



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2070-202X

代替 NY/T 2070—2011

牛初乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 的测定

Determination of immunoglobulin G in bovine colostrum and its products

公开征求意见稿

202X – XX – XX 发布

202X – XX – XX 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

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。

本文件代替 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》，与 NY/T 2070-2011 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 将“范围”中的检出限更改为定量限（见第1章，2011年版的第1章）；
- b) 增加了对标准品选择的要求（见 4.2.6，2011年版的 4.3）；
- c) 增加了样品（见 4.4）；
- d) 更改了试验步骤（见 4.5，2011年版的第6章）；
- e) 更改了试验数据处理中的计算公式（见 4.6，2011年版的第7章）；
- f) 更改了精密度（见 4.7，2011年版的第8章）；
- g) 增加了高效液相色谱法（见第5章）。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会（SAC/TC 274）归口。

本文件起草单位：XXX 等。

本文件主要起草人：XXX等。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2011年首次发布为NY/T 2070-2011；

——本次为第一次修订。

牛初乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 的测定

1 范围

本文件描述了牛初乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 测定的分光光度法和高效液相色谱法。

本文件适用于牛初乳及其制品（乳粉、胶囊、奶贝、奶棒）中免疫球蛋白 IgG 含量的测定。

本文件分光光度法的定量限：液态样品为 0.2 mg/mL，固态样品为 0.2 mg/g；高效液相色谱法的检出限：液态样品为 0.3 mg/mL、固态样品为 0.2 mg/g，定量限：液态样品为 1.0 mg/mL、固态样品为 1.0 mg/g。

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 6682 分析实验用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 分光光度法

4.1 原理

试样中可溶性抗原IgG与抗体形成的可溶性免疫复合物在聚乙二醇的作用下析出，形成微粒，试液浊度发生变化，试液浊度与所含IgG抗原量成正比，在340 nm测定免疫球蛋白IgG含量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，二级。

4.2.2 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)：称取 0.27 g 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)，2.86 g 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)，0.20 g 氯化钾(KCl)，8.80 g 氯化钠(NaCl)，水溶解后调 pH 至 7.4 ± 0.1，用水定容至 1000 mL，置 2℃~8℃保存。

4.2.3 4%聚乙二醇缓冲液：取 40 g 聚乙二醇，加磷酸盐缓冲液(4.2.2)定容至 1000 mL，置 2℃~8℃保存。

4.2.4 抗 IgG 抗体储备液：称取 10 mg（精确至 0.1 mg）兔抗 IgG 抗体粉剂(效价 $\geq 10\,000$) 溶于 2 mL 的磷酸盐缓冲液(4.2.2)中，每管分装成 100 μL ，置于 -18°C 以下保存备用。

4.2.5 抗 IgG 抗体稀释液：移取 100 μL 的抗体储备液，加入 4.9 mL 的聚乙二醇缓冲液(4.2.3)，将抗体稀释 50 倍。临用现配。

4.2.6 IgG 标准储备溶液（1.0 mg/mL）：称取 0.010 g（精确到 0.01 mg）IgG 标准品（纯度不低于 95%，或有国家认证并授予标准物质证书的标准物质），用磷酸盐缓冲液(4.2.2)溶解并定容至 10 mL，摇匀，临用现配。

4.2.7 IgG 标准系列溶液：取适量 IgG 标准储备溶液(4.2.6)，用 4%聚乙二醇缓冲液稀释(4.2.3)，配制质量浓度为 0.20 mg/mL、0.30 mg/mL、0.40 mg/mL、0.50 mg/mL、0.60 mg/mL、0.70 mg/mL 和 0.80 mg/mL 的 IgG 标准系列溶液，临用现配。

4.3 仪器设备

4.3.1 紫外分光光度计：340 nm $\pm$ 2 nm，配有微量比色皿。

4.3.2 分析天平，精度为 0.1 mg 和 0.01 mg。

4.3.3 冷冻离心机：不超过 5°C 。

4.3.4 恒温水浴锅。

4.3.5 微量移液器。

4.3.6 反应管：0.5 mL。

4.4 样品

4.4.1 液态样品

取有代表性的样品约 20 mL，混匀，装入洁净容器， $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下密闭保存。

4.4.2 固态样品

取有代表性的样品约 20 g，粉碎研磨（胶囊去皮），混匀，装入洁净容器，常温密封保存。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

4.5.1.1 液态样品

平行做两份试验。准确移取 2 mL 试样于 5 mL 离心管中，在 $1^{\circ}\text{C}\sim 5^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 条件下离心 30 min。弃去上层脂肪，准确移取下层溶液 1 mL，用 4%聚乙二醇缓冲液(4.2.3)稀释并定容至 100 mL $\sim$ 200 mL，混匀，备用。

4.5.1.2 固态样品

平行做两份试验。准确称取0.2 g试样，精确至 0.001 g，准确加2 mL水，混匀，在1°C~5°C、5 000 r/min条件下离心30 min。弃去上层脂肪，准确移取下层溶液1 mL，用4%聚乙二醇缓冲液(4.2.3)稀释并定容至50 mL~100 mL，混匀，备用。

4.5.2 测定

4.5.2.1 标准曲线的绘制

分别取系列标准溶液(4.2.7)各10 μL加入7个反应管中，涡旋混匀，置于37°C水浴中反应 40 min。以4%聚乙二醇缓冲液(4.2.2)调零，于340 nm波长下测定吸光度。以标准溶液浓度为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线，相关系数不低于0.99。

4.5.2.2 试样的测定

向各个反应管中加入250 μL的抗IgG抗体稀释液(4.2.5)，再取10 μL待测试样加入各反应管中，涡旋混匀后，置于37°C水浴中反应40 min。以4%聚乙二醇缓冲液(4.2.2)调整分光光度计的零点，在340 nm波长下，测定吸光度。

4.6 试验数据处理

4.6.1 液态样品

试样中 IgG 的含量以质量分数 ω 计，单位为毫克每毫升(mg/mL)表示，按式(1)计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V_1}{V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中免疫球蛋白 IgG 的质量浓度的数值，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

V_1 ——试样稀释后的体积，单位为毫升(mL)；

V_2 ——试样离心后的取样体积，单位为毫升(mL)；

计算结果保留两位有效数字。

4.6.2 固态样品

试样中 IgG 的含量以质量分数 ω 计，单位为毫克每克(mg/g)表示，按式(2)计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V_1 \times V_2}{m \times V_3} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

ρ ——从标准曲线查得的试样溶液中免疫球蛋白 IgG 的质量浓度的数值,单位为毫克每毫升(mg/mL)；

V_1 ——试样稀释后的体积，单位为毫升(mL)；

V_2 ——试样离心前的体积，单位为毫升(mL)；

m ——试样的质量，单位为克(g)；

V_3 ——试样离心后的取样体积，单位为毫升(mL)；

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于其算术平均值的20%。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的免疫球蛋白IgG用磷酸盐缓冲溶液提取，经Protein G亲和柱富集净化，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 盐酸溶液（6 mol/L）：量取 5 mL 盐酸（含量为 36%-38%），缓慢加水稀释至 10 mL，混匀。

5.2.3 磷酸盐缓冲液 I（0.05 mol/L，pH 6.50）：称取 7.10 g 无水磷酸氢二钠于 1 000 mL 烧杯中，加 800 mL 水溶解，用 6 mol/L 盐酸溶液（5.2.2）调节 pH 值至 6.50 ± 0.05 ，用水定容至 1 000 mL，混匀。

5.2.4 磷酸盐缓冲液 II（0.05 mol/L，pH 7.50）：称取 7.10 g 无水磷酸氢二钠于 1 000 mL 烧杯中，加 800 mL 水溶解，用 6 mol/L 盐酸溶液（5.2.2）调节 pH 值至 7.50 ± 0.05 ，用水定容至 1 000 mL，混匀，临用现配。

5.2.5 甘氨酸溶液（pH 2.0）：称取 1.5 g 甘氨酸于 250 mL 烧杯中，用 150 mL 水溶解，用 6 mol/L 盐酸溶液（5.2.2）调节 pH 值至 2.00 ± 0.10 ，用水定容至 200 mL，混匀。

5.2.6 IgG 标准储备溶液（1.0 mg/mL）：称取 0.010 g（精确至 0.01 mg）IgG 标准品（纯度不低于 95%，或有国家认证并授予标准物质证书的标准物质），用磷酸盐缓冲液 I（5.2.3）溶解并定容至 10 mL，摇匀。临用现配。

5.2.7 IgG 系列标准溶液：准确移取适量免疫球蛋白 IgG 标准工作溶液（5.2.6），用甘氨酸溶液（5.2.5）稀释，配制成质量浓度分别为 0.02 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 的免疫球蛋白 IgG 系列标准溶液。临用现配。

5.2.8 免疫球蛋白 Protein G 亲和柱：5 mg protein G/mL，3 mL；或其他性能类似的纯化柱。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.3.2 分析天平：精度 0.1 mg 和 0.01 mg。

5.3.3 pH 计：精度为 ± 0.01 。

5.3.4 冷冻离心机：转速不低于 11 000 r/min，可控温不高于 4℃。

5.3.5 固相萃取装置。

5.3.6 涡旋混合仪。

5.4 样品

5.4.1 液态样品

取有代表性的样品约20 mL，混匀，装入洁净容器，2℃~8℃下密闭保存。

5.4.2 固态样品

取有代表性的样品约20 g，粉碎研磨（胶囊去皮），混匀，装入洁净容器，常温密封保存。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

5.5.1.1 液态样品

平行做两份试验。准确移取 1 mL（精确至 0.01 mL）试样至 50 mL 离心管中，用磷酸盐缓冲液I（5.2.3）定容至 50 mL，涡旋混匀。于 4℃、11 000 r/min 离心 10 min，去除上层脂肪，立即用移液器取出中间层液体 30 mL 至另一离心管，于相同条件下再次离心 10 min，去除上层脂肪，准确移取中间层液体 10 mL，待净化。

5.5.1.2 固态样品

平行做两份试验。准确称取 1 g（精确至 1 mg）固体牛初乳试样至 50 mL 离心管中，用磷酸盐缓冲液I（5.2.3）定容至 50 mL，涡旋混匀。于 4℃、11 000 r/min 离心 10 min，去除上层脂肪，立即用移液器取出中间层液体 30 mL 至另一离心管，于相同条件下再次离心 10 min，去除上层脂肪，准确移取中间层液体 10 mL，待净化。

5.5.2 净化

用 5 mL 磷酸盐缓冲液I（5.2.3）活化亲和柱（5.2.8），将中间层液体（5.5.1.1 和 5.5.1.2）分别过柱，速度控制在不超过 1 滴/s。用 10 mL 磷酸盐缓冲液I（5.2.3）淋洗，4 mL 甘氨酸溶液（5.2.5）洗脱，收集洗脱液，用甘氨酸溶液（5.2.5）定容至 5 mL，摇匀，待测。

5.5.3 测定

5.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：体积排阻色谱柱SEC-300 4.6×250 mm，5 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：磷酸盐溶液II（5.2.4）；
- c) 流速：0.4 mL/min；
- d) 柱温：25℃；
- e) 检测波长：214 nm；
- f) 进样量：50 μL。

5.5.3.2 系列标准溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取免疫球蛋白IgG系列标准溶液（5.2.7）和试样溶液（5.5.2）上机测定。免疫球蛋白IgG标准溶液的液相色谱图见附录A。

5.5.3.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中免疫球蛋白IgG保留时间应与系列标准溶液（浓度相当）中免疫球蛋白IgG的保留时间一致，其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

5.5.3.4 定量

以免疫球蛋白IgG的质量浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线，其相关系数 r 应不低于0.99。试样溶液中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用甘氨酸溶液（5.2.4）稀释后，重新测定。

5.6 试验数据处理

5.6.1 液态样品

试样中 IgG 的含量以质量分数 w_1 计，单位为毫克每毫升（mg/mL）表示，按公式（3）计算：

$$w_1 = \frac{\rho \times V_4 \times V_3}{V_1 \times V_2} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ρ —从标准曲线查得的试样溶液中 IgG 的质量浓度的数值，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V_4 —试样洗脱后定容的体积，单位为毫升（mL）；

V_3 —试样定容的体积，单位为毫升（mL）

V_2 —试样上样亲和柱的体积，单位为毫升（mL）；

V_1 —试样的体积，单位为毫升（mL）。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，结果保留3位有效数字。

5.6.2 固态样品

试样中 IgG 的含量以质量分数 w_2 计，单位为毫克每克（mg/g）表示，按公式（4）计算：

$$w_2 = \frac{\rho \times V_2 \times V_3}{m \times V_1} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

ρ —从标准曲线查得的试样溶液中 IgG 的质量浓度的数值，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V_2 —试样洗脱后定容的体积，单位为毫升（mL）；

V_3 —试样定容的体积，单位为毫升（mL）

V_1 —试样上样亲和柱的体积，单位为毫升（mL）；

m —试样的质量，单位为克（g）；

测定结果以平行测定的算术平均值表示，结果保留3位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于其算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性)

免疫球蛋白 IgG 标准溶液高效液相色谱图

免疫球蛋白 IgG 标准溶液高效液相色谱图见图 1。

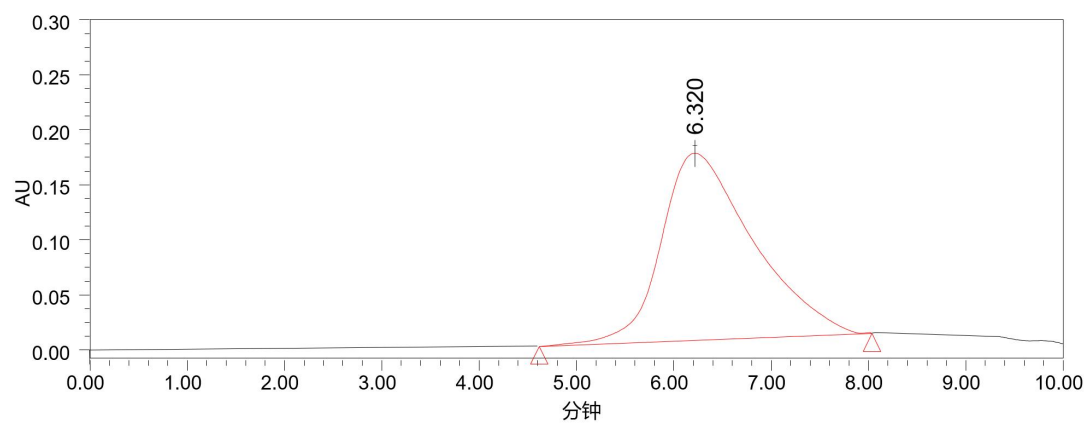


图 1 免疫球蛋白 IgG 标准溶液 (0.10 mg/mL) 高效液相色谱图