

# 高通量毛细管电泳方法进行乳品（液态奶、奶粉）中A2 $\beta$ -酪蛋白含量测定

## PA800 Plus与BioPhase 8800方法的平行转移

## Determination of A2- $\beta$ -casein in dairy products (liquid milk and powder) by high throughput capillary electrophoresis

### Parallel method transfer from PA800 Plus to BioPhase 8800

高铁<sup>1</sup>, 王象欣<sup>2</sup>, 刘冬科<sup>1</sup>, 陈凌声<sup>1</sup>, 陈泓序<sup>1</sup>, 郭立海<sup>1</sup>

Gao Tie<sup>1</sup>, Wang Xiangxin<sup>2</sup>, Liu Dongke<sup>1</sup>, Chen Lingsheng<sup>1</sup>, Chen Hongxu<sup>1</sup>, Guo Lihai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX, 中国; <sup>2</sup> 黑龙江飞鹤乳业有限公司

<sup>1</sup> SCIEX, China<sup>2</sup>; Heilongjiang Feihe Dairy Co., Ltd.

**关键词:** BioPhase 8800 系统; 毛细管区带电泳; 液态奶; 奶粉; 配方奶粉; A2  $\beta$ -酪蛋白

### 1. 前言

乳制品中蛋白约80%为酪蛋白(CN), 其中 $\beta$ -酪蛋白( $\beta$ -CN)占CN的33%-40%,  $\beta$ -CN最常见的变异体为A1、A2、B型。所谓A2 乳制品是由以产A2  $\beta$ -CN为主的奶牛(A2牛)产出的奶加工而成的乳制品, 但A2牛有一定概率发生基因突变导致产奶以A1  $\beta$ -CN为主。因此, 为保证A2乳制品质量, 不仅需要对A2牛的基因进行检测, 也需要对产奶及终产品的A2  $\beta$ -CN的含量进行确证。

A2  $\beta$ -酪蛋白相关的产品, 比如液态奶、普通奶粉或配方奶粉目前已有多款产品上市, 由于工艺问题, 巴氏杀菌或UHT杀菌乳中的蛋白美拉德产物并不多, 而在奶粉制作过程中由于高温喷粉的工艺, 会有较多美拉德产物的生成, 尤其是像蛋白与乳糖发生反应, 这会导致乳蛋白的复杂程度增高, 检测难度增加; 并且随着乳品的来源、种类、功能不断增多, 乳品行业需要高通量仪器以提高研发、检测效率。基于之前的研究<sup>[1-2]</sup>, 本文在BioPhase 8800上建立了基于毛细管区带电泳(CZE)的方法检测乳品中(如液态奶及奶粉)的A2  $\beta$ -CN, 可在保证分析效果和准确性的前提下, 提高大量样本的分析检测效率, 方案具有以下优点:

1. BioPhase 8800系统与PA800 Plus药物分析系统的数据一致性较高, 可相互转移;
2. 方法通量高, 速度快, 平均每个样品仅用时5 min;
3. 同一样品8通道一致性高, A2  $\beta$ -CN含量RSD值 < 1.5%;
4. 单通道连续6针进样重复性好, A2  $\beta$ -CN含量RSD值 < 1.5%。
5. 使用50 cm总长的毛细管, 可对液态奶及奶粉中(常规或A2产品)的A1和A2  $\beta$ -酪蛋白进行有效分离。

### 2. 仪器及方法

BioPhase 8800系统, 配备紫外检测器(UV, 波长220 nm), BioPhase软件1.2.20(SCIEX)。用于BioPhase 8800系统的熔融石英毛细管卡盒8 × 50 cm(SCIEX PN 5080123, 50  $\mu$ m内径, 40/50 cm有效/总长); BioPhase 8800系统启动盘套装(SCIEX PN 5080311), 包含4块96孔样品盘、4块缓冲液盘、8块出口盘。

BioPhase 8800 系统进行A2  $\beta$ -CN含量分析的CZE分离方法如下, 检测器: UV, 220 nm, 样品室温度: 25°C; 毛细管温度: 38°C; 分离电压: 14.5 kV; 进样压力及进样时间: 0.5 psi, 10 s。针间冲洗方法: 碱性冲洗液, 70 psi, 2min; 酸性冲洗液, 50 psi, 2min; DDI Water, 50 psi, 1 min; 背景电解质冲洗: 50 psi, 5 min。

### 3. 试剂及配置

尿素（分析纯，Amresco, PN 0568）；柠檬酸（分析纯，Amresco, PN 0529）；羟丙基甲基纤维素（HPMC, Sigma-Aldrich, PN 09963）；七水合磷酸二氢钠（分析纯，MP Biomedicals, PN191441）。

分别配制10 mol/L尿素，0.2 mol/L磷酸二氢钠，1.0 mol/L柠檬酸和1%羟丙基甲基纤维素作为储备液。

分别移取10 mL尿素、6.25 mL磷酸二氢钠、3.5 mL柠檬酸和5 mL HPMC储备液，均置于同一25 mL容量瓶中，用超纯水稀释、定容至刻度，混匀则配制成含50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ +140 mmol/L 柠檬酸+0.2% HPMC+4 mol/L尿素的分离背景电解质。

分别移取5 mL 磷酸二氢钠、2 mL 柠檬酸和12.5 mL尿素储备液，均置于同一25 mL容量瓶中，用超纯水稀释、定容至刻度，混匀则配制成40 mmol/L 磷酸二氢钠+80 mmol/L 柠檬酸+5 mol/L尿素为样品稀释液。

### 4. 样品及前处理

$\beta$ -酪蛋白标准品（ $\beta$ -CN,  $\geq 98\%$  (PAGE), Sigma-Aldrich）；液奶、奶粉等均为市场购买。

去离子水配置 $\beta$ -CN标准品至2 mg/mL，去离子水配置奶粉为10 mg/mL； $\beta$ -CN标准品、奶粉溶液、液奶样品均与样品缓冲液等比例添加，充分涡旋混合。

以一个普通奶粉样品为例，各取100  $\mu\text{L}$ 加入96孔样品盘第一列的8个样品孔中（此时8个样品孔中的样品相同），考察单次进样8通道的一致性，单通道连续进样6次的重复性。将收集到的样品分别各取100  $\mu\text{L}$ 加入样品盘第二列的8个样品孔中，考察方法对不同乳品的分析适用性。最终样品摆放见图1，使用BioPhase 8800仪器及BioPhase软件采集分析。

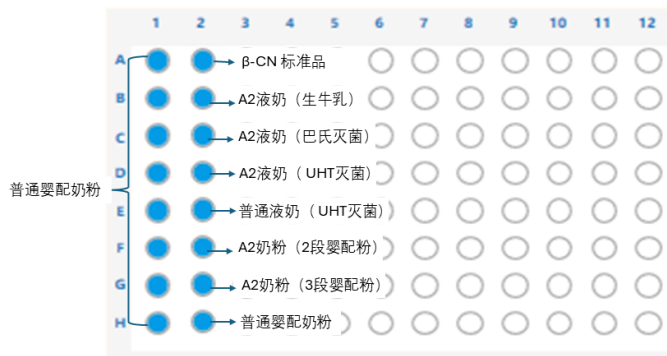


图1. BioPhase 8800样品盘摆放

另取100  $\mu\text{L}$   $\beta$ -CN标准品，使用PA 800 Plus仪器及32Karat软件采集分析，比较同一样品在BioPhase 8800及PA 800 Plus两个仪器上的电泳结果。

### 5. 结果与讨论

#### 5.1 同一样品使用 BioPhase 8800与PA 800 Plus采集的结果分析

对于同一 $\beta$ -CN标准品，分别使用BioPhase 8800及PA 800 Plus进行CZE分析的电泳结果见图2a、2b。 $\beta$ -CN各峰的校正峰面积百分比（CAP%）及分离度（R）结果见表1，同一样品在BioPhase 8800与PA 800 Plus上表现出较好的一致性。

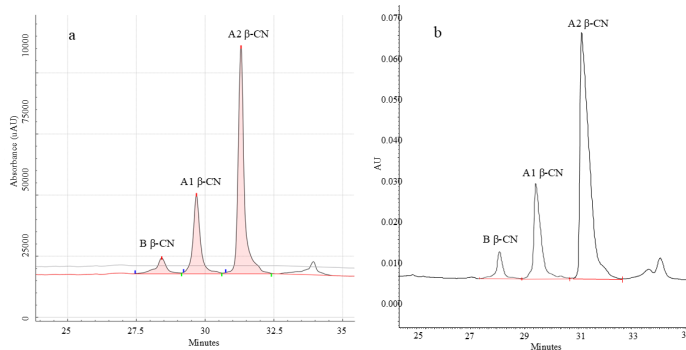


图2. 相同 $\beta$ -CN标准品在不同仪器及软件中的CZE电泳图（a. BioPhase 8800仪器，BioPhase软件，b. PA 800 Plus仪器，32Karat软件）

表1. 相同 $\beta$ -CN标准品在不同仪器分析中的结果

Instrument	B- $\beta$ CN		A1- $\beta$ CN		A2- $\beta$ CN	
	CAP%	R	CAP%	R	CAP%	R
BioPhase 8800	8.23	/	27.63	3.13	64.14	4.28
PA 800 Plus	7.96	/	26.97	3.25	65.07	3.97

#### 5.2 BioPhase 8800多通道重复性结果分析

对样品盘第一列的普通奶粉样品连续进样6次，考察单次进样8通道间的一致性，单通道连续进样6次的重复性。样品中A1、A2  $\beta$ -CN峰较宽，为高温喷粉过程中形成的美拉德产物。单次进样8通道间表现出良好的一致性（图3a），A2  $\beta$ -CN百分含量RSD值均 $< 1.5\%$ 。单通道6针重复性好（图3b），A2  $\beta$ -CN百分含量RSD值均 $< 1.5\%$ 。对8通道的样品同时连续进样6次共计48针样品中，A2  $\beta$ -CN含量平均值为60.16%，RSD值1.15%，见表2。

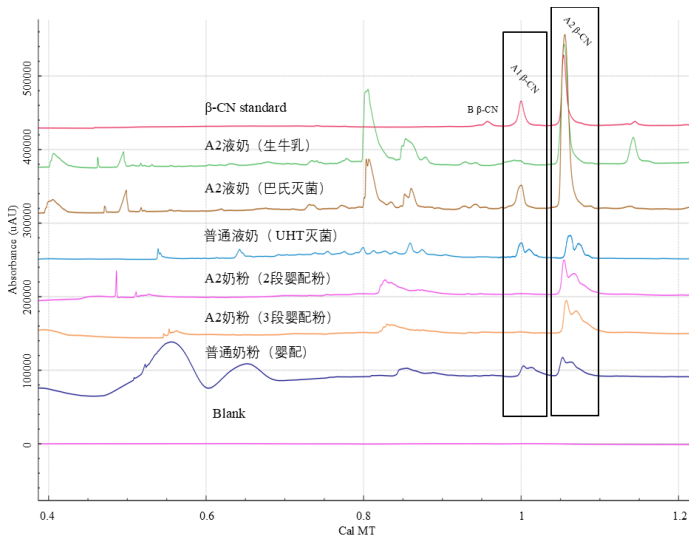


图3. Biophase 8800系统使用CZE方法分析乳品中A2 β-CN含量的电泳图  
(a) 8通道A-H; (b) A通道重复6针 (Cal MT: 校正迁移时间)

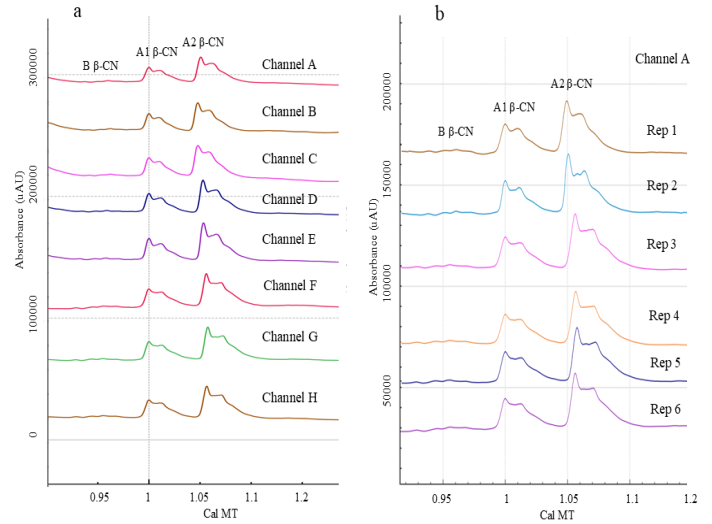


图4. 不同乳品的 β-CN分析电泳图 (Cal MT: 校正迁移时间)

### 5.3 不同乳品A2 β-CN含量分析

BioPhase 8800系统可准确测定乳品中A2 β-CN的含量。不同乳品的CZE电泳结果见图4, B、A1、A2 β-CN可实现基线分离并准确定量。收集的液奶样品中, A2液奶(生牛乳)的A2 β-CN含量最高, 为86.72%, A2液奶(巴氏灭菌)为81.81%, 普通液奶(UHT灭菌)为57.65%, 且UHT液奶因高温灭菌的方式产生了美拉德

产物峰。奶粉样品因高温喷粉工艺均表现出美拉德产物峰, 其中A2奶粉(2段婴配粉) A2 β-CN含量为92.28%, A2奶粉(3段婴配粉)为91.87%, 普通奶粉59.95%。

表2. Biophase 8800 A2 β-CN含量分析的8通道一致性、单通道6针重复性结果

Channel	A2 β-CN含量 (%)						Mean	RSD
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6		
A	60.75%	59.11%	60.73%	60.32%	60.62%	60.72%	60.31%	0.97%
B	60.93%	59.07%	59.10%	60.93%	60.53%	60.80%	60.11%	1.36%
C	60.71%	60.98%	59.44%	60.78%	59.59%	60.95%	60.30%	1.06%
D	59.17%	59.46%	59.13%	60.98%	60.68%	59.62%	60.07%	1.19%
E	60.94%	59.50%	59.06%	60.61%	59.07%	59.25%	59.84%	1.26%
F	59.26%	60.90%	60.57%	60.21%	59.37%	60.02%	60.06%	0.99%
G	60.60%	60.98%	60.21%	60.21%	60.26%	60.35%	60.45%	0.46%
H	60.84%	60.62%	59.16%	59.40%	59.37%	60.61%	59.88%	1.17%
Mean	60.40%	60.08%	59.75%	60.43%	59.94%	60.29%	60.16% (48针平均值)	
RSD	1.15%	1.35%	1.13%	0.80%	1.02%	0.94%	1.15% (48针RSD值)	

## 5. 结论

本文提供了在BioPhase 8800系统上使用CZE方法进行乳品（液态奶、奶粉）中A2  $\beta$ -CN含量分析的方法验证：1）BioPhase 8800系统与PA800 Plus药物分析系统的数据一致性较高，可相互转移；2）方法通量高，速度快，平均每个样品仅用时5 min；3）同一样品8通道一致性高，A2  $\beta$ -CN含量RSD值 < 1.5%；4）单通道连续6针进样重复性好，A2  $\beta$ -CN含量RSD值 < 1.5%。5）BioPhase 8800系统可对液态奶和奶粉中（常规或A2产品）的A1和A2  $\beta$ 酪蛋白进行有效分离。当面对不同批次、工艺、种类、功能等大量乳品样品检测时，BioPhase 8800系统可在保证分析效果和准确性的前提下，实现大量样品的快速分析，提高检测分析效率。

## 6. 参考文献

- [1] SCIEX Tech Note: 毛细管区带电泳方法对乳制品中A2  $\beta$ -酪蛋白含量的测定, RUO-MKT02-10644-ZH-B.
- [2] SCIEX Tech Note: High-throughput milk A2  $\beta$ -Casein analysis by capillary zone electrophoresis (CZE), RUO-MKT-02-26643-A.

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。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-33823-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：021-2419-7201  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)