

毛细管区带电泳法(CZE)用于婴儿配方奶粉中骨桥蛋白的分离及含量检测

Capillary zone electrophoresis (CZE) for the separation and detection of osteopontin in infant formula milk powder

张晓霞¹, 唐红梅¹, 王象欣², 陈泓序¹, 罗继¹, 郭立海¹

Xiaoxia Zhang¹, Hongmei Tang¹, Xiangxin Wang², Hongxu Chen¹, Ji Luo¹, Lihai Guo¹

¹ SCIEX, 中国; ² 黑龙江飞鹤乳业有限公司, 中国

¹ SCIEX, China; ² Heilongjiang Feihe Dairy Co., Ltd, China

Key words: CZE, Infant formula milk powder, Osteopontin

1. 引言

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种高度磷酸化的酸性糖蛋白, 分子量从45至75 kDa范围内不等, 牛乳OPN主要有两种亚型, 一个是全长编码翻译, 分子量为60 kDa; 另一个是C端缺失的OPN蛋白, 分子量为40 kDa。OPN具有多种生物、生理和病理活性, 同时OPN还可通过静电或亲和相互作用与乳铁蛋白、乳过氧化物酶和IgM形成复合物为这些免疫调节和抗微生物蛋白转运至其作用位点并保护它们免于蛋白水解。OPN在母乳中含量高达138mg/L, 占乳蛋白总量的2.1%, 被认为是母乳中重要的免疫活性蛋白, 因此, 许多高端婴配粉中都标称添加了OPN, 旨在使配方奶粉“无限接近母乳”, 以满足婴幼儿早期发育的需求。欧盟委员会发布的新条例(EU) 2023/463规定了在婴儿配方奶粉中骨桥蛋白的最大使用量应控制在151 mg/mL以下。因此, 建立一种有效、准确和快速的方法来定量婴配粉中OPN的含量是乳制品质量的保证。

目前报道的关于OPN含量检测的方法包括酶联免疫法(ELISA)¹和液相色谱质谱联用法(LCMS)²等, 其中ELISA因操作简便, 广泛用于母乳中OPN的检测, 可能与其他蛋白发生交叉反应, 导致结果被高估。LC-MS是一种灵敏的、通用的分析物测定方法。然而, 不易直接定量完整OPN, 需要将OPN的两部分酶解成特定肽段后, 通过分析肽段进行定性和定量。王象欣等³开发了HPLC方法检测乳制品中OPN含量, 通过离子交换柱实现乳制品中OPN与其他蛋白的分离与检测。与HPLC相比, 毛细管电泳技术(CE)是一种以高压电

场为驱动力的分离技术, 更适合用于带电的、大极性的蛋白分离和检测。且相较于HPLC, CE具有分离速度快, 操作简便, 分离度高, 试剂消耗量低等多种优势, 已在多种蛋白产品中广泛应用, 如蛋白药物质量研究。乳制品行业也已有多种蛋白的检测方法采用CE技术^{4,5}, 其中CE用于乳清蛋白总量测定、A2-酪蛋白含量测定等方法已在国内外多个标准中收录。

本文利用毛细管区带电泳(CZE)开发了一种乳品中OPN蛋白分离及含量检测方法, 从乳品样品前处理、CZE方法毛细管选择、背景电解质选择等方向进行了方法优化, 并考察了方法的线性和重复性等结果。优化后的方法OPN的峰与乳品中其他蛋白分离度好, 分析速度快, 重复性好、线性良好, 适用于婴儿配方奶粉及其他乳制品中OPN的分离和含量检测。

2. 试剂及方法

2.1 试剂和样品

试剂: 去离子水 (Millipore), 醋酸 (Sigma-Aldrich), 氢氧化钠 (Sigma-Aldrich), 磷酸氢二钠(Sigma-Aldrich), 磷酸二氢钠 (Sigma-Aldrich), 硼酸 (Sigma-Aldrich), 柠檬酸 (Sigma-Aldrich)。

标准品: OPN标准品 (OPN纯度为95%) (Sigma-Aldrich), BSA (Sigma-Aldrich), -乳白蛋白 (Sigma-Aldrich), -lac (Sigma-Aldrich), IgG (Sigma-Aldrich)。

样品: 从超市购买3种不同品牌的1段婴配粉, 分别命名为婴配粉-1, 婴配粉-2, 婴配粉-3。

2.2 试剂及样品溶液制备

2.2.1 背景电解质制备

背景电解质为40 mM pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液，配置方法：
6.1 mL 40 mM 磷酸氢二钠 + 3.9 mL 40 mM 磷酸二氢钠，混合均匀。

2.2.2 标准品溶液制备

OPN标准储备液：精确称取OPN标准品10 mg，添加1 mL水，配制成10 mg/mL的OPN标准储备液。

乳清蛋白混标溶液：分别配制BSA 6.5 mg/mL, α -lac 7.72 mg/mL, β -lac 6.13 mg/mL, 乳铁蛋白 6.76 mg/mL, IgG 5.28 mg/mL及OPN 6.2 mg/mL的单标准品溶液；各个单标分别取50 μ L混合均匀，制成乳清蛋白混标溶液。

2.2.3 样品溶液制备

婴配粉样品溶液：取5 g 婴配粉，加30 mL去离子水溶解后，加入4 mL 500 mM氯化钙溶液混匀。于70℃下水浴20 min，冷却室温。用10%醋酸溶液调整pH至4.4，用水定容至25 mL。10000 g条件下离心10 min。取500 μ L清液于10000 Da超滤管中，4000 g条件下离心20 min，向超滤管中加水定容至500 μ L。取清液作为待测样品溶液。

OPN样品加标溶液：将OPN储备溶液加水分别稀释成6份不同浓度的OPN标准品溶液(稀释8倍, 16倍, 32倍, 64倍, 128倍和256倍)，取900 μ L待测样品溶液加100 μ L稀释后的OPN标准溶液，涡旋混匀，制备成加标OPN终浓度分别为125 μ g/mL, 62.5 μ g/mL, 31.25 μ g/mL, 15.62 μ g/mL, 7.81 μ g/mL, 3.90 μ g/mL的样品加标溶液。

2.3 仪器及方法

SCIEX PA 800 Plus毛细管电泳系统，匹配UV检测器，采集频率：2 Hz，检测波长：214 nm；中性涂层毛细管，50 μ m内径，20/30.2 cm (有效/总长度)；2号狭缝；进样：2 psi, 10 s；分离电压：-10 kV, 20 min；毛细管温度：20℃；样品室温度：10℃。

毛细管冲洗条件：每天分析样品前需要对毛细管进行预冲洗，先用去离子水在20 psi压力下冲洗5 min，再用背景电解质在20 psi压力下冲洗5 min。每针运行前也需要对毛细管进行冲洗，先用去离子水在20 psi压力下冲洗2 min，再用背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗2 min。

3. 结果与分析

3.1 CZE方法优化

3.1.1 背景电解质的选择

比较了40 mM pH7.0的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，40 mM pH7.0的硼酸缓冲液和40 mM pH7.0的磷酸缓冲液作为背景电解质对乳清蛋白标准品混合溶液中各蛋白的分离情况，结果如下图1所示：背景电解质为磷酸盐缓冲液时OPN与其他乳清蛋白的分离效果最好，故最终选择磷酸缓冲液作为背景电解质。

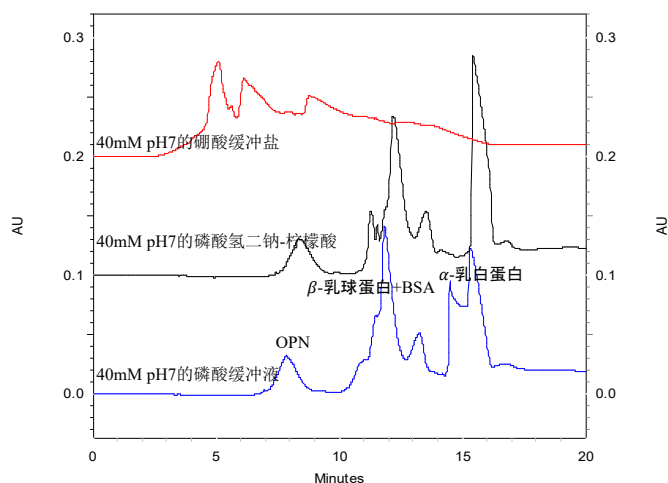


图1. 不同类型背景电解质下乳清蛋白标分离的电泳图

3.1.2 背景电解质pH的优化

确认背景电解质的类型后，进一步优化背景电解质的最佳pH，样品选择OPN标准品和乳清蛋白混标溶液，结果见图2(A)和(B)。图2(A)显示，在pH 6.0或者7.0时OPN标准品峰型更好；图2(B)结果显示pH 7.0时OPN与其他乳清蛋白分离度好，且蛋白分离时间短，所有蛋白在20 min内出峰；当pH 6.0时OPN与其他乳清蛋白分离度最大，但分离时间长；pH 5.0时OPN峰展宽明显。最终确认pH 7.0作为背景电解质的最佳pH值。

3.1.3 样品前处理的优化

奶粉直接用水溶解时发现OPN与其它蛋白分不开，查阅文献发现OPN与奶粉中含量较高的酪蛋白的分离度差，而钙离子的引入，可使钙敏感酪蛋白发生沉淀，同时加热还能使酪蛋白与含有二硫键的乳清蛋白发生交联，减少干扰样液澄清。冷却后调pH值至4.4避免OPN发生沉淀，同时也可使未崩解的酪蛋白胶束进一步沉淀，降低干扰。后经优化最终确认样品前处理条件为：向样品溶液中加入氯化钙溶液，70℃下水浴20 min后冷却至室温，用10%醋酸调至pH 4.4，定容后离心取上清液，然后用10000 Da超滤管超滤，最后用水定容样品即得婴配粉样品溶液，对其进行检测。

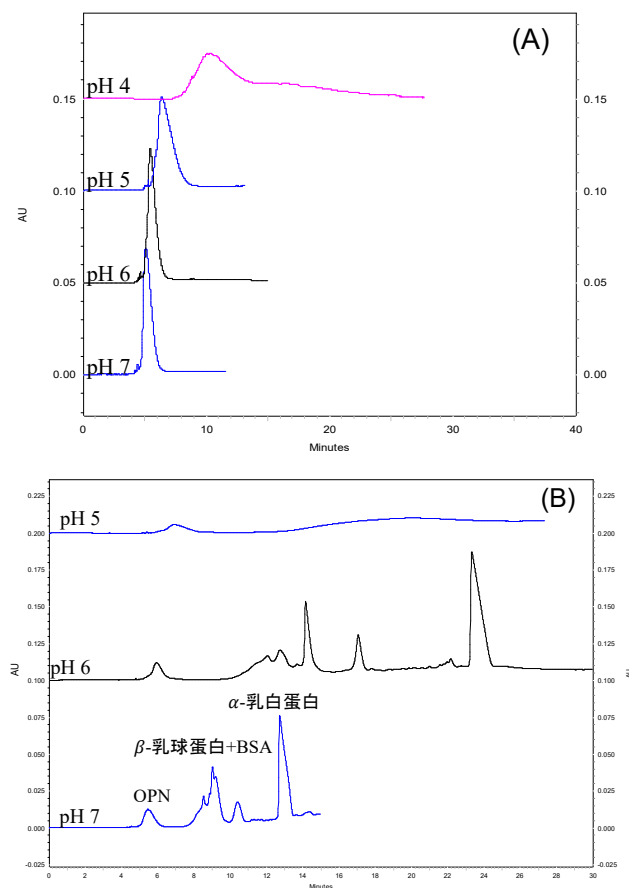


图2. 不同pH条件下OPN标准品和乳清蛋白混标的电泳图。(A)不同pH条件下OPN标准品溶液的电泳图 (B) 不同pH条件下乳清蛋白混标的电泳图

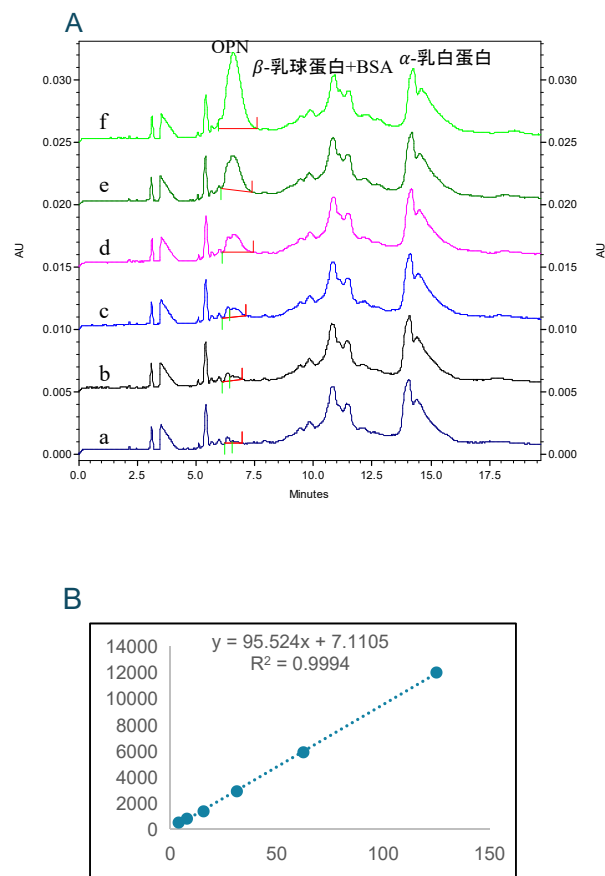


图3. 婴儿配方-3加标不同浓度OPN的加标溶液电泳图谱(A)和标准曲线(B)。图A中a-f分别指OPN浓度为3.90 $\mu\text{g/mL}$, 7.81 $\mu\text{g/mL}$, 15.62 $\mu\text{g/mL}$, 31.25 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 和125 $\mu\text{g/mL}$ 的加标样品溶液电泳图

3.2 方法验证

3.2.1 线性范围

以婴儿配方-3为基质，按照2.2.3中样品加标溶液的制备方式制备一系列OPN样品加标溶液。OPN终浓度分别为3.90 $\mu\text{g/mL}$, 7.81 $\mu\text{g/mL}$, 15.62 $\mu\text{g/mL}$, 31.25 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$, 125.0 $\mu\text{g/mL}$ ，不同浓度对应的电泳图见图3(A)。以OPN浓度为横坐标，校准峰面积为纵坐标绘制标准曲线。标准曲线见图3(B)，标准曲线的 R^2 为0.9994，说明OPN在3.90 $\mu\text{g/mL}$ ~125 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性良好。

3.2.2 重复性

以婴儿配方-3为基质，按照2.2.3中样品加标溶液的制备方式制备OPN浓度为62.52 $\mu\text{g/mL}$ 的样品加标溶液，重复进样6次，计算迁移时间和校正峰面积的重复性。实验结果迁移时间的RSD值为0.09%，校正峰面积的RSD值为1.72%，说明该方法重复性良好。

3.2.3 回收率

以婴儿配方-3为背景基质，按照加标样品处理方法制备OPN终浓度为20 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ 和100 $\mu\text{g/mL}$ 的加标样品，每个浓度平行制备3份，代入线性方程计算OPN的回收率。低、中、高浓度的OPN回收率为82.98%-96%。

3.3 婴儿配方中OPN含量检测

购买的3种婴儿配方按照2.2.3样品溶液制备方法制备成待测样品溶液。另外，取待测样品溶液加标制备成含OPN浓度为125.0 $\mu\text{g/mL}$ 的加标样品溶液。加标样品溶液与样品溶液平行检测，通过加标样品溶液中OPN的出峰位置作为对照确认婴儿配方中OPN的出峰位置。三个样品中OPN含量计算结果见下表。

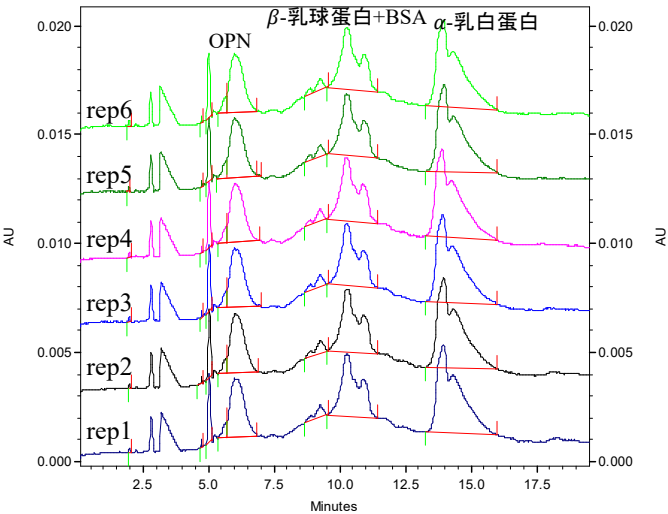


图4. OPN样品加标溶液的电泳图(n=6)

表1. 不同浓度OPN加标样品溶液中OPN的回收率(n=3)

理论浓度(μg/mL)	计算浓度(μg/mL)	回收率(%)
20	16.60	82.98
60	57.59	95.98
100	96.00	96.00

4. 结论

本文开发了一种毛细管区带电泳用于分离和定量检测乳品中骨桥蛋白的方法，通过优化样品前处理条件，毛细管类型，背景电解质的类型和pH等条件，确认了CZE分离骨桥蛋白的最佳条件。用OPN加标样品进行方法学考察，考察了该方法的线性范围，重复性和回收率，结果线性范良好，加标样品中OPN的校准

表2. 不同婴儿配粉中OPN含量检测结果

样品名称	溶液中OPN浓度(μg/mL)	奶粉中OPN含量(mg/100g)
婴儿配粉-1	2.28	27.37
婴儿配粉-2	2.12	25.45
婴儿配粉-3	1.84	22.09

峰面积的重复性好，低、中、高浓度样品回收率符合要求，说明该方法非常适合用于婴儿配粉中骨桥蛋白的分离检测。用该方法对三个婴儿配粉中骨桥蛋白的含量进行了检测，确认婴儿配粉中骨桥蛋白的含量。

5. 参考文献

1. Wang, K. X.; Denhardt, D. T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. Cytokine Growth Factor Rev. 2008, 19 (5-6), 333-345.

2. Hu, B.; Zhang, J.; Jiang, Y.; Tong, W.; Lai, S.; Ren, Y. Quantitative determination of osteopontin in bovine, buffalo, yak, sheep and goat milk by Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and stable isotope dimethyl labeling. Food Chem. 2021, 343, 128489.

3. Wang, X. X; Cui, D.Y; Qu, X.Y; You, H. Analytical Ultracentrifugation-Calibrated Anion-Exchange Chromatography for Sensitive and Intact Determination of Osteopontin in Infant Formula and Dairy Products. J. Agric. Food Chem. 2023, 71, 13880-13888.

4. SCIEX Technote, 毛细管区带电泳方法对乳制品中A2-酪蛋白含量的测定, RUO-MKT02-10644-ZH-B

5. SCIEX Technote, CE-SDS方法对婴儿配方奶粉中乳清蛋白的定量分析, RUO-MKT-02-7649-ZH-B

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-33548-A