

CE-SDS方法对婴儿配方奶粉中乳清蛋白的定量分析

Quantification of Whey Protein Content in Infant Formula by CE-SDS

高铁¹, 陈泓序¹, 吴建华¹, 冯铿²

Gao Tie¹, Chen Hongxu¹, Wu Joshua¹, Feng Ping²

¹ SCIEX, 中国; ² 惠氏营养, 中国

¹ SCIEX, China; ² Wyeth, China

Key words: capillary electrophoresis, infant formula, content of whey protein, SDS

1. 前言

乳清蛋白作为一组从乳清中分离出来的球状结构的蛋白，是人体生长、发育、增强机体抵抗力首选的蛋白来源，也是婴儿配方奶粉中重要配方成份。

本技术说明采用CE-SDS的方法定量分析乳清蛋白在婴儿配方奶粉的蛋白中百分含量。通过在配方奶粉样品中加入阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS）和β-巯基乙醇，在加热的条件下，蛋白质间的分子间力和二硫键断开，SDS结合到蛋白质分子上，形成带负电的蛋白质与SDS的复合物。该复合物进入填充了分离凝胶的电场后，在电压的驱动下迁移至检测窗口而被检测。奶粉中的乳清蛋白和乳酪蛋白被分离成两组不互相干扰的蛋白质峰组，根据这两组蛋白质组的峰面积，以及乳清蛋白对乳酪蛋白的质量对面积校正系数1.4，利用峰面积归一化法，计算出乳清蛋白在奶粉总蛋白质中的百分含量。

2. 材料和方法

2.1 试剂

SDS-MW分子量分析试剂盒（SCIEX, PN 390953），所含试剂见表1；β-巯基乙醇（Sigma, PN M7154或M6250）；乳品蛋白标准品（Sigma：α-乳白蛋白，L6010；β-乳球蛋白，L3908；免疫球蛋白，I5506；牛血清白蛋白，A1933；β-酪蛋白，C6905；α-S-酪蛋白，C6780；κ-酪蛋白，C0406；ALAR Ingredient：酪蛋白糖巨肽）和婴儿配方奶粉由国内某厂家提供；去离子水（Millipore）。

2.2 样品前处理

乳品蛋白标准品混合物

根据配方奶粉中的含量比例，取相应质量的蛋白标准品，溶于水中，配置成乳品蛋白标准品混合物。

表1. SDS-MW分子量分析试剂盒。

货号	项目
338451	50 μm 内径毛细管
A30341	SDS凝胶缓冲液
A26487	10 kDa 标准品
A22196	不同分子量标准品
	SDS样品缓冲液
	0.1N 碱洗液
	0.1N 酸洗液

婴儿配方奶粉

称取100 ± 4 mg婴儿配方奶粉，置于1.5 mL离心管中，加入水到1 mL刻度，涡旋振荡，至充分溶解并混合均匀。

变性过程

以SDS样品缓冲液与10 kDa Marker为84:1 μL体积比例配置分析预备液，用移液器将10 μL的婴儿配方奶粉和蛋白标准品混合溶液，分别移入至1.5 mL离心管中，然后相继加入85 μL分析预备液、5 μL β-巯基乙醇，混合并涡旋振荡，盖紧瓶盖。在水浴或金属浴中加热样品100 ± 5 °C 10 min，冷却样品至室温，列入样品盘。

Initial Conditions		PDA Detector Initial Conditions		Time Program				
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments	
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	10.00 min	BI:D1	BO:D1	forward	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface	
2	Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:E1	BO:E1	forward	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group	
3	Rinse - Pressure	20.0 psi	2.00 min	BI:F1	BO:F1	forward	ddH2O rinse to remove the acid residue	
4	Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward	SDS Gel rise to fill the capillary	
5	Separate - Voltage	15.0 KV	10.00 min	BI:C1	BO:C1	5.00 Min ramp, reverse polarity, both	SDS Gel for voltage equilibration	
6								

图1. 毛细管预平衡程序。

Initial Conditions		PDA Detector Initial Conditions		Time Program				
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments	
1	Rinse - Pressure	70.0 psi	3.00 min	BI:D1	BO:D1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface - Automatic increment every 8 runs	
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	1.00 min	BI:E1	BO:E1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N HCl rinse to neutralize capillary surface silanol group - Automatic increment every 8 runs	
3	Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:F1	BO:F1	forward, In / Out vial inc 8	Water rinse to remove the acid residue - Automatic increment every 8 runs	
4	Rinse - Pressure	70.0 psi	10.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 8	SDS Gel rise to fill the capillary with SDS gel - Automatic increment every 8 runs	
5	Wait	0.00 min		BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic increment every 8 runs	
6	Wait	0.00 min		BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip - Automatic increment every 8 runs	
7	Inject - Voltage	5.0 KV	20.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, reverse polarity	Sample injection	
8	Wait	0.00 min		BI:B4	BO:B4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to avoid sample carry over - Automatic increment every 8 runs	
9	Separate - Voltage	15.0 KV	30.00 min	BI:C1	BO:C1	1.00 Min ramp, reverse polarity, both, In / Out vial inc 8	SDS Gel for separation - Automatic increment every 8 runs	
10	5.00	Autozero						
11								

图 2. 分离程序。

2.3 运行条件及方法

SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统；检测器：PDA, 220 nm, 采集频率：2 Hz；样品室温度：25 °C；毛细管温度：25 °C；窗口狭缝：2号（100 × 200 μm）；毛细管：熔融石英毛细管，50 μm内径，20/30 cm有效/总长。毛细管预平衡和分离时间程序如图1和图2。

3. 数据处理

3.1 积分方法

完成采集后，需要使用32 Karat™软件进行积分处理。首先要进行凯撒积分的关闭，从32 Karat™软件工具栏中以仪器管理员身份登录，然后选择使用的仪器模块，在仪器配置中关闭凯撒积分。

积分乳品蛋白混合物标准品电泳图：对照试剂空白，确定乳清蛋白和乳酪蛋白标准品的位置，进行数据的积分处理。

积分婴儿配方奶粉电泳图：对奶蛋白的第一个乳清蛋白峰组和乳酪蛋白峰组进行自动积分，积分起始时间是10 kDa内标前小峰开始（大约内标前0.4 min），结束时间是酪蛋白结束的位置；根据乳品蛋白混合物标准品所得的酪蛋白组起始和终止的出峰迁移时间，确定酪蛋白峰组。用手动积分从酪蛋白后到第二个乳清蛋白峰组后的基线，得到乳酪蛋白后的相对分子质量高的乳清蛋白。

3.2 含量测定

按照公式（1）和（2）计算乳清蛋白在婴幼儿配方奶粉中的含量：

$$Aw.c. = 1.4 \times Aw \quad (1)$$

式中：Aw.c. – 乳清蛋白校正峰面积；

Aw – 总乳清蛋白实测峰面积；

1.4 – 校正因子

$$\text{乳清蛋白含量}(\%) = Aw.c. / (Aw.c. + Acn) \times 100 \quad (2)$$

式中：Acn – 总乳酪蛋白实测峰面积

4. 结果分析

乳品蛋白标准品混合物

乳清蛋白（α-乳白蛋白、β-乳球蛋白、酪蛋白糖巨肽、免疫球蛋白和血清白蛋白）和乳酪蛋白（β-酪蛋白，αS-酪蛋白，κ-酪蛋白）标准品的CE-SDS分离结果如图3所示。乳酪蛋白刚好移动到免疫球蛋白的轻链和重链之间，而没有主要乳清蛋白在此间出峰，乳清蛋白组和乳酪蛋白组完全分离，互不干扰。

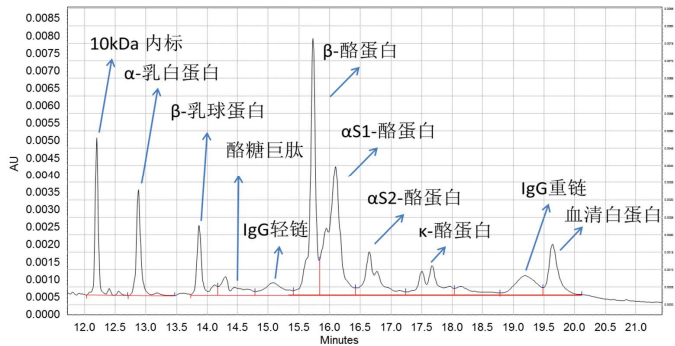


图3. 乳品蛋白标准品混合物CE-SDS分离的电泳图。

婴儿配方奶粉

按照中国国标GB 10765 的定义：婴儿奶粉是“指以乳类及乳蛋白制品为主要原料，加入适量的维生素、矿物质和/或其他成分，仅用物理方法生产加工制成的液态或粉状产品。”婴儿配方奶粉中蛋白的CE-SDS分析电泳图见图4。经计算，此婴儿配方奶粉中乳清蛋白含量为61.97%。

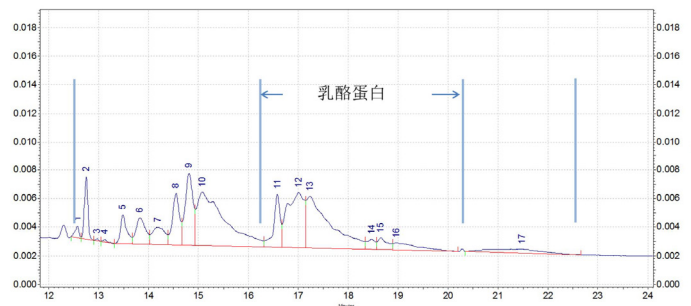


图4. 婴儿配方奶CE-SDS分离的电泳图（图中2号峰为10 kDa内标）。

5. 结论

利用毛细管凝胶电泳（CGE）对乳清蛋白在婴儿配方奶粉的总蛋白中含量的测定，可将乳清蛋白和乳酪蛋白按照峰组进行区分，达到定量乳清蛋白的测定。经过多方验证，方法稳定重现。通过每个厂家的样品测定，结果反馈符合厂家预期，方法可提供准确的婴儿配方奶粉的总蛋白中乳清蛋白含量信息¹。

参考文献

1. Ping.Feng, Christophe Fuerer, Adrienne McMahon. Quantification of Whey Protein Content in Infant Formulas by Sodium Dodecyl Sulfate-Capillary Gel Electrophoresis (SDS-CGE): Single-Laboratory Validation, First Action 2016.15; Journal of AOAC International Vol. 100, No.2, 2017.

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。AB SCIEX™ 商标经许可使用。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-7649-ZH-B



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