

# 应用高效液相色谱 – 串联质谱法测定婴幼儿配方食品和乳粉中的乳清蛋白

LCMSMS-196

**摘要:** 建立一种测定婴幼儿配方食品和乳粉中  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白的超高效液相色谱串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 并用于考察 5 个实际样品婴幼儿配方食品和乳粉中  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白的含量。样品经烷基化和酶解处理后, 用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离酶解后的肽段, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 进行定量分析。使用内标法定量酶解后的特征肽段,  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白特征肽段的定量标准曲线相关系数分别为 0.9961 和 0.9968; 浓度线性范围分别为 20 nmol/L ~500 nmol/L 和 40 nmol/L ~1000 nmol/L。

**关键词:** 乳清蛋白  $\alpha$ -乳白蛋白  $\beta$ -乳球蛋白 超高效液相色谱串联质谱法

乳清蛋白被称为蛋白之王, 是从牛奶中提取的一种蛋白质, 具有营养价值高、易消化吸收、含有多种活性成分等特点, 是公认的人体优质蛋白质补充剂之一。乳清蛋白中主要含有的  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白等, 各自都有独特的生物活性。 $\alpha$ -乳白蛋白是必需氨基酸和支链氨基酸的极好来源, 也是唯一能与金属元素和钙元素结合的乳清蛋白成分。 $\beta$ -乳球蛋白具备最佳的氨基酸比例, 支链氨基酸含量极高, 对促进蛋白质合成和减少蛋白质分解起着重要的作用。

婴幼儿配方食品和乳粉中乳清蛋白的质量, 尤其是  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白的含量, 对婴幼儿的生长发育和健康成长至关重要。长期以来, 劣质婴幼儿配方乳粉得不到有效控制, 有多种原因, 缺乏有效的检测方法乃是原因之一。我们在本文中开展的 LC-MS/MS 方法可通过检测特异肽段来快速准确定量婴幼儿配方食品和乳粉中乳清蛋白的  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白的含量。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.65 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: C18 色谱柱 2.1 mm I.D.×100 mm L,  
1.7  $\mu$ m

流动相: A, 水 +0.1% 甲酸;  
B, 乙腈 +0.1% 甲酸

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 10  $\mu$ L

柱温: 40°C

样品温度: 20°C

洗脱方式: 采用梯度洗脱, B 相初始浓度为 5% 时  
间程序见表 1

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.80	Pumps	Pump B Conc	5
1.20	Pumps	Pump B Conc.	10
2.50	Pumps	Pump B Conc.	17
2.60	Pumps	Pump B Conc.	22
4.20	Pumps	Pump B Conc.	24
4.30	Pumps	Pump B Conc.	100
5.00	Pumps	Pump B Conc.	100
5.10	Pumps	Pump B Conc.	5
9.00	Controller	Stop	

质谱条件	接口温度: 300°C
离子化模式: ESI(+)	DL 温度: 250°C
离子源接口电压: 4.5 kV	加热模块温度: 400°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
加热气: 空气 10 L/min	延迟时间: 1 ms
干燥气: 氮气 10 L/min	MRM 参数: 见表 2
碰撞气: 氩气	

### 1.3 标准品与试剂

牛  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段标准品 (序列: VGINYWLAHK, 分子量 1200.4 Da, 纯度  $\geq 99\%$ ); 牛  $\alpha$ -乳白蛋白同位素标记特异肽段标准品 (序列: VGI\*NYWL\*AHK, 分子量 1214.4 Da, 纯度  $\geq 95\%$ ); 牛  $\alpha$ -乳白蛋白同位素标记内标 (序列: KILDKVGI\*NYWL\*AHKALCSEK, 分子量 2443.9 Da, 纯度  $\geq 95\%$ ); 牛  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段标准品 (序列: IDALNENK, 分子量 916.0 Da, 纯度  $\geq 99\%$ ); 牛  $\beta$ -乳球蛋白同位素标记特异肽段标准品 (序列: I\*DAL\*NENK, 分子量 30.0 Da, 纯度  $\geq 95\%$ ); 牛  $\beta$ -乳球蛋白同位素标记内标 (序列: KIPAVFKI\*DAL\*NEN KVLVLDTDYK, 分子量 2761.2 Da, 纯度  $\geq 95\%$ ).

乙腈购自 Merck 公司; 实验用水由 Milli-Q Plus 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 经去离子与二次净化制得; 甲酸 (纯度 99%, Wako, Japan); 其余试剂均为分析纯; 碱性胰蛋白酶: 活力大于 10000 BAEE 每毫克蛋白质。

碳酸氢铵溶液 (500 mmol/L): 称取碳酸氢铵 3.95 g, 用水溶解后定容至 100 mL;

二硫苏糖醇溶液 (500 mmol/L): 称取二硫苏糖醇 0.771 g, 用碳酸氢铵溶液溶解后定容至 10 mL;

碘代乙酰胺溶液 (500 mmol/L): 称取碘代乙酰胺 0.925 g, 用碳酸氢铵溶液溶解后定容至 10 mL;

氯化钙溶液 (100 mmol/L): 称取氯化钙 0.111 g, 用水溶解后定容至 10 mL;

乙酸溶液 (1%, V/V): 移取乙酸 0.1 mL, 用水稀释并定容至 10 mL;

胰蛋白酶溶液 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 称取碱性胰蛋白酶 5 mg, 用乙酸溶液溶解后定容至 10 mL。

### 1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

牛  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段标准储备溶液 (500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ): 准确称取牛  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段固体 6.00 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛  $\alpha$ -乳白蛋白同位素特异肽段储备溶液 (500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ): 准确称取牛  $\alpha$ -乳白蛋白同位素特异肽段固体 6.07 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛  $\alpha$ -乳白蛋白同位素内标储备溶液 (500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ): 准确称取牛乳  $\alpha$ -乳白蛋白同位素内标固体 12.22 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段标准储备溶液 (500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ): 准确称取牛  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段固体 4.58 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛  $\beta$ -乳球蛋白同位素特异肽段储备溶液: 准确称取牛  $\beta$ -乳球蛋白同位素特异肽段固体 4.65 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

牛  $\beta$ -乳球蛋白同位素内标储备溶液 (500  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ): 称取牛  $\beta$ -乳球蛋白同位素内标固体 13.81 mg (准确至 0.01 mg), 用水溶解并定容至 10 mL, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 置于冰箱内冷冻保存。

特异肽段标准中间混合溶液 (2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ): 分别准确移取牛  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段标准储备液 40  $\mu\text{L}$  和牛  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段标准储备液 80  $\mu\text{L}$ , 于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。

同位素标记特异肽段中间混合溶液 (2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  和 4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ): 分别准确移取牛  $\alpha$ -乳白蛋白同位素标记特异肽段标准储备液 40  $\mu\text{L}$  和牛  $\beta$ -乳球蛋白同位素特异肽段标准储备液 80  $\mu\text{L}$ , 于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。

同位素内标中间混合溶液 (2  $\mu\text{mol/L}$  和 4  $\mu\text{mol/L}$ ): 分别准确移取牛  $\alpha$ -乳白蛋白同位素内标储备液 40  $\mu\text{L}$  和牛  $\beta$ -乳球蛋白同位素内标储备液 80  $\mu\text{L}$ , 于 10mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。

标准系列工作溶液: 分别吸取特异肽段标准中间混合溶液 10、25、50、100、150、200、250  $\mu\text{L}$ , 每个浓度点加入 50  $\mu\text{L}$  的同位素标记特异肽段中间混合溶液, 用 0.1% 甲酸水溶液稀释至 1.0 mL, 得  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段浓度为 20、50、100、200、300、400、500 nmol/L 和  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段浓度为 40、100、200、400、600、800、1000 nmol/L 的标准系列工作溶液。临用前配制。

### 1.5 样品制备

称取固体试样约 2 g 或液体试样约 10 g (精确至 0.01 g, 内含蛋白质约 200 mg 左右) (于 500 mL 烧杯中, 分次用 900 mL 水将试样充分溶解, 转移到 1000 mL 容量瓶中, 并用水定容至刻度, 混匀, 备用。

准确移取 200  $\mu\text{L}$  试样溶液, 于 2 mL 离心管中, 加入 50  $\mu\text{L}$  同位素内标中间混合溶液, 混匀, 加入 150  $\mu\text{L}$  碳酸氢铵溶液和 10  $\mu\text{L}$  二硫苏糖醇溶液, 混匀, 置于 75  $^{\circ}\text{C}$  下恒温反应 30 min; 冷却至室温, 加入 30  $\mu\text{L}$  碘代乙酰胺溶液, 暗处静置 30 min; 加入 10  $\mu\text{L}$  氯化钙溶液和 50  $\mu\text{L}$  胰蛋白酶溶液, 混匀, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$  下恒温酶解 5 小时及以上。加入 10  $\mu\text{L}$  甲酸, 混匀, 室温下静置 15 min, 加入 490  $\mu\text{L}$  水, 混匀, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 供液相色谱串联质谱仪检测。

表2 MRM优化参数

化合物名称	前体离子(m/z) [M+2H] <sup>2+</sup>	产物离子(m/z)	碰撞能量(V)
$\alpha$ -乳白蛋白 特异肽段	600.8	284.1* 355.2	-33 -26
$\alpha$ -乳白蛋白同 位素特异肽段	608.0	284.1* 355.0	-34 -28
$\beta$ -乳球蛋白 特异肽段	458.7	261.2* 504.1	-24 -18
$\beta$ -乳球蛋白同 位素特异肽段	465.7	261.0* 504.1	-24 -17

\*为定量离子对

## 结果讨论

### 2.1 标准品色谱图

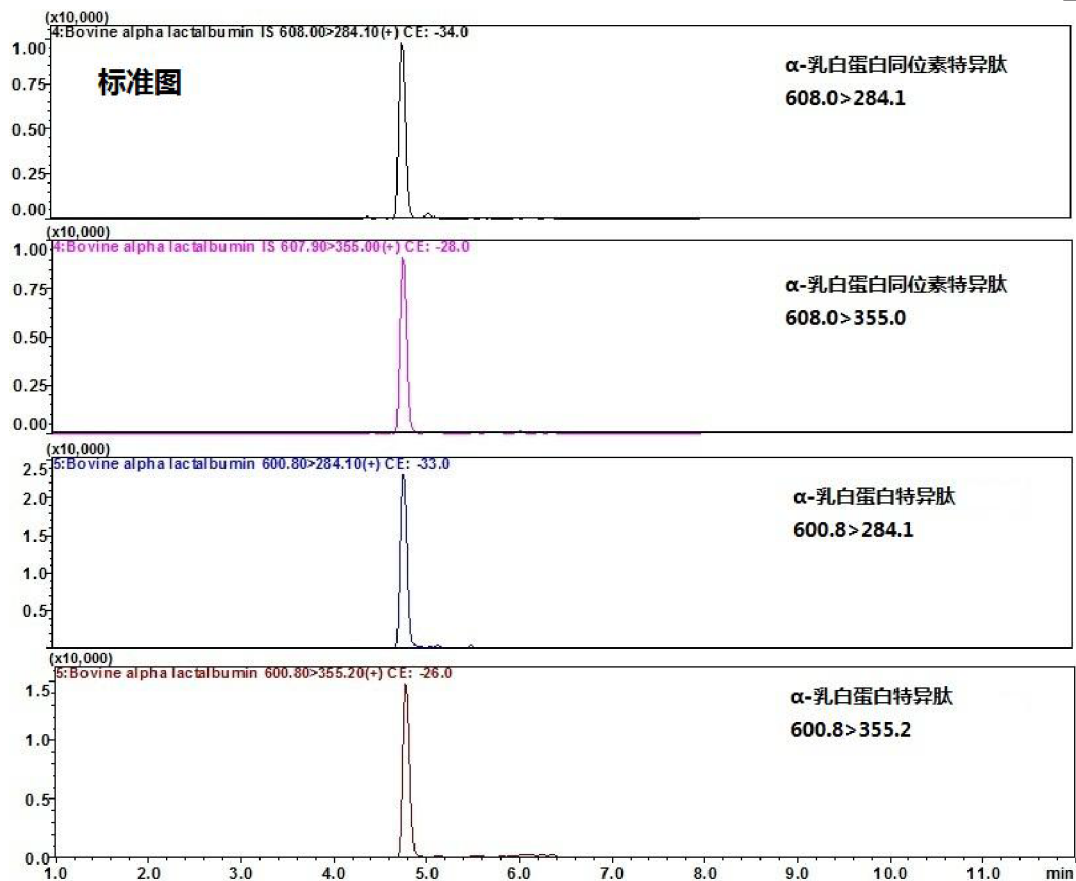


图1 α-乳白蛋白特异肽段和同位素特异肽标准品(100 nmol/L)MRM色谱图

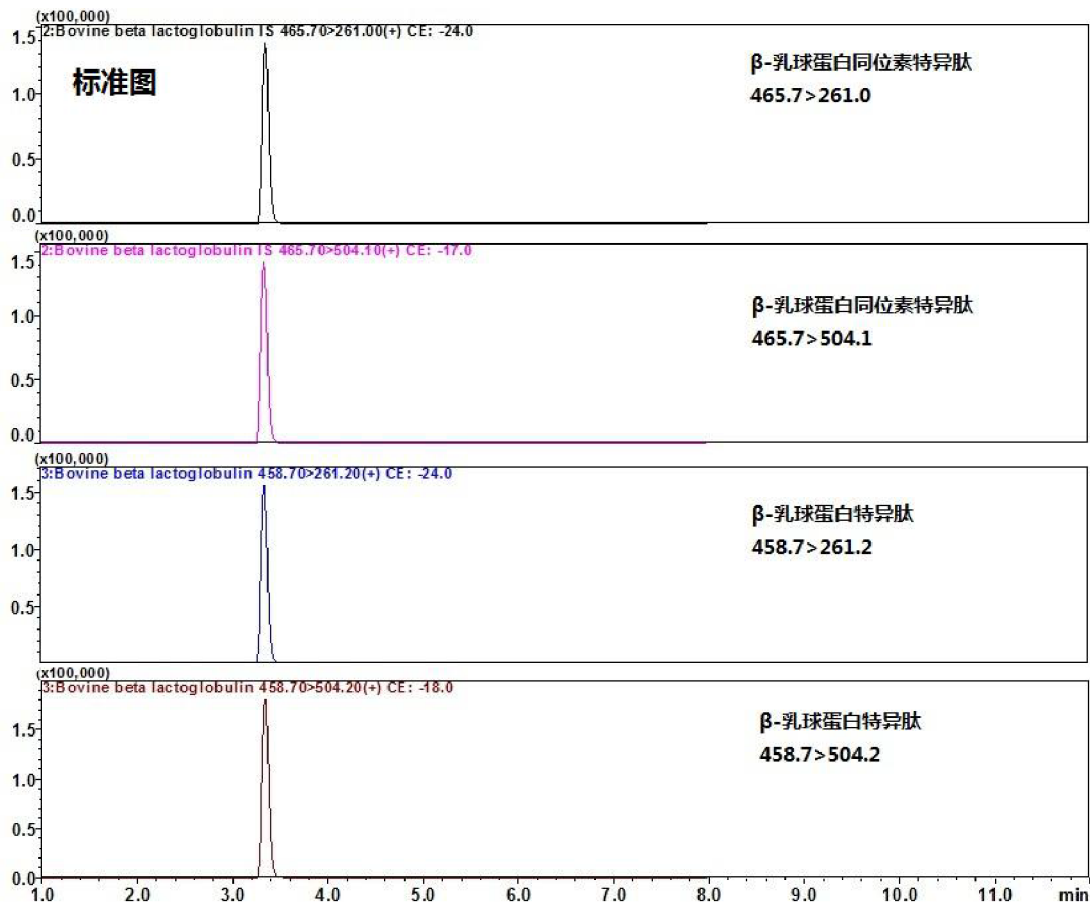


图2 100 nmol/L β-乳球蛋白特异肽和同位素特异肽标准品(100 nmol/L)MRM色谱图

## 2.2 线性关系

将配制的  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段 20、50、100、200、300、400、500 nmol/L 和  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段 40、100、200、400、600、800、1000 nmol/L 不同浓度的标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，内标法制作校准曲线，线性良好，线性方程、相关系数和线性范围见表 3。

表3 线性结果

基质	回归方程	r	线性范围
$\alpha$ 乳白蛋白特异肽段	$y=0.254051x-0.0568241$	0.9961	20 ~500 nmol/L
$\beta$ 乳球蛋白特异肽段	$y=10.6884x+3.73716$	0.9968	40 ~1000 nmol/L

## 2.3 实际样品测定结果

不称取试样，按 1.5 的步骤进行空白试验，确认空白中没有干扰待测组分的物质。

实际样品按 1.5 的步骤处理。将处理后的样品注入液相色谱 - 串联质谱仪，按照已确立的参考条件与参数，测得相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段的浓度，平行测定次数不少于两次，结果见表 4。

表4 实际样品中 $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段和 $\beta$ -乳球蛋白特异肽段检测结果

样品	$\alpha$ -乳白蛋白特异肽段浓度	RSD(%)	$\beta$ -乳球蛋白特异肽段浓度	RSD(%)
	(nmol/L)	n=2	(nmol/L)	n=2
Sample 1	199.47	1.33%	393.39	3.14%
Sample 2	214.99	4.10%	140.05	2.82%
Sample 3	139.81	7.49%	203.74	0.27%
Sample 4	212.78	1.07%	267.097	1.04%
Sample 5	176.99	2.00%	208.42	3.43%

## 结论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定婴幼儿配方食品和乳粉中  $\alpha$ -乳白蛋白和  $\beta$ -乳球蛋白含量的快速准确定量方法，经方法学研究表明线性、精密度、灵敏度均满足样品测定要求。本文分别检测了 5 个婴幼儿配方食品和乳粉实际样品中  $\alpha$ -乳白蛋白特异肽段和  $\beta$ -乳球蛋白特异肽段的浓度。