柱进行了承载量的测试。这是因为 Protein G 亲和柱对 IgG 的承载量存在差异, 而不同的承载量会对分析结果的准确度产生显著影响。通过实验确定色谱柱的最适承载量, 可以优化 IgG 的捕获和纯化过程, 从而提高实验的精确度和可重复性。Protein G 亲和柱用 10 mL 水冲洗并用 10 mL 磷酸盐溶液活化后, 取含量为 10 mg 的 IgG 标品过柱(相当于样品浓度 5 g/kg), 经过 4.5 mL 洗脱液洗脱后, 用甘氨酸洗脱液定容至 100 mL 后过滤膜, 转移至样品瓶后上机测定。结果见图 6 和表 4, 10 mg IgG 过柱后的回收率为 106%, 适用于此方法, 说明该规格的 Protein G 亲和柱的最大柱承载量超过 10 mg, 而牛奶中 IgG 含量平均为 322 mg/L^[35], 远小于柱承载量, 所以可满足实际样品检测的需要。

2.2.3 磷酸盐缓冲液 pH 的选择

由于 pH 会使 IgG 变性, 需要对所用缓冲液的 pH 进行优化选择。选择 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 共 5 个不同 pH 的缓冲液对样品进行处理, 测定牛奶中 IgG 含量。结果如图 7 所示, 缓冲液 pH 在 7.0 时, IgG 峰面积最大, 因此, 选择 pH 7.0 为磷酸盐缓冲液的最佳 pH 并进行后续实验。

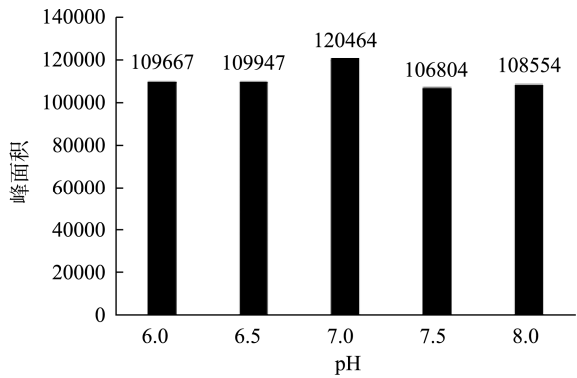


图7 磷酸缓冲液pH的优化
Fig.7 Optimization of pH of phosphate buffer

2.2.4 甘氨酸洗脱液 pH 的选择

洗脱液的 pH 对实验结果也会产生影响, 选择 2.0、2.5、3.0 共 3 个不同洗脱液 pH 对样品进行处理, 测定牛奶中的 IgG 含量。结果如图 8 所示, 洗脱溶液 pH 在 2.5 时, IgG 的峰面积最大, 且 pH 增大为 3.0 时, 洗脱出的 IgG 的峰面积明显降低。因此, 选择 pH 2.5 为洗脱溶液的最佳 pH 并进行后续实验。

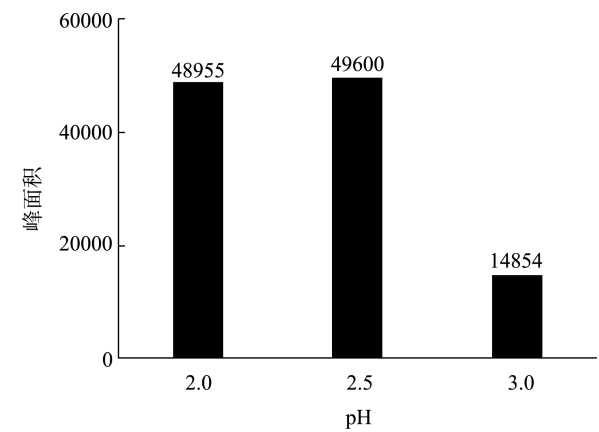


图8 洗脱溶液pH的优化
Fig.8 Optimization of pH of elution solution

2.2.5 洗脱体积的选择

采用规格为 1 mL 的 Protein G 亲和柱, 使用 1 mL 洗脱液连续洗脱 5 次上机测定。由图 9 可见, 第 1 次和第 2 次洗脱后的试样溶液中可检测到 IgG, 第 3~5 次洗脱后的试样溶液中均未检测到 IgG。由表 5 可见, 连续 5 次洗脱后, 试样测试后 IgG 峰面积总和为 260232, 理论峰面积为 259555, IgG 回收率达到 100.3%。发现使用 2 mL 洗脱液可将 IgG 完全洗脱, 为提高实验的准确性和稳定性, 并减少实验误差, 最终决定采用 4 mL 洗脱液进行洗脱后定容并进行上机测定。虽然 2 mL 的洗脱液已足够, 但为了保证后期方法的复现性, 使用 4 mL 的洗脱液更加稳妥。

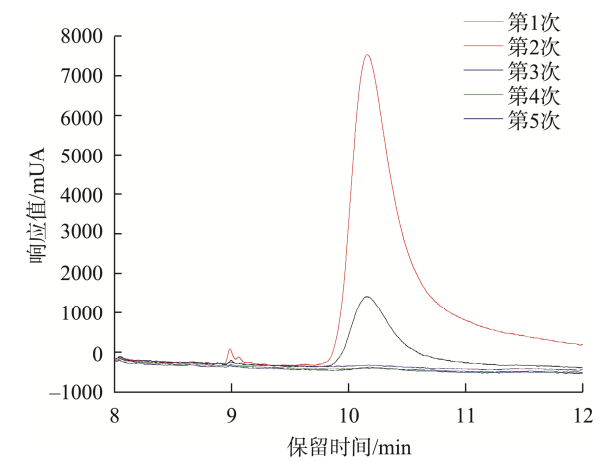


图 9 Protein G 亲和柱洗脱体积的测定色谱图
Fig.9 Chromatograms of Protein G affinity column elution volume determination

2.3 方法学评价

2.3.1 方法线性范围

选取 5.0、10.0、40.0、80.0、160.0 和 200.0 mg/L 6 个点用 IgG 标准中间液(800 mg/L)作标准曲线。结果显示

在 5.0~200.0 mg/L 内呈良好线性关系, 其回归方程为 $Y=0.709387X-0.130821$, 且具有较高的相关系数 $r=0.99988$ 。这表明该分析方法在指定的浓度范围内具有较好的线性度, 能够为 IgG 的定量测定提供准确和可靠的参考。

表 5 Protein G 亲和柱洗脱体积		
Table 5 Protein G affinity column elution volume		
洗脱次数	洗脱液峰面积	洗脱比率/%
第 1 次	42420	16.3
第 2 次	217812	83.9
第 3 次	0	0
第 4 次	0	0
第 5 次	0	0
IgG 总峰面积	260232	100.3

2.3.2 方法定量限

用 IgG 标准溶液配制成浓度为 4.0、5.0、6.0、7.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0、200.0 mg/kg 10 个浓度 IgG 标准工作液再进行离心等后续处理, 信噪比见表 6。

表 6 标准工作液信噪比			
Table 6 Standard working fluid signal-to-noise ratio			
标准液浓度/(mg/kg)	峰面积	浓度/(mg/kg)	信噪比
4.0	1.8	4	7.1
5.0	2.6	5	14.2
6.0	3.3	6	17.6
7.0	3.6	7	18.6
10.0	6.1	10	27.1
20.0	13.5	20	/
40.0	28.7	40	/
80.0	58.3	80	/
160.0	113.3	160	/
200.0	141.1	200	/

注: /表示信噪比随浓度增加而增加, 样品加标浓度为 5.0 mg/kg 时信噪比小于 10, 不满足信噪比要求, 样品加标为 10.0 mg/kg 的时候信噪比大于 10, 已经达到要求, 因此后续不再计算。

选择灭菌牛奶为空白基质, 取样后添加 0.0、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0 mg/kg 6 个浓度 IgG 再进行离心等后续处理, 信噪比与加标回收率见表 7。结果可知, 当灭菌牛乳中添加 IgG 浓度为 10.0 mg/kg, 测得的结果非常清晰和可靠,

表 7 样品加标回收率及信噪比
Table 7 Sample recovery rates and signal-to-noise ratio

编号	标准液浓度 (mg/kg)	峰面积	浓度 (mg/kg)	信噪比	回收率 /%
1	0.0	0.00000	/	/	/
2		0.00000	/	/	/
3	5.0	2.65885	4.03419	10.7	99.75
4		2.63546	4.00124	8.5	99.15
5	10.0	5.46188	7.98358	24.4	99.36
6		5.65992	8.26262	25.1	101.77
7	20.0	12.66094	16.71681	48.1	103.94
8		12.56600	16.58910	67.4	103.29
9	40.0	23.36123	28.83637	79.5	89.31
10		23.64653	29.22926	116.4	90.26
11	60.0	36.04647	46.30481	/	95.86
12		36.45142	46.86245	/	94.95

注: /表示空白对照不进行浓度、信噪比、回收率的计算。

信噪比大于 10, 并且加标后的样品回收率在理想范围 (89%~110%)之间, 表明该方法对于样品中 IgG 的定量具有

较好的准确性和精密度。因此, 本方法对样品中 IgG 的定量限为 10.0 mg/kg。

2.3.3 准确度和精密度测试

以灭菌乳为基质, 分别添加 100.0、200.0 和 400.0 mg/kg 3 个浓度水平 IgG 进行准确度和重复性测试, 每组 3 个平行。IgG 回收率在 97.2%~103.6%之间, 实验室内 3 d 实验的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 2.5%~5.9%之间 (表 8)。结果表明本方法的准确度和重复性满足化学分析方法验证指南(GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》)的要求。

2.3.4 重现性测试

本方法分别在 3 家实验室进行重现性测试。由于 IgG 的含量会随温度的升高而减少, 巴氏杀菌乳中 IgG 的本底值会低于生牛乳, 所以二者选择不同的加标浓度。生牛乳添加 80、160 和 400 mg/kg 3 个浓度水平进行重现性测试, 巴氏杀菌乳添加 100、200 和 400 mg/kg 3 个浓度水平进行重现性测试, 每个浓度水平进行 3 次重复实验。结果见表 9~14, 本方法回收率在 90.0%~110.0%之间, RSD 在 0.0%~8.0%之间, 具有良好的重现性。

2.3.5 实际样品测定

选取生牛乳(编号 1~5)和巴氏杀菌牛乳(编号 6~10)实际样品采用本方法进行测定。结果如表 15、16 所示, 实际样品的回收率在 90.0%~110.0%之间, 平行性较好。

表 8 实验室内准确度和精密度结果汇总表
Table 8 Summary table of accuracy and precision results in the laboratory

时间	浓度水平/(mg/kg)	实测值/(mg/kg)	理论值/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
Day1	100.0	92.5	100.0	92.5	97.5	5.6
		96.6		96.6		
		103.3		103.3		
		186.6		93.3		
	200.0	191.8	200.0	95.9	97.2	4.8
		204.8		102.4		
		397.6		99.4		
		405.6		101.4		
	400.0	440.0	400.0	110.0	103.6	5.4
		103.5		103.5		
		98.6		98.6		
		92.0		92.0		
Day2	100.0	193.0	100.0	96.5	98.0	5.9
		204.0		102.0		
		203.2		101.6		
		422.0		105.5		
	400.0	412.4	400.0	103.1	102.5	3.2
		396.0		99.0		

表 8(续)						
时间	浓度水平/(mg/kg)	实测值/(mg/kg)	理论值/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
Day3	100.0	96.1	100.0	96.1	100.5	4.1
		104.2		104.2		
		101.3		101.3		
		199.4		99.7		
	200.0	191.6	200.0	95.8	98.6	2.5
		200.6		100.3		
		392.4		98.1		
		420.8		105.2		
	400.0	393.6		98.4	100.6	4.0

表 9 生牛乳中添加 80 mg/kg IgG Table 9 Raw milk supplemented with 80 mg/kg IgG												
测定值 /(mg/kg)	Lab1			Lab2			Lab3			平均值	标准差	RSD/%
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
B		227.2			226.0			225.1		226.1	2.30	0.79
X1	306.5	308.4	306.7	308.4	307.8	307.4	305.5	307.9	302.8	306.8	/	/
X1-B	146.9	146.2	150.2	153.6	165.0	156.9	158.2	159.8	157.8	155.0	6.25	4.03
回收率/%	97.6	100.0	97.8	99.1	98.2	97.9	96.7	99.7	93.2	97.8	2.02	2.07

注: /表示不计算, 表 10~14 同。

表 10 生牛乳中添加 160 mg/kg IgG Table 10 Raw milk supplemented with 160 mg/kg IgG												
测定值 /(mg/kg)	Lab1			Lab2			Lab3			平均值	标准差	RSD/%
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
B		227.2			226.0			225.1		226.1	2.30	0.79
X2	374.1	373.4	377.4	379.6	391.0	382.9	383.3	384.9	382.9	381.1	/	/
X2-B	79.3	81.2	75.8	82.4	76.4	77.3	80.4	78.8	72.5	78.2	3.07	3.93
回收率/%	91.0	90.6	93.1	94.0	101.1	96.1	97.0	98.0	96.7	95.3	3.42	3.59

表 11 生牛乳中添加 400 mg/kg IgG Table 11 Raw milk supplemented with 400 mg/kg IgG												
测定值 /(mg/kg)	Lab1			Lab2			Lab3			平均值	标准差	RSD/%
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
B		227.2			226.0			225.1		226.1	2.30	0.79
X3	593.8	595.9	592.5	601.6	602.3	603.5	604.1	606.4	609.1	601.0	/	/
X3-B	366.6	368.7	365.3	375.6	376.3	377.5	379.0	381.3	384.0	374.9	6.61	1.76
回收率/%	91.3	91.9	91.0	93.1	93.3	93.6	94.0	94.6	95.2	93.1	1.45	1.56

表 12 巴氏杀菌乳中添加 100 mg/kg IgG
Table 12 Pasteurized milk supplemented with 100 mg/kg IgG

测定值 /(mg/kg)	Lab1			Lab2			Lab3			平均值	标准差	RSD/%
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
B		271.0			188.8			216.5		207.4	16.10	7.78
X1	315.2	315.0	315.5	293.0	291.0	293.2	315.0	313.3	311.8	307.0	/	/
X1-B	98.2	98.0	98.5	104.2	102.2	104.4	98.5	96.8	95.3	99.6	3.24	3.25
回收率/%	98.2	98.0	98.5	104.2	102.2	104.4	96.8	96.8	96.8	99.5	3.17	3.18

表 13 巴氏杀菌乳中添加 200 mg/kg IgG
Table 13 Pasteurized milk supplemented with 200 mg/kg IgG

测定值 /(mg/kg)	Lab1			Lab2			Lab3			平均值	标准差	RSD/%
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
B		227.2			226.0			225.1		226.1	2.30	0.79
X2	415.8	424.2	424.2	405.5	405.0	394.8	425.3	430.5	430.8	417.3	/	/
X2-B	198.8	207.2	207.2	216.7	216.2	206.0	208.8	214.0	214.3	209.9	5.88	2.80
回收率/%	99.4	103.6	103.6	108.4	108.1	103.0	104.4	107.0	107.2	105.0	2.95	2.81

表 14 巴氏杀菌乳中添加 400 mg/kg IgG
Table 14 Pasteurized milk supplemented with 400 mg/kg IgG

测定值 /(mg/kg)	Lab1			Lab2			Lab3			平均值	标准差	RSD/%
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
B		227.2			226.0			225.1		226.1	2.30	0.79
X3	634.5	634.5	633.2	601.2	606.0	612.5	616.5	620.8	624.5	620.4	/	/
X3-B	417.5	417.5	416.2	412.4	417.2	423.7	400.0	404.3	408.0	413.0	7.52	1.82
回收率/%	104.4	104.4	104.1	103.1	104.3	105.9	100.0	101.1	102.0	103.3	1.88	1.82

表 15 实际样品中 IgG 含量测定
Table 15 Determination of IgG in actual samples

样品类型	样品编号	含量/(mg/kg)	加标量/ μ g	回收率/%
生牛乳	1	230.7 $\pm$ 4.6	800.0	93.2~105.6
	2	201.2 $\pm$ 2.3		
	3	208.8 $\pm$ 1.1		
	4	215.9 $\pm$ 0.9		
	5	207.6 $\pm$ 3.5		
巴氏杀菌牛乳	6	118.6 $\pm$ 2.7		91.5~108.3
	7	124.8 $\pm$ 3.3		
	8	125.5 $\pm$ 1.8		
	9	112.9 $\pm$ 0.4		
	10	117.1 $\pm$ 1.6		

表 16 不同品牌样品中 IgG 含量测定
Table 16 Determination of IgG in samples of different brands

样品类型	样品	含量/(mg/kg)	加标量/ μg	回收率/%
生牛乳	A1	229.4 $\pm$ 2.25	650.0	97.7
	A2	171.4 $\pm$ 2.1		
	B3	200.5 $\pm$ 0.46	600.0	92.0
	B4	225.5 $\pm$ 0.9		
巴氏杀菌牛乳	A6	120.7 $\pm$ 1.8	650.0	97.7
	A7	114.3 $\pm$ 2.5		
	B8	115.5 $\pm$ 2.9	600.0	92.0
	B9	125.8 $\pm$ 0.6		

注: A、B 分别表示两个品牌的产品及生乳。

3 结 论

本研究建立了一种牛奶中 IgG 含量的 HPLC 分析方法, 经前处理条件和色谱条件的优化探索, 最终确定最佳实验条件为: 经过 pH 为 7.0 的缓冲液处理后, 用 Protein G 亲和柱富集 IgG, 并用 pH 为 2.5 的甘氨酸洗脱溶液洗脱, 通过 BEH C₄ 色谱柱分离检测, 以 0.1%三氟乙酸溶液为流动相 A, 0.1%三氟乙酸乙腈溶液为流动相 B, 在检测波长 280 nm、柱温 65℃、流速 1.5 mL/min、进样量 30 μL 条件下进行分离检测。经方法学验证, 本方法稳定性、准确性、重现性良好, 适用于牛奶中 IgG 的定量检测, 为未来牛奶及其制品中 IgG 的检测标准制订提供了技术支撑。

参考文献

[1] COLLARD KM, MCCORMICK DP. A nutritional comparison of cow's milk and alternative milk products [J]. Acad Pediatr, 2021, 21(6): 1067–1069.

[2] 王蓓, 唐艳斌, 张炎, 等. 牛乳中乳清蛋白质的功能活性研究进展[J]. 中国食品学报, 2021, (9): 366–373.

WANG B, TANG YB, ZHANG Y, *et al.* Research progress on functional activity of whey protein in cow milk [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2021, (9): 366–373.

[3] 马兴铭, 丁剑冰. 医学免疫学(第 2 版)[M]. 北京: 清华大学出版社, 2017.

MA XM, DING JB. Medical immunology (2nd Ed) [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2017.

[4] 张和平, 郭军. 乳中特异性免疫球蛋白(IgG 乳抗体)的开发及应用[J].

乳业科学与技术, 2004, 1: 5.

ZHANG HP, GUO J. Development and application of specific immunoglobulin (IgG milk antibody) in milk [J]. Dairy Sci Technol, 2004, 1: 5.

[5] 刘生杰, 余为一. 免疫球蛋白 IgG 和 IgM 分离纯化技术现状与展望[J]. 阜阳师范学院学报: 自然科学版, 2006, 23: 5.

LIU SJ, YU WY. Status and prospect of isolation and purification technology of immunoglobulin IgG and IgM [J]. J Fuyang Norm Univ (Nat Sci Ed), 2006, 23: 5.

[6] RAO PN, DEO DD, GAUR A, *et al.* A new flow cytometry assay identifies recipient IgG subtype antibodies binding donor cells: Increasing donor availability for highly sensitised patients [J]. Asi J, 2022, 11(9): e1415.

[7] LIU GL, WANG JQ, BU DP, *et al.* Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows [J]. Vet J, 2009, 182(1): 79–85.

[8] ZHANG J, CHEN Q, ZHOU Y, *et al.* Characterization and determination of bovine immunoglobulin G subtypes in milk and dairy products by UPLC-MS [J]. Food Chem, 2022, 390: 133170.

[9] 郭军, 张和平. 乳中特异性免疫球蛋白(IgG 乳抗体)的开发及应用[J]. 乳业科学与技术, 2004, (3): 5.

GUO J, ZHANG HP. Development and application of milk specific immunoglobulin (IgG) [J]. Dairy Sci Technol, 2004, (3): 5.

[10] 张锋华. 巴氏杀菌牛乳中免疫球蛋白 G 含量和乳过氧化物酶活性[J]. 乳业科学与技术, 2022, 45: 6–10.

ZHANG FH. Content of immunoglobulin G and lactoperoxidase activity in pasteurized milk [J]. Dairy Sci Technol, 2022, 45: 6–10.

- [11] 曹婷婷. IgA, IgG 和 IgM 分泌细胞在家兔胃肠道的分布规律及其与年龄的关系[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- CAO TT. Distribution of IgA, IgG and IgM secretory cells in the gastrointestinal tract of rabbits and their relationship with age [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.
- [12] UEMOTO Y, KATSURA T, ENDO Y, *et al.* Genetic aspects of immunoglobulins and cyclophilin A in milk as potential indicators of mastitis resistance in Holstein cows [J]. J Dairy Sci, 2024, 107(3): 1577–1591.
- [13] HICKS K, BLADES M, HART G. Role for food-specific IgG-based elimination diets [J]. Nutr Food Sci, 2008, 38(5): 404–416.
- [14] TAYEB MMS. Role of IgG food test in patients with allergic diseases [J]. Aims Allerg Immunol, 2023, 7(2): 1–5.
- [15] 吴雨泓, 陈碧华, 吴欢, 等. 亚麻酸对乳蛋白理化性质与免疫球蛋白 G/E 结合能力的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(24): 239–245.
- WU YH, CHEN BH, WU H, *et al.* Effect of linolenic acid on physicochemical properties of milk protein and the binding ability of immunoglobulin G/E [J]. J Food Saf Qual, 2019, 14(24): 239–245.
- [16] 刘生杰, 朱茂英, 顾士彬, 等. 免疫球蛋白 G(IgG)三种提取方法比较[J]. 中国农学通报, 2007, 23: 38–43.
- LIU SJ, ZHU MY, GU SB, *et al.* Comparison of three extraction methods of immunoglobulin G (IgG) [J]. Chin Agric Sci Bullet, 2007, 23: 38–43.
- [17] 吴继尧, 刘鹏龙, 张丹凤, 等. 琼脂双向免疫扩散法测定牛初乳中 IgG[J]. 新疆农业科学, 2001, 38: 3.
- WU JY, LIU PL, ZHANG DF, *et al.* Determination of IgG in bovine colostrum by agar double immunodiffusion [J]. Xinjiang Agric Sci, 2001, 38: 3.
- [18] 杜凌, 孟令洁, 苏米亚. 婴儿配方奶粉中 IgG 的测定方法[J]. 乳业科学与技术, 2004, 1: 4.
- DU L, MENG LJ, SU MY. Determination of IgG in infant formula [J]. Dairy Sci Technol, 2004, 1: 4.
- [19] 高东微, 马孝斌, 孙远明, 等. 乳制品中牛 IgG 含量间接竞争性 ELISA 检测方法的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 1: 395–398.
- GAO DW, MA XB, SUN YM, *et al.* Study on Indirect competitive ELISA method for detection of bovine IgG in dairy products [J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 1: 395–398.
- [20] 项新华, 尹香君, 赵丹慧, 等. 酶联免疫双抗体夹心法检测牛初乳素中免疫球蛋白 IgG[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12: 2.
- XIANG XH, YIN XJ, ZHAO DH, *et al.* Detection of immunoglobulin IgG in bovine promaxin by enzyme-linked double antibody sandwich method [J]. Chin J Health Lab, 2002, 12: 2.
- [21] HURLEY IP, COLEMAN RC, IRELAND HE, *et al.* Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration [J]. J Dairy Sci, 2004, 87(3): 543–549.
- [22] 刘爱国, 吴子健, 徐清, 等. 火箭电泳法检测牛血清 IgG 条件的研究[J]. 食品科学, 2008, 29: 537–540.
- LIU AIG, WU ZJ, XU Q, *et al.* Study on detection of IgG in bovine serum by rocket electrophoresis [J]. Food Sci, 2008, 29: 537–540.
- [23] 杨祖英, 宋书锋. 高效亲和色谱法测定初乳素免疫球蛋白 IgG[J]. 卫生研究, 2003, 1: 53.
- YANG ZY, SONG SF. Determination of immunoglobulin IgG by high performance affinity chromatography [J]. J Health Res, 2003, 1: 53.
- [24] 侯方妮, 张佳程, 杜彦山, 等. 婴幼儿配方奶粉中 IgG 检测方法的研究进展[J]. 中国乳业, 2009, 1: 3.
- HOU FN, ZHANG JC, DU YS, *et al.* Research progress of IgG detection methods in infant formula milk powder [J]. Dairy Ind Chin, 2009, 1: 3.
- [25] 王森, 薛巧如, 姚敏菲, 等. 测定静脉注射人免疫球蛋白 IgG 含量的三种方法比较[J]. 解放军药学报, 2010, 1: 4.
- WANG M, XUE QR, YAO MF, *et al.* Comparison of three methods for determination of human immunoglobulin IgG by intravenous injection [J]. Chin J Pharm, 2010, 1: 4.
- [26] SOCKETT D, BREUER RM, SMITH LW, *et al.* Investigation of brix refractometry for estimating bovine colostrum immunoglobulin G concentration [J]. Front Vet Sci, 2023, 1: 10.
- [27] GUPTA MK, GHUGE A, PARAB M, *et al.* A comparative review on high-performance liquid chromatography (HPLC), ultra performance liquid chromatography (UPLC) & high-performance thin layer chromatography (HPTLC) with current updates [J]. Curr Iss Pharm Med, 2022, 35(4): 224–228.
- [28] 张玉. 高效液相色谱在食品安全分析中的应用[J]. 经济研究导刊, 2010, 1: 2.
- ZHANG Y. Application of high performance liquid chromatography in food safety analysis [J]. Econ Res Guide, 2010, 1: 2.
- [29] PINHO C, MARTINS ZE, PETISCA C, *et al.* Size exclusion and reversed-phase high-performance liquid chromatography/UV for routine control of thermal processing of cows' and donkey milk major proteins [J]. J Dairy Res, 2012, 79(2): 224.
- [30] 马燕芬, 陈志伟, 魏晓兵, 等. 高效液相色谱法测定牛初乳中 IgG 含量的方法研究[J]. 饲料工业, 2007, 28: 6.
- MA YF, CHEN ZW, WEI XB, *et al.* Determination of IgG in bovine colostrum by high performance liquid chromatography [J]. Feed Ind, 2007,

- 28: 6.
- [31] 任意. 高效液相色谱法测定牛奶及奶粉中免疫球蛋白含量[J]. 食品工业, 2022, 43: 3.
- REN Y. Determination of immunoglobulin in milk and milk powder by high performance liquid chromatography [J]. Food Ind, 2022, 43: 3.
- [32] 李鹏. 奶及奶制品中乳清蛋白成分的检测技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- LI P. Research on detection technology of whey protein in milk and milk products [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [33] 李飞, 隋新, 刘红娟, 等. 热处理对乳蛋白质的影响[J]. 北京联合大学学报, 2015, 1: 35–40.
- LI F, SUI X, LIU HJ, *et al.* Effect of heat treatment on milk protein [J]. J Beijing Union Univ, 2015, 1: 35–40.
- [34] COPESTAKE DEJ, INDYK HE, OTTER DE. Affinity liquid chromatography method for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum powders [J]. J AOAC Int, 2006, 89(5): 1249–1256.
- [35] 刘艺婷, 周凌华, 许秋莉, 等. 不同巴氏杀菌强度对牛乳中活性蛋白的影响[J]. 食品工业, 2021, 1: 139–142.
- LIU YT, ZHOU LH, XU QL, *et al.* Effect of different pasteurization intensity on active protein in milk [J]. Food Ind, 2021, 1: 139–142.
- (责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)

作者简介



李 珊, 硕士研究生, 主要研究方向为奶产品质量安全与营养品质。

E-mail: Lisannn2023@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