

反相高效液相色谱法同时检测多种乳清蛋白成分

朱宏 邢志恩 戴蕴青 陈敏*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 建立一种快速、简便鉴定和定量检测乳清蛋白中牛乳铁蛋白(bLf)、转基因人乳铁蛋白(rLf)、 α -乳白蛋白(α -La)和 β -乳球蛋白(β -Lg)的方法。对样品进行离心脱脂和酸法去除酪蛋白,水洗乳脂和酪蛋白以提高 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和乳铁蛋白(Lf)的回收率。乳清通过高效液相色谱检测,采用Proteonavi反相C4色谱柱,以体积分数为0.1%的三氟乙酸水溶液和乙腈水溶液为流动相,梯度洗脱,流速0.5 mL/min,柱温35℃,检测波长280 nm。结果显示:此方法可以有效分离牛 α -乳白蛋白、牛 β -乳球蛋白、牛乳铁蛋白和转基因人乳铁蛋白。标准品线性关系良好,平均回收率在正常范围内。

关键词 乳品; α -乳白蛋白; β -乳球蛋白; 乳铁蛋白; 高效液相色谱

中图分类号 TS 201.2; O 629.73

文章编号 1007-4333(2012)03-0127-04

文献标志码 A

Determination of components of whey protein by reversed-phase HPLC method

ZHU Hong, XING Zhi-en, DAI Yun-qin, CHEN Min*

(College of Food Science and Nutritional Engineering,

China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract The aim of this study was the rapid determination of α -lactalbumin (α -La), β -lactoglobulin (β -Lg), Lactoferrin (Lf). After removing fat from whey protein by centrifugation and precipitating caseins by adjusting pH, the whey contents were detected by Dikma Proteonavi Chromatographic column with 0.1% (volume fraction) TFA solution and acetonitrile solution by 0.5 mL/min flow rate, gradient elution and column temperature was setted at 35℃. Detection was carried out at the wavelength 280 nm. The results illustrate that the separation of α -La, β -Lg and Lf is available. The linear relationship of standard samples is good, and the recovery of the standard samples is in the normal range. The method which is simple, fast and accurate can determine the content of α -La, β -Lg and Lf of breast milk, milk and transgenic milk.

Key words dairy; α -lactalbumin; β -lactoglobulin; Lactoferrin; HPLC

牛奶中蛋白质包括酪蛋白和乳清蛋白,其中乳清蛋白有较好的氨基酸比例,近年来其生理功能受到人们越来越多的关注^[1]。乳清蛋白主要组分包括 β -乳球蛋白(β -Lg)、 α -乳白蛋白(α -La)和乳铁蛋白(Lf)等,前两者分别占总量的40%~50%和10%~20%^[2],乳铁蛋白在牛初乳中含量稍高,常乳中含量很小(一般<500 μ g/mL)。由于人乳中乳铁蛋白含量很高,且结构与牛乳铁蛋白不同,国内外一些研究机构将利用转基因技术使牛乳营养价值接近人乳作为重要的研究方向,目前已取得了一些成果^[3],即将

人乳铁蛋白基因转入牛中,培育可以产出富含转基因人乳铁蛋白(rLf)牛奶的奶牛新品种。

牛乳铁蛋白与转基因人乳铁蛋白结构虽有不同,但利用一般的蛋白分析技术无法将二者分离只能单独测定含量^[4]。反相高效液相色谱法(RP-HPLC)是分析乳清蛋白成分的有效方法之一,具有分辨率和回收率高、重复性好、操作简便等优势^[5]。目前,RP-HPLC分析乳清蛋白在国外已经进行了一定的研究^[6-8],国内也报道了乳清蛋白粉中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白的分析方法^[9-10],但未见乳铁蛋白

收稿日期:2011-10-23

基金项目:转基因生物品种培育重大专项资助(2008ZX08007-001)

第一作者:朱宏,硕士研究生,E-mail:zhuland@sina.com

通讯作者:陈敏,教授,主要从事天然产物化学研究,E-mail:minch19@163.com

检测尤其是转基因人乳铁蛋白的相关试验;直接分析鲜牛乳的方法也鲜有报道。本研究拟建立一个可靠稳定、快速简便的乳清蛋白组分检测方法,旨在为鲜牛乳、人乳、转基因牛乳和各种奶制品中的乳清蛋白组分检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

鲜牛奶(三元特品鲜牛乳,北京三元食品股份有限公司)、转基因牛乳(中国农业大学生物学院提供)、乳珍、乳锭、乳粉和某医院提供的2个产妇泌乳第7天样品、第30天样品和第150天样品;盐酸、甲醇、乙酸均为国产分析纯;牛 α -乳白蛋白标准品(sigma)、牛 β -乳球蛋白标准品(sigma)、牛乳铁蛋白标准品(sigma)、转基因人乳铁蛋白标准品(中国农业大学生物学院提供);乙腈(Fisher)、三氟乙酸(Dikma)均为色谱纯;

高速冷冻离心机(GL-20B,上海安亭科学仪器厂)、pH计(PP-15,Satoris)、超纯水仪(Milli-Q)、高效液相色谱仪(LC-20AD,日本岛津公司)、PDA检测器(SPD-M20A,日本岛津公司)。

1.2 色谱条件

Dikma C4 色谱柱(5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm);流动相为:A,体积分数为0.1%的三氟乙酸(TFA)水溶液;B,V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸)=95:5:0.1的混合溶液。梯度洗脱程序为,流动相B最初为18%,在15 min内匀速升至43%,保持5 min,在10 min内匀速升至75%,在最后的15 min内匀速降至18%。流速0.5 mL/min;二极管阵列检测器;检测波长280 nm;进样量10 μ L;柱温35 $^{\circ}$ C。

1.3 样品制备

量取样品奶液10 mL,离心脱脂;将3 mL去离子水加入脂肪层,涡旋3 min洗涤,离心10 min。共清洗2次。将3次收集的上清液,用2 mol/mL盐酸调节pH至4.6,室温静置40 min待酪蛋白沉淀。离心,收集上清液;再将3 mL去离子水加入酪蛋白层,涡旋3 min,离心,共清洗2次,收集上清液,定容至25 mL待测。上述离心操作均在4 $^{\circ}$ C条件下以3 000 r/min进行15 min。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

固定相由疏水烷基链构成的色谱柱最常见的有

3种:C4、C8、C18。大的蛋白分子有较多能与固定相发生作用的疏水成分,故短一些的烷基链更适合分离蛋白,因此C4柱常用来分离分子质量大的蛋白;而如多肽,分子质量小一些,需要疏水性更强、烷基链更长一些的柱子,因此常用C8或C18分离^[11]。C8也常用来分离分子质量中等大小的蛋白,如 α_s -CN、 β -CN^[12]。因此,本试验选择Dikma C4柱作为分离柱。

色谱分离选用PDA检测器,样品中的蛋白在210 nm左右和280 nm左右都有吸收峰,210 nm左右的光谱区域蛋白吸收灵敏度较高,但基线噪声大,故选用280 nm为检测波长。

乳清中的蛋白极性较大,选用蛋白分离常用的乙腈和水作为流动相^[13],添加0.1%(体积分数)三氟乙酸(TFA)。三氟乙酸通过与疏水键相和残留的极性表面以多种模式相互作用^[13]来改善峰形、克服峰展宽和拖尾问题。试验发现,乳清中蛋白都在B相40%~70%时出现,故在此比例范围内改变梯度,实现了分离。流速选用0.5 mL/min,高于此速度时各蛋白峰会向前堆积,并出现重叠情况。

2.2 色谱峰归属检查

分别将牛乳铁蛋白(bLf)、转基因人乳铁蛋白(rLf)、牛 α -乳白蛋白(牛 α -La)和牛 β -乳球蛋白(牛 β -Lg)的标准品溶液以及4种蛋白标准品的混合溶液进行HPLC检测。色谱结果见图1。可以看出,4种蛋白都可以在本色谱条件上有效分离。同时根据各自蛋白标准品的保留时间可以进行定性分析。

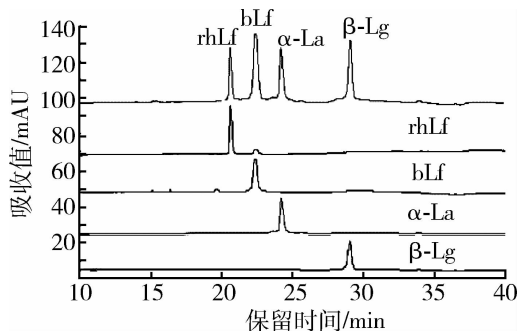


图1 bLf、rLf和牛 α -La、牛 β -Lg标准品以及4种蛋白混标的HPLC图

Fig. 1 HPLC chart of bLf, rLf, α -La, β -Lg and mixed sample

2.3 线性关系

分别取标准品bLf和rLf均配制成系列质量浓度为50、100、500、1 000和2 000 μ g/mL;取 α -La配

制成系列质量浓度为 85.7、428.5、600、770 和 857 $\mu\text{g/mL}$ ；取 $\beta\text{-Lg}$ 配制成系列质量浓度为 50.5、101、303、1 010 和 2 020 $\mu\text{g/mL}$ 。按照选定的色谱条件进样，以峰面积对质量浓度绘制标准曲线。表 1 示出 4 种标准品的线性方程和相关系数，可见，4 种标准品在设定的浓度范围内线性关系良好。

表 1 $\alpha\text{-La}$ 、 $\beta\text{-Lg}$ 、bLf 和 rLf 的线性方程及相关系数
Table 1 Standard curve of 4 standard proteins

乳清蛋白	线性范围/(mg/mL)	回归方程	相关系数 R^2
α -乳白蛋白	0.086~0.857	$y=167.064x+1\ 951.8$	0.999 6
β -乳球蛋白	0.051~2.020	$y=96.516x+4.224\ 8$	0.999 9
牛乳铁蛋白	0.050~2.000	$y=264.67x-7\ 640.5$	0.999 7
转基因人乳铁蛋白	0.050~2.000	$y=210.42x-7\ 683.6$	0.999 7

2.4 回收率及重现性试验

平行取 3 份鲜牛乳样品，加入不同浓度的 $\alpha\text{-La}$ 、 $\beta\text{-Lg}$ 、bLf 和 rLf 的标准品，测定标准品回收率，结果见表 2： $\alpha\text{-La}$ 和 $\beta\text{-Lg}$ 的平均加标回收率为

91.2%和 91.0%；bLf 和 rLf 的平均加标回收率为 79.4%和 103.1%。说明本检测方法具有较高的回收率，证明方法准确性良好。

按照 1.2 和 1.3 的方法，分别处理 5 个鲜牛奶样品，通过 5 次 $\alpha\text{-La}$ 和 $\beta\text{-Lg}$ 检测结果的相对标准偏差(RSD 值)考察重现性。 $\alpha\text{-La}$ 和 $\beta\text{-Lg}$ 的 RSD 值分别为 3.74%和 2.44%。

按照 1.2 的方法分别检测 5 次同一个 $\alpha\text{-La}$ 和 $\beta\text{-Lg}$ 标准品，通过 5 次 $\alpha\text{-La}$ 和 $\beta\text{-Lg}$ 检测结果的相对标准偏差(RSD 值)考察精密度。 $\alpha\text{-La}$ 和 $\beta\text{-Lg}$ 的 RSD 值分别为 0.81%和 2.48%。

通过回收率、重现性和精密度试验可以看出本次试验使用的检测方法稳定、可靠，结果准确。

2.5 不同来源样品测定

本试验检测了牛乳、人乳、转基因牛乳及牛乳制品(包括乳锭、乳粉、乳珍)。从检测结果(表 3)可以看出，乳锭和乳粉均是将牛奶直接喷雾干燥制得，乳清蛋白各组分含量并没有得到富集。乳珍是经过特殊加工的产品，乳清蛋白各组分含量均很高，可以作为营养品使用。在所有检测的牛乳制品样品中，并没有检测到乳铁蛋白，可能与原料及加工工艺有关。

表 2 $\alpha\text{-La}$ 、 $\beta\text{-Lg}$ 、bLf 和 rLf 的回收率试验结果
Table 2 Test results of the recovery experiment on $\alpha\text{-La}$ 、 $\beta\text{-Lg}$ 、bLf and rLf

乳清蛋白	ρ (乳清蛋白)/(mg/mL)			回收率/%
	样品中	加入量	检测量	
α -乳白蛋白	0.734	0.222	0.932	89.2
		0.434	1.133	91.9
		0.649	1.335	92.6
β -乳球蛋白	1.872	0.716	2.522	90.8
		1.288	3.058	92.1
		2.662	4.273	90.2
牛乳铁蛋白	0.317	0.185	0.464	79.5
		0.298	0.555	79.9
		0.650	0.828	78.6
转基因	2.450	1.128	3.658	107.1
人乳铁蛋白		2.204	4.761	104.9
		4.536	6.878	97.6

表 3 样品中 $\alpha\text{-La}$ 、 $\beta\text{-Lg}$ 、bLf 和 rLf 的含量
Table 3 Quantitative analysis on $\alpha\text{-La}$ 、 $\beta\text{-Lg}$ 、bLf and rLf of samples

乳清蛋白	ρ (乳清蛋白)/(mg/mL)			w (乳清蛋白)/(mg/g)		
	鲜牛乳	牛初乳	转基因牛乳	乳锭	乳粉	乳珍
α -乳白蛋白	0.734	0.339	0.861	1.71	1.37	12.87
β -乳球蛋白	1.860	3.220	2.374	10.78	9.38	31.78
乳铁蛋白	ND	1.134	2.231	ND	ND	ND

注：ND 表示样品中未检测到乳铁蛋白。

本试验还检测了人乳中乳铁蛋白的含量,从结果(图 2)可以看出,乳铁蛋白在人初乳中含量很高,是牛初乳的 2~3 倍,随着哺乳时间的延长,乳铁蛋白在人乳当中的含量逐渐减小,但仍维持在一个相对较高的水平。

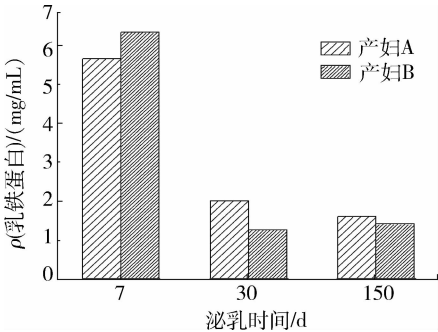


图 2 人乳中乳铁蛋白的质量浓度

Fig. 2 Quantitative analysis of samples

3 结束语

1)本试验利用高效液相色谱法有效分离了 α -Lg、 β -Lg、bLf 和 rLf,经检验该方法回收率和精密度正常,重现性好,且简便可靠。

2)本试验成功的将 bLf 与 rLf 分离,克服了其他分析方法因 2 种蛋白结构相似而不能分离只能单独检测的难点。随着转基因技术的商业化,bLf 与 rLf 的分离和快速检测将具有实际意义。

3)建立的冷冻离心-酸法沉淀的液体乳样品的前处理方法可以有效的提高检测方法的回收率。检测方法可以鉴别市场中牛乳制品的乳清蛋白组成,评

估商品的营养价值。

参 考 文 献

[1] 郭本恒. 乳品化学[M]北京:中国轻工业出版社,2001:246

[2] 管斌,林洪,王广策. 食品蛋白质化学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:303

[3] Patrick C, Van B, Mick M, et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows [J]. Nature Biotechnology,2002,20:484-487

[4] 邢志恩,王军,戴蕴青,等. SDS-PAGE-薄层扫描联用法测定 3 种不同来源的乳铁蛋白[J]. 食品科学,2011,32(16):274-278

[5] 孙毓庆,胡育筑. 分析化学[M]北京:科学出版社,2006:433

[6] Mercier A, Gauthier S F, Fliss T. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests [J]. Int Dairy J, 2004,14(3):175-183

[7] Olieman C, Bedem J. A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder [J]. Netherlands Milk and Dairy Journal,1983,37(1):27-36

[8] Corinna T, Ingolf K, Ulrich K. Precipitation behaviour of caseinomacropeptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC [J]. International Dairy Journal,2006,16(4):285-293

[9] 李慧,陈敏,李贺,等. 反相高效液相色谱法测定乳清蛋白中的 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白[J]. 色谱,2007,25(1):116-117

[10] 李珊珊,王加启,魏宏阳. 乳及乳制品中乳铁蛋白定量测定法 SDS-PAGE 法的建立[J]. 乳品加工,2008,25(9):42-46

[11] 张玉奎. 现代生物样品分离分析方法[M]. 北京,科学出版社,2003:8-9

[12] 王娟,张庆合,王志华,等. 反相高效液相色谱法测定牛奶中的主要蛋白质[J]. 分析化学研究简报,2009,37(11):1667-1670

[13] 唐玲玲,夏明. 高效液相色谱法在蛋白质分离检测中的应用 [J]. 农产品加工,2009(1):89-92

责任编辑:刘迎春