

嬰兒配方食品中牛乳鐵蛋白檢驗方法開發

覃丞弘 吳白玟 謝咏倫 張淑涵 高雅敏 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

乳鐵蛋白為一種含鐵糖蛋白，分子量約為80 kDa，廣泛存在於哺乳動物之乳汁中。為配合衛生福利部111年3月10日修正「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」有關乳鐵蛋白「可使用於標示有每日食用限量之食品，在每日食用量中，其總量不得高於300 mg」及「本品可於特殊營養食品中視實際需要適量使用」規定，開發嬰兒配方食品中牛乳鐵蛋白檢驗方法。將樣品中牛乳鐵蛋白以二硫蘇糖醇(Dithiothreitol)及碘乙醯胺(Iodoacetamide)分別進行還原及烷化，再以胰蛋白酶(Trypsin)水解後，以超高效液相層析串聯質譜儀(Ultra Performance Liquid Chromatograph/tandem Mass Spectrometer, UPLC-MS/MS)進行分析。以不含牛乳鐵蛋白之駝乳營養粉作為空白基質進行5重複添加回收試驗結果，添加4、10及40 mg/100 g乳鐵蛋白之同日間平均回收率分別為91.0、95.1及105.7%，變異係數分別為6.7、3.2及6.6%；異日間平均回收率分別為93.0、99.4及112.2%，變異係數分別為7.8、7.8及7.4%；定量極限為4 mg/100 g。市售產品之檢驗方法適用性評估結果，3件具乳鐵蛋白標示之產品，其牛乳鐵蛋白含量為120-253 mg/100 g；1件水解蛋白基質產品及2件羊奶基質產品則均未檢出牛乳鐵蛋白。

關鍵詞：嬰兒配方食品、牛乳鐵蛋白、超高效液相層析串聯質譜儀

前言

乳鐵蛋白是一單鏈糖蛋白，外觀呈紅色，自1960年代可自牛乳中分離純化取得乳鐵蛋白^(1,2)。其結構與血清中運鐵蛋白相似，並且可結合二價鐵及三價鐵⁽³⁾，屬於運鐵蛋白家族之一⁽⁴⁾。有研究指出，乳鐵蛋白具調節免疫之生理功能⁽⁵⁾，因此乳鐵蛋白常被添加於嬰兒配方食品、特定疾病配方食品及發酵乳製品等市售產品中。

依據衛生福利部111年3月10日修正「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」⁽⁶⁾，乳鐵

蛋白屬第八類營養添加劑，可使用於標示有每日食用限量之食品；在每日食用量中，其乳鐵蛋白總量不得高於300 mg（自112年1月1日施行），其規格限定乳鐵蛋白來源係由牛乳經脫脂、分離、精製而得。

有關以質譜技術定量乳鐵蛋白之相關分析方法⁽⁷⁻¹⁰⁾，經彙整文獻可知為蛋白質檢體經二硫蘇糖醇(Dithiothreitol, DTT)反應還原其雙硫鍵，並以碘乙醯胺(Iodoacetamide, IAA)將其硫氫基烷基化，破壞蛋白質之二級與三級結構，再經胰蛋白酶(Trypsin)專一性切割離胺酸(Lysine)及精胺酸(Arginine)之C-端，使蛋白質分解成肽片後，進行質譜分析。乳鐵蛋白

之質譜定量分析步驟，首先從以軟體預測乳鐵蛋白之胰蛋白酶專一性胺基酸切位(Lysine及Arginine之C-端)，將預測結果之產物胜肽輸入資料庫中以確認是否具有物種專一性，再經實驗測試選擇游離狀態穩定之特徵胜肽作為定量目標物⁽¹¹⁾。

本研究探討乳鐵蛋白經適當條件處理，利用超高效液相層析串聯質譜儀建立以牛乳鐵蛋白之特徵胜肽ETTVFENLPEK及GSNFQLDQLQGR序列之定性及定量檢驗方法。

材料與方法

一、試驗樣品

檢驗方法產品適用性驗證使用之牛乳粉狀產品3件、羊乳粉狀產品2件、含牛乳水解蛋白配方產品1件，共6件樣品，皆於111-112年購自網路通路及藥局，儲放於室溫備用。確效試驗使用之空白樣品為含駝乳之粉狀產品1件，其成分為乳清粉、駱駝乳粉、大豆蛋白、植脂末、甜菊糖苷、低聚異麥芽糖、大豆磷脂、食用鹽、碳酸鈣及碳酸氫鈣。

二、試驗藥品

(一) 試藥溶劑

碳酸氫銨(Ammonium bicarbonate)、二硫蘇糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)及碘乙醯胺(Iodoacetamide, IAA)採用試藥級，皆購自美國Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)；胰蛋白酶(Sequencing grade modified trypsin)採用試藥級，購自美國Promega公司(Madison, WA, USA)；乙腈(Acetonitrile)採用液相層析級，購自德國Merck公司(Darmstadt, Germany)；甲酸(Formic acid)及尿素(Urea)採用試藥級，皆購自美國Avantor公司(Radnor, PA, USA)。

(二) 對照用標準品

牛乳鐵蛋白(Bovine Lactoferrin)標準品(純度95%)、ETTVFENLPEK特徵胜肽標準品(純度97.2%)購自美國Sigma-Aldrich公司，ETTVFENLPEK(C13N15)特徵胜肽內部標準品(純度98.14%)，購自基龍米克斯生物科技股份有限公司(New Taipei, Taiwan)。GSNFQLDQLQGR特徵胜肽標準品(純度95%)、GSNFQLDQLQGR(C13N15)特徵胜肽內部標準品(純度95%)，皆購自明欣生物科技有限公司(Taipei, Taiwan)。

三、器材

容量瓶(10 mL、25 mL、250 mL及1,000 mL)、樣品瓶(2 mL，褐色)、血清瓶(1,000 mL)、離心管(15 mL，PP材質)、針筒(1 mL，PP材質，無針)、針筒式濾頭(孔徑0.22 μm，PVDF材質)。

四、儀器與設備

- (一) 旋渦混合器(Vortex Genie-2, Scientific Industries, USA)
- (二) 超音波振盪器(Elmasonic P, Elma, Germany)。
- (三) 去離子水製造機(Millipore Milli-Q, Millipore, USA)
- (四) 電子天平(AX 204, Mettler Toledo, Switzerland)
- (五) 高效液相層析儀(Acquity UPLC, Waters, USA)
- (六) 串聯式質譜儀(Xevo TQ MS, Waters, USA)
- (七) 超高速離心機(Centrifuge MPW-251, MPW MED. INSTRUMENTS, Poland)

五、試劑之調製

(一) 50 mM碳酸氫銨溶液：

稱取碳酸氫銨0.988 g，以去離子水溶解使成250 mL，再以0.1 N鹽酸溶液調整pH值

至8.0。稱取BHT 12.5 mg，以正己烷溶解使成1,000 mL。

(二)100 mM碳酸氫銨溶液：

稱取碳酸氫銨1.976 g，以去離子水溶解使成250 mL，再以0.1 N鹽酸溶液調整pH值至8.0。

(三)10 mM DTT溶液：

稱取DTT 0.015 g，以100 mM碳酸氫銨溶液溶解使成10 mL，臨用時調製。

(四)50 mM IAA溶液：

稱取IAA 0.093 g，以100 mM碳酸氫銨溶液溶解使成10 mL，臨用時調製，避光保存。

(五)胰蛋白酶溶液：

稱取胰蛋白酶20 μ g，以產品包裝內所附50 mM醋酸溶液0.05 mL溶解，於30°C水浴靜置15分鐘，臨用時調製。

(六)10%乙腈溶液 (v/v)：

取乙腈50 mL，加去離子水使成500 mL。

(七)20%乙腈溶液：

取乙腈100 mL，加去離子水使成500 mL。

(八)萃取溶液(含1 M尿素之50 mM碳酸氫銨溶液, pH 8.0)

稱取尿素30 g，以50 mM碳酸氫銨溶液溶解使成500 mL，再以0.1 N鹽酸溶液調整pH值至8.0。

六、移動相溶液之調製

(一)移動相溶液A：取甲酸1 mL，加去離子水使成1,000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

(二)移動相溶液B：取甲酸1 mL，加乙腈使成1,000 mL，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

七、標準溶液之配製

(一)牛乳鐵蛋白標準溶液：取牛乳鐵蛋白

(Bovine lactoferrin，分子量82,620)標準品約10 mg，精確稱定，以20%乙腈溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷凍貯存。臨用時，取適量標準原液，以20%乙腈溶液稀釋10倍，分裝後，供作標準溶液(濃度約為100 μ g/mL；1.2 μ M)，冷凍貯存，切勿反覆解凍使用。

(二)特徵胜肽內部標準溶液

分別稱取ETTVFENLPEK特徵胜肽內部標準品(簡稱ETT I.S.，分子量1,314.4)及GSNFQLDQLQGR特徵胜肽內部標準品(簡稱GSN I.S.，分子量1,372.5)各約1.7 mg，精確稱定，分別以20%乙腈及10%乙腈溶液溶解並定容至25 mL，再稀釋50倍，分裝後，供作ETTVFENLPEK特徵胜肽內部標準溶液及GSNFQLDQLQGR特徵胜肽內部標準溶液(濃度約為1 μ M)，冷凍貯存，切勿反覆解凍使用。

(三)特徵胜肽標準溶液

分別稱取ETTVFENLPEK特徵胜肽標準品(簡稱ETT，分子量1,305.6)約2.1 mg及GSNFQLDQLQGR特徵胜肽標準品(簡稱GSN，分子量1,362.5)約1.8 mg，精確稱定，分別以20%乙腈溶液及10%乙腈溶液溶解並定容至25 mL，經稀釋10倍，分裝後，分別作為ETTVFENLPEK特徵胜肽標準原液及GSNFQLDQLQGR特徵胜肽標準原液，冷凍貯存，切勿反覆解凍使用。臨用時，分別取適量ETTVFENLPEK特徵胜肽標準原液及GSNFQLDQLQGR特徵胜肽標準原液，以20%乙腈溶液及10%乙腈溶液溶解並定容至1 mL，供作ETTVFENLPEK特徵胜肽標準溶液及GSNFQLDQLQGR特徵胜肽標準溶液(濃度約為1 μ M)。

八、特徵胜肽序列選擇

步驟包含預測牛乳鐵蛋白經胰蛋白酶水解

產物胜肽、產物胜肽之離子對選擇及分析參數之設定等。篩選條件設定主要參考Ellingson等人⁽⁷⁾、Yuan等人⁽⁹⁾及Lange等人⁽¹²⁾之研究。

九、檢液之調製

將檢體混勻，取約1 g，精確稱定，以適量萃取溶液漩渦混合溶解，置於60°C水浴15分鐘，取出後混合均勻，冷卻至室溫，以萃取溶液定容至10 mL。取前述溶液0.2 mL置於微量離心管，加入10 mM DTT溶液0.1 mL，混合均勻，於60°C水浴反應60分鐘，冷卻至室溫，加入50 mM IAA溶液0.2 mL，混合均勻，於室溫避光反應30分鐘，混合均勻，取前液0.05 mL，加入0.1 mg/mL之胰蛋白酶溶液0.045 mL及50 mM碳酸氫銨溶液0.155 mL，混合均勻，於37°C水浴反應2小時。加入甲酸0.01 mL、ETTVFENLPEK及GSNFQLDQLQGR特徵胜肽內部標準溶液各0.006 mL及10%乙腈溶液0.028 mL，混合均勻，以12,000 ×g離心10分鐘，取上層液，經濾膜過濾，供作檢液。

十、標準曲線之製作

取適量各特徵胜肽標準溶液及其內部標準溶液混合，以20%乙腈溶液稀釋至5~170 nM (含內部標準品濃度20 nM)，作為特徵胜肽標準曲線溶液，並分別注入超高效液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析。就各特徵胜肽標準品與內部標準品之波峰面積比，與對應之特徵胜肽標準品濃度，製作標準曲線。

超高效液相層析串聯質譜分析條件

- (一)層析管柱：C18材質，2.1 × 100 mm，1.7 μm，顆粒孔徑300 Å。
- (二)保護管柱：C18材質，2.1 × 5 mm，1.7 μm，顆粒孔徑300 Å。
- (三)移動相溶液：A液(1%甲酸溶液)及B液(含1%甲酸之乙腈溶液)依表一進行梯度分析
- (四)移動相流速：0.6 mL/min
- (五)層析管溫度：30°C

表一、梯度分析條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0 → 0.5	95 → 95	5 → 5
0.5 → 2.0	95 → 90	5 → 10
2.0 → 7.0	90 → 75	10 → 25
7.0 → 7.1	75 → 10	25 → 90
7.1 → 8.5	10 → 10	90 → 90
8.5 → 8.6	10 → 95	90 → 5
8.6 → 10.0	95 → 95	5 → 5

(六)樣品槽溫度：15°C

(七)樣品注入量：10 μL

串聯質譜儀分析條件

(一)正離子電灑離子化：ESI⁺

(二)毛細管電壓(Capillary Voltage)：3.5 kV

(三)離子源溫度(Ion Source Temperature)：150°C

(四)加熱溫度(Temperature)：550°C

(五)進樣錐氣體流速(Cone Gas Flow)：50 L/hr

(六)溶媒揮散流速(Desolvation Flow)：900 L/hr

(七)偵測模式：多重反應監測模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM)。偵測離子對(Ion pair)、進樣錐電壓(Cone Voltage)與碰撞能量(Collision Energy)如表二所示。

十一、鑑別試驗與含量測定

精確量取檢液及特徵胜肽標準曲線溶液各10 μL，分別注入超高效液相層析串聯質譜儀中，參照第九節之超高效液相層析串聯質譜分析條件進行分析。就檢液與特徵胜肽標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度比較鑑別之，並以下列計算式求出檢體中牛乳鐵蛋白之含量(mg/100 g)。

檢體中牛乳鐵蛋白之含量(mg/100 g) =

$$\frac{C \times V \times MW \times F}{M} \times 10^{-7}$$

C：由標準曲線求得檢液中特徵胜肽ETTVFENLPEK濃度(nM)

表二、牛乳鐵蛋白之特徵胜肽以液相層析串聯質譜儀分析之MRM參數、進樣錐電壓、碰撞能量

分析物	分子量	離子對		進樣錐電壓(V)	碰撞能量(eV)
		前驅離子(m/z)	產物離子(m/z)		
ETTVFENLPEK	1,306.4	653.8	876.4 ^{a,b}	30	20
		653.8	729.3	30	20
ETTVFENLPEK I.S.	1,314.4	657.8	884.4	30	20
GSNFQLDQLQGR	1,362.5	681.8	829.5 ^b	30	24
		681.8	716.4	30	24
GSNFQLDQLQGR I.S.	1,372.5	686.9	839.5	30	24

^a 定量離子對

^b 鑑別確認牛乳鐵蛋白之2特徵胜肽之離子對

V：檢體最後定容之體積(0.3 mL)

MW：82,620 (牛乳鐵蛋白之分子量)

M：取樣分析之檢體重量(g)

F：稀釋倍數(100)

十二、確效試驗

本研究參考衛生福利部食品藥物管理署公布之「食品化學檢驗方法之確效規範」⁽¹³⁾進行確效試驗，評估方法之準確度(Accuracy)、精密度(Precision)及定量極限(Limit of Quantification, LOQ)。

(一)專一性試驗

1. 比較空白樣品及空白樣品添加牛乳鐵蛋白標準品之分析結果，確認空白樣品中並無待測物。
2. 市售樣品中牛乳鐵蛋白之鑑別確認為2特徵胜肽之第1對離子對比值應介於空白基質所添加之牛乳鐵蛋白標準品之2特徵胜肽之第1對離子對比值之70~130%。以下列計算式計算之⁽⁷⁾：

$$70 \leq \left[\frac{\text{樣品中特徵胜肽1與特徵胜肽2之產物離子T1波峰面積比值}}{\text{牛乳鐵蛋白中特徵胜肽1與特徵胜肽2之產物離子T1波峰面積平均比值}} \right] \times 100 \leq 130$$

註：第1對離子對為多重反應監測模式

(MRM)中測得之訊號最強之產物離子(T1)。

(二)準確度-添加回收試驗

於同日及不同日進行添加回收試驗，分別將40、100及400 μg/g之低、中及高3種濃度之牛乳鐵蛋白標準溶液添加至空白樣品中，各濃度皆進行5重複試驗，依前述流程製成檢液，並計算其平均回收率及變異係數。

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{檢測值}}{\text{配製值}} \times 100$$

$$\text{變異係數(CV\%)} = \frac{\text{標準差}}{\text{平均值}} \times 100$$

(三)定量極限(LOQ)之評估

評估含有已知量待測物之低濃度樣品，經前處理後層析圖中待測物波峰之訊號/雜訊比 ≥ 10 ，以及回收率及重複性符合方法確效要求。

十三、檢驗方法適用性評估

於網路通路及藥局價購羊奶粉2件、標示有乳鐵蛋白含量之產品3件及水解蛋白配方產品1件，以驗證本研究檢驗方法之適用性。

十四、統計分析

平均值(Mean)、標準差(Standard deviation)及變異係數(CV%)等數值以Microsoft Excel

2010軟體進行計算。牛乳鐵蛋白相關胜肽序列數據分析判讀使用Skyline軟體⁽¹⁴⁾。

結果與討論

一、前處理條件評估

(一)特徵胜肽序列之選擇

1. 預測牛乳鐵蛋白之水解產物胜肽及其專一性

有關牛乳鐵蛋白之完整胺基酸序列(UniProt ID:P24627)自UniProt網站(www.uniprot.org)查詢,以Skyline軟體計算,經胰蛋白酶處理後之水解產物胜肽,符合下列篩選條件共有11個水解產物胜肽,經NCBI blastp資料庫(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins)搜尋確認其專一性,並與文獻⁽⁷⁻¹⁰⁾對照比較。

(1)含胜肽序列長度為8~15。

(2)不含半胱胺酸(Cys)、甲硫胺酸(Met)、NXT/NXS序列。

(3)可含結構修飾Carbamidomethyl。

2. 水解產物胜肽之離子對選擇及分析參數

將牛乳鐵蛋白標準品100 nmole經前處理後,以Skyline軟體輸出預設質譜參數建立11個水解產物胜肽之滯留時間,因DSALGFLR⁽⁹⁾於本次實驗中無訊號產生故將其排除。其後,優化質譜參數並保留10個水解產物胜肽訊號較強之前2組離子對(如表三)。再參考文獻⁽⁷⁻¹⁰⁾挑選之水解產物胜肽,觀察並選擇穩定(本研究設定CV < 10%者)及訊號強度佳⁽¹¹⁾之ETTVFENLPEK及GSNFQLDQLQGR為主要觀察對象:ETTVFENLEPK之產物離子T1為 m/z 653.8 > 876.4;GSNFQLDQLQGR之產物離子T1為 m/z 681.8 > 829.5。前述本研究依據Skyline軟體內建離子對選擇預設值,並參考相

關文獻^(7,9,12)設定篩選之可能目標離子對需符合下列條件:

(1)前驅離子電荷為2+或3+。

(2)產物離子電荷為1+,類型為y及b。

(3)產物離子荷質比(m/z)需大於前驅離子荷質比,且最大之產物離子片段殘基(胺基酸)數量為前驅離子殘基數

表三、牛乳鐵蛋白水解產物胜肽之質譜參數

分析物	離子對		進樣 銼電 壓 (V)	碰撞 能量 (eV)
	前驅離子(m/z)>	產物離子(m/z)		
ETTVFENLPEK ⁽⁹⁾	653.8 >	876.4 ^{a,b}	30	20
	653.8 >	729.3	30	20
ETTVFENLPEK I.S.	657.8 >	884.4	30	20
	657.8 >	737.3	30	20
GSNFQLDQLQGR ^(7,9)	681.8 >	829.5 ^b	30	24
	681.8 >	716.4	30	24
GSNFQLDQLQGR I.S.	686.9 >	839.5	30	24
	686.9 >	726.4	30	24
LRPVAAEIYGTK ^(8,9)	659.4 >	737.4	30	35
	659.4 >	1,048.6	30	29
ESPQTHYYAVAVVK	796.4 >	1,049.6	30	34
	796.4 >	912.5	30	31
EPYFGYSGAFK	633.3 >	729.4	30	25
	633.3 >	672.3	30	22
SFQLFGSPPGQR ⁽⁷⁾	660.8 >	698.4	30	20
	660.8 >	554.3	30	20
VDSALYLGSR ⁽⁸⁾	540.8 >	708.4	30	19
	540.8 >	595.3	30	19
ANEGLTWNLSK	616.8 >	748.4	30	19
	616.8 >	647.4	30	22
YYGYTGAFR	549.3 >	551.3	30	19
	549.3 >	648.3	30	16
QVLLHQALFGK	691.4 >	791.4	30	28
	691.4 >	928.5	30	28

^a定量離子對

^b鑑別牛乳鐵蛋白之2特徵胜肽之離子對

量-3以內。

(4)若產物離子含N端Proline者可不符合第(3)點規定。

(二)層析條件之建立

本研究參考Yuan等人⁽⁹⁾研究之層析條件，經測試後將特徵胜肽之滯留時間由1.54分鐘調整至5.2分鐘，並將層析時間0-3.5分鐘之流洗液轉入廢液，僅收集層析時間3.51-10分鐘之質譜訊號。增加分析時間，延長滯留時間可增加層析之解析度，以獲得足夠之停留時間(Dwell time) (如圖一)。

(三)蛋白變性及烷基化作用之環境評估

參考文獻中使用DTT及IAA作用條件及廠商Promega之胰蛋白酶使用說明(2-4 mM DTT，於60°C反應45-60分鐘)，選擇以3.33 mM DTT為作用濃度(即於檢體溶液0.2 mL加入10 mM DTT 0.1 mL)。IAA之作用濃度為20 mM，與文獻所載條件相近。

(四)Trypsin反應時間評估

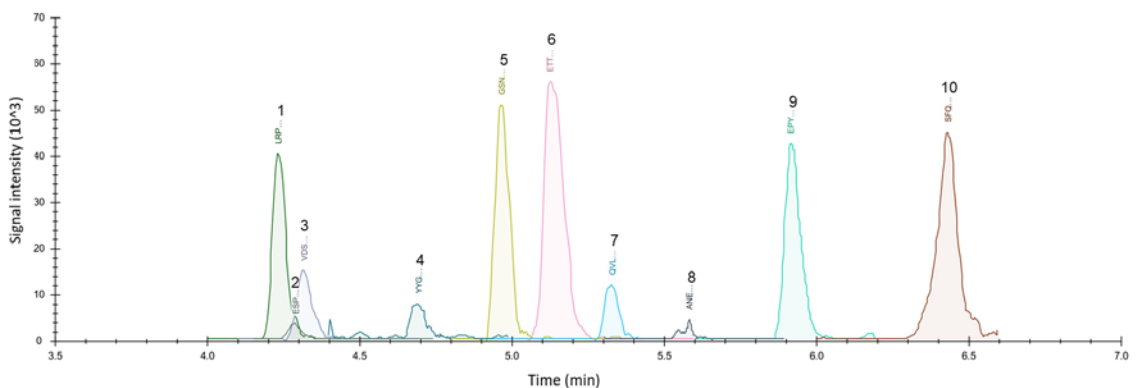
將牛乳鐵蛋白標準品經前述蛋白變性及烷基化作用後，分別以不同時間條件(1、

2、4及16小時)反應，結果如圖二。因ETTVFENLPEK產物較快生成及訊號強度較佳，故選擇Trypsin反應2小時為前處理條件。

二、確效試驗

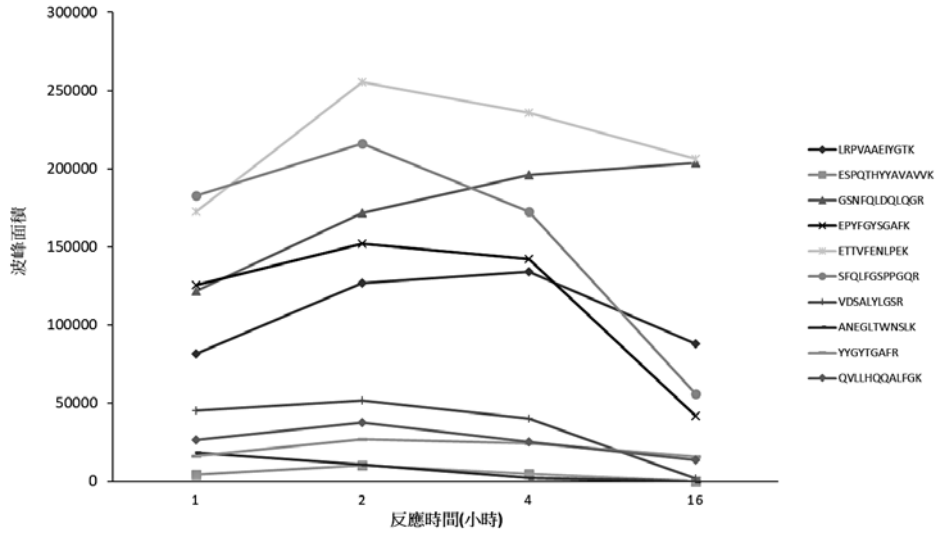
(一)專一性及標準曲線

1. 本研究選用特徵胜肽序列ETTVFENLPEK作為定量之特徵胜肽序列，以駝乳為空白基質樣品。空白基質樣品添加牛乳鐵蛋白經前處理後之ETTVFENLPEK及GSNFQLDQLQGR訊號與未添加牛乳鐵蛋白之空白基質樣品訊號相較，並無明顯干擾，結果如圖三。
2. 標準曲線部分，為評估基質效應，以ETTVFENLPEK特徵胜肽標準溶液分別製作標準曲線(Standard curve)及基質匹配檢量線(Matrix matched calibration curves)，使其檢液中ETTVFENLPEK濃度介於2至170 nM之間，並計算其斜率，測試結果其基質匹配檢量線及

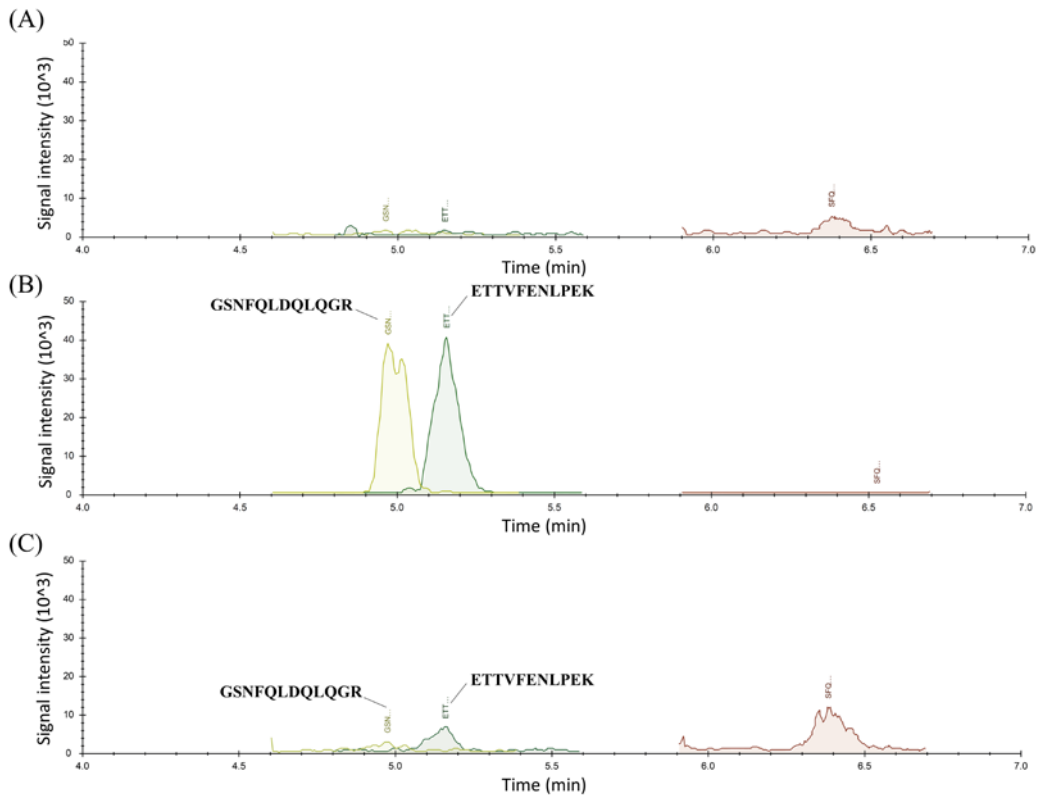


圖一、以UPLC-MS/MS分析牛乳鐵蛋白水解產物胜肽之總離子層析圖譜

1: LRPVAAEIYGTK (4.24 min) ; 2: ESPQTHYYAVAVVK (4.3 min) ; 3: VDSALYLGSR (4.32 min) ; 4: YYGYTGAFR (4.7 min) ; 5: GSNFQLDQLQGR (4.97 min) ; 6: ETTVFENLPEK (5.14 min) ; 7: QVLLHQALFGK (5.34 min) ; 8: ANEGLTWNLSLK (5.59 min) ; 9: EPYFGYSGAFK (5.92 min) ; 10: SFQLFGSPPGQR (6.43 min)



圖二、胰蛋白酶反應時間對牛乳鐵蛋白之特徵產物胜肽生成之影響



圖三、以UPLC-MS/MS分析空白樣品(脫乳)(A)、ETTVFENLPEK與GSNFQLDQLQGR特徵胜肽標準混合溶液(B)及空白樣品中添加牛乳鐵蛋白4 ppm (C)之TIC圖譜

嬰兒配方食品中牛乳鐵蛋白檢驗方法開發

標準曲線之斜率分別為107.9及110.9，經計算基質效應為-2.7%，參考EURL SANTE/11312/2021規範⁽¹⁵⁾，並不具明顯基質效應。故本研究採以溶劑為背景，並搭配同位素內部標準品建立標準曲線。ETTVFENLPEK之線性範圍為2~170 nM，相關係數可達0.99以上，顯示線性良好。

(二)含量測定單位

由於乳鐵蛋白中醯基化之差異使分子量為估計值，另因產品製造過程中亦可能去醯基反應。本研究參考Ellingson等人研究⁽⁷⁾，係以牛乳鐵蛋白分子量(82,620 dalton)推算檢體中牛乳鐵蛋白含量(mg/100 g)。

(三)準確度及精密度

實驗結果同日間平均回收率(n=5)分別為91.0、95.1及105.7%，變異係數分別為6.7、3.2及6.6%；異日間平均回

收率(n=10)之變異係數分別為7.8、7.8及7.4%，顯示其準確度及精密度良好(表四)。另以添加回收試驗結果，計算GSNFQLDQLQGR與ETTVFENLPEK兩者之產物離子T1之波峰面積比值平均值，作為蛋白質鑑別確認之評估，於10 mg/100 g及40 mg/100 g分別為0.32及0.30，異日間之變異係數分別為19.5及13.1% (表五)。本研究專一性設定係參考Ellingson等人研究⁽⁷⁾，以確效數據獲得之2條特徵肽產物離子T1之波峰面積比值之平均值，作為蛋白質鑑別確認之設定值，即為0.31。再以此設定值之70~130%作為允收範圍，即為0.22至0.37，以鑑定檢體中牛乳鐵蛋白。上述蛋白質鑑別確認於實驗中會因儀器及質譜設定參數影響此設定值⁽⁷⁾，故本研究中此設定值建議隨實驗批次中以空白檢體添加牛乳鐵蛋白方式建立適合之設定

表四、於駝乳中添加牛乳鐵蛋白之回收試驗結果

分析物	添加量 (mg/100 g)	同日間 ^a				異日間 ^b	
		第一日		第二日		回收率(%)	變異係數(%)
		回收率(%)	變異係數(%)	回收率(%)	變異係數(%)		
牛乳鐵蛋白	4	91.0	6.7	95.0	8.8	93.0	7.8
	10	95.1	3.2	103.6	10.2	99.4	7.8
	40	105.7	6.6	118.6	1.1	112.2	7.4

^a n = 5.^b n = 10.

表五、於駝乳中添加牛乳鐵蛋白之特徵肽產物離子積分面積比值計算結果

分析物	添加量 (mg/100 g)	GSNFQLDQLQGR/ETTVFENLPEK產物離子T1之波峰面積比值				同日間 ^a		異日間 ^b	
		第一日		第二日		比值	CV (%)		
		比值	變異係數(%)	比值	變異係數(%)				
牛乳鐵蛋白	10	0.32	18.3	0.32	23.0	0.32	19.5		
	40	0.27	9.1	0.33	9.7	0.30	13.1		

^a n = 5.^b n = 10.

值。另Jenkins等人解釋因胜肽有時會展現不同的線性特性，建議以回歸分析補償胜肽分析時反應值之變異⁽¹⁶⁾。

(四) 定量極限

參照國際公定分析化學家協會(AOAC International)之Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) for determination of bovine lactoferrin in infant and adult/pediatric nutritional formula⁽¹⁷⁾中定量極限4 mg/100 g之需求，本研究於空白樣品中添加牛乳鐵蛋白4 mg/100 g之回收率為91%，符合食品化學檢驗方法確效規範之要求，故定量極限可訂為4 mg/100 g。

三、食品中牛乳鐵蛋白檢驗方法之產品適用性驗證

3件具乳鐵蛋白含量標示並標示添加乳鐵蛋白之牛乳基質粉狀產品，以所建立之檢驗方法檢測，其檢測含量為120~258 mg/100 g，變異係數介於5.6至15.3%之間，換算產品之乳鐵蛋白每日食用量為97~206 mg/day (表六)，均未超過食品添加物使用範圍及限量暨規格標準有關乳鐵蛋白每日食用限量300 mg規定⁽⁶⁾，且檢測值皆與包裝食品營養標示應遵行事項之營養標示值誤差允許範圍 \geq 標示值之80%相符⁽¹⁸⁾。

在蛋白質鑑別確認部分，上述3件產品其GSNFQLDQLQGR與ETTVFENLPEK之產物離子T1之波峰面積比值為0.31~0.33，符合本研

究牛乳鐵蛋白鑑別之允收範圍。另，測試2件羊乳基質之粉狀產品，未檢出牛乳鐵蛋白；測試1件具牛乳成分之水解蛋白配方產品，卻未檢出牛乳鐵蛋白，推測可能該產品中牛乳鐵蛋白成分已於製程中水解破壞。經上述產品適用性驗證結果，證實本研究方法適用於含牛乳基質粉狀產品之牛乳鐵蛋白檢測。

由層析圖譜可以發現，牛乳粉狀產品中具明顯GSNFQLDQLQGR及SFQLFGSPPGQR等2個波峰，於羊乳粉狀產品中則無此2個波峰，可初步推論，此2個水解蛋白胜肽可區別牛乳與羊乳產品中乳鐵蛋白之物種來源(圖四)。

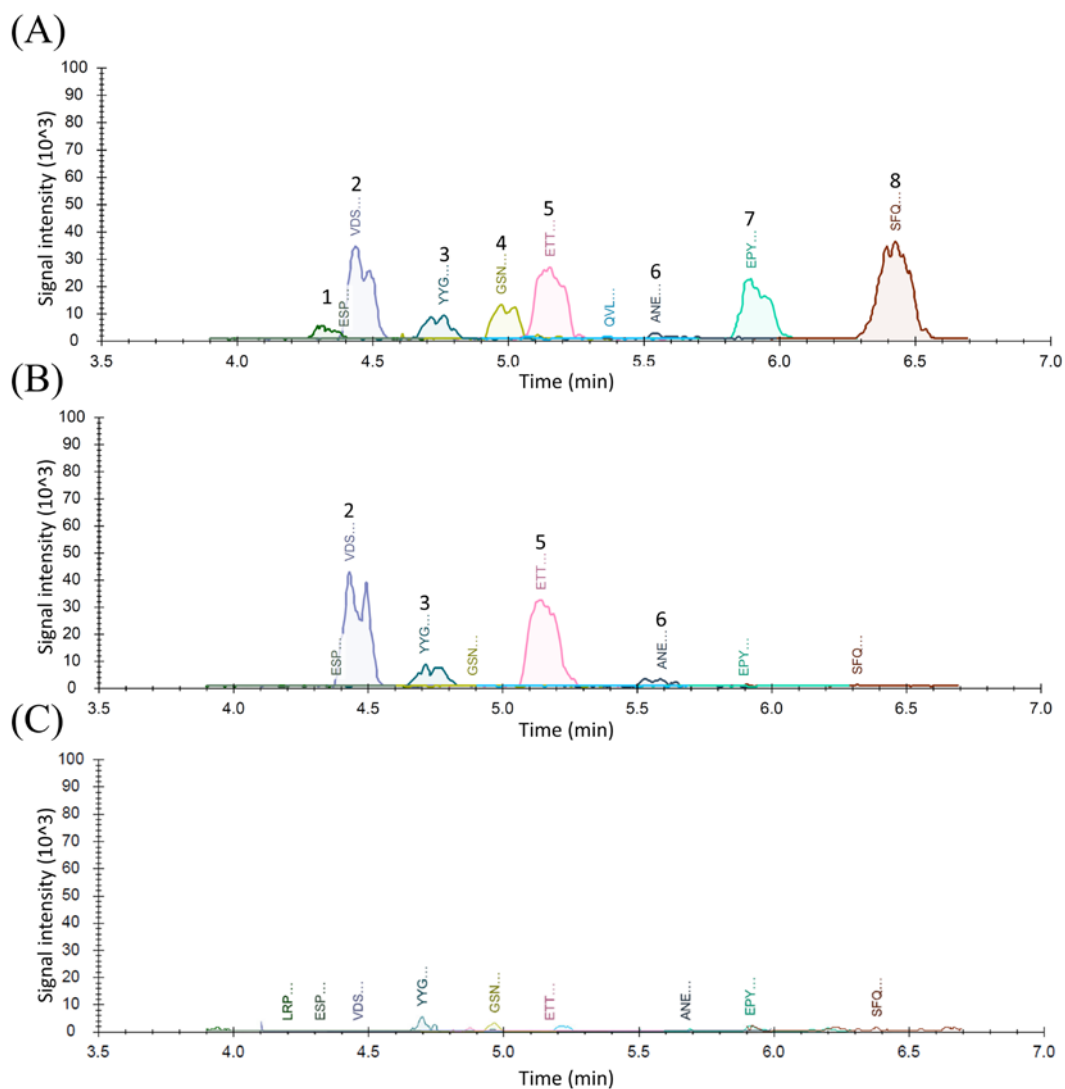
結 論

本研究以質譜技術分析建立乳鐵蛋白營養添加劑定量方法，並依循歐盟歐洲理事會藥品品質與衛生保健局(European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, EDQM)建議未知蛋白之鑑別需以2條特徵胜肽執行⁽¹⁹⁾之規則，可於10分鐘內完成分析，且確效試驗結果良好，並以此方法檢測3件具乳鐵蛋白含量標示並標示添加乳鐵蛋白之市售嬰幼兒奶粉及成人奶粉，確認本研究方法適用於食品中牛乳鐵蛋白之檢驗。

表六、市售具乳鐵蛋白標示之嬰幼兒及成人乳品中牛乳鐵蛋白之檢測結果

檢體名稱	標示值 (mg/100g)	檢測值 ^a (mg/100g)	變異係數 (%)	每日 建議食用量(g)	每日食用量中 乳鐵蛋白總量 (mg)	GSNFQLDQLQGR / ETTVFENLPEK 產物離子積分面積比值
S1	25	120	15.3	81	97	0.32
S2	10	258	6.0	80	206	0.33
S3	18	253	5.6	74	187	0.31

^an=3.



圖四、LC-MS/MS分析市售牛乳粉狀產品(A)、羊乳粉狀產品(B)、水解蛋白配方產品(代號HP-A)(C)之TIC圖譜
 1: ESPQTHYYAVAVVK; 2: VDSALYLGSR; 3: YYGYTGAFR; 4: GSNFQLDQLQGR; 5: ETTVFENLPEK;
 6: ANEGLTWNLSLK; 7: EPYFGYSGAFK; 8: SFQLFGSPPGQR

參考文獻

1. Groves, M.L. 1960. The isolation of a red protein from Milk. *J. Am. Chem. Soc.* 82(13): 3345-3350.
2. Johanson, B. 1960. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem. Scand.* 14(2): 510-512.
3. Baker, E.N. 1994. Structure and reactivity of transferrins. *Adv. Inorg. Chem.* 41: 389-464.
4. Lambert, L.A., Perri, H. and Meehan, T.J.

2005. Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 140(1): 11-25.
5. Baveye, S., Elass, E., Mazurier, J., Spik, G. and Legrand, D. 1999. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37(3): 281-286.
6. 衛生福利部。2022。食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。111年3月10日衛授食字第1101360128號公告修正。
7. Ellingson, D.J., Shippar, J.J., Vennard, T.R., Moloney, C. and *et al.* 2019. Analytical method for lactoferrin in milk-based infant formulas by signature peptide quantification with ultra-high performance LC-tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 102(3): 915-925.
8. Zhang, J., Lai, S., Cai, Z., Chen, Q. and *et al.* 2014. Determination of bovine lactoferrin in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry based on tryptic signature peptides employing an isotope-labeled winged peptide as internal standard. *Anal. Chim. Acta* 829: 33-39.
9. Yuan, M., Feng, C., Wang, S., Zhang, W. and *et al.* 2017. Selection of possible signature peptides for the detection of bovine lactoferrin in infant formulas by LC-MS/MS. *PLoS One* 12(9): e0184152.
10. Ke, X., Chen, Q., Pan, X., Zhang, J. and *et al.* 2016. Quantification of lactoferrin in breast milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotopic dilution. *RSC Adv.* 6(15): 12280-12285.
11. van den Broek, I., Niessen, W.M. and van Dongen, W.D. 2013. Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals. *J. Chromatogr. B* 929: 161-179.
12. Lange, V., Picotti, P., Domon, B. and Aebersold, R. 2008. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* 4(1): 222.
13. 衛生福利部食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範。102年09月09日第二次修正。
14. MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M. and *et al.* 2010. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26(7): 966-968.
15. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. SANTE/11312/2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf]
16. Jenkins, R., Duggan, J. X., Aubry, A. F., Zeng, J. and *et al.* 2015. Recommendations for validation of LC-MS/MS bioanalytical methods for protein biotherapeutics. *AAPS J.* 17: 1-16.
17. AOAC International. 2020. Standard Method Performance Requirements (SMPR®) for determination of bovine lactoferrin in infant and adult/pediatric nutritional formula. [<https://www.aoac.org/resources/smpr-2020-005>]
18. 衛生福利部。2021。包裝食品營養標示應遵行事項。110年4月27日衛授食字第1101300478號公告修正。
19. General European OMCL Network. 2016. Interpretation of screening results for unknown peptides and proteins by mass spectrometry based methods. *PA/PH/OMCL (15) 04 2R.*

Method Development of Bovine Lactoferrin Analysis in Infant Formula

CHENG-HONG QIN, PAI-WEN WU, YUNG-LUN HSIEH, SHU-HAN CHANG,
YA-MIN KAO, SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA, MOHW

ABSTRACT

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein commonly found in mammalian milk. To comply with the amended “Standards for Specification, Scope, Application and Limitation of Food Additives” announced by the Ministry of Health and Welfare of March 10, 2022, which stipulates that “Lactoferrin can be used in foods labeled with daily intake limits, and the total daily intake should not exceed 300 mg” and “This product can be used in special nutritional foods as needed”. A test method for bovine lactoferrin in infant formula products was developed. The protocol in brief was that bovine lactoferrin was reduced by dithiothreitol, alkylated by iodoacetamide, hydrolyzed by trypsin, and then analyzed by an ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometer (UPLC-MS/MS). The average recoveries of bovine lactoferrin spiked at 4, 10 and 40 mg/100 g into the blank matrix made of camel milk nutrition powder were 91.0, 95.1 and 105.7%, and the coefficients of variance were 6.7, 3.2 and 6.6%, respectively in intra-day test (n=5); the average recoveries were 93.0, 99.4 and 112.2%, and the coefficients of variance were 7.8, 7.8 and 7.4%, respectively in inter-day test (n=10). We tested commercial nutrition supplement products for the application of the testing method, the results showed the detected values of bovine lactoferrin in 3 commercial products with bovine lactoferrin labeling were in the range of 120-253 mg/100 g. One hydrolyzed formula powder and 2 commercial products constituted of goat milk were not detected of bovine lactoferrin.

Key words: infant formula, bovine lactoferrin, UPLC-MS/MS