

应用高效液相色谱 – 串联质谱法测定食品中的乳铁蛋白

LCMSMS-197

摘要： 建立一种测定乳品中乳铁蛋白的超高效液相色谱串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 并用于考察 26 个实际样品鲜乳和奶粉中乳铁蛋白的含量。样品经酶解处理后，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，乳铁蛋白特征肽段的定量标准曲线相关系数为 0.9981；浓度线性范围分别为 2 nmol/L ~50 nmol/L。

关键词： 乳铁蛋白；特异肽段；超高效液相色谱串联质谱法

乳铁蛋白 1939 年首次从牛乳中分离获得，是一种具有许多生理活性的铁结合性糖蛋白，它既能参与铁的转运，又能调节免疫系统，同时又可抗菌、抗病毒、抗氧化和抗肿瘤等。由于乳铁蛋白有如此多的生理功能，许多乳制品公司把乳铁蛋白作为一种重要的功能性添加

剂，因此，对乳铁蛋白灵敏快速检测技术的建立亟待解决。我们在本文中开展的 LC-MS/MS 方法可通过检测乳铁蛋白的特异肽段来快速准确定量鲜乳和奶粉中乳铁蛋白的含量。

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-20A₅ 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 μm

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 μL

柱温： 40℃

样品温度： 15℃

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

乳铁蛋白特异肽标准品: 序列为 VDSALYLGSR, 分子量 1079.6 Da, 纯度 $\geq 99\%$;

乳铁蛋白同位素特异肽标准品: 序列为 VDSAL*YL*GSR, 分子量 1093.6 Da, 纯度 $\geq 95\%$; 乳铁蛋白同位素内标: 序列为 ALGFLRIPSKVDSAL*YL*GSRYLTLKLNRE, 分子量 3409.9 Da, 纯度 $\geq 95\%$ 。

注: 上述所示肽段序列中注有 * 的氨基酸为同位素氨基酸。

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。

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

二硫苏糖醇溶液 (500 mmol/L): 称取 0.771 g 二硫苏糖醇, 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 0.925 g 碘代乙酰胺, 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 0.111 g 氯化钙, 用水溶解后定容至 10 mL。

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

碱性胰蛋白酶溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 称取 1 mg 碱性胰蛋白酶, 用乙酸溶液溶解后定至 10 mL。

1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

乳铁蛋白特异肽标准储备溶液 (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$): 准确称取 1.08 mg (精确至 0.01 mg) 乳铁蛋白特异肽标准品, 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, 于 -20°C 保存。

乳铁蛋白同位素特异肽储备溶液 (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$): 准确称取 1.09 mg (精确至 0.01 mg) 乳铁蛋白同位素特异肽标准品, 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, 于 -20°C 保存。

乳铁蛋白同位素内标储备溶液 (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$): 准确称取 3.41 mg (精确至 0.01 mg) 乳铁蛋白同位素内标标准品, 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, 于 -20°C 保存。

乳铁蛋白特异肽标准中间溶液 (500 nmol/L): 准确吸取 50 μL 乳铁蛋白特异肽标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 于 -20°C 保存。

乳铁蛋白同位素特异肽中间溶液 (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$): 准确吸取 100 μL 乳铁蛋白同位素特异肽储备液于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 于 -20°C 保存。

乳铁蛋白同位素内标中间溶液 (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$): 准确吸取 100 μL 乳铁蛋白同位素内标储备液于 10 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。将配制的溶液转移到塑料瓶中, 于 -20°C 保存。

标准系列工作溶液: 分别吸取 4、10、20、40、60、80、100 μL 的乳铁蛋白特异肽标准中间溶液, 每个浓度点分别加入 20 μL 的同位素特异肽中间溶液, 用 0.1% 甲酸水溶液定容至 1 mL, 得到乳铁蛋白特异肽浓度分别为 2、5、10、20、30、40、50 nmol/L 的标准系列工作溶液。临用前配制。

1.5 样品制备

液体试样：称取 5 g(精确至 0.01 g) 试样，于 100 mL 烧杯中，用 40 mL 水稀释后，转移至 50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀，待酶解。

固体试样：称取 1 g(精确至 0.01 g) 试样，于 100 mL 烧杯中，用 80 mL 温水溶解，待冷却至室温后，转移至 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀，待酶解。

准确吸取 200 μ L 上述试样溶液于 2 mL 离心管中，加入 20 μ L 乳铁蛋白同位素内标中间溶液，混匀。加入 180 μ L 碳酸氢铵溶液和 15 μ L 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 50 $^{\circ}$ C 恒温反应 30 min；冷却至室温，加入 45 μ L 碘代乙酰胺溶液，暗处静置 30 min；加入 10 μ L 氯化钙溶液和 40 μ L 碱性胰蛋白酶溶液，混匀，于 37 $^{\circ}$ C 恒温酶解 4 h 以上。加入 10 μ L 甲酸混匀，室温静置 30 min，加入 480 μ L 水，混匀，过 0.22 μ m 微孔滤膜，供液相色谱 - 串联质谱仪分析。

表2 MRM优化参数

名称	前体离子(m/z)	产物离子	碰撞能量(eV)
乳铁蛋白特异肽	540.8	595.3*	-23
		866.4	-19
乳铁蛋白同位素特异肽	547.8	602.3*	-21
		880.4	-18

*为定量离子对

结果讨论

2.1 标准品色谱图

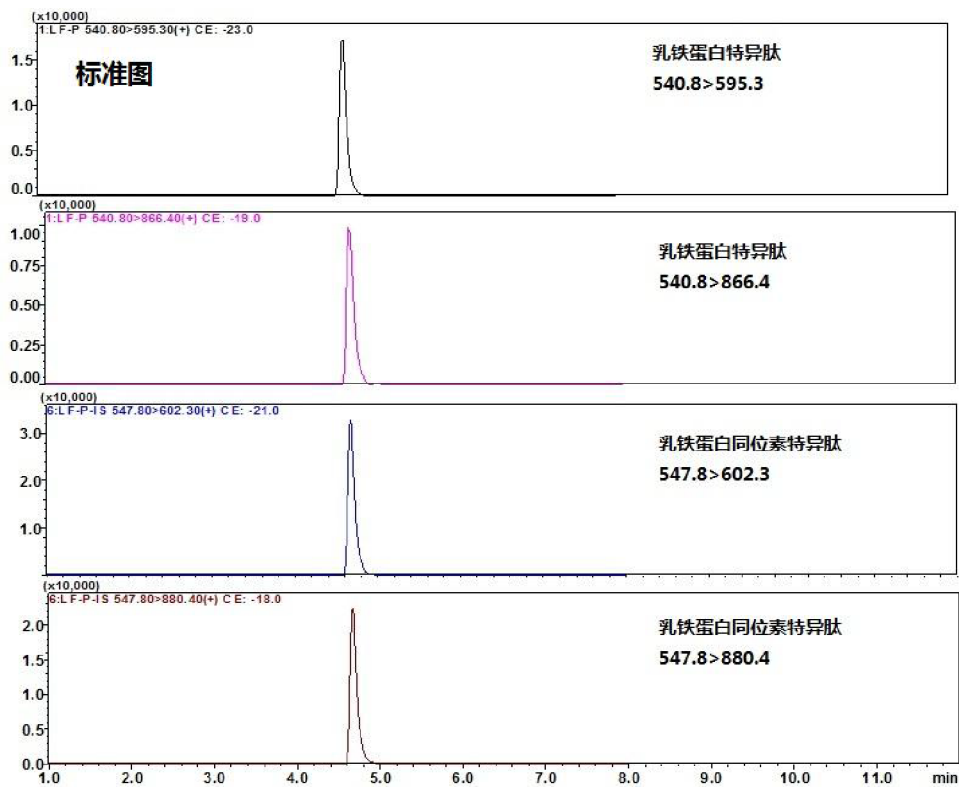


图1 乳铁蛋白特异肽段10 nmol/L标准品MRM色谱图

2.2 线性关系

将配制的 α -乳白蛋白特异肽段2、5、10、20、30、40、50 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	范围
乳铁蛋白	$y=7.32510x+0.0478466$	0.9981	2~50 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。

样品按照1.5的步骤进行处理,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乳铁蛋白特异肽段的浓度。结果见表4。

表4 鲜乳和奶粉中乳铁蛋白特异肽段检测结果

序号	样品名称	检测结果 (mg/100g)	序号	样品名称	检测结果 (mg/100g)
1	鲜乳01	19.2	14	婴儿配方奶粉基粉	40.7
2	鲜乳02	18.8	15	婴儿配方奶粉基粉	36.6
3	鲜乳03	18.7	16	婴儿配方奶粉基粉	83.3
4	鲜乳04	19.3	17	全脂奶粉01	57.1
5	鲜乳05	19.4	18	全脂奶粉	55.7
6	鲜乳06	18.4	19	全脂奶粉03	55.6
7	婴儿配方奶粉基粉	63.8	20	全脂奶粉04	53.1
8	婴儿配方奶粉基粉	62.9	21	全脂奶粉05	53.1
9	婴儿配方奶粉基粉	38.4	22	全脂奶粉06	59.4
10	婴儿配方奶粉基粉	40.8	23	全脂奶粉07	64.0
11	婴儿配方奶粉基粉	35.6	24	全脂奶粉08	64.7
12	婴儿配方奶粉基粉	40.5	25	全脂奶粉09	63.2
13	婴儿配方奶粉基粉	46.9	26	全脂奶粉10	57.5

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 联用定量乳品中乳铁蛋白含量的快速准确定量方法,得到的校准曲线相关系数为 0.9981,线性范围为 2 nmol/L ~50 nmol/L,该方法分析速度快,可在 9 min 完成一个样品的分析。本文利用该方法分别检测了 26 个鲜乳和奶粉实际样品中乳铁蛋白特异肽段的浓度。