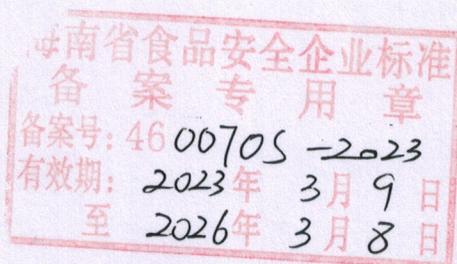


Q/SQYY

海南省食品安全企业标准

Q/SQYY 0001S—2023

天壮佑膳牌 AD 营养粉 (固体饮料)



2023-02-01 发布

2023-03-15 实施

海南森祺营养工程有限公司 发布

前 言

本标准按照《中华人民共和国食品安全法》和 GB/T 1.1《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。

本标准附录 A 为规范性附录。

本标准由海南森祺营养工程有限公司提出。

本标准由海南森祺营养工程有限公司发布。

本标准同时适用于受委托加工企业：海南天壮营养工程有限公司（地址：海南省海口市秀英区药谷三路 5 号）。

本标准主要起草人：李红艳、曾纪锴。

本标准为首次发布。

天壮佑膳牌 AD 营养粉（固体饮料）

1 范围

本标准规定了天壮佑膳牌 AD 营养粉（固体饮料）的技术要求、食品添加剂和营养强化剂、生产加工过程中的卫生要求，检验规则以及标签、标志、包装、运输、贮存和保质期的要求。

本标准适用于以乳清蛋白、植物油微囊粉[植物油（低芥酸菜籽油、葵花籽油、大豆油、中链甘油三酯）、低聚麦芽糖、酪蛋白酸钠、二氧化硅、单，双甘油脂肪酸酯、三聚磷酸钠、维生素 E，加或不添加维生素 C]、麦芽糊精、抗性糊精、复配矿物质（麦芽糊精、柠檬酸钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、碳酸镁、柠檬酸钾、焦磷酸铁、柠檬酸锌）、低聚半乳糖、低聚果糖、复配维生素（麦芽糊精、维生素 C、牛磺酸、维生素 E、烟酰胺、维生素 A、D-泛酸钙、维生素 B₁₂、叶酸、维生素 B₁、维生素 B₆、维生素 B₂、维生素 D₃）为主要原料，经粉碎或不粉碎、过筛或不过筛、混合、包装等生产工艺制成的天壮佑膳牌 AD 营养粉（固体饮料）的生产控制、检验和贮运等环节。

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构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的文件，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（包括所有修改单）适用于本文件。

- GB/T 191 包装储运图示标志
- GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准
- GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则
- GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
- GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数
- GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
- GB/T 4789.21 食品卫生微生物学检验 冷冻饮品、饮料检验
- GB 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定
- GB 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定
- GB 5009.11 食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定
- GB 5009.12 食品安全国家标准 食品中铅的测定
- GB 5009.14 食品安全国家标准 食品中锌的测定
- GB 5009.22 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定
- GB 5009.24 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定
- GB 5009.33 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定
- GB 5009.82 食品安全国家标准 食品中维生素 A、D、E 的测定
- GB 5009.84 食品安全国家标准 食品中维生素 B₁ 的测定
- GB 5009.85 食品安全国家标准 食品中维生素 B₂ 的测定
- GB 5009.86 食品安全国家标准 食品中抗坏血酸的测定
- GB 5009.89 食品安全国家标准 食品中烟酸和烟酰胺的测定
- GB 5009.90 食品安全国家标准 食品中铁的测定

- GB 5009.92 食品安全国家标准 食品中钙的测定
 GB 5009.154 食品安全国家标准 食品中维生素 B₆ 的测定
 GB 5009.169 食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定
 GB 5009.210 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定
 GB 5009.211 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定
 GB/T 5009.217 保健食品中维生素 B₁₂ 的测定
 GB 5009.241 食品安全国家标准 食品中镁的测定
 GB 5009.268 食品安全国家标准 食品中多元素的测定
 GB 5009.285 食品安全国家标准 食品中维生素 B₁₂ 的测定
 GB 5413.18 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 C 的测定
 GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则
 GB 11674 食品安全国家标准 乳清粉和乳清蛋白粉
 GB 12695 食品安全国家标准 饮料生产卫生规范
 GB 14880 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准
 GB/T 20882.6 淀粉糖质量要求 第6部分：麦芽糊精
 GB/T 23528.2 低聚糖质量要求第2部分：低聚果糖
 GB 28050 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则
 GB/T 28118 食品包装用塑料与铝箔复合膜、袋
 JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则
 国家质量监督检验检疫总局令 第75号《定量包装商品计量监督管理办法》
 卫生部公告 2008年第20号《关于批准低聚半乳糖等新资源食品的公告》
 卫生部公告 2012年第16号《关于批准中长链脂肪酸食用油和小麦低聚肽作为新资源食品等的公告》

3 技术要求

3.1 原辅料要求

- 3.1.1 乳清蛋白：应符合 GB 11674 的规定。
 3.1.2 麦芽糊精：GB/T 20882.6 的规定。
 3.1.3 低聚果糖：应符合 GB/T 23528.2 的规定。
 3.1.4 低聚半乳糖：应符合原卫生部公告 2008 年第 20 号的规定。
 3.1.5 抗性糊精：应符合原卫生部公告 2012 年第 16 号的规定。
 3.1.6 植物油微囊粉、复配矿物质、复配维生素：应符合附录 A 的规定。
 3.1.7 复合原料中各种原材料应符合相应的标准和要求。

3.2 感官要求

应符合表 1 的要求。

表 1 感官要求

项 目	要 求	检 验 方 法
色 泽	白色至黄色，可见散在白色晶体	取5g左右的被测样品置于洁净的白色瓷盘中，在自然光线下用肉眼观察其色泽和外观形态，按标签标示的冲调方法制备样品，倒入无色透明的容器中，在自然光下
滋味、气味	具有本品特有的滋气味，无异味、无异臭	
状 态	粉末或粉末颗粒，无结块，可见散在晶体，冲调后呈悬浮液，有少许浮末和沉淀，无正常视力可见外来异物	

表 2 感官要求 (续表)

项 目	要 求	检验方法
状 态		观察色泽, 鉴别气味, 用温开水漱口, 品尝滋味, 检查其有无外来异物

3.3 理化指标

应符合表 2 的规定。

表 3 理化指标

项 目	指 标	检验方法
水分, g/100g	≤ 7.0	GB 5009.3
铅 (以 Pb 计), mg/kg	≤ 0.9	GB 5009.12 或 GB 5009.268
总砷 (以 As 计), mg/kg	≤ 0.5	GB 5009.11 或 GB 5009.268
黄曲霉毒素 M1, μg/kg	≤ 0.5	GB 5009.24
黄曲霉毒素 B1, μg/kg	≤ 0.5	GB 5009.22

3.4 营养学指标

应符合表 3 的要求。

表 4 营养学指标

项 目	指 标	检验方法
蛋白质, g/100g	≥ 40.0	GB 5009.5
乳铁蛋白, mg/100g	≥ 400	依据附录 B
维生素 A, μg/kg	4000~17000	GB 5009.82
维生素 D ₃ (以胆钙化醇计), μg/kg	10~20	GB 5009.82
维生素 E, mg α-TE/kg	76~180	GB 5009.82
维生素 B ₁ , mg/kg	9~22	GB 5009.84
维生素 B ₂ , mg/kg	9~22	GB 5009.85
烟酸, mg/kg	110~330	GB 5009.89
泛酸, mg/kg	22~80	GB 5009.210
维生素 B ₆ , mg/kg	7~22	GB 5009.154
叶酸, μg/kg	600~6000	GB 5009.211
维生素 B ₁₂ , μg/kg	10~66	GB/T 5009.217 或 GB 5009.285
维生素 C, mg/kg	1000~2250	GB 5009.86 或 GB 5413.18
钙, mg/kg	2500~10000	GB 5009.92 或 GB 5009.268
镁, mg/kg	1300~2100	GB 5009.241 或 GB 5009.268
铁, mg/kg	95~220	GB 5009.90 或 GB 5009.268
锌, mg/kg	60~180	GB 5009.14 或 GB 5009.268
牛磺酸, g/kg	1.1~1.4	GB 5009.169

3.5 微生物限量

应符合表4的规定。

表5 微生物限量

项 目	采样方案及限量（若非指定，均以/25g表示）				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数, CFU/g	5	2	10 ⁴	5×10 ⁴	GB 4789.2
大肠菌群, CFU/g	5	2	10	10 ²	GB 4789.3 平板计数法
霉菌, CFU/g ≤	50				GB 4789.15
沙门氏菌, CFU	5	0	0/25g	—	GB 4789.4

注：样品的采样及处理按GB 4789.1及GB/T 4789.21执行。

3.6 净含量

应符合《定量包装商品计量监督管理办法》的规定，按JJF 1070规定的方法进行测定。

4 食品添加剂和营养强化剂

4.1 食品添加剂和营养强化剂的质量应符合2.1中列出的标准要求。

4.2 食品添加剂使用量应符合GB 2760的规定，营养强化剂的用量应符合GB 14880的规定。

5 生产加工过程中的卫生要求

应符合GB 12695的要求。

6 检验规则

6.1 原料入库要求

原料采购严格执行食品安全标准，每批原料应具备该批产品的检验合格报告书，必要时可对原料部分项目进行进厂检验。

6.2 组批

以同一配方、相同原料、同一生产线、同一生产工艺生产出来同一规格的产品为一组批。

6.3 抽样

每批产品按包装件数的1%随机抽样，不足1千件者按1千件计，每批产品抽样数量不少于10独立包装（总量不少于1kg），3个包装样品用于感官检查、理化指标和营养学指标检验，5个包装样品用于微生物指标检验，余下的用于留样，另根据产品的具体规格抽取适当的样品进行净含量检验。

6.4 出厂检验

产品出厂前须经工厂检验部门逐批检验，并签发合格证。出厂检验项目包括：感官要求、净含量、水分、蛋白质、菌落总数、大肠菌群。

6.5 型式检验

型式检验是对产品质量进行的全面考核,正常生产时每年进行一次,检验项目包括本标准技术要求中的全部项目。有下列情况之一时亦应进行型式检验。

- a) 产品正式投入生产时;
- b) 主要原辅料来源有较大改变或更换主要生产设备,可能影响产品质量时;
- c) 出厂检验与上一次型式检验结果有较大差异时;
- d) 长期停产6个月以上,恢复生产时;
- e) 食品安全监管部门提出进行型式检验的要求时。

6.6 判定规则

所检项目检验结果全部符合本标准规定时,判该批产品为合格品。微生物指标不符合本标准要求时,判该批产品为不合格品,不得复检。除微生物指标外,其它项目检验结果不符合本标准要求时,可以在原批次产品中双倍抽样复检一次,判定以复检结果为准。复检后仍有一项或一项以上不符合标准,则判该批产品为不合格品。

7 标签、标志、包装、运输和贮存

7.1 标签、标志

7.1.1 产品标签应符合 GB 7718 和 GB 28050 的规定。包装储运图示标志应符合 GB/T 191 的规定。

7.1.2 产品标签应标注不同蛋白质来源的混合比例。

7.2 包装

产品内包装采用符合 GB/T 28118 的复合膜包装;中包装用纸盒或塑料袋或者塑料盒包装;运输包装为纸箱,纸箱上的包装储运图示标志应符合 GB/T 191 的规定。规格:10g/袋,15g/袋,20g/袋,25g/袋;包装规格:6袋/盒,10袋/盒、20袋/盒、30袋/盒、60袋/盒、100袋/盒;或根据市场需求包装。

7.3 运输

运输车辆应保持清洁,不得与有毒、有害物品混装、混运。运输时防止挤压、爆晒、雨淋。装卸时轻搬、轻放。

7.4 贮存

产品应置于干燥处贮存,应离地15cm、离墙10cm贮存,不得露天存放,不得与有毒、有污染的物品或其他杂物混存。

8 保质期

在符合本标准规定的条件下,产品保质期为24个月。

附 录 A
(规范性附录)
原料(部分)质量要求

A.1 植物油微囊粉

适用于以中链甘油三酯、葵花籽油、大豆油、低芥酸菜籽油、低聚麦芽糖、酪蛋白酸钠、二氧化硅、单，双甘油脂肪酸酯、三聚磷酸钠、维生素 E、加或不加抗坏血酸钠，经微囊化工艺加工而成的食用植物油微囊粉。产品质量应符合附表 A.1 的规定。

表 A.1 植物油微囊粉的质量要求

项 目	指 标
外观	白色或类白色自由流动粉末
脂肪, g/100g	≥ 70.0
水分, %	≤ 3.0
粒度, %	≥ 95% 通过 40 目筛网
铅, mg/kg	≤ 0.8
总砷, mg/kg	≤ 1.0
菌落总数, CFU/g	≤ 1000
大肠菌群, CFU/g	≤ 10
酵母菌和霉菌, CFU/g	≤ 100
沙门氏菌/25g	不得检出

A.2 复配矿物质

适用于以麦芽糊精、磷酸三钙、磷酸氢二钾、柠檬酸钠、碳酸镁、柠檬酸钾、焦磷酸铁、柠檬酸锌为原料，经混合、过筛、包装等工艺制成的矿物质。产品质量应符合附表 A.2 的规定。

表 A.2 复配矿物质的质量要求

项 目	指 标
外观可见异物数	均匀一致的晶体粉末，无结块无肉眼可见杂质
滋味和气味	具有本品特有气味，无异味
钙, mg/kg	86400.000~105600.000
铁, mg/kg	2880.000~3520.000
镁, mg/kg	28800.000~35200.000
钠, mg/kg	63000.000~77000.000
锌, mg/kg	2160.000~2640.000

表 A.2 复配矿物质的质量要求 (续表)

项 目	指 标
磷, mg/kg	68000.000~92000.000
钾, mg/kg	77400.000~94600.000
砷, mg/kg	≤ 2.0
铅, mg/kg	≤ 2.0
菌落总数, CFU/g,	≤ 1000
大肠菌群, CFU/g	≤ 10
酵母菌和霉菌, CFU/g	≤ 50

A.3 复配维生素

适用于以麦芽糊精、维生素 A、叶酸、维生素 C、牛磺酸、烟酰胺、生育酚当量、D-泛酸钙、维生素 B₁₂、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆、维生素 D₃ 为原料, 经混合、过筛、包装等工艺制成的复配维生素。产品质量应符合附表 A.3 的规定。

附表 A.3 复配维生素的质量要求

项 目	要 求
外观可见异物数	均匀一致的粉末, 无结块无肉眼可见杂质
滋味和气味	具有本品特有气味, 无异味
视黄醇当量, μg/kg	2184000.000~3276000.000
维生素 D ₃ (胆钙化醇), μg/kg	3120.000~4680.000
生育酚当量, mg/kg	19200.000~28800.000
硫胺素 (维生素 B ₁), mg/kg	3328.000~4992.000
核黄素 (维生素 B ₂), mg/kg	3072.000~4608.000
烟酸, mg/kg	42240.000~63360.000
泛酸, mg/kg	9600.000~14400.000
吡哆醇 (维生素 B ₆), mg/kg	2880.000~4320.000
叶酸, μg/kg	686400.000~1029600.000
氰钴胺 (维生素 B ₁₂), μg/kg	8320.000~12480.000
维生素 C, mg/kg	381420.000~466180.000
牛磺酸, mg/kg	236250.000~288750.000
砷, mg/kg	≤ 2.0
铅, mg/kg	≤ 2.0
菌落总数, CFU/g,	≤ 1000
大肠菌群, CFU/g	≤ 10
酵母菌和霉菌, CFU/g	≤ 50

附 录 B
(规范性附录)
乳铁蛋白检测方法

B.1 液相色谱测定法

B.1.1 原理

试样中的乳铁蛋白经磷酸盐缓冲液提取，肝素亲和柱富集净化，用液相色谱仪分析，经反相蛋白质分离柱分离，紫外光检测，外标法定量。

B.1.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- B.1.2.1 氢氧化钠溶液 (10mol/L): 称取400.00g氢氧化钠，加水溶解，定容至1L。
- B.1.2.2 三氟乙酸溶液: 量取1mL三氟乙酸 (色谱纯)，用水定容至1L，混匀。
- B.1.2.3 三氟乙酸乙腈溶液: 量取1mL三氟乙酸 (色谱纯)，用乙腈 (色谱纯) 定容至1L，混匀。
- B.1.2.4 磷酸盐缓冲液 I: 称取磷酸氢二钠 23.85g，磷酸二氢钠4.99g，加适量水溶解，用氢氧化钠溶液 (4.1) 调节 pH 至7.50，定容至1L，混匀。
- B.1.2.5 磷酸盐缓冲液 II: 称取磷酸氢二钠5.96g，磷酸二氢钠0.96g，氯化钠5.84g，加适量水溶解，用氢氧化钠溶液 (4.1) 调节 pH至7.50，定容至1L，混匀。
- B.1.2.6 磷酸盐缓冲液 III: 称取磷酸氢二钠5.96g，磷酸二氢钠2.50g，氯化钠119.30g，加适量水溶解，用氢氧化钠溶液 (4.1) 调节pH至7.50，定容至1L，混匀。
- B.1.2.7 乳铁蛋白对照品: CAS: 112163-33-4，纯度≥85.0%。
- B.1.2.8 乳铁蛋白标准储备溶液 (10mg/mL): 将乳铁蛋白对照品按对照品证书提供的纯度换算后称量，用水定容至10mL。于-20℃保存，有效期4个月。
- B.1.2.9 乳铁蛋白标准中间溶液 (200mg/L): 准确移取乳铁蛋白标准储备溶液 (4.8) 200μL，用水定容至10mL。现用现配。
- B.1.2.10 乳铁蛋白标准系列溶液: 准确移取一定量的标准中间溶液 (4.9)，用磷酸盐缓冲液 III (4.6) 稀释定容，配制成乳铁蛋白浓度分别为0.0mg/L、20.0mg/L、40.0mg/L、60.0mg/L、80.0mg/L和100.0mg/L的标准工作溶液，现用现配。
- B.1.2.11 肝素亲和柱: HiTrap Heparin HP柱，1mL；或其他性能类似的净化柱。
- B.1.2.12 微孔滤膜: 水系，0.22 μm。

B.1.3 仪器设备

- B.1.3.1 高效液相色谱仪: 配紫外检测器或二极管阵列检测器。
- B.1.3.2 天平: 感量0.01g、0.1mg。
- B.1.3.3 容量瓶: 5mL、10mL、50mL、1000mL。
- B.1.3.4 旋涡混合器。
- B.1.3.5 离心机: 转速不低于10000r/min。
- B.1.3.6 固相萃取装置。
- B.1.3.7 pH计: 精度为0.01。

B.1.4 样品制备

取有代表性样品约 200g，混匀，装入洁净容器作为试样，密封并做好标识，于常温下干燥保存。

B.1.5 试验步骤

B.1.5.1 提取

称取试样 5g（精确到 0.01g），加入磷酸盐缓冲液 I（4.4）混匀，定容至 50mL，混匀，离心 15min，吸取 25mL 中间层试液于另一 50mL 离心管中，离心 15min。吸取上清液，待净化。

B.1.5.2 净化

肝素亲和柱用 10mL 磷酸盐缓冲液 II（4.5）活化，准确移取 10mL 上清液（7.1）过柱，用 10mL 磷酸盐缓冲液 II（4.5）淋洗，用 4.5mL 磷酸盐缓冲液 III（4.6）洗脱，收集洗脱液，用磷酸盐缓冲液 III（4.6）定容至 5.0mL，涡旋混匀，过微孔滤膜后待测。

B.1.5.3 测定步骤

B.1.5.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱：Xbridge Protein BEH C4 柱（柱长 250mm，柱内径 4.6mm，填料粒径 3.5 μm），或相当者。

流动相：A：三氟乙酸溶液（4.2），B：三氟乙酸乙腈溶液（4.3）。

检测波长：280nm。

梯度洗脱条件见附表 B.1。

流速：1.5mL/min。

柱温：60℃。

进样量：30μL。

表 B.1 流动相梯度洗脱条件

时间/ (min)	A/ (%)	B/ (%)
0	95	5
6.5	62	38
10	62	38
12	40	60
15	40	60
15.5	95	5
20.0	95	5

B.1.5.3.2 测定

取标准系列溶液（4.10）和试样溶液（7.2）上机测定。以乳铁蛋白峰面积为纵坐标，以标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，得到标准曲线回归方程。

B.1.6 试验数据处理

试样中乳铁蛋白的质量分数 X 计，数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示，按下列公式计算：

$$X = \frac{c \times V_3 \times 1000 \times V_1}{m \times V_2 \times 1000}$$

式中：

C ——被测组分曲线计算浓度，单位为毫克每升 (mg/L)；

V_3 ——样液最终定容体积，单位为毫升 (mL)；

V_1 ——试样处理液总体积，单位为毫升 (mL)；

m ——试样质量，单位为克 (g)；

V_2 ——样液过柱体积，单位为毫升 (mL)；

1000——换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

B.1.7 精密度

在重现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的 15%。

B.2 酶联免疫吸附法

B.2.1 原理

利用抗原-抗体特异性结合反应，对样品中乳铁蛋白含量进行竞争性酶联免疫吸附测定。

标准品或样品中游离的乳铁蛋白，与其酶标记物竞争性的结合微孔中预先包被的乳铁蛋白抗体结合位点。未结合的乳铁蛋白在洗涤步骤被除去。结合的酶标记物将无色的底物转化为蓝色产物。加入反应终止液后颜色由蓝色转变为黄色。标准品或样品中乳铁蛋白含量与吸光度值成反比，通过测定 450nm 波长下吸光度值和绘制标准曲线，计算得到样品中乳铁蛋白含量。

B.2.2 试剂和材料

B.2.2.1 乳铁蛋白酶联免疫吸附检测试剂盒 (EuroProxima LACTOFERRIN FAST ELISA) 包括：

B.2.2.1.1 预包被乳铁蛋白抗体的 96孔可拆分微孔板：12×8孔；

B.2.2.1.2 100×乳铁蛋白-HRP浓缩液：150 μL/瓶×1瓶；

B.2.2.1.3 乳铁蛋白标准品冻干粉：3瓶；

B.2.2.1.4 10×稀释缓冲液浓缩液：30mL/瓶×1瓶；

B.2.2.1.5 20×洗涤缓冲液浓缩液：30mL/瓶×1瓶；

B. 2. 2. 1. 6 底物/发色剂: 12mL/瓶×1瓶;

B. 2. 2. 1. 7 终止液: 15 mL/瓶×1 瓶。

B. 2. 2. 2 试剂盒验收和保存

B. 2. 2. 2. 1 每个批号试剂盒应进行回收率测试的验收试验, 回收率符合质量控制要求。

B. 2. 2. 2. 2 试剂盒于2℃~8℃黑暗处避光保存, 使用前回复至室温。

B. 2. 2. 2. 3 不同批号试剂盒中组分不得混用。

B. 2. 2. 2. 4 超过有效期的试剂盒不得使用。

B. 2. 2. 2. 5 标准曲线谱图

标准曲线谱图示例见图 A.1。

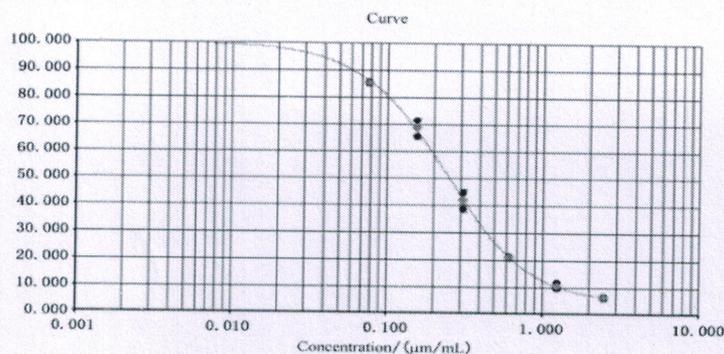


图 A.1 标准曲线谱图示例

B. 2. 2. 3 纯水符合 GB/T 6682规定的一级水。

B. 2. 2. 4 空白婴幼儿配方乳粉

市售未添加且未标注含有乳铁蛋白的婴幼儿配方乳粉。

B. 2. 3 仪器和设备

B. 2. 3. 1 酶标仪: 450nm。

B. 2. 3. 2 分析天平: 感量 0.01g。

B. 2. 3. 3 涡旋混匀仪。

B. 2. 3. 4 微孔板振荡器。

B. 2. 3. 5 单道移液器: 2μL~20μL, 10μL~100μL, 50μL~200μL, 100μL~1000μL, 500μL~5000μL。

B. 2. 3. 6 八道移液器: 30μL~300μL。

B. 2. 4 分析步骤

B. 2. 4. 1 试剂配制

B. 2. 4. 1. 1 1×稀释缓冲液: 按照1: 10比例稀释试剂盒中 10×稀释缓冲液浓缩液, 现配现用。如移取 1.0mL 10×稀释缓冲液浓缩液到 9.0 mL水中稀释混匀。

B. 2. 4. 1. 2 1×洗涤缓冲液: 按照1: 20 比例稀释试剂盒中 20×洗涤缓冲液浓缩液, 现配现用。如移取 1.0mL 20×稀释缓冲液浓缩液到 19.0mL水中稀释混匀。1个微孔需约1.0mL 1×洗涤缓冲液洗涤。

B.2.4.1.3 标准稀释工作液的配制：试剂盒标准品瓶中加入2.0mL 1×稀释缓冲液（7.1.1），混匀，得到浓度为2.5μg/mL的标准稀释工作液。400μL/管分装在洁净的1.5mL离心管中，储藏在-20℃条件下至试剂盒有效期结束。每次测定前取出1管回复至室温，即为标准稀释工作液7。

使用标准稀释工作液7进行其他梯度标准稀释工作液的配制：储藏在-20℃条件下的标准稀释工作液7回复至室温后，点甩离心，按照表1用1×稀释缓冲液（7.1.1）逐级稀释并混匀。

表 B.2 梯度标准稀释工作液的配置

编号	浓度/（μg/mL）	配制方法
标准稀释工作液 1	0	200μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 2	0.078	200μL 标准稀释工作液 3+200μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 3	0.156	200μL 标准稀释工作液 4+200μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 4	0.313	200μL 标准稀释工作液 5+200μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 5	0.625	200μL 标准稀释工作液 6+200μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 6	1.250	200μL 标准稀释工作液 7+200μL 1×稀释缓冲液
标准稀释工作液 7	2.500	标准品瓶中加入 2.0mL 1×稀释缓冲液

B.2.4.1.4 1×酶标记物：使用前点甩离心。用1×稀释缓冲液（7.1.1）按照1：100比例稀释试剂盒中100×乳铁蛋白-HRP浓缩液，现配现用。样品数为X个，应配制1×酶标记物的体积为 $(7+X) \times 2 \times 50\mu\text{L} + 50\mu\text{L}$ 。如样品数为1个，应配制850μL 1×酶标记物，移取8.5μL 100×乳铁蛋白-HRP浓缩液到841.5μL 1×稀释缓冲液（7.1.1）中稀释混匀。

B.2.4.1.5 试剂配制前将试剂盒回复至室温，使用完尽快放置于2℃~8℃

B.2.4.2 样品前处

B.2.4.2.1 乳铁蛋白含量/标签值<200 mg/kg的样品

B.2.4.2.2 计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的质量浓度在0.156μg/mL~0.313μg/mL，如稀释倍数为200倍，应进行溶解和稀释：取1.00g样品，加水至10mL，涡旋混匀5 min后，移取50μL液体样品，加入950 μL 1×稀释缓冲液（7.1.1），涡旋混匀30s得到稀释液。

B.2.4.2.3 乳铁蛋白含量/标签值在200mg/kg~2500 mg/kg范围内的样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的质量浓度为0.156μg/mL~0.313μg/mL，如稀释倍数为2000倍：称取1.00g，加水至10mL，涡旋混匀5min后，移取50μL混匀后的样品溶液至450μL 1×稀释缓冲液（7.1.1）中稀释混匀得到一级稀释液；移取50μL一级稀释液到950μL 1×稀释缓冲液（7.1.1）中，涡旋混匀30s后得到二级稀释液。

B.2.4.3 乳铁蛋白含量/标签值≥2500 mg/kg的样品

计算稀释倍数，使得测定前样品中乳铁蛋白的质量浓度为0.156μg/mL~0.313μg/mL，如稀释倍数为40000倍：先按照7.2.2进行样品前处理，称取1.00g样品，加水至10mL，涡旋混匀5min，用1×稀释缓冲液（7.1.1）稀释400倍后，得到样品二级稀释液。

对空白婴幼儿配方乳粉（5.3）进行样品前处理：称取1.00g样品，加水至10 mL，涡旋混匀5min，用1×稀释缓冲液（7.1.1）稀释200倍后，得到空白婴幼儿配方乳粉稀释液。

用空白婴幼儿配方乳粉稀释液对样品二级稀释液进行进一步稀释，移取 50 μL 样品二级稀释液到 450 μL 空白婴幼儿配方乳粉稀释液中混匀，此为用于测定的样品液。

B.2.4.4 测定

将预先包被有乳铁蛋白抗体的微孔插入微孔板架并做好标记，标准稀释工作液和样品均做双平行。

平行加入 50μL 标准稀释工作液 1~7 和样品至微孔，再加入 50μL 1×酶标记物 (7.1.4) 至每个微孔。轻轻地水平摇动微孔板使其均匀混合，20℃~25℃ 黑暗处避光孵育 30min。孵育结束后，倒去微孔中的液体，每个微孔每次加入 300μL 1×洗涤缓冲液 (7.1.2) 洗涤并在吸水纸上拍干，洗板 3 次。洗板结束后，加入 100 μL 底物/发色剂 (见附录 A) 至每个微孔，20℃~25℃ 黑暗处避光孵育 15min。孵育结束后，加入 100 μL 终止液 (见附录 A) 至每个微孔，并立即读取 450nm 波长下吸光度值。

B.2.5 结果与计算

B.2.5.1 标准曲线制作和测定结果计算

以标准稀释工作液 2~7 质量浓度为横坐标，公式 (1) 计算的百分比为纵坐标，绘制半对数曲线，计算样品液中乳铁蛋白浓度。

乳铁蛋白标准稀释工作液和样品液的百分比吸光度值按公式 (1) 计算：

$$A = \frac{S}{S_0} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

A——百分比吸光度值；

S——乳铁蛋白标准工作稀释液或样品液的平均吸光度值；

S₀——标准稀释工作液 1 的平均吸光度值。

可以使用试剂盒配套分析软件 RIDASOFT® Win 中 cubic spline 模式进行标准曲线绘制和测定结果计算，得到待测样品液中的乳铁蛋白的浓度。

B.2.5.2 测定结果计算

乳铁蛋白含量按公式计算：

$$X = \frac{c \times f \times V}{m} \times \frac{1000}{1000}$$

式中：

X——样品中乳铁蛋白含量，单位为毫克每千克 (mg/kg)；

c——待测样品液中乳铁蛋白质量浓度，单位为微克每毫升 (μg/mL)；

f——样品稀释倍数，除第一步固体样品溶解之外的稀释倍数；

V——定容体积，为 10mL；

m——样品质量，单位为 g；

$\frac{1000}{1000}$ ——从 $\mu\text{g/g}$ 更换为 mg/kg 的换算。

注：结果保留小数点后两位有效数字。

B. 2. 6 质量控制

B. 2. 6. 1 试剂失效

出现以下情况之一表明试剂失效，不能进行测定或测定结果作废：

——贮存在试剂瓶中的底物颜色出现蓝色；

——加入终止液后标准稀释工作液 1 ($0\mu\text{g/mL}$) 吸光度值 <0.8 。

B. 2. 6. 2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

B. 2. 7 检出限和定量限

本方法检测检出限是 13.58 mg/kg ，定量限为 17.04 mg/kg 。
