利用超高效液相色谱串联三重四级杆质谱定量检测人乳中的 α-乳白蛋白

陈 启[1], 赖世云[1], 张京顺[2], 任一平[2*]

(1. 贝因美婴童食品股份有限公司, 杭州 310057; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051)

摘 要: 目的 建立一种新型基于多肽标准品体系的人乳 α-乳白蛋白的定量检测方法。**方法** 从人乳 α-乳白蛋白筛选出特异性多肽, 并建立对应的检测方法; 利用化学方法人工合成特异性多肽、同位素标记特异性多肽和内标。**结果** 本方法所选择的多肽具有高度特异性, α-乳白蛋白的检测灵敏度为 8.0 mg/100 g, 精密度均小于 5.22%, 回收率均在 97.21%~102.45%之间。**结论** 本方法建立了利用特异性多肽检测人 α-乳白蛋白的方法, 具有较高的准确度、灵敏度和稳定性。通过对 447 份人乳样品进行检测, 初步探索了人乳中 α-乳白蛋白的含量范围, 为人乳化配方奶粉的华人配方奠定理论基础。

关键词: 人乳; 液相色谱串联三重四级杆质谱; α-乳白蛋白; 多肽标准品体系

Quantification of α-lactalbumin in human milk based on ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

CHEN Qi[1], LAI Shi-Yun[1], ZHANG Jing-Shun[2], REN Yi-Ping[2*]

(1. *Beingmate Baby & Child Food Co., Ltd., Hangzhou* 310057, *China*; 2. *Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou* 310051, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a quantitative detection of α-lactalbumin in human milk with peptide standard system. **Methods** The signature peptide for α-lactalbumin was searched and selected from the protein digestion products. The signature peptide, isotope-labelled signature peptide and internal standard peptide were also synthesized and used for establishing the quantification method. **Results** The limit of quantification for α-lactalbumin was 8.0 mg/100 g. Reproducibility were below 5.22% and spiked recoveries were between 97.21%~102.45%. **Conclusion** The validation showed that the method was with high selectivity, accuracy, reproducibility and sensitivity. The analysis results of 447 human milk samples provided the theoretical basis for infant formula suitable for Chinese babies.

KEY WORDS: human milk; UPLC-MS/MS; α-lactalbumin; peptides standard system

1 引 言

人乳中的蛋白质含量约为 1%~2%[1-4]。它可以分为酪蛋白以及乳清蛋白, 其比例约为 4:6[5]。α-乳白蛋白为主要的乳清蛋白, 占人乳含量的 0.25%左右。它能作为载物与钙、镁、锰、钠、钾以及锌[6-8]结合。Pellegrini 等[9]对牛 α-乳白蛋白的研究发现, 其水解产物还具有抗菌作用。

*通讯作者: 任一平, 教授级高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检验技术及食品安全检验技术。E-mail: renyiping@263.net

***Corresponding author:** REN Yi-Ping, Senior Engineer, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, NO.3399, Binsheng Road, Binjiang District, Hangzhou 310051, China. E-mail: renyiping@263.net

在牛乳中的酪蛋白以及乳清蛋白比例约为8:2[10]，同时乳清蛋白主要是由 α-乳白蛋白与 β-酪蛋白构成。所以在调制以牛奶为基质的人乳化配方乳粉时，需要将其蛋白质比例，尤其是 α-乳白蛋白含量，调节至类似人乳的比例，以利于婴幼儿营养吸收。

现阶段国内外对人乳中的蛋白质的定量分析研究主要停留在总蛋白含量测定水平上：利用凯氏定氮法检测蛋白氮与非蛋白氮[11,12]，以及酪蛋白和乳清蛋白[13]。而对单一蛋白质的定量研究并不多，主要采取的检测方法为反相色谱法[14]、离子交换色谱[15]、电泳法[15,16]以及免疫学方法[17]。

单一蛋白质检测方法匮乏原因是多方面的。首先上述电泳以及色谱等方法均需要提供高纯度的标准品进行定性以及定量分析，免疫学方法需要纯净的人乳单一蛋白质用于制备抗体。鉴于商品化的、单一人乳蛋白质标准品非常难以得到，也就难以建立上述检测方法。人乳中营养物质组成复杂，利用色谱以及电泳法也难以将被测化合物与基质达到基线分离；同时由于各种人乳蛋白质的理化性质十分接近，无法有效区分相似蛋白质[5]；利用免疫学方法不可避免地会产生交叉反应，对检测结果会造成影响。上述仪器法的检测均采用紫外 280 nm 检测，该波长对所有的蛋白质均有吸收，无法通过检测器对不同种类的蛋白质进行区分；同时紫外检测器的灵敏度低，检出限约为 10 μg/mL[15]。

Zhang 等[18]、Lutter 等[19]和 Heick 等[20]尝试利用蛋白质组学与液质联用技术分别对牛奶、花生等蛋白质进行分析。他们将蛋白质酶切成多肽根据现有的数据库从中筛选出特异性多肽以用于测定。但是这些方法依然在定量准确度、标准品和内标设计等方面存在不同的问题。现阶段没有任何利用该方法检测人乳蛋白的文章发表。

本文利用同样的检测原理，筛选出合适的人 α-乳白蛋白特异肽用于定性与定量检测。同时人工合成高纯度的该特异多肽作为标准品，使用同位素标记的氨基酸合成内标，排除了酶解、分离和质谱离子化、样品基质等干扰问题。从而建立一套新型的基于多肽的标准品体系，满足无蛋白质标准品情况下准确定量检测的需要。

2 材料与方法

2.1 试 剂

碳酸氢铵，二硫苏糖醇(DTT)，碘代乙酰胺(IAA)，乙酸，甲酸，乙腈，碳、氮全同位素标记的亮氨酸(L^*)购自美国 Sigma-Aldrich 公司，重组猪胰蛋白酶购自上海雅心生物技术有限公司。

标准物与内标：特异肽：CELSQLLK(纯度≥98%，水分≤1%)，同位素特异肽 CELSQL^*L^*K，内标 AKQFTKCELSQL^*L^*KDIDGYGGIA，由上海强耀公司合成。其中带*的氨基酸为碳、氮全同位素标记的氨基酸。

2.2 仪器工作条件

2.2.1 超高压液相色谱(UPLC)参数

液相色谱仪：Acquity Ultra Performance LC(美国 Waters 公司)；色谱柱：BEH 300 C_{18} (100 mm×2.1 mmi.d.，1.7 μm，美国 Waters 公司)；柱温：40 ℃，样品室温度：4 ℃，进样体积：5 μL；流动相 A：含 0.1%甲酸的水溶液，流动相 B：含 0.1%甲酸的乙腈溶液，流速 0.3 mL/min，梯度洗脱条件：在 5 min 内将流动相 B 含量从 3%提升至 32%。

2.2.2 三重四级杆质谱(MS)参数

质谱仪：TQ-S MS Xevo(美国 Waters 公司)，带 ESI 源。毛细管电压：3.0 kV，脱溶剂温度：500 ℃，脱溶剂气流量：900 L/min，锥孔反吹气流量：150 L/h，碰撞室压力：3.0×10^{-3} mbar；低端分辨率 1:2.5 V，高端分辨率 1:15.0 V，离子能量 1:0.5；低端分辨率 2:2.8 V，高端分辨率 2:15.0 V，离子能量 2:1.0；离子源温度：150 ℃，提取器电压：3.0 V，入口透镜电压：0.5 V，出口电压：0.5 V，碰撞梯度：1.0，多离子反应监测(MRM)参数见表 1。

2.3 标准曲线的配制

分别将特异肽 CELSQLLK 和同位素特异肽 CELSQL^*L^*K 用水溶解，再配制成浓度为 0.1、0.6、1.2、1.8、2.4、3.0 μmol/L 的特异肽标准曲线溶液，与 1.5 μmol/L 的同位素特异肽溶液。

由于本实验所合成的特异肽和同位素特异肽含有半胱氨酸 C，需在进样前破坏分子间的潜在的二硫键，并使其烷基化，故取 20 μL 的标准曲线溶液，加入 10 μL 同位素特异肽溶液，10 μL 的 50 mmol/L DTT 溶液与 945 μL 水，在 55 ℃水浴锅中反应 30 min。待

表 1　MRM 参数
Table 1　Conditions of multiple reactions monitoring

多肽序列	母离子 *m/z*	锥孔电压 V	子离子 *m/z*	碰撞能量 eV	裂解方式
CELSQLLK	495.8	15	290.1*	18	b2
			588.5	18	y5
			701.8	18	y6
CELSQL*L*K	502.8	15	290.1*	18	b2
			602.5	18	y5
			715.8	18	y6

*标记的子离子为定量子离子

冷却后加入 10 μL 的 150 mmol/L IAA 溶液，在暗处室温静置 30 min。最后加入 5 μL 甲酸溶液，待测。

2.4　人乳酶解

将人乳 1:100 用水稀释，经充分混匀后，取 20 μL 人乳稀释液，加入 10 μL 内标溶液(1.5 μmol/L)，10 μL 的 50 mmol/L DTT 溶液与 835 μL 水，在 55 ℃水浴锅中反应 30 min。待冷却后加入 10 μL 的 150 mmol/L IAA 溶液，在暗处室温静置 30 min。加入 100 μL 500 mmol/L 的碳酸氢铵缓冲液与 10 μL 200 μg/mL 的碱性胰蛋白酶，在 37 °C 水浴锅中反应 2 h。最后加入 5 μL 甲酸溶液终止反应，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，待测。

3　结果与讨论

3.1　特异多肽的选择

本文选择碱性胰蛋白酶作为酶切工具，利用其高度专一性，水解精氨酸与赖氨酸羧基端的肽键。通过 Uniprot 数据库(www.uniprot.org)里 PeptideMass 工具分析，α-乳白蛋白理论上可以通过酶解分别获得 14 条长短不一的多肽产物，其中有 5 个多肽序列的氨基酸数量少于 5 个，不具有足够的特异性，故不进行进一步分析。在剩余 9 条理论多肽中，搜索到其中的 8 条多肽，分别是 FLDDDITDDIMCAK、GIDYWLAHK、LEQWLCEK、NICDISCDK、CELSQLLK、SSQVPQSR、ALCTEK 和 ILDIK。未搜索到的多肽序列含有 45 个多肽，可能是由于该序列过长，其色谱分辨率过低而未测得。本文通过单离子扫描模式(SIR)与 MRM 方式对各个多肽的响应值进行评估，最终选择了色谱分离过程中无干扰，响应值最高的 CELSQLLK 多肽作为 α-乳白蛋白的特异性多肽(见图 1)。通过 Uniprot 数据库的 BLAST 分析工具对人乳中 β-酪蛋白等全部已知蛋白质的比对分析，未在其他蛋白质中发现本肽段的存在。因此，本文所选择的多肽具有高度特异性。

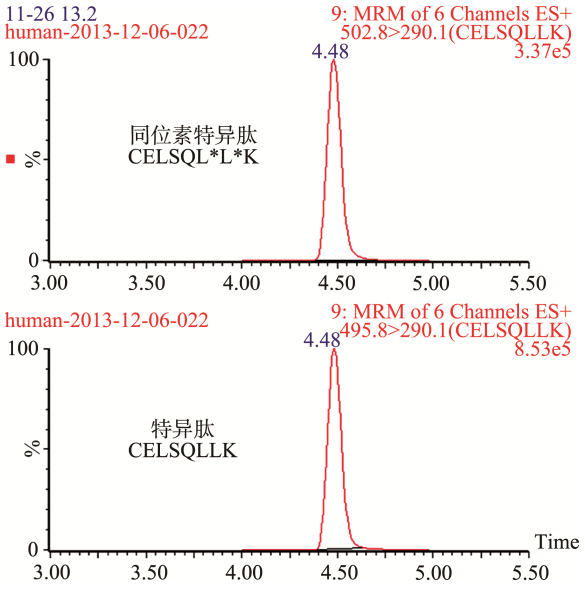

图 1　人乳样品中 α-乳白蛋白特异肽及其同位素特异肽色谱图

Fig. 1　Chromatograms of α-Lactalbumin siganture peptide and its isotope-labeled analog in the digested human milk sample

作为一般经典的分析方法，通常会使用高纯度的蛋白质作为标准品，用以定量检测样品中目标蛋白质含量。在缺乏高纯度的蛋白质标准品情况下，会无法建立对应的检测方法。而本文利用化学方法合成了特异性多肽标准品，同时购买了商品化的人 α-乳白蛋白(纯度≥85%，经 SDS-PAGE 分离纯化提取)，分别利用内标法配制标准曲线。多肽标准曲线的斜率为 1.121±0.029(n=3)，蛋白质标准曲线斜率为 1.143±0.031(n=3)，两者在统计学上无显著性差异(P>0.05)。故由此推断，可利用多肽 CELSQLLK 替代 α-乳白蛋白标准品建立标准曲线。

至今为止，人 α-乳白蛋白是唯一可获得商品化

的人乳蛋白，其他的人乳蛋白，例如 β-酪蛋白、αs1-酪蛋白，乳铁蛋白等至今均无商品化的蛋白质标准品。本文尝试通过多肽标准曲线替代了蛋白质标准曲线，结果表明：可解决蛋白质标准品缺乏的定量难题，有助于扩大检测范围。

3.2 内标的选择

在应用 UPLC-MS 法检测多肽时，多肽的响应值受到基质以及参与反应的化学试剂的影响，导致响应信号增益或抑制。介于上述问题，本文人工合成了同位素特异肽 CELSQL*L*K，其中 L*代表同位素碳 13、氮 15 全同位素标记的亮氨酸[$^{13}C_6$, ^{15}N]-Leucine。该同位素特异肽的理化性质与目标多肽完全一致，所表现出来的色、质谱行为也一致(见图 1)，能校正由基质效应所带来的检测响应值波动。

此外，在上述同位素特异肽 CELSQL*L*K 的基础上，按照蛋白质氨基酸序列，分别沿该肽的 C 端与 N 端各延长若干个氨基酸，设计并合成了作为同位素内标使用的长肽段：AKQFTKCELSQL*L*KDIDGYGGIA。将该肽段作为内标，在预处理之前加入被测样品中，经酶解等预处理过程后会产生等摩尔浓度的同位素特异肽 CELSQL*L*K。该内标不但能随基质效应所致的检测响应值而波动，还能校正复杂样品基质对酶解过程造成的干扰，并可用于指示蛋白质被酶解的程度。

3.3 方法学验证

本文通过一系列方法学实验来验证本方法的准确性与可靠性。其中标准曲线通过人工合成的特异肽与同位素特异肽配制而成。在 10~200 nmol/L 线性范围内的回归方程 y=1.254x+0.0194，相关系数 R^2 为 0.993，满足本实验检测需求。

方法检出限,通过低浓度标准品溶液计算获得。配制 2 nmol/L 的标准品溶液，进样分析后获得其信噪比，以 10 倍信噪比为定量限，乘以蛋白质的分子量与稀释倍数，计算得到该方法的检出限为 8.0 mg/100 g。

日内精密度通过重复平行处理 11 份相同样品获得，其日内精密度为 4.12%。日间精密度通过在每天重复平行处理 5 份相同样品，重复 4 天实验后获得，其日内精密度为 5.22%。

加标回收率通过在样品中加入特异肽来实现。特异肽的加入量分别为样品中蛋白质的本底摩尔浓度的 1.5 倍、1 倍与 0.5 倍，作为高、中、低浓度加标，结果见表 2。本方法的加标回收率在 97.21%~102.45%之间。

表 2 加标回收率

Table 2 Recovery results of spiked human milk

编号	低浓度加标	中浓度加标	高浓度加标
1	102.85%	98.04%	102.36%
2	100.99%	95.92%	100.93%
3	99.44%	101.24%	102.13%
4	104.84%	97.67%	103.01%
5	104.14%	93.17%	101.90%
总计	102.45%±4.22%	97.21%±3.97%	102.07%±4.79%

3.4 人乳样品检测结果以及与市售人乳化配方乳粉的比对

本人乳检测研究项目在全国范围内采集了 149 位产妇产后一周乳、两周乳与六周乳，共 447 份样品，利用本文所述方法来对人乳中 α-乳白蛋白含量进行分析，结果见图 2。

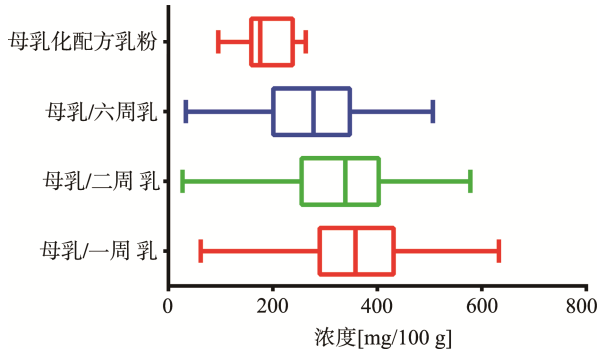

图 2 人乳样品中 α-乳白蛋白的检测结果以及与配方乳粉中含量的比较

Fig. 2 Contents of α-Lactalbumin in human milk samples and in infant formulas

由检测结果发现，一周乳、二周乳和六周乳中 α-乳白蛋白含量中间值分别为 358.8、344.0、281.4 mg/100 g。虽然有部分极大或极小的检测结果出现，但大多数 α-乳白蛋白含量依然集中在 300~450 mg/100 g 范围内。α-乳白蛋白在整个泌乳期呈递

减趋势。

利用 Zhang 等[18]的市售的人乳化配方乳粉的牛 α-乳白蛋白的含量检测结果, 按照推荐的冲调方式, 即奶粉与水的比例为 1:7, 将检测结果推算液体奶中的牛 α-乳白蛋白的含量, 结果见图 2。配方乳粉中的 α-乳白蛋白含量显著低于各阶段的人乳中 α-乳白蛋白(P<0.01)。这是由于纯 α-乳白蛋白粉价格昂贵, 产量少, 配方乳粉中一般通过牛奶乳粉和牛乳清粉调节各蛋白质含量, 而乳清粉中含有大量的 β-乳球蛋白, 最终导致无法在维持低总蛋白含量的基础上提高 α-乳白蛋白含量的比率。同时在中国乃至世界范围内缺少权威的人乳 α-乳白蛋白的定量检测方法与含量数据库, 使得各配方乳粉生产厂家缺乏有力的数据支持。这也可能是导致配方乳粉中 α-乳白蛋白含量偏低的原因之一。

4　结　论

本文设计并合成了 α-乳白蛋白的特异肽、同位素特异肽和同位素内标, 解决了蛋白质定量分析过程中, 酶切与质谱检测易受基质效应干扰的问题; 并通过一系列方法学验证, 实验证明本方法具有高准确度、灵敏度、稳定性和特异性, 适宜不同阶段人乳的 α-乳白蛋白定量分析。

本方法建立了一套基于多肽的标准品体系, 为蛋白质定量研究工作者提供了一种蛋白质定量研究的新思路, 扩展了检测范围, 使蛋白质定量分析不必受到标准品缺乏的限制。

本文对 447 个不同阶段的人乳中 α-乳白蛋白含量进行分析, 为打造人乳化配方奶粉的华人配方的蛋白质数据库奠定方法基础。

参考文献

[1] Bauer J, Gerss J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants [J]. Clin Nutr, 2011, 30(2): 215–220.

[2] Michaelsen KF, Skafte L, Badsberg JH, *et al*. Variation in macronutrients in human bank milk: influencing factors and implications for human milk banking[J]. J Pediatr Gastr Nutr, 1990, 11(2): 229–239.

[3] Wojcik KY, Rechtman DJ, Lee ML, *et al*. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk [J]. J Am Diet Assoc, 2009, 109(1): 137–140.

[4] Yamawaki N, Yamada M, Kan-no T, *et al*. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women [J]. J Trace Elem Med Bio, 2005, 19(2): 171–181.

[5] Committee on Nutritional Status During Pregnancy and Lactation. Nutrition during lactation [M]. Washington D.C.: National Academies Press, 1991.

[6] Lönnerdal B, Glazier C. Calcium binding by alpha-lactalbumin in human milk and bovine milk [J]. J Nutr, 1985, 115(9): 1209–1216.

[7] Ren J, Stuart DI, Acharya K. Alpha-lactalbumin possesses a distinct zinc binding site [J]. J Bio Chem, 1993, 268(26): 19292–19298.

[8] Permyakov EA, Morozova LA, BursteinEA. Cation binding effects on the pH, thermal and urea denaturation transitions in α-lactalbumin [J]. Biophys Chem, 1985, 21(1): 21–31.

[9] Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, *et al*. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α-lactalbumin molecule [J]. BBA-Gen Subjects, 1999, 1426(3): 439–448.

[10] Roginski H, Fuquay JW, Fox PF, *et al*. Encyclopedia of dairy sciences [M]. Amsterdam: Academic Press, 2011.

[11] Rudloff S, Kunz C. Protein and nonprotein nitrogen components in human milk, bovine milk, and infant formula: quantitative and qualitative aspects in infant nutrition [J]. J Pediatr Gastr Nutr, 1997, 24(3): 328–344.

[12] Atkinson S, Anderson G, Bryan M. Human milk: comparison of the nitrogen composition in milk from mothers of premature and full-term infants [J]. Am J Clin Nutr, 1980, 33(4): 811–815.

[13] Kunz C, Lönnerdal B. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk [J]. Acta Paediatr, 1992, 81(2): 107–112.

[14] Ferreira IM. Chromatographic separation and quantification of major human milk proteins [J]. J Liq Chromatogr RT, 2007, 30(4): 499–507.

[15] Kunz C, Lönnerdal B. Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods [J]. Am J Clin Nutr, 1990, 51(1): 37–46.

[16] Ng-Kwai-Hang K, Kroeker E. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis [J]. J Dairy Sci, 1984, 67(12): 3052–3056.

[17] Chtourou A, Brignon G, Ribadeau-Dumas B. Quantification of β-casein in human milk [J]. J Dairy Res, 1985, 52(2): 239–247.

[18] Zhang J, Lai S, Zhang Y, *et al*. Multiple reaction monitoring-based determination of bovine α-lactalbumin in infant for-

mulas and whey protein concentrates by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using tryptic signature peptides and synthetic peptide standards [J]. Anal Chim Acta, 2012, 727: 47–53.

[19] Lutter P, Parisod V, Weymuth H. Development and validation of a method for the quantification of milk proteins in food products based on liquid chromatography with mass spectrometric detection [J]. J AOAC Int, 2011, 94: 1043–1059.

[20] Heick J, Fischer M, Pöpping B. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218: 938–943.

(责任编辑: 邓伟)

作者简介

陈　启，工程师，主要研究方向为食品检验技术。
E-mail: chenqi1982@163.com

任一平，教授级高级工程师，主要研究方向为卫生理化检验技术及食品安全检验技术。
E-mail: renyiping@263.net

“水产品加工与贮藏”专题征稿

水产品腐败变质的原因主要是水产品本身带有的或贮运过程中污染的微生物，在适宜条件下生长繁殖，分解鱼体蛋白质、氨基酸、脂肪等成分产生有异臭味和独行的物质，致使水产品腐败变质，丧失食用价值，这不仅造成巨大的经济损失，而且威胁到人们的生命健康。因此，以杀死微生物为目标的杀菌技术，一直是水产品加工行业以及整个食品行业共同关注的问题。水产品加工不同于其他食品，不仅要求保持水产品原有的风味和色泽，还要具有良好的口感和质地，因此水产品的加工与贮藏技术影响着整个水产工业的发展。

鉴于此，本刊特别策划了“水产品加工与贮藏”专题，由**渤海大学励建荣教授**担任主编，围绕**水产品保鲜加工技术、水产品加工副产物的综合利用、海洋生物活性物质的提取分离机活性鉴定研究、功能性保健食品和海洋药物的研制、水产品的质量安全研究和风险评估**等或您认为本领域有意义的问题展开讨论，计划在 2014 年 10 月出版。

本刊编辑部和励教授欢迎各位专家为本专题撰写稿件，以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可，请在 2014 年 9 月 10 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式：

网站：www.chinafoodj.com

Email：tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部