

毛细管区带电泳进行乳品中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的含量测定

The Determination of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in Dairy by Capillary Zone Electrophoresis

高铁¹, 陈泓序¹, 杨爱君², 何瑛², 纪坤发²

Gao Tie¹, Chen Hongxu¹, Yang Aijun², He Ying², Ji Kunfa²

¹ SCIEX, 中国; ² 燕塘乳业

¹ SCIEX, China; ² Yantang Milk

Keywords: α -lactalbumin; β -lactoglobulin; P/ACE™ MDQ Plus Capillary Electrophoresis System; Capillary Zone Electrophoresis; Milk

1. 前言

α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白是乳清蛋白的主要成分, 其中 β -乳球蛋白含有 A 和 B 两种变异体; 在生乳及其乳制品中, 两个蛋白的含量可反应产品的质量。在现行的标准中, β -乳球蛋白有相应的检测方法 (T/TDSTIA 007-2019), 而 α -乳白蛋白并没有相应的检测方法。

本文利用毛细管区带电泳分离了乳品中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白 A 和 β -乳球蛋白 B, 并制作外标曲线进行 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量测定; 该方法可在同一次运行中同时检测到 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白, 并且适用于液态奶、奶粉和配方奶粉等多种类型的乳品。

2. 试剂和方法

2.1. 试剂和样品

CEofix™ NTMP 试剂盒 (Analis, PN 10004780/A71142) 包含 pH 7.0 缓冲液、pH 4.2 缓冲液、启动冲洗液和样品稀释液; α -乳白蛋白标准品 (Sigma-Aldrich, PN L5385); β -乳球蛋白标准品 (Sigma-Aldrich, PN L3908); 醋酸 (Sigma-Aldrich, PN 695092); 氢氧化钠 (Sigma-Aldrich, PN S5881); 二次去离子水 (Millipore); 巴氏杀菌奶由燕塘乳业提供。



图1. P/ACE™ MDQ Plus毛细管电泳系统

2.2. 标准品前处理

分别精确称取 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品 2 mg, 添加 4 mL 二次去离子水, 分别配置成 500 μ g/mL 标准品溶液; 逐级稀释至如表 1 浓度。

表 1. α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品逐级稀释后的浓度

稀释倍数	0	2	4	8	16	32
α -乳白蛋白浓度 (μ g/mL)	500	250	125	62	31	16
β -乳球蛋白浓度 (μ g/mL)	500	250	125	62	31	16

2.3. 样品前处理方法

巴氏杀菌奶样品精确移取 20 mL, 添加醋酸调节 pH 至 4.5 (± 0.1), 10000 rpm 离心 15 min, 用移液枪穿过表面的脂质层吸

取中间的清液（避免触碰底部沉淀）；取 20 μ L 清液，添加 NTMP 试剂盒中的样品稀释液 180 μ L，为最终进样样品。

2.4. 仪器及方法

P/ACE™ MDQ Plus 毛细管电泳系统，匹配紫外检测器（UV）。熔融石英毛细管：

50/60.2 cm（有效/总长度），50 μ m 内径；分离条件：15 kV, 30 min；进样条件：0.5 psi, 12 s；毛细管温度：25 $^{\circ}$ C；样品室温度：15 $^{\circ}$ C；UV 检测器波长：200 nm；分离缓冲液选择 pH 7.0 缓冲液（NTMP 试剂盒）。图 2 为毛细管活化和分离的初始条件，图 3 为毛细管活化和分离的检测器条件。

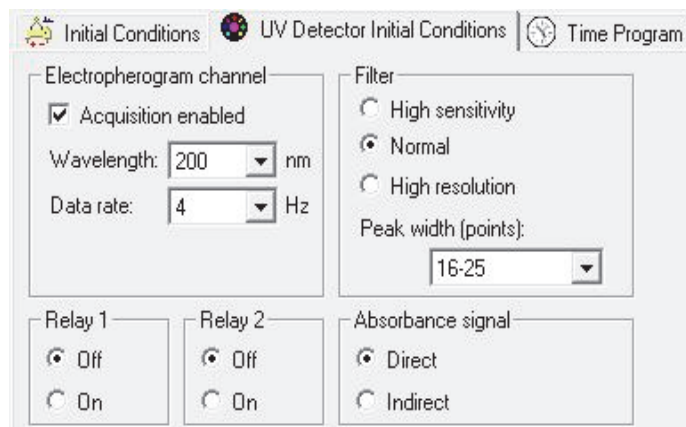


图 3. 检测器条件

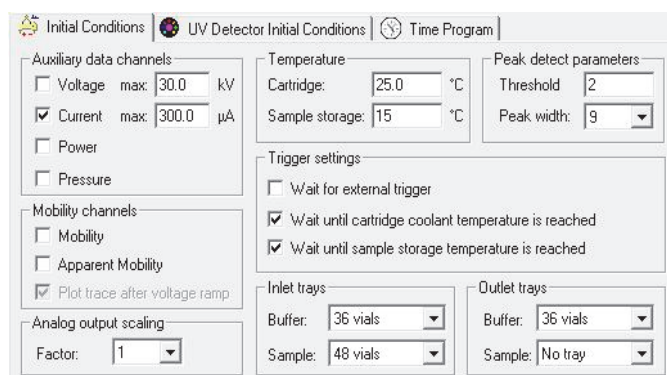


图 2. 初始条件

新毛细管活化：分别使用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液、启动冲洗液和 pH 7.0 缓冲液进行毛细管的冲洗活化。图 4 为毛细管活化的时间程序。

每针运行间毛细管的冲洗：启动冲洗液 50 psi 压力下冲洗 0.5 min，pH 7.0 缓冲液 50 psi 压力下冲洗 1 min。图 5 为毛细管电泳分离的时间程序。

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	0.00	Separate - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	NaOH Rinse
2	5.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
3	10.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
4	20.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
5	20.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
6	25.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
7	35.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
8	35.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	5.00 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
9	40.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	10.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
10	50.00	Wait		0.00 min	BI:F1	BO:A1		Water Dip
11	50.00	Stop data						
12	50.00	End						

图 4. 毛细管活化的时间程序

Initial Conditions		UV Detector Initial Conditions		Time Program				
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	50.0 psi	0.50 min	BI:B1	BO:A1	forward	Initiator Rinse
2		Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:C1	BO:A1	forward	pH 7.0 buffer Rinse
3		Inject - Pressure	0.5 psi	12.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, forward	Sample Inject
4		Inject - Pressure	0.5 psi	8.0 sec	BI:D1	BO:B1	No override, forward	Sample buffer Inject
5	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	40.00 min	BI:E1	BO:B1	1.00 Min ramp, normal polarity	Separation
6	2.00	Autozero						
7	40.00	Stop data						
8	40.00	Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:A1	BO:A1	forward	NaOH Rinse
9	41.00	End						

图 5. 毛细管电泳分离的时间程序

3. 结果

3.1. 外标曲线的制作

利用毛细管电泳分别检测不同级别浓度的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白，以浓度为横坐标，以校正峰面积为纵坐标进行外标曲线的制作。其中 β -乳球蛋白由于含有 A 和 B 两种变体，以 A 和 B 总校正峰面积之和作为相应浓度对应的校正峰面积。图 6 为 α -乳白蛋白不同浓度下的电泳图谱，线性方程为 $y=1.53 \times 10^3x+7.25$ ，线性相关性 $r^2=0.999$ ；图 7 为 β -乳球蛋白不同浓度下的电泳图谱，线性方程为 $y=1.46 \times 10^3x+6.51$ ，线性相关性 $r^2=0.998$ 。 β -乳球蛋白含有 A 和 B 变体，毛细管区带电泳的分离原理是根据待测物质的荷质比差异，根据文献报道^[1]可判断 β 乳球蛋白 B 的迁移时间小于 β -乳球蛋白 A 的迁移时间。

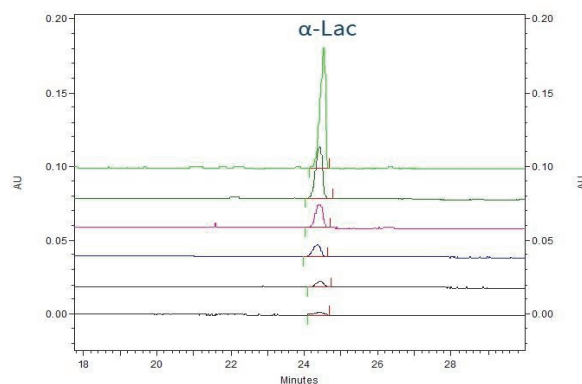


图 6. 不同浓度的 α -乳白蛋白标准品 (16-500 $\mu\text{g/mL}$) 的电泳图谱

3.2. 乳品中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量测定

巴氏杀菌奶经过酸沉淀后，吸取 20 μL 清液，添加 180 μL 样品稀释液充分混合后利用毛细管电泳进行检测，在同一针运行中可同时检测到 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白，如图 8。分别利用外标曲线方程测定 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量，测定结果乘以 10 (稀释倍数) 为巴氏杀菌乳中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的实际浓度，巴氏杀菌奶中的实际浓度分别为 1.33 mg/mL (α -乳白蛋白) 和 2.69 mg/mL (β -乳球蛋白)。

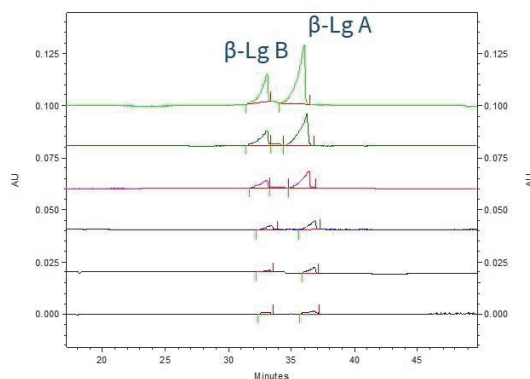


图 7. 不同浓度的 β -乳球蛋白标准品 (16-500 $\mu\text{g/mL}$) 的电泳图谱

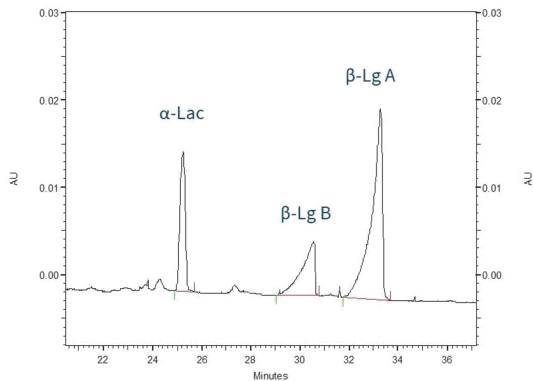


图 8. 巴氏杀菌奶中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的电泳图

4. 结论

毛细管电泳可成功分离巴氏杀菌奶中的 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白 B 和 β -乳球蛋白 A；并利用 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白标准品制作的外标曲线，可准确测定巴氏杀菌奶中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的含量，本文测定的巴氏杀菌奶中 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白的实际含量分别为 1.33 mg/mL 和 2.69 mg/mL。

毛细管电泳在一次运行中即可同时检测到 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白，并可进行含量测定。该方法不仅适用于巴氏杀菌奶，也适用于生乳、超高温灭菌奶、奶粉或配方奶粉等乳制品。

5. 参考文献

1. Irene Maierb, Vadim M. Okuna, Fritz Pittnerb, Wolfgang Lindner
Changes in peptic digestibility of bovine-lactoglobulin as a result of food processing studied by capillary electrophoresis and immunochemical methods. *Journal of Chromatography B*, 2006, 841: 160–167.

SCIEX 临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅 <https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于 AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-12296-ZH-A



SCIEX 中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)