

高效液相色谱法检测乳铁蛋白的方法优化

孙建娜, 祝乾, 刘秀, 余恒琳, 徐宁, 朱毛毛

南京市产品质量监督检验院 (南京市质量发展与先进技术应用研究院), 江苏南京

摘要: 本文旨在探讨高效液相色谱法在乳铁蛋白检测中的应用及其方法优化。通过对流速、温度梯度编程、离子强度、柱后衍生技术、色谱柱选择以及流动相条件等多方面的调整与优化, 本文系统研究了这些因素对乳铁蛋白检测效率、分离度、稳定性及信号响应的影响。实验结果显示, 通过合理的优化策略, 可以显著提高乳铁蛋白的检测精度与灵敏度, 为乳铁蛋白的定量分析提供了一种更为准确、高效的方法。此外, 本文还详细讨论了数据处理与分析技术在乳铁蛋白检测中的应用。

关键词: 高效液相色谱法; 乳铁蛋白; 方法优化; 数据处理与分析

Optimization of Lactoferrin Detection Method by High Performance Liquid Chromatography

Jianna Sun, Qian Zhu, Xiu Liu, Henglin Yu, Ning Xu, Maomao Zhu

Nanjing Institute of Product Quality Inspection (Nanjing Institute of Quality Development and Advanced Technology Application), Nanjing, Jiangsu

Abstract: This study aims to explore the application of high performance liquid chromatography (HPLC) in lactoferrin detection and the optimization of its methodology. Through adjustments and optimizations in flow rate, temperature gradient programming, ionic strength, post-column derivatization techniques, column selection, and mobile phase conditions, this paper systematically investigates the impact of these factors on the detection efficiency, resolution, stability, and signal response of lactoferrin. Experimental results demonstrate that rational optimization strategies can significantly enhance the accuracy and sensitivity of lactoferrin detection, providing a more precise and efficient method for the quantitative analysis of lactoferrin. Additionally, this paper elaborates on the application of data processing and analysis techniques in lactoferrin detection.

Keywords: High performance liquid chromatography; Lactoferrin; Method optimization; Data processing and analysis

随着乳制品行业的快速发展，乳铁蛋白作为重要的功能性成分，其准确、高效的检测方法对于保障产品质量及消费者健康具有重要意义。然而，传统的乳铁蛋白检测方法存在诸多局限性，如检测速度慢、分离度低、稳定性差等问题，难以满足现代乳制品行业对高效、精准检测的需求。因此，本文聚焦于高效液相色谱法在乳铁蛋白检测中的应用，旨在通过一系列优化策略，克服传统方法的不足，为乳铁蛋白的定量分析提供新的思路和方法。

1 高效液相色谱法原理及乳铁蛋白检测现状

1.1 高效液相色谱法的基本原理

高效液相色谱法作为一种强大的分离技术，在生物大分子如乳铁蛋白的检测中展现出卓越的能力。其基本原理在于利用高压泵将流动相以较高的流速通过填充有固定相的色谱柱，从而实现样品组分的快速分离。固定相的选择至关重要，它通常是由微粒状的硅胶或其他聚合物构成，表面经过化学修饰以提供不同的极性和亲疏水性，进而影响待测物质的吸附和解吸过程。在分离过程中，样品分子与固定相之间的相互作用决定了其在色谱柱中的保留时间和分离度。这些相互作用包括范德华力、氢键、离子交换和疏水作用等。通过调整流动相的组成、pH值、离子强度以及温度等参数，可以精细调控这些相互作用，从而实现对目标分子如乳铁蛋白的高效分离和纯化[1]。此外，高效液相色谱法还具备高灵敏度、高分辨率和高通量等优点，使其成为生物大分子分析和检测领域不可或缺的工具。

1.2 当前乳铁蛋白检测方法的局限性

尽管高效液相色谱法在乳铁蛋白检测中展现出显著优势，但现有方法仍存在一些局限性。首先，样品的预处理步骤繁琐且耗时，这限制了检测效率，尤其是在需要快速检测大量样品的情况下。其次，尽管高效液相色谱法具备高分辨率，但对于某些结构相似或极性相近的乳铁蛋白变体，其分离效果可能不够理想，导致检测结果的准确性受到影响。此外，检测过程中使用的化学试剂可能对环境

造成污染，且部分试剂对人体有害，增加了操作风险。因此，针对这些局限性，探索和优化乳铁蛋白的检测方法显得尤为重要。

2 方法优化策略

2.1 流速调整对乳铁蛋白检测速度与精度的平衡

在高效液相色谱法中，流速是影响检测速度与精度的重要因素。通过适当调整流速，可以在保证检测精度的前提下，显著提高乳铁蛋白的检测速度。一方面，较高的流速可以缩短样品在色谱柱中的停留时间，从而加快检测速度。然而，过高的流速可能导致样品与色谱柱固定相之间的相互作用不充分，进而影响分离效果和检测精度。另一方面，较低的流速虽然有助于改善分离度和提高检测精度，但会延长检测时间，降低检测效率。因此，在实际操作中，需要根据样品特性和检测需求，合理调整流速，以实现检测速度与精度的最佳平衡。

2.2 温度梯度编程在提高乳铁蛋白分离度的应用

在探索乳铁蛋白检测新路径的过程中，温度梯度编程作为一项关键的技术革新，展现出了其在提高乳铁蛋白分离度方面的显著优势。传统的高效液相色谱分析中，固定温度下的分离往往难以满足对复杂样品中微量乳铁蛋白的精确检测需求。然而，通过引入温度梯度编程，即在分析过程中动态调整色谱柱的温度，可以显著改善乳铁蛋白的分离效果，从而提升检测的灵敏度和特异性。

具体而言，温度梯度编程利用了蛋白质在不同温度下溶解度的变化特性，以及温度对流动相粘度的影响，进而影响蛋白质在色谱柱中的迁移行为。研究显示，在特定的温度范围内，随着温度的升高，乳铁蛋白的保留时间会缩短，而分离度则呈现先增加后减少的趋势。为了找到最佳的温度梯度条件，研究人员进行了大量的实验摸索。他们发现，当起始温度设定较低，然后逐步升高至某一特定温度时，乳铁蛋白的分离效果最为理想。这一过程中，乳铁蛋白不仅能够与其他杂质成分有效分离，

而且其峰形也更加对称，有利于后续的定量分析[2]。此外，温度梯度编程的应用还显著缩短了分析时间，提高了工作效率。因此，温度梯度编程在提高乳铁蛋白分离度的应用中具有广阔的前景，值得进一步研究和推广。

2.3 离子强度调节对乳铁蛋白稳定性的影响

离子强度是影响蛋白质稳定性的关键因素之一。在高效液相色谱法中，通过调节流动相中的盐浓度，即离子强度，可以显著影响乳铁蛋白在色谱柱上的保留行为和稳定性。实验结果显示，随着离子强度的增加，乳铁蛋白的保留时间会有所延长，这主要是因为离子强度的增加导致蛋白质与固定相之间的相互作用增强。同时，适当的离子强度调节还有助于提高乳铁蛋白的分离度和峰形对称性，减少拖尾现象，从而提高检测的准确性和灵敏度。然而，过高的离子强度也可能导致蛋白质变性或沉淀，因此需要仔细摸索和优化离子强度条件，以在保持乳铁蛋白稳定性的同时，实现最佳的分离效果。

2.4 利用柱后衍生技术增强乳铁蛋白信号响应

柱后衍生技术是一种通过在色谱柱出口处引入化学反应，将目标分析物转化为更易检测的形式，从而提高检测灵敏度和选择性的方法。在乳铁蛋白的高效液相色谱检测中，柱后衍生技术的应用尤为重要。通过选择合适的衍生化试剂和反应条件，乳铁蛋白可以在柱后被标记上高灵敏度的荧光基团或发色团，使得原本微弱的信号得到显著增强。这一技术不仅提高了乳铁蛋白的检测下限，还增强了色谱峰的分辨力，使得复杂样品中的乳铁蛋白能够更为准确地被识别和定量。此外，柱后衍生技术还提供了多种衍生化策略，可以根据不同的检测需求和样品特性进行灵活调整，进一步拓宽了高效液相色谱法在乳铁蛋白检测中的应用范围。

2.5 色谱柱选择与优化

2.5.1 不同类型色谱柱对乳铁蛋白分离效果的影响

在探索乳铁蛋白的高效液相色谱检测方法中，

色谱柱的选择被视为关键步骤之一，其性能直接影响到乳铁蛋白的分离效果和检测精度。不同类型的色谱柱，如反相色谱柱、离子交换色谱柱以及亲水作用色谱柱等，因其固定相性质的不同，在乳铁蛋白的分离过程中展现出各异的表现。反相色谱柱通常使用非极性的固定相，如C18或C8键合硅胶，适用于分离中等至极性化合物。在乳铁蛋白的检测中，反相色谱柱能够提供较好的保留和分离效果，尤其当乳铁蛋白的疏水性适中时，反相色谱柱表现出较高的分离度和峰形对称性[3]。然而，对于某些特定的乳铁蛋白变体或与其他蛋白质共存时，反相色谱柱可能会遇到分离不完全或峰重叠的问题。

离子交换色谱柱则依据蛋白质的电荷性质进行分离，适用于分离带有不同电荷的蛋白质。乳铁蛋白作为一种带正电荷的蛋白质，在离子交换色谱柱上可根据其电荷密度和等电点的差异实现有效分离。离子交换色谱柱特别适用于复杂样品中乳铁蛋白的纯化，能够有效去除杂质，提高检测的准确性。

亲水作用色谱柱则适用于分离极性化合物，尤其对于含有大量亲水性基团的蛋白质表现出色。乳铁蛋白虽然属于中等极性蛋白质，但在特定条件下，亲水作用色谱柱也能提供满意的分离效果。这类色谱柱在分离含有糖类或其他亲水性修饰的乳铁蛋白变体时尤为有效。因此，在选择色谱柱时，需综合考虑乳铁蛋白的物理化学性质、样品复杂性以及检测目的，通过实验筛选出最适合的色谱柱类型，以达到最佳的分离效果和检测精度。

2.5.2 色谱柱温度控制对分离效率的作用

在探讨高效液相色谱法中色谱柱温度控制对分离效率的作用时，我们发现这是一个至关重要的参数，其微妙变化可显著影响乳铁蛋白的分离效果。温度不仅影响流动相的粘度，还直接影响蛋白质的构象稳定性和色谱柱填料的性能。高温可能导致蛋白质变性，增加分子间的相互作用，从而影响分离效率；而低温则可能降低流动相的粘度，提高溶质的扩散系数，有利于分离。因此，选择适当的色谱柱温度对于优化乳铁蛋白的分离至关重要[4]。通

过实验，我们可以确定一个最佳温度范围，使得乳铁蛋白的分离效率达到最高，同时保证蛋白质的构象稳定性不受影响。此外，温度控制还可以减少色谱柱的柱效损失，延长色谱柱的使用寿命，提高检测的稳定性和重复性。因此，在高效液相色谱法检测乳铁蛋白的过程中，应高度重视色谱柱温度的控制，以实现最佳的分离效果和检测精度。

2.6 流动相条件的优化

2.6.1 pH值对乳铁蛋白保留时间的影响

在探讨高效液相色谱法中pH值对乳铁蛋白保留时间的影响时，我们发现这一参数是决定乳铁蛋白检测效率与准确性的关键因素之一。乳铁蛋白作为一种在哺乳动物乳汁中广泛存在的铁结合糖蛋白，其结构与功能特性使其在不同pH环境下表现出显著差异。研究表明，当流动相的pH值从酸性向碱性转变时，乳铁蛋白的保留时间呈现出非线性的变化趋势。

具体来说，在较低的pH值条件下，乳铁蛋白的电荷状态发生变化，可能导致其与色谱柱填料之间的相互作用增强，从而延长保留时间。相反，在较高的pH值条件下，乳铁蛋白的电荷状态可能减少，与填料之间的相互作用减弱，使得保留时间缩短。因此，通过精确调控流动相的pH值，我们可以有效调整乳铁蛋白的保留时间，进而优化分离效率和检测准确性[5]。此外，值得注意的是，pH值的变化还可能影响乳铁蛋白的构象稳定性，因此在调整pH值时，需综合考虑其对保留时间和蛋白质稳定性的影响，以确保检测结果的可靠性。

2.6.2 添加剂对乳铁蛋白检测灵敏度的提升

在高效液相色谱法中，添加剂的引入是一种有效的策略，可以显著提升乳铁蛋白的检测灵敏度。常见的添加剂包括有机溶剂、离子对试剂和表面活性剂等。这些添加剂通过改善流动相的性质，影响乳铁蛋白在色谱柱上的分离行为和检测信号。

具体而言，有机溶剂如甲醇或乙腈的适量添加，可以改变流动相的极性和粘度，有助于乳铁蛋白分子更好地溶解和分散，从而提高其在色谱柱上

的分离度和检测灵敏度。离子对试剂则能与乳铁蛋白分子形成离子对，改变其电荷状态，增强与检测器的响应，进一步提升检测信号的强度[6]。而表面活性剂能够通过包裹乳铁蛋白分子，减少其与色谱柱填料的非特异性吸附，优化峰形，提高检测准确性。

然而，添加剂的使用也需谨慎。过量的添加剂可能导致流动相性质的剧烈变化，影响乳铁蛋白的分离效果和稳定性。因此，在添加剂的选择和使用浓度上，需要进行细致的优化实验，以找到最佳的添加剂种类和浓度，确保在提升检测灵敏度的同时，不牺牲分离效率和检测准确性。

3 数据处理与分析技术

3.1 数据采集与预处理

在高效液相色谱法检测乳铁蛋白的过程中，数据采集与预处理是至关重要的一步。首先，通过色谱工作站或数据采集软件，实时记录色谱图的峰形、保留时间、峰面积等关键信息。这些信息直接反映了乳铁蛋白在色谱柱上的分离效果和浓度。随后，对采集到的原始数据进行预处理，包括滤波去噪、基线校正和平滑处理，以提高数据的准确性和可靠性。滤波去噪可以有效消除仪器噪声和背景干扰，基线校正则能确保数据的一致性，而平滑处理则能进一步减少数据波动，提高数据的可读性。经过预处理的数据，将为后续的定量分析和方法验证提供坚实的基础。

3.2 定量分析方法的建立与验证

在定量分析方法的建立与验证阶段，我们深入探讨了如何通过精确的数据处理和分析技术，确保乳铁蛋白检测结果的准确性和可靠性。首先，数据采集是整个分析流程的基础，我们采用高灵敏度的检测器，结合优化后的流动相条件，以确保每一组数据的完整性和准确性。接下来，我们利用统计学原理和软件工具，对预处理后的数据进行定量分析。通过建立标准曲线，我们可以将乳铁蛋白的峰面积与其浓度进行线性回归分析，从而得出乳铁蛋白的准确浓度。此外，我们还采用内标法或外标法

进行校正,以消除仪器误差和实验条件变化对结果的影响。在方法验证阶段,我们对定量分析方法的选择性、线性范围、灵敏度、精密度和准确度进行了全面评估。通过与实际样品进行比对分析,我们验证了该方法的适用性和可靠性。

4 结语

综上所述,通过优化高效液相色谱法的各项参数,我们成功提升了乳铁蛋白的检测效率与准确性。在方法优化过程中,我们不仅考虑了流速、温度梯度编程、离子强度调节、柱后衍生技术等多方面的因素,还特别关注了流动相条件的优化,这对提高乳铁蛋白的分离度和检测灵敏度至关重要。在数据处理与分析阶段,我们采用了先进的数据采集与预处理技术,结合精确的定量分析方法,确保了检测结果的可靠性和准确性。未来,我们将继续探索更高效、更准确的乳铁蛋白检测方法。

参考文献

- [1] 叶颖慧, 徐明轩, 梁敏慧, 等. 乳铁蛋白检测方法研究进展[J]. 质量安全与检验检测, 2025(02): 25-27.
- [2] 郑仕剑, 徐腾洋, 焦玉芬, 等. 高效液相色谱法测定婴幼儿乳粉中乳铁蛋白含量[J]. 现代食品, 2021(19): 45-47.
- [3] 张宁, 叶巧燕, 郑百芹, 等. 高效液相色谱法检测奶及奶制品中未变性乳铁蛋白[J]. 食品安全质量检测学报, 2024(15): 126-128.
- [4] 赵飒, 张晓梅, 鲍蕾, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛乳基婴幼儿配方奶粉中的乳铁蛋白[J]. 食品安全质量检测学报, 2021(24): 72-74.
- [5] 陈钦, 周朗君, 陈梓敬, 等. 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. 食品与机械, 2024(09): 66-68.
- [6] 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(06): 12-14.

