

# LC-MS/MS检测乳糖中的乳清蛋白痕量残留

## Determination Trace Residues of Whey Protein in Lactose by LC-MS/MS

张拓<sup>1</sup>; 朱怀恩<sup>1</sup>  
Zhang Tuo<sup>1</sup>; Nick Zhu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX, China

**Key Words:** Whey protein, Lactose, Alpha-Lactoglobulin, Beta-Lactalbumin, LC-MS/MS

### 摘要

乳糖水合物在药品生产中被广泛使用，然而其中残留的痕量乳清蛋白有可能引起过敏反应。因此，检测乳糖中的乳清蛋白残留，是乳糖辅料质量控制的重要指标之一。本文研究建立了一种检测乳糖中乳清蛋白的方法，可以检测乳糖辅料中低至1 µg/kg含量的β-乳球蛋白和α-乳白蛋白残留。为乳糖中检测痕量乳清蛋白残留提供了一种可供参考的定量方法。

### 研究背景

乳糖水合物在药品生产中被广泛使用，在固体制剂中被作为填充剂、助流剂、崩解剂、润滑剂和黏合剂，在冻干制剂中被作为赋形剂。多国药典均有收载乳糖。药用乳糖一般是从牛奶的乳清中经浓缩、结晶、精制、重结晶、干燥后提取得到的。然而，在乳糖的纯化过程中，有可能会残留微量的乳清蛋白。而部分乳球蛋白可能引起人的过敏反应，这将严重影响乳糖辅料的使用安全。如何检测乳糖中残留的乳清蛋白含量，是乳糖辅料质控中的重要环节。

乳清蛋白在乳糖中的残留有很多种，能够引起过敏反应的主要是β-乳球蛋白(β-lactoglobulin)。有研究表明，0.1 µg的β-乳球蛋白就可以引起强烈的过敏反应，而有些以乳糖为辅料的药物，按每日的给药量计算，乳糖的摄入量可能达到1 g以上。因此，药用乳糖辅料的质量控制，必须可以检测到低于100 µg/kg的β-乳球蛋白残留。然而检测在大量的乳糖基质中痕量的蛋白，有一定的难度。目前用于检测β-乳球蛋白残留的方法主要是酶联免疫法。该方法虽然特异性较好，但是在检测含量1 mg/kg以下的残留时，偏差较大，不能够很好的满足药用辅料的质控需求。

液相色谱-质谱联用具有特异性好，灵敏度高的优点。本文研究了液质联用检测乳糖中β-乳球蛋白和α-乳白蛋白两种蛋白残留的方法，为定量检测乳糖中痕量的乳清蛋白残留，提供了另一种参考方法。

### 蛋白在乳糖基质中的变化

药用乳糖的纯化，通常会经历加热重结晶的过程，而蛋白在大量的糖中经过加热，可能会与糖发生反应。查明这类反应对蛋白的影响，对判断样品中的蛋白形态，选取特征肽段和蛋白的定量，都有着重要的作用。我们设置了β-乳球蛋白和α-乳白蛋白在乳糖中加热，随时间检测蛋白状态的实验，用于研究蛋白的变化。

### 样品处理

称取约10 mg标准蛋白，溶于水中，制成10 mg/mL的标准蛋白溶液。将标准蛋白溶液加入10倍体积的精制乳糖(超滤处理，不含蛋白)饱和溶液中，制成1 mg/mL的蛋白乳糖溶液。将溶液在烘箱中80°C加热1, 6, 9, 12, 24小时后，分别取样，经过超滤处理去除乳糖，使用TripleTOF® 5600 System进行分子量测定。

### 结果与讨论

两种蛋白在加热过程中均与糖发生了反应，乳糖结合在蛋白上，且随着时间的延长，乳糖结合的越多。随着加热时间的延长，蛋白的信号强度越来越低，这可能是由于蛋白发生了降解。加热12小时后，β-乳球蛋白的原蛋白基本消失，样品中几乎全部为乳糖修饰的蛋白，24小时后几乎所有蛋白都被降解。α-乳白蛋白在加热12h后基本全部为乳糖修饰蛋白。但我们也能发现，两种蛋白与乳糖基本上只发生了糖修饰反应，而未发生其他未知反应，这使通过特征肽段检测和定量蛋白成为可能。

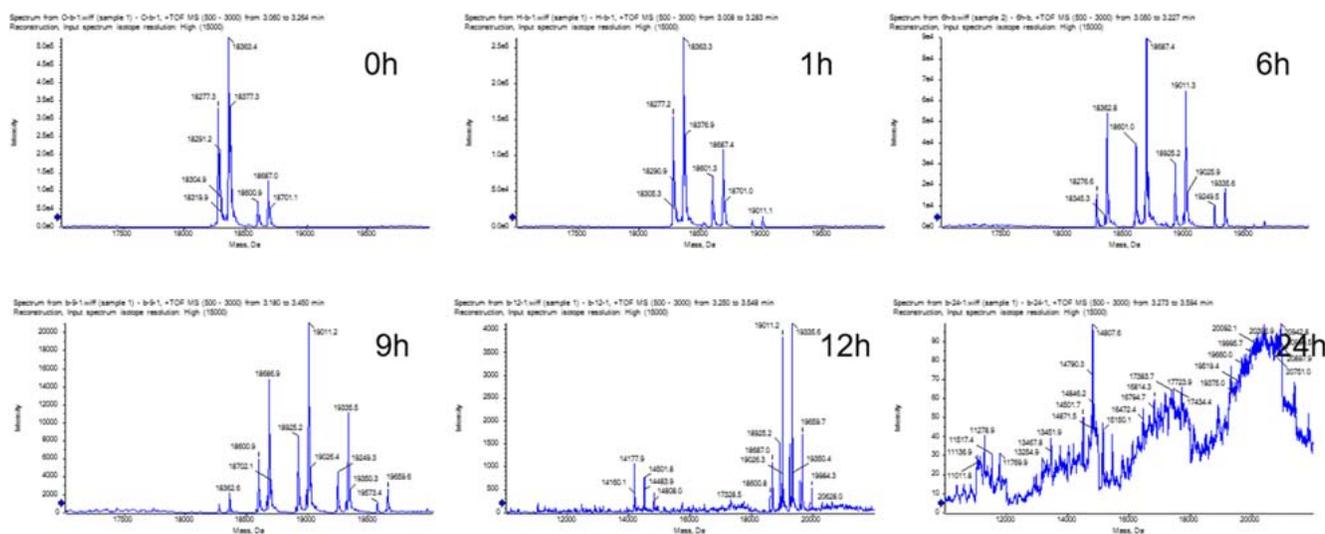


Figure 1.  $\beta$ -乳球蛋白在乳糖中，随加热时间变化的分子量检测图。

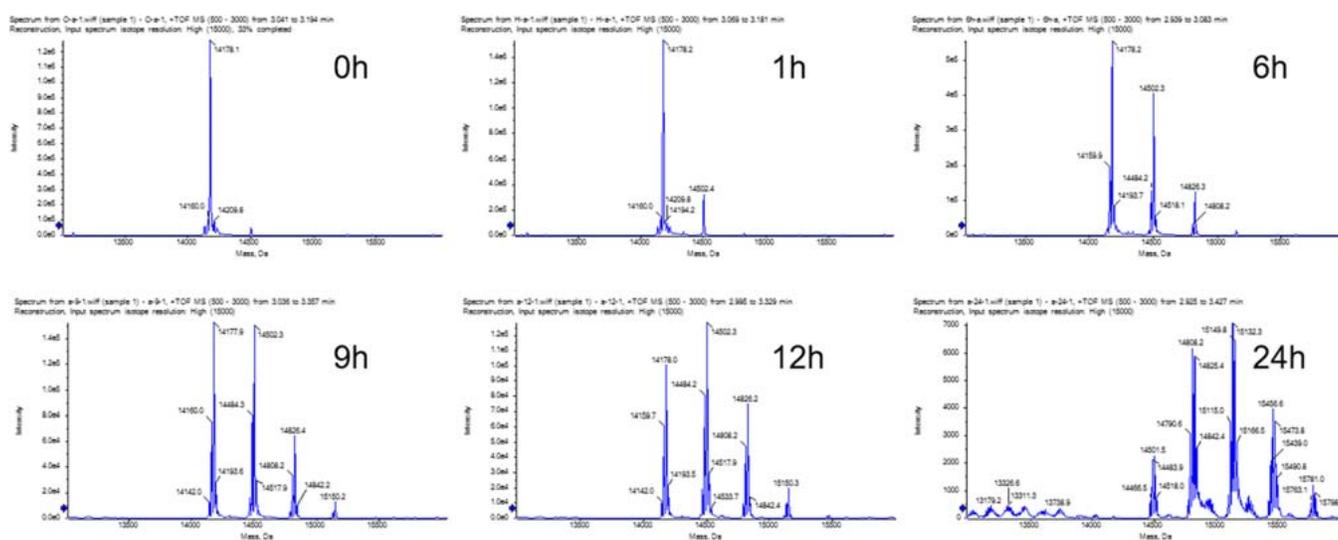


Figure 2.  $\alpha$ -乳白蛋白在乳糖中，随加热时间变化的分子量检测图。

## 蛋白的特征肽段在乳糖基质中的变化

实验证明，两种蛋白在乳糖中基本上只发生了糖修饰反应。那么蛋白的特征肽段是否发生了糖修饰，是验证特征肽段是否可以定量蛋白的前提条件。如果特征肽段发生了糖修饰，那么用特征肽段定量得到的蛋白含量就会有偏差。我们对比加热1小时和24小时的蛋白特征肽段，如果特征肽段发生了修饰，则分子量发生变化，强度会相应降低，通过对比峰强度的变化来分析特征肽段是否发生了糖修饰。

## 样品处理

取在乳糖基质中加热1 h和24 h的蛋白样品，还原，烷基化后酶解过夜。使用Exion LC™-TripleTOF® 5600 LC-MS/MS System液质联用系统，检测肽谱。提取特征肽段的离子流图，比较强度变化。

## 结果与讨论

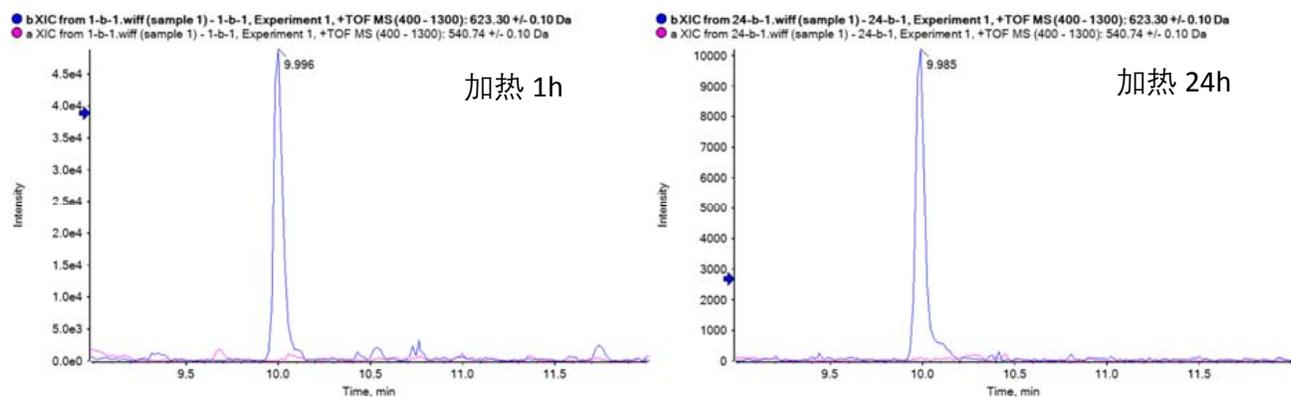


Figure 3.  $\beta$ -乳球蛋白特征肽段在热反应1 h和24 h峰强度比较。

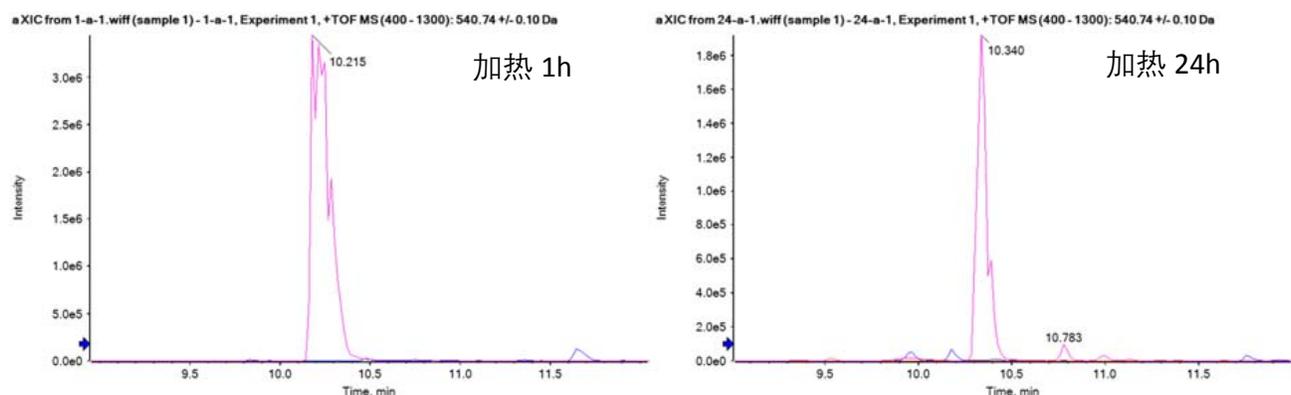


Figure 4.  $\alpha$ -乳白蛋白特征肽段在热反应1 h和24 h峰强度比较。

根据检测结果，加热24小时的 $\beta$ -乳球蛋白的特征肽段强度降低至加热1小时的1/4，但是考虑到 $\beta$ -乳球蛋白的完整蛋白，在加热24小时后几乎完全降解，可以判断该特征肽段并没有发生糖修饰反应。 $\alpha$ -乳白蛋白加热24小时后，特征肽段强度降低至加热1小时的约2/3，同样可以判断其未发生糖修饰反应。因此， $\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳白蛋白的特征肽段均可以用于定量。

### 乳糖基质中的痕量蛋白的检测

$\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳白蛋白的检测，常见于乳制品中乳清蛋白的含量测定。然而乳清蛋白的含量在牛奶中约占鲜奶蛋白质的7%-12%，在奶粉中，含量可高达g/kg级别。而在乳糖中，其残留可

能低至10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。高达6至7个数量级的浓度差异，使得在乳糖中检测痕量的乳清蛋白残留非常困难。我们通过比较超滤浓缩和SPE浓缩，确定SPE浓缩更适合用于浓缩富集乳糖中的乳清蛋白残留。

### 样品处理

取标准蛋白，溶于精制乳糖（超滤处理，不含蛋白）饱和溶液中，经SPE浓缩富集，再经还原，烷基化后酶解过夜。使用Exion LC™- QTRAP® 6500+ LC-MS/MS System液质联用系统，MRM法检测特征肽段离子对，建立定量标准曲线。同样处理两批市售的乳糖样品，检测其中的蛋白残留情况。

## 结果与讨论

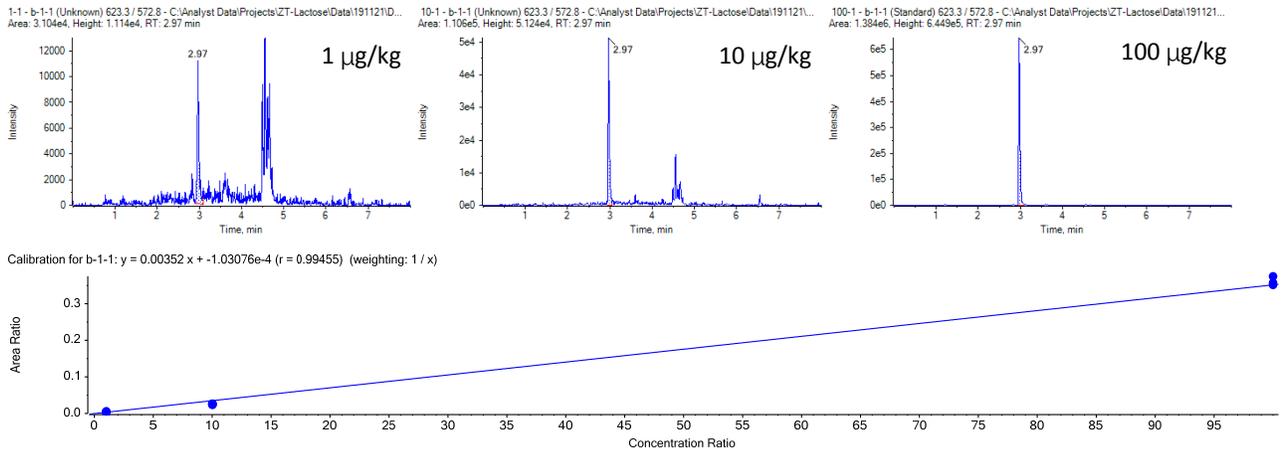


Figure 5.  $\beta$ -乳球蛋白 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 检测图及线性。

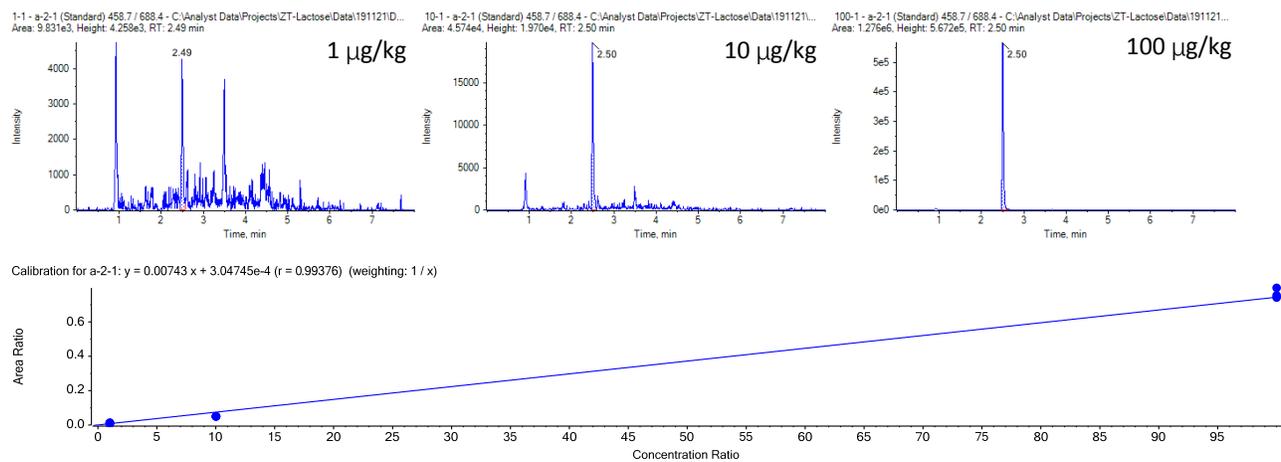


Figure 6.  $\alpha$ -乳白蛋白 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 检测图及线性。

Table 1. 3次重复处理方法稳定性测试结果。

#	峰面积		
	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	25730	110600	2041000
2	27810	87190	2208000
3	23750	110500	2306000
平均值	25763.3	102763.3	2185000.0
标准差	2030.2	13487.0	133988.8
CV%	7.9	13.1	6.1

结果表明，建立的方法可以检测到乳糖中低至1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的乳清蛋白残留。3次重复处理，不同浓度的样品峰面积CV低于20%，方法稳定可靠。

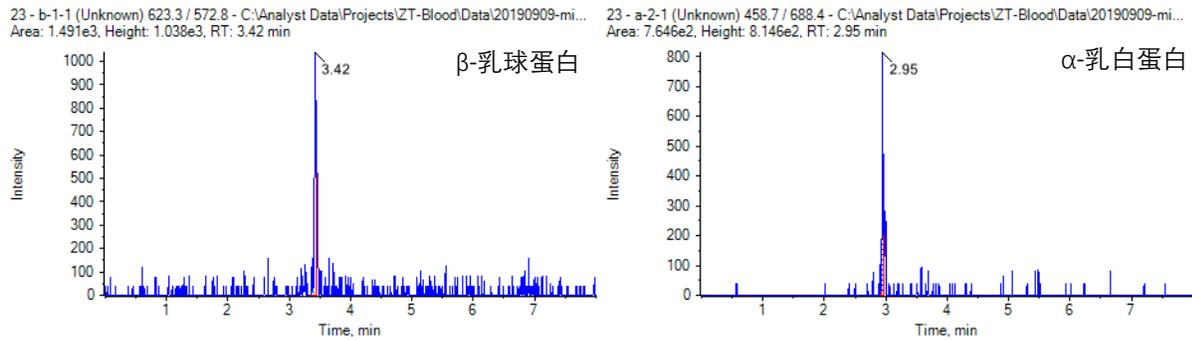


Figure 7. 市售乳糖样品1的 $\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳白蛋白特征肽段检测。

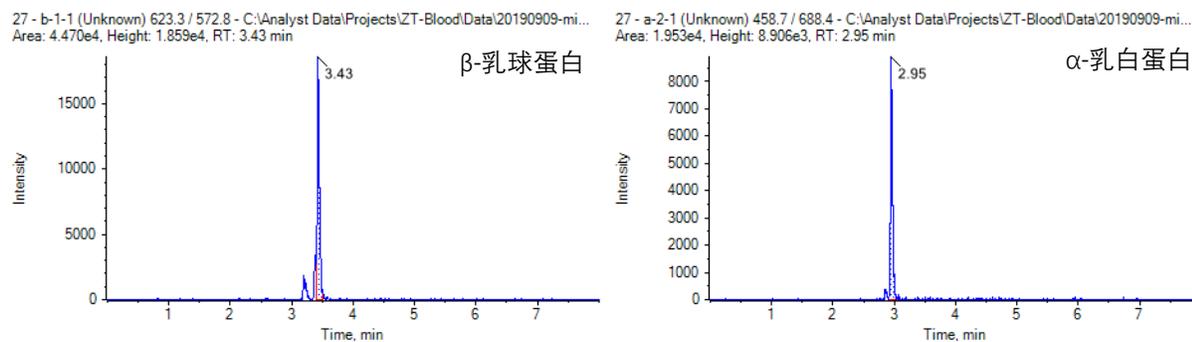


Figure 8. 市售乳糖样品2的 $\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳白蛋白特征肽段检测。

用该方法检测两批市售的乳糖样品，在其中均检测到了不同含量的乳清蛋白残留，说明该方法可用于实际样品检测。

## 总结

本研究验证了 $\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳白蛋白的特征肽段不受糖的影响，可以用于乳糖中乳清蛋白的定量检测。通过SPE的方法富集

的方法，使乳糖中痕量的乳清蛋白检测成为可能。建立的方法，可检测低至 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 含量的 $\beta$ -乳球蛋白和 $\alpha$ -乳白蛋白残留，且方法稳定可靠，可以应用于药用乳糖的乳清蛋白残留质量控制。

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. 或在英国和/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。

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-10790-ZH-A



### SCIEX中国公司

北京分公司  
地址：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

上海公司及中国区应用支持中心  
地址：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

广州分公司  
地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510 0200  
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897 网址：sciex.com.cn 官方微信：ABSciex-China