

分析与测试

基于水解氨基酸-同位素稀释质谱法的
酪蛋白磷酸肽特征肽段纯度定值研究

徐琪, 李玲, 杨梦瑞*, 周剑, 李付凯, 李亮

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 农业农村部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081)

摘要:针对酪蛋白磷酸肽特征肽段 YKVPQLEIVPNpSAEER, 建立了基于水解氨基酸-同位素稀释质谱法(AA-LC-IDMS/MS)的纯度定值方法。重点表征了特征肽段原料分子量、氨基酸序列等结构信息, 优化了肽段氨基酸水解条件, 讨论了空间位阻对水解效率的影响。选取脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸以及异亮氨酸这 4 种氨基酸, 运用建立的 AA-LC-IDMS/MS 方法, 对酪蛋白磷酸肽特征肽段原料展开纯度定值。结果表明, 基于 4 种不同氨基酸的肽段定值结果一致性良好, 定值准确可靠, 最终肽段的定值结果为 (0.916 ± 0.016) g/g。该方法的建立, 为下一步特征肽段标准物质研制及酪蛋白磷酸肽的准确测量奠定了基础。

关键词:酪蛋白磷酸肽; 特征肽段; 水解氨基酸同位素稀释质谱法; 纯度; 定值

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2025)03-0077-08

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0427

Purity Measurement of Specific Peptide Segment of Casein Phosphopeptides Using Amino Acid-Based Isotope Dilution Mass Spectrometry XU Qi, LI Ling, YANG Meng-rui*, ZHOU Jian, LI Fu-kai, LI Liang (Key Laboratory of Agro-food Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A determination method of purity based on hydrolysed amino acid-isotope dilution mass spectrometry (AA-LC-IDMS/MS) was established for the casein phosphopeptide with specific peptide segment of YKVPQLEIVPNpSAEER. The structural information, such as molecular weight and amino acid sequence of the specific peptide segment of raw materials was focused. The hydrolysis conditions of peptide segment amino acids were further optimized, and the influence of spatial resistance on the hydrolysis efficiency was also discussed. Four kinds of amino acids, including proline, valine, leucine, and isoleucine, were selected to determine the purity of the casein phosphopeptide with specific peptide segment by the established AA-LC-IDMS/MS. The results showed that the accurate and reliable determinations of peptide segment based on four different amino acids were obtained with a good consistency, and the value was ultimately assigned to be (0.916 ± 0.016) g/g. The determination method would lay a foundation for the preparation of certified reference of the specific peptide segment and the accurate measurement of casein phosphopeptides.

Key words: casein phosphopeptides; specific peptide segment; hydrolyzed amino acid isotope dilution mass spectrometry; purity; characterization

酪蛋白磷酸肽 (Casein phosphopeptides, CPPs) 是源于酪蛋白, 经特定蛋白酶水解得到的含聚簇磷酸丝氨酸、可提高矿物质生物利用率的生物活性肽。相关研究显示, 其生物活性的核心结构为-SerP-SerP-Glu-Glu- (其中 Ser 代表丝氨酸, Glu 代表谷氨酸, P 代表磷酸基)^[1,2], 该结构中磷酸丝氨酸残基 (-Ser(P)-) 呈聚簇状态且带有众多负电荷, 能够在小肠 pH 处于中性或弱碱性的环境下, 有效阻止钙形成磷酸钙沉淀, 进而促进

钙在小肠内的吸收^[3-5]。此外, 酪蛋白磷酸肽可应

收稿日期: 2024-10-08; 修回日期: 2024-12-03

基金项目: 国家重点研发计划项目课题“绿色投入品抗致病因子生物活性评价计量技术和标准物质研究”(2023YFF0724503); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2024-IQSTAP)。

作者简介: 徐琪 (1999-), 女, 山东枣庄人, 硕士生, 主要研究方向为食品安全风险与评估。

通讯作者: 杨梦瑞, E-mail: yangmengrui2014@163.com。

用于各类营养与保健食品当中,对人体吸收和利用钙、铁、锌等二价矿物营养素起着切实有效的促进作用。此外, CPPs 还具有抗龋齿^[6-8]、增强精卵结合受精^[9-11]、抗氧化、免疫调节、抗辐射潜力、促肿瘤细胞凋亡^[12,13]以及促进尿酸降低等功能。

CPPs 是酪蛋白酶解后含成簇磷酸丝氨酸氨基酸序列的一类多肽的总称,因此, CPPs 组成复杂、检测难度较大、结果准确性不高。常见的检测方法包括氯化钡-乙醇沉淀法、高效毛细管电泳法(HPCE)、高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS/MS)、高效液相色谱法(HPLC)以及酶联免疫吸附测定法(ELISA)等^[14-16]。然而,这些方法在准确度、抗杂质干扰能力以及特异性等方面存在一定局限性。特征肽段指某一类蛋白质或者多肽所特有的能够将其与其他蛋白质特异性区分的肽段序列,在蛋白质组学研究中可作为区分物种属性的生物标志物^[17,18]。蛋白质经过特定酶酶解后结合蛋白质氨基酸序列筛选出特征肽段,基于特征肽段检测来实现目标蛋白质定性和定量分析已成为蛋白质或者多肽间接准确测量的一种新方法^[19]。根据文献[20]检索报道,酪蛋白磷酸肽经过动物源酶酶解后获得的肽段 YKVPQLEIVNP₃SAEER,具有检测特异性,通过特征肽段测量可以实现对酪蛋白磷酸肽的定量测定,利用该特异性肽段进行 CPPs 的检测具有准确性高、一致性好的应用效果^[21,22]。目前,该方法已立项 CPPs 的食品安全国家标准,但缺乏相应的标准物质作为标准实施的技术支撑。

标准物质作为“砝码”对提高测量水平,保证测量结果准确、可靠非常关键。CPP 特征肽段纯度有证标准物质的研制,对提高酪蛋白磷酸肽测量准确性,建立结果计量溯源性,推动相关检测标准有效实施尤为重要与迫切。多肽纯度准确定值是建立多肽测量溯源性与相关标准物质研制的基础。多肽纯度测量主要包括质量平衡法^[23-25]、同位素稀释质谱法^[26-29]、定量核磁法^[30]、元素分析法^[31]等。质量平衡法属于一种间接测定主成分纯度的方法,其原理是减去有机结构类似的杂质、水分、挥发性溶剂以及无机元素等。何程铖^[32]曾运用质量平衡法对高纯度牛血清白蛋白和转铁蛋白的纯度进行评估。同位素稀释质谱技术以多肽水解为氨基酸为基础原理,选取同位素标记的氨基酸作为内标进行质谱测量,该技术被视作一种高准确度定量多肽和蛋白质的方法,能够溯源到

国际单位制(SI)单位,因此在标准物质定值得到广泛应用。Yan 等^[33]使用水解氨基酸同位素稀释质谱技术定值牛乳铁蛋白的纯度,评估结果可根据已有的氨基酸纯度标准物质溯源至 SI 单位。通过核磁共振技术(qNMR),可快速准确地定量分析化合物,Bradley 等^[34]设计了针对蛋白质浓度测量的新 qNMR 方法,具有用量少、快速、高准确性等优点。另外,对于包含半胱氨酸残基的多肽,可以利用 ICP-MS 测定硫含量来实现对待测样品的绝对定量。陆艳丽^[35]在研究中开发了一种基于硫元素测定的微管相关蛋白-tau 蛋白的准确定量实验方法,成功地确定了对 tau 蛋白的定值。

本研究针对固相合成获得的特征肽段(YKVPQLEIVNP₃SAEER)纯品原料定性鉴定后,采用水解氨基酸同位素稀释质谱法测定,研究重点在于优化水解液的酸度、温度和时间等条件,比较了不同氨基酸对测量结果的影响,同时进行了方法学研究。最终成功构建了基于水解氨基酸-同位素稀释质谱技术的酪蛋白磷酸肽特征肽段纯度定值方法。本研究将酪蛋白磷酸肽特征肽段作为研究对象,采用水解氨基酸同位素稀释质谱法进行定值,为特征肽段标准物质的研制提供了技术支撑。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

AB Triple QUAD 4500 型液质联用质谱仪、Triple TOF 6600 型高分辨飞行时间质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);LC-20 AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);AL104 型分析天平、XS105 型分析天平(瑞士 Mettler 公司);EFAA-DC24-RT 型氮吹仪(上海安谱实验科技股份有限公司);Touch mixer MT-51 型涡旋振荡仪(日本 Yamato 公司);D2012plus 型高速离心机(美国 SCILOGEX 公司);OKFKJ-2 型氢氧焰安瓿瓶熔封机(湖南沃克能源科技有限公司)。

CPP 特征肽段 YKVPQLEIVNP₃SAEER 纯品原料(中国南京金斯瑞生物科技有限公司);国家有证标准物质缬氨酸 GBW(E) 100055(纯度 97.8%~101%)、脯氨酸 GBW(E) 100084(纯度 98.4%~101.4%)、异亮氨酸 GBW(E) 100057(纯度 97.9%~100.9%)、亮氨酸 GBW(E) 100058(纯度 97.9%~100.9%)(中国计量科学研究

院);缬氨酸标记物($U-^{13}C_5$,纯度为 99%; ^{15}N ,同位素丰度为 99%)、脯氨酸标记物($U-^{13}C_9$,纯度为 99%; ^{15}N ,同位素丰度为 99%),异亮氨酸标记物($U-^{13}C_6$,纯度为 99%; ^{15}N ,同位素丰度为 99%)(美国剑桥同位素实验室);亮氨酸标记物(D_3 ,氘代率为 99.93%,纯度为 96%~100%,加拿大 Toronto Research Chemicals 公司);其他试剂均为色谱纯。

1.2 实验方法

1.2.1 液相纯度分析

取 1 mg 酪蛋白磷酸肽特征肽段样品溶于 1 mL 纯水中,混匀后待测。

色谱条件:色谱柱为 Eclipse Plus C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 A 为体积分数是 0.05%的三氟乙酸-水混合溶液;流动相 B 为体积分数是 0.05%的三氟乙酸-乙腈混合溶液;梯度洗脱程序:0~25 min, 5% B; 25~25.01 min, 5%~65% B; 25.01~27 min, 95% B; 27~27.01 min, 95%~5% B; 27.01~35 min, 5% B。流速 1 mL/min, 进样量 10 μL , 洗脱时间 35 min。紫外检测器波长 220 nm。

1.2.2 质谱定性分析

色谱条件:Acquity UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);柱温:25 $^{\circ}C$;流动相 A:体积分数是 0.1%的甲酸水溶液,流动相 B:乙腈溶液;流速:0.4 mL/min;进样体积:5 μL 。梯度洗脱程序:0~5 min, 2% B; 5~15 min, 2%~98% B; 15~17 min, 98% B; 17~17.1 min, 98%~2% B; 17.1~20 min, 2% B。

质谱条件:质谱采用热电喷雾离子源,正离子模式,全扫描模式,AGC target: 3×10^6 ;扫描范围:50~4 000 m/z ;分辨率: 7×10^4 FWHM;最大积分时间:100 ms;喷雾电压:3 000 V;毛细管温度:320 $^{\circ}C$;气化温度:300 $^{\circ}C$,鞘气流速:40 arb; S-lens 电压:55 V;辅助气流速:12 arb;辅助气加热温度:300 $^{\circ}C$ 。MS2 分辨率: 7×10^4 FWHM;自动增益控制目标值: 1×10^5 ;最大积分时间:50 ms;隔离窗口:4.0 m/z ; NCE:30%。

1.2.3 定值分析

氨基酸综合标准液配制:将脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸样品精确称取至百万分之一的天平中,然后置于深褐色玻璃瓶内。注入 0.1 mol/L 盐酸水溶液,充分振荡深褐色玻璃瓶以完全溶解样品,制备出分别为 0.118 0、0.120 0、0.067 2 和

0.067 2 mg/g 浓度的混合标准液。将预先混合好的氨基酸标准溶液倒入小瓶中,置于温度为 -20 $^{\circ}C$ 的冰箱储存。

同位素标记的氨基酸混合标准溶液配制:用百万分之一天平准确分别称取脯氨酸标记物、缬氨酸标记物、亮氨酸标记物和异亮氨酸标记物样品置于棕色玻璃瓶中,并加入采用 0.1 mol/L 盐酸水溶液,通过彻底震荡棕色玻璃瓶以实现完全溶解,配制成浓度分别为 0.125 1、0.127 2、0.068 和 0.070 3 mg/g 的同位素标记的氨基酸混合标准溶液。将预先混合好的氨基酸标准溶液倒入小瓶中,置于温度为 -20 $^{\circ}C$ 的冰箱储存。

准确称量 50 mg CPP 特征肽段水溶液及 50 mg 氨基酸标记物工作液,倒入干净安瓿瓶内,混匀后加入 1 mL (6 mol/L) 盐酸水溶液,充分混合。随后持续通入氮气至安瓿瓶内约 40 s 以排除空气,随即使用热封机对安瓿瓶进行即时热熔封。样品熔封后置于 150 $^{\circ}C$ 的烘箱中水解 48 h,水解结束后,取出样品进行氮吹干燥,随后使用 1 mL (0.1 mol/L) HCl 重新溶解样品,搅拌均匀后采用 0.22 μm 滤膜过滤至进样小瓶,进行后续仪器分析。

色谱条件:KINETEX C18 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 2.6 μm);流动相 A 为体积分数是 0.2%的甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈;流速为 0.3 mL/min;样品进样量为 1 μL ,等度洗脱程序为 $V(A):V(B)=98:2$,洗脱时间为 5 min。

质谱条件为电喷雾正离子模式,采用多反应监测扫描 (MRM);离子源电压 5 500 V;离子源温度 550 $^{\circ}C$;雾化器压力 379.21 kPa;辅助气压力 379.21 kPa;气帘气压力 241.32 kPa;离子驻留时间 100 ms。MRM 监测离子对信息为脯氨酸 (116.3>70.0)、脯氨酸- $^{13}C_9$ (125.1>70.2),缬氨酸 (118.3>72.3)、缬氨酸- $^{13}C_5$ (123.2>72.1),异亮氨酸 (132.2>86.3)、异亮氨酸- $^{13}C_6$ (138.0>86.1),亮氨酸 (132.1>86.2)、亮氨酸- D_3 (135.1>89.1)。

采用公式(1)进行结果计算。

$$C = (m_{L样} \times I_{L样} \times I_{X样} \times m_{N标} \times M) / (I_{N标} \times I_{L样} \times m_{L标} \times n \times M_{AA} \times m) \quad (1)$$

式中, C 为样品中 CPP 特征肽段的纯度, g/g; $m_{L样}$ 为样品溶液中标记的氨基酸的质量, g; $m_{L标}$ 为标准溶液中标记的氨基酸的质量, g; $m_{N标}$ 为标准溶液中氨基酸的质量, g; $I_{X样}$ 为样品溶液中氨基酸的峰面积; $I_{L样}$ 为样品溶液中标记的氨基酸的峰面积; $I_{L标}$ 为标准溶液中标记的氨基酸的峰面积; $I_{N标}$ 为标准溶液中氨基酸的

峰面积; M_{AA} 为 CPP 特征肽段的相对分子质量; n 为 CPP 特征肽段中含有该氨基酸的个数; M_{AA} 为该氨基酸的相对分子质量; m 为 CPP 特征肽段样品称样量, g。

2 结果与讨论

2.1 液相纯度测定

通过高效液相色谱面积归一化法对 CPP 特征肽段原料纯度进行检测, 结果如图 1 所示, CPP 特征肽段液相纯度为 99.24%, 可以使用水解氨基酸同位素稀释质谱法对 CPP 特征肽段进行定值分析。

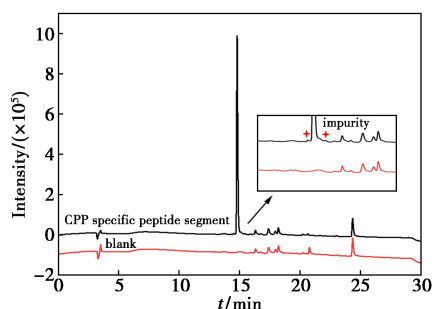


图 1 CPP 特征肽段样品色谱图

Fig.1 Chromatogram of specific peptide segment of CPP

2.2 质谱定性分析

利用高分辨率质谱法对固相合成获得的 CPP 特征肽段样品进行定性分析。结果如图 2 所示, 检测到质荷比 m/z 为 1 953.1、976.5 和 651.3 这 3 个典型离子, 分析可知 $m/z = 1\ 953.1$ 为 YKVPQLEIVPNpSAEER 的分子离子峰, $m/z = 976.5$ 和 $m/z = 651.3$ 分别 CPP 特征肽段多电荷离子 $[M+2H]^{2+}$ 、 $[M+3H]^{3+}$ 。同时也检出 $m/z = 1\ 302.3$ 的质谱峰。对主要未知峰 $m/z = 1\ 302.3$ 进行分析, 认为其可能是 $[2M+3H]^{3+}$ 聚物质谱峰, 其他响应较低的峰为特征肽段经 ESI 源电离后的碎片峰。此外, 采用二级质谱测定肽段氨基酸序列, 结果如图 3 所示。经过分析得到的二级碎片信息与 CPP 特征肽段 YKVPQLEIVPNpSAEER 一一对应。

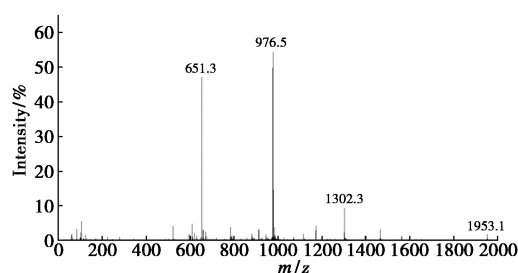


图 2 CPP 特征肽段样品的高分辨质谱图

Fig.2 High-resolution mass spectra of specific peptide segment of CPP

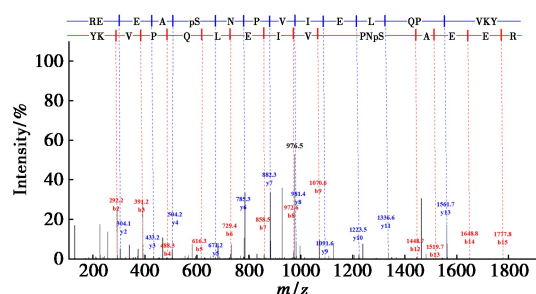


图 3 CPP 特征肽段样品的 b,y 离子和氨基酸序列对应图

Fig.3 Corresponding map of b,y ions and amino acid sequences of specific peptide segment of CPP

2.3 前处理优化与 LC-MS/MS 方法测定

2.3.1 前处理优化

目前, 氨基酸水解与同位素稀释质谱技术相结合是对蛋白质和多肽进行准确度定量的主要方法。氨基酸的种类众多, 在定量中通常主要用到脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸等^[36]。从氨基酸序列 YKVPQLEIVPNpSAEER 来看, 缬氨酸和脯氨酸各有两个, 异亮氨酸和亮氨酸各有一个, 选取这 4 种氨基酸进行定量分析能够增强测定的准确性并且具有代表性。为实现准确测定, 肽段需要充分水解, 而酸的使用量、水解温度以及水解时间通常是影响水解效率的关键要素。所以, 本研究把重点放在对这 3 个因素的优化上, 以提升水解条件。根据文献^[37]报道, 蛋白质通常以 6 mol/L 盐酸水解为主, 本研究采用相同浓度的盐酸, 研究了 0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mL 等不同用量对水解产率的影响, 具体数据详见图 4a。根据图 4a 的数据显示, 加入不同量的盐酸水溶液对水解效果影响较小, 当添加 1 mL (6 mol/L) 盐酸水溶液时, 水解效果最佳。然而, 缬氨酸和异亮氨酸的水解效率较为有限。同时, 对肽段在 110~170 °C 的温度区间内的水解效率进行了研究, 具体结果可参考图 4b。温度达到 130 °C 时, 缬氨酸和异亮氨酸的水解效率仍低, 与脯氨酸和亮氨酸相比, 缬氨酸 (V) 和异亮氨酸 (I) 可能未完全水解。据文献^[38,39]指出, 氨基酸排列顺序对水解效果至关重要。当脂族氨基酸位于支链上时, 可能产生位阻, 从而影响水解效率。脂肪族氨基酸间的化学键, 例如 I—I、V—V、I—V 之间的肽键, 很难被水解。经过对比分析, 发现在目标特征肽段中也有 I—V 的氨基酸残基结构存在, 因此选择通过升高温度来增强水解的效率。从图 4b 可以观察到, 在温度升至 150 °C 之后, 4 种氨基酸的

水解效能都已经接近平衡状态,因此最终决定以 150℃ 作为最佳的水解温度。除此之外,还研究了水解时间对结果的影响,具体结果可参见图 4c。经过 48 h 的水解,其效率达到了顶峰,因此,48 h 可以被视为特征肽段中 4 种氨基酸得到充分水解的最佳时间。

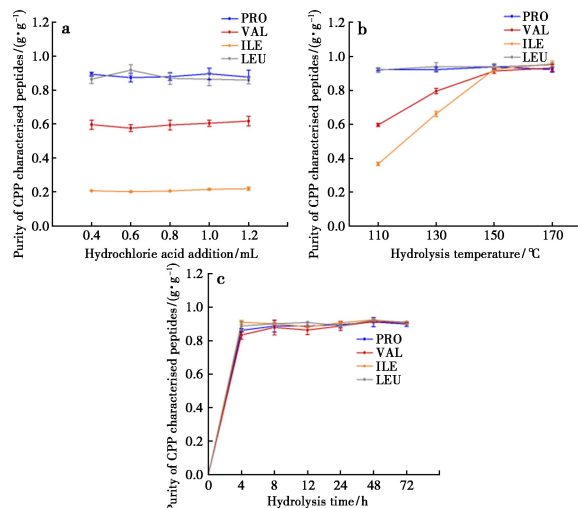


图 4 盐酸添加量(a)、水解温度(b)和水解时间(c)对 CPP 特征肽段样品中氨基酸水解效率的影响

Fig.4 Effects of additive amount of hydrochloric acid (a), hydrolysis temperature (b) and hydrolysis time (c) on the hydrolysis efficiency of amino acids in specific peptide segment of CPP

2.3.2 LC-MS/MS 方法优化

为了确保目标氨基酸能够做出良好的响应,对氨基酸和同位素标记的氨基酸质谱条件进行了优化。在对目标物进行电离模式的扫描时,观察到目标氨基酸在正离子模式下容易获得电子,从而形成稳定的准分子离子峰,因此,本次实验选择了正离子模式进行扫描。通过对各种氨基酸离子碎片的扫描,确定了相应的离子对,以便进行定性和定量分析。在多重反应监测模式(MRM)的指导下,进一步对去簇电压(DP)和碰撞能(CE)进行了优化,确保氨基酸在质谱分析中展现出优良响应。流动相的 pH 对氨基酸的保留时间以及不同氨基酸之间的分离度有着显著的影响。在之前的实验研究基础上,选择了体积分数是 0.2% 的甲酸水溶液和乙腈作为流动的相对目标氨基酸进行洗脱处理。为了最大化氨基酸的分离效果,对体积分数是 0.2% 的甲酸溶液与乙腈的比例进行了调整和优化。研究结果显示,在体积分数是 0.2% 的 $V(\text{甲酸水}) : V(\text{乙腈}) = 98 : 2$ 、流速为 0.3 mL/min 的条件下,质谱的反应更为明显,色

谱的分离效果也更为出色,达到了最优效果。图 5a、5b 呈现了氨基酸标准溶液与样本水解后氨基酸的 LC-MS/MS 结果。

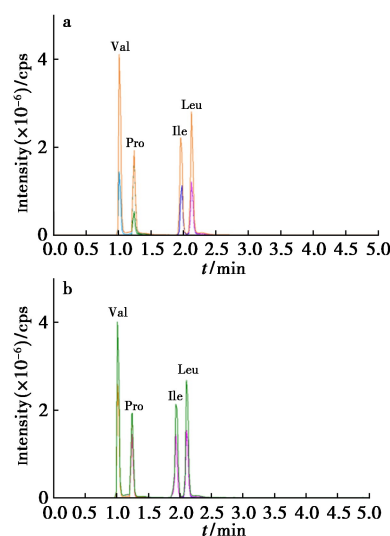


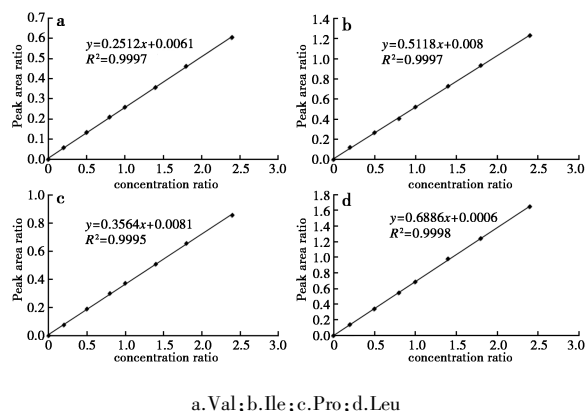
图 5 标准溶液(a)与 CPP 特征肽段水解成氨基酸的样品(b)中氨基酸及其同位素内标的 LC-MSMS 质谱图

Fig.5 LC-MSMS mass spectra of amino acids and their isotopic internal standards in a standard solution (a) and in the specific peptide segment fragments of CPP (b)

2.4 方法学评价

2.4.1 线性考察

制备了浓度为 10、25、40、50、70、90、120 mg/g 的氨基酸标准溶液系列,并在每一种标准溶液中加入 50 mg 的同位素内标。使用 AA-LC-IDMS/MS 方法进行了测定。根据测得的峰面积比(y)和质量浓度比(x)的数值,绘制标准曲线,并将其拟合成图 6 所示的曲线。研究结果揭示,所有氨基酸的线性相关系数都超过了 0.999,这表明该测量方法适用于浓度在这一范围内的样本含量分析。



a. Val; b. Ile; c. Pro; d. Leu

图 6 氨基酸标准曲线

Fig.6 Amino acid standard curve

2.4.2 重复性和精密度评价

平行称量 3 份样品,充分水解后用 LC-IDMS/MS 法准确测定 4 种目标氨基酸,每份样品测 3 次取平均值为测定结果,再由氨基酸测定结果算特征肽段纯度。由表 1 可知,各测量结果的标准偏差不超过 2%,表明其精密度较为良好。

表 1 AA-LC-IDMS/MS 对 CPP 特征肽段纯度的定值结果

Tab.1 Determination of the purity of specific peptide segment of CPP by AA-LC-IDMS/MS

Name	Sample	Purity/ (g·g ⁻¹)	Average/ (g·g ⁻¹)	SD/ %	RSD/ %
Val	1	0.919	0.916	0.67	0.73
	2	0.920			
	3	0.908			
Pro	1	0.893	0.905	1.61	1.78
	2	0.923			
	3	0.898			
Ile	1	0.920	0.925	0.57	0.61
	2	0.931			
	3	0.923			
Leu	1	0.924	0.921	0.36	0.39
	2	0.917			
	3	0.922			

2.4.3 基质效应评价

本研究开展了基质效应考察,将空白水解液按照水解 CPP 特征肽段的方法进行水解模拟,实验结束后向其中添加与标准溶液相同浓度的氨基酸及其内标,按照优化后的 LC-MS/MS 方法上机检测,通过比较水解氮吹复溶后的氨基酸和标准溶液中离子峰面积,进而计算二者的比值,以此来考察样品的基质效应。如表 2 所示,各氨基酸及其同位素内标的 ME 值均接近等于 1,说明基质效应影响可以忽略不计。

表 2 AA-LC-IDMS/MS 对 CPP 特征肽段纯度的定值结果

Tab.2 Determination of the purity of specific peptide segment of CPP by AA-LC-IDMS/MS

Characteristic quantity	Peak area of standard solution (A)	Hydrolysed amino acid peak area (B)	ME=B/A
Val	1 382 049	1 368 618	0.99
Val(U- ¹³ C ₅)	3 583 311	3 897 939	1.09
Pro	2 256 903	2 217 685	0.98
Pro(U- ¹³ C ₉)	4 086 631	4 192 645	1.03
Ile	3 641 854	3 818 074	1.05
Ile(U- ¹³ C ₆)	5 081 578	5 903 757	1.16
Leu	4 485 162	4 425 200	0.99
Leu(D ₃)	5 402 312	5 627 239	1.04

2.4.4 检出限和定量限

将水解后特征肽段样品溶液按优化后的液相色谱同位素稀释质谱法上机检测,根据质谱图得到该浓度的信噪比,通过计算得出 3 倍信噪比和 10 倍信噪比下对应的各种氨基酸的浓度,结果见表 3。

表 3 氨基酸的检出限与定量限

Tab.3 Limit of detection and quantification of amino acids

Amino acid	LOD/(μg·kg ⁻¹)	LOQ/(μg·kg ⁻¹)
Val	16.65	55.46
Pro	14.78	49.21
Ile	2.78	9.26
Leu	8.41	28.00

2.5 定值结果

平行准确称取 6 份样品,采用建立的水解氨基酸-同位素稀释质谱法测定,每个样品平行测定 3 次,基于测定的氨基酸含量,根据公式(1)计算 CPP 特征肽段纯度,定值结果见表 4。

表 4 AA-LC-IDMS/MS 对 CPP 特征肽段的定值结果

Tab.4 Determination of the specific peptide segment of CPP by AA-LC-IDMS/MS

Number(n=6)	1	2	3	4	5	6
Val	0.906 0	0.914 0	0.915 0	0.927 0	0.929 0	0.915 0
Pro	0.927 0	0.923 0	0.916 0	0.915 0	0.917 0	0.912 0
Ile	0.897 0	0.913 0	0.917 0	0.911 0	0.912 0	0.900 0
Leu	0.925 0	0.920 0	0.921 0	0.918 0	0.919 0	0.922 0
AA-LC-IDMS/MS/(g·g ⁻¹)	0.913 8	0.917 5	0.917 3	0.917 8	0.919 3	0.912 3
Overall average/(g·g ⁻¹)	0.916 0					
SD/(g·g ⁻¹)	0.008 0					

针对上述测定结果,进行统计分析,采用 Dixon 检验定值结果中的异常值,科克伦检验平均值的一致性。

首先针对各氨基酸定值结果的异常值展开 Dixon 检验。其结果如表 5 所示。

表 5 AA-LC-IDMS/MS 对 CPP 特征肽段的定值结果

Tab.5 Determination of the specific peptide segment of CPP by AA-LC-IDMS/MS

	Val	Pro	Ile	Leu	AA-LC-IDMS/MS
r ₁	0.381	0.273	0.188	0.250	0.273
r _n	0.133	0.333	0.235	0.500	0.273

依据数值从小到大的顺序对测定结果予以排序。

$$x_{(1)} \leq x_{(2)} \leq \cdots \leq x_{(n-1)} \leq x_{(n)}$$

当 $n=6$ 时,

$$r_1 = (x_{(2)} - x_{(1)}) / (x_{(n-1)} - x_{(1)})$$

$$r_n = (x_{(n)} - x_{(n-1)}) / (x_{(n)} - x_{(2)})$$

由 Dixon 检验可知,各氨基酸测定结果的 r_1 和 r_n 均小于 $f_{(0.05,6)} = 0.560$,表明各氨基酸测量结果均通过检验,均无异常值,测量结果保留。

采用科克伦检验各氨基酸定值结果平均值的一致性。

计算公式如公式(2)所示。

$$C = \left[\sum_{i=1}^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 / (k\bar{x}^2) \right] \quad (2)$$

根据科克伦检验计算公式,可得出结果为 0.425,在自由度为 3,显著性水平 $\alpha = 0.05$ 的情况下,科克伦检验的临界值大致为 0.481。鉴于该测定结果 < 0.481 这一临界值,所以在显著性水平 $\alpha = 0.05$ 的情况下,这 4 组数据的方差具有一致性,这也就表明各氨基酸测量结果的平均值呈现出一致性。因此,取 Val、Pro、Ile、Leu 的定值结果平均值 0.916 g/g,作为该方法的最终定值结果,标准偏差为 0.008 0 g/g。

3 结论

本研究针对 CPP 特征肽段 YKVPQLEIVNP-SAEER 进行了定值探究,着重对水解条件予以优化,实施了方法学考察,构建了基于 4 种氨基酸的水解氨基酸同位素稀释质谱法。基于 4 种不同氨基酸的肽段定值结果具有良好的一致性,定值准确且可靠,最终肽段的定值结果是 (0.916 ± 0.016) g/g。此外,这里的 0.016 仅考虑了重复性引入的分量。该方法的构建,为后续特征肽段标准物质的研制打下了基础。

参考文献:

- [1] Wang Q Q, Du J, Feng F Q. *J. Food Saf. Qual.*, 2022, **13**(5):1 438-1 443.
王倩倩,杜鹃,冯凤琴.食品安全质量检测学报,2022, **13**(5):1 438-1 443.
- [2] Jiang C X, Quan W, Chen J, He L J. *Sci. Technol. Food Ind.*, 2021, **42**(18):292-299.
姜春秀,全威,陈洁,贺来健.食品工业科技,2021, **42**(18):292-299.
- [3] Michihiro N, Teruaki M, Komei I, Hidehiko I. *Allergol. Int.*, 2023, **72**(3):488-490.
- [4] Ying W, Hua S B, Song J W, Rui X W, Zhan Z W. *Food Chem.*, 2022, **401**:134 218.
- [5] Lan J, Shu H L, Nan W, Shuang Z, Yue C. *Food Chem.*, 2021, **352**:129 332.
- [6] Mathie T, Barbara D, Camille D, Aurélie M, Audrey R, Julie R, Audrey B, Rozenn R, Christophe F, Benoit C. *Food Res.Int.*, 2022, **157**:11 360.
- [7] Sima B, Zahra S, Sadat S M H T, Abolfazl H, Majid D. *J. Drug Deliv.Sci.Technol.*, 2023, **86**:104 680.
- [8] Widyarman A S, Udawatte N S, Theodorea C F, Apriani A, Richi M, Astoeti T E, Seneviratne C J. *J. Dent.*, 2021, **106**(5):103 582.
- [9] Olumeeshabon Z, Boehmer J L. *J. Proteome Res.*, 2013, **12**(6):3 034.
- [10] Kitamura H. *Milchwiss*, 2002, **57**(11):611-614.
- [11] Donida B M, Mrak E, Gravaghi C, Villa I, Cosentino S, Zacchi E, Perego S, Rubinacci A, Fiorilli A, Tettamanti G, Ferraretto A. *Peptides*, 2009, **30**(12):2 233.
- [12] Bansal A, Ingle N A, Kaur N, Ingle E. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent*, 2015, **5**(5):341.
- [13] Chandak S, Bhondey A, Bhardwaj A, Pimpale J, Chandwani M. *J. Int. Soc. Prev. Commun. Dent*, 2016, **6**(5):423-429.
- [14] Shao Q, Wei L N, Zhang D L, Zhang L R, Wang W, Qu Y F. *Food Res.Dev.*, 2019, **40**(3):220-224.
邵琪,魏丽娜,张东丽,张丽茹,王为,屈岩峰.食品研究与开发,2019, **40**(3):220-224.
- [15] Wang Z Q, Tang H, Liu Y, Li J L. *Mod. Food*, 2022, **28**(1):205-208.
王泽琪,唐辉,刘洋,李金龙.现代食品,2022, **28**(1):205-208.
- [16] Li S Q, Bao R, Li R, Jiang Z T. *Food Res. Dev.*, 2021, **42**(14):132-137.
李书启,包荣,李荣,姜子涛.食品研究与开发,2021, **42**(14):132-137.
- [17] Hettinga K A, Reina F M, Boeren S, Zhang L, Koppelma G H, Postma D S, Vervoort J J M, Wijga A H. *PLoS One*, 2015, **10**(3):e0122 234.
- [18] Wei X L, Mohan L, Xue Y C, Hong J H, Fan H K, Xi Q Y. *Food Res.Int.*, 2020, **127**(C):108 741.
- [19] Eva B, Eduard S. *Proteom*, 2017, **17**(17/18):1 700 180.
- [20] Zhou Y. Optimization of the Detection Method of Casein Phosphopeptides in Milk Powder. Heilongjiang: Heilongjiang University, 2018.
周原.乳粉中酪蛋白磷酸肽检测方法的优化.黑龙江:黑龙江大学,2018.
- [21] Gabriella P, Simonetta C, Maria A N, Rosalba M, Marina C, Antonio P, Gianni P, Lina C, Francesco A. *Food Res. Int.*, 2013, **53**(1):510-521.
- [22] Hu Z W, Wang Z M, Liu Y, Wu Y, Han X J, Zheng J, Yan X F, Wang Y. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, **63**(41):8 999.

- [23] Epshtein N A. *Pharm. Chem. J.*, 2018, **51**(10): 928-937.
- [24] Xiao B J, Ting T W, Yuan H D, Lei Y. *Appl. Catal. A*, 2017, **541**: 107-111.
- [25] Tahoun I F, Shehata A B. *Mapan*, 2016, **31**(2): 145-152.
- [26] Wang X X, Wu L Q, Yang B, Zhang N, Su P, Yang Y. *Biotechnol. Prog.*, 2020, **10**(6): 597-606.
王仙霞, 武利庆, 杨彬, 张宁, 苏萍, 杨屹. 生物技术进展, 2020, **10**(6): 597-606.
- [27] Caroline P, Frank A T, Chris H, Milena Q, Gavin O C. *Anal. Biochem.*, 2011, **412**(1): 40-46.
- [28] Hashim L, Jinhwan L. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2022, **43**(5): 704-713.
- [29] Zang Y, Zhou X R, Pan M Y, Lu Y L, Liu H R, Xiong J P, Feng L X. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2022, **415**(1): 211-220.
- [30] Huang T, Zhang W, Quan C, He Y J, Li H M. *Metrol. Tech.*, 2018, (9): 8-9.
黄挺, 张伟, 全灿, 何雅娟, 李红梅. 计量技术, 2018, (9): 8-9.
- [31] Huo Z Z, Feng L X, Li H M, Xiong J P. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2019, **47**(12): 1 931-1 937.
霍中中, 冯流星, 李红梅, 熊金平. 分析化学, 2019, **47**(12): 1 931-1 937.
- [32] He C C. Research on the Purification and Preparation of High-purity Bovine Serum Albumin and the Value Assignment of Two Serum Proteins. Tianjin: Tianjin University of Technology, 2019.
何程铖. 高纯牛血清白蛋白的纯化制备及两种血清蛋白的定值研究. 天津: 天津理工大学, 2019.
- [33] Yan J J, Wang M, Yang M R, Zhou J, Xue X F, Wang T T. *Food Chem.*, 2022, **385**: 132 674.
- [34] Bradley S A, Jackson W C, Mahoney P P. *Anal. Chem.*, 2019, **91**(3): 1 962-1 967.
- [35] Lu Y L. High-accuracy Quantitative Study of Tau Protein, a Biomarker of Alzheimer's Disease. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2022.
陆艳丽. 阿尔茨海默症生物标志物 tau 蛋白的高准确度定量研究. 北京: 北京化工大学, 2022.
- [36] Ji S J, Hyuk M L, Sook K K, Hyung K K, Kyung H O, Sang R P. *J. Chromatogr. A*, 2011, **1 218**(38): 6 596-6 602.
- [37] Xie L N, Suo R, Zhao Y. *Qual. Saf. Agric. Prod*, 2021, (1): 67-72.
谢立娜, 锁然, 赵燕. 农产品质量与安全, 2021, (1): 67-72.
- [38] Munoz A, Kral R, Schimmel H. *Anal. Biochem.*, 2010, **408**(1): 124-131.
- [39] Zhou M Y, Ma X F. *Lab. Sci.*, 2018, **21**(5): 75-78.
周梦怡, 马小芳. 实验室科学, 2018, **21**(5): 75-78.