

《婴幼儿配方食品、乳清粉和乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定 液相色谱-质谱/质谱法》编制说明（征求意见稿）

一、方法制定的基本情况

标准名称：婴幼儿配方食品、乳清粉和乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定

标准研制类别（制定、修订）：制定

起草单位：*****、*****

验证单位：*****、*****、*****、*****、*****

主要起草人：***、***、***、***

主要验证人：***

1.1 制定过程

1.1.1 立项目的

乳清是一种营养丰富的天然产物，具有较高的食用和工业价值。乳清蛋白是一种从牛乳中提取的优质蛋白质，具有高蛋白含量、易消化吸收、氨基酸组成均衡等特点。乳清是在奶酪制作过程中产生的一种天然副产品，是牛奶经凝乳处理后分离出固体凝乳块后的液体部分。在制作奶酪时，牛奶加入凝乳酶或酸性物质后，酪蛋白凝结形成固体凝乳块，而剩余的液体即为乳清。乳清富含优质蛋白质（如乳清蛋白）、乳糖、矿物质（如钙、钾）和维生素。其中，乳清蛋白是其核心成分，包含必需氨基酸和生物活性肽。可作为营养补充：乳清蛋白易被人体吸收，是健身人群、术后患者及老年人补充蛋白质的优质来源。在食品工业：乳清广泛用于制作乳清粉、蛋白粉、烘焙食品、饮料等。功能性作用：乳清蛋白也是我国婴幼儿配方食品的重要原料。

乳清蛋白在生牛乳中占总蛋白的 20%左右。在牛乳清蛋白中主要包含 β -乳球蛋白（50%-55%，支链氨基酸主要来源）、 α -乳白蛋白（20%-25%，促进矿物质吸收）同时包含免疫球蛋白、乳铁蛋白等具有生物活性的成分（兼具营养与生理调节功能），相关的特性参见下表^[1]。

表 1 牛乳中主要乳蛋白的特性

蛋白质	分子质量 ^a /Da	氨基酸残基数量			PO ₄ 数量	CH ₂ O 存在	浓度/ (g · L ⁻¹)	遗传变异体
		总量	Pro	Cys				
α _{s1} -酪蛋白	23 164	199	17	0	8	0	10	A, B, C, D, E, F, G, H
α _{s2} -酪蛋白	25 388	207	10	2	10~13	0	2.6	A, B, C, D
β-酪蛋白	23 983	209	35	0	5	0	9.3	A ¹ , A ² , A ³ , B, C, D, E, F, G
κ-酪蛋白	19 038	169	20	2	1	+	3.3	A, B, C, E, F ^S , F ^I , G ^S , G ^F , H, I, J
β-乳球蛋白	18 277	162	8	5	0	0	3.2	A, B, C, D, E, F, H, I, J
α-乳白蛋白	14 175	123	2	8	0	0	1.2	A, B, C
血清白蛋白	66 267	582	28	35	0	0	0.4	—
免疫球蛋白	103 000~143 000	8.4%	2.3%	—	—	+	0.8	—

a. 粗体的是遗传变异体的分子质量。

《食品安全国家标准 婴儿配方食品 (GB 10765-2021)》^[2]、《食品安全国家标准 较大婴儿配方食品 (GB 10766-2021)》^[3]规定了乳清蛋白的含量, 分别为 ≥60%和 ≥40%。《婴幼儿配方食品和乳粉 乳清蛋白的测定 (GB 5413.2-1997)》^[4]采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法进行乳清蛋白测定, 但该方法为半定量测定方法, 难以测定乳清蛋白的准确含量。《食品安全国家标准 乳清粉和乳清蛋白粉 (GB 11674—2010)》采用凯氏定氮法 (GB 5009.5) 测定乳清粉和乳清蛋白粉总蛋白含量, 无法准确获得乳清蛋白的主要成分 (α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白) 含量。

2007 年国家标准化管理委员会“关于下达 2007 年第 4 批国家标准制修订计划的通知〔国标委计(2007) 85 号〕”中将“婴幼儿配方乳粉中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的测定——高效液相色谱-质谱联用法”列入了制定计划 (项目编号为 20071157-T-469)。2010 年原卫生部食品安全综合协调与卫生监督局 (现国家卫生健康委食品安全标准与监测评估司) 委托国家乳制品质量监督检验中心牵头起草修订《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中乳清蛋白的测定 (项目编号:spaq-2010-100)》。起草单位建立了乳清蛋白测定的液相色谱法和 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白的液相色谱-串联质谱法, 删除了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法。第二届食品安全国家标准审评委员会理化检验方法与规程专业委员会第十五次会议审评认为第一法通过分析丙氨酸/脯氨酸两种氨基酸在乳清蛋白、酪蛋白等在乳蛋白中的含量及差异, 根据其比值测定乳清蛋白的含量, 尚缺乏理论依据与数据支撑, 乳清蛋白定量标准曲线无溯源结果, 且乳清蛋白和酪蛋白引用的标准适用性有待评价; 第二法 液相色谱-串联质谱法测定 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白具有技术可行性, 但需要进一步明确测定的 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白与乳清蛋白的关系。

在 α-乳白蛋白、β-乳球蛋白的液相色谱-串联质谱法研制的技术基础上, 提出婴幼儿配方食品、乳清粉、乳清蛋白粉中 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的测定 液相色谱-质谱/质谱法, 可以解决婴幼儿配方食品、乳清粉、乳清蛋白粉中乳清蛋白重要组成成分 (α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白) 的测定, 为婴幼儿配方食品、

乳清粉、乳清蛋白粉中乳清蛋白的质量评价提供可靠的技术手段，为《食品安全国家标准 婴儿配方食品（GB 10765-2021）》、《食品安全国家标准 较大婴儿配方食品（GB 10766-2021）》的乳清蛋白质量评价提供有力技术支撑。

1.1.2 实验室间验证工作

验证工作由北京市食品检验研究院、山东省食品药品检验研究院、上海市疾病预防控制中心、深圳市计量质量检测研究院、福建省产品质量检验研究院、泰州市食品检验院等实验室完成。

通过统计分析各个实验室的检测数据，验证了方法的线性、准确度和精密度、检出限和定量限等指标。

二、国内国际相关标准情况

目前国内用于乳清蛋白检测的仍然有效的方法为 1997 年制定的 GB 5413.2-1997《婴幼儿配方食品和乳粉乳清蛋白的测定》^[4]，该方法采用凝胶电泳法（SDS-PAGE），试样中的不同分子量蛋白在电场的作用下由于迁移率的不同而得到区分，形成不同的迁移条带，再根据经染色后条带的深浅度判别各蛋白的相对比例，此法受蛋白变性影响，染色剂与蛋白无法保证完全结合，导致检测结果存在偏差，且重现性不佳，为半定量方法，不能精确测定各种蛋白的含量。

国际上，美国国际标准化组织（ISO 23293-2020）及 AOAC 均用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶毛细管电泳（SDS-CGE）测定乳基配方奶粉中乳清蛋白的含量^[5]。使用脱脂奶粉作为标准样，确定乳清蛋白和酪蛋白的面积校正因子，然后将试样的毛细管电泳图按标准样的方式进行分段积分，根据各段的积分面积及校正因子计算乳清蛋白与酪蛋白的比值。首先，该方法依赖于脱脂奶粉的标准样，而非统一的蛋白或标准样品，没有溯源性；其次，该方法的结果是乳清蛋白与酪蛋白的比值，而非乳清蛋白的绝对含量，若试样中存在其他小分子氮，则与真实结果偏差较大；再者，若试样中掺入其他类型的蛋白（如大豆蛋白），电泳图将出现偏移，导致结果判定出现较大误差，也即无法对非乳蛋白进行鉴别。

目前文献报道的乳清蛋白的测定方法还有氨基酸折算法、高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用法。

氨基酸折算法是根据牛奶和乳清蛋白含有的独特氨基酸图谱，通过特定的氨基酸的差异来计算乳清蛋白含量的一种方法。Rae Greenberg 等人对氨基酸折算法（5 种氨基酸折算）^[6]计算奶粉中乳清蛋白含量的方法进行评估，对国内外品牌婴幼儿配方粉检测发现，一段奶粉中乳清蛋白的检测值高于标示值 5 ~ 10%，二、三段的奶粉乳清蛋白也与商品标示值有所偏差。该方法只适用于乳基婴幼儿配方粉，对含有豆基配方粉的产品不适用。氨基酸折算法易受其他添加的营养素的干扰，如添加多肽、氨基酸的产品。

HPLC 对配方乳粉中乳清蛋白的检测仅适用于某些产品，无法广泛应用于全部产品中乳清蛋白（ α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白）的检测，Xiaojing Ding 等人^[7]在实验过程中发现 α -乳白蛋白与乳铁蛋白在检测中峰形会出现重叠而干扰 α -乳白蛋白检测结果。该方法无法对复杂基质（乳基婴配粉）进行精准定量。农业

部在 2025 年发布了：《牛乳及其制品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定 高效液相色谱》（NY/T 4630—2025）^[8]，包括两个方法：反相色谱法（方法一）和凝胶渗透色谱法（方法二），方法声称：第一法适用于生牛乳和巴氏杀菌牛乳中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定；第二法适用于高温杀菌牛乳、灭菌牛乳、牛乳粉和牛乳基婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定。该方法仅可测定牛乳基婴幼儿配方乳粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白，不适用羊乳基质的检测，同时无法鉴别掺入植物蛋白基质样品。

液相色谱-质谱联用法是通过质谱检测酶解产生的特异性肽段对乳制品中蛋白进行鉴定和定量的方法。Cristian Piras¹ 综述了蛋白质组学应用于近几年来食品科学界对动物源性食品的关注典型范例，强调这是具有价值的、重要的学科，可作为评估食品质量和安全的工具^[9]。Rubén Agregán 等提出了蛋白质组学是一个新的研究领域，分析近几十年来在医学领域所取得的巨大的进展，并认为牛奶是一种高度异质和复杂的液体，其基质中存在大量蛋白质和肽，蛋白质组学被认为是一种可用于表征牛奶样品及其产品的强大工具。开发的技术已实现了详尽的牛奶和乳制品中蛋白质和肽的表征^[10]。Nagib Ahsan 等阐述了靶向蛋白质组学技术的最新进展，即多重反应监测（MRM）质谱（MS）结合同位素标记内标，也称为 AQUA 肽，可对食物样品进行绝对定量^[11]。杜鹃等人建立了超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱（UPLC-MS/MS）法测定乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的分析方法^[12]，其结果表明 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白分别在 40 ~ 1000 nmol/L 和 80 ~ 2000 nmol/L 范围内呈良好线性关系，定量下限(S/N=10)均为 0.020 g/100 g；加标回收率为 84.7% ~ 95.6%，相对标准偏差(RSD, n=6)为 1.6% ~ 5.8%。

综上，国内外目前尚未建立牛与羊乳基婴幼儿配方食品中主要乳清蛋白成分（ α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白）的准确定量的标准方法。也未建立可鉴别植物蛋白质掺假的鉴别方法。应用靶向蛋白组学检测技术建立乳清蛋白准确定量的方法无疑是最佳、可行的路径。

三、方法的重要内容及主要研究情况

3.1 方法原理

试样中的蛋白经温水溶解、烷基化、碱性胰蛋白酶酶解。与此同时将 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白系列标准溶液与试样同步平行烷基化、酶解。在试样和标准液酶解液中加入同位素标记的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段，用于校准由复杂基质导致的离子化误差。经液相色谱分离，质谱/质谱测定试样与标准酶解液，使用 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白系列标准溶液曲线计算结果，内标法定量。

3.2 主要技术路线

乳清蛋白是由 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、血清白蛋白和免疫球蛋白等组成，对于用凝乳酶生产的乳清蛋白粉，还含有较高水平的微量酪蛋白糖巨肽，其为 κ -酪蛋白经凝乳酶作用产生的含 64 个氨基酸残基的糖肽。其中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白是乳清蛋白的主要成分，约占总乳清蛋白含量的 75% 以上。因此，通过监测原料及产品中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量，可基本反映其乳清蛋白的质量。但无论是薄层

凝胶电泳法、毛细管电泳法、液相色谱法、凝胶色谱法，还是液相色谱质谱法，在测定 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白含量时均存在受复杂基质干扰、标准品的质量不同、加工工艺差异等众多因素的影响，使得测定的结果难以反应样品中的实际含量。

本研究通过靶向蛋白组学技术，既将专一性极强的酶解技术与质谱技术相结合，把结构复杂、分子量大的蛋白质酶切成结构简单、分子量相对较小的多肽，然后再运用液相色谱-质谱/质谱技术，对多肽进行分离与检测，最终获得试样中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的准确含量。

通过查询 UniProt 蛋白数据库，可获得 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的相关的蛋白质性质的信息，详见下图 3.2-1，由图可见 α -乳白蛋白是由 123 个氨基酸残基组成，其理论 pI 值: 4.80 ，平均分子量: 14186.06，精确分子量: 14176.81。 β -乳球蛋白由 162 个氨基酸残基组成，其理论 pI: 4.83 ，平均分子量: 18281.21，精确分子量: 18269.42。

α -乳白蛋白

MMSFVSLLLV GILFHATQAE QLTKEVFR LKDLKGYGGV SLPEWVCTTF HTSGYDTQAI VQNDSTEYG LQINNKIW
 CKDDQNPSS NICNISCDKF LDDDLTDDIM CVKILDKVGI NYWLAHKAL CSEKLDQWLC EKL
 (位置: 20 - 142, 理论pI值: 4.80 , 平均分子量: 14186.06,
 精确分子量: 14176.81)

β -乳球蛋白

MKCLLLALAL TCGAALIVT QTMKGLDIQK VAGTWYSLAM AASDISLLDA QSAPLRVYVE ELKPTPEGDL EILLQKWENG
 ECAQKKIIAE KTKIPAVFKI DALNENKVLV LDTDYKYL FCMENSAEPE QSLACQLVR TPEVDDEALE KFDKALKAL
 PMHIRLSFNP QLEEQCHI
 (序列: 17 - 178, 理论pI: 4.83 , 平均分子量: 18281.21,
 精确分子量: 18269.42)

图 3.2-1 图中为两个蛋白的氨基酸序列和相关信息

本研究所使用的用于蛋白质酶切的酶为碱性胰蛋白酶，其特点是专一性比较强，主要的作用位点是精氨酸（R）和赖氨酸（K），因此用该酶酶切蛋白获得的多肽序列相对固定，这为方法的准确定量提供了基础保障。通过软件模拟碱性胰蛋白酶酶切 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白所得到的理论肽段如图 3.2-2 所示。

mass	position	#MC	modifications	peptide sequence
2707.3759	31-56	0		VAGTWYSLAMAASDISLLDA QSAPLR
2647.2023	118-140	0		YLLFCMENSAEPEQSLACQC LVR
2313.2587	57-76	0		VYVEELKPTPEGDL EILLQK
1658.7843	165-178	0		LSFNPTQLEEQCHI
1245.5845	141-151	0		TPEVDDEALEK
1065.5826	108-116	0		VLVLDTDYK
1064.4465	77-85	0		WENGECAQK
933.5437	17-24	0		LIVTQTMK
916.4734	100-107	0		IDALNENK
837.4763	158-164	0		ALPMHIR
674.4235	94-99	0		IPAVFK
673.3879	25-30	0		GLDIQK
573.3606	87-91	0		IIAEK
4654.1467	36-77	0		GYGGVSLPEWVCTTFHTSGY DTQAI VQNDSTEYGLFQIN NK
1889.7752	82-98	0		DDQNPSSNICNISCDK
1642.7338	99-112	0		FLDDDLTDDIMCVK
1200.6524	118-127	0		VGINYWLAHK
1034.4975	134-141	0		LDQWLCEK
653.3075	25-29	0		CEVFR
650.3178	128-133	0		ALCSEK
618.3457	20-24	0		EQLTK
549.2853	78-81	0		IWCK

α -乳白蛋白

β -乳球蛋白

图 3.2-2 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白经碱性胰蛋白酶酶切后所获得肽段信息

除上述理论数据外，还需实验验证：选取高纯度的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标样，用碱性胰蛋白酶酶解后获得酶解溶液，酶解溶液通过液相色谱分离，高分辨串联质谱检测，获得的数据通过蛋白软件进行分析，依据肽段筛选原则，筛选出具有唯一性、稳定性的目标肽段；随后通过同位素标记技术对筛选获得的目标肽段进行同位素标记，用以消除质谱中由于复杂基质效应带来的干扰。再用高纯度 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白配制系列标准液，与试样平行酶解，内标法定量，从而实现试样中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的准确定量的目的。该方法既可测定试样中的原型蛋白，也可测定因试样被加工、加热而产生变性的部分蛋白，因此排除了样品复杂基质和热加工工艺带来的影响；同时此方法使用蛋白制作标曲，与试样平行酶解，也排除了因无法获得相对应的高纯度的、无法量值溯源的目标肽段标准品导致定量结果不可溯源的影响。下图 3.2-3 为本方法建立方法的技术路线图。其中需研究的关键点：1 特征肽段的选择与确认；2 酶解最佳条件的优化；3 串联四级杆质谱 MRM 方式的建立；4 同位素特征肽段的设计与合成。

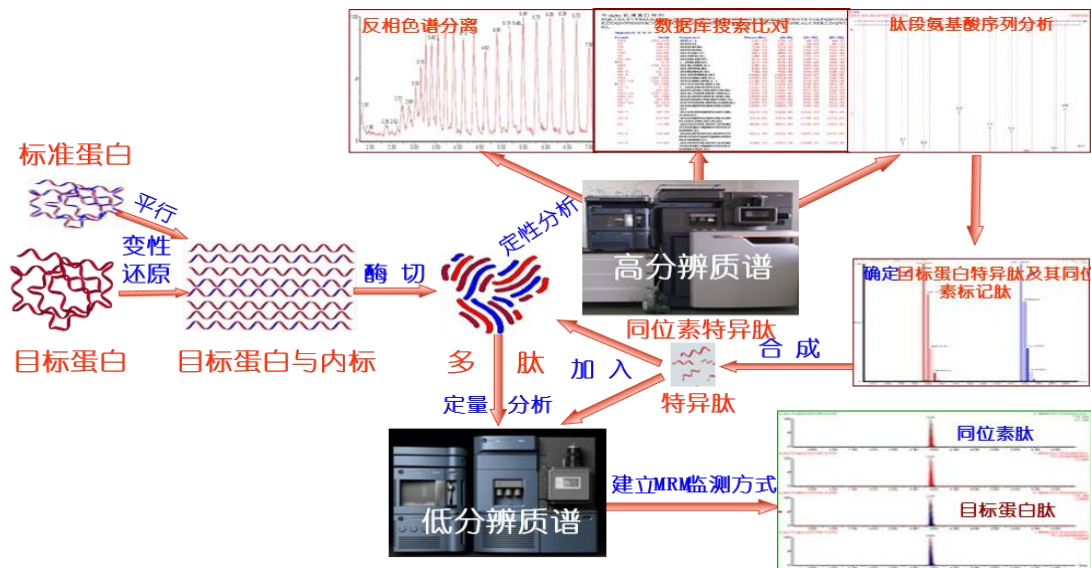


图 3.2-3 技术路线图

3.3 方法研究

3.3.1 应用质谱技术的定性与定量研究

3.3.1.1 肽段选择的依据与原则。

根据靶向蛋白质组学技术的原理与实验步骤可知，定量特征肽段的筛选是决定定量方法准确性的关键步骤，本方法依据 PeptidePicker 中肽段筛选的一般原则：1. 定量特征肽段具有高度的物种特异性；2. 定量特征肽段在 ExPASy 预测软件中具有良好的酶切特性；3. 定量特征肽段的长度在 7 到 20 个氨基酸之间最佳；4. 定量特征肽段具有高度保守性，即在目标蛋白质的所有变异亚型中均存在；5. 定量特征肽段的氨基酸序列中避免出现甲硫氨酸、半胱氨酸、色氨酸等不稳定、易氧化的氨基酸，筛选出特异性强、酶切效率高、稳定性强、质谱响应高的定量特征肽段。此外，本方法的测定基质为牛乳基和羊乳基，因此所选

择的特征肽段需要同时适用于牛乳基产品与羊乳基产品。

3.3.1.2 特征肽段的选择

通过对 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的蛋白酶解溶液进行高分辨扫描，获得高分辨扫描总离子流图，如图 3.3-1、图 3.3-2 所示。

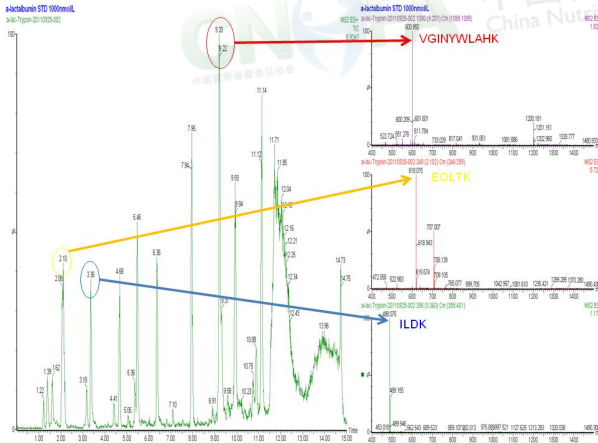


图 3.3-1 α -乳白蛋白酶解溶液高分辨扫描图

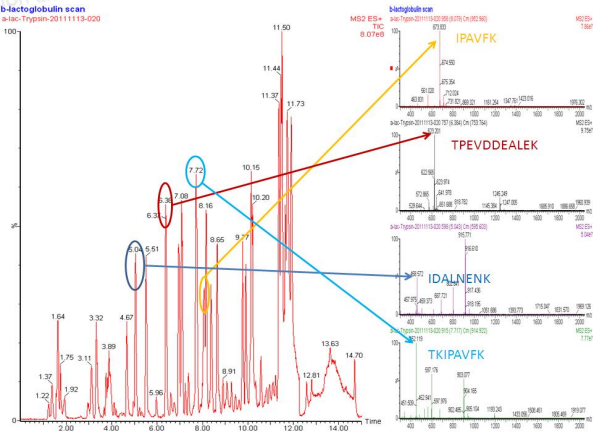


图 3.3-2 β -乳球蛋白酶解溶液高分辨扫描图

然后通过蛋白软件对 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的高分辨扫描图进行分析，获得对应的酶解肽段，如表 3.3-1 所示。根据肽段的筛选原则， α -乳白蛋白经胰蛋白酶酶解得到的长度在 7~20 个氨基酸的肽段有 4 条，其中牛羊共有的肽段有 VGINYWLAHK、LDQWLCEK、FLDDDLTDDIMCVK，但 FLDDDLTDDIMCVK 和 LDQWLCEK 肽段均含有 2 个不稳定氨基酸，因此选择 VGINYWLAHK 作为 α -乳白蛋白定量肽段； β -乳球蛋白肽段经胰蛋白酶酶解得到的长度在 7~20 个氨基酸的肽段有 8 条，其中牛羊共有的肽段有 VLVLDTDYK、ALPMHIR、IDALNENK、WENGECAQK，肽段 ALPMHIR 含易氧化的氨基酸，肽段 WENGECAQK 含有不稳定氨基酸，综合考虑质谱响应，IDALNENK 作为 β -乳球蛋白的定量肽段，VLVLDTDYK 可作为备选肽段。

表 3.3-1 高分辨质谱分析后肽段信息

样品基质	α -乳白蛋白来源肽段序列	β -乳球蛋白来源肽段序列
脱盐牛乳清粉	ALCSEK	ALPMHIR
	VGINYWLAHK	GLDIQK
	IWCK	IDALNENK
	ILDK	LIVTQTMK
	LDQWLCEK	IPAVFK
	GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAIQV	LSFNPTQLEEQCHI
	NNDSTEYGLFQINN	TPEVDDEALEK
	FLDDDLTDDIMCVK	VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR
	DDQNPSSNICNISCDC	VLVLDTDYK
	CEVFR	VYVEELKPTPEGDLEILLQK

	YLLFCMENS A EPEQSLACQLVR
	WENGECAQK
	VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR
	FLDDDLTDDIMCVK
	LAFNPTQLEGQCHV
	NICNISC DK
	VLVLDTDYK
	CEVFQELK
	WENGECAQK
脱盐羊乳清粉	DDQNPHSR
	IDALNENK
	VGINYWLAHK
	GLDIQK
	LDQWLCEK
	TPEVDNEALEK
	DDQNPHSR
	ALPMHIR
	ALCSEK
	IIVTQTMK

3.3.1.3 肽段稳定性验证

特征肽段不仅是检测的对象，更是结果定量的基础，因此其稳定性直接关系到定量结果的可靠性与准确性。为确认所选的特征肽段稳定周期，本实验将 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段配制成1 mg/mL的储备液，分装至2 mL聚丙烯的进样小瓶中，于-20°C下保存，然后在第0天、5天、10天、30天、60天、90天、180天的时间点取样回温后由液相色谱-紫外检测器分析，每个时间点平行分析3次，计算各时间点各物质的峰面积，并与第0天的数据进行t-检验比较，结果如表3.3-2所示，从第5天到第180天， α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段的峰面积与第0天相比，其P值均大于0.05，也即数据间无显著性差异，因此说明，在-20°C的保存条件下，180天内 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征肽段是稳定的。

表 3.3-2 特征肽段稳定性实验

储存时间	0天	5天	10天	30天	60天	90天	180天
α -乳白蛋白特征肽段	926699.8	923858.6	924153.1	919468.0	912929.2	917652.7	912475.2
	921758.4	921957.3	920187.2	924262.4	918603.5	918573.5	921845.3
	916385.3	918365.3	918492.4	920745.3	925057.5	921755.3	918492.5
t-检验 (vs 0天, P值)	/	0.89	0.68	0.98	0.71	0.64	0.52
β -乳球蛋白特征肽段	335263.2	331889.2	331840.3	331317.3	325427.6	322240.3	328403.1
	329735.2	329572.3	329573.5	328669.5	330487.6	339285.6	334866.5
	330145.3	326592.4	331037.4	332573.7	328734.6	323768.5	328946.4
t-检验 (vs 0天, P值)	/	0.17	0.56	0.69	0.39	0.67	0.80

3.3.1.4 MRM 参数建立

串联四级杆质谱的反应离子监测模式 (MRM) 是目前公认的最准确的定量方式，而肽段的质谱裂解有其特殊的规律，既在肽键中间断裂，若断裂后由N端带电，则称之为b型碎片离子，若断裂后由C端带电，则称之为y型碎片离子，这也是最重要的两种断裂方式。除上述断裂的基本规律外，子离子的选择还要考虑仪器的响应及同位素氨基酸的取代位置，尽量获得包含同位素取代的氨基酸序列。 α -乳白蛋白特征肽(VGINYWLAHK)和 β -乳球蛋白特征肽(IDALNENK)的理论裂解碎片见图3.3-4，按上述方法，结合

各肽段的实际子离子裂解图（图 3.3-5 和图 3.3-6），最终确定 α -乳白蛋白特征肽段(VGINYWLAHK)的子离子为 y 系列的离子 654.4 和 284.4，对应的氨基酸序列为 WLAHK 和 HK； β -乳球蛋白特征肽段 (IDALNENK) 的子离子为 b 系列的离子 229.1 和 y 系列的离子 688.4,对应的氨基酸序列为 ID 和 ALNENK。具体的参数如表 3.3-2 所示，所得的色谱质谱图如图 3.3-7 所示。

Average Mass = 1200.4062, Monoisotopic Mass = 1199.6451 Residues: 1-10 N-Terminus = H, C-Terminus = OH Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).											Average Mass = 915.9992, Monoisotopic Mass = 915.4662 Residues: 1-8 N-Terminus = H, C-Terminus = OH Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).										
a	72.1	129.1	242.2	356.2	519.3	705.4	818.5	889.5	1026.6	-	a	86.1	201.1	272.2	385.2	499.3	628.3	742.4	-		
b	100.1	157.1	270.2	384.2	547.3	733.4	846.5	917.5	1054.5	-	b	114.1	229.1	300.2	413.2	527.3	656.3	770.4	-		
c	115.1	172.1	285.2	399.2	562.3	748.4	861.5	932.5	1069.6	-	c	129.1	244.1	315.2	428.3	542.3	671.3	785.4	-		
i	72.1	30.0	86.1	87.1	136.1	159.1	86.1	44.1	110.1	101.1	i	86.1	88.0	44.1	86.1	87.1	102.1	87.1	101.1		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1	2	3	4	5	6	7	8		
	Val	Gly	Ile	Asn	Tyr	Trp	Leu	Ala	His	Lys		Ile	Asp	Ala	Leu	Asn	Glu	Asn	Lys		
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		8	7	6	5	4	3	2	1		
x	-	1127.6	1070.5	957.5	843.4	680.4	494.3	381.2	310.2	173.1	x	-	829.4	714.3	643.3	530.2	416.2	287.1	173.1		
y	-	1099.6	1042.5	929.5	815.4	652.4	466.3	353.2	282.2	145.1	y	-	801.4	686.3	615.3	502.2	388.2	259.1	145.1		
z	-	1084.6	1027.5	914.5	800.4	637.3	451.3	338.2	267.1	130.1	z	-	786.4	671.3	600.3	487.2	373.2	244.1	130.1		

a. 牛 α -乳白蛋白特异肽

b. 牛 β -乳球蛋白特异肽

图 3.3-4 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特异肽理论子离子信息图

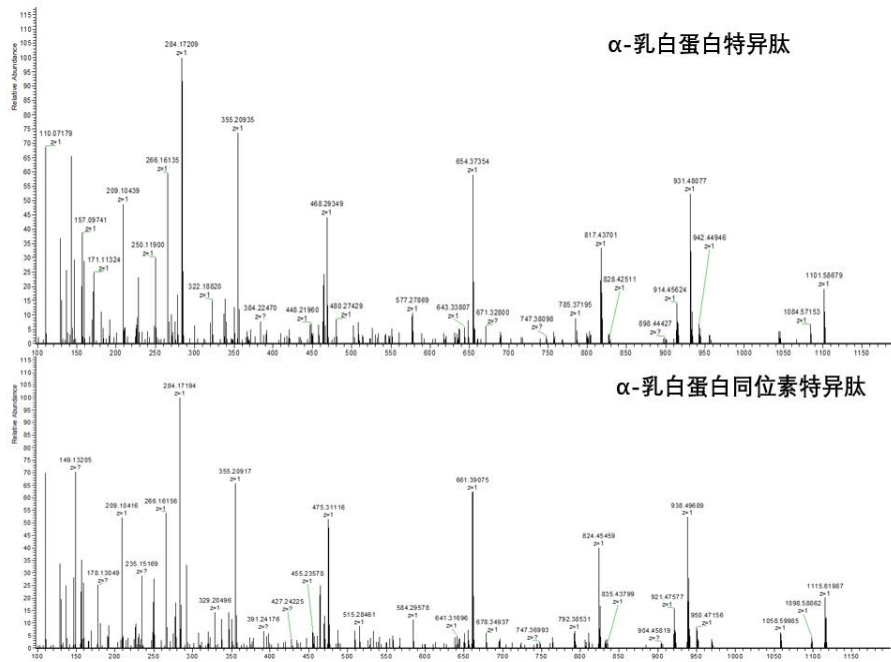


图 3.3-5 α -乳白蛋白特异肽、同位素肽段子离子质谱图

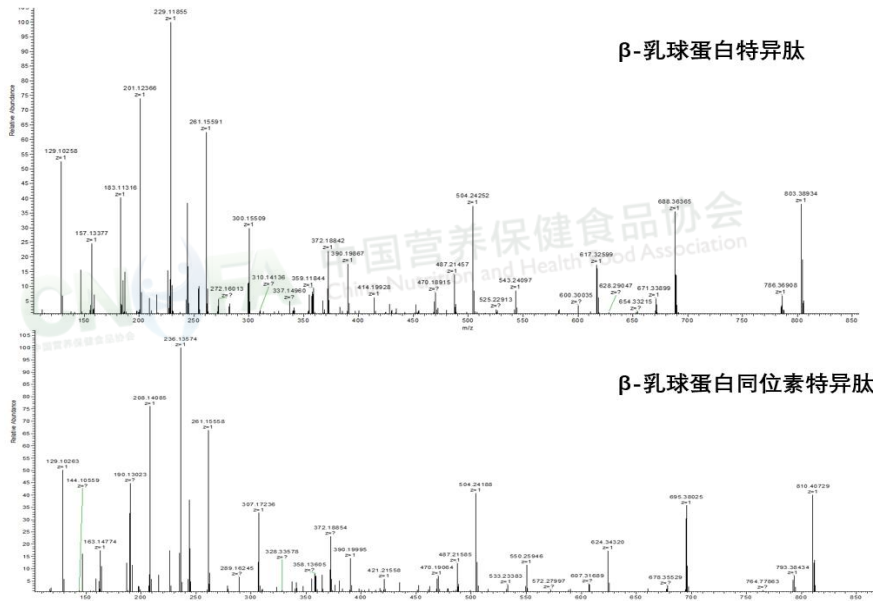
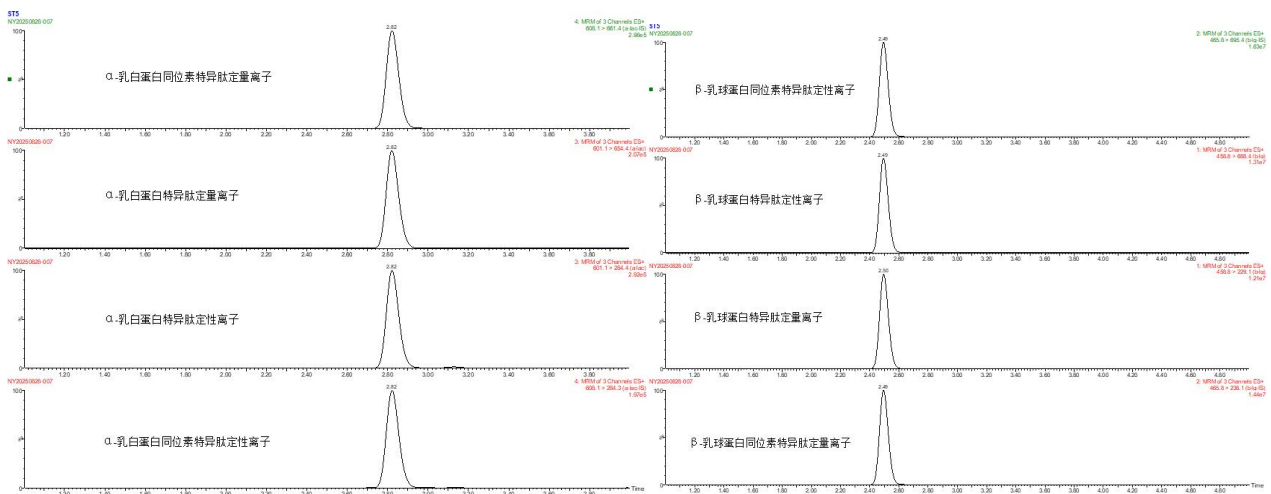


图 3.3-6 β-乳球蛋白特异肽、同位素肽段子离子质谱图

表 3.3-2 各肽段质谱参数

名称	分子量 (Da)	母离子(m/z)		锥孔电压(V)	子离子(m/z)	碰撞能量 (eV)
		[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺			
α-乳白蛋白特异肽	1199.7	1201.1	601.1	35	654.4*	24
					284.4	28
α-乳白蛋白内标特异肽	1214.42	1215.1	608.1	35	661.4*	24
					284.3	26
β-乳球蛋白特异肽	915.47	916.6	458.8	30	229.1*	30
					688.4	27
β-乳球蛋白内标特异肽	929.47	930.6	465.8	30	236.1*	30
					695.4	27

*为定量离子



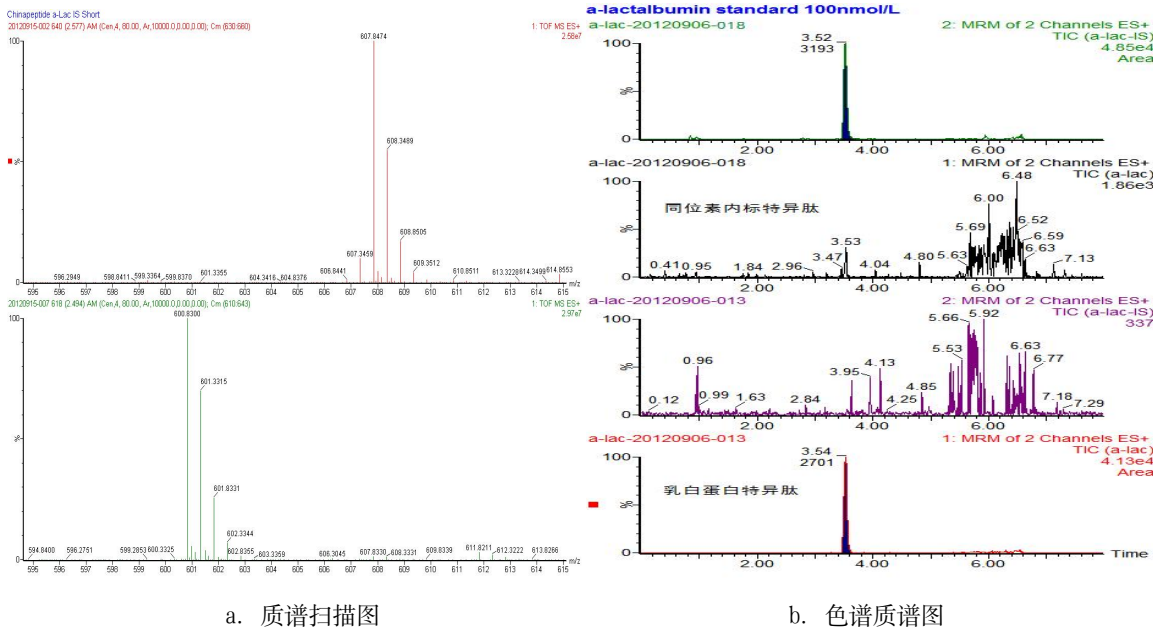
a. 牛 α-乳白蛋白

b. 牛 β-乳球蛋白

图 3.3-7 牛 α -乳白蛋白与 β -乳球蛋白肽段及同位素肽段质谱色谱图

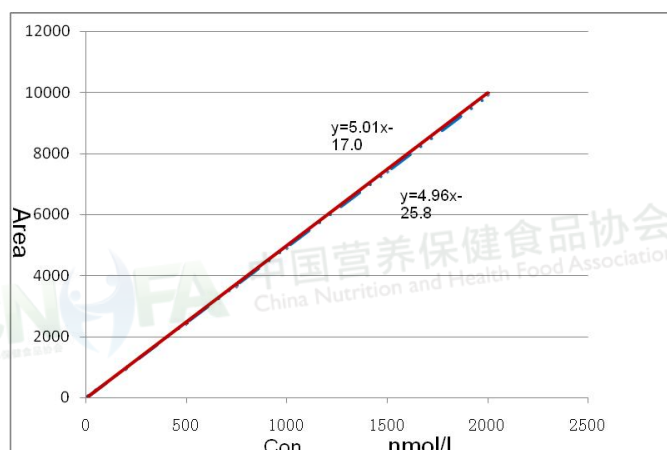
3.3.1.5 同位素特征肽段的设计与合成

基质干扰是质谱检测定量中最为常见的问题，使用内标以克服基质干扰对结果带来的影响是较为普遍亦是较为理想的手段，选择同位素内标为最佳选择。同位素内标需本身化学性质稳定，对被分析物不产生干扰，并与其具有高度相似性，且在试样中不存在。碳(1.11% ^{13}C)、氮(0.37% ^{15}N)元素的天然同位素在质谱检测器中响应显著，可获得较高的丰度，可作为稳定同位素标记氨基酸。如前所述，本方法选择的 α -乳白蛋白特征肽段(VGINYWLAHK)和 β -乳球蛋白特征肽段(IDALNENK)的母离子均为双电荷，同位素标记的元素个数过少则会引起质量数接近导致干扰，为此设计将肽段中的亮氨酸(Leu)和异亮氨酸(Ile)用同位素标记的亮氨酸(Leu- $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$)和异亮氨酸(Ile- $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$)替代，从而获得同位素标记的特征肽段与特征肽段有 14 个质量数差异，即使是双电荷也有 7 个质量数的差异(图 3.3-3 a)。根据 3.3.1.3 的操作， α -乳白蛋白同位素特征肽段(VGI*NYWL*AHK)选择的子离子为 y 系列断裂的离子 661.4 和 284.4，对应的氨基酸序列为 WL*AHK 和 HK； β -乳球蛋白特征肽段(I*DAL*NENK)选择的子离子为 b 系列断裂的离子 236.1 和 y 系列断裂的子离子 695.4，对应的氨基酸序列为 I*D 和 AL*NENK。具体的参数如表 3.3-2 所示，所得的色谱质谱图如图 3.3-7 所示。通过实验，特征肽段进样，在同位素特征肽段的离子通道不会出现色谱峰；同位素特征肽段进样，在特征肽段的离子通道不会出现色谱峰，但同位素特征肽段与特征肽段具有相同的色谱行为(图 3.3-3 b)。此外，通过配置相同浓度的标准浓度点，进样分析后分别拟合特征肽段与同位素特征肽段的线性方程及曲线，两者具有近乎相同的斜率，由此说明两者具有相同的质谱行为(图 3.3-3 c)。



a. 质谱扫描图

b. 色谱质谱图



c. 线性曲线

图 3.3-3 α -乳白蛋白特异肽、同位素肽段质谱扫描图、色谱质谱图及线性曲线

3.3.1.5 所选定特异肽的对羊乳基通用性的确认

由蛋白数据库 (<https://www.uniprot.org>) 查询获得牛、羊 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白对应的蛋白氨基酸序列如图 3.3-7 所示。兼顾目前市场上除了全牛乳源的产品以外，还存在羊乳基与牛乳清混合或者全羊乳源的产品，本方法所选肽段应兼顾考虑对羊乳清蛋白定量检测的可行性。由于牛与羊的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白具有较高同源性，它们的序列氨基酸相似度在 90% 以上，因此选择牛、羊均有的肽段理论上是可行的。由图下中被画有方框的氨基酸序列可见牛、羊存在相同序列的肽段。

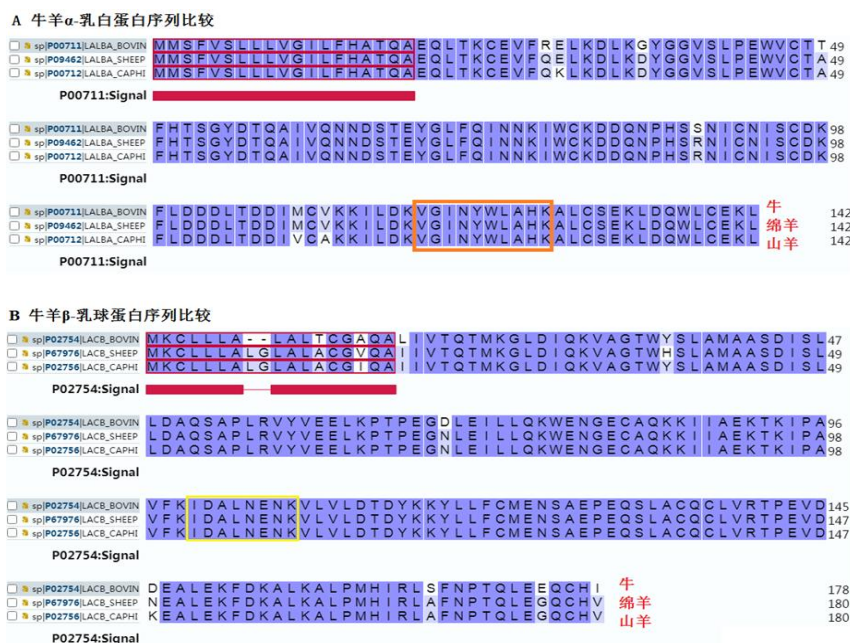


图 3.3-7 牛、羊 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白氨基酸序列

为验证所建立的方法也可用于羊乳基产品的测定，取脱盐羊乳清粉 2 g，用水溶解定容至 100 mL，样品稀释 10 倍后移取 200 μ L，加入 200 μ L 碳酸氢铵溶液和 10 μ L 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 70 $^{\circ}$ C 下恒

温反应 30 min；然后加入 30 μL 碘代乙酰胺溶液，混匀后于暗处静置 30 min；反应完成后加入 10 μL 氯化钙溶液和 10 μL 胰蛋白酶溶液，充分混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温酶解 5 h。酶解完成后，加入 10 μL 甲酸，混匀后置于室温下静置 15 min，终止反应，然后加入 50 μL 同位素标记特异肽溶液、680 μL 水混匀，过 0.22 μm 滤膜于聚丙烯材质塑料进样瓶中，进液相色谱-质谱/质谱仪检测。从图 3.3-8 可知，脱盐羊乳清粉在 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白特征通道均可出峰，从实验结果证明所选的特征肽段既可适用于牛乳基产品，也可适用于羊乳基产品，与上述的理论分析结果一致。

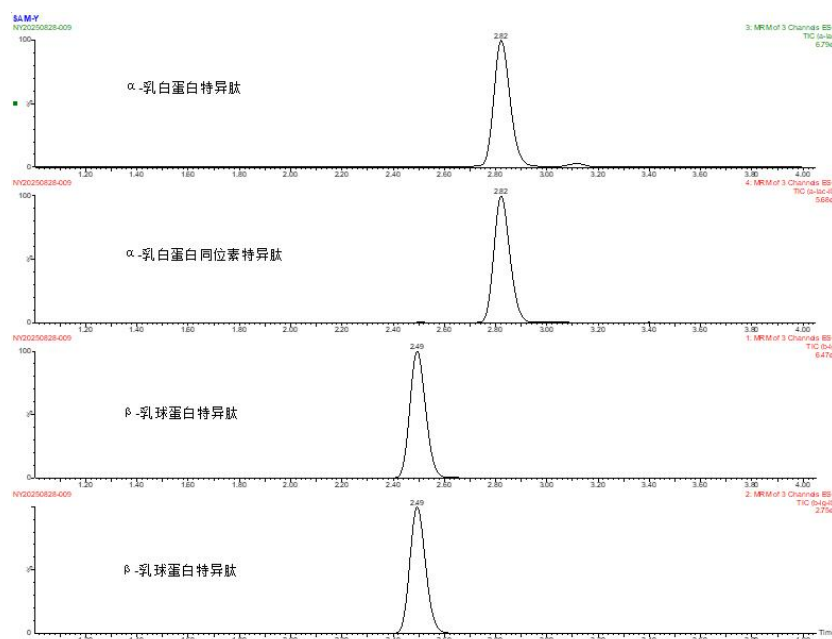


图 3.3-8 羊 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白色谱图

3.3.2 液相色谱条件优化

3.3.2.1 色谱柱的选择

色谱分析柱是影响分析物峰型、分离度的重要因素，由于本方法是先通过胰蛋白酶将分子量上万道尔顿的大分子蛋白质酶切成分子量几百至上千道尔顿的小分子多肽，然后再选择目标蛋白的特异性肽段进行检测，因此选择一根适合分离多肽的分离色谱柱是至关重要的工作。根据检测对象的特性，工作组尝试了以下 5 种不同规格的反相色谱柱：

A 柱：硅烷基 C4 柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.7 μm ，孔径 30 nm (300 \AA)；

B 柱：硅烷基 C18 柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.7 μm ，孔径 10nm (100 \AA)；

C 柱：硅烷基 C18 柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.7 μm ，孔径 30 nm (300 \AA)；

D 柱：硅烷基 C18 柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.7 μm ，孔径 13nm (130 \AA)。

结果如图 3.3-8 所示，柱 B 的色谱峰最差，主要是因为目标多肽的分子量对于小颗粒色谱柱偏大，致

使洗脱不是很顺畅，从而出现拖尾；柱 D 对 β -乳球蛋白虽有较理想的色谱峰，但对 α -乳白蛋白也同样存在拖尾现象，只是相对于柱 B 有所改善；虽然柱 A 和柱 C 一样均具有较好的峰形，但对于 β -乳球蛋白，柱 A 的保留较弱，出峰过早，易与杂质共流出。综上比较，最终选择柱 C，也就是 BEH300 C18,100 x2.1 mm,1.7 μ m 作为本方法的色谱分离柱。

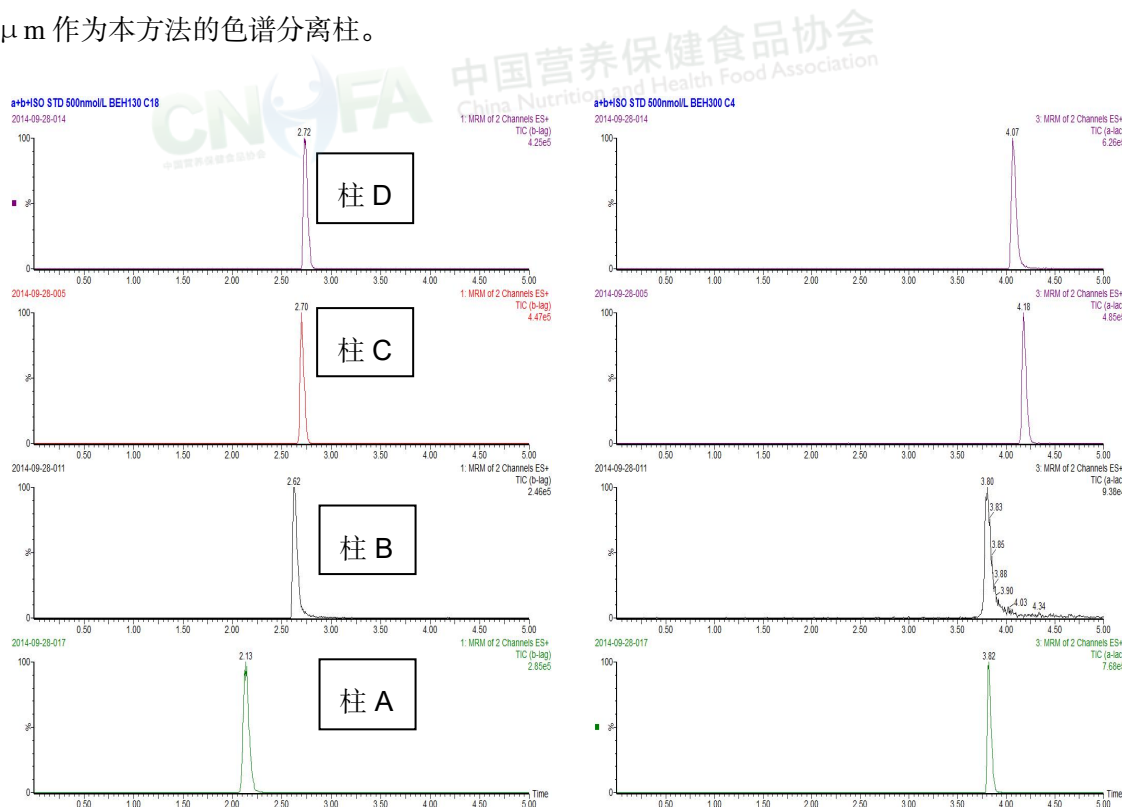


图 3.3-8 不同规格色谱柱分离效果的比较

3.3.2.2 流动相的选择

流动相是影响峰型、分离度及灵敏度的另一重要因素，选择合适的流动相组成不仅可以获得较好的峰型，还可以获得较好的灵敏度。为探讨流动相组成对两个目标物的影响，设计了两组实验进行比较，第一组为水相，第二组为有机相：

水相：

流动相 a —— 纯水；

流动相 b —— 0.05% 甲酸水溶液；

流动相 c —— 0.1% 甲酸水溶液；

流动相 d —— 0.2% 甲酸水溶液；

有机相：

流动相 e —— 乙腈；

流动相 f —— 0.05% 甲酸乙腈溶液；

流动相 g —— 0.1% 甲酸乙腈溶液；

流动相 h —— 0.2% 甲酸乙腈溶液。

用同一浓度的标准、相同的检测条件进行正交比较，以所得目标物色谱质谱图的信噪比作为比较依据，结果如表 3.3-3 所示。由结果知在水相及有机相中均加入 0.1% 的甲酸时，目标物色谱质谱图的信噪比最高，

也即在此条件下灵敏度最高。因此选择 0.1%甲酸水溶液和 0.1%甲酸乙腈溶液作为本方法的流动相。

表 3.3-3 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白信噪比比较

α -乳白蛋白 信噪比	a	b	c	d
e	511	679	865	693
f	552	857	947	703
g	629	872	1144	745
h	523	756	843	712

β -乳球蛋白 信噪比	a	b	c	d
e	357	434	572	497
f	416	472	598	506
g	535	671	737	612
h	476	482	534	487

3.3.3 前处理条件的优化

本方法引入了蛋白组学的酶解方法，先用碱性胰蛋白酶将待测的目标物进行酶切，得到易于检测的肽段分子。为了考查酶解条件的相关参数，在查询相关文献资料的基础上，方法起草组针对同一试样，设计不同的方案并进行实验，从中选优。

3.3.3.1 烷基化反应条件选择

在 α -乳白蛋白氨基酸序列中存在 8 个半胱氨酸，在 β -乳球蛋白序列中存在 7 个半胱氨酸，半胱氨酸能在蛋白质分子内或分子间形成使蛋白质获得稳定空间结构的二硫键。要想通过质谱技术测定目标蛋白的特征肽段，获得准确的定量结果，首先需要将蛋白质分子内或分子间的二硫键打开，让碱性胰蛋白酶作用在赖氨酸和精氨酸位点上。打开二硫键的经典试剂为二硫苏糖醇（DTT），其具有很强的还原性，能够将蛋白质分子内或分子间的二硫键还原成巯基。DTT 的还原能力与溶液的 pH 值密切相关，只有当溶液中的 pH 值大于 7 时才能够发挥还原作用，最宜 pH 值为 8.3。被还原形成的巯基具有活泼的化学性质，需要立即进行封端，否则会再次形成二硫键。用于封闭巯基的试剂通常使用的是碘代乙酰胺（IAA），它能迅速与巯基发生反应，将巯基上的活泼氢夺取，从而使巯基被封端，此为烷基化反应，烷基化反应的最佳 pH 值为 8.0~8.5。

在蛋白组学领域，蛋白质的还原与烷基化反应条件已有成熟的文献^[13,14,15]支持，要求控制 DTT 与 IAA 的浓度与比例，即可获得理想的实验效果。本方法的还原与烷基化条件基本依据前人的研究成果^[16]实施。

β -乳球蛋白是一种比较特殊的球蛋白，具有比较紧密的三维空间结构，被还原反应的难度要高于其

他结构类型的蛋白。为此，本文在前人基础上对 DTT 的浓度和还原温度进行正交实验，最终确定最优的还原反应条件。其中 DTT 的终浓度为 2、5 和 10 mmol/L，还原反应的温度为 60、70、80、90 ° C，IAA 溶液的浓度也须与 DTT 溶液保持一致，保证过量的 DTT 溶液不会对后续的酶解过程产生影响。结果如图 5 所示，由此结果可以推论，提高 DTT 浓度也可提高还原效率，但是通过提高反应温度所带来的还原效率影响更明显。在 70-90 ° C 的反应温度范围内， β -乳球蛋白的测得量略微有所波动，可能是由实验误差引起的。考虑到高温可能导致多肽的破坏，且主要用于测定牛乳的特异肽段，最终本文选择 DTT 的终浓度为 10 mmol/L 和还原反应温度为 70 ° C。

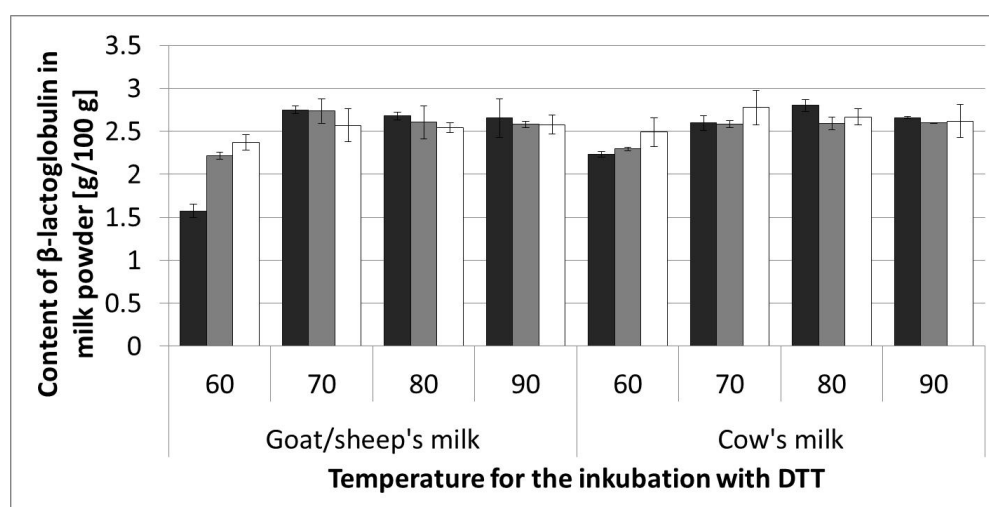


图 5 DTT 反应浓度与温度的比较

(黑: DTT 浓度为 2 mmol/L; 灰: DTT 浓度为 5 mmol/L; 白: DTT 浓度为 10 mmol/L)

对于 DTT 与 IAA 的浓度与浓度比率，有关文献还做了优化，其结论是鉴于 IAA 的过烷基化会造成定性结果的复杂性和定量结果的误差，建议严格按照化学计量加入 DTT 和 IAA 即二者最终物质的量比为 1:2，控制烷基化时间为 30 分钟，并在烷基化后及时封闭残留 IAA。本方法烷基化操作过程完全按该建议执行，未做更多的改动。

3.3.3.2 酶浓度及酶解时间的确定

酶的浓度及酶解的时间是影响酶解效果的另一重要因素，酶量不足则蛋白质就无法被有效的酶切，而酶量过大不仅增加成本，又会因酶的自溶产物影响离子化效率；而对于酶解时间，在酶量充足的前提下，若时间过短，则酶解未完全，若时间过长酶的自溶物增加影响离子化效率。无论是酶量不足或过多，还是时间过短或过长，均会对酶解效率、离子化效率产生影响，进而影响方法的重现性，合理的酶量及酶解时间是本方法具有较好重现性的前提。根据文献^[12,15]及牛胰蛋白酶使用说明等资料的介绍，牛胰蛋白酶与底物(蛋白质)的浓度比例范围为 1:20~1:250，酶解时间根据目标物的不同而异。为确定针对 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的最佳酶浓度与酶解时间，分别选择酶浓度与蛋白浓度比例为 1:250、1:125、1:60、1:40、1:20、

1:5 和酶解时间为 1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、20 小时，然后进行正交实验，结果如图 3.3-10、图 3.3-11 所示。无论是 α -乳白蛋白还是 β -乳球蛋白，在酶的浓度较低时，如 1:250 和 1:125，酶解获得的产物峰面积均未达到最高，而当酶浓度增加至 1:60 时，酶解获得的产物峰面积趋于最高，此后酶浓度再增加，峰面积也无显著差异。也即当酶浓度与蛋白浓度比值在 1:60 到 1:5 之间，均能将 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白全部酶切，从而达到最高。此外，当酶浓度相对较高时，到达峰值所需时间会缩短，而当酶解时间无限延长，至 12 小时以上时，产物的峰面积响应开始下降，当酶浓度在 1:5 时， α -乳白蛋白在 7 小时后就开始出现下降的趋势，这可能与酶过量后发生自切的产物越来越多，从而对目标物产生基质影响。综合考虑，方法最终选择酶与蛋白底物的浓度比列为 1:5~1:60，酶解时间为 5 小时。

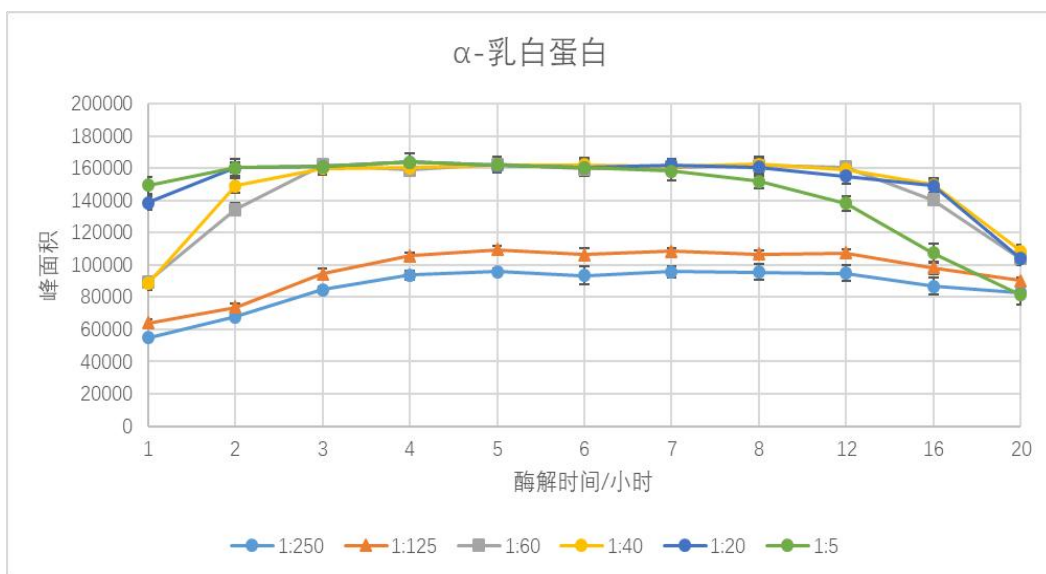


图 3.3-10 α-乳白蛋白酶浓度比列及酶解时间实验图

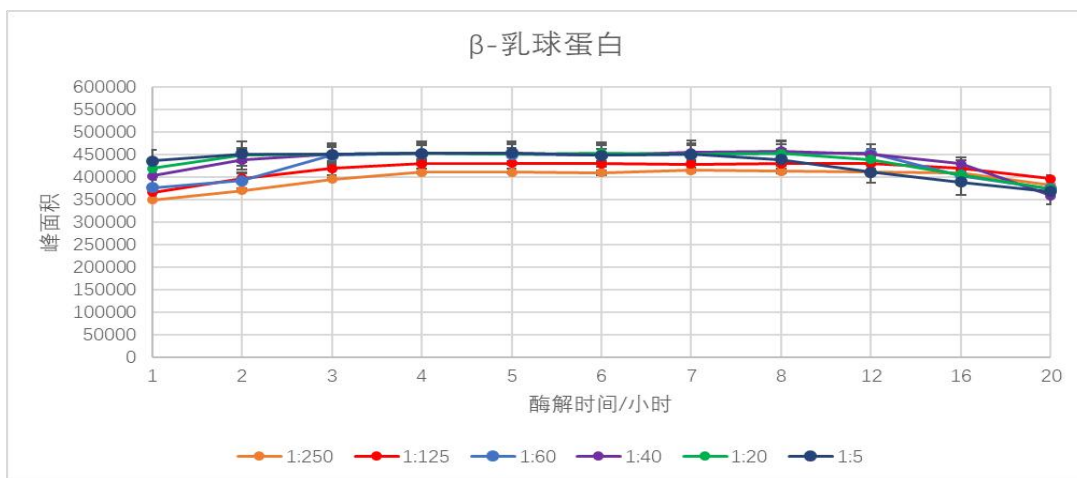


图 3.3-11 β-乳白蛋白酶浓度比列及酶解时间实验图

3.3.3.3 终止酶解反应试剂的选择

终止酶解反应的关键是将酶解溶液的 pH 值调至酸性(pH 约为 2)，在此环境下，碱性胰蛋白酶处于失活状态。多数文献报道的终止酶解所用的试剂为 200 mM 盐酸溶液，盐酸酸性极强，调 pH 值的效果过于显著。考虑强酸环境对色谱柱的使用寿命影响较大，且盐酸对质谱检测器的影响也非常大，故而尝试了用甲酸或三氟乙酸作为终止酶解试剂，经对比实验表明，使用甲酸或三氟乙酸作为终止酶解剂亦可达到相同效果。结合色谱分离所用流动相，最终选择甲酸作为终止酶解的试剂。

3.3.4 特异性验证

为证明所选择的肽段是 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白所特有的，本方法选择了不同类型不同基质的蛋白进行了特异性实验。从 sigma 购买的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白、 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、人乳蛋白、大豆蛋白、大米蛋白等标准品，配成 1 mg/mL 的溶液，取 200 μ L 上述溶液于 2 mL 聚丙烯材质的离心管中，加入 200 μ L 碳酸氢铵溶液和 10 μ L 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 70 $^{\circ}$ C 下恒温反应 30 min；然后加入 30 μ L 碘代乙酰胺溶液，混匀后于暗处静置 30 min；反应完成后加入 10 μ L 氯化钙溶液和 10 μ L 胰蛋白酶溶液，充分混匀后于 37 $^{\circ}$ C 下恒温酶解 5 h。酶解完成后，加入 10 μ L 甲酸，混匀后置于室温下静置 15 min，终止反应，用水定容至 1 mL，按优化好的相同的色谱及质谱条件进行分析，得质谱色谱图如图 3.3-12 所示，由图可知，上述蛋白均不在所选肽段离子通道中出峰，更不会产生干扰，由此说明所选肽段为 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的特异肽段。

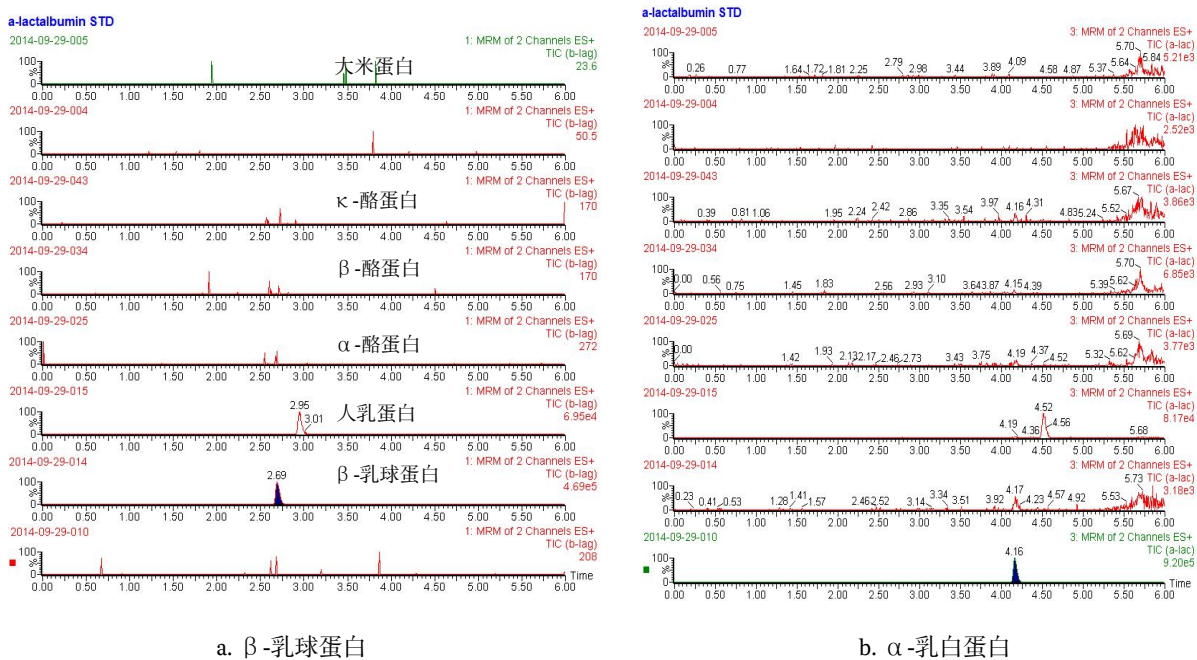


图 3.3-12 各种蛋白酶解物质质谱色谱图

3.3.5 酶解效率评估

在适合的条件下，碱性胰蛋白酶虽有较高的酶解效率，但在样品中仍然存在基质效应等不可控因素，

为考察碱性胰蛋白酶在样品中的酶解效率，本研究分别选择水、鲜牛乳、酸乳、配方奶粉、全脂奶粉、脱脂奶粉和乳清粉等 7 种基质，对每种基质进行基质空白和基质加标处理，其中 α -乳白蛋白的添加量为 2.5 nmol， β -乳球蛋白的添加量为 5.0 nmol，处理所得样品用各自对应的特征肽段计算结果，并与理论添加量比较，计算出回收率，详见表 3.3-4。由表可知，无论在何种基质中，两种目标蛋白的酶解效率均达 95% 以上，高酶解效率完全满足准确定量的要求。

表 3.3-4 酶解效率评价

基质		水	鲜奶	酸奶	配方奶粉	全脂奶粉	脱脂奶粉	乳清粉	
α -乳白蛋白	添加量(nmol)	2.5							
	测定值 (nmol)	本底样	0.00	1.38	1.04	2.05	1.56	1.74	2.89
		加标样	2.45	3.84	3.48	4.53	4.04	4.15	5.34
	酶解效率(%)		98.0	98.4	97.6	99.2	99.2	96.4	98.0
β -乳球蛋白	添加量(nmol)	5.0							
	测定值 (nmol)	本底样	0.00	3.20	2.27	5.06	3.73	3.98	6.99
		加标样	4.89	8.11	7.25	9.95	8.58	8.79	11.8
	酶解效率(%)		97.8	98.2	99.7	97.7	97.0	96.1	95.9

3.3.6 基质效应评估

分别取事先已测定过其中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白含量的牛乳基配方奶粉和羊乳基配方奶粉 2 g，然后进行标准添加，加标量约是本底值的 0.5 倍、1.0 倍和 2.0 倍，即 α -乳白蛋白的添加量为：0.5 g/100g、1.0 g/100g、2.0 g/100g； β -乳球蛋白的添加量为：1.5 g/100g、3.0 g/100g、6.0 g/100g。用水溶解后定容至 100 mL，样液再稀释 10 倍，取 200 μ L 上述样液于 2 mL 聚丙烯材质的离心管中，加入 200 μ L 碳酸氢铵溶液和 10 μ L 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 70 $^{\circ}$ C 下恒温反应 30 min；然后加入 30 μ L 碘代乙酰胺溶液，混匀后于暗处静置 30 min；反应完成后加入 10 μ L 氯化钙溶液和 10 μ L 胰蛋白酶溶液，充分混匀后于 37 $^{\circ}$ C 下恒温酶解 5 h。酶解完成后，加入 10 μ L 甲酸，混匀后置于室温下静置 15 min，终止反应，然后加入 50 μ L 同位素标记特异肽溶液、680 μ L 水混匀，过 0.22 μ m 滤膜后进质谱分析，同时做溶剂标准对照。以标准添加浓度为横坐标，各特征肽段的峰面积为纵坐标，线性拟合获得线性方程，结果如图 3.3-17 和图 3.3-18 所示；另外以标准添加浓度为横坐标，各特征肽段的峰面积与同位素特征肽段的峰面积比值为纵坐标，线性拟合获得线性方程，结果如图 3.3-19 和图 3.3-20 所示。

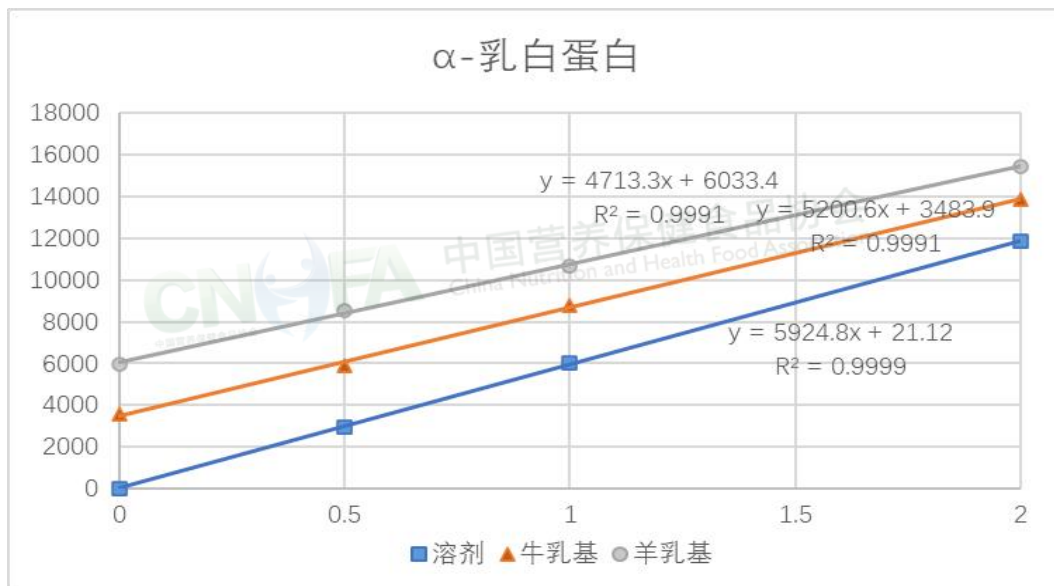


图 3.3-17 溶剂及基质标准添加外标线性拟合 (α-乳白蛋白)

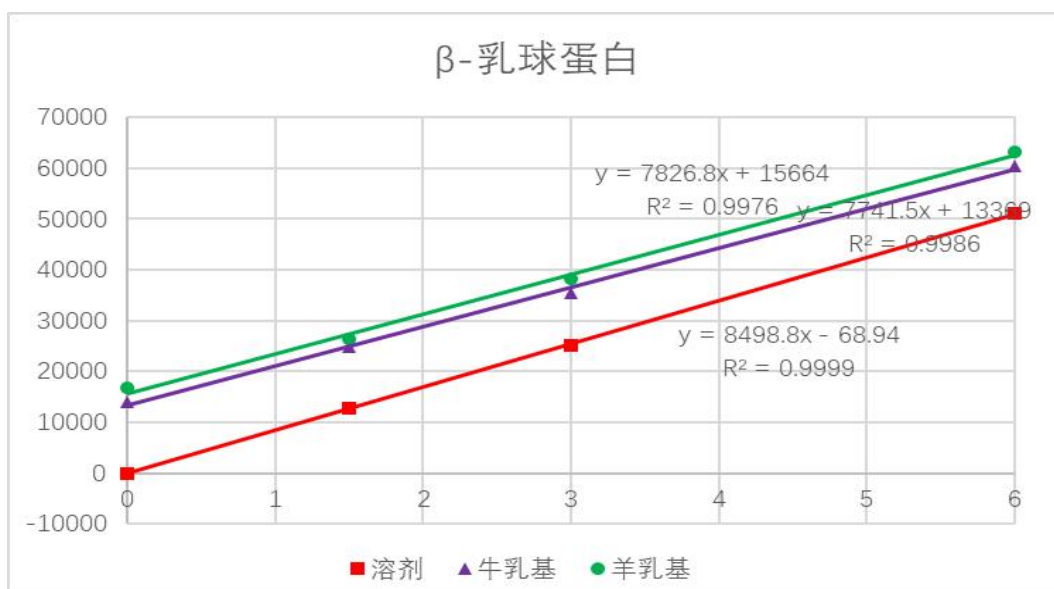


图 3.3-18 溶剂及基质标准添加外标线性拟合 (β-乳球蛋白)

由图 3.3-17 和图 3.3-18 知, 在溶剂中, α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白的外标斜率分别是 5924.8 和 8498.8, 而在牛乳基及羊乳基中的斜率分别是 5200.6、7741.5 和 4713.3、7826.8, 分别存 12.2%、8.9%、20.4%和 7.9%的基质抑制作用, 因此需要同位素特征肽作为内标进行基质效应的校正。

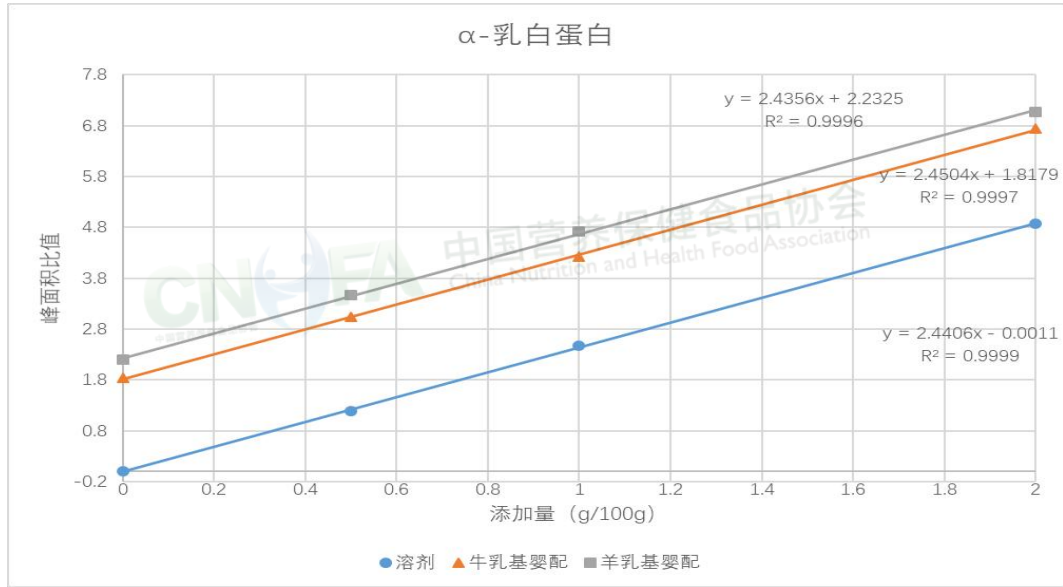


图 3.3-19 溶剂及基质标准添加内标线性拟合 (α -乳白蛋白)

当加入同位素特征肽段，并以特征肽段峰面积与同位素特征肽段峰面积的比值为纵坐标，结果如图 3.3-19 和图 3.3-20 所示，溶剂中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的斜率分别为 2.4406 和 0.8274；而在牛乳基质中的斜率分别是 2.4504 和 0.8292，与溶剂的斜率比值分别为 1.0018 和 0.9975；羊乳基质中的斜率分别是 2.4345 和 0.8292，与溶剂的斜率比值分别为 1.0022 和 1.0022。由结果知，在加入同位素特征肽段，并进行校正后，无论是牛乳基质或是羊乳基质， α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的斜率与溶剂中的一致，也即同位素特征肽段在基质效应的消除方面起到显著性作用，为方法的准确定量提供了保障。

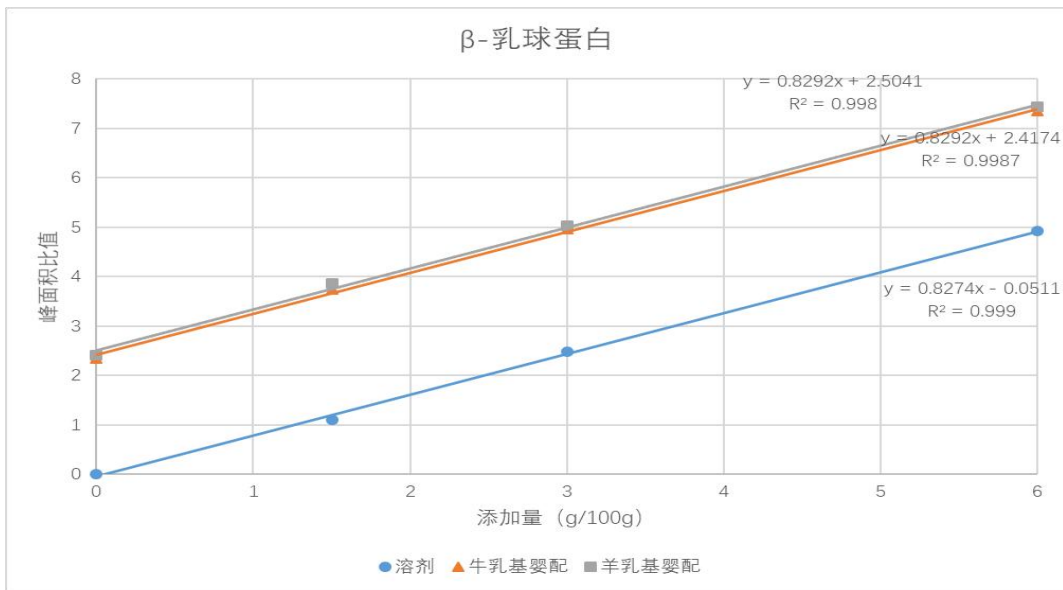


图 3.3-20 溶剂及基质标准添加内标线性拟合 (β -乳球蛋白)

3.4 实验室内方法学验证

3.4.1 线性

配制 α -乳白蛋白浓度分别为0.3、0.6、1.5、3.0、4.5和6.0 $\mu\text{g/mL}$ ； β -乳球蛋白浓度分别为0.9、1.8、4.5、9.0、13.5和18.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作溶液，然后经烷基化及酶解处理后，在每个浓度点中加入50 μL 的同位素特征肽段混合(2.0 $\mu\text{g/mL}$)溶液。进样分析后，以样品峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标， α -乳白蛋白或 β -乳球蛋白浓度为横坐标，得标准曲线如图3.4-1所示， α -乳白蛋白的线性相关系数 R^2 为0.9987， β -乳球蛋白的线性相关系数 R^2 为0.9998，两种物质的线性相关系数 R^2 均大于0.99，满足准确定量的要求。

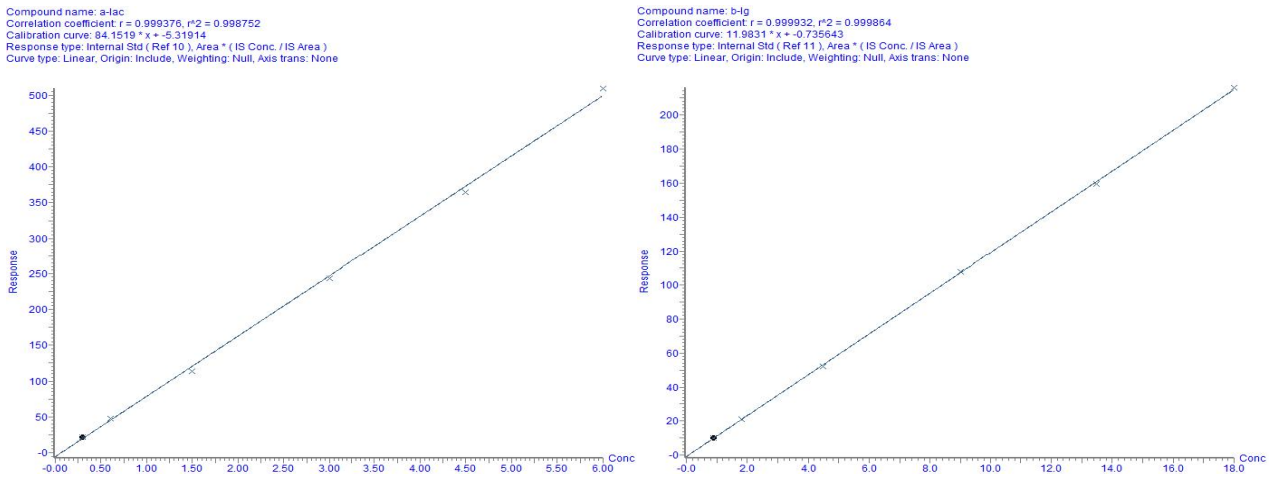


图3.4-1 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的标准曲线

3.4.2 检出限和定量限

经大量的样品筛查，无论是牛乳基亦或是羊乳基的产品，其 α -乳白蛋白与 β -乳球蛋白的含量普遍在100mg/100g以上，不适用于检出限、定量限的实验，故而选择与牛或羊的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白序列差异较大的骆驼奶粉作为空白基质，经uniprot蛋白质数据库检索分析，骆驼 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白不含所选的特征肽段。称取1.0 g骆驼奶粉10份，加入 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品（其中 α -乳白蛋白的添加量为20 mg/100g， β -乳球蛋白的添加量为25 mg/100g）过夜放置。然后按预处理方法进行处理后进样分析，计算结果及标准偏差，当以置信度为95%时的变异系数与标准差的乘积作为方法的检测限（LOD），3倍的检测限为定量限（LOQ），计算得到 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的检出限（LOD）分别为2.93 mg/100g和5.15 mg/100g； α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的定量限（LOQ）分别为8.79 mg/100g和12.46 mg/100g，结果如表3.4-1所示。为便于操作，本方法最终将 α -乳白蛋白的定量限定为10 mg/100g， β -乳球蛋白的定量限定为12.5 mg/100g。

表 3.4-1 检测限与定量限

平行	α -乳白蛋白	β -乳球蛋白
----	----------------	---------------

	测定值	平均值	标准偏差(s)	LOD	LOQ	测定值	平均值	标准偏差(s)	LOD	LOQ
	mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g
1	10.1	10.13	0.99	2.93	8.79	12.9	13.1	1.40	4.15	12.46
2	10.6					10.9				
3	11.7					15.6				
4	9.8					13.6				
5	10.2					11.9				
6	9.3					14.8				
7	8.7					12.6				
8	9.8					13.3				
9	9.3					13.6				
10	11.7					11.9				

注: LOD= $s \times f_{(n)}$; LOQ= $3 \times \text{LOD}$; $f_{(n)}$ 为置信度 95%时的变异系数, 查表得; 当 n=10 时, $f_{(10)}=2.96$ 。

3.4.3 精密度

3.4.3.1 日内精密度

称取婴配奶粉2 g, 平行11份, 用水溶解后定容至100 mL, 样液再稀释10倍, 取200 μ L上述样液于2 mL聚丙烯材质的离心管中, 加入200 μ L碳酸氢铵溶液和10 μ L二硫苏糖醇溶液, 混匀后于70 $^{\circ}$ C下恒温反应30 min; 然后加入30 μ L碘代乙酰胺溶液, 混匀后于暗处静置30 min; 反应完成后加入10 μ L氯化钙溶液和10 μ L胰蛋白酶溶液, 充分混匀后于37 $^{\circ}$ C下恒温酶解5 h。酶解完成后, 加入10 μ L甲酸, 混匀后置于室温下静置15 min, 终止反应, 然后加入50 μ L同位素标记特异肽溶液、680 μ L水混匀, 过0.22 μ m滤膜后进质谱分析, 内标法计算结果, 见表3.4-2。牛 α -乳白蛋白的日内精密度相对标准偏差RSD为2.6%, 牛 β -乳球蛋白的日内精密度相对标准偏差RSD为4.7%, 两者均小于10%, 符合定量分析的要求。

表 3.4-2 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的日内精密度试验

试验次数	α -乳白蛋白(g/100g)	β -乳球蛋白(g/100g)
1	1.71	2.87
2	1.67	2.58
3	1.75	2.94
4	1.68	2.81
5	1.75	2.78
6	1.67	3.04
7	1.71	2.89
8	1.77	2.73
9	1.64	2.75
10	1.77	2.69
11	1.71	2.87
平均值	1.71	2.81
SD	0.04	0.13

RSD(%)	2.6	4.7
--------	-----	-----

3.4.3.2 日间精密度

连续 11 天，每天按 3.4.3.1 中方法处理同一婴配奶粉，进样检测，内标法计算结果，见表 3.4-3，牛 α -乳白蛋白的日间精密度相对标准偏差 RSD 为 3.7%；牛 β -乳球蛋白的日间精密度相对标准偏差 RSD 为 3.6%，两者均小于 10%，符合定量分析的要求。

表 3.4-3 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的日间精密度试验

试验天数	牛 α -乳白蛋白 (g/100g)	牛 β -乳球蛋白 (g/100g)
1	1.71	2.87
2	1.69	2.84
3	1.65	2.8
4	1.78	2.95
5	1.72	2.89
6	1.63	2.72
7	1.74	2.92
8	1.59	2.67
9	1.76	3.02
10	1.68	2.81
11	1.61	2.76
平均值	1.69	2.84
SD	0.06	0.1
RSD(%)	3.7	3.6

3.4.4 准确度

因奶粉中天然含有 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白，且浓度较高。根据欧盟法典委员会 2002/675/EC 规定，无法获得阴性样品时，标准添加浓度按样品本底值的 0.5 倍、1.0 倍和 2.0 倍或 0.5 倍、1.0 倍和 1.5 倍添加。因此，本实验选择奶粉本底值的 0.5 倍、1.0 倍和 2.0 倍做加标回收实验，每个加标水平独立检测 7 次（其中表 3.4-4 是牛乳基样品加标，表 3.4-5 是羊乳基样品加标），结果见表 3.4-4 和表 3.4-5。牛乳基样品中三个浓度水平加标的 α -乳白蛋白回收率在 97.3%-107.6%， β -乳球蛋白的回收率在 97.2%-106.2% 之间；羊乳基样品中三个浓度水平加标的 α -乳白蛋白回收率在 94.0%-103.0%， β -乳球蛋白的回收率在 95.6%-101.8% 之间；相对标准偏差均在 10% 以下，满足方法验证要求。

表 3.4-4 室内方法回收率试验（牛乳基）

样品名称	本底值 (g/100)	添加值 (g/100g)	实测值 (g/100g)	回收率(%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
------	----------------	-----------------	-----------------	--------	--------------	----------------

	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白
加标 0.5 倍	1.12	3.28	0.78	2.35	0.77	2.41	99.4	102.7	103.9	104.2	3.8	1.8
			0.75	2.28	0.81	2.41	107.6	105.9				
			0.77	2.34	0.75	2.38	97.1	102.1				
			0.75	2.28	0.80	2.40	106.4	105.3				
			0.77	2.33	0.81	2.37	105.1	101.9				
			0.72	2.18	0.77	2.30	105.9	105.4				
			0.75	2.28	0.80	2.42	105.8	106.2				
加标 1.0 倍	1.12	3.28	1.41	4.25	1.49	4.49	105.6	105.6	102.0	102.7	2.5	1.9
			1.43	4.31	1.43	4.47	100.4	103.7				
			1.42	4.29	1.43	4.44	100.5	103.5				
			1.43	4.32	1.51	4.43	105.8	102.4				
			1.43	4.31	1.45	4.44	101.5	103.0				
			1.44	4.34	1.43	4.37	100.0	100.8				
			1.45	4.37	1.45	4.36	100.3	99.8				
加标 2.0 倍	1.12	3.28	2.84	8.58	3.04	8.97	107.2	104.6	100.6	100.0	3.4	2.6
			2.79	8.42	2.76	8.53	99.1	101.2				
			2.80	8.45	2.86	8.52	102.3	100.9				
			2.85	8.61	2.89	8.59	101.3	99.8				
			2.89	8.74	2.88	8.59	99.5	98.3				
			2.93	8.85	2.85	8.60	97.4	97.2				
			2.91	8.78	2.83	8.58	97.3	97.7				

表 3.4-5 室内方法回收率试验（羊乳基）

样品名称	本底值 (g/100)		添加值 (g/100g)		实测值 (g/100g)		回收率 (%)		平均回收率 (%)		相对标准偏差 RSD%	
	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白	α-乳白蛋白	β-乳球蛋白
加标 0.5 倍	0.75	1.95	0.35	1.49	0.34	1.47	95.7	99.2	98.1	98.4	3.5	2.4
			0.35	1.49	0.35	1.45	99.5	97.8				
			0.36	1.50	0.34	1.46	94.0	97.2				

			0.35	1.49	0.34	1.43	96.6	95.6				
			0.35	1.47	0.36	1.49	102.0	101.1				
			0.35	1.49	0.34	1.43	96.0	96.3				
			0.34	1.45	0.36	1.48	103.2	101.8				
加标 1.0 倍			0.68	2.88	0.65	2.84	95.3	98.8	95.2	98.3	0.8	0.8
			0.68	2.86	0.65	2.82	95.3	98.7				
			0.69	2.90	0.65	2.84	94.8	97.9				
			0.68	2.88	0.66	2.85	96.6	99.0				
			0.69	2.92	0.66	2.83	95.6	96.8				
			0.69	2.90	0.65	2.85	94.5	98.3				
			0.69	2.89	0.65	2.85	94.4	98.8				
加 标 2.0 倍			1.50	6.32	1.53	6.31	101.9	99.9	100.6	98.9	1.8	1.7
			1.51	6.33	1.49	6.30	99.2	99.4				
			1.51	6.36	1.49	6.13	98.4	96.4				
			1.51	6.34	1.52	6.16	100.9	97.1				
			1.49	6.27	1.52	6.25	101.9	99.6				
			1.49	6.25	1.47	6.17	98.9	98.6				
			1.47	6.18	1.51	6.26	103.0	101.4				

3.4.5 稳定性

将 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品按照方法配制成浓度为 1 mg/mL 的储备溶液，转移分装至聚丙烯材质的冻存管中，于-20 °C避光保存。将此储备液保存 0 天、7 天、15 天、1 个月、2 个月、4 个月、6 个月，按方法规定的前处理条件和液相色谱-串联质谱仪器条件进行测定，记录测定结果，以此研究标准溶液的稳定性。

表 3.4-6 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准储备溶液的稳定性考察

储存时间	0 天	7 天	15 天	1 个月	2 个月	4 个月	6 个月
α -乳白蛋白	1.00	0.99	0.98	0.99	0.98	1.00	1.00
β -乳球蛋白	1.00	0.97	1.00	1.00	1.01	1.00	1.01
t-检验 (vs 0 天, P 值)	/	0.305	0.56	0.184	0.848	0.226	0.453

由表 3.4-6 可知， α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准储备溶液按方法妥当保存 6 个月后，采用 t-检验评估溶液浓度变化，统计量 P 值均大于 0.05，无统计学差异。由此可知， α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准储备溶液 6 个月保存期内稳定。

3.4.6 结果一致性比较

取同一批样品，分别用本方法及 T/CNHFA 232-2025 两种方法进行测定，每个样品平行测定 3 次，结果如表 3.4-7 所示。由结果知，对于乳清粉、乳清蛋白粉和配方粉，两种方法的测定结果具有一致性。

表 3.4-7 方法比较

序号	样品名称	α-乳白蛋白(g/100g)		β-乳球蛋白 (g/100g)	
		本方法	T/CNHFA 232-2025	本方法	T/CNHFA 232-2025
1	乳清粉 1	2.45	2.47	5.84	5.76
2	乳清粉 2	2.28	2.33	4.79	4.82
3	乳清粉 3	2.48	2.51	5.86	5.83
4	乳清蛋白粉 1	6.60	6.52	17.80	17.71
5	乳清蛋白粉 2	35.45	34.87	28.30	27.56
6	乳清蛋白粉 3	30.43	29.95	18.80	18.56
7	配方奶粉 1	1.60	1.55	2.76	2.72
8	配方奶粉 2	1.25	1.23	2.43	2.39
9	配方奶粉 3	1.63	1.61	2.78	2.81

3.4.7 实际样品测定

对不同厂商、不同规格的乳清粉、乳清蛋白粉和市售婴幼儿配方食品（包括牛乳基和羊乳基）进行检测，按方法规定的步骤进行处理后测定，样品中测得的 α-乳白蛋白和 β-乳球蛋白含量结果如表 3.4-8 所示。

表 3.4-8 实际样品测定结果

序号	样品名称	α-乳白蛋白 (g/100g)	β-乳球蛋白 (g/100g)	序号	样品名称	α-乳白蛋白 (g/100g)	β-乳球蛋白 (g/100g)
1	牛乳基婴儿配方奶粉 1	1.60	2.76	25	羊乳基婴儿配方奶粉 25	0.920	2.72
2	牛乳基婴儿配方奶粉 2	1.25	2.43	26	羊乳基婴儿配方奶粉 26	0.810	2.56
3	牛乳基婴儿配方奶粉 3	1.63	2.78	27	牛乳基脱盐乳清粉 D90-1	2.40	6.37
4	牛乳基婴儿配方奶粉 4	1.81	3.10	28	牛乳基脱盐乳清粉 D90-2	2.45	5.84
5	牛乳基婴儿配方奶粉 5	2.06	1.25	29	牛乳基脱盐乳清粉 D90-3	2.28	4.79
6	牛乳基婴儿配方奶粉 6	1.32	4.06	30	牛乳基脱盐乳清粉 D90-4	2.48	5.86
7	牛乳基婴儿配方奶粉 7	1.23	4.02	31	牛乳基脱盐乳清粉 D90-5	2.71	5.51
8	牛乳基婴儿配方奶粉 8	1.01	3.46	32	牛乳基脱盐乳清粉 D90-6	2.91	7.08
9	牛乳基婴儿配方奶粉 9	0.980	2.89	33	羊乳基脱盐乳清粉 D90-7	2.68	6.93
10	牛乳基婴儿配方奶粉 10	1.15	3.92	34	羊乳基脱盐乳清粉 D90-8	3.07	8.45

11	牛乳基婴儿配方奶粉 11	1.13	3.97	35	羊乳基脱盐乳清粉 D90-9	2.79	7.41
12	牛乳基婴儿配方奶粉 12	1.44	2.75	36	牛乳基浓缩乳清粉 WPC-1	12.9	50.1
13	牛乳基婴儿配方奶粉 13	1.41	3.13	37	牛乳基浓缩乳清粉 WPC-2	22.3	11.9
14	牛乳基婴儿配方奶粉 14	1.06	3.25	38	牛乳基浓缩乳清粉 WPC-3	22.6	11.9
15	牛乳基婴儿配方奶粉 15	0.881	3.3	39	牛乳基浓缩乳清粉 WPC-4	26.6	13.6
16	牛乳基婴儿配方奶粉 16	1.03	3.05	40	牛乳基浓缩乳清粉 WPC-5	6.60	17.8
17	牛乳基婴儿配方奶粉 17	0.920	2.89	41	牛乳基浓缩乳清粉 WPC-6	35.45	28.3
18	牛乳基婴儿配方奶粉 18	1.08	2.96	42	羊乳基浓缩乳清粉 WPC-7	30.43	18.8
19	羊乳基婴儿配方奶粉 19	1.01	2.82	43	牛乳基全脂奶粉-1	0.771	2.92
20	羊乳基婴儿配方奶粉 20	0.850	2.46	44	牛乳基全脂奶粉-2	0.774	2.98
21	羊乳基婴儿配方奶粉 21	0.86	3.27	45	牛乳基全脂奶粉-3	0.782	3.28
22	羊乳基婴儿配方奶粉 22	0.990	4.03	46	羊乳基全脂奶粉-4	0.780	2.42
23	羊乳基婴儿配方奶粉 23	0.941	3.73	47	羊乳基全脂奶粉-5	0.781	2.64
24	羊乳基婴儿配方奶粉 24	0.982	2.92				

由上述样品测定可知，所建立的方法不仅能检测婴幼儿配方食品，还可以检测奶粉、脱盐乳清粉、浓缩乳清粉。且其中部分配方奶粉在标签上标示了 α -乳白蛋白的含量（表 3.4-9），通过与标签值比较，检测结果的准确度在 98%-103%，由此说明了本方法的准确、可靠。

表 3.4-9 婴配奶粉中测定值与标示值比较

序号	样品名称	α -乳白蛋白(g/100g)	标示值(g/100g)
1	牛乳基婴儿配方奶粉 1	1.6	1.58
3	牛乳基婴儿配方奶粉 3	1.63	1.6
4	牛乳基婴儿配方奶粉 4	1.81	1.8
8	牛乳基婴儿配方奶粉 8	1.01	1.0
9	牛乳基婴儿配方奶粉 9	0.98	1.0
16	牛乳基婴儿配方奶粉 16	1.03	1.0
19	羊乳基婴儿配方奶粉 19	1.01	1.0

3.5 实验室间验证

待完成后填写



3.6 参考文献:

- [1] H. Roginiski et al., Encyclopedia of dairy sciences, 2002, P2405.
- [2] GB 10765-2021 食品安全国家标准 婴儿配方食品
- [3] GB 10766-2021 食品安全国家标准 较大婴儿配方食品
- [4] GB/T 5413.2-1997 婴幼儿配方食品和乳粉 乳清蛋白的测定
- [5] 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(4):1043-1059.
- [6] Greenberg, Rae and Harold J. Dower. Detection of added whey protein concentrate in nonfat dry milk by amino acid analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34 (1986): 30-32.
- [7] Ding X, Yang Y, Zhao S, et al. Analysis of α -lactalbumin, β -lactoglobulin A and B in whey protein powder, colostrum, raw milk, and infant formula by CE and LC[J]. *Dairy Science & Technology*, 2011, 91(2):213-225.
- [8] NY/T 4630—2025 牛乳及其制品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的测定 高效液相色谱.
- [9] Piras C, Roncada P, Rodrigues PM, Bonizzi L, Soggiu A. Proteomics in food: Quality, safety, microbes, and allergens. *Proteomics*[J]. 2016;16(5):799-815.
- [10] Agregán R, Echegaray N, López-Pedrouso M, Kharabshah R, Franco D, Lorenzo JM. Proteomic Advances in Milk and Dairy Products[J]. *Molecules*. 2021;26(13):3832.
- [11] Ahsan N, Rao RSP, Gruppiso PA, Ramratnam B, Salomon AR. Targeted proteomics: Current status and future perspectives for quantification of food allergens[J]. *J Proteomics*. 2016;143:15-23.
- [12] 杜娟, 郑云鹏, 董洪涛, 张凤霞. 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法测定乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白[M]. 中国广州分析测试中心, 2020.
- [13] Defernez M, Mandalari G, et al. Quantitative assessment of multi-laboratory reproducibility of SDS-PAGE assays: Digestion pattern of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated conditions. *Electrophoresis*, 2010, 31(16):2838.
- [14] Brownridge P, Beynon R J. The importance of the digest: Proteolysis and absolute quantification in proteomics. *Methods*, 2011, 54(4):351.
- [15] Hustoft H K, Reubsæet L, et al. *Pharm Biomed Anal*. 2011 56(5):1069.
- [16] 王继峰, 赵新元等. 酶切过程中肽段过烷基化对蛋白质定性和定量分析的影响. *色谱*, 2013. 31(10):927-933.