

基于特征肽段结合超高效液相色谱-串联质谱法的 乳制品真实性鉴别方法研究

陈荣桥, 洗燕萍*, 梁明, 胡均鹏, 吴玉奎, 奚晓翔, 戴航, 侯向昶

(广州质量监督检测研究院, 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心,
广州市食品安全检测技术重点实验室, 广州 511447)

摘要: **目的** 基于超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)建立乳制品中乳铁蛋白、乳桥蛋白、奶牛 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白、水牛 A2 β -酪蛋白的检测方法, 开展市售乳制品中功能性蛋白质检测和乳制品真实性鉴别分析。**方法** 乳蛋白经酶解后, 应用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q/Orbitrap HRMS)和 UPLC-MS/MS 筛选获得可用于定性定量分析的特征肽段, 基于 UPLC-MS/MS 建立同时检测 LF、LPN、奶牛 A1 β -CN、奶牛 A2 β -CN 和水牛 A2 β -CN 的方法并应用于乳制品检测。**结果** 5种待测蛋白在相应的浓度范围内线性关系良好($r^2 > 0.99$), 加标回收率在 82.1%~105.5%之间, 相对标准偏差均小于 5%, 78份乳制品的检测结果表明同类样品 LF 含量差异较大, 不同类液体乳中 LPN 均值差异不大。**结论** 本方法性能良好, 适用于乳制品中乳桥蛋白等功能性蛋白的同时检测, 也可以实现乳制品中乳蛋白物种来源的鉴别。

关键词: 功能性乳蛋白; 靶向蛋白质组学; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法; 超高效液相色谱-串联质谱法; 真实性鉴别

Study on the authenticity identification of dairy products based on characteristic peptides combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Rong-Qiao, XIAN Yan-Ping*, LIANG Ming, HU Jun-Peng, WU Yu-Luan,
XI Xiao-Xiang, DAI Hang, HOU Xiang-Chang

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou City Research Center of Risk Dynamic Detection and Early Warning for Food Safety, Guangzhou City Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Guangzhou 511447, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the detection of lactoferrin, lactopontin, A1 β -casein and A2 β -casein from cows, and A2 β -casein from buffalo in dairy products based on ultra performance liquid

基金项目: 广州市科技计划项目(2023B04J0407)、国家重点研发计划项目(2019YFC1606400)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Guangzhou (2023B04J0407), and the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1606400)

*通信作者: 洗燕萍, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 13642613459@139.com

*Corresponding author: XIAN Yan-Ping, Master, Professor, Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou City Research Center of Risk Dynamic Detection and Early Warning for Food Safety, Guangzhou City Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Guangzhou 511447, China. E-mail: 13642613459@139.com

chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and conduct functional protein testing and identification analysis of commercially available dairy products. **Methods** After enzymatic digestion of milk proteins, ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q/Orbitrap HRMS) and UPLC-MS/MS were applied to screen and obtain specific peptides for qualitative and quantitative analysis, and a method for the simultaneous detection of lactoferrin, lactopontin, A1 β -casein and A2 β -casein from cows, and A2 β -casein from buffalo based on UPLC-MS/MS was developed and applied to dairy products detection. **Results** The 5 kinds of proteins to be measured showed good linearity ($r^2 > 0.99$) in the corresponding concentration ranges, and the spiked recoveries ranged from 82.1% to 105.5% with the relative standard deviations less than 5%. The results of 78 dairy products showed that the LF content of similar samples varied widely, and the mean LPN values in different types of liquid milk did not differ significantly. **Conclusion** This method has good performance and is suitable for the simultaneous detection of functional proteins such as lactoferrin in dairy products, and also for the identification of the origin of milk protein species in dairy products.

KEY WORDS: functional proteins; targeted proteomics; ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; authenticity identification

0 引言

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)、乳桥蛋白(lactopontin, LPN)、A1 β -酪蛋白 A1 β -CN (A1 β -Casein, A1 β -CN)和 A2 β -酪蛋白 A2 β -CN (A2 β -Casein, A2 β -CN)是乳与乳粉中重要的蛋白质,除了作为膳食体系中氨基酸的来源外,还各自发挥着特定的生理作用。LF 是一种主要由乳腺上皮细胞分泌的非血红素铁结合糖蛋白,具有抗微生物、免疫调节、促进铁吸收、促进肠道发育等功能^[1-4]; LPN 是一种高度磷酸化修饰的酸性糖蛋白,可由多种器官和组织表达^[5],对婴幼儿早期神经系统发育、肠道发育、骨骼与血管生成、免疫调节等发挥着关键作用^[6-7]; A2 β -CN 是 β -酪蛋白 13 种遗传变异体中的主要变异体^[8],与人体母乳成分相似,有利于提高儿童免疫力和大脑发育,降低冠心病发病率,改善乳糖不耐受症^[9-11]; A1 β -CN 是 β -酪蛋白另一种变异体,其代谢产生的 β 酪啡肽-7 (beta-casomorphin-7, BCM-7)有增加婴幼儿患 I 型糖尿病风险^[11]。近年来,市场上不断涌现出标称强化 LF 或 LPN、A2 β -CN 纯奶、纯水牛奶、纯羊奶等各类乳制品,满足了不同消费者的需求。由于全球拥有纯 A2 β -CN 基因的奶牛数量大约只有 30%, A2 β -CN 纯奶产量少^[12], LF 和 LPN 水牛奶、羊奶等产量也通常较少,市场价格都比较高,在利益驱使下,乳制品的生产可能存在虚假标识或以次充好等问题。因此,准确识别乳制品中功能性蛋白的含量水平和物种来源对乳制品质量安全监管具有重要意义。

目前,仅见 GB 1903.17—2016《食品安全国家标准食品营养强化剂 乳铁蛋白》中规定的检测 LF 的高效液相色谱法,尚未见关于 LPN、A1 β -CN 和 A2 β -CN 的标准检测方法。国内外报道的关于 LF、LPN、A1 β -CN 和 A2 β -CN 检测方法主要包括酶联免疫法(euzymlinked

immunosorbent assay, ELISA)^[13-14]、高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)技术^[15-16]、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)^[17-18]、核酸适配体胶体金(colloidal gold, AuNPs)比色法^[19]、液相色谱法(liquid chromatography, LC)^[20-21]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[22]等,但基本只对其中一种蛋白质进行检测。ELISA 操作简单,但对于成分复杂的乳及乳制品基质,易受杂质峰干扰而出现假阳性。HPCE 检测快速、灵敏,但易受仪器条件限制,重复性较差。SDS-PAGE 是蛋白质分析常用方法,但操作烦琐且耗时。LC 检测结果准确、重现性好、回收率高,但只能测定非热变性蛋白。LC-MS/MS 基于蛋白质组学原理,通过酶解获得并检测蛋白质的特征肽段,不仅具有 LC 的优点,还能够检测热变性和非热变性蛋白^[23]。

靶向蛋白质组学技术是将蛋白质酶解成肽段,结合目标蛋白质氨基酸序列筛选出特征肽段,通过检测特征肽段来实现目标蛋白质定性和定量分析的技术^[24],具有灵敏度高、稳定性好等优点,现已成为蛋白质定性定量研究的常用方法^[25-26]。本研究应用靶向蛋白质组学,采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q/Orbitrap HRMS)和超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)筛选获得可用于定性定量分析的特征肽段,基于 UPLC-MS/MS 建立同时检测 LF、LPN、奶牛 A1 β -CN、奶牛 A2 β -CN 和水牛 A2 β -CN 的方法,采用相应的合成多肽标准品可以实现准确的定量分析;同时可实现乳制品中乳蛋白物种来源的鉴别,为乳制品的质量安全监管提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

30 个纯奶牛奶(pure cow milk)、3 个调制乳(fortified milk, 标识以生奶牛奶为原料)、15 个 A2 β -CN 纯奶牛奶(A2 cow milk)、1 个 A2 β -CN 羊奶(A2 goat milk)、1 个纯羊奶(pure goat milk)、14 个纯水牛奶(pure buffalo milk)、10 个牛奶粉(cow milk powder)和 4 个羊奶粉(goat milk powder), 共计 78 个样品。其中包括 1 个真实纯水牛奶和 4 个真实羊奶粉样品, 其余样品均为线上或线下采购的乳制品。

碳酸氢铵(NH_4HCO_3 , 分析纯, 广州化学试剂有限公司); 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘代乙酰胺(iodoacetamide, IAA)(色谱级, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲酸(formic acid, FA)、乙腈(acetonitrile, ACN)(色谱级, 美国 Merck 公司); 牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin, bLF)标准品(纯度 $\geq 95\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 重组胰蛋白酶(trypsin)(测序级, 比活 ≥ 3800 USP unit/mg pro, 上海雅心生物科技有限公司); 超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)(实验室 Milli-Q 自制)。

1.2 仪器与设备

Orbitrap Q Exactive 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ACQUITYTM 超高效液相色谱串联 XevoTM TQ MS 三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC BEH C_{18} (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱(美国 Waters 公司); KBF115 恒温培养箱(德国 Binder 公司); DHG-9240A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); BSA224S 天平(精度 0.1 mg, 德国 Sartorius 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解

准确称取乳粉 0.125 g 或吸取液体乳 1.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加入超纯水溶解混匀, 稀释定容至 10 mL。移取 100 μL 样液于 2 mL 离心管中, 再加入 100 μL 超纯水、100 μL 100 mmol/L DTT 溶液、500 μL 100 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 涡旋混匀, 置于 56 $^\circ\text{C}$ 烘箱中恒温反应 30 min; 取出冷却至室温, 加入 100 μL 300 mmol/L IAA, 混匀后置于室温下避光反应 1 h; 接着加入 100 μL 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶, 混匀后置于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温箱中酶解 6 h; 加入 10 μL FA 后于室温下静置 30 min, 终止酶解反应; 12000 r/min 离心 10 min, 取上层清液过 0.22 μm 滤膜, 待测。

1.3.2 标准溶液配制

LF 标准溶液采用 bLF 标准品制备。准确称量 5 mg bLF 溶于 10 mL 超纯水中, 充分溶解配制成 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液, 取 100 μL 标准液按 1.3.1 稀释定容后步骤处理, 获得酶解液。将酶解液与超纯水按 1:99、1:49、1:24、1:9、1:4、2:3、3:2 ($V:V$) 比例混合, 配制成质量浓度为 5、10、20、50、100、200 和 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列 LF 标准溶液。

纯奶牛奶和纯水牛奶的标准样品由各物种鲜奶酶解液(由 1.0 mL 鲜奶按照 1.3.1 酶解获得)与超纯水混合配制, 其混合比例($V:V$)依次为 0:100、5:95、10:90、20:80、30:70、40:60、60:40、70:30、80:20 及 100:0。

1.3.3 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 分析

色谱条件: 色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈(A)和 0.1% 甲酸水溶液(B); 梯度洗脱程序为: 0~1.0 min, 5% A; 1.0~5.6 min, 5%~50% A; 5.6~6.0 min, 50%~95% A; 6.0~6.8 min, 95% A; 6.8~7.0 min, 95%~5% A; 7.0~9.0 min, 5% A。流速 0.3 mL/min; 柱温 35 $^\circ\text{C}$; 进样量 5 μL 。

Orbitrap 高分辨质谱条件: 离子源电压 3.5 kV; 毛细管温度 320 $^\circ\text{C}$; 离子源雾化温度 350 $^\circ\text{C}$; 鞘气流量 40 L/min; 辅助气流量 10 L/min; 电喷雾电离正离子(electrospray ionization, ESI^+)模式; 扫描模式: Full MS/dd- MS^2 ; 扫描范围: m/z 200~3000; Full MS 分辨率: 70000, AGC target 3e^6 ; 最大进样时间: 100 ms。dd- MS^2 扫描分辨率: 17500, AGC target 1e^5 ; 最大进样时间为 50 ms; 碰撞能: 25、30、35 eV。

1.3.4 UPLC-MS/MS 分析

色谱条件: 除进样量为 2 μL 外, 其余条件同 1.3.3 的色谱条件。

质谱条件: ESI^+ 模式; 毛细管电压 2.5 kV; 去溶剂温度 400 $^\circ\text{C}$; 去溶剂气为氮气, 800 L/Hr; 锥孔气为氮气, 150 L/Hr; 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式。5 种目标肽段的质谱参数见表 1。

1.4 数据处理

采用 MaxQuant 软件对谱图进行鉴定分析, 实验结果图采用 Origin 2019b 绘制。

2 结果与分析

2.1 候选特征肽段筛选

将乳制品的酶解液注入 LC-Orbitrap 高分辨质谱仪, 按照 1.3.3 方法进行检测, 将采集获得的数据导入 MaxQuant 软件, 根据 Uniprot 数据库获得的奶牛 LF、LPN、A1 β -CN、A2 β -CN 及水牛 A2 β -CN 蛋白序列 fasta 文件进行非标记定量分析。设置最大漏切位点为 2, 固定修饰为 Carbamidomethyl (Cysteine), 多肽最小长度为 8, 实验用酶选择胰蛋白酶, 搜库一级质量精度为 $10\sim 15\text{e}^{-6}$ 。最终在 LF 中筛选出 6 条肽段, LPN 中筛选出 2 条肽段, A1 β -CN(奶牛)中筛选出 1 条肽段, A2 β -CN(奶牛)中筛选出 2 条肽段, A2 β -CN(水牛)中筛选出 1 条肽段。特征肽段应具有物种(蛋白)特异性, 通过 Uniprot 网站提供的局部序列对比工具(BLAST)在蛋白质数据库中对 12 条肽段进行分析对比, 结果表明, 除 FQSEEQQTDELQDK 为奶牛 A1 β -酪蛋白和 A2 β -CN 共享肽段外, 其余均为对应蛋白质的特有肽段, 候选特征肽段信息如表 1 所示。

表 1 LF、LPN、A1 β -CN 和 A2 β -CN 候选特征肽段
Table 1 Candidate specific peptides of LF, LPN, A1 β -CN and A2 β -CN

蛋白质/aac no.	候选特征肽段/(缩写)	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能/eV
LF/P24627	VDSALYLGSR/(VDS)*	540.8	595.3 ^a	25	19
			762.4	25	15
	AFALECIR/(AFA)	490.3	690.4 ^a	20	26
			577.3	25	25
	SCHTGLGR/(SCH)	444.2	503.3 ^a	28	22
			486.2	20	25
QVLLHQALFGK/(QVL)	691.4	1041.6 ^a	20	20	
		791.4	30	26	
LPN/P31096	FFSASCVCIDR/(FFS)	486.9	563.3 ^a	25	30
			540.3	25	25
	GSNFQLDQLQGR/(GSN)	681.8	1218.6 ^a	22	18
			716.4	25	27
	GDSVAYGLK/(GDS)*	455.2	551.3 ^a	30	18
			650.3	30	16
YPDAVATWLKPDPSQK/(YPD)	606.0	799.4 ^a	25	28	
		459.3	30	30	
A2 β -CN(奶牛) /P02666	IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPLTQTPVV VPPFLQPEVMGVSK/(PIP)*	1330.0	1428.8 ^a	28	25
			1385.7	30	35
A1 β -CN(奶牛) /A0A452DHW7	IHPFAQTQSLVYFPFGPIHNSLPQNIPLTQTPV VPPFLQPEVMGVSK/(PIH)*	1340.0	1428.8 ^a	35	25
			1527.8	35	25
A2 β -CN(水牛) /Q9TSI0	IHPFAQTQSLVYFPFGPIPK/(PIPK)*	746.4	852.5 ^a	30	20
			1015.6	30	20

注: acc no.=Uniprot/Swissprot accession number; ^a 定量离子; *最终选定的特征肽段。

2.2 特征肽段及色谱质谱检测条件的确定

特征肽段的确定是建立 UPLC-MS/MS 的关键, 根据 MOHAMMED 等^[27]提出的靶向蛋白质组学肽段筛选指南, 特征肽段应具有物种(蛋白)特异性、酶解效率良好、稳定性强、质谱响应高等特点。因此, 本研究重点考察了上述 11 条候选特征肽段质谱响应、酶解效率和稳定性。将 11 条候选肽段序列导入 skyline 软件, 把肽段信息转换成离子对信息, 建立相应的 UPLC-MS/MS, 参照 1.3.4 方法分析, 优化碰撞能等参数, 获得每条肽段定性定量离子对信息, 具体见表 1。

酶解时间会对酶解结果产生显著影响, 酶解时间不足会导致酶解不充分, 酶解时间过长则影响实验效率^[28]。本研究分别考察了酶解时间为 2、4、6、8、10 h 时, 候选特征肽段的酶解效率和稳定性, 结果如图 1 所示。LF 的 6 条候选特征肽段(红色酶解曲线)在酶解 4 h 时均达到了最大酶解水平, 但其中 QVL 和 GSN 两条肽段在达到最大酶解水平后, 含量会逐渐下降, 表明其稳定性较差, 不适宜作为特征肽段, 综合考虑酶解效率、稳定性和响应强度, 选择 VDS 作为 LF 特征肽段; LPN 的 2 条候选特征肽段(绿色酶解曲线)在酶解 4 h 时达到最大酶解水平, 本研究选择响应较强的 GDS 肽段作为 LPN 特征肽段; 奶牛和水牛的

A2 β -CN、奶牛 A1 β -CN 均只有 1 个候选特征肽段(分别为蓝色、紫色和灰色酶解曲线), 在酶解 6~8 h 时可达最大酶解水平, 响应强度和稳定性均较好, 因此分别选择这 3 条肽段作为相应的 β -CN 的特征肽段。综合考虑所选定的 5 条特征肽段(见表 1 带*的肽段)的酶解效率、稳定性和响应强度, 确定最终酶解时间为 6 h。

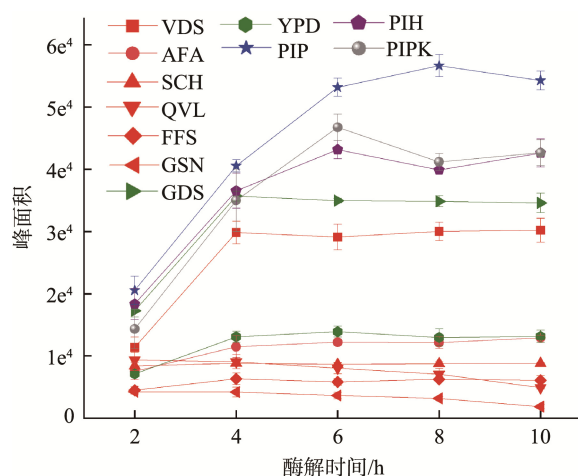


图 1 11 条候选特征肽段酶解曲线

Fig.1 Enzymatic digestion curves of 11 candidate specific peptides

另外,本研究分别考察了甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-水和乙腈-0.1%甲酸水作为流动相的分析效果。以甲醇-水或乙腈-水作为流动相时,目标肽段响应较低,且峰形较差;以甲醇-0.1%甲酸水或乙腈-0.1%甲酸水作为流动相时,5种目标肽段峰形较好,响应较高,但是后者相对峰型更优。因此,综合对比分析,确定以乙腈-0.1%甲酸水为流动相,优化洗脱梯度获得了5种目标肽段的良好色谱分离(图2)。

2.3 方法的线性关系

应用建立的方法检测系列LF标准溶液和奶牛、水牛2个物种奶的标准样品溶液,考察5种待测蛋白的线性关系。结果如表2所示,LF在5~500 μg/mL范围内相关系数大于0.99,在相应的范围内,奶牛标准样品溶液中的LF、LPN、A1 β-CN和A2 β-CN的相关系数及水牛标准样品溶液中的A2 β-CN的相关系数也均大于0.99,表明本方法的5种待测蛋白线性关系良好。

2.4 方法的准确性

选择1个纯奶牛奶样品,进行3个添加水平LF(20、100和200 μg/mL)的回收实验,选择1个纯奶牛奶样品和1个水牛奶样品,分别添加其他来源的纯奶牛奶或水牛奶,计算回收率。结果显示,3个添加水平的LF回收率在89.1%~105.5%之间,相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)均小于4%;添加纯奶牛奶实验中,LF、LPN、A1 β-CN和A2 β-CN肽段的回收率在84.7%~89.5%之间,RSDs均小于5%;添加纯水牛奶实验中,A2 β-CN的回收率为82.1%,RSD为3.6%。详见表3。表明方法的回收率和精密度良好,满足方法学要求。

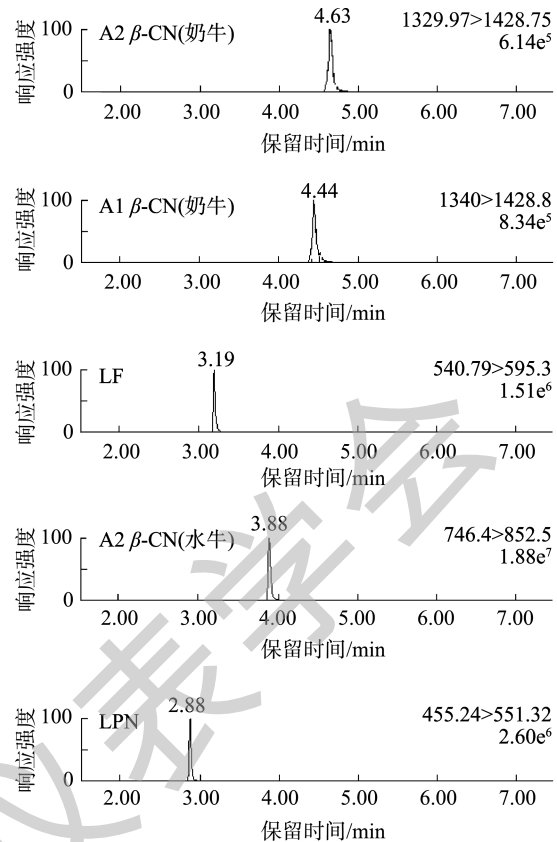


图2 5种目标肽段的定量离子色谱图

Fig.2 Quantitative ion chromatograms of 5 kinds of specific peptides

表2 特征肽段线性方程和相关系数

Table 2 Linear equations and correlation coefficients of specific peptides

待测蛋白	线性范围	线性方程	相关系数(r^2)	定量限
LF	5~500 μg/mL	$Y=2639.51X-472.84$	0.999	2 μg/mL
LF(奶牛奶)		$Y=366.05X-70.31$	0.999	
LPN(奶牛奶)		$Y=519.78X-315.87$	0.998	
A1 β-CN(奶牛奶)	纯奶牛奶含量 0%~100%	$Y=4021.81X-2229.13$	0.999	/
A2 β-CN(奶牛奶)		$Y=3751.22X-368.11$	0.998	
A2 β-CN(水牛奶)	纯水牛奶含量 0%~100%	$Y=6847.55X-1145.21$	0.997	/

注: /表示当前无此蛋白标准品在售,本研究暂未能考察其定量限。

表3 样品加标回收实验结果($n=6$)

Table 3 Sample spiked recovery test results ($n=6$)

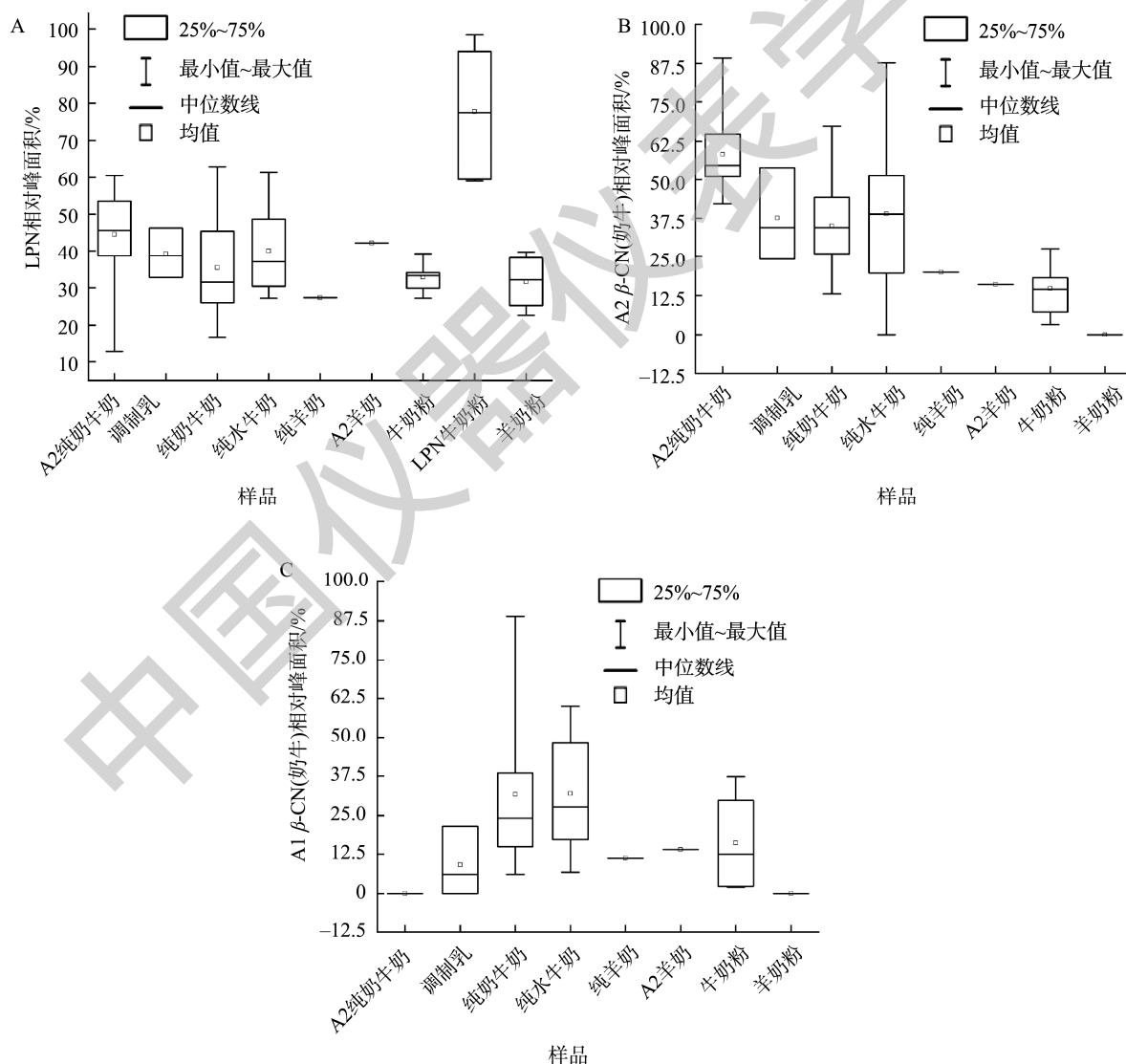
待测蛋白	本底值	添加量	测定值	回收率/%	RSDs/%
LF	93 μg/mL	20 μg/mL	110.9 μg/mL	89.4	2.7
	93 μg/mL	100 μg/mL	182 μg/mL	89.1	3.5
	93 μg/mL	200 μg/mL	304 μg/mL	105.5	3.9
LF	120 μg/mL	125 μg/mL	230 μg/mL	88.0	4.4
LPN*	37.1%	74.2%	100%	84.7	3.2
A1 β-CN(奶牛奶)*	15.8%	94.1%	100%	89.5	4.9
A2 β-CN(奶牛奶)*	45.3%	62.7%	100%	87.3	4.4
A2 β-CN(水牛奶)*	55.4%	54.3%	100%	82.1	3.6

注: *LPN、A1 β-CN(奶牛奶)、A2 β-CN(奶牛奶)和 A2 β-CN(水牛奶)的“本底值”“添加量”和“测定值”是以各自的峰面积与“测定值”峰面积相比获得。

2.5 乳制品检测及相关性分析

利用本方法对市售 64 份液体乳和 14 份乳粉样品进行检测, 其中 LF 通过 LF 标准品定性定量, 其他蛋白质采用纯奶牛奶和纯水牛奶作为标准参考进行定性, 并结合产品信息进行关联性比较分析。结果显示, 所有样品中均检出 LF 和 LPN。64 份液体乳和 14 份乳粉样品中 LF 含量分别在 58~217 $\mu\text{g/mL}$ 和 416~1248 $\mu\text{g/g}$ 之间, 同类样品 LF 含量差异较大, 这可能与乳制品的奶源不同有关; 标识强化 LPN 乳粉的 LPN 含量明显高于普通乳粉(图 3A), 而各类液体乳的 LPN 平均值相差不大。值得注意的是, 本方法中, PIH 和 PIP 是奶牛 A1 β -CN 和 A2 β -CN 的特异性肽段、PIPK 是水牛 A2 β -CN 的特异性肽段, 理论上水牛奶和羊奶中不

含 PIH 和 PIP、奶牛奶中不含 PIPK。30 个纯奶牛奶、3 个调制乳和 10 个牛奶粉中均检出了 PIH 和 PIP, 15 个 A2 β -CN 纯奶牛奶中只检出 PIP 而未检出 PIH(图 3B 和图 3C), A2 β -CN 纯奶牛奶中 PIP 的检出值范围在普通牛奶的检出值范围内, 部分普通牛奶中 A2 β -CN 的含量比 A2 β -CN 纯奶牛奶的高, 这表明 A2 β -CN 基因普遍存在于奶牛中, 只含有 A2 β -CN 基因的奶牛比较少^[29-31]。14 个纯水牛奶中, 只有 1 个纯水牛奶没有检出奶牛的 PIH 和 PIP, 其余 13 个都检出了 PIH 和 PIP; 有 1 个纯水牛奶没有检出水牛的 PIPK, 其余 13 个都检出了 PIPK。1 个 A2 β -CN 羊奶和 1 个纯羊奶也均检出了奶牛的 PIH 和 PIP, 但是 4 个羊奶粉中均未检出奶牛的 PIH 和 PIP, 提示纯水牛奶、纯羊奶的真实性值得关注。



注: 乳粉的数据是按 1 g 乳粉加 7 mL 水冲调成的液体乳(即 1:7)的检测结果。

图 3 各类乳制品样品中 LPN (A)、A2 β -CN(奶牛) (B)和 A1 β -CN(奶牛) (C)分布情况

Fig.3 Distributions of LPN (A), A2 β -CN (cow) (B) and A1 β -CN (cow) (C) in various dairy products samples

3 结 论

本研究综合靶向蛋白质组学、UPLC-Q/Orbitrap HRMS 和 UPLC-MS/MS 技术, 分别筛选出 LF、LPN、A1 β -CN(奶牛)、A2 β -CN(奶牛)和 A2 β -CN(水牛)的特征肽段, 建立了 5 种功能性乳蛋白的同时检测方法, 方法性能良好, 采用相应的合成多肽标准品就可以进行准确的定量分析, 也可以实现 A2 β -CN 纯奶牛奶和其他物种奶掺杂奶牛奶的鉴别。市售液体乳和乳粉样品的检测研究表明, 标识强化 LPN 乳粉的 LPN 含量明显高于普通乳粉; A2 β -CN 普遍存在于奶牛奶中; 在大部分的水牛奶和羊奶样品中检出了奶牛 A1 β -CN 和 A2 β -CN 的特征肽段, 可能存在掺杂奶牛奶的情况。本方法有望为乳制品质量监督提供技术支持。

参考文献

- [1] RASCÓN CQ, ESPINOZA SEA, SIQUEIROS CTS, *et al.* Lactoferrin: A glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial processes [J]. *Molecules*, 2021, 26(1): 205–220.
- [2] LONNERDA B, GEORGIEFF MK, HORNELL O. Developmental physiology of iron absorption, homeostasis, and metabolism in the healthy term infant [J]. *J Pediatr*, 2015, 167(4): 8–14.
- [3] KAWAKAMI H, HIRATSUKA M, DOSAKO SI. Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption [J]. *Agric Biol Chem*, 1988, 52(4): 903–908.
- [4] MACMANUS CF, COLLINS CB, NGUYEN TT, *et al.* VEN-120, a recombinant human lactoferrin, promotes a regulatory T cell (Treg) phenotype and drives resolution of inflammation in distinct murine models of inflammatory bowel disease [J]. *J Crohns Colitis*, 2017, 11(9): 1101–1112.
- [5] BRUUN S, JACOBSEN LN, ZE X, *et al.* Osteopontin levels in human milk vary across countries and within lactation period: Data from a multicenter study [J]. *J Pediatr Gastr Nutr*, 2018, 67(2): 250–256.
- [6] JIANG R, LONNERDAL B. Osteopontin in human milk and infant formula affects infant plasma osteopontin concentrations [J]. *Pediatr Res*, 2019, 85: 502–505.
- [7] JIANG R, LONNERDAL B. Effects of milk osteopontin on intestine, neurodevelopment, and immunity [J]. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 2020, 94: 152–157.
- [8] GAUDRY DKD, LOHNER S, BISCHOFF K, *et al.* A1- and A2 beta-casein on health-related outcomes: A scoping review of animal studies [J]. *Eur J Nurt*, 2021, 61: 1–21.
- [9] HE M, SUN J, JIANG ZQ, *et al.* Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: A multicentre, randomised controlled study [J]. *Nutr J*, 2017, 16(1): 72.
- [10] SODHI M, MUKESH M, KATARIA RS, *et al.* Milk proteins and human health: A1/A2 milk hypothesis [J]. *Indian J Endocr Metab*, 2012, 16(5): 856.
- [11] MIGUEL DV, CARLOS GU, LAURA VG, *et al.* Production of cow's milk free from beta-casein A1 and its application in the manufacturing of specialized foods for early infant nutrition [J]. *Foods*, 2017, 6(7): 50.
- [12] RAMAKRISHNAN M, ZHOU X, DYDAK U, *et al.* Gastric emptying of new-world milk containing A1 and A2 β -casein is more rapid as compared to milk containing only A2 β -casein in lactose maldigesters: A randomized, cross-over trial using magnetic resonance imaging [J]. *Nutrients*, 2023, 15: 801.
- [13] AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA [J]. *Peptides*, 2015, 72: 4–15.
- [14] CHEN T, LIU B, CHEN Y, *et al.* Development of a novel competitive ELISA based on nanobody-horseradish peroxidase fusion protein for rapid detection of antibodies against avian hepatitis E virus [J]. *Poultry Sci*, 2023, 102(1): 102326.
- [15] XU N. Research on HPCE determination of content and related proteins of bovine lactoferrin [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2005, 25(1): 68–70.
- [16] 许宁. 牛乳铁蛋白的质量研究及稳定性考察[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [17] XU N. Quality control and stability study for bovine lactoferrin [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [18] RONAYNE FPA, BARONI A, SAMBUCETTI ME, *et al.* Lactoferrin levels in term and preterm milk [J]. *J Am Coll Nutr*, 2000, 19(3): 370–373.
- [19] GIACINTI G, BASIRICO L, RONCHI B, *et al.* Lactoferrin concentration in buffalo milk [J]. *Ital J Anim Sci*, 2013, 12(1): e23.
- [19] 江利华, 刘佳惠, 颜朦朦, 等. 基于核酸适配体的胶体金比色法检测奶粉中的乳铁蛋白[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(9): 2864–2870.
- [19] JIANG LH, LIU JH, YAN MM, *et al.* Determination of lactoferrin in milk powder by colloidal gold colorimetry based on nucleic acid aptamer [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(9): 2864–2870.
- [20] ELLINGSON DJ, SHIPPAR JJ, VENNARD TR, *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.
- [21] SESSA R, DI PM, FILARDO S, *et al.* *Lactobacilli*-lactoferrin interplay in *Chlamydia trachomatis* infection [J]. *Pathog Dis*, 2017. DOI: 10.1093/femspd/ftx054
- [22] PURVINE S, EPPEL JT, YI EC, *et al.* Shotgun collision-induced dissociation of peptides using a time of flight mass analyzer [J]. *Proteomics*, 2003, 3(6): 847–850.
- [23] 陈柔含, 韩奕奕, 马颖清, 等. 乳及乳制品中牛乳铁蛋白含量测定方法比较研究[J]. *中国乳业*, 2022, (9): 95–101.
- [23] CHEN RH, HAN YY, MA YQ, *et al.* Comparative study on determination methods of bovine lactoferrin in dairy products [J]. *China Dairy*, 2022, (9):

- 95–101.
- [24] EVA B, EDUARD S. What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry [J]. *Proteomics*, 2017. DOI: 10.1002/pmic.201700180
- [25] KASPER A, HETTINGA, FABIOLA M, *et al.* Difference in the breast milk proteome between allergic and non-allergic mothers [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122234.
- [26] LI W, LI M, CAO X, *et al.* Comparative analysis of whey proteins in donkey colostrum and mature milk using quantitative proteomics [J]. *Food Res Int*, 2020, 127(C): 108741.
- [27] MOHAMMED Y, DOMANSKI D, JACKSON AM, *et al.* Peptide Picker: A scientific workflow with web interface for selecting appropriate peptides for targeted proteomics experiments [J]. *J Proteomics*, 2014, 106: 151–161.
- [28] 刘泽阳. 液相色谱-高分辨串联质谱法检测牛奶中的 A1 和 A2 β -酪蛋白[D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- LIU ZY. Determination of A1 and A2 β -casein in milk by liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry [D]. Changchun: Jiling University, 2021.
- [29] SEBASTIANI C, ARCANGELI C, CIULLO M, *et al.* Frequencies evaluation of β -casein gene polymorphisms in dairy cows reared in Central Italy [J]. *Animals*, 2020, 10(2): 252.
- [30] LIU B, QIAO W, ZHANG M, *et al.* Bovine milk with variant β -casein types on immunological mediated intestinal changes and gut health of mice [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 970685.
- [31] ANNA C, FIEDOROWIZ E, ROZMUS D, *et al.* Does a little difference make a big difference? Bovine β -casein A1 and A2 variants and human health-An update [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24).

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



陈荣桥, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 844247943@qq.com



洗燕萍, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 13642613459@139.com