

《乳与乳制品中 A1 型β-酪蛋白和 A2 型β-酪蛋白的测定 液相色谱-质谱/质谱法》编制说明（征求意见稿）

一、标准起草基本情况

β-酪蛋白是牛乳中的主要蛋白质之一，约占牛乳总蛋白含量的 30%~35%。作为酪蛋白组分的重要组成部分，β-酪蛋白赋予乳及乳制品重要的营养特性、功能特性和加工特性。β-酪蛋白是一种由 209 个氨基酸残基组成的单链磷蛋白，其编码基因为牛 CSN2 基因。CSN2 基因中天然存在的遗传变异已鉴定出至少 12 种牛β-酪蛋白变体，包括 A1、A2、A3、B、C、D、E、F、G、H1、H2 和 I 型变体，见表 1.1-1。

表 1.1-1 牛属（Bos）CSN2 基因遗传变体在基因及成熟 β-酪蛋白中的位置（引自 Caroli AM 等，2009）

Gene, Protein	CSN2 variant ²											
	A ¹	A ²	A ³	B	C	D	E	F	G	H ¹	H ²	I
4647–4648	AGC					γ ³						
18	SerP					Lys						
6562	CGC									TGC		
25	Arg									Cys		
6684–6686	AGT				AGT							
35	SerP				Ser							
6687	GAG						AAG					
36	Glu						Lys					
6690	GAA				AAA							
37	Glu				Lys							
8101	CAT	CCT	CCT			CCT	CCT			?	CCT	CCT
67	His	Pro	Pro			Pro	Pro			?	Pro	Pro
8115	CAA										GAA	
72	Gln										Glu	
8163	CTT									ATT		
88	Leu									Ile		
8178	ATG										CTG	CTG
93	Met										Leu	Leu
8219	CAC		CAA									
106	His		Gln									
8267	AGC			AGG								
122	Ser ₄			Arg								
8311–8314 ⁴												
137–138 ⁴	Pro								⁴ Leu			
8356	CCT							CTT				
152	Pro							Leu				
?? ⁵	??										??	
??	Gln										Glu	

在这些变体中，A1、A2、A3、B、C 和 I 型是目前全球商业奶牛群中最常见的β-酪蛋白变体。这些变体之间的差异源于β-酪蛋白氨基酸序列中一个或多个氨基酸的替换。其中，蛋白质第 67 位氨基酸尤为重要。第 67 位氨基酸为组氨酸（Histidine）的变异体，包括 A1、B 和 C 型，归类 A1 型 β-酪蛋白；而第 67 位氨基酸为脯氨酸（Proline）的变异体，包括 A2、A3 和 I 型，则被归类为 A2 型 β-酪蛋白。这一单个氨基酸的替换会影响蛋白质的结构及其在消化过程中的行为特征，并构成将β-酪蛋白变异体划分为 A1 型和 A2 型的理论基础。这一分类原则与 AOAC SMPR 2022. 005 保持一致。已有研究进一步表明，I 型变异体由于第 67 位氨基酸及相关序列结构与 A2 型β-酪蛋白一致，在消化过程中表现出与 A2 型β-酪蛋白相似的行为特征，为其归属于 A2 型β-酪蛋白提供了进一步的科学依据。

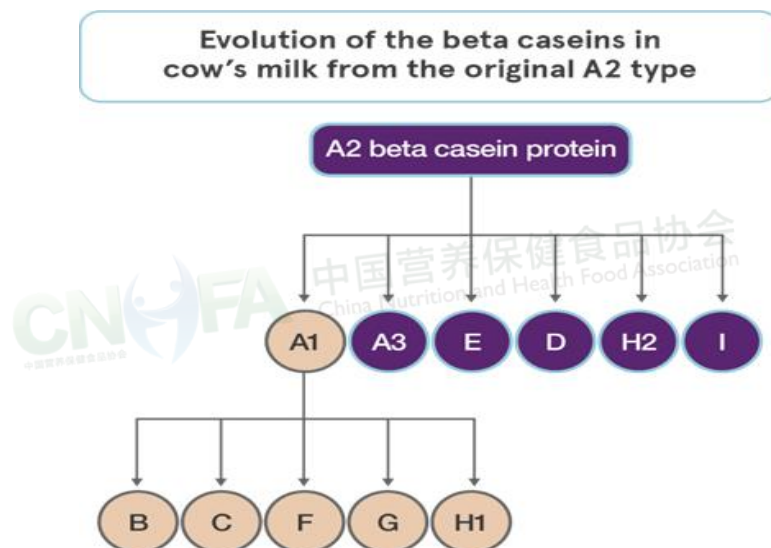


图 1.1-1 β -酪蛋白变体由原始 A2 型变体演化而来的示意图
(改编自 P. Formaggioni 等, 1999, 《Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria》, Università degli Studi di Parma)

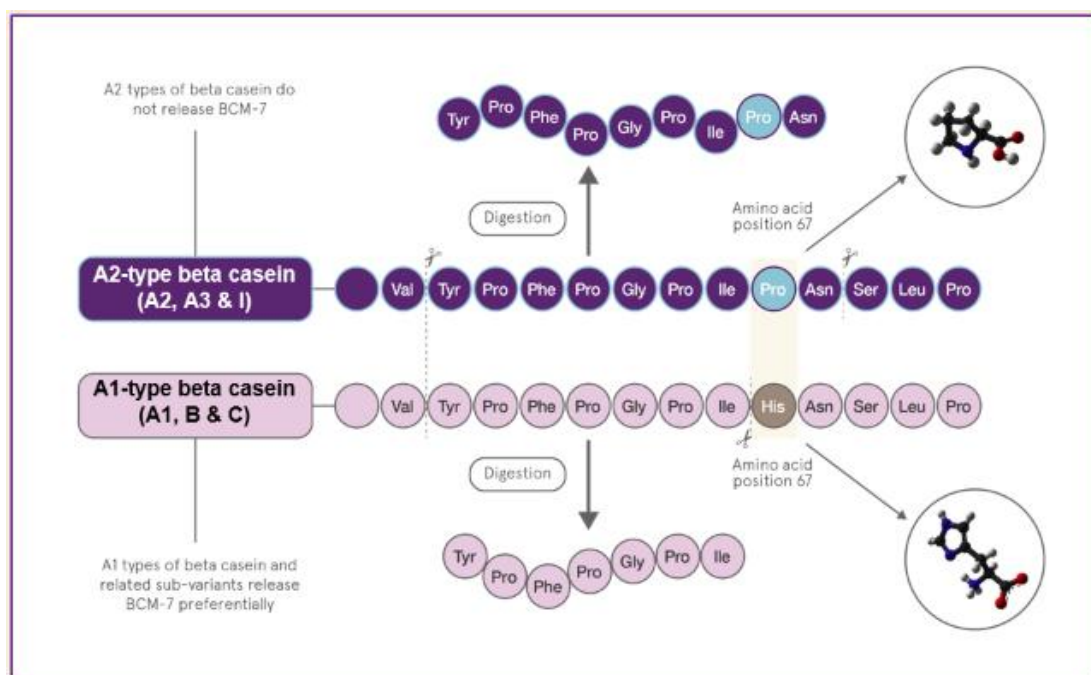


图 1.1-2 A1 型与 A2 型 β -酪蛋白在消化过程中差异性降解的示意图

仅含 A2 型 β -酪蛋白的乳及乳制品已成为全球增长最快的乳品细分品类之一。此类产品的生产依赖于选择性育种计划，通过基于 DNA 的基因分型检测技术筛选符合要求的奶牛个体。该类遗传检测主要针对 CSN2 基因中的单核苷酸变异位点，该位点决定 β -酪蛋白第 67 位氨基酸的编码类型。因此，基于 DNA 的筛选并非仅识别经典 A2 型变体，而是筛选所有第 67 位氨基酸为脯氨酸（Proline）的 β -酪蛋白变异体，包括 A2、A3 和 I 型变体。同样，第 67 位氨基酸为组氨酸（Histidine）的变体，包括 A1、B 和 C 型变异体，则被排除在 A2 型奶牛育种计划之外。因此，准确测定乳及乳制品中的 A1 型和 A2 型 β -酪蛋白，需要采

用能够检测和定量所有相关 β -酪蛋白变异体，并依据第 67 位氨基酸类型进行分类的分析方法。然而，现有分析方法并不总是与奶牛遗传选育的生物学基础保持一致。虽然 DNA 检测能够识别所有 A2 型变体，但目前部分基于蛋白质检测的分析方法仅能检测部分 β -酪蛋白变体。因此，这些方法可能因无法检测和定量 I 型等变异体，而低估样品中 A2 型 β -酪蛋白的真实含量；尽管这些变异体同样属于建立 A2 型奶牛群所采用遗传筛选体系的目标变体。

历史上， β -酪蛋白变异体主要通过蛋白质电泳、等电聚焦以及 DNA 基因分型等技术进行鉴定。近年来，液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）凭借其较高的特异性以及通过特征肽段直接鉴别蛋白质变体的能力，已成为 β -酪蛋白分析的优选技术路线。目前行业标准及团体标准中的 β -酪蛋白检测方法大多采用 LC-MS/MS 技术，例如 T/CITS 0012—2023 和 QB/T 8203—2026。然而，上述方法尚未实现对所有 A2 型 β -酪蛋白变异体的全面检测，因此可能低估乳及乳制品中 A2 型 β -酪蛋白的总含量。

为解决上述问题，本方法建立了适用于生乳、巴氏杀菌乳、超高温灭菌乳（UHT）、乳粉、配方乳粉及婴幼儿配方食品中 A1 型和 A2 型 β -酪蛋白准确测定的方法。该方法采液相色谱-串联质谱技术（LC-MS/MS），对所有相关 β -酪蛋白变异体进行检测和定量，并依据其第 67 位氨基酸类型进行分类，使蛋白质检测结果与奶牛遗传选育所依据的生物学基础保持一致。本方法能够科学、准确地测定样品中 A1 型和 A2 型 β -酪蛋白总含量，为产品真实性验证、质量控制、法规符合性评价以及乳品行业标准化提供技术支撑。

二、 标准的主要技术内容

本标准适用于生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、乳粉和调制乳粉及婴幼儿配方食品中 A1 型 β -酪蛋白和 A2 型 β -酪蛋白的测定，包括荷斯坦牛和娟姗牛。

本标准的原理是试样中的蛋白经缓冲溶液溶解、碱性胰蛋白酶酶解。与此同时将蛋白系列标准溶液与试样溶液同步酶解处理。在试样和标准液酶解液中加入同位素标记的特征肽段，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，使用蛋白系列标准溶液曲线计算结果，内标法定量。

本标准对于称样量为 2.0 g 时，A1 β -酪蛋白检出限为 2.5 mg/100 g，定量限为 8.0 mg/100 g；A2 β -酪蛋白检出限为 12.5 mg/100 g，定量限为 40 mg/100 g；I β -酪蛋白检出限为 2.5 mg/100 g，定量限为 8.0 mg/100 g。A1 β -酪蛋白在 0.01~0.4 mg/mL 浓度范围内，线性良好；A2 β -酪蛋白在 0.05~2.0 mg/mL 浓度范围内时，线性良好；I β -酪蛋白在 0.01~0.4 mg/mL 浓度范围内，线性良好。方法平均加标回收率在 86.2%~114.6%，相对标准偏差为 2.1%~4.9%。

三、国内国际相关标准情况

目前，国内 A1 型和 A2 型 β -酪蛋白测定相关的标准主要包括 DB12/T 1190-2023、T/CITS 0012-2023 和

QB/T 8203-2026。DB12/T 1190-2023《A2 型 β-酪蛋白牛乳识别技术规范》于 2023 年作为天津市地方标准发布。该标准适用于牛乳及乳粉，并依据β-酪蛋白序列第 67 位氨基酸为脯氨酸的特征对 A2 型β-酪蛋白进行定义。该方法基于第 67 位氨基酸特征性替换的识别，主要用于仅含 A2 型β-酪蛋白乳制品的真实性鉴别。虽然该标准为 A2 型β-酪蛋白产品的验证提供了技术依据，但其目的并非对乳及乳制品中所有β-酪蛋白变异体进行全面定量测定；T/CITS 0012-2023《牛乳和婴幼儿配方食品中 A1 和 A2 β-酪蛋白的测定 液相色谱-串联质谱法》于 2023 年发布，采用液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）测定牛乳及牛乳基婴幼儿配方食品中的 A1 和 A2 β-酪蛋白。该方法是我国较早将靶向蛋白质组学技术标准化应用于 A1 和 A2 β-酪蛋白检测的方法之一。然而，该方法主要关注经典的 A1 和 A2 变异体，未能依据第 67 位氨基酸类型对所有可归属于 A1 型或 A2 型的β-酪蛋白变异体进行全面测定；QB/T 8203-2026《牛乳及乳制品中β-酪蛋白的测定》是目前国内关于β-酪蛋白分析最全面的标准。该标准包含三种分析方法：液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）、毛细管电泳法和高效液相色谱法。其中，LC-MS/MS 法被指定为仲裁方法，适用于生乳、巴氏杀菌乳、灭菌乳、乳粉、配方乳粉及婴幼儿配方乳粉。该方法采用胰蛋白酶酶解、稳定同位素标记内标、反相液相色谱分离以及多反应监测（MRM）质谱检测技术，对 β-酪蛋白、A1 β-酪蛋白和 A2 β-酪蛋白进行定量分析。与电泳法和色谱法相比，LC-MS/MS 具有更高的选择性和灵敏度。然而，该方法仍主要针对经典 A1 和 A2 变异体，未能充分考虑依据第 67 位氨基酸残基类型对β-酪蛋白变异体进行 A1 型和 A2 型分类的需求。

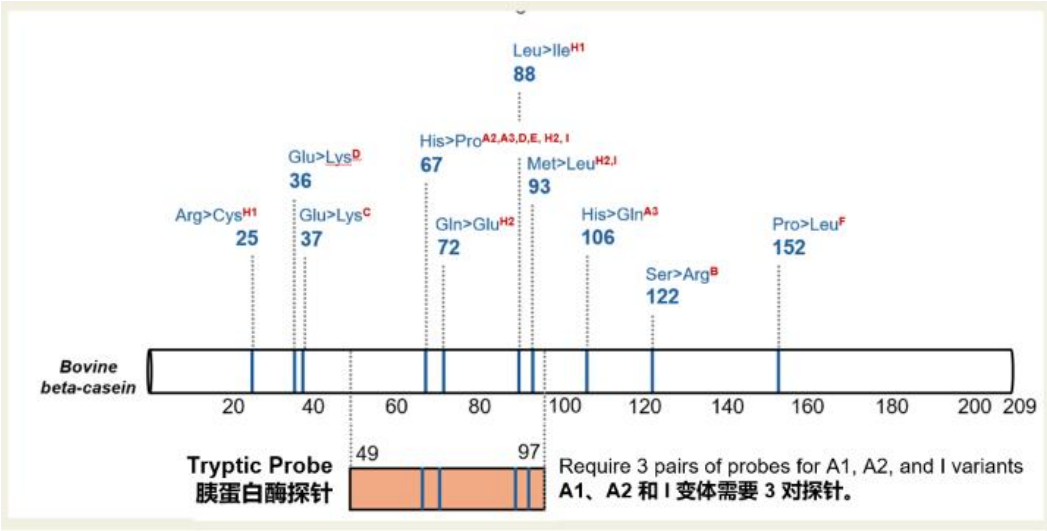


图 2-1 牛 β-酪蛋白结构及其变体氨基酸替换位点示意图，并显示用于 LC-MS/MS 测定 A1 型和 A2 型 β-酪蛋白的胰蛋白酶酶解特征肽段位置

国际上，目前美国分析化学家协会（AOAC INTERNATIONAL）和国际标准化组织（ISO）均尚未发布 A1 型和 A2 型β-酪蛋白测定的正式标准方法。然而，AOAC INTERNATIONAL 已发布《SMPR 2022.005

婴幼儿配方食品及成人营养制品中 A1 型和 A2 型 β -酪蛋白标准方法性能要求》（Standard Method Performance Requirements for A1- and A2-Type β -Casein in Infant Formulas and Adult Nutritionals），为未来相关方法的开发和验证提供了国际认可的技术框架。值得注意的是，该 SMPR 将所有第 67 位氨基酸为组氨酸（Histidine）的全长 β -酪蛋白变体定义为 A1 型 β -酪蛋白，将所有第 67 位氨基酸为脯氨酸（Proline）的全长 β -酪蛋白变体定义为 A2 β -酪蛋白。该定义突破了传统仅关注 A1 和 A2 变异体的范围，明确了多个 β -酪蛋白遗传变体均可归属于相应类别。此外，该文件还规定了适用于婴幼儿、儿童及成人营养产品的分析性能要求，包括定量限、回收率、重复性、再现性以及分析范围等指标。

文献报道的 β -酪蛋白变体检测方法在过去六十余年间经历了显著发展。早期研究主要依赖电泳技术对 β -酪蛋白多态性进行鉴定。Peterson 和 Kopfler 建立了酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳方法，可分离此前碱性电泳体系无法区分的 A、B、C 和 D 型 β -酪蛋白表型。该研究首次证实了额外 β -酪蛋白多态性的存在，并奠定了电泳技术作为 β -酪蛋白表型分析主要技术手段的基础。随后，淀粉凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳以及等电聚焦技术不断发展，提高了分离分辨率，并广泛应用于乳蛋白多态性研究、品种鉴定及遗传选育等领域。尽管电泳技术在蛋白质表型分析方面仍具有一定应用价值，但其本质上属于基于电泳迁移率差异的间接检测方法。对于结构相近的 β -酪蛋白变体，往往难以实现完全分离，其定量能力有限，并易受到加工过程中蛋白质修饰、蛋白水解以及复杂基质效应的影响。因此，此类方法通常不适用于加工乳制品及营养配方产品中 β -酪蛋白变体的准确定量测定。

20 世纪 90 年代，基于 DNA 的基因分型技术的发展为识别携带特定 β -酪蛋白等位基因的奶牛提供了新的技术途径。现代 CSN2 基因分型方法通常针对决定 β -酪蛋白第 67 位氨基酸编码为组氨酸（Histidine）或脯氨酸（Proline）的核苷酸变异位点进行检测。该类方法已广泛应用于仅生产 A2 型 β -酪蛋白乳品的奶牛育种计划。然而，DNA 检测方法反映的是动物的基因型，而非乳及乳制品中的蛋白质组成。此类方法无法对最终产品中的 β -酪蛋白进行定量分析，也无法检测生产过程中的污染情况或验证混合乳原料的组成。随后，为进一步提升分析性能，研究人员开发了毛细管电泳法和色谱分析法。这些方法能够实现完整 β -酪蛋白变体的分离，并较传统凝胶电泳技术具有更好的重复性。然而，其鉴别通常依赖于迁移时间或色谱保留行为，而非对蛋白质结构的直接确认。因此，共洗脱现象、基质干扰、翻译后修饰以及结构相近变体的存在均可能限制其分析特异性。

质谱技术的引入推动了 β -酪蛋白变体分析的发展。2003 年，Miralles 等研究人员首次采用胰蛋白酶酶解、反相高效液相色谱和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）相结合的方法，对仅存在单个氨基酸差异的牛 β -酪蛋白遗传变体进行了鉴定。研究表明，通过检测变异体特异性胰蛋白酶酶解肽段形成的肽质量指纹图谱（Peptide Mass Fingerprinting），能够有效区分不同 β -酪蛋白变体，并首次证实了基于肽质量图谱的分析策略可用于乳蛋白多态性的表征。2006 年，Huynh、Walsh 和 Clarke 报道了一

种利用 MALDI-TOF 质谱测定乳中不同 β -酪蛋白变体相对比例的方法。该方法采用胰蛋白酶酶解产生覆盖 β -酪蛋白第 49 至 97 位氨基酸区域的特征肽段，该肽段包含第 67 位多态性氨基酸位点。根据第 67 位氨基酸为组氨酸或脯氨酸的不同，所形成肽段之间约存在 40 Da 的质量差异。研究表明，该方法能够检测以 A2 型 β -酪蛋白为主的乳样中低水平存在 A1 β -酪蛋白，其灵敏度和重复性均显著优于毛细管电泳法。该研究是利用靶向质谱技术测定 β -酪蛋白变体的早期代表性工作之一。随后十年间，高分辨率质谱技术的发展推动了 β -酪蛋白变体的完整蛋白分析（intact protein analysis）。Jensen 等研究人员利用液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）对牛乳蛋白遗传变异体及其翻译后修饰进行了表征。这类方法能够提供有关蛋白质异质性及不同蛋白形式（proteoforms）的重要信息，但通常需要高端仪器设备，并且对蛋白质磷酸化、糖基化等翻译后修饰模式的解析较为复杂。近年来，研究重点逐渐转向基于自下而上蛋白质组学（bottom-up proteomics）的 LC-MS/MS 分析策略。De Poi 等建立了用于鉴定牛乳中 β -酪蛋白遗传变异体的 LC-MS 方法；Fuerer 等利用高分辨率质谱技术测定商业乳样中的 β -酪蛋白变异体组成；Nguyen 等报道了在线胰蛋白酶酶解结合 LC-MS/MS 的快速检测方法，用于测定乳中的 A1 和 A2 β -酪蛋白；Ehling 等则开发了基于稳定同位素稀释技术的 LC-MS 方法，用于测定乳源配料中的总 β -酪蛋白及 A1 型 β -酪蛋白含量。随后，Chen、Ghafoori、Guo、Liu、Wang 等研究人员相继报道了多种靶向 LC-MS/MS 方法，利用胰蛋白酶（Trypsin）、嗜热菌蛋白酶（Thermolysin）及其他蛋白酶产生的特征肽段，实现 β -酪蛋白变体的鉴别与定量分析。

上述研究表明，LC-MS/MS 目前是 β -酪蛋白变异体分析中选择性最高、分析性能最稳健的技术手段。然而，现有大多数方法主要用于区分经典的 A1 和 A2 变体、检测仅含 A2 β -酪蛋白乳品中的 A1 β -酪蛋白掺入情况，或验证标称仅含 A2 β -酪蛋白产品的真实性。针对 AOAC 所认可的更广义分类体系——即依据 β -酪蛋白第 67 位氨基酸类型将所有 β -酪蛋白变异体归类为 A1 型或 A2 型——而设计的方法仍较为有限。这一差异具有重要意义，因为现代 CSN2 基因分型育种计划的筛选依据是第 67 位氨基酸残基类型，而非传统的 A1 或 A2 变异体命名体系。因此，经遗传筛选获得的仅产生 A2 β -酪蛋白乳品的奶牛，实际上可能同时产生多个 A2 型 β -酪蛋白变异体，包括 A2、A3 和 I 变异体。仅定量经典 A2 变异体的蛋白质检测方法，难以完全反映遗传选育的生物学基础，从而可能低估样品中 A2 型 β -酪蛋白的实际总含量。

综上所述，现有国内标准、国际标准方法性能要求以及公开发表的分析方法为 β -酪蛋白检测提供了重要技术基础。然而，目前国内外尚无标准方法能够依据第 67 位氨基酸类型，对所有归属于 A1 型和 A2 型的 β -酪蛋白变异体进行全面、准确的定量测定。因此，开发一种能够检测所有相关 β -酪蛋白变体并将其归类为 A1 型和 A2 型的靶向 LC-MS/MS 方法，对于产品真实性验证、质量保证、法规符合性评价以及国际标准协调统一具有重要意义。

四、其他需要说明的事项

无