

肝素亲和柱在乳铁蛋白检测中的应用优化

楼飞¹, 杨秀敏², 章寅^{3,*}

(1. 上海市农业科学院庄行综合试验站, 上海 201415; 2. 沈阳市动物疫病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110034; 3. 上海德诺产品检测有限公司, 上海 200436)

摘要: 乳铁蛋白是一种极具营养价值的活性糖蛋白, 广泛应用到婴幼儿乳粉中, 目前国内外未建立乳铁蛋白测定相关的标准。将肝素亲和柱(HiTrap™ Heparin HP 柱)或相当者应用到乳铁蛋白检测前处理的净化过程中, 建立一种高效、便捷的食品中乳铁蛋白测定的分析方法。试样中的乳铁蛋白经磷酸氢二钠溶液(0.20 mol/L, pH=8.00±0.5)提取, 提取液经肝素亲和柱净化后, 用磷酸氢二钠溶液淋洗, 磷酸氢二钠-氯化钠溶液洗脱, 并定容至 3.0 mL。采用反相高效液相色谱柱分离, 以紫外或者二极管阵列检测器于 280 nm 处检测, 外标法定量。该方法系首次提出将肝素亲和柱应用到乳铁蛋白检测前处理过程中。该检测方法适合检测机构或乳品企业日常样品中乳铁蛋白的检测。

关键词: 乳铁蛋白; 肝素亲和柱; 磷酸盐缓冲液; 高效液相色谱法; C4

Application of Heparin Affinity Column in the Detection of Lactoferrin

LOU Fei¹, YANG Xiu-min², ZHANG Yin^{3,*}

(1. Shanghai Academy of Agricultural Sciences Zhuanghang Comprehensive Experiment Station, Shanghai 201415, China; 2. Shenyang Animal Disease Prevention and Control Center, Shenyang 110034, Liaoning, China; 3. Denuo Product Testing Service CO., Ltd., Shanghai 200436, China)

Abstract: Lactoferrin is a kind of active glycoprotein with great nutritional value, which is widely used in infant milk powder. At present, there is no relevant standard for the determination of lactoferrin at home and abroad. Heparin affinity column (HiTrap™ Heparin HP column) or equivalent were applied to the purification process of lactoferrin before pretreatment. An efficient and convenient method for the determination of lactoferrin in foods was established. The lactoferrin in the sample was extracted by Na_2HPO_4 buffer solution (0.20 mol/L, pH=8.00±0.5). The extract was purified by heparin affinity column, washed with Na_2HPO_4 buffer solution, and Na_2HPO_4 -NaCl buffer solution was eluted and the final volume to 3.0 mL. High performance liquid chromatography (HPLC) was used with ultraviolet absorption detector (UV) or diode array detector (DAD) at 280 nm, and the external standard method was quantified. It was the first time to put forward the idea that heparin affinity column was applied to the purification of lactoferrin before detection. The improved method was suitable for detection of lactoferrin in detection mechanism or dairy enterprises.

作者简介: 楼飞(1984—), 男(汉), 工程师, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全管理、检测。

* 通信作者: 章寅(1986—), 女, 工程师, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全管理、检测。

[8] 王静. 基于傅立叶变换红外光谱和化学计量技术的致病微生物鉴别系统研究[D]. 青岛: 山东大学, 2012: 13-26

[9] 陈丽萍, 徐茂琴, 何红萍, 等. 应用 PEN3 型电子鼻传感器快速检测食源性致病菌[J]. 食品科学, 2014(8): 187-192

[10] 余伟, 彭宽宽, 陈伟, 等. 基于高光谱技术的培养基上细菌菌落分类方法研究[J]. 分析化学, 2016, 44(8): 1221-1226

[11] 王武, 王建明, 李颖, 等. 近红外特征波长筛选在勾兑梨汁中原汁含量的快速检测中的应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(10): 3058-3062

[12] WORLEY B, HALOUSKA S, POWERS R. Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots[J]. Analytical Biochemistry, 2013, 433(2): 102-104

[13] 吴梦, 李希, 马永昆, 等. 主成分分析超高压对桑椹饮料香气成分的影响[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(19): 116-123

[14] 黎远鹏, 黄富荣, 董佳, 等. 荧光光谱成像技术结合主成分分析与 Fisher 判别快速鉴别肉苁蓉[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(3): 689-694

收稿日期: 2018-07-26

Key words: lactoferrin; heparin affinity column; phosphate buffer; high performance liquid chromatography (HPLC); C4

引文格式:

楼飞,杨秀敏,章寅. 肝素亲和柱在乳铁蛋白检测中的应用优化[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(6): 161-165

LOU Fei, YANG Xiumin, ZHANG Yin. Application of Heparin Affinity Column in the Detection of Lactoferrin [J]. Food Research and Development, 2019, 40(6): 161-165

乳铁蛋白是近年来国内外开发研究速度较快的一种营养添加剂,由于其具有:广谱抗菌,抗病毒感染作用;能调节体内铁平衡;调解骨髓细胞的生成;抑制人体肿瘤细胞的作用;能同多种抗生素及抗真菌制剂协同作用,有效地治疗疾病等功效,使其产品在国内外食品加工中的应用范围日益广泛^[1-2]。乳铁蛋白是一种极具营养价值的活性糖蛋白,对婴幼儿或者成人的健康具有重要的意义^[3-4]。GB14880-2012 我国《食品营养强化剂使用标准》中规定婴幼儿配方食品中乳铁蛋白的最大允许使用量为 1.0 g/kg,而目前国内外未建立乳铁蛋白测定相关的国家标准。文献中报道的测定乳铁蛋白含量的方法大致可以归为以下几类:酶联免疫吸附法、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、毛细管电泳法、高效液相色谱法和高效液相串联质谱法^[5-7]。

其中,酶联免疫吸附法是将抗原、抗体特异性反应和酶的高效催化作用有机结合起来的一种新颖、快速的免疫学分析技术,具有灵敏度高、检测限低、样品无需纯化等特点,因此该法应用范围最广、常用于包括初乳和乳粉等一系列产品中的乳铁蛋白质量浓度的测定,但该法所用试剂盒昂贵,不适于长期大量检测乳铁蛋白。SDS-PAGE 法具有测定准确快速、操作简便等特点,适用于初步分离效果的监控,但对纯度较低的乳铁蛋白检测时,由于乳铁蛋白与其他杂蛋白分子量相近,很难达到分离,故仅适用于高纯度的样品测定。毛细管电泳法由于进样量少,因而制备能力差,而且由于毛细管直径比较小,造成了灵敏度较低,重现性差等一系列缺点。

高效液相色谱法拥有分离效率高,选择性好,检测灵敏度高,操作自动化等优点,是目前食品检测领域应用最广泛的方法之一。乳铁蛋白的等电点为 8.2 左右,是一种分子量为 80 kDa,具有大约 700 个氨基酸残基序列的单体糖蛋白,并连接 1~2 个配糖体(配糖体成分约占 7%)^[8-10]。乳铁蛋白一共有两个铁离子结合位,每个结合位可以与一个铁离子结合。现已有多篇文献研究报道应用高效液相色谱检测乳制品中

的乳铁蛋白含量,前处理方法包括:(1)样品采用脱脂,酸法去除酪蛋白,硫酸铵沉淀富集,纤维素滤膜过滤净化等方法进行预处理^[11-12];(2)通过额外加入的二价铁离子使乳铁蛋白的构型更利于沉淀,然后用体积分数 60%乙醇溶液沉淀蛋白除去糖分,再用醋酸盐缓冲液提取乳铁蛋白并分离掉酪蛋白进行预处理^[13-14];(3)样品采用 0.5 mol/L 氯化钠溶液溶解,稀释至适当浓度作为预处理等方法^[15]。

肝素是一种含硫酸酯的酸性多糖,有文献报道乳铁蛋白可与这类多负电荷分子糖胺多糖通过亲和层析结合^[16-18]。本标准中采用 HiTrap™ Heparin HP(1 mL)肝素亲和柱作为目标化合物纯化和浓缩的前处理步骤^[19-20],由于是首次将该亲和柱应用到乳铁蛋白的检测中,故对应用条件进行了摸索和优化,包括:肝素亲和柱的承载量、淋洗液和洗脱液的浓度、pH 值等参数的优化等,建立一种适合乳铁蛋白检测的前处理净化方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

乳铁蛋白标准物质(批号:SP113101):Tatua 公司提供;乙腈为(色谱纯):美国默克公司;无水乙醇、氯化钠、磷酸、磷酸氢二钠、三氟乙酸(均为分析级):国药集团化学试剂有限公司产品;超纯水:美国赛默飞世尔科技有限公司;高效液相色谱仪:美国安捷伦科技有限公司;HiTrap™ Heparin HP(1 mL)肝素亲和柱:美国通用电气医疗集团;Jouan Ceterifuge MR23i 离心机:美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 肝素亲和柱的应用比较

本方法中采用 HiTrap™ Heparin HP(1 mL)肝素亲和柱作为目标化合物纯化和浓缩的前处理步骤。通过经过和未经过肝素亲和柱纯化的样品色谱图,分析其对乳铁蛋白检测应用的可行性。

1.2.2 肝素亲和柱承载量的测定

该款肝素亲和柱对乳铁蛋白纯化和浓缩的前处理步骤未有报道,亲和柱的承载量对方法的准确度方

面有很大的影响,故在本方法中进行了承载量的试验。采用 40 μg~10 000 μg 不同的上柱量测定回收率的方式,选定承载量范围值。

1.2.3 磷酸盐浓度的优化

前处理过程中需要分离纯化乳铁蛋白,故首先要求将乳铁蛋白从基质中以溶解的状态释放出来,并保持原先的天然状态,不丢失生物活性。故在本方法中进行磷酸盐浓度的优化,通过奶粉本底和加标回收率的测定,在磷酸盐 pH=7.0 的条件下,依次选择浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mol/L 进行比较。

1.2.4 磷酸盐 pH 值的优化

乳铁蛋白是一种分子量为 80 kDa,具有大约 700 个氨基酸残基序列的单体糖蛋白,并连接 1 个~2 个配糖体。对于这一类大分子量的蛋白质,pH 值对其的结构有一定的影响。故在本方法中进行磷酸盐 pH 值的优化,通过奶粉本底和加标回收率的测定,在磷酸盐浓度为 0.2 mol/L 的条件下,依次选择 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 进行比较。

1.2.5 洗脱液盐浓度的优化

洗脱步骤属于肝素亲和柱使用过程中比较关键的步骤,在此步骤中乳铁蛋白目标化合物将从亲和柱中被洗脱下来,故洗脱液的浓度对整个试验比较关键。选定 Na₂HPO₄ 的浓度为 0.05 mol/L,pH=7.0,设定 4 个不同浓度的 NaCl 浓度即 0.25、0.50、1.0、2.0 mol/L,通过加标回收测定,选定最佳的 NaCl 浓度。

1.2.6 洗脱液 pH 值的优化

同样原理,选定 0.05 mol/L 的 Na₂HPO₄,1.0 mol/L 浓度的 NaCl,设定 5 个不同的 pH 值即 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,通过加标回收测定,选定最佳的 pH 值。

1.2.7 肝素亲和柱洗脱体积的测定

本方法中采用 1 mL 规格的 HiTrap™ Heparin HP 亲和柱,乳铁蛋白的上柱量控制在 100 μg~10 000 μg,试验设计当乳铁蛋白的上柱量为最大值即 10 000 μg 时,分别收集第 1 mL,第 2 mL,第 3 mL,第 4 mL,第 5 mL,第 6 mL~8 mL 的洗脱液,上机测定。

1.2.8 自制肝素亲和柱性能的比较

目前市场上使用率最高的肝素亲和柱是由美国通用电气医疗集团生产的 HiTrap™ Heparin HP 亲和柱,为了验证乳铁蛋白检测是否只能依靠该款亲和柱,本试验采用偶联有肝素分子的琼脂糖作为填料自制了一批肝素亲和柱。将自制的肝素亲和柱与 Hi-Trap™ Heparin HP 肝素亲和柱在相同的试验条件下进行回收率的测定。

1.3 液相色谱条件

色谱柱规格:C4,5 μm,300A°(孔径),250 mm×

4.6 mm(内径);检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样体积:50 μL;流速:1.0 mL/min;流动相:0.1 %三氟乙酸溶液和乙腈,梯度洗脱参数见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序表

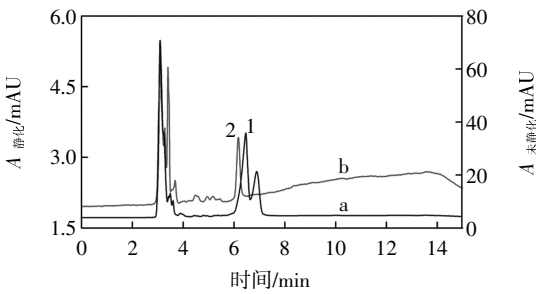
Table 1 Optimization of gradient elution

时间/min	乙腈/%	0.1 %三氟乙酸溶液/%
0	30	70
5	55	45
10	60	40
12	30	70
16	30	70

2 结果与分析

2.1 肝素亲和柱的应用比较

图 1 为经过和未经过肝素亲和柱纯化的样品液相色谱比较图。



a.未经过净化的婴幼儿奶粉;b.经过净化的样品;色谱峰 1 代表乳铁蛋白和杂质,保留时间为 6.1 min;色谱峰 2 代表乳铁蛋白,保留时间为 6.1 min。

图 1 肝素亲和柱纯化样品比较色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of lactoferrin with heparin affinity column cleanup and without

从色谱图 1 中可以看出未纯化的样品成分复杂,难以满足检测需要,经过肝素亲和柱纯化的样品,杂质少,峰形好,符合检测的要求。

2.2 肝素亲和柱承载量的测定

1 mL HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱对乳铁蛋白承载量的测定结果见表 2。

表 2 1 mL HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱对乳铁蛋白承载量的测定(n=3)

Table 2 Determination of the bearing capacity of lactoferrin by 1 mL HiTrap™ Heparin HP(n=3)

上柱量/μg	回收率/%
40	50.8
80	77.5
100	93.8
160	94.7
320	97.0
1 000	97.1
5 000	103
10 000	105

从表 2 可知,当乳铁蛋白的上柱量达到 100 μg 时,1 mL 规格的 HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱的回收率就达到 90 % 以上,乳铁蛋白的上柱量在 100 μg ~10 000 μg 时,回收率在 93.8 %~105 % 之间,符合试验要求。故本试验中将样品中乳铁蛋白的上柱量控制 100 μg ~10 000 μg 之间,如果试验中遇到高浓度乳铁蛋白含量的样品时,需将样品稀释至合适的浓度后再使用亲和柱;反之则可适当增加称样量和上柱体积。

2.3 磷酸盐浓度的优化

磷酸盐浓度的优化结果见表 3。

表 3 磷酸缓冲液浓度优化表(n=3)

Table 3 Optimization of phosphate buffer concentration(n=3)

添加水平/ (mg/100 g)	磷酸盐 pH 值	磷酸盐浓度/ (mol/L)	回收率/%
30	7.0	0.05	80.2
30	7.0	0.1	89.1
30	7.0	0.2	90.5
30	7.0	0.4	0
30	7.0	0.8	0

从表 3 数据得知,随着磷酸缓冲液浓度的增加,回收率先增加后降低至零,当磷酸缓冲液浓度达到 0.4 mol/L 时,回收率为 0,故选定乳铁蛋白检测时磷酸缓冲液浓度为 0.2 mol/L,同时发现在该浓度下目标峰附近的杂质最少,符合试验要求。

2.4 磷酸盐 pH 值的优化

磷酸盐 pH 值的优化结果见表 4。

表 4 磷酸缓冲液 pH 优化表(n=3)

Table 4 Optimization of phosphate buffer pH(n=3)

添加水平/ (mg/100 g)	磷酸盐浓度/ (mol/L)	磷酸盐 pH 值	回收率/%
30	0.2	5.0	72.3
30	0.2	6.0	85.3
30	0.2	7.0	90.5
30	0.2	8.0	91.3
30	0.2	9.0	87.6

从表 4 可知,随着磷酸缓冲液 pH 值的增加,回收率先增加后降低,整体数值在 72.3 %~91.3 % 之间,当磷酸缓冲液 pH 值为 8.0 时回收率为最大,同时此 pH 值下目标峰附近的杂质最少,符合试验要求。

2.5 洗脱液盐浓度的优化

洗脱液盐浓度的优化结果见表 5。

从表 5 可知,随着 NaCl 浓度的增加,回收率相应增加。高浓度的 NaCl 有利于乳铁蛋白从亲和柱中的洗脱。但 2.0 mol/L 的 NaCl 容易造成液相色谱仪的损

表 5 洗脱液盐浓度优化表(n=3)

Table 5 Optimization of NaCl concentration(n=3)

添加量/mg	洗脱液 pH 值	NaCl 浓度/(mol/L)	回收率/%
0.3	7.0	0.25	0
0.3	7.0	0.50	23.2
0.3	7.0	1.0	96.4
0.3	7.0	2.0	97.8

伤,不利于机器稳定状态的保持,故选定 1.0 mol/L 的 NaCl 作为洗脱浓度。

2.6 洗脱液 pH 值的优化

洗脱液 pH 值的优化结果见表 6。

表 6 磷酸缓冲液 pH 优化表(n=3)

Table 6 Optimization of phosphate buffer pH(n=3)

添加量/mg	NaCl 浓度/(mol/L)	洗脱液 pH 值	回收率/%
0.3	1.0	5.0	94.9
0.3	1.0	6.0	95.2
0.3	1.0	7.0	96.4
0.3	1.0	8.0	98.0
0.3	1.0	9.0	97.6

从表 6 试验结果可以得知,不同的 pH 值下,回收率范围为 94.9 %~98.0 %,最高值和最低值的相对相差 3.2 %,故选定常规的 pH=8。

2.7 肝素亲和柱洗脱体积的测定

肝素亲和柱洗脱体积的测定结果见表 7。

表 7 肝素亲和柱洗脱体积的测定(n=3)

Table 7 Optimization of elution volume(n=3)

洗脱体积	峰面积	标样浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	标样峰 面积	定容体 积/mL	计算结 果/mg	洗脱 率/%
第 1 mL	818.4	50	129	20	6.34	63.4
第 2 mL	427.3	50	129	20	3.31	33.1
第 3 mL	39.2	50	129	1	0.015	0.15
第 4 mL	0	50	129	1	0	0
第 5 mL	0	50	129	1	0	0
第 6 mL~ 8 mL	0	50	129	3	0	0

由表 7 可知 1 mL 规格的 HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱,乳铁蛋白的上柱量为 10 000 μg 时,收集到的第 1 mL 和第 2 mL 的洗脱液中乳铁蛋白总的洗脱率达到 96.5 % 以上,第 3 mL 洗脱液中乳铁蛋白的洗脱率为 0.15 %,第 4 mL,第 5 mL,第 6 mL~8 mL 的洗脱液中未检测到乳铁蛋白,故本试验中选定收集洗脱液的体积为 3.0 mL。

2.8 自制肝素亲和柱性能的比较

自制肝素亲和柱性能的比较结果见表 8。

表 8 自制肝素亲和柱性能的比较(n=3)
Table 8 Comparison of the properties of homemade heparin affinity columns(n=3)

名称	回收率 1/%	回收率 2/%	回收率 3/%	平均回收率/%	相对相差/%
自制的肝素亲和柱	99.2	96.4	97.3	97.6	1.4
HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱	102.4	98.6	100.2	100.4	1.9

由表 8 可知,在相同的试验条件下上海德诺产品检测有限公司的实验室自制的亲和柱平均回收率为 97.6 %,相对相差 1.4 %,HiTrap™ Heparin HP 肝素亲和柱的平均回收率 100.4 %,相对相差 1.9 %,柱效比较接近,证明同类型的肝素亲和柱可以使用到本方法中用于乳铁蛋白的检测。

3 结论

本文首次提出将肝素亲和柱应用到乳铁蛋白检测前处理过程中,优化之后的前处理过程包括:试样中的乳铁蛋白经磷酸氢二钠溶液(0.20 mol/L,pH=8.00±0.5)提取,HiTrap™ Heparin HP 1 mL 规格的亲和柱经上述磷酸氢二钠溶液活化后,上样,经过磷酸氢二钠溶液淋洗,磷酸氢二钠-氯化钠溶液(磷酸氢二钠 0.05 mol/L,NaCl 1 mol/L,pH=8.00±0.5)洗脱,并定容至 3.0 mL,上机测定。本方法与文献中报道的方法相比,具有检测成本低、操作方便简单、耗时较短、重复性好、灵敏度高的优势,能满足目前乳铁蛋白的日常检测任务。

参考文献:

[1] H Tsuda, K Sekine, K Fujita, et al. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms—a review of experimental and clinical studies[J]. *Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 2002, 80(1): 131–136

[2] H Jegasothy, R Weerakkody, S Selby Pham, et al. In vitro heme and non-heme iron capture from hemoglobin, myoglobin and ferritin by bovine lactoferrin and implications for suppression of reactive oxygen species *in vivo*[J]. *Biometals*, 2014, 2 (6):1371–1382

[3] X Yao ,C Bunt , J Cornish , et al. Improved RP-HPLC method for determination of bovine lactoferrin and its proteolytic degradation in simulated gastrointestinal fluids [J]. *Biomedical Chromatography*, 2013, 27(2): 197–202

[4] Zhang GH, Mann DM, Tsai CM. Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by a human lactoferrin derived peptide[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(3): 1353–1358

[5] 刘秀清,姜金斗,陶大利.超滤浓缩-HPLC 法测定乳中乳铁蛋白质量分数及功能性评价[J]. *中国乳品工业*, 2016, 44(11): 53–56

[6] 李则均. 婴幼儿配方羊奶粉中乳铁蛋白含量测定[J]. *中国乳业*, 2017(4): 71–75

[7] N Xu, S Li, X Wu, et al. RP-HPLC Determination of Bovine Lactoferrin[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2004, 24(1): 49–51

[8] 肖奕昕,赵善仓,董燕婕,等.乳铁蛋白生物学功能及其检测方法研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2018(3): 29–34

[9] A Kawakami, K Hirayama, F Kawakami, et al. Purification and biochemical characterization of a fibroblast growth factor-binding protein (FGF-BP) from the lactoferrin fraction of bovine milk[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1760(3): 421–431

[10] 刘宇,陈伟,史玉东,等.高效毛细管电泳法快速测定乳铁蛋白原料的纯度[J]. *中国乳品工业*, 2016(2): 43–46

[11] 任璐,龚广予,杭锋,等.采用 HPLC 测定乳铁蛋白质量浓度的方法研究[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(2): 49–52

[12] 王德伟,游景水,黄远英.反相高效液相色谱法快速测定乳铁蛋白含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015(8): 3088–3092

[13] 夏明,应铁进.高效液相色谱检测乳制品中的乳铁蛋白含量[J]. *食品科学*, 2010, 31(2): 165–167

[14] 殷继永,马欣欣,孙静,等.蛋白质芯片检测牛乳中乳铁蛋白条件的优化研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016(6): 720–724

[15] 张林田,陈小雪,魏建华,等.反相高效液相色谱法测定食品添加剂乳铁蛋白[J]. *理化检验(化学分册)*, 2010, 46(7): 765–766

[16] 林成招,张彦明,陈伟华,等.肝素亲和柱分离纯化乳铁蛋白[J]. *色谱*, 2003, 21(4): 434–434

[17] 邹思湘,Whurley.PH 和某些阳离子对乳铁蛋白与肝素结合的影响[J]. *南京农业大学学报*, 1992, 15(4): 81–85

[18] A Roşeanu,F Chelu,M Trif,et al. Inhibition of binding of lactoferrin to the human promonocyte cell line THP–1 by heparin: the role of cell surface sulphated molecules[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1475(1): 35–38

[19] 章寅,高磊,郑隽,等.乳制品中乳铁蛋白的测定[J]. *现代农业科技*, 2013(16): 291–292

[20] Zhang Y, Lou F, Wu W, et al. Determination of Bovine Lactoferrin in Food by HPLC with a Heparin Affinity Column for Sample Preparation[J]. *Journal of Aoac International*, 2017, 100(1):133–138

收稿日期:2018–08–02