

在线二维液相色谱法同时测定乳制品中乳铁蛋白及免疫球蛋白 G

陈 钦^{1,2} 周朗君^{1,2} 陈梓敬^{1,2} 刘梦妮^{1,2} 林森煜^{1,2}

(1. 广州检验检测认证集团有限公司, 广东 广州 511447;

2. 国家加工食品质量检验检测中心(广东), 广东 广州 511447)

摘要: [目的] 建立二维液相色谱法同时测定乳制品中乳铁蛋白及免疫球蛋白 G 的方法。 [方法] 样品经提取后直接进样, 以 Pharmacia HI-Trap Protein G 柱为第一维色谱柱, 磷酸盐缓冲溶液和甘氨酸缓冲液为流动相, 分离目标蛋白与其他杂质。以 BioCore SEC-300 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为第二维色谱柱, 水和磷酸盐缓冲溶液为流动相, 分离乳铁蛋白和免疫球蛋白 G。 [结果] 乳铁蛋白和免疫球蛋白 G 在 0~1 000 mg/L 范围内线性良好, 相关系数均 >0.99。乳铁蛋白在固态样品和液态样品中的定量限分别为 20, 13 mg/kg。加标回收率为 91.0%~107.0%, 相对标准偏差为 2.4%~5.3%。免疫球蛋白 G 在固态样品和液态样品中的定量限分别为 34, 7 mg/kg。加标回收率为 91.2%~104.0%, 相对标准偏差为 2.1%~4.7%。 [结论] 试验建立的在线二维液相色谱系统, 前处理简单、自动化程度高、分析效率高、准确度高、重复性好, 适用于乳制品中乳铁蛋白及免疫球蛋白 G 含量测定。

关键词: 乳铁蛋白; 免疫球蛋白 G; 在线二维液相色谱法; 乳制品

Online simultaneous determination of lactoferrin and immunoglobulin G in dairy products by two-dimensional liquid chromatography

CHEN Qin^{1,2} ZHOU Langjun^{1,2} CHEN Zijing^{1,2} LIU Mengni^{1,2} LIN Senyu^{1,2}

(1. Guangzhou Inspection Testing and Certification Group Company Limited, Guangzhou, Guangdong 511447, China;

2. National Quality Testing Center for Processed Food (Guangdong), Guangzhou, Guangdong 511447, China)

Abstract: [Objective] A method of two-dimensional liquid chromatography was established to simultaneously determine the content of lactoferrin and immunoglobulin G in dairy products. [Methods] The pretreated samples were directly injected into the constructed system. Target protein and other effects were separated on a Pharmacia HI-Trap Protein G as the first-dimensional column using a mobile phase consisting of sodium phosphate buffer and glycol buffer by gradient elution. Lactoferrin and immunoglobulin G were separated on a BioCore SEC-300 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) as the second-dimensional column using a mobile phase consisting of water and sodium phosphate buffer by gradient elution. [Results] The results showed that the standard curves of Lactoferrin and Immunoglobulin G were linear with $R > 0.99$. The quantitation limits of Lactoferrin in solid samples was 20 mg/kg while in liquid samples was 13 mg/kg, the recovery rate were 91.0%~107.0% and the RSD were 2.4%~5.3%. The quantitation limits of Immunoglobulin G in solid samples was 34 mg/kg while in liquid samples was 7 mg/kg, the recovery rate were 91.2%~104.0% and the RSD were 2.1%~4.7%. [Conclusion] The online two-dimensional liquid chromatography system established in the experiment has the advantages of simple pretreatment, high automation, high analysis efficiency, high accuracy and good repeatability, and is suitable for the determination of lactoferrin and immunoglobulin G in dairy products.

Keywords: lactoferrin; immunoglobulin G; online two-dimensional liquid chromatography; dairy products

乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 是一种具有多种生物学活性的功能性蛋白, 具有参与铁代谢、抗肿瘤、抗氧化、抗菌、阻断氧自由基、免疫调节及抗炎症、促进细胞增长、减少内脏脂肪等多种功能, 主要存在于哺乳动物的乳汁中,

基金项目: 广东省市场监督管理局科技项目 (编号: 2020kj44)

通信作者: 林森煜 (1982—), 男, 广州检验检测认证集团有限公司高级工程师, 学士。E-mail: 13751735502@139.com

收稿日期: 2023-11-09 改回日期: 2024-07-18

以人乳、牛乳为典型代表。人乳中乳铁蛋白含量最高,是牛乳的 10 倍^[1-4]。近年来,向婴幼儿配方奶粉中添加乳铁蛋白使产品成分更接近人乳已成为发展趋势。目前,常见的乳铁蛋白检测方法主要有高效液相色谱法^[5-6]、高效液相色谱串联质谱法^[7]、凝胶电泳法^[8]和酶联免疫吸附法^[9]等。高效液相色谱串联质谱法及肝素亲和柱-液相色谱法存在操作步骤繁琐、成本高等缺点;凝胶电泳法存在基质限制,无法满足所有食品基质的检测需求,且试验所需试剂种类较多,操作繁琐;酶联免疫吸附法受试剂盒品牌及试验人员操作误差的影响较大,因而重复性较差^[10]。

免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 是人的免疫球蛋白之一,也是血清的主要抗体成分,约占血清免疫球蛋白的 75%,是初级免疫应答中最持久、最重要的抗体,容易通过毛细管壁,弥散到组织间隙中,起到抑制多种细菌、真菌、病毒等病原体的繁殖速度,中和毒素的作用,同时还能刺激神经细胞引发特殊反应来提高机体抗病能力。IgG 通过母乳传递给新生儿后,能够为其提供被动免疫^[11-14]。近年来,免疫球蛋白检测方法主要有酶联免疫吸附法^[15]、琼脂单向免疫扩散法^[16]、分光光度法^[17]、高效亲和色谱法^[18-19]等,其中常用的方法为高效亲和色谱法,该方法是利用 Pharmacia HI-Trap Protein G 柱接在液相色谱仪上通过特异性吸附作用对样品进行检测,但实际检测过程中,由于乳制品中蛋白成分较为复杂,存在其他蛋白与 IgG 共流出,无法准确定量,方法检出限较高等问题。

由于上述两种蛋白质都具有免疫调节作用,常同时存在于乳制品及保健食品中,其生产工艺易导致添加的蛋白丧失活性^[20],目前暂无简单、快速并能同时检测这两种活性蛋白质的方法,在部分 IgG 检测方法中,会由于同时测出样品中的乳铁蛋白导致试验结果偏大。二维液相色谱通过控制六通阀的切换,经一维色谱柱分离,可精准将目标物收集至定量环,以降低基质对检测结果的影响,再通过二维色谱柱实现两种蛋白的分离测定。

研究拟根据二维液相色谱的优点,建立乳制品中乳铁蛋白和免疫球蛋白 G 同时分析测定的检验方法。通过简化前处理步骤,提高检测效率,减少前处理操作的人力成本和耗材成本;通过优化液相条件,分离目标物与其余杂质蛋白,为乳制品中的乳铁蛋白和免疫球蛋白 G 的同时检测提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

乳铁蛋白(LF)、免疫球蛋白 G(IgG)、甘氨酸:美国 Sigma-Aldrich 公司;

磷酸氢二钠、氯化钠、磷酸、盐酸、乙酸:分析纯,广州化学试剂厂;

甲酸、乙腈:色谱纯,德国 Merck 默克公司;

去离子水:18.0 MΩ·cm,由 Milli-Q 纯水系统制备。

1.2 仪器与设备

液相色谱仪:U3000HPLC-DAD 型,美国 Thermo Fisher 公司;

漩涡混合器:MS3 basic 型,德国 IKA 公司;

去离子水发生器:Milli-Q 型,美国 Millipore 公司;

超声波清洗器:KQ-500E 型,昆山市超声仪器有限公司;

低速离心机:KDC-400 型,科大创新股份有限公司。

1.3 色谱条件

一维色谱柱为 Cytiva HI-Trap Protein G HP 柱(1 mL);一维流动相 A 为 0.05 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液(用磷酸调节 pH 至 6.5±0.2);流动相 B 为 0.05 mol/L 甘氨酸盐酸缓冲液(用盐酸调节 pH 至 2.5±0.1),交替洗脱及冲洗柱子;流速 0.5 mL/min;二维色谱柱为 BioCore SEC-300 4.6 mm×250 mm,5 μm;二维流动相 A 为水,流动相 B 为 20 mmol/L 磷酸氢二钠缓冲液(用磷酸调节 pH 至 7.0±0.3),等度洗脱;流速 1.0 mL/min;柱温 30 °C;检测波长 214 nm;定量环 1 mL;进样量 10 μL。二维管路搭建如图 1 所示,加标样品色谱图如图 2 所示。

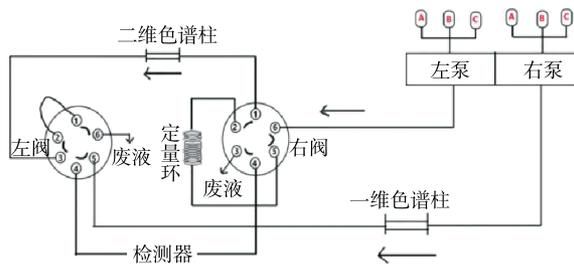


图 1 二维色谱管路连接示意图

Figure 1 Two-dimensional chromatographic pipeline connection diagram

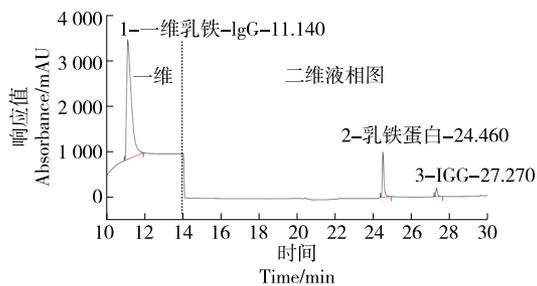


图 2 阴性样品加标色谱图

Figure 2 HPLC chromatogram of spiked sample

1.4 标准溶液配制

(1) 乳铁蛋白标准储备液(5.0 mg/mL):准确称取乳铁蛋白标准品 50 mg,用水溶解,定容至 10 mL,现用现配。

(2) 免疫球蛋白 G 标准储备液(5.0 mg/mL):准确称取免疫球蛋白 G 标准品 50 mg,用 3% 乙酸溶液(1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 3.0±0.1)溶解后,定容至 10 mL,现用现配。

(3) 标准曲线绘制:分别吸取适量的乳铁蛋白标准储备液和免疫球蛋白 G 标准储备液,用 0.1 mol/L 磷酸氢二钠缓冲溶液定容,配制成 0, 20, 50, 100, 200, 500, 750, 1 000 mg/L 的标准溶液,涡旋混匀后,进样分析。

1.5 试样处理

(1) 奶粉及其他固态粉末样品:称取 2.0 g 样品于 50 mL 刻度离心管中,加入 8 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钠缓冲溶液,涡旋溶解 10 min,加入 0.1 mol/L 磷酸氢二钠缓冲溶液定容至 10 mL,涡旋均匀,8 000 r/min 冷冻离心 5 min,取上清液至液相进样瓶中,待 HPLC 分析。

(2) 液态样品:称取 5.0 mL 样品于 50 mL 刻度离心管中,并同时记录质量,加入 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液定容至 10 mL,涡旋溶解 10 min,8 000 r/min 冷冻离心 5 min,取上清液至液相进样瓶中,待 HPLC 分析。

1.6 数据处理

采用 Thermo Chromeleon 7.0 工作站处理各物质的保留时间、峰面积、信噪比、标准曲线、样品浓度等参数,采用 Excel 软件及 Origin 软件进行统计学数据处理。

2 结果与分析

2.1 提取溶液的选择

根据日常检测分析经验,由于活性蛋白的来源及纯化方式不同,测试过程中提取所用提取液的 pH 值对功能蛋白的提取有较大影响,试验考察了 3 种不同 pH 磷酸盐缓冲液在 4 种基质样品中对两种蛋白质回收率的影响,结果如图 2 所示。由图 2 可知,当 pH 为 4.6 时,回收率最差;当 pH 为 6.8 时,所有测试的样品基质均能达到 90% 以上的回收率。因此,选择 pH 为 6.8 的磷酸盐缓冲液作为提取液。

2.2 提取时间的优化

为了确保提取完全,统一进行 30 min 的涡旋处理,为了进一步提升试验效率,以 pH 为 6.8 的磷酸盐缓冲液作为提取液对提取方式以及提取时间进行优化,结果如图 3 所示。对于涡旋及超声震荡两种方式而言,涡旋在相同时间内提取率更高,当提取时间为 5 min 时,两种方式的回收率均无法满足试验要求,涡旋 10 min 时,回收率已基本与 30 min 的结果一致,最终确定提取时间及方式为涡旋 10 min。

2.3 线性方程及检出限

对系列浓度乳铁蛋白-免疫球蛋白混合标准工作溶液进行测定,以色谱峰面积对其质量浓度进行线性回归,得到 0~1 000 mg/L 质量浓度范围内的线性方程(表 1)。由表 1 可知,方程的线性关系良好,相关系数 > 0.99。

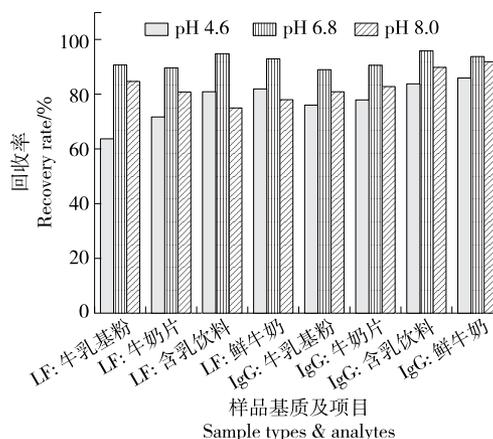


图 3 溶液 pH 值的优化

Figure 3 Optimization of the amount of the pH in sodium phosphate buffer

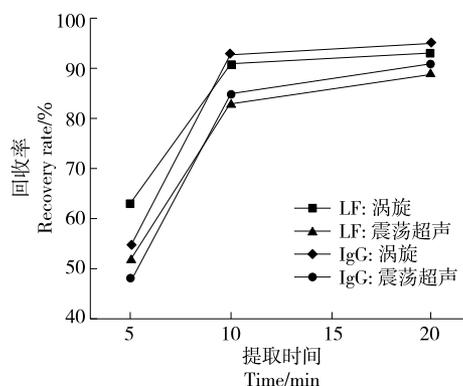


图 4 萃取时间的优化

Figure 4 Optimization of extraction time

以 3 倍信噪比(S/N)计算得到方法检出限(MLOD)和定量限(MLOQ)如表 2 所示。由表 2 可知,对于固体样品,乳铁蛋白的 MLOD 为 5~6 mg/kg, MLOQ 为 17~20 mg/kg,免疫球蛋白 G 的 MLOD 为 9~10 mg/kg, MLOQ 为 34 mg/kg;对于液体样品,乳铁蛋白的 MLOD 为 3~4 mg/kg, MLOQ 为 10~13 mg/kg,免疫球蛋白 G 的 MLOD 为 2 mg/kg, MLOQ 为 7 mg/kg;说明试验方法适用于对乳制品的定量分析。

2.4 回收率和精密度试验

选取各基质阴性样品,分别添加 3 个浓度水平的乳铁蛋白-免疫球蛋白 G,混匀后,按试验方法进行前处理和色谱检测,每个浓度水平平行测定 5 次,计算回收率和日内精密度;选取中间添加水平,连续测试 5 d,计算日间精密度。由表 2 可知,乳铁蛋白在 40~400 mg/L 加标水平下,平均回收率为 91.0%~107.0%,日内相对标准偏差(RSD)为 2.4%~5.3%;对于中间添加水平,日间精密密度为 2.3%~2.9%;在 20~200 mg/L 加标水平下,平均回收率为

表 1 两种蛋白质的线性范围、线性方程、相关系数、方法检出限及方法定量限

Table 1 Linear regression equations, linear ranges, R^2 and the method detection and quantitation limit of LF and IgG

物质名称	样品基质	线性范围/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	线性方程	相关系数	MLOD/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	MLOQ/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
LF	牛乳基粉	0~1 000	$Y=0.319 4x-1.994 6$	0.999 5	5	17
	牛奶片				6	20
	含乳饮料				3	10
	鲜牛奶				4	13
IgG	牛乳基粉	0~1 000	$Y=0.422 8x-2.611 3$	0.999 7	10	34
	牛奶片				9	34
	含乳饮料				2	7
	鲜牛奶				2	7

93.9%~97.7%, RSD 为 2.4%~4.1%; 对于中间添加水平, 日间精密密度为 1.9%~2.1%。免疫球蛋白 G 在 40~400 mg/L 加标水平下, 平均回收率为 91.2%~104.0%, RSD 为 2.1%~4.7%; 对于中间添加水平, 日间精密密度为 3.3%~3.8%; 在

20~200 mg/L 加标水平下, 平均回收率为 90.2%~104.0%, RSD 为 2.4%~3.3%; 对于中间添加水平, 日间精密密度为 2.8%~2.9%, 表明试验方法具有良好的回收率和精密密度, 能够满足乳铁蛋白及免疫球蛋白 G 的测定要求。

表 2 回收率与精密密度测定结果

Table 2 Recoveries, repeatability and reproducibility for LF and IgG ($n=5$)

物质名称	样品基质	加标水平/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%	日间精密密度/%
LF	牛乳基粉	40, 80, 400	107, 94.5, 91.0	4.1, 2.4, 5.3	2.9
	牛奶片	40, 80, 400	103, 97.1, 94.4	2.6, 2.9, 3.6	2.3
	含乳饮料	20, 40, 200	95.3, 96.4, 93.9	3.1, 2.7, 4.1	1.9
	鲜牛奶	20, 40, 200	97.7, 93.6, 96.1	2.4, 2.6, 3.4	2.1
IgG	牛乳基粉	40, 80, 400	104, 91.2, 96.5	2.1, 3.5, 4.7	3.8
	牛奶片	40, 80, 400	98.4, 96.8, 97.3	3.2, 2.8, 3.4	3.3
	含乳饮料	20, 40, 200	99.6, 97.4, 90.2	1.9, 2.4, 2.9	2.9
	鲜牛奶	20, 40, 200	104, 97.3, 96.9	2.2, 3.1, 3.3	2.8

2.5 方法比较与实际样品检测

2.5.1 乳铁蛋白的检测方法比较 采用试验方法与肝素亲和柱-液相色谱法^[6]分别对乳粉样品中的乳铁蛋白含量进行分析, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, 对于常规样品分析, 试验方法的回收率与 GB 5009.299-2024 的无显著差异, 均能满足日常检验需求。但 GB 5009.299-2024 的前处理时间长, 且肝素亲和柱为一次性耗材, 耗材成本较高; 而试验方法所需前处理时间短、操作简便, 耗试剂少, 且在二维液相分析体系下, 肝素亲和柱作为分析色谱柱使用, 可以稳定完成 50 次进样分析, 提高了前处理效率, 同时降低了测试成本。

2.5.2 免疫球蛋白的检测方法比较 采用试验方法与高效液相色谱法^[19]分别对乳粉样品中的免疫球蛋白 G 含量进行分析, 对于同一样品采用两种方法各平行测定 10 次, 以 t 检验法评价两种方法的差异情况, 结果见表 3。 t 检验结果小于临界值^[21], 说明两种方法测定的样品结果无显著差异。在此基础上, 试验方法所需的人工处理时间较短, 操作更为简便, 有助于大批量样品测定时的效率提升。

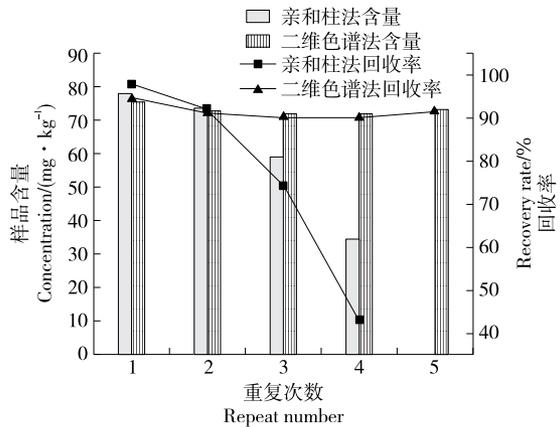


图 5 乳铁蛋白方法间结果对比
Figure 5 Comparison of this methods with other method for determining lactoferrin

3 结论

通过建立乳制品中乳铁蛋白-免疫球蛋白 G 的在线固相萃取-高效液相色谱检测方法, 在保障标准曲线范

表3 免疫球蛋白 G 方法间结果比对

Table3 Comparison of this method with other methods for determining immunoglobulin G

测试次数	试验方法/ ($10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	高效液相色谱法/ ($10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	t值	临界值(自由度为18)
1	321	311	1.72	2.10
2	315	322		
3	308	308		
4	311	311		
5	306	315		
6	324	306		
7	319	313		
8	322	320		
9	314	301		
10	316	302		

围、检出限、定量限以及精密度均能适用于日常样品检验的前提下,试验方法提高了仪器检验自动化水平,极大地节省了乳铁蛋白检测过程中昂贵的耗材成本,完善了现有研究中对于免疫球蛋白 G 分析方法定量准确度低、检出限高等缺陷。同时缩短了人工前处理耗时,一次试验即可完成两种功能性蛋白的测定分析。此外,乳制品中还存在有如 IgM、IgE、IgD 等在内的多种活性蛋白组分,如能对更多的活性蛋白建立二维在线方法进行分析,则可以满足更多种类产品的检测需求,降低分析成本。

参考文献

- [1] KRUZEL M L, ZIMECKI M, ACTOR J K. Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1 438.
- [2] WAKABAYASHI H, YAMAUCHI K, TAKASE M. Lactoferrin research, technology and applications[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(11): 1 241-1 251.
- [3] 温佩佩,肖彬彬,褚楚,等.常见动物乳与人乳的营养成分比较分析[J]. *中国乳业*, 2023(1): 96-102.
- WEN P P, XIAO B B, CHU C, et al. Comparison and analysis of nutritional composition between common animal milk and human milk[J]. *China Dairy*, 2023(1): 96-102.
- [4] DUARTE D C, NICOLAU A, TEIXEIRA J A, et al. The effect of bovine milk Lactoferrin on human breast cancer cell lines[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(1): 66-76.
- [5] 廖菁菁,谢志榕,李雅玫,等.高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中乳铁蛋白[J]. *中国口岸科学技术*, 2022, 4(3): 90-96.
- LIAO J J, XIE Z R, LI Y M, et al. Determination of Lactoferrin in infant formula by high performance liquid chromatography [J]. *China Port Science and Technology*, 2022, 4(3): 90-96.
- [6] 苏昭仑,张颖,贺瑞坤.肝素亲和柱—高效液相色谱法快速测

定乳粉中乳铁蛋白的优化研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(2): 289-294.

SU Z L, ZHANG Y, HE R K. Optimization of rapid determination of lactoferrin in milk powder by heparin affinity column-high performance liquid chromatography[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(2): 289-294.

[7] 陈柔含,古淑青,赵超敏,等.超高效液相色谱—串联质谱法测定乳与乳制品中牛乳铁蛋白[J]. *色谱*, 2020, 38(6): 663-671.

CHEN R H, GU S Q, ZHAO C M, et al. Determination of bovine lactoferrin in milk and dairy products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020, 38(6): 663-671.

[8] 孙娜娜,刘金虎,杨孟迪,等.乳及乳制品中乳铁蛋白的全自动高通量毛细管凝胶电泳检测方法研究[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(9): 52-56.

CUN N N, LIU J H, YANG M D, et al. Detection of lactoferrin in milk and dairy products exploring capillary gel electrophoresis with automatic high throughput [J]. *China Dairy Industry*, 2021, 49(9): 52-56.

[9] 吴春香,刘志楠,赵源,等.酶联免疫吸附法快速检测婴儿配方奶粉中乳铁蛋白含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(4): 803-807.

WU C X, LIU Z N, ZHAO Y, et al. Rapid detection of lactoferrin content in infant formula by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(4): 803-807.

[10] 李莉,李硕,董亚蕾,等.婴幼儿配方食品中乳铁蛋白含量测定方法比较研究[J]. *中国乳品工业*, 2019(8): 44-46, 64.

LI L, LI S, DONG Y L, et al. Comparative study on determination methods for lactoferrin in infant formula[J]. *China Dairy Industry*, 2019(8): 44-46, 64.

[11] 裴晓言,顾名夏,黄鹤,等.牛乳中的免疫球蛋白与健康的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(3): 418-421.

PEI X Y, GU M X, HUANG H, et al. The role of milk immunoglobulin in health[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007, 7(3): 418-421.

[12] GUTZWILLER A. Effect of colostrum intake on diarrhea incidence in new-born calves[J]. *Schweiz Arch Tierherkd*, 2022, 144(2): 59-64.

[13] SUGISAWA H, ITOU T, SAKAI T. Promoting effect of colostrum on the phagocytic activity of bovine polymorphonuclear leukocytes in vitro[J]. *Biology of the Neonate*, 2001, 79(2): 140-144.

[14] 秦兰霞.牛初乳粉中免疫球蛋白 IgG 增强免疫力功能的研究[J]. *现代食品*, 2018(17): 111-115.

QIN L X. Study on immunoglobulin IgG in bovine colostrum powder enhanced immune function[J]. *Modern Food*, 2018(17): 111-115.

(下转第 98 页)

- containing a composite layer of pu-pcm and dedicated to refrigerated vehicle[J]. *Applied Thermal Engineering*, 2017, 116: 382-391.
- [18] PRINCIPI P, FIORETTI R, COPERTARO B. Energy saving opportunities in the refrigerated transport sector through phase change materials (PCMS) application[J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2017, 923(1): 012043.
- [19] MICHELE C, CLAUDIO Z, GIULIA R, et al. Latent thermal energy storage for refrigerated trucks[J]. *International Journal of Refrigeration*, 2022, 136: 124-133.
- [20] 刘广海, 李庆庭, 谢如鹤, 等. 基于辐射制冷技术的冷链保温箱隔热性能测试与能耗分析[J]. *农业工程学报*, 2022, 38(11): 318-325.
- LIU G H, LI Q T, XIE R H, et al. Thermal insulation performance test and energy consumption analysis of cold chain incubator based on radiation refrigeration technology[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2022, 38(11): 318-325.
- [21] TONG S, NIE B, LI Z, et al. A phase change material (PCM) based passively cooled container for integrated road-rail cold chain transportation: an experimental study[J]. *Applied Thermal Engineering*, 2021, 195: 1-11.
- [22] 谢如鹤, 唐海洋, 陶文博, 等. 基于空载温度场模拟与试验的冷藏车冷板布置方式优选[J]. *农业工程学报*, 2017, 33(24): 290-298.
- XIE R H, TANG H Y, TAO W B, et al. Optimization of cold plate layout of refrigerated truck based on no-load temperature field simulation and test[J]. *Journal of Agricultural Engineering*, 2017, 33(24): 290-298.
- [23] TAHER M, MAHDAOUI M, KOUSKSOU T, et al. Numerical study of the aero-thermal performance for different scenarios of a refrigerated truck using urans[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 320: 1-10.
- [24] 杨国梁, 胥义, 辛岩, 等. 相变材料蓄冷式双温区城市宅配保温箱的研制及测试[J]. *包装工程*, 2018, 39(23): 43-49.
- YANG G L, XU Y, XIN Y, et al. Development and test of thermal insulation box for urban house with cold storage type of phase change material[J]. *Packaging Engineering*, 2018, 39(23): 43-49.
- [25] 李锦, 谢如鹤. 冷藏车隔热厢体多目标设计优化[J]. *农业机械学报*, 2015, 46(1): 224-230.
- LI J, XIE R H. Multi-objective design optimization of insulated car body of refrigerated truck[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015, 46(1): 224-230.
- [26] 王晓理. 纤维空气分布系统气流组织特性及设计方法[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2015: 1-126.
- WANG X L. Air distribution characteristics and design method of fiber air distribution system[D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2015: 1-126.
-
- (上接第 65 页)
- [15] 国家认证认可监督管理委员会. 出口牛乳制品中牛免疫球蛋白 G 的测定 酶联免疫吸附法: SN/T 3132—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 1-3.
- China National Accreditation Service for Conformity Assessment and Supervision Management Committee (CNCA). Detection of bovine immunoglobulin G in milk products of export-enzyme-linked immunosorbent assay method: SN/T 3132—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012: 1-3.
- [16] 中国乳制品工业协会. 牛初乳粉: RHB 602—2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005: 4-5.
- China Dairy Industry Association. Bovine colostrum powder: RHB 602—2005[S]. Beijing: Standards Press of China, 2005: 4-5.
- [17] 中华人民共和国农业部. 牛初乳及其制品中免疫球蛋白 IgG 的测定 分光光度法: NY/T 2070—2011[S]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 1-2.
- Ministry of Agriculture of the PRC. Determination of immunoglobulin G in bovine colostrum and its products-spectrophotometry: NY/T 2070—2011[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 1-2.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 保健食品中免疫球蛋白 IgG 的测定: GB/T 5009.194—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 1-2.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the PRC, Standardization Administration of China. Determination of immunoglobulin in health foods: GB/T 5009.194—2003[S]. Beijing: Standards Press of China, 2003: 1-2.
- [19] 上海市食品学会. 乳及乳制品中免疫球蛋白 G 的测定(高效液相色谱法): T/SSFS 0002—2021[S]. 上海: 上海市食品学会, 2021: 1-5.
- Shanghai Society of Food Science. Determination of IgG in milk and dairy products-liquid chromatography method: T/SSFS 0002—2021[S]. Shanghai: Shanghai Society of Food Science, 2021: 1-5.
- [20] 艾正文, 徐致远, 叶景锦. 动态高压处理对牛乳中生物活性物质的影响[J]. *食品与机械*, 2023, 39(7): 210-222.
- AI Z W, XU Z Y, YE J J. Effects of dynamic highpressure processing on bioactive components of milk[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(7): 210-222.
- [21] 全国统计方法应用标准化技术委员会. 统计分布数值表 t 分布: GB/T 4086.3—1983[S]. 北京: 中国标准出版社, 1983: 3.
- National Technical Committee on Standardization of Statistical Method Application. Statistical distribution values: t distribution: GB/T 4086.3—1983[S]. Beijing: Standards Press of China, 1983: 3.