

超高效液相色谱 – 串联质谱法测定山羊全脂奶粉产品中山羊奶粉和奶牛奶粉成分的含量

LCMSMS-263

摘要：建立了一种测定山羊全脂奶粉产品中的山羊奶粉和奶牛奶粉成分含量的超高效液相色谱串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 并用于考察 5 个市售山羊全脂奶粉中山羊奶粉和奶牛奶粉的含量。奶粉的山羊和奶牛 β -乳球蛋白经二硫苏糖醇、碘代乙酰胺变性还原，以碱性重组胰蛋白酶酶解成特异性肽段后，用稳定同位素稀释 – 液相色谱串联质谱法测定目标蛋白的特异肽段，内标法定量。方法学结果表明，羊奶粉和奶牛奶粉含量的两条曲线线性均良好， R^2 在 0.9989 以上。在两个不同含量的混合对照品条件下，两种奶粉测定结果的 RSD% 在 13% 以下，方法的精密度良好。

关键词：山羊全脂奶粉 山羊奶粉 奶牛奶粉 超高效液相色谱串联质谱法

山羊奶是全球继奶牛奶、水牛奶之后的第三大奶类资源，占总奶量 2.07%。通常奶类蛋白中的酪蛋白在胃酸的作用下易形成较大的凝固物，从而影响蛋白的消化率。羊奶中酪蛋白含量低于牛奶，与人奶相似，所以羊奶中蛋白质的消化率比牛奶高，更适合作为婴儿、老人的保健食品。同时羊奶的酪蛋白结构与牛奶中的不同，羊奶中主要含 α -2S 酪蛋白、 β -酪蛋白，这两种酪蛋白易被酵母分解；而牛奶中主要含 α -1S 酪蛋白，因此，对牛奶过敏和体质较弱的人群完全可以接受山羊奶。因此可以说羊奶是乳制品中最接近母乳，营养成分最全、最易被人体吸收的奶品，正日益得到人们的青睐。然而羊奶产品的成本要比牛奶高，因此有不法厂商向羊奶粉

中添加牛乳清粉等成分，更有甚者直接用牛奶粉冒充羊奶粉，严重侵害了消费者的利益。相关部门对此十分重视，相继出台了相关文件，要求产品名称中有动物性来源的应当在配方组成中注明生乳、乳粉、乳清（蛋白）粉等乳制品原料的动物性来源，同一乳制品原料有两种以上动物性来源的，应当标明各种动物性来源原料所占比例。因此，建立一个能够准确测定山羊奶粉中羊奶粉和奶牛奶粉含量的方法迫在眉睫。

在本文中建立的 LC-MS/MS 方法可通过检测特异肽段来快速准确测定全脂山羊奶粉中羊奶粉和奶牛奶粉含量。

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 \times 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. \times 100 mm L，
1.7 μ m，孔径 300 Å。

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 μ L

柱温：40°C

洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 3%

时间程序见表 1

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.0	Pumps	Pump B Conc	32
5.5	Pumps	Pump B Conc.	100
6.5	Pumps	Pump B Conc.	100
7.0	Pumps	Pump B Conc.	3
9.0	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)

接口温度: 300°C

离子源接口电压: 4.5 kV

DL 温度: 250°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热模块温度: 400°C

加热气: 空气 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气: 氮气 10.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

碰撞气: 氩气

1.3 试剂

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; 碱性重组胰蛋白酶: 活力大于 10000 BAEE 每毫克蛋白质。

碳酸氢铵溶液 (100 mmol/L): 称取 0.79 g 碳酸氢铵, 用水溶解后定容至 100 mL。

二硫苏糖醇溶液 (100 mmol/L): 称取 1.542 g 二硫苏糖醇, 用 100 mmol/L 的碳酸氢铵溶液溶解后定容至 100 mL。

碘代乙酰胺溶液 (100 mmol/L): 称取 1.850 g 碘代乙酰胺, 用 100 mmol/L 的碳酸氢铵溶液溶解后定容至 100 mL。

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

碱性重组胰蛋白酶溶液 (300 µg/mL): 称取 3 mg 碱性重组胰蛋白酶, 用 1% 乙酸溶液溶解后定容至 10 mL。

甲酸水溶液 (0.1%, V/V): 吸取 1 mL 甲酸, 用水稀释并定容至 1000 mL。

甲酸乙腈溶液 (0.1%, V/V): 吸取 1 mL 甲酸, 用乙腈稀释并定容至 1000 mL。

表2 MRM优化参数

化合物名称	前体离子(m/z) [M+2H] ²⁺	产物离子(m/z)	碰撞能量(V)
奶牛β-乳球蛋白特异肽段	858.6	462.2	-28
		685.3	-27
		1254.5*	-32
奶牛β-乳球蛋白同位素特异肽段	865.7	462.2	-26
		693.3	-27
		1268.6*	-31
山羊β-乳球蛋白特异肽段	807.5	600.2	-30
		842.4	-28
		1168.4*	-28
山羊β-乳球蛋白同位素特异肽段	814.0	606.2	-30
		855.4	-32
		1182.0*	-27

*为定量离子对

1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

奶牛 β -乳球蛋白特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取奶牛 β -乳球蛋白特异肽粉末 8.29 mg(准确至 0.01 mg), 用水溶解后定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

山羊 β -乳球蛋白特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取山羊 β -乳球蛋白特异肽段粉末 7.78 mg(准确至 0.01 mg), 用水溶解后定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

奶牛 β -乳球蛋白稳定同位素特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取奶牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段粉末 8.36 mg(准确至 0.01 mg), 用水溶解后定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

山羊 β -乳球蛋白稳定同位素特异肽段储备液 (500 $\mu\text{mol/L}$): 准确称取山羊 β -乳球蛋白同位素特异肽段粉末 7.85 mg(准确至 0.01 mg), 用水溶解后定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

奶牛 β -乳球蛋白特异肽段工作溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$): 准确吸取 20 μL 奶牛 β -乳球蛋白特异肽段标准储备液, 按照 1.5.2 步骤进行烷基化后, 用水稀释并定容至 1 mL。

山羊 β -乳球蛋白特异肽段工作溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$): 准确吸取 20 μL 山羊 β -乳球蛋白特异肽段标准储备液, 按照 1.5.2 步骤进行烷基化后, 用水稀释并定容至 1 mL。

奶牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段工作溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$): 准确吸取 20 μL 奶牛 β -乳球蛋白同位素特异肽段储备液, 按照 1.5.2 步骤进行烷基化后, 用水稀释并定容至 1 mL。

山羊 β -乳球蛋白同位素特异肽段工作溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$): 准确吸取 20 μL 山羊 β -乳球蛋白同位素特异肽段储备液, 按照 1.5.2 步骤进行烷基化后, 用水稀释并定容至 1 mL。

同位素标记特异肽中间混合溶液 (25 $\mu\text{mol/L}$): 分别准确吸取 500 μL 奶牛和山羊 β -乳球蛋白特异肽段标准储备液和奶牛, 用水稀释并定容至 10 mL。将溶液分别转移到 1 mL 塑料管中, 迅速置于 -20°C 保存, 使用前冻融至室温, 每个塑料瓶管包装只能一次性使用。

1.5 样品前处理

1.5.1 样品制备

称取奶粉试样约 1 g 或鲜乳试样约 5 g(精确至 0.01 g, 内含总蛋白质约 100 mg 左右)于 50 mL 烧杯中, 用 50 mL 水分次将试样充分溶解后转移到 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 必要时置于涡旋混合器上充分涡旋溶解。移取上述溶液 50 μL 于 2 mL 离心管中, 加入 20 μL 稳定同位素标记内标中间混合溶液, 待酶解。

1.5.2 烷基化与酶解

向上述样液中加入 100 μL 碳酸氢铵溶液、10 μL 二硫苏糖醇溶液和 660 μL 超纯水, 混匀后于 70°C 下恒温水浴 30 min; 冷却至室温, 加入 30 μL 碘代乙酰胺溶液, 暗处静置 30 min; 再加入 100 μL 碳酸氢铵溶液, 20 μL 胰蛋白酶溶液, 充分混匀后于 37°C 恒温水浴中酶解 2 h。加入 10 μL 甲酸混匀, 室温下静置 10 min, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 供高效液相色谱 - 串联质谱仪检测。

注: 以上前处理过程中所使用耗材均应考虑多肽吸附效应, 吸附率应小于 15%。

1.6 计算

本方法以标准山羊奶粉和奶牛奶粉作为标准品, 检测定量样品中山羊奶粉和奶牛奶粉含量。并将定量结果代入公式 (1) 和公式 (2), 分别计算得出样品中的山羊奶与奶牛奶的成分占比。

$$C_a = \frac{n_a}{n_a + n_b} \times 100\%$$

$$C_b = \frac{n_b}{n_a + n_b} \times 100\%$$

式中：

$c\alpha$ — 试样中山羊奶成分占比，%；

$c\beta$ — 试样中奶牛奶成分占比，%；

$n\alpha$ — 试样溶液中山羊奶成分相对于标准山羊奶粉的当量；

$n\beta$ — 试样溶液中奶牛奶成分相对于标准奶牛奶粉的当量。

■ 结果讨论

2.1 标准品色谱图

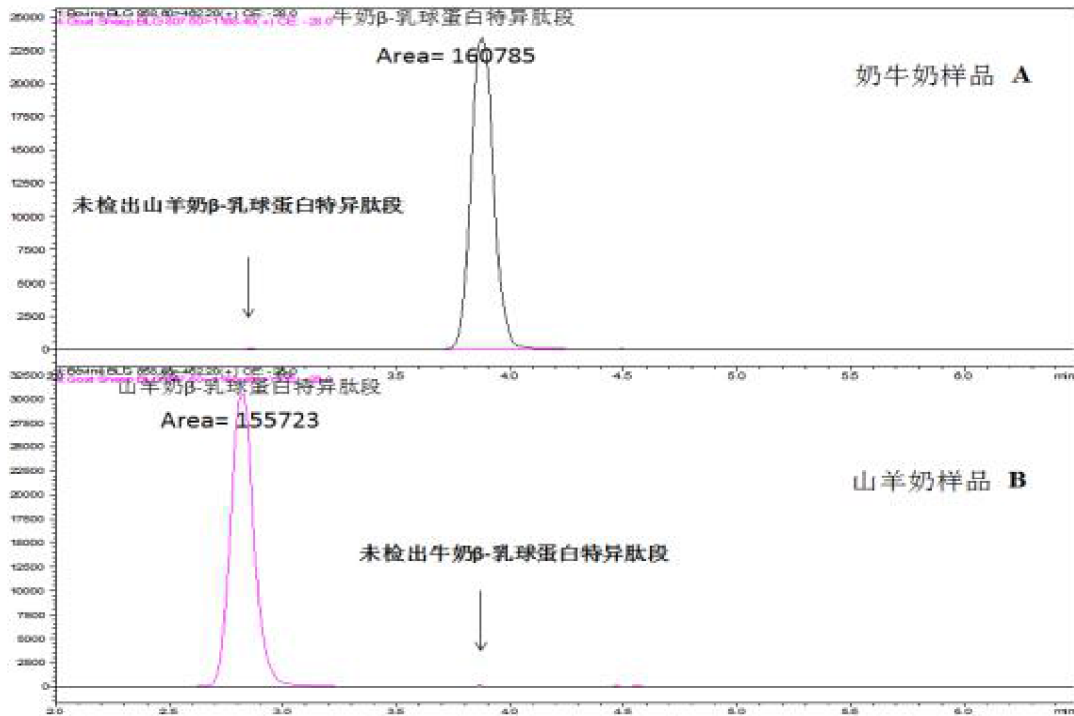


图1 标准奶牛奶 (A) 和标准山羊奶 (B) 酶解溶液的MRM色谱图

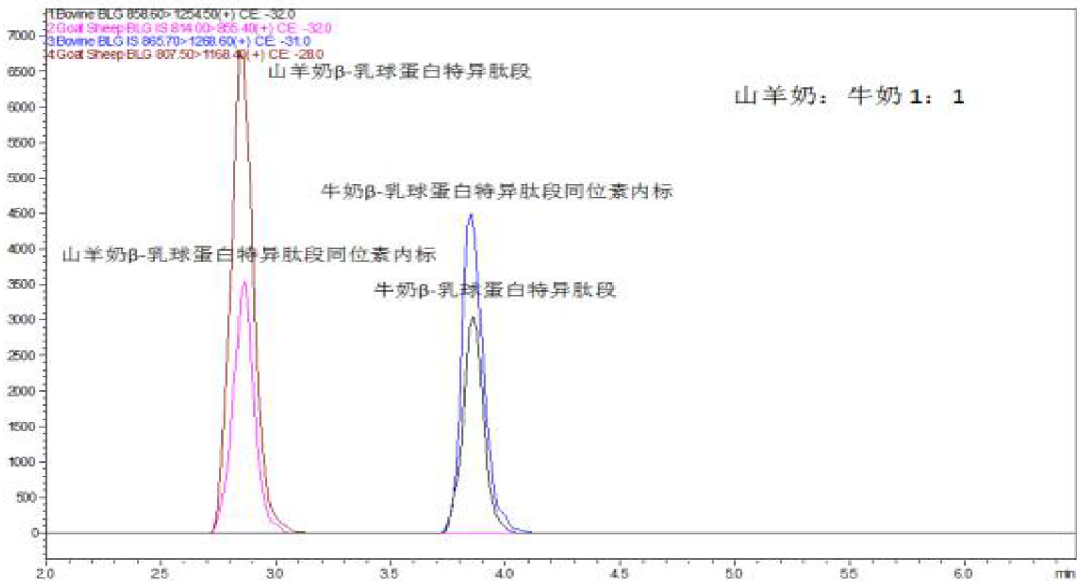


图2 奶牛奶粉/山羊奶粉 1: 1 混合酶解溶液的MRM色谱图

2.2 线性关系

分别称取标准山羊和奶牛奶粉试样约 1 g(精确至 0.01 g, 内含总蛋白质约 100 mg 左右)于 50 mL 烧杯中, 用 50 mL 水分次将试样充分溶解后转移到 100 mL 容量瓶中。按照表 3 中比例混合配制不同浓度的标准系列。依次进样后制作以牛奶粉 / 羊奶粉含量为横坐标、以牛奶和羊奶的实际测定比值为纵坐标的两条校准曲线分别对牛奶粉和羊奶粉含量进行定性。由结果可见, 两条曲线线性关系均良好, R^2 在 0.9989 以上。

表3 牛羊奶标准曲线制作方法

序号	标准曲线 [%]	
	牛奶标准溶液	羊奶标准溶液
1	0	100
2	10	90
3	20	80
4	30	70
5	40	60
6	50	50
7	60	40
8	70	30
9	80	20
10	90	10
11	100	0

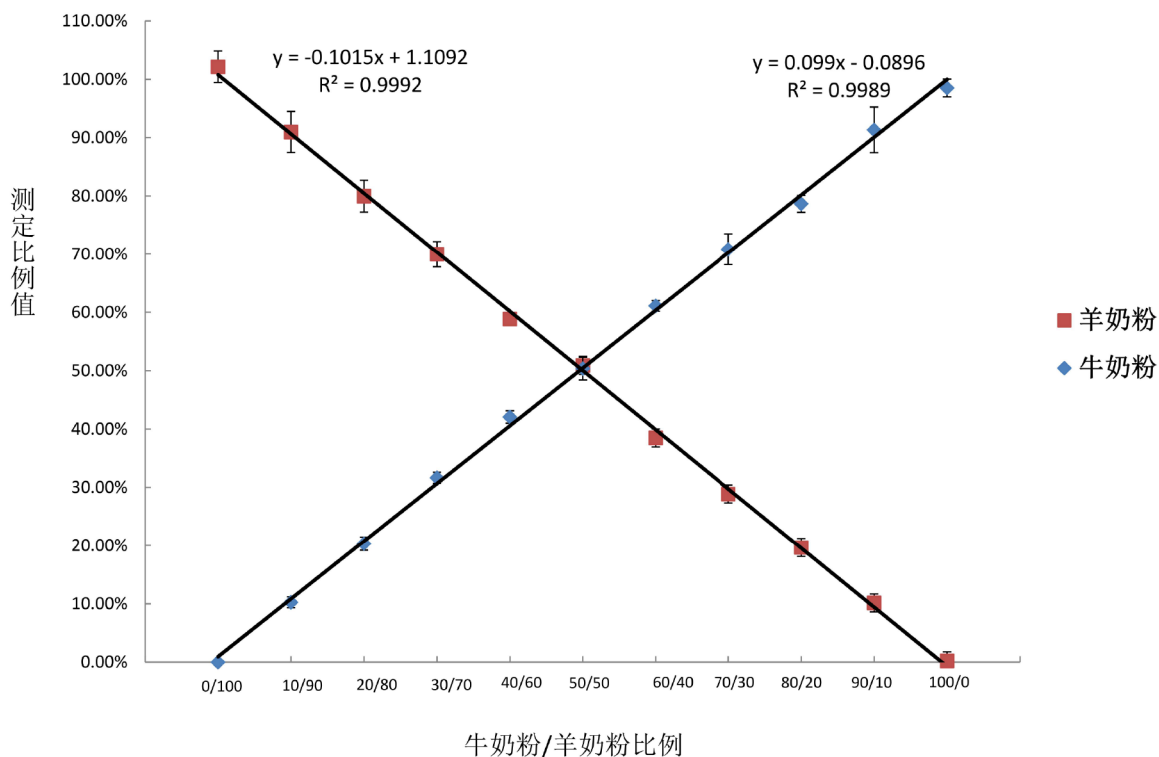


图3 羊奶粉与牛奶粉不同比例下的校准曲线

2.3 精密度结果

取含量分别为山羊奶粉 / 奶牛奶粉 1:9 与 9:1 的两个浓度下的混合对照品溶液，每个浓度的溶液做六次实验，分别酶解后进入质谱进行分析，得到的结果如图 4 所示。两种奶粉在这两个浓度下的测定含量 RSD% 在 13% 以下。

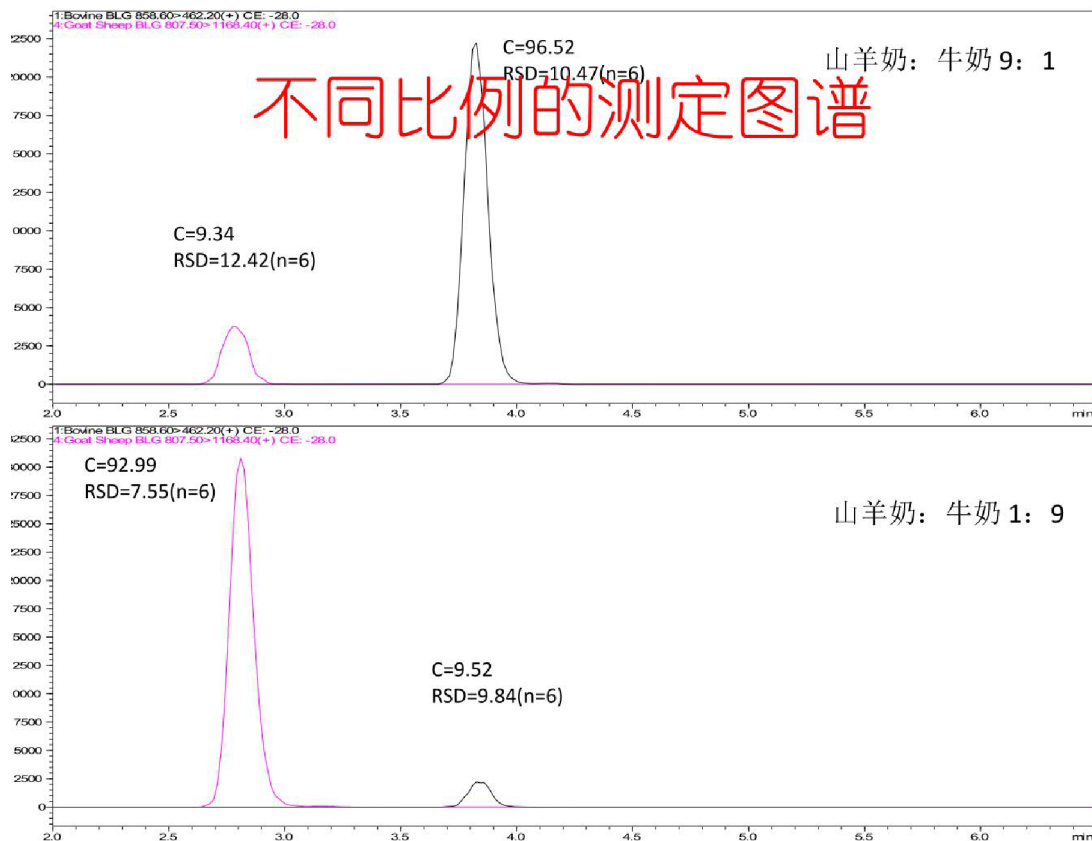


图4 山羊奶粉/奶牛奶粉含量分别为1:9（上）与9:1（下）的混合酶解溶液MRM色谱图

2.4 实际样品测定结果

抽取市售的 5 个品牌的羊奶粉样品，每个样品做三个平行样，按 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，按照已确立的方法进行测定，结果见表 4。从结果看到，只有一个品牌的羊奶粉没有添加牛奶成分，其它四个品牌的羊奶粉不同比例的添加了牛奶成分，添加的比例从 3% 到 17% 不等。

表4 市售羊奶粉中羊奶及牛奶成分检测结果

样品	相对标准牛奶比例 (%)	相对标准山羊奶比例 (%)
Sample 1	3.85±0.27	86.09±1.56
Sample 2	-	87.28±3.54
Sample 3	4.50±0.21	77.76±2.71
Sample 4	9.07±0.36	83.66±1.09
Sample 5	16.67±0.57	68.05±0.47

■ 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 联用测定山羊全脂奶粉中的山羊奶粉和奶牛奶粉成分含量的快速准确定量方法，方法曲线的线性、重复性、灵敏度均满足样品测定要求。本文还检测了市售的 5 个品牌的羊奶粉样品，结果显示只有一个品牌的羊奶粉没有添加牛奶成分，其它四个品牌的羊奶粉均不同比例的添加了牛奶成分。

■ 致谢

本文所引用的数据来源于浙江清华长三角研究院，国家食品安全风险评估中心应用技术合作中心，在此感谢其对应用报告的顺利完成提供的大力支持。