

《食品中乳铁蛋白的测定 酶联免疫吸附法》

编制说明

一、工作简况

（一）任务来源、起草单位、起草人

1. 背景

乳铁蛋白又称乳转铁蛋白、红蛋白，是 80 kDa 的铁结合糖蛋白，存在于哺乳动物的乳汁中，含量与动物种属相关，以人乳、牛乳为典型代表。人初乳中乳铁蛋白含量高达 6.0 mg/L~8.0 mg/mL。人常乳中含量为 2.0 mg/L~4.0 mg/mL，约占普通母乳总蛋白的 20%，是牛乳中含量的 10 倍以上。

乳铁蛋白具有多种生物学活性，具有参与铁代谢、抗肿瘤、抗氧化、抗菌、阻断氧自由基、调节免疫和抗炎症、促进细胞增长、减少内脏脂肪等多种功能，是一种极具广阔市场前景的功能性蛋白。《食品营养强化剂使用标准》（GB 14880-2012）规定，乳铁蛋白作为食品营养强化剂，允许使用的食品类别包括调制乳（ ≤ 1.0 g/kg）、风味发酵乳（ ≤ 1.0 g/kg）、含乳饮料（ ≤ 1.0 g/kg）、调制乳粉（ ≤ 1.0 g/kg）和婴幼儿配方食品（以即食状态计 ≤ 1.0 g/L）。近年来，在各种乳制品中添加乳铁蛋白，从而提高产品的营养价值，成为乳制品行业的新热点。添加了乳铁蛋白的乳制品，得到市场的追捧，为广大消费者所青睐。

《食品营养强化剂 乳铁蛋白》（GB 1903.17-2016）规定了作为食品营养强化剂的乳铁蛋白的各项技术要求，在附录 A 中规定了乳铁蛋白占总蛋白质量百分比的高效液相色谱法。除此以外，至今我国没有其他有关乳铁蛋白的国家标准检测方法。食品生产企业使用乳铁蛋白作为营养强化剂生产食品，生产过程中没有合适的检测方法对产品进行品质安全控制。产品进入市场后，食品安全监管机构也没有合适的检测方法对市售商品进行标签符合性检验监管。2019 年，团体标准 T/TDSTIA 006—2019《奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 液相色谱法》发布实施，规定了生乳、液态奶和乳粉中乳铁蛋白的液相色谱测定方法。液相色谱法需要昂贵的检测仪器设备和耗材，对实验室硬件条件和检测人员的技能要求较高，检测结果容易受到成分复杂的样品中基质背景干扰的影响，难以满足食品行业日常生产质控和食品安全检验监管机构批量快速筛查的需要。为满足食品行业对食品中乳铁蛋白含量检测的实际需要，应当尽快建立定量准确、操作简便、人力和经济成本合理、适合基层实验室广泛应用的标准检

测方法。

2. 任务来源

任务来自《中国食品科学技术学会关于发布 2020 年团体标准立项计划的通知》（中食学字[2020]第 004 号）。项目编号 ttbz-2020-005。

3. 起草单位及起草人

本标准起草单位：

起草人：

（二）起草过程

2020 年申报中国食品科学技术学会团体标准项目，标准立项后，项目组通过在线会议等方式，完成了标准文本和编制说明，经过讨论并征求相关专家意见，形成目前征求意见稿。

二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

我国现行国家标准中，GB 14880-2012 规定了乳铁蛋白作为食品营养强化剂的使用标准，允许使用的食品类别包括调制乳（ ≤ 1.0 g/kg）、风味发酵乳（ ≤ 1.0 g/kg）、含乳饮料（ ≤ 1.0 g/kg）、调制乳粉（ ≤ 1.0 g/kg）和婴幼儿配方食品（以即食状态计 ≤ 1.0 g/L）。GB 1903.17-2016 规定了作为食品营养强化剂的乳铁蛋白的各项技术要求，在附录 A 中规定了乳铁蛋白占总蛋白质量百分比的高效液相色谱法。

我国至今没有食品中乳铁蛋白含量检测方法的国家标准。

目前国内仅有 1 项食品中乳铁蛋白含量检测方法的团体标准 T/TDSTIA 006-2019《奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 液相色谱法》，规定了生乳、液态奶和乳粉中乳铁蛋白的液相色谱测定方法。

本标准采用 ELISA 法，利用抗原-抗体特异性结合反应，对多种乳制品和婴幼儿配方食品中乳铁蛋白含量进行竞争性酶联免疫吸附测定，本标准为企业生产质控和监管机构标签符合性检验提供重要的技术支撑。

三、国外有关法律、法规和标准情况的说明

从检测技术标准这一方面来说，国外暂无食品中乳铁蛋白含量检测方法标准。

四、标准的制（修）订与起草原则

本标准按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本标准技术内容根据 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南中附

录-方法回收率》，参考其他采用 ELISA 法的现行国家标准和行业标准，结合标准制定项目组以往起草国家标准和行业标准的经验，拟定了应用性验证评价方案并加以实施，对本标准的技术性能参数进行各项指标评估。

五、确定各项技术内容的依据

5.1 样品前处理

本标准采用 EuroProxima LACTOFERRIN FAST ELISA 乳铁蛋白检测试剂盒。试剂盒说明书规定 2 种样品前处理方式，分别是乳铁蛋白含量 $\leq 2500 \mu\text{g/g}$ 的婴儿乳粉和乳铁蛋白含量 $>2500 \mu\text{g/g}$ 的婴儿乳粉。根据 GB 14880-2012，乳铁蛋白作为食品营养强化剂允许使用的食品类别包括调制乳（ $\leq 1.0 \text{ g/kg}$ ）、风味发酵乳（ $\leq 1.0 \text{ g/kg}$ ）、含乳饮料（ $\leq 1.0 \text{ g/kg}$ ）、调制乳粉（ $\leq 1.0 \text{ g/kg}$ ）和婴幼儿配方食品（以即食状态计 $\leq 1.0 \text{ g/L}$ ）。显然，试剂盒说明书规定的样品前处理方式远不能满足国内食品行业对乳铁蛋白含量测定的需求。为此，项目组针对国内检测需求，开展了样品类型扩大化及其对应样品前处理方法的研究。

乳铁蛋白在生牛乳中含量很低，未经人工添加乳铁蛋白的以生牛乳乳为原料生产的乳制品，如巴氏杀菌乳、灭菌乳、风味发酵乳、含乳饮料等，针对这类样品，项目组通过缩小稀释倍数的实验研究，建立了乳铁蛋白含量 $<20 \text{ mg/100 g (mL)}$ 的样品前处理方法，满足对未经人工添加乳铁蛋白的食品测定乳铁蛋白含量的需要。

此外，项目组针对 GB 14880-2012 规定的食品类别，分别进行了试剂盒的应用性验证。验证结果表明，试剂盒对国家标准中规定的食品类别均可以稳定地进行乳铁蛋白含量测定。随后广州海关技术中心对社会提供委托检测技术服务的过程中，陆续完成了本标准规定的各种食品类别中乳铁蛋白含量的测定，所提供的检测结果得到社会的认可。

5.2 试剂和材料

试剂盒说明书规定使用蒸馏水进行试剂配制和样品前处理。项目组研究发现，国内实验室的蒸馏水制备过程和质量控制情况比较复杂，采用实验室制备的蒸馏水，极易造成严重的背景干扰，蒸馏水中残余的铁质往往导致测定结果的准确性超出 ELISA 法质量控制要求。经过调查摸索，项目组确定了一种广泛适用、简便易得的替代处理方式，以市售瓶装饮用纯净水作为实验用水，如怡宝饮用纯净水等，兼顾解决了本标准使用上的便利性和准确性问题。

5.3 试剂配制

试剂配制方法直接影响测定结果的准确性。采用试剂盒说明书中规定的试剂配制方法， $1\times$ 稀释缓冲液可提前配制后贮存在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 长期使用，标准系列工作液则没有规定配制后具体的使用有效期。项目组实验研究发现，提前稀释后贮存在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 的 $1\times$ 稀释缓冲液不利于测定；乳铁蛋白对环境比较敏感，标准系列工作液提前配制后贮存在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，对绘制标准曲线造成明显的负面影响。项目组针对上述潜在问题，改变了试剂盒说明书规定的试剂配制方法，对试剂配制的细节给出进一步操作指南。本标准规定， $1\times$ 稀释缓冲液应

当现配现用；标准稀释工作液 7 可配制后分装贮-20 °C 保存至试剂盒有效期结束，每次测定前取出 1 管回复至室温，用于配制标准系列工作液；标准系列工作液中除标准稀释工作液 7 以外的其他浓度标准品应当现配现用。这些规定，进一步保证了标准曲线和样品测定的准确性，从而保障了标准的可靠性。

此外，对于试剂配制，本标准提供了具体的操作指南，如 1×稀释缓冲液、1×洗涤缓冲液、1×酶标记物等试剂的用量计算方法及对应的配制操作要点，又如对标准系列工作液的配制提供了清晰明白的配制表格，便于标准使用者对实验操作细节的掌握，最大程度上避免不同实验室在标准使用过程中因操作差异导致的结果偏差。

5.4 质量控制

ELISA 法对环境条件非常敏感，ELISA 试剂盒的保存、试剂配制和保存、测定操作步骤的反应时间等环节，对最终的定量测定结果影响极大。为此，ELISA 法必须严格规定质量控制的要求，通用做法是对变异系数和回收率进行明确规定。项目组走访了贝因美、君乐宝、完达山等食品企业，以及深圳海关食品中心、厦门海关技术中心、大连海关技术中心等海关技术机构，调研了食品企业生产质控实验室和第三方食品检测机构两类实验室对 ELISA 法检测工作的质量要求。调研发现，企业生产质控实验室总体上对 ELISA 法检测的质量控制相对宽松，变异系数以不超过 15%居多，回收率以 80%~120%居多。与此同时，第三方食品检测机构通常规定变异系数不超过 10%，回收率在 85%~115%之间。考虑到本标准发布实施后的用途，项目组讨论并征求各类食品检测实验室意见后确定了变异系数和回收率的技术指标。此外，由于乳铁蛋白的 ELISA 测定对环境中的铁质污染非常敏感，本标准特别在质量控制条款进一步强调规定了避免铁质污染的要求和注意事项。

5.4.1 评估标准

为考察本项目研制成果的各项性能，项目研究组广泛检索国内外 ELISA 检测方法权威评估方法，根据 GB/T 27417-2017 附录-方法回收率，并结合实际经验，最终自行拟定了一个可接受的限量标准（见表1），以此来对本标准检测方法的技术性能参数评估。

5.4.2 灵敏度

以检测限（LOD）作为灵敏度评价指标。检测限的计算公式为： $LOD = \bar{X} + 3 \times SD$ 。其中， \bar{X} 为重复测定空白样品的平均值， SD 为重复测定空白样品的标准偏差。因此：

$$LOD = \bar{X} + 3 \times \sqrt{\frac{n \sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$$

其中 \bar{X} 为重复测定空白样品的平均值， n 为样品数量。

本项目采用的 ELISA 标准检测方法，婴幼儿配方奶粉检测限 LOD 为 102.20 mg/kg，牛奶的检测限 LOD 为 14.74 mg/L。

5.4.3 稳定性

为评估本标准方法的稳定性，选择不同批次的试剂盒（3 个批次）分别对 5 个不同浓度的样本进行测定，用标准偏差、变异系数及回收率作为稳定性的评估指标。变异系数（CV）计算公式为： $CV = SD / \bar{x} \times 100\%$ ；其中 SD 为标准偏差， \bar{x} 为测定数据的平均值。回收率计算公式为：回收率（%）= 实际测定值/理论值 $\times 100\%$ 。 SD 为重复测定空白样品的标准偏差。使用不同批次的检测试剂，变异系数范围为 1.7%~4.4%，符合技术性能参数限量标准的要求。

5.4.4 准确度和精密度

以重复测定某一浓度样品的检测结果变异系数（CV 值）作为精密度评价指标。以回收率作为准确度评价指标。牛奶、婴幼儿配方奶粉、乳清蛋白粉进行测定，变异系数范围 2.3%-5.6%，回收率范围为 107.6%-118.9%，符合技术性能评估标准的要求。

六、验证

采用乳铁蛋白酶联免疫试剂盒检测法（ELISA）和高效液相色谱法（HPLC）分别对婴幼儿配方乳粉和特殊医学用途婴儿配方食品中乳铁蛋白含量进行测定，并对结果进行了比对。分析结果表明，两种方法的检测结果没有显著性差异，显著性概率 $P > 0.05$ 。