

Cuantificación del Contenido de Proteína de Suero en Fórmula Infantil por CE-SDS

Gao Tie¹, Chen Hongxu¹, Wu Jianhua¹, Feng Ping²
¹SCIEX, China; ²Wyeth Nutrition, China

La leche es casi siempre la primera fuente de proteína para el crecimiento y desarrollo humano. La leche de mamífero incluye dos grupos principales de proteínas: proteínas de suero, una familia de proteínas globulares, y proteínas de caseína, una familia de fosfoproteínas. Se encuentran en una proporción de aproximadamente 60:40 en la leche humana y en otras proporciones en otras leches de mamíferos. Las proteínas del suero también son un componente estándar de la mayoría de las fórmulas infantiles. De acuerdo con el Estándar Nacional de Alimentos GB 10765 de la República Popular China, la fórmula infantil a base de leche se refiere a productos líquidos o en polvo hechos principalmente de leche y productos lácteos; con la adición de una cantidad adecuada de vitaminas, minerales y/u otros ingredientes; producido y procesado solo por métodos físicos, adecuado para bebés normales.

Para verificar las afirmaciones de los proveedores de fórmula infantil y garantizar la calidad, seguridad y eficacia de la fórmula infantil, es esencial contar con un método preciso para medir el contenido de suero. Anteriormente, sin embargo, no había un método confiable para separar los dos tipos principales de proteínas y cuantificar el contenido de proteína de suero.

El desafío se vio agravado por la pasteurización, durante la cual la reacción de Maillard puede hacer que las proteínas formen

complejos con azúcares. Estos complejos hacen que la separación efectiva de las diversas proteínas sea aún más difícil.

Esta nota explora un método efectivo y práctico basado en electroforesis capilar —dodecil sulfato de sodio (CE-SDS)— para separar y cuantificar el contenido de proteína de suero en la fórmula infantil. Para el análisis se utilizó el sistema CE para análisis farmacéutico SCIEX PA 800 Plus, el cual claramente separó las proteínas de suero, caseína e inmunoglobulinas (Figura 1), y proporcionó una cuantificación precisa y confiable de las proteínas de suero. El método fue validado en múltiples laboratorios y demostró ser confiable y reproducible¹. Este

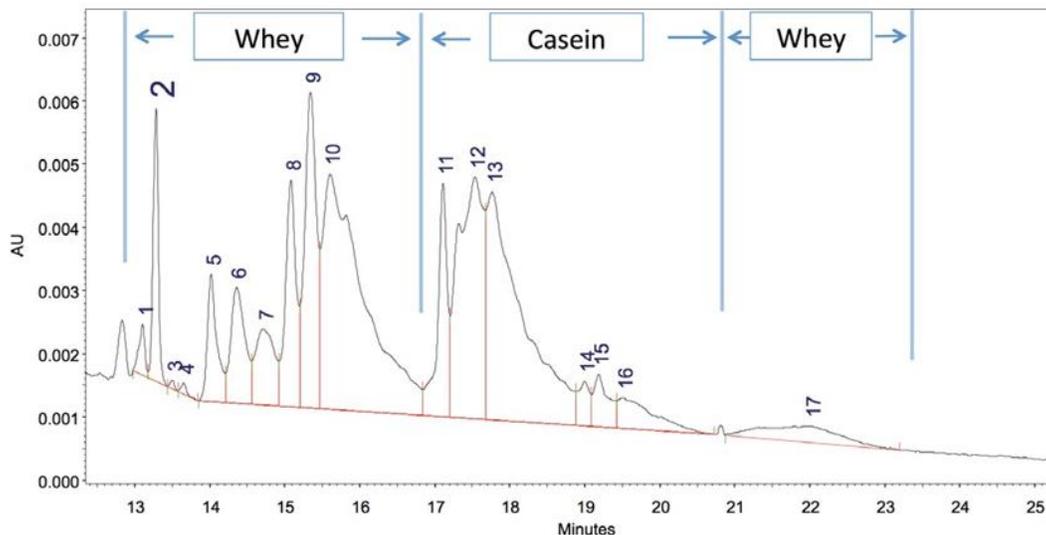


Figura 1. Electroferograma de Fórmula Infantil.

método fue aprobado por el panel de revisión de expertos de AOAC para el panel de partes interesadas sobre fórmula infantil y nutrición para adultos (SPIFAN).¹

Características clave

- CE-SDS el sistema PA 800 Plus proporciona una excelente resolución de separación, separando claramente las proteínas de suero, las proteínas de caseína y las inmunoglobulinas en muestras de estándar de proteínas y de fórmula infantil
- Las separaciones son relativamente rápida; menos de 30 minutos en el caso de este análisis
- La validación en múltiples laboratorios encontró el método confiable y reproducible

Condiciones Experimentales

Reactivos y Suministros: El kit de análisis SDS-MW (SCIEX, P/N 390953) suministró el capilar, el tampón de gel SDS, el marcador de 10 kDa, el marcador de MW y el tampón de muestra. El contenido se enumera en la Tabla 1. Otros reactivos y suministros incluidos: β - mercaptoetanol (SIGMA P/N M7154 or M6250); estándares de proteína de leche (SIGMA: α -lactalbúmina, L6010; β - lactoglobulina, L3908; IgG, I5506; BSA, A1933; β -caseína, C 6905; α S-caseína, C6780; κ -caseína, C0406. Ingredientes ALAR: CGMP). La fórmula infantil fue proporcionada por un fabricante local de lácteos. Agua desionizada (Millipore).

Preparación de la Muestra

Mezcla de estándar de proteína de leche: Las proteínas de leche se pesaron y se disolvieron en agua de acuerdo con la proporción de fórmula infantil.

Fórmula infantil: En tubos de centrifuga de 1,5 mL, se adicionaron (100 mg \pm 4 mg) de fórmula infantil y 1 mL de agua. Los tubos fueron sometidos al vortex y oscilación hasta que la fórmula infantil se disolvió por completo.

Solución de Pre-corrida de Muestra: La solución de pre-corrida de muestra se preparó mezclando el buffer de muestra y

el marcador 10 kDa (estándar interno), ambos del kit de análisis SDS-MW, en una proporción 84:1.

Desnaturalización: Se pipetearon 10 μ L de cada solución de muestra en tubos separados de microcentrifuga de 1,5 mL. Se agregaron 85 μ L de pre -solución y 5 μ L of β -mercaptoetanol . cada tubo se mezcló bien y luego se calentó en un baño de agua a (100 \pm 5) °C por 10 minutos . Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y luego se volvió a aplicar el vortex . Finalmente , cada muestra se transfirió por separado a un vial de inyección.

Tabla 1. Artículos en el Kit de Análisis SDS-MW

Artículos	Número de Parte
Columna capilar de 50 μ m ID	338451
Buffer de gel SDS	A30341
Marcador de 10 kDa	A26487
Marcador de MW	A22196
Buffer de muestra SDS	
NaOH 0.1 N	
HCl 0.1 N	

Separación y Detección: Todas las separaciones se llevaron a cabo en un sistema de electroforesis capilar SCIEX PA 800 Plus, para análisis farmacéutico, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) programado a 220 nm, 2 Hz. La apertura fue de 2 (100 x 200 μ m). El sistema fue equipado con una columna capilar de sílica fundida (50 μ m ID, 30 cm total/20 cm de longitud efectiva). La muestra y el capilar se almacenaron a una temperatura de 25 °C. Los métodos de acondicionamiento y separación se muestran en las Figuras 2 y 3, respectivamente.

Análisis de Datos: El análisis de datos, fue realizado usando el software SCIEX 32 Karat. La integración se llevó a cabo con la integración César desactivada. Se integró el electroferograma de la mezcla de estándar de proteínas. La migración de las proteínas de suero y caseína se define mediante la comparación

	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	0.00	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								

Figura 2. Método de Acondicionamiento de la Columna.

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	70.0 psi	3.00 min	BI:D1	BD:D1	forward, In / Out vial inc 8	0.1 N NaOH rinse to clean capillary surface - Automatic increment every 8 runs
2		Rinse - Pressure	70.0 psi	1.00 min	BI:E1	BD: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	BD: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	BD:B1	forward, In / Out vial inc 8	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel - Automatic increment every 8 runs
5		Wait		0.00 min	BI:A1	BD: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	BD: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	BD:C1	Divide, reverse polarity	Sample injection
8		Wait		0.00 min	BI:B4	BD:B4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to avoid sample carry over - Automatic increment every 8 runs
9	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	30.00 min	BI:C1	BD: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								

Figura 3. Método de Acondicionamiento de la Columna.

de los E- gramos de cada estándar de proteína, se muestra en la Figura 5.

Para el electroferograma de la fórmula infantil, el punto de inicio de la autointegración fue después del pico de solvente aproximadamente 0.4 minutos antes del pico del marcador de 10 kDa. El punto final de la autointegración fue el final del grupo de picos de la proteína de caseína, cuya posición fue definida de acuerdo con la mezcla de estándar. La integración manual se realizó para las proteínas de suero de alto peso molecular que eluyeron después de las proteínas de caseína.

Cálculos: El contenido de proteínas de suero en la fórmula infantil se calculó usando la siguiente ecuación:

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

Donde: Aw.c. = área integrada corregida de los componentes del suero

Aw = área total integrada de los componentes del suero.

1.4 = Factor de corrección

$$\% \text{ Proteína de suero} = Aw.c. / (Aw.c. + Acn) \times 100 \quad (2)$$

Donde: Acn = área integrada de los componentes de caseína

El factor de corrección se utiliza para ajustar la diferencia del factor de respuesta de las proteínas de suero y las proteínas de caseína cuando se detectan al UV a 220 nm, ya que las caseínas contienen más aminoácidos aromáticos los cuales contribuyen con una mayor respuesta en el área que las proteínas de suero.

Resultados

Mezcla de estándar de Proteína de Leche

El estándar de proteína de leche compuesto de proteínas de suero (α -lactalbumina, β -lactoglobulina, CGMP, IgG, and BSA) y proteínas de caseína (β -caseína, α S1-caseína, α S2-caseína, κ -caseína) fueron analizadas por CE-SDS. Todas las proteínas de caseína migraron entre la cadena ligera de IgG y la cadena pesada de IgG. Las proteínas de suero y las proteínas de caseína se separaron completamente entre sí (Figura 4).

Fórmula Infantil

El electroferograma de la muestra de fórmula infantil se mostró previamente en la Figura 1. The electropherogram of the infant formula sample was previously shown in Figure 1. Se calculó que el contenido de proteína de suero era del 61,97%, em concordancia con el contenido de proteína de suero de la leche humana natural.

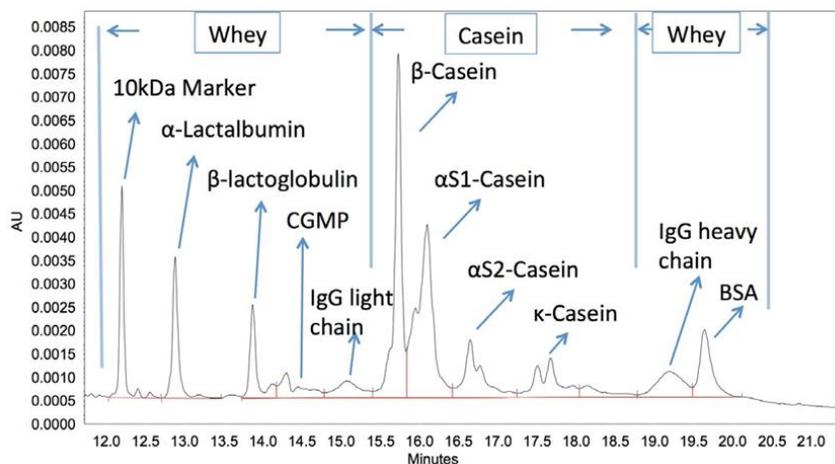


Figura 4. Electroferograma de la mezcla de estándar de proteína. El primer pico integrado es el marcador (SI) de 10 kDa.

Conclusiones

La electroforesis Capilar con SDS se aplicó con éxito a la cuantificación del contenido de proteínas de suero en la fórmula infantil. El método CE-SDS separó completamente las proteínas de suero, proteínas de caseína y las inmunoglobulinas, lo que facilitó la cuantificación de las proteínas de suero. La validación en múltiples laboratorios ha demostrado que el método es una solución precisa y confiable para el difícil problema de verificar el contenido de suero.

Referencias

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

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-8133-B. AB SCIEX™ is being used under license.



Headquarters
500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales
For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices