液相色谱-串联质谱法测定牛乳基婴幼儿配方奶粉中的乳铁蛋白

赵 飒[1], 张晓梅[1], 鲍 蕾[2*], 魏 帅[2], 高瑞刚[1], 马世波[3], 李明哲[1], 卜汉萍[2], 何京澄[1], 张鸿伟[1*], 梁成珠[1]

[1. 青岛海关技术中心, 青岛 266114; 2. 雀巢研发(中国)有限公司雀巢食品安全研究院, 北京 100015; 3. 圣元营养食品有限公司, 青岛 266400]

摘 要: 目的 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定牛乳基婴幼儿配方奶粉中的乳铁蛋白含量的分析方法。**方法** 试样中的乳铁蛋白经尿素-碳酸氢铵缓冲液提取, 二硫苏糖醇还原, 碘乙酰胺烷基化, 37 ℃酶解后, 特征肽段用液相色谱-串联质谱正离子模式测定, 内标法定量。**结果** 乳铁蛋白在 0.00080~0.16000 pmol/μL(相当于 10~2000 mg/100 g)水平间线性关系良好, 相关系数 r=0.9997, 定量限为 0.0020 pmol/μL(相当于 25 mg/100 g), 加标回收率为 89.71%~106.28%, 相对标准偏差为 2.96%~4.15%。**结论** 该方法准确度好、特异性强、灵敏度高, 可用于牛乳基婴幼儿配方奶粉中的乳铁蛋白含量的测定。

关键词: 牛乳基婴幼儿配方奶粉; 液相色谱-串联质谱法; 乳铁蛋白; 特征肽段

Determination of lactoferrin in milk-based infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHAO Sa[1], ZHANG Xiao-Mei[1], BAO Lei[2*], WEI Shuai[2], GAO Rui-Gang[1], MA Shi-Bo[3], LI Ming-Zhe[1], BU Han-Ping[2], HE Jing-Cheng[1], ZHANG Hong-Wei[1*], LIANG Cheng-Zhu[1]

[1. *Technology Center of Qingdao Customs District*, *Qingdao* 266114, *China*; 2. *Nestlé Food Safety Institute*, *Nestlé Research & Development* (*China*) *Co*., *Ltd*., *Beijing* 100015, *China*; 3. *Synutra Nutrition Foods Co.*, *Ltd.*, *Qingdao* 266400, *China*]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of lactoferrin in milk-based infant formula by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Lactoferrin was extracted by urea-ammonium bicarbonate buffer, reduced with dithiothreitol, alkylated with iodoacetamide, digested at 37 ℃. Afterwards, the lactoferrin was quantified using the derived signature peptides using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in positive ion mode with correction of isotope-labelling internal standard. **Results** The method showed a good linearity between 0.00080–0.16000 pmol/μL (correspond to 10-2000 mg/100 g) with the correlation

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFE0110800)、青岛海关科研项目(QK202101)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program (2017YFE0110800), and the Qingdao Customs District Science and Technology Program (QK202101)

***通信作者:** 鲍蕾, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: lei.bao@rd.nestle.com

张鸿伟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全检测。E-mail: light04@126.com

***Corresponding author:** BAO Lei, Ph.D, Professor, Nestlé Food Safety Institute (China), Beijing 100015, China. E-mail: lei.bao@rd.nestle.com

ZHANG Hong-Wei, Ph.D, Professor, Technology Center of Qingdao Customs District, No.83 Xinyue Road, Chengyang District, Qingdao 266114, China. E-mail: light04@126.com

coefficient r=0.9997. The limit of quantitation for the method was 0.0020 pmol/μL, which was equivalent to 25 mg/100 g. The recoveries ranged from 89.71% to 106.28%, and relative standard deviations varied from 2.96%–4.15%. **Conclusion**　The proposed method has good accuracy and specificity, as well as high sensitivity, which can be used for the determination of lactoferrin in milk-based infant formula.

KEY WORDS: milk-based infant formula; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; lactoferrin; signature peptide

0　引　言

乳铁蛋白(lactoferrin, Lf)是一种具有多种功能的天然活性蛋白, 又称乳转铁蛋白。它多存在于哺乳动物的分泌物中, 其中以人乳及牛乳中含量较高[1−2]。研究表明, 乳铁蛋白在广谱抗菌、抗氧化、抗病毒、调节胃肠道对铁的吸收、促进神经系统发育等方面发挥着重要作用[3−6]。由于母乳有限, 目前, 向婴幼儿配方奶粉中添加从牛乳中分离纯化的乳铁蛋白已成为配方奶粉“母乳化”的又一重要方向[7−8]。在 GB 14880—2012《食品营养强化剂使用标准》中, 乳铁蛋白允许添加量小于等于 1.0 g/kg。卫生部 2004 年第 6 号公告中规定, 婴幼儿配方奶粉、较大婴儿和幼儿配方奶粉中乳铁蛋白的最大使用量为 30~100 mg/100 g。

目前乳铁蛋白的测定方法主要有分光光度法[9]、高效液相色谱法[10]、酶联免疫吸附法[11−12]、高效亲和色谱法[13]以及表面等离子共振技术[14]、毛细管电泳技术[15]等。高效液相色谱法、高效亲和色谱法、分光光度法需对样品进行纯化和浓缩, 耗时长、过程烦琐; 酶联免疫法在方法灵敏度和克服食品基质效应方面还有不足, 导致检测结果存在不稳定性, 容易出现假阳性。同时, 国内目前尚无奶粉中乳铁蛋白含量测定的国家标准, 仅有 2019 年天津市奶业科技创新协会发布的 T/TDSTIA 006—2019《奶及奶制品中乳铁蛋白的测定 液相色谱法》, 该方法定量限较高、操作耗时较长, 方法特异性易受其他蛋白影响。

近年来, 液相色谱-串联质谱技术(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)因其具有灵敏度和准确度高、特异性强、重现性好的特点而在食品质量安全检测中被广泛应用[16−18]。同时, 介于特征肽段的蛋白定量分析方法也在食品分析领域中不断被报道[19−20]。相比其他分析技术, 基于质谱分析的方法可有效避免非目标蛋白对目标蛋白分析的干扰, 且同位素内标的使用有效改善了样品基质效应的影响[21−22], 从而实现对目标蛋白的准确定量分析。本研究使用蛋白组学技术筛选出牛乳铁蛋白特征肽段, 并合成相关特征肽段同位素内标, 基于 LC-MS/MS 建立了牛乳基婴幼儿配方奶粉中乳铁蛋白含量的测定方法, 具体分析流程图见图 1。同时通过对市售实际样品的检测分析, 为相关乳品生产企业提供了一种更加准确、高效的测定技术手段, 对其实际生产过程中的质量控制与营养评估具有重要现实意义。

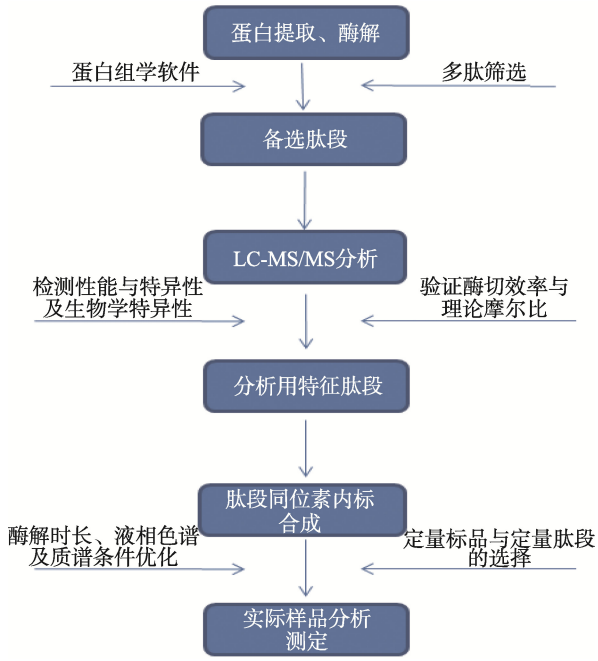


图 1　研究分析流程图

Fig.1　Flow chart of research and analysis

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

不同品类婴幼儿配方奶粉(市购)。

尿素、碳酸氢铵(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙腈、甲酸(色谱纯)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT, 纯度≥99%)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA, 纯度≥99%)(美国 Sigma 公司); 胰蛋白酶(序列分析纯, 美国 Promega 公司); 超纯水(Direct8 超纯水机制备, 德国 Milli-Q 公司); 特征肽段 1 (SFQLFGSPPGQR, 纯度≥95%)、特征肽段 1 同位素标记内标(SFQLFGSPPGQ*R, 纯度≥95%)、特征肽段 2 (GSNFQLDQLQGR, 纯度≥95%)、特征肽段 2 同位素标记内标(GSNFQLDQLQG*R, 纯度≥95%)(合肥国肽生物科技有限公司); 牛乳铁蛋白(纯度≥95%, 上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

APUS PLUS 液相色谱仪(成都珂睿科技有限公司); Sciex 6500 三重四极杆质谱仪(美国 SCIEX 公司); BSA223S 分析天平(德国赛多利斯公司); IKA MS3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); K-80 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司); D-63505 恒温培养箱(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液配制

精密称定特征肽段 1、2 与其同位素内标, 用 0.1%甲酸水-乙腈溶液溶解并稀释, 配制成质量浓度为 100 pmol/μL 的标准肽段和内标标准肽段贮备液, –20 ℃以下保存, 有效期 6 个月。分别准确吸取标准肽段和同位素内标贮备液各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1%甲酸水-乙腈溶液稀释至刻度, 配制成质量浓度为 10 pmol/μL 的标准中间液, –20 ℃以下保存, 有效期 3 个月。分别准确吸取上述标准中间液各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1%甲酸水-乙腈溶液稀释至刻度, 配制成质量浓度为 1 pmol/μL 的标准工作液。2~8 ℃保存, 现用现配。

准确称取牛乳铁蛋白标准品 1.0 g 于 10 mL 容量瓶中, 加少量超纯水溶解, 随后定容至 10 mL 作为牛乳铁蛋白标准储备溶液。

1.3.2 乳铁蛋白提取及酶解

准确称取 1.00 g (±0.05 g)试样, 用尿素-碳酸氢铵缓冲液溶解并定容至 50 mL, 于(60±2) ℃水浴中加热 30 min, 并间歇摇动, 随后冷却至室温。取 500 μL 上述冷却试样于 96 孔板中, 加入 40 μL DTT, 涡旋混合, 于(60±2) ℃水浴中加热 30 min, 冷却至室温后再加入 40 μL IAA, 涡旋混合, 避光反应 30 min。取 20 μL 反应后试样于新 96 孔板中, 加入 60 μL 碳酸氢铵溶液与 40 μL 胰蛋白酶, 混匀, (37±2) ℃恒温酶解 2 h。

1.3.3 样品的稀释

稀释取决于样品中乳铁蛋白的估计量。

对于乳铁蛋白含量低于 1000 mg/100 g 的样品, 取酶解后试样 50 μL, 加入 50 μL 甲酸水-乙腈溶液(80:20, *V*:*V*, 0.2%甲酸)与 100 μL 0.02 pmol/μL 内标工作液, 进行稀释。对于乳铁蛋白含量在 1000~2000 mg/100 g 的样品, 取酶解后试样 50 μL, 加入 100 μL 甲酸水-乙腈溶液(85:15, *V*:*V*, 0.15%甲酸)与 150 μL 0.02 pmol/μL 内标工作液。

1.3.4 仪器条件

(1)液相色谱条件

色谱柱: Phenomenex Kintex C_{18} (50 mm×2.1 mm, 1.3 μm); 流动相: A: 0.1%甲酸水溶液, B: 0.1%甲酸水-乙腈溶液; 流速: 0.35 mL/min; 柱温: 25 ℃; 进样量 5 μL; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 90% A; 1.0~4.0 min, 90%~65% A; 4.0~4.5 min, 65%~10% A; 4.5~6.0 min, 10%~90% A。

(2)质谱条件

离子源: 电喷雾离子源正离子(electron spray ionization, ESI+)模式; 离子喷雾电压: 4500 V; 扫描模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 加热模块温度: 450 ℃; 质谱参数见表 1。

表 1 2 种乳铁蛋白肽段及内标物的质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters of 2 kinds of lactoferrin peptide and their internal standard substances

肽段	定性离子对(*m*/*z*)	定量离子对(*m*/*z*)	去簇电压/V	碰撞能量/V
SFQLFGSPPGQR	660.9/698.4	660.9/698.4	40	14
	660.9/554.3		40	12
GSNFQLDQLQGR	681.9/829.5	681.9/829.5	40	9
	681.9/232.1		40	12
SFQLFGSPPGQ*R	665.9/708.4	/	40	11
GSNFQLDQLQG*R	686.8/839.5	/	40	11

注: /表示无此项。

1.3.5 结果计算

试样中乳铁蛋白的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{C \times V \times D \times 82620 \times 100}{S \times 10^9} \quad (1)$$

式中:

X—供试试样中乳铁蛋白含量, mg/100 g;

C—由标准曲线得到的被测组分浓度, pmol/μL;

V—初始样品溶液的体积, μL;

S—样品质量, g;

D—稀释系数;

82620 为乳铁蛋白的相对分子质量。

稀释系数 *D* 按式(2)计算:

$$D = \frac{V_1 \times V_2 \times V_3}{A_1 \times A_2 \times A_3} \quad (2)$$

式中:

V_1—还原/烷基化的总样品量(580 μL);

V_2—酶解后的总样品量(120 μL);

V_3—最终稀释后的总样品量(500 μL);

A_1—用于还原/烷基化的样品量(500 μL);

A_2—用于酶解的试样体积(20 μL);

A_3—用于最终稀释的试样体积(50 μL)。

2 结果与分析

2.1 特征肽段的选择

牛乳铁蛋白是一个含有 708 个氨基酸残基的由 2 个叶片状结构组成的分子量约在 78 kD 的蛋白分子, 其氨基酸序列

见图 2。特征肽段是指能特异性指代牛乳铁蛋白的胰蛋白酶酶切后产生的可定量重现的牛乳铁蛋白氨基酸残基序列。特征肽段的选取要同时具备生物学特异性和检测特异性。针对牛乳铁特征肽段的特异性, 筛选原则如下: (1)与完整蛋白分子有明确的质量摩尔比; (2)具有种属特异性; (3)氨基酸残基数目 8~16; (2)序列中不含蛋氨酸、半胱氨酸和组氨酸残基; (3)序列不含 N-糖基化位点; (4)酶切后不含脯氨酸及修饰氨基酸残基; (5)响应及峰形良好; (6)无离子对串扰; (7)保留时间适宜。

针对本方法采用的特征肽段(定量肽段 SFQLFGSPPGQR 与定性肽段 GSNFQLDQLQGR)其生物学特异性分析如下: 在 Uniprot 蛋白数据库(www.uniprot.org) (2021.06.04)中检索, 在 BOVIN 项下共发现 3 个具有完整氨基酸序列的牛乳铁蛋白条目: 分别为: SP｜P24627｜TRFL_BOVIN(已审核)、TR｜Q6LBN7｜Q6LBN7_BOVIN 和 TR｜C7FE01｜C7FE01_BOVIN, 对上述 3 个条目进行蛋白序列比对分析, 结果见图 3。由图 2 和图 3 可见, 选择的特征肽段与牛乳铁蛋白的理论摩尔比为 1:1, 同时在数据库收录的所有牛乳铁蛋白中均含有该特征肽段序列。在使用 Uniprot 数据库进行肽段唯一性检索结果如下: 定量肽段 SFQLFGSPPGQR 在 Uniprot 收录的 42 个蛋白质中, 其最低的亚科归属为牛亚科(Bovinae), 证实了肽段 SFQLFGSPPGQR 的生物学特异性, 即该肽段在目前的蛋白数据库中仅存在于牛亚科动物中。

本方法选定的特征肽段检测特异性如下: 在本方法优化的色谱质谱条件下, 2 条特征肽段在奶粉基质中的典型质量色谱图见图 4。由图 4 可见, 2 个肽段的选择离子对与内标离子对在奶粉基质中峰形良好, 在保留时间窗口内无明显干扰峰, 提示该 2 条特征肽段在优化的色谱质谱条件下可进行准确的定量分析。

2.2　前处理及仪器分析方法优化

2.2.1　酶切时长优化

在前处理方面, 为了保证牛乳铁蛋白的酶切效率, 本研究采用测序级酶(promega, 19038 U/mg)进行了酶切效率的比较。使用市售牛乳基婴幼儿配方奶粉(牛乳铁蛋白标识值为 50 mg/100 g), 在 37 ℃分别考察了酶切时长为 1、2、3、5、8、16、24 h, 结果显示 2 h 特征肽段的测定值即达到峰值, 故采用 2 h 作为酶切时长。

	1	11	21	31	41	51	
	｜	｜	｜	｜	｜	｜	
1		A	PRKNVRICTI	SQPEWFKCRR	WQWRMKKLGA	PSITCYRRAF	60
61	ALECIRAIAE	KKADAVTLDG	GMVFEAGRDP	YKLRPVAAEI	YGTKESPQTH	YYAVAVVKKG	120
121	SNFQLDQLQG	RKSCGTGLGR	SAGWIIPMGL	LRPYLSWTES	LEPLQGAVAK	FFSASCVPCI	180
181	DRQAYPNLCQ	LCKGEGENQC	ACSSREPYPG	YSGAFKCLQD	GAGDVAFVKE	TTVFENLPEK	240
241	ADRDQYELLC	LNNSRAPVDA	FKECHLAQVP	SHAWVARSVD	GKEDLIWKLL	SKAQEKFGKN	300
301	KSRSFQLFGS	PPGQRDLLFK	DSALGFLRIP	SKVDSALYLG	SRYLTTLKNL	RETAEEVKAR	360
361	YTRVVWCAVG	PEEQKKCQQW	SQQSGQNVTC	ATASTTDDCI	VLVLKGEADA	LNLDGGYTYT	420
421	AGKCGLVPVL	AENRKSSKHS	SLDCVLRPTE	GYLAVAVVKK	ANEGLTWNSL	KDKKSCHTAV	480
481	DRTAGWNIPM	GLIVNQTGSC	AFDEPRSQSC	APCADPKSRL	CALCAGDDQG	LDKCVPNSKH	540
541	KYYGYTGAFR	GLAEDVGDVA	FVKNOTWWEN	TNGESTADWA	KNLNREDPRL	LCLDGTRKPV	600
601	TEAQSCHLAV	APNHAVVSRS	DRAAHVKQVL	LHQQALFGKN	GKNCPDKFCL	FKSETKNLLF	660
661	NDNTECLAKL	GCRPTYEEYL	GTEYVTAIAN	LKKCSTSPLL	EACAFLTR		

图 2　牛乳铁蛋白氨基酸序列

Fig.2　Amino acid sequence of bovine lactoferrin

```
SP|P24627|TRFL_BOVIN      ALECIRAIAEKKADAVTLDGGMVFEAGRDPYKLRPVAAEIYGTKESPOTHYYAVAVVKKG 120
TR|Q6LBN7|Q6LBN7_BOVIN   ALECIRAIAEKKADAVTLDGGMVFEACRDPYKLRPVAAEIYGTKESPOTHYYAVAVVKKG  93
TR|C7FE01|C7FE01_BOVIN   ALECIRAIAEKKADAVTLDGGMVFEAGRDPYKLRPVAAEIYGTKESPOTHYYAVAVVKKG 102
                         ************************************************************

SP|P24627|TRFL_BOVIN      SNFQLDQLQGRKSCHTGLGRSAGWIIPMGILRPYLSWTESLEPLQGAVAKFFSASCVPCI 180
TR|Q6LBN7|Q6LBN7_BOVIN   SNFQLDQLQGRKSCHTGLGRSAGWIIPMGILRPYLSWTESLEPLQGAVAKFFSASCVPCI 153
TR|C7FE01|C7FE01_BOVIN   SNFQLDQLQGRKSCHTGLGRSAGWIIPMGILRPYLSWTESLEPLQGAVAKFFSASCVPCI 162
                         ************************************************************

SP|P24627|TRFL_BOVIN      KSHSFQLFGSPPGQRDLLFKDSALGFLRIPSKVDSALYLGSRYLTTLKNLRETAEEVKAR 360
TR|Q6LBN7|Q6LBN7_BOVIN   KSRSFQLFGSPPGQRDLLFKDSALGFLRIPSKVDSALYLGSRYLTTLKNLRETAEEVKAR 333
TR|C7FE01|C7FE01_BOVIN   KSHSFQLFGSPPGQRDLLFKDSALGFLRIPSKVDSALYLGSRYLTTLKNLRETAEEVKAR 342
                         ************************************************************
```

注: 方框位置为 2 个特征肽段的氨基酸残基序列。

图 3　牛乳铁蛋白数据库检索序列比对分析

Fig.3　Alignment of bovine lactoferrin based on database searching

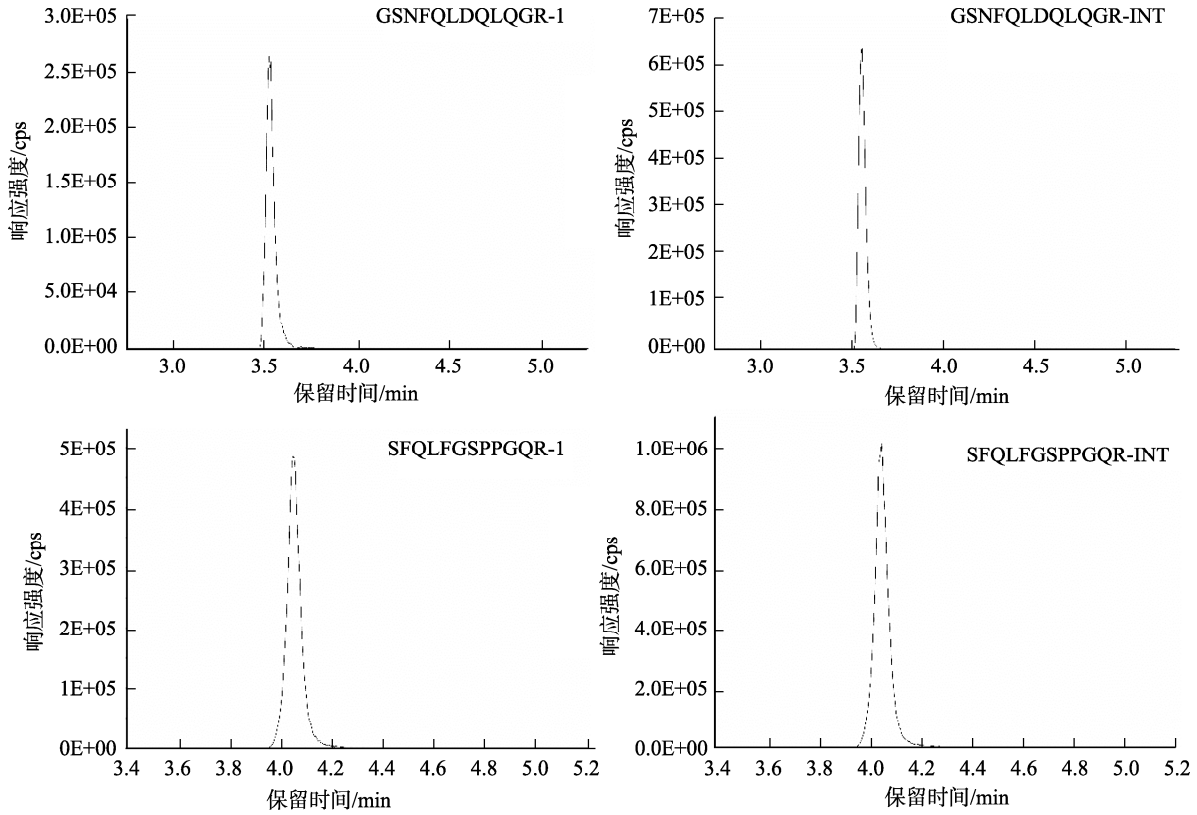


图 4 SFQLFGSPPGQR 与 GSNFQLDQLQGR 的典型 MRM 离子流图

Fig.4 Typical MRM ion flow diagrams of GSNFQLDQLQGR and SFQLFGSPPGQR

2.2.2 色谱条件优化

先后采用 Waters Cortex C_{18} (2.1 mm×75 mm, 1.6 μm)、Agilent Poroshell C_{18} (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)、Phenomenex Kintex C_{18} (2.1 mm×50 mm, 1.3 μm)色谱柱进行了色谱分离的比较, 结果显示, 采用 Phenomenex Kintex C_{18} (2.1 mm×50 mm, 1.3 μm)色谱柱分离时间短(6 min 中可以完成 1 个色谱循环)、特征肽段保留时间适宜(SFQLFGSPPGQR, 4.10 min; GSNFQLDQLQGR, 3.57 min)、基质干扰小, 故选择该型色谱柱进行特征肽段的分离分析。

2.2.3 质谱条件优化

对质谱条件进行了包括离子源温度、喷雾电压和碰撞能量的优化, 结果见表 1。依据优化参数设置, 发现 2 个特征肽段响应良好、无离子对串扰现象, 证明了肽段的氨基酸长度适宜、具有较高的电喷雾离子源离子化效率。

2.3 定量标准品与定量肽段的选择

为考察特征肽段对乳铁蛋白标准品定量结果的可比性, 本方法采用豆基奶粉作为空白对照(该基质除了不含乳铁蛋白外, 其他组分与牛乳基奶粉组分构成极为相似), 采用标准添加进行定量分析比对。

分别以标准肽段溶液与乳铁蛋白标准溶液对豆基奶粉进行添加回收实验, 在 50、100、500 mg/100 g 水平上添加牛乳铁蛋白, 并分别绘制牛乳铁蛋白基质匹配标准曲线和特征肽段溶剂标准曲线进行定量分析, 回收结果见表 2。

表 2 基于豆基奶粉的特征肽段与牛乳铁蛋白的添加回收率比较 (n=6)

Table 2 Comparison of add recoveries of characteristic peptides based on soy milk powder and lactoferrin (n=6)

添加水平 /(mg/100 g)	测定值/(mg/100 g)	
	牛乳铁蛋白 (基质匹配标准曲线)	特征肽段 SFQLFGSPPGQR (溶剂标准曲线)
50	46.70±1.71[a]	48.30±1.77[a]
100	95.19±5.89[b]	98.44±6.09[b]
500	492.54±4.00[c]	497.66±4.04[c]

注: 同一行相同字母表示无显著性差异(P>0.05)。

由表 2 可见, 使用定量特征肽段 SFQLFGSPPGQR 绘制的溶液标准曲线定量结果与使用牛乳铁蛋白基质匹配的定量结果无明显差别(P>0.05)。提示可以采用特征肽段 SFQLFGSPPGQR 作为定量肽段用作牛乳铁蛋白的含量测定分析。

需要指出的是, 定性特征肽段 GSNFQLDQLQGR 的定量分析结果明显低于使用牛乳铁蛋白作为标准品的定量值(数据未列出), 提示 GSNFQLDQLQGR 的酶切效率未能达

到该肽段在蛋白中的理论摩尔比值, 但其定量结果的稳定性提示其可以作为定性肽段来使用。

上述研究证明, 在定量肽段的选择上需验证肽段的酶切效率是否能达到该肽段在蛋白中的理论摩尔比值, 否则将影响最终牛乳铁蛋白的定量结果, 而相关文献[23]的研究并未对这一方面进行验证。

2.4　线性范围及定量限

为考察采用特征肽段进行定量分析方法的动态线性范围和定量限是否满足乳铁蛋白作为强化组分的量化要求, 本研究采用定量特征肽段 SFQLFGSPPGQR 进行了标准曲线的绘制, 结果显示该定量肽段浓度在 0.00080~0.16000 pmol/μL(相当于 10~2000 mg/100 g)范围内均有良好线性关系, 标准曲线方程为 Y=11.7X+1.08×10^{-4}, r=0.9997, 可满足样品定量分析的需要, 以 10 倍信噪比(S/N)计算方法定量限为 0.0020 pmol/μL, 相当于 25 mg/100 g, 满足作为强化组分的测定限范围。

2.5　准确度与精密度

使用本研究建立的方法对市售牛乳基婴幼儿配方奶粉(0~6 月龄, 2 段)进行添加回收实验, 经本方法测定该实验用奶粉的牛乳铁蛋白本底值为(113.00±3.08) mg/100 g (n=6), 添加水平设计为 100、500、1000 mg/100 g, 扣除本底后计算回收率, 结果见表 3。同时, 经前期对各市售牛乳基婴幼儿配方奶粉的牛乳铁蛋白含量测定, 选取其中 3 种含量具有代表性的样本进行室内重现性测试, 其牛乳蛋白本底值分别为: (81.50±2.15)、(153.80±3.26)、(452.40±2.98) mg/100 g (n=6), 结果见表 4。结果得出, 方法在 100、500、1000 mg/100 g 的添加水平上, 回收率范围为 89.71%~106.28%; 室内重现性测定结果显示, 方法的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 2.96%~4.15%, 重现性良好。

表 3　牛乳基婴幼儿配方奶粉中牛乳铁蛋白加标回收率实验结果(%)
Table 3　Recoveries of the spiked samples at three different levels (%)

添加浓度/(mg/100 g)	测定次数					
	1	2	3	4	5	6
100	98.44	92.00	98.92	97.52	106.28	101.20
500	98.33	101.90	89.71	98.33	98.45	97.87
1000	97.76	99.37	99.37	97.53	94.54	95.46

表 4　室内重现性实验结果
Table 4　Results of in-house reproducibility

样本编号/本底值	测定值/(mg/100 g)						RSDs/%
	1	2	3	4	5	6	
样本 1/81.50 mg/100 g	86.14	84.19	82.00	83.38	84.42	88.21	3.98
	80.96	79.70	78.55	78.89	87.06	80.27	
	82.23	77.97	81.08	85.68	86.03	87.75	
样本 2/153.80 mg/100 g	155.26	167.91	167.91	163.31	171.36	157.56	2.96
	162.16	161.01	167.91	159.86	154.11	162.16	
	163.31	167.91	163.31	164.46	158.71	167.94	
样本 3/452.40 mg/100 g	480.98	447.03	460.48	465.88	503.63	498.18	4.15
	496.03	497.98	499.68	456.48	472.98	497.98	
	463.48	459.68	468.68	449.68	477.18	450.03	

2.6　实际样品测定

应用本方法测定了市售的 7 种不同品牌和不同阶段的婴幼儿配方奶粉, 检测结果显示相关产品的牛乳铁蛋白的测定值均高于产品的标示值, 该结果表明一方面相关市售产品不存在超量标示的情况, 另一方面也提示本方法的测定值与生产商计算量之间存在差异。

造成差异可能的原因是现有婴幼儿配方奶粉的生产工艺通常包括较为剧烈的加工过程(如加热、强烈搅拌等)[24–25], 该过程通常会导致牛乳级婴幼儿配方奶粉中原本含有的牛乳铁蛋白变性失活, 为增加牛乳铁蛋白的含量和保证其活性, 生产商通常会在这些剧烈工艺之后再添加天然的牛乳铁蛋白, 其标示量通常以此为基础计算, 但本方法是基于特征肽

段进行牛乳基乳铁蛋白的含量测定，测定的应该是所有含有该特征肽段的牛乳铁蛋白的量值，如果是上述原因，测定结果就包括了本底值和后来强化加入的量，因此就会导致基于本方法测定值偏高的情况。另一方面，也不排除生产商使用其他测定方法进行标识值的计算，如液相色谱法、酶联免疫法等，方法之间的差异也会导致标示值与本方法测定值的不同。同时，由于商业利益导致的虚假标识，也是可能的原因之一。

3 结 论

本研究基于蛋白组学技术，筛选出针对牛乳铁蛋白的 2 条特征肽段，分别作为定量肽段和辅助定性肽段，并合成了特征肽段的稳定同位素内标，以此建立了基于 LC-MS/MS 的定量分析方法。基于特征肽段质谱检测的定量方法具有特异性强、灵敏度高的特点，配合稳定同位素内标可有效抑制奶粉的基质效应影响，准确度与重现性均优于现有分析方法。同时，由于蛋白一级结构的相对稳定性，合适长度的特征肽段对热、机械剪切等影响因素具有更好的分析稳定性，在方法的耐用性和转移性方面也具有独特的优势，可作为未来进行乳铁蛋白准确定量分析的优选方法。

但需要指出的是，由于乳铁蛋白作为功能组分强化是乳铁蛋白标识的主要原因，蛋白功能性基础通常来源于蛋白的高级构象，而基于质谱的分析方法目前还无法区分定量具有高级构象的蛋白，因此，由于工艺和强化步骤而引入的功能性蛋白的量的变化尚无法使用本研究建立的方法加以区分，应合理地看待基于本方法的检测结果与标示值之间的差异。进一步探讨生产工艺、强化方式与基于质谱定量方法之间的乳铁蛋白量的变化规律，寻找能有效表征功能蛋白量的方法将是下一步工作的重点，以期为牛乳基婴幼儿配方奶粉中乳铁蛋白的含量测定提供更为有效的技术解决方案。

参考文献

[1] GUO M. Human milk biochemistry and infant formula manufacturing technology [M]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014.

[2] BEVAN D, BODLAENDER P, SHEMIND. Probable role of lactoferrin in the transport of iron across the intestinal brush border [J]. Nutr Rev, 1980, 38(7): 256–257.

[3] 肖红艳, 兰欣怡, 张佩华. 乳铁蛋白生物学功能研究进展[J]. 中国奶牛, 2021, (4): 46–50.
XIAO HY, LAN XY, ZHANG PH. Research progress on biological function of lactoferrin [J]. Chin Dairy Cattle, 2021, (4): 46–50.

[4] GIFFORD JL, HUNTER HN, VOGEL HJ. Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(22): 2588–2598.

[5] MANEVA A, TALEVA B, MANEVA L. Lactoferrin-protector against oxidative stress and regulator of glycolysis in human erythrocytes [J]. Zeit Fur Naturforsch Sect C, 2016, 58(3–4): 256–262.

[6] PATTAMTTA U, WILLCOX M, STAPLETON F, *et al*. Bovine lactoferrin promotes corneal wound healingand suppresses IL-1 expression in alkali wounded mouse cornea [J]. Curr Eye Res, 2013, 38(11): 1110–1117.

[7] 赵红霞. 乳铁蛋白的功能特性及其在婴儿配方奶粉中的应用[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(6): 36–39.
ZHAO HX. Function of lactoferrin and the application of lactoferrin in infant formula milk powder [J]. Chin Dairy Ind, 2016, 44(6): 36–39.

[8] BO L. Bioactive proteins in human milk: Health, nutrition, and implications for infant formulas [J]. J Pediatr US, 2016, 173: 4–9.

[9] 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, 46(3): 29–34.
XIAO YX, ZHAO SC, DONG YJ, *et al*. Advances in biological functions and determination methods of lactoferrin [J]. Chin Dairy Ind, 2018, 46(3): 29–34.

[10] 朱丹丹, 洪辉, 吴红宇, 等. 高效液相色谱法测定特殊医学用途婴幼儿配方食品中乳铁蛋白含量[J]. 现代食品, 2020, (18): 190–193.
ZHU DD, HONG H, WU HY, *et al*. Determination of lactoferrin content in special medical infant formula food by high performance liquid chromatography [J]. Mod Food, 2020, (18): 190–193.

[11] 吴春香, 刘志楠, 赵源, 等. 酶联免疫吸附法快速检测婴儿配方奶粉中乳铁蛋白含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 803–807.
WU CX, LIU ZN, ZHAO Y, *et al*. Rapid detection of lactoferrin content in infant formula by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(4): 803–807.

[12] VAN ASEC, DE KLERK B, HETTINGA KA, *et al*. A proteomics-based identification of putative biomarkers for disease in bovine milk [J]. Vet Immunol Immunop, 2016, 174: 11–18.

[13] 陈晓旭, 宋桂雪, 童玉, 等. 高效亲和色谱法检测液体奶和奶制品中乳铁蛋白的质量浓度[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(12): 40–42.
CHEN XX, SONG GX, TONG Y, *et al*. Determination of lactoferrin in milk and milk products by high performance affinity chromatography [J]. Chin Dairy Ind, 2013, 41(12): 40–42.

[14] 庞莉莉, 邱焕焕, 黄俊逸. 乳铁蛋白检测技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(6): 161–164.
PANG LL, QIU HH, HUAN JY. Advance in detection technique of lactoferrin [J]. Food Res Dev, 2011, 32(6): 161–164.

[15] CHEN H. Analysis method of lactoferrin based on uncoated capillary electrophoresis [J]. eFood, 2021, 2(3): 147–153.

[16] 郭庆龙, 崔淑华, 王英华, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬中胺苯吡菌酮残留量[J]. 分析试验室, 2021, 40(9): 1053–1058.
GUO QL, CUI SH, WANG YH, *et al*. Determination of amphetamine residues in fruits and vegetables by ultra high performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2021, 40(9): 1053–1058.

[17] 王凤美, 何京橙, 张鸿伟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测动物血浆中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(12): 5023–5028.
WANG FM, HE JC, ZHANG HW, *et al*. Determination of clenbuterol,ractopamine and salbutamol in animal plasma by ultra high performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(12): 5023–5028.

[18] 许辉, 张鸿伟, 王凤美, 等. 液相色谱-串联质谱法检测奶制品中 9 种 *β*-受体阻断剂药物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12):

3884–3890.

XU H, ZHANG HW, WANG FM, *et al*. Determination of 9 *β*-blokers residues in dairy products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(12): 3884–3890.

[19] ELLIMGSON J, SHIPPAR J, VENNARD R, *et al*. Analytical method for lactoferrin in milk-based infant formulas by signature peptide quantification with ultra-high performance LC-tandem mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 2019, 102(3): 915–925.

[20] YUAN MM, FENG C, WANG SY, *et al*. Selection of possible signature peptides for the detection of bovine lactoferrin in infant formulas by LC-MS/MS [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0184152.

[21] 谢慧英, 袁娅, 于晖, 等. 同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿谷类辅助食品中的15种真菌毒素和6种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(13): 5306–5313.

XIE HY, YUAN Y, YU H, *et al*. Simultaneous determination of 15 mycotoxins and 6 pesticide residues in infant cereal auxiliary foods by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(13): 5306–5313.

[22] 苏萌, 艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(2): 511–515.

SU M, AI LF. Matrix effects and elimination methods of liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(2): 511–515.

[23] 张京顺. 应用高效液相色谱-串联质谱技术定量检测婴幼儿配方食品中牛乳铁蛋白[C]. 中国乳制品工业协会第十九次年会, 2013.

ZHANG JS. Determination of lactoferrin in infant formula food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [C]. The 19th Annual Meeting of China Dairy Industry Association, 2013.

[24] 胡小苗. 配方奶粉生产工艺特点及影响产品质量的因素[J]. 食品界, 2018, (10): 133.

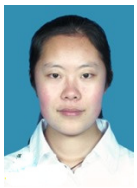
HU XM. Production process characteristics of formula milk powder and factors affecting product quality [J]. Food Ind, 2018, (10): 133.

[25] 孙健, 王青云, 宫春颖. 不同工艺对配方奶粉中营养素稳定性的影响研究[J]. 中国乳业, 2018, (10): 68–71.

SUN J, WANG QY, GONG CY. Effects of different processes on the stability of nutrients in formula milk powder [J]. Chin Dairy, 2018, (10): 68–71.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



赵　飒, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。
E-mail: 425643339@qq.com

鲍　蕾, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: lei.bao@rd.nestle.com

张鸿伟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全检测.
E-mail: light04@126.com