

羊乳婴幼儿配方粉中牛乳成分鉴别与测定模型的建立

张立佳^{1,2}, 莫楠^{1,2}, 刘丽君^{1,2}, 韩晓旭¹, 赖世云³,
任一平⁴, 尹睿杰¹, 李翠枝^{1,2*}

[1. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司, 呼和浩特 010110; 2. 国家市场监管重点实验室(乳及乳制品检测与监控技术) 上海 201100; 3. 杭州璞湃科技有限公司, 杭州 310007; 4. 浙江清华长三角研究院, 嘉兴 314006]

摘要: **目的** 基于超高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)建立羊乳婴幼儿配方粉中牛乳的鉴别与测定模型, 实现羊乳婴幼儿配方粉中牛乳成分的快速分析。**方法** 样品经胰蛋白酶水解, 采用四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, Q-Orbitrap-HRMS)结合蛋白数据库筛选特征肽段。选择具有代表性的羊全脂乳粉、牛全脂乳粉、羊乳清粉、牛乳清粉, 分别按不同的比例进行混合, UPLC-MS/MS 测定, 通过换算系数构建特征肽与牛全脂奶粉和牛乳清粉的鉴别和定量分析模型。**结果** 牛 β -酪蛋白与牛全脂奶粉的换算系数 k_1 为 2.8343, 牛 β -乳球蛋白与牛全脂奶粉的换算系数 k_2 为 1.6542, 牛 β -乳球蛋白与牛乳清粉的换算系数 k_3 为 27.8598。牛 β -乳球蛋白和牛 β -酪蛋白在 20~1000 nmol/L 范围内, 线性关系良好; 方法的检出限为 1.9 g/kg, 定量限为 6.4 g/kg; 日内精密密度为 3.2%~8.1%, 日间精密密度为 3.4%~7.3%, 准确度为 99.0%~103.0%; 经 3 家实验室验证, 方法准确度为 91.5%~103.0%; 重复性相对标准偏差为 4.3%~5.1%, 再现性相对标准偏差为 4.7%~5.7%。**结论** 该模型可分别对羊乳婴幼儿配方粉中牛乳清粉和牛全脂乳粉进行鉴别与测定, 两者之和即为牛乳含量。该模型极大地简化了前处理, 具有操作简便、快速、方法实用性强等优点。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 特征肽段; 羊乳婴幼儿配方粉; 牛乳; 模型

Identification and quantitative model establishment for cow milk components in infant and young children goat formulas

ZHANG Li-Jia^{1,2}, MO Nan^{1,2}, LIU Li-Jun^{1,2}, HAN Xiao-Xu¹, LAI Shi-Yun³,
REN Yi-Ping⁴, YIN Rui-Jie¹, LI Cui-Zhi^{1,2*}

(1. Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd., Hohhot 010110, China; 2. Key Laboratory of Milk and Dairy Products Detection and Monitoring Technology for State Market Regulation, Shanghai 201100, China; 3. Hangzhou Pupa Technology Co., Ltd., Hangzhou 310007, China; 4. Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314006, China)

ABSTRACT: Objective To develop an identification and quantitative model for the rapid analysis of cow milk components in infant and young children goat formulas based on ultra performance liquid chromatography-tandem

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFF0215206)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFF0215206)

*通信作者: 李翠枝, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全管理及检验检测技术研究。E-mail: lczg@yili.com

*Corresponding author: LI Cui-Zhi, Master, Professor, Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd., Hohhot 010110, China. E-mail: lczg@yili.com

mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were hydrolyzed by trypsin, and the marker peptides were screened by combining protein database with quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry (Q-Orbitrap-HRMS). The representative goat whole milk powder, bovine whole milk powder, goat whey powder and bovine whey powder were selected and mixed in different proportions, respectively. Identification and quantitative analysis model was established for peptide marker and bovine whole milk powder and bovine whey powder by the conversion coefficient. **Results** The conversion coefficient k_1 of bovine β -casein and bovine whole milk powder was 2.8343, and the conversion coefficient k_2 of bovine β -lactoglobulin and bovine whole milk powder was 1.6542. The conversion coefficient k_3 of bovine β -lactoglobulin and bovine whey powder was 27.8598. The β -lactoglobulin and β -casein had a good linear relationship in the range of 20–1000 nmol/L, the limit of detection was 1.9 g/kg and the limit of quantitation was 6.4 g/kg. The recoveries ranged from 99.0% to 103.0%, and the precision of intra- and inter-day precision were 3.2% to 8.1% and 3.4% to 7.3%, respectively. The method was verified by 3 laboratories, the accuracy of the method were 91.5%–103.0%. The repeatability relative standard deviations were 4.3%–5.1%. The reproducibility relative standard deviations were 4.7%–5.7%. **Conclusion** This model can be used for the identification and determination of bovine whey powder and bovine whole milk powder in infant and young children goat formulas, respectively, the sum of the 2 is the content of bovine milk. This model greatly simplifies the preprocessing, which is simple, fast and practical.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; peptide marker; infant and young children goat formulas; bovine milk; model

0 引言

羊乳作为特色小众乳品具有较好的营养特性,与牛乳相比,羊乳的脂肪球更小,干物质含量较高,酪蛋白和乳清蛋白比例更接近母乳^[1-5],在消化吸收、抗氧化、降低胆固醇、修复及改善肠道功能、低致敏性等多个方面都具有优势^[6-11]。因此,羊乳基婴幼儿配方奶粉具有独特的营养特性和健康益处,越来越受消费者欢迎。然而,由于羊乳原料价格要高于牛乳,因此存在着为了追求经济利益往羊乳基婴幼儿配方奶粉中掺入牛乳的现象。我国《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》(国家食品药品监督管理总局令第 26 号)中规定产品名称中有动物性来源的,应当根据产品配方在配料表中如实标明使用的生乳、乳粉、乳清(蛋白)粉等乳制品原料的动物性来源。婴幼儿配方乳粉原料为羊乳(粉)的,产品名称可标注为婴幼儿配方羊乳粉,并应当在配料表中标明每 100 g 产品中羊乳(粉)所占比例,以及乳清蛋白粉来源。但是我国当前并没有相关的标准规定羊乳基婴幼儿配方奶粉中牛乳成分的测定方法。因此,有必要对婴幼儿配方羊乳粉中牛乳的鉴定及定量进行研究。

目前,羊乳粉中牛乳成分的检测方法主要有聚合酶链式反应法(polymerase chain reaction, PCR)^[12-17]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[18-21]、高分辨质谱法^[22-25]、毛细管电泳法^[26-27]和高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass

spectrometry, HPLC-MS/MS)^[28]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[29]和高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)^[30]。PCR 的主要原理是对羊乳中含有的奶牛 DNA 片段进行提取纯化与扩增后检测,进而对羊乳中是否含有奶牛源性成分进行鉴定。PCR 是通过间接检测奶中的 DNA 作为定性依据。奶中的 DNA 来源于体细胞,而体细胞含量受到许多干扰因素的影响,如个体奶牛的乳腺是否健康、产奶的季节等,PCR 无法对牛乳成分进行定量。ELISA 利用的是抗原抗体特异结合原理,具有特异性强、灵敏度高及操作简单,可进行现场检测等优点。然而在工业加工后的乳制品检测中,ELISA 可能会出现大量的假阴性结果,这是因为经过热加工、酶解、添加其他原料等不同生产工艺处理后,复杂的乳制品组分会不同程度地干扰 ELISA 的测定。因此,ELISA 法主要适用于蛋白质未变性的鲜奶等样品检测,在加工后乳制品的真假鉴别中受到极大的限制。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)为代表的高分辨质谱法在蛋白指纹谱库的建立与分析中具有独特的优势,通过检测选定的生物标记物可以获得乳制品中物种来源和地域来源等信息,是一种准确性较高的快速检测技术。但是由于高分辨质谱仪器造价昂贵,难以在监管部门和乳制品生产企业中进行普及。毛细管电泳法在婴幼儿配

基质中的应用受热变性和美拉德糖基化反应影响, 方法的稳定性和重复性上争议较大, 同时无法区分牛乳中全脂乳粉和乳清粉的占比。UPLC-MS/MS 是以特征肽为特异性指标进行定性和定量检测的技术, 具有操作简单、灵敏、准确等诸多优点, 但是目前报道的主要是鉴别羊乳粉中牛乳清粉成分^[27-28], 鲜有报道羊乳基婴幼儿配方奶粉中牛全脂乳粉和牛乳清粉的测定方法。

本研究基于靶向蛋白质组学检测技术和胰蛋白酶特异酶切特性, 将四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry, Q-Orbitrap-HRMS)与蛋白质数据库结合, 筛选获得目标蛋白候选特异肽段, 确定生物标记肽段, 并合成相应的同位素标记肽段作为内标, 利用 UPLC-MS/MS 研究特异肽段与蛋白质换算系数, 通过换算系数构建特征肽与牛全脂奶粉和牛乳清粉的鉴别与测定模型, 为羊乳婴幼儿配方粉中牛乳清粉和牛全脂乳粉鉴别与测定提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

羊乳粉、牛乳粉均为市售预包装产品。

碳酸氢铵(分析纯)、甲酸(LC-MS 级)(上海安谱实验科技股份有限公司); 碘代乙酰胺、二硫苏糖醇(高级纯, 瑞士阿达玛斯试剂有限公司); 测序级蛋白酶(10000~20000 BAEE units/mg, 上海雅心公司); 同位素标记内标特征肽段(色谱纯, 上海强耀公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Meker 公司)。

1.2 仪器与设备

LTQ-Orbitrap 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TQ-S 超高效液相色谱-串联质谱仪、Acquity UPLC BEH300 C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司); KS 501 涡旋混合振荡器(德国 IKA 公司); Milli-Q 型纯水机(美国 Merck 公司); MS205DU 十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

称取乳粉试样约 0.5 g(精确至 0.0001 g)于 50 mL 烧杯中, 用水分次将试样充分溶解后转移到 25 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 100 μL 于 2 mL 离心管中, 加入 50 μL 5 μmol/L 稳定同位素标记内标中间混合溶液, 待酶解。向上述溶液中加入 200 μL 500 mmol/L 的碳酸氢铵溶液和 10 μL 500 mmol/L 二硫苏糖醇溶液, 混匀后于 70°C 下恒温水浴 30 min; 冷却至室温, 加入 30 μL 500 mmol/L 碘代乙酰胺溶液, 暗处静置 30 min; 再加入 20 μL 1.0 mg/mL 的胰蛋白

酶溶液, 充分混匀后于 37°C 恒温水浴中酶解 2 h。加入 10 μL 的甲酸终止酶解, 室温下静置 15 min, 加入 580 μL 的超纯水。用 0.22 μm 滤膜过滤, 供仪器分析。

1.3.2 定量模型的设计

本研究首先考虑选择具有代表性的羊全脂乳粉、牛全脂乳粉和羊乳清粉、牛乳清粉, 然后分别按不同的比例进行混合, 既在羊全脂粉中加入不同比例的牛全脂粉及在羊乳清粉中加入不同比例的牛乳清粉, 制作出两组牛、羊不同比例的标准物质曲线。

1.3.3 UPLC-MS/MS 测定

色谱条件: UPLC BEH300 C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液(V:V), 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈(V:V); 流速为 0.3 mL/min; 柱温为 35°C; 进样体积为 5 μL; 梯度洗脱: 0~1.0 min, 5% B; 1.0~3.0 min, 5%~40% B; 3.0~5.0 min, 40%~100% B; 5.0~7.0 min, 100% B; 7.5 min, 5% B, 并保持 3.0 min。

质谱条件: 电离模式为电喷雾正离子源; 毛细管电压为 4.5 kV; 离子源温度为 150°C; 脱溶剂温度为 325°C; 脱溶剂气流量为 10 L/min; 鞘气温度为 375°C, 鞘气流量为 11.5 L/min; 分别采用离子扫描模式及多反应离子监测模式进行测定。

1.4 数据处理

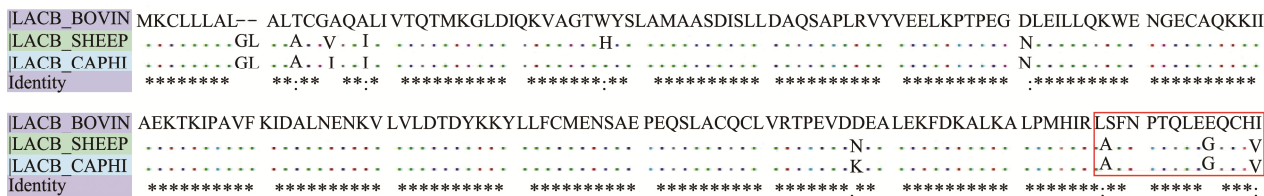
使用 Waters MassLynx V4.1 对超高效液相色谱-串联质谱仪采集数据进行处理, 采用 Origin 2022 绘图, 采用 Microsoft Excel 2016 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 特异肽段的筛选

牛乳蛋白与羊乳蛋白具有一定的同源性, 两者氨基酸序列十分接近(>90%)^[31], 因此直接在蛋白质结构层次上对其进行分离定性具有较大的难度, 同时, 由于蛋白质变性可能导致定量的准确性受到影响。因此, 本方法基于靶向蛋白质组学检测技术, 从肽段层面出发, 利用测序级胰蛋白酶对肽段的特异性酶切, 利用蛋白质组学数据库与高分辨质谱仪采集数据, 从 β-酪蛋白和 β-乳球蛋白中筛选出合适的特异肽段作为生物标记肽段, 从而实现羊乳粉样品中牛乳成分的定性与定量分析。

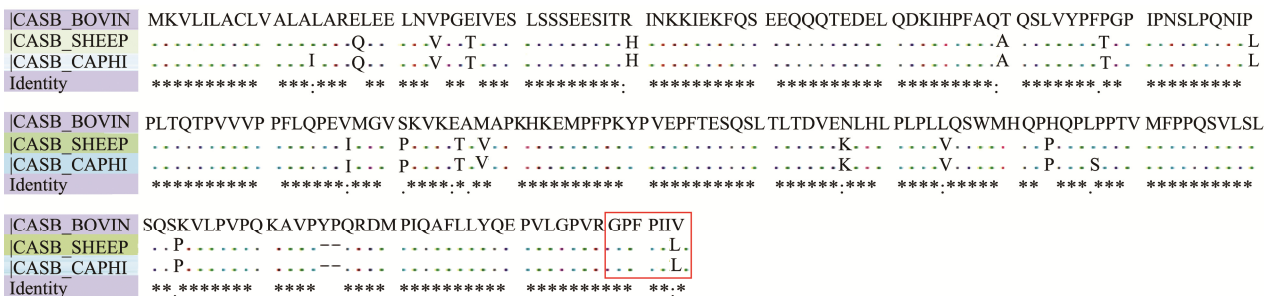
首先从 Uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org>)中查询属于牛乳和羊乳的 β-酪蛋白与 β-乳球蛋白的氨基酸序列数据, 并用高分辨质谱蛋白软件对它们进行比对分析, 如图 1~2 所示。通过比对分析, 可得出理论上可用于牛、羊区分的 β-酪蛋白和 β-乳球蛋白的特异肽段, 表 1 梳理了适于色谱分离、质谱检测的牛、羊 β-酪蛋白和 β-乳球蛋白的特异肽段。



注: 方框标注为牛、羊乳清蛋白特异肽段。

图 1 牛、羊乳清蛋白氨基酸序列

Fig.1 Amino acid sequence of the goat and bovine β -lactoglobulin



注: 方框标注为牛、羊 β -酪蛋白氨基酸特异肽段。

图 2 牛、羊 β -酪蛋白氨基酸序列

Fig.2 Amino acid sequence of the goat and bovine β -casein

表 1 牛羊区分特异肽段肽段

Table 1 Peptide markers in goat and bovine milk

蛋白序列	牛 β -乳球蛋白	羊 β -乳球蛋白	牛- β -酪蛋白	羊 β -酪蛋白
特异肽段	LIVTQTMK LSFNPTQLEEQCHI	IIVTQTMK LAFNPTQLEGQCHV	EAMAPK GPFPIIV	ETMVPK GPFPIIV

本研究对候选特异肽段的选择主要基于以下几点: 1) 候选特异肽段的特异性应当满足区分牛乳和羊乳蛋白质成分的要求, 由于山羊乳和绵羊乳的相互掺假无经济利益驱动, 同时考虑到方法的通用性, 所选候选特异肽段应可以同时检测山羊乳和绵羊乳; 2) 候选特异肽段应有良好的质谱响应; 3) 候选特异肽段在样品分析检测中应当具有良好的稳定性, 因此如含有甲硫氨酸(M)的肽段尽量避免选择, 因其极易被氧化; 4) 候选特异肽段的长度不应过长(<14), 过长的肽段序列可能导致较差的色谱行为、较低的质谱响应和过高的合成成本。综上, 选择氨基酸序列 LAFNPTQLEGQCHV 为羊 β -乳球蛋白的特异性肽段, 氨基酸序列 GPFPIIV 为羊 β -酪蛋白的特异性肽段, 氨基酸序列 LSFNPTQLEEQCHI 为牛 β -乳球蛋白的特异性肽段, 氨基酸序列 GPFPIIV 为牛 β -酪蛋白的特异性肽段, 如表 2 所示。由于肽段在不同样品中基质效应不同, 因此通过外标法测得的峰面积响应值差异较大, 使用同位素氨基酸替代普通氨基酸合成的同位素标记肽段是一种简单而有效的内标。因此本研究合成了同位素标记肽段 LSFNPTQL*EEQCHI*和 GPFPI*I*V 分别作为相应生物标记肽段的同位素内标, 用来校正样品中存在的基质效应,

表 2 蛋白的特征肽段

Table 2 Peptide markers in goat and bovine milk

类别	蛋白名称	羊	牛
乳清蛋白	β -乳球蛋白	LAFNPTQLEGQCHV	LSFNPTQLEEQCHI
酪蛋白	β -酪蛋白	GPFPIIV	GPFPIIV

其中 L*为同位素标记的亮氨酸(Leu-OH-¹³C₆, ¹⁵N), I*为同位素标记的异亮氨酸(Ile-OH-¹³C₆, ¹⁵N)。

2.2 流动相梯度条件优化

本研究中肽段分离的难点主要在牛羊 β -酪蛋白特异肽段的分离。其原因是牛羊 β -酪蛋白特异肽段(GPFPIIV 和 GPFPIIV)不同的两个氨基酸为异亮氨酸 I 和亮氨酸 L, 两氨基酸为同分异构体, 在质谱中不能通过不同分子量来达到分离的目的, 因此, 只能通过改变色谱洗脱条件来提高分离度以获得牛、羊 β -酪蛋白的完全分离。选用最常用的流动相 0.1%甲酸水和 0.1%甲酸乙腈, 用较快的梯度条件, 使 β -乳球蛋白和 β -酪蛋白均在液相中出峰, 发现 β -乳球蛋白特异肽段保留能力较弱, 出峰时间短, 而 β -酪蛋白特异肽段, 出峰时间长, 但牛羊 β -酪蛋白色谱峰存在重合现象。

在此基础上, 在 β -乳球蛋白特异肽段出峰后, 改变液相的梯度条件(将有机相比例降低), 使 β -酪蛋白出峰时间延长, 以达到分离目的。经过多次实验调节, 最终定流动相梯度条件 1.3.3, 使肽段 GPFPIIV 和 GPFPIIV 达到了完全分离。

2.3 定量模型的设计

本研究在羊全脂粉中加入不同比例的牛全脂粉及在羊乳清粉中加入不同比例的牛乳清粉, 制作出两组牛、羊不同比例的标准物质曲线, 配制比例如表 3 所示。

因本研究选择的直接测试目标是 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白的特异性肽段, 因此设想若能将全脂粉和乳清粉的两条曲线转为用 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白特异性肽段曲线, 那么可大大降低实验操作的复杂性, 缩短检测周期提高检测效率, 同时提高检测结果的稳定性。而若想用 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白特异肽段的曲线来替代全脂粉和乳清粉的曲线, 那么必须要建立 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白与全脂粉和乳清粉之间的关系。

2.4 模型数据的验证

为获得牛全脂粉和牛乳清粉与其相应特征肽段换算系数, 按表 3 的配制方法, 对各 3 个不同批次的牛全脂粉和牛

乳清粉进行连续 3 d 实验, 采用牛 β -酪蛋白和牛 β -乳球蛋白的标准曲线方程进行定量计算, 获得各自的物质的量含量, 结果如表 4 和表 5 所示。不同浓度点 3 d 共 9 次实验数据日间精密密度范围为 1.18%~6.13%, 符合方法精密密度 10%规定。

表 3 羊全脂粉和羊乳清粉中添加不同比例牛乳成分实验设计
Table 3 Experimental design of adding different proportions of milk components to sheep whole fat powder and sheep whey powder

序号	全脂粉/g		乳清粉/g	
	牛全脂粉	羊全脂粉	牛乳清粉	羊乳清粉
1	0.000	5.000	0.000	2.500
2	0.050	4.950	0.025	2.475
3	0.125	4.875	0.050	2.450
4	0.250	4.750	0.125	2.375
5	0.625	4.375	0.250	2.250
6	1.250	3.750	0.625	1.875
7	2.500	2.500	1.250	1.250
8	3.750	1.250	2.000	0.500
9	5.000	0.000	2.500	0.000

表 4 牛全脂奶粉中 β -酪蛋白与 β -乳球蛋白的含量
Table 4 β -casein and β -lactoglobulin content in bovine whole milk powder

牛全脂粉称量/g	蛋白名称	测定结果/(μ mol)								
		第 1 d			第 2 d			第 3 d		
0.000		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
0.050		0.148	0.148	0.146	0.147	0.149	0.156	0.141	0.147	0.141
0.125		0.369	0.366	0.369	0.360	0.372	0.370	0.358	0.359	0.357
0.250		0.753	0.735	0.736	0.724	0.739	0.735	0.709	0.715	0.712
0.625	牛 β -酪蛋白	1.895	1.837	1.762	1.920	1.849	1.754	1.914	1.875	1.766
1.250		3.355	3.349	3.456	3.448	3.584	3.396	3.361	3.342	3.452
2.500		6.967	7.352	7.048	7.088	7.210	7.166	6.910	7.206	7.018
3.750		10.517	10.821	10.597	10.608	10.765	10.799	10.340	10.801	10.618
5.000		14.424	14.070	14.005	14.252	14.212	13.970	14.372	14.194	13.987
0.000		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
0.050		0.085	0.086	0.082	0.079	0.081	0.078	0.086	0.081	0.080
0.125		0.205	0.216	0.197	0.195	0.200	0.189	0.215	0.199	0.200
0.250		0.428	0.448	0.385	0.379	0.399	0.371	0.403	0.386	0.400
0.625	牛 β -乳球蛋白	1.098	1.029	1.030	1.107	1.037	1.043	1.100	1.055	1.059
1.250		2.162	2.072	2.136	2.049	2.038	1.991	2.074	2.012	2.058
2.500		3.941	4.285	4.163	3.960	4.006	3.964	4.138	4.131	4.205
3.750		6.051	6.234	6.330	6.176	6.120	6.131	6.319	6.244	6.225
5.000		8.153	8.352	8.416	8.167	8.290	8.394	8.118	8.293	8.450

注: N.D.代表未检出, 下同。

表 5 牛乳清粉中 β -乳球蛋白的含量
Table 5 β -lactoglobulin content in bovine whey powder

牛乳清粉 称量/g	测定结果/(μmol)								
	第 1 d			第 2 d			第 3 d		
0.000	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
0.025	0.621	0.633	0.631	0.634	0.636	0.627	0.635	0.657	0.635
0.050	1.236	1.243	1.254	1.256	1.252	1.263	1.279	1.239	1.289
0.125	3.082	3.160	3.157	3.128	3.125	3.141	3.209	3.208	3.176
0.250	6.965	7.146	6.867	6.609	7.138	7.264	6.705	6.545	6.495
0.625	18.309	17.213	17.548	18.151	17.580	17.621	17.880	17.613	17.474
1.250	35.370	34.919	33.675	33.937	35.306	34.975	35.806	35.400	36.044
2.000	55.577	57.023	55.762	56.123	56.775	54.869	55.975	56.325	56.885
2.500	69.423	70.425	69.212	69.866	68.734	69.729	67.431	68.909	68.646

以牛全脂粉或乳清粉的质量(X_1 、 X_2 、 X_3 , g)为横坐标, 牛 β -酪蛋白或 β -乳球蛋白的物质的量(Y_1 、 Y_2 、 Y_3 , μmol)为纵坐标, 进行线性拟合获得线性方程及相关系数, 线性方程的斜率即为每克牛全脂粉或乳清粉对应的牛 β -酪蛋白或 β -乳球蛋白的物质的量, 也即牛全脂粉或乳清粉与牛 β -酪蛋白或 β -乳球蛋白的换算系数 k 。结果显示, 牛全脂奶粉和牛 β -酪蛋白的线性方程为 $Y_1=2.8343X_1$, 线性相关系数为 0.999; 牛全脂粉与牛 β -酪蛋白的换算系数 k_1 为 2.8343; 牛全脂奶粉和牛 β -乳球蛋白的线性方程为 $Y_2=1.6542X_2$, 线性相关系数为 0.999, 牛全脂粉与牛 β -乳球蛋白的换算系数 k_2 为 1.6542; 牛乳清粉和牛 β -乳球蛋白的线性方程为 $Y_3=27.8598X_3$, 线性相关系数为 0.999, 牛乳清粉与牛 β -乳球蛋白的换算系数 k_3 为 27.8598。

2.5 结果输出

因本研究的内容是羊乳配方奶粉中牛乳含量的测定, 因此第一要则是羊乳配方奶粉, 也即需先进行对配方奶粉的定性判定, 要求针对每个试样的羊 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白的通道均有极高的响应。而试样中的牛乳的含量则由公式(1)计算获得:

$$X_{\text{bovine}} = \left(\frac{n_L}{k_3} + \frac{k_3 - k_2}{k_1 \times k_3} \times n_C \right) \times \frac{V}{m} \times 10 \times 10^{-3} \times 1000 \quad (1)$$

式中: X_{bovine} 为羊配方奶粉中牛乳含量, g/kg; n_C 为从标准工作曲线中得到的牛 β -酪蛋白溶液浓度, nmol/L; n_L 为从标准工作曲线中得到的牛 β -乳球蛋白的浓度, nmol/L; V 为样品溶液定容体积, L, 正常为 0.025; m 为试样的质量, g; k_1 为牛 β -酪蛋白与牛全脂奶粉的换算系数, 取值 2.8343, $\mu\text{mol/g}$; k_2 为牛 β -乳球蛋白与牛全脂奶粉的换算系数, 取值 1.6542, $\mu\text{mol/g}$; k_3 为牛 β -乳球蛋白与牛乳清粉的换算系数, 取值 27.8598, $\mu\text{mol/g}$ 。结果保留至小数点后一位。

2.6 方法学验证结果

2.6.1 线性关系

用 0.1% 甲酸水配制浓度分别为 20、50、100、250、

500、750 和 1000 nmol/L 的标准工作溶液, 进样分析, 以浓度(X)为横坐标, β -乳球蛋白和 β -牛酪蛋白特异肽分别与其同位素内标峰面积比值(Y)为纵坐标进行线性拟合, 得线性回归方程及线性相关系数(r^2), 重复 3 d 实验, 结果如表 6 所示, 在 20~1000 nmol/L 范围内, 牛 β -乳球蛋白和牛 β -酪蛋白的线性相关系数 r^2 均为 0.999, 线性关系良好, 3 d 的斜率偏差牛 β -乳球蛋白为 $0.66501 \pm 2.1359E^{-4}$, 牛 β -酪蛋白为 $0.3846 \pm 5.52929E^{-4}$, 方法的稳定性较好, 满足日常检测需求。

表 6 标准曲线与相关系数
Table 6 Standard curves and correlation coefficients

名称	线性方程	r^2
牛 β -乳球蛋白	$Y=0.549498X+1.73578$	0.999
	$Y=0.530204X+2.06698$	0.999
	$Y=0.697443X+0.542084$	0.999
牛 β -酪蛋白	$Y=0.373805X+0.382871$	0.999
	$Y=0.389741X+0.277365$	0.999
	$Y=0.352506X+0.141288$	0.999

2.6.2 准确度

通过对牛乳掺入量已知的羊乳配方奶粉的测定来评估方法的准确度, 本研究分别选取了牛乳掺入量为 1%、5%、7% 和 10%, 其中 1%、5% 和 10% 由掺入牛全脂粉制得, 而 7% 的掺入量则是由分别掺入 5% 的全脂粉和 2% 的乳清粉制得。根据既定方法对每个样品进行测定, 每次测定平行 6 次实验, 连续重复 3 d 实验, 结果如表 7 所示。无论何种掺入方式, 在牛乳掺入量在 1%~10% 的样品中, 检测结果的准确度均在 99.0%~103.0% 之间, 满足准确定量的要求。

2.6.3 精密度

取样品 1、样品 2 和样品 3, 按既定方法进行处理, 每个样品均进行 6 次平行实验, 计算样品中牛乳的含量及测定值的相对平均标准偏差(relative standard deviation, RSD), 由 RSD 来评判方法的精密度, 结果如表 8 所示。日内精密度的 3.2%~8.1%, 日间精密度的 3.4%~7.3%, 均在 10% 之内, 满足准确定量的要求。

表 7 准确度结果
Table 7 Accuracy results

样品名称	掺入量/(g/kg)	测定结果/(g/kg)						均值	准确度/%
		1	2	3	4	5	6		
样品 1	10.0	10.5	9.8	9.5	9.7	9.7	9.9	9.9	99.0
		10.7	10.0	10.3	9.3	9.1	9.2		
		10.7	10.1	9.8	10.0	9.9	10.1		
样品 2	50.0	49.2	49.4	49.6	50.6	51.6	50.2	51.1	102.2
		51.2	50.9	51.2	49.5	51.7	50.6		
		52.6	50.7	51.3	53.0	53.4	52.7		
样品 3	100.0	98.6	98.9	99.9	102.7	102.4	105.3	103.0	103.0
		101.0	104.0	104.0	107.4	100.6	104.4		
		101.9	101.0	103.9	105.3	105.1	108.1		
样品 4	70.0	68.7	70.3	67.7	70.2	70.0	72.8	69.8	99.7
		64.8	66.2	65.1	66.5	68.8	67.8		
		72.0	72.7	72.5	73.1	71.3	75.7		

表 8 精密度结果
Table 8 Precision results

样品名称	测定结果/(g/100 g)						日内精密度/%	日间精密度/%
	1	2	3	4	5	6		
样品 1	10.9	10.9	11.4	9.7	9.3	10.0	8.1	7.3
	9.3	10.9	9.7	9.7	9.1	9.9	6.4	
	9.0	10.5	9.2	9.9	9.2	10.1	6.3	
样品 2	50.6	49.2	53.0	50.6	49.5	53.0	3.2	3.4
	52.1	49.5	54.7	51.6	51.7	53.4	3.4	
	51.7	49.2	54.4	50.2	50.6	52.7	3.6	
样品 3	116.8	109.2	119.0	102.7	107.4	105.3	5.9	5.9
	116.0	109.4	120.8	102.4	100.6	105.1	7.3	
	114.0	107.0	119.7	105.3	104.4	108.1	5.4	

2.6.4 检出限和定量限

选择最低可接受浓度的样品空白独立测定 10 次, 计算测定结果的标准偏差(standard deviation, s), 以 $3s$ 作为方法的检出限(limit of detection, LOD), $10s$ 作为定量限(limit of quantitation, LOQ), 得出本方法的检出限为 1.9 g/kg, 定量限为 6.4 g/kg, 满足 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法评定和指南》中 5.4.2.2 规定检出限 $S/N > 3$ 和定量限 $S/N > 10$ 规定。

2.7 外部实验室间比对

取 3 种不同类型的样品, 由 3 家外部实验室根据本研究的方法 1.3.2 和 1.3.3 独立开展实验, 对本研究建立测定模型的准确性进行验证, 验证结果如表 9 所示, 3 家外部实验室准确度为 91.5%~103.0%, 说明本研究定量模型可行。根据 GB/T 6379.2—2004《测量方法与结果的准确度 第 2 部分: 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》中的规定, 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法中 7.4.4 和 7.4.5 中计算获得各样本的总平均值、重复性方差、实验室间方差、再现性方差、重复性相对标准偏差及再现性相对标准偏差结果显示, 实验室间方法的重复性标准偏

表 9 准确度结果
Table 9 Accuracy results

样品	理论含量/(g/kg)	实验室	测定结果/(g/kg)	准确度/%
样品 1	10	实验室 1	9.6	96.0
		实验室 2	10.0	100.0
		实验室 3	10.3	103.0
样品 2	50	实验室 1	47.7	95.4
		实验室 2	45.8	91.5
		实验室 3	47.9	95.8
样品 3	100	实验室 1	97.3	97.3
		实验室 2	92.3	92.3
		实验室 3	99.5	99.5

差为 4.3%~5.1%, 再现性标准偏差为 4.7%~5.7%, 说明实验室间验证数据有效, 证明本方法的可行性。

由表 10 可知, 本研究以 β -酪蛋白和 β -乳球蛋白为特征指标, 在方法的灵敏度和定量限等技术指标均优于已有的方法, 同时首次建立了定量模型, 简化了工作流程, 处于行业领先技术水平。

表 10 技术差异比对
Table 10 Comparison of technical differences

技术差异	本研究	PCR ^[15]	ELSA ^[20]	毛细管电泳法 ^[26]	HPLC-MS/MS ^[28]
特征指标	β -酪蛋白和 β -乳球蛋白	体细胞	β -乳球蛋白	酪蛋白	乳白蛋白和 β -乳球蛋白
定量/定性	定量和定性	定性	定性	定量	定量和定性
灵敏度	1.9‰	1%	0.1%	0.5%	1.5%
定量限	6.4‰	/	/	3%	5%
检测成本	高	低	低	低	高
是否建立模型	是	否	否	否	否

注: /代表无此项。

3 结 论

本研究开发的用于羊乳婴幼儿配方奶粉中牛乳的鉴别与测定模型, 线性相关系数均在 0.99 以上, 日内精密度为 3.2%~8.1%, 日间精密度为 3.4%~7.3%, 准确度为 99.0%~103.0%, 方法的检出限为 1.9 g/kg, 定量限为 6.4 g/kg。经 3 家实验室的验证; 重复性相对标准偏差为 4.3%~5.1%, 再现性相对标准偏差为 4.7%~5.7%。该模型可对羊乳婴幼儿配方粉中牛乳清粉和牛全脂乳粉进行区分和独立定量, 两者之和即为牛乳含量。该模型极大地简化了前处理过程, 具有操作简便、快速、方法推广应用性强等优点, 可为企业内部质量控及国家监管部门提供技术支持。

参考文献

- [1] COSTA WKAD, SOUZA EL, O-FILHO EMB, *et al.* Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the alpine and saanen breeds in northeastern brazil and related antibacterial activities [J]. PLoS One, 2014, 9(3): 1-8.
- [2] WANG Y, ZHENG Y, JIANG M, *et al.* Comparison of the biochemical components and marker of milk between Tibetan goat and goat in neighboring area [J]. Afr J Biotechnol, 2011, 10(11): 2092-2100.
- [3] 李婧妍, 安乐, 韩波, 等. 羊乳制品中掺杂牛乳鉴别技术研究进展[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(5): 29-33.
LI JY, AN L, HAN B, *et al.* DRecent advances in identification techniques of cow milk adulteration in goat milk products [J]. China Dairy Ind, 2021, 49(5): 29-33.
- [4] 张宇, 王立娜, 张宏达, 等. 母乳、牛乳及山羊乳脂肪酸组成的差异分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(4): 21-26.
ZHANG Y, WANG LN, ZHANG HD, *et al.* Difference analysis of fatty acid composition of breast milk, bovine milk and goat milk [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(4): 21-26.
- [5] 张宏达, 王立娜, 张宇, 等. 基于脂质组学法对母乳、牛乳及羊乳脂质的差异分析[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 207-213.
ZHANG HD, WANG LN, ZHANG Y, *et al.* Comparative lipidomic analysis of human, bovine and caprine milk [J]. Food Sci, 2020, 41(4): 207-213.
- [6] 高婧昕, 毛学英. 羊乳组成及功能特性研究进展[J]. 中国乳业, 2019, (8): 160-164.
- [7] 陈天鹏, 刘翠, 冷友斌, 等. 羊乳营养成分及功能特性的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(3): 71-76.
CHEN TP, LIU C, LENG YB, *et al.* Research progress on nutritional components and functional property of goat milk [J]. Food Nutr China, 2016, 22(3): 71-76.
- [8] 石韶琦, 逢金柱, 赖必辉. 羊奶粉对小鼠免疫调节功能作用的研究[J]. 中国奶牛, 2022, (5): 1-5.
SHI SQ, PANG JZ, LAI BH. Modulating effect of goat milk powder on mice immunity [J]. Chin Dairy Cattl, 2022, (5): 1-5.
- [9] 杨鹏飞, 吴桐, 谢奎, 等. 配方羊奶粉对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 中国乳业, 2021, (12): 133-136.
YANG PF, WU T, XIE K, *et al.* Study on the effect of goat milk formula on the immune function on mice [J]. China Dairy, 2021, (12): 133-136.
- [10] PROSSER CG. Compositional and functional characteristics of goat milk and relevance as a base for infant formula [J]. J Food Sci, 2021, 86(2): 257-265.
- [11] 张雪茹, 付尚辰, 郑卫民, 等. 商品羊奶粉中 DNA 的质量评价及牛源性成分掺假检测[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 249-255.
ZHANG XR, FU SC, ZHANG WM, *et al.* Quality evaluation of DNA in commercial goat milk powder and the detection of adulterated bovine-derived components [J]. Food Ferment Ind, 2022, 48(18): 249-255.
- [12] XUE RZ, CHUN YQ, SHANG CF, *et al.* DNA-based qualitative and quantitative identification of bovine whey powder in goat dairy products [J]. J Dairy Sci, 2022, 105: 4749-4759.
- [13] DENG L, LI AL, GAO Y, *et al.* Detection of the bovine milk adulterated in camel, horse, and goat milk using duplex PCR [J]. Food Anal Method, 2020, 13(4): 560-567.
- [14] SOVOVÁ T, KRÍZ OB, KUC EL, *et al.* Detecting soybean and milk in dairy and soy products with post-PCR high resolution melting assays [J]. Czech J Food Sci, 2020, 38(4): 209-214.
- [15] 侯艳梅, 杨艳歌, 吴桐, 等. Real-time PCR 和双向电泳联合鉴别婴幼儿配方羊奶粉的乳源成分[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 324-333.
HOU YM, YANG YG, WU T, *et al.* Combination of real-time polymerase chain reaction with two-dimensional electrophoresis to identify milk-derived ingredients of infant formula [J]. Food Sci, 2022, 43(8): 324-333.

- [16] 郇娟, 董华夏, 张珣, 等. 基于荧光定量 PCR 法鉴定婴幼儿配方羊乳粉中牛源性成分[J]. 中国乳品工业, 2018, 46(9): 47-49.
LI J, DONG HX, ZHANG X, *et al.* Detection of bovine derived substance in infant and young children goat formulas by real-time PCR [J]. China Dairy Ind, 2018, 46(9): 47-49.
- [17] YUN XW, LI JJ, ZHI JL, *et al.* Fluorescence-based PCR detection of goat milk powder mixed with cow milk [J]. Asian Agric Res, 2021, 13(8): 43-48.
- [18] 杨睿. 羊乳及羊乳粉中牛乳、牛乳清粉含量 ELISA 检测技术的建立[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
YANG R. Establishment of ELISA detection technology for the content of milk and cow whey powder in goat milk and goat milk powder [D]. Yangling: Northwest Agriculture & Forestry University, 2021.
- [19] 西北农林科技大学. 配方羊乳粉中牛乳清成分含量的 ELISA 检测试剂盒制备方法: 中国, CN202110172324.3[P]. 2021-05-28.
Northwest Agriculture & Forestry University. Preparation of ELISA kit for detection of bovine whey in formula goat milk powder: China, CN202110172324.3 [P]. 2021-05-28.
- [20] 王士峰, 姚添淇, 冯荣虎, 等. 胶体金免疫层析法快速检测配方羊乳粉中的牛 β -乳球蛋白[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 60-64.
WANG SF, YAO TQ, FENG RH, *et al.* Colloidal gold immunochromatographic assay for rapid detection of bovine β -lactoglobulin in goat milk formulas [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(15): 60-64.
- [21] 邢常瑞, 刘崇靖, 孔志康, 等. 基于酪蛋白免疫快速检测的羊奶鉴别方法建立[J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 281-287.
XING CX, LIU CJ, KONG ZK, *et al.* Establishment of goat milk forgery detection method based on casein rapid immunoassay [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(8): 281-287.
- [22] 河北省食品检验研究院. 一种针对乳粉中羊源性成分 MALDI-TOF 检测方法: 中国, CN202110903414.5[P]. 2021-09-28.
Hebei Food Inspection and Research Institute. A method for MALDI-TOF detection of sheep derived components in milk powder: China, CN202110903414.5 [P]. 2021-09-28.
- [23] RYSOVAL, CEJNARP, HANUSO, *et al.* Use of MALDI-TOF MS technology to evaluate adulteration of small ruminant milk with raw bovine milk [J]. J Dairy Sci, 2022, 105(6): 4882-4894.
- [24] CRISTIAN P, OLIVER JH, CHRISTOPHER KR, *et al.* Speciation and milk adulteration analysis by rapid ambient liquid MALDI mass spectrometry profiling using machine learning [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 3305-3314.
- [25] 房艳, 于思雨, 高俊海, 等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法与代谢组学技术分析牛乳与羊乳差异性[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(7): 2075-2083.
FANG Y, YU SY, GAO JH, *et al.* Analysis of differences in cow milk and goat milk by ultra performance liquid chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry and metabolomics approach [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(7): 2075-2083.
- [26] 刘鸣畅, 侯艳梅, 杨艳歌, 等. 毛细管电泳技术检测羊乳婴幼儿配方粉中的牛乳成分[J]. 中国食品学报, 2019, 19(5): 270-275.
LIU MC, HOU YM, YANG YG, *et al.* Detection of cow milk components in goat milk from infant formula using capillary gel electrophoresis method [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2019, 19(5): 270-275.
- [27] 刘鸣畅, 王洪越, 方舒正, 等. 采用毛细管凝胶电泳技术检测常见乳源成分[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(12): 43-48.
LIU MC, WANG HY, FANG SZ, *et al.* Capillary gel electrophoresis method applied to detect common milk source components [J]. China Dairy Ind, 2020, 48(12): 43-48.
- [28] 陈树娣, 谢景千, 蒋明峰, 等. 基于液相色谱-串联质谱技术的羊牛乳特征肽段鉴别及测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(15): 5948-5953.
CHEN SD, XIE JQ, JIANG MF, *et al.* Identification and detection of goat and bovine milk peptide marker based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(15): 5948-5953.
- [29] ANNE JK, MARTINE PV, FREDERIQUE VH, *et al.* Quantification of bovine a-lactalbumin in infant milk formula using LC-MS [J]. Int Dairy J, 2021, 113(104899): 1-10.
- [30] KE X, ZHANG JS, LAI SY, *et al.* Quantitative analysis of cow whole milk and whey powder adulteration percentage in goat and goat milk products by isotopic dilution-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409: 213-224.
- [31] 罗元理, 于雪, 窦宇琪, 等. 牛乳与山羊乳中乳桥蛋白的比较研究[J]. 中国乳品工业, 2023, 51(2): 10-31.
LUO YL, YU X, DOU YQ, *et al.* Comparative study of lactopontin in cow milk and goat milk [J]. China Dairy Ind, 2023, 51(2): 10-31.

(责任编辑: 郑丽 韩晓红)

作者简介



张立佳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测与分析。

E-mail: jtzhanglijia@yili.com



李翠枝, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全管理及检验检测技术研究。

E-mail: lczg@yili.com