

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.60149

高效液相色谱—串联质谱法测定原料乳粉中乳脂球膜蛋白

刘建平¹ 王美玲¹ 成婧² 王林¹ 张帆³ 李光胜¹
刘洋¹ 方静¹ 刘向荣¹

(1. 中国检验认证集团湖南有限公司, 湖南 长沙 410021; 2. 长沙海关技术中心, 湖南 长沙 410004;
3. 长沙环境保护职业技术学院, 湖南 长沙 410023)

摘要: [目的] 建立一种基于特征肽的乳脂球膜蛋白液相色谱串联质谱定量检测方法。[方法] 从乳脂球膜蛋白酶解产物中筛选出特征肽, 通过多反应监测模式, 对原料乳粉中的乳脂球膜蛋白进行定量测定, 同时人工合成同位素内标肽段以降低基质效应和抵消处理过程中的损失。[结果] 方法定量限为 0.234~0.811 mg/g。低、中、高 3 个添加水平回收率为 82.5%~105.6%, 相对标准偏差为 2.2%~10.3%。[结论] 试验方法准确性和灵敏度高、特异性强, 可满足原料乳粉中不同含量水平的乳脂球膜蛋白定量测定要求。

关键词: 乳脂球膜蛋白; 特征肽; 液相色谱—质谱/质谱法; 定量测定; 原料乳粉

High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of milk fat globule membrane proteins in raw milk powder

LIU Jianping¹ WANG Meiling¹ CHENG Jing² WANG Lin¹ ZHANG Fan³ LI Guangsheng¹
LIU Yang¹ FANG Jing¹ LIU Xiangrong¹

(1. China Certification & Inspection Group Hunan Co., Ltd., Changsha, Hunan 410021, China;
2. Changsha Customs Technical Center, Changsha, Hunan 410004, China;
3. Changsha Environmental Protection Vocational College, Changsha, Hunan 410023, China)

Abstract: [Objective] To establish a method for the quantitative detection of milk fat globule membrane proteins in raw milk powder based on characteristic peptides using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. [Methods] Characteristic peptides are selected from the proteolytic products of milk fat globule membrane proteins. The quantification of milk fat globule membrane proteins in raw milk powder is performed using multiple reaction monitoring mode. Isotope-labeled internal standard peptides are synthesized to reduce matrix effects and compensate for losses during sample preparation. [Results] The method's quantification limits range from 0.234 to 0.811 mg/g. The recovery rates at low, medium, and high spiked levels are 82.5% to 105.6%, with relative standard deviations between 2.2% and 10.3%. [Conclusion] The method demonstrates high accuracy, sensitivity, and specificity, and can meet the requirements for the quantitative determination of milk fat globule membrane proteins at different levels in raw milk powder.

Keywords: milk fat globule membrane protein; characteristic peptide; liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry; quantitative determination; raw milk powder

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(编号: 2022JJ90019, 2024JJ8279); 湖南省重点研发项目(编号: 2024JK2157)

通信作者: 刘向荣(1968—), 男, 中国检验认证集团湖南有限公司高级工程师, 硕士。E-mail: huazhong_kch@ccic.com

收稿日期: 2024-10-06 改回日期: 2025-05-22

引用格式: 刘建平, 王美玲, 成婧, 等. 高效液相色谱—串联质谱法测定原料乳粉中乳脂球膜蛋白[J]. 食品与机械, 2025, 41(7): 32-38.

Citation: LIU Jianping, WANG Meiling, CHENG Jing, et al. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of milk fat globule membrane proteins in raw milk powder[J]. Food & Machinery, 2025, 41(7): 32-38.

乳脂肪作为乳的重要组成部分,以脂肪球的形式存在,外面包裹一层较薄的膜,称为乳脂肪球膜^[1-4]。乳脂球膜蛋白(MFGPs)为膜结合的蛋白,主要吸附在膜表面,含量较低,只占总乳蛋白质的1%~2%^[5],但具有重要的生物学作用,如改善人体机能、提高婴幼儿免疫力、促进脑部发育等^[6-8]。乳脂肪球膜蛋白中含量相对较高且具有显著生理功能的主要成分有黏蛋白-1、黄嘌呤脱氢酶、黏液素 15、嗜乳脂蛋白和乳凝集素(PAS6/7)等^[9-10]。近年来,由于乳脂肪球膜蛋白其特殊的营养价值和功能,已被作为食品原料广泛应用于配方奶粉、儿童营养食品和保健品等领域^[11-13]。但由于原料来源不明,生产工艺不统一或是质量参差不齐,直接影响食品品质。而目前中国尚未有乳粉中乳脂球膜蛋白检测的相关国家标准或行业标准,也无相应的定量检测方法。

乳粉中蛋白的常规检测方法主要有凯氏定氮法、紫外分光光度法、酶联免疫法、电泳法等^[14-16]。其中凯氏定氮法可测定所有含氮化合物,无法区分蛋白质和其他含氮化合物。酶联免疫法操作简便,但容易受样品中基质、交叉反应等因素干扰。紫外分光光度法和电泳法的灵敏度不足。因此,常规检测无法满足特异蛋白质的鉴定和定量分析要求。液相色谱—质谱技术是近几年发展起来鉴定蛋白质的重要工具,具有高灵敏度、高选择性等优点,已被应用于人乳或牛乳中乳脂球膜蛋白的研究^[10,17-19],但均以定性鉴别为主,未对乳脂肪球膜蛋白进行定量测定。研究拟将蛋白酶解技术与液相色谱串联质谱多反应监测模式相结合,建立原料乳粉中乳脂球膜蛋白的高效识别和定量检测方法,旨在为保证产品质量安全和政府加强监管提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

XDH-VR(VSLSTTGIFYR,纯度为 97.37%,肽含量为 68.26%)、MUC1-EK(EGTTAEWVK,纯度为 95.91%,肽含量为 74.24%)、ADPN-DR(DSVASTITGVVDR,纯度为 95.48%,肽含量为 77.09%)、BTN-TR(TPLPLAGPPR,纯度为 97.99%,肽含量为 76.16%)、PAS6/7-QR(QFQIQVAGR,纯度为 96.87%,肽含量为 77.30%)特征肽标准品:加拿大 Biomatik 公司;

XDH-VRH(*V)SLSTTGIFYR,纯度为 97.17%)、MUC1-EKH(EGTTAEW(*V)K,纯度为 96.17%)、ADPN-DRH(DS(*V)ASTITGVVDR,纯度为 98.55%)、BTN-TRH(TP(*L)PLAGPPR,纯度为 95.73%)、PAS6/7-QRH(QFQIQV(*A)GR 纯度为 95.73%)内标物:加拿大

Biomatik 公司;

二硫蔗糖醇(纯度为 99.5%)、碘乙酰胺(纯度为 99.0%):北京索莱宝科技有限公司;

牛胰蛋白酶:酶活 $\geq 10\ 000$ U/mg 蛋白,美国 Sigma 公司;

乙腈、甲酸:色谱纯,上海安谱科学仪器有限公司;

碳酸氢铵:优级纯,上海安谱科学仪器有限公司;

其余试剂均为国产分析纯;

试验用水为超纯水;

乳脂球膜蛋白原料粉:乳脂球膜蛋白含量为 61.2 mg/g,新西兰适华利营养有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

液相色谱—三重四级杆串联质谱仪:AB Triple Quad 5500 型,美国 SCIEX 公司;

超声波清洗器:KQ-500DE 型,昆山市超声仪器有限公司;

涡旋混匀器:SK-1 型,常州澳华仪器有限公司;

电子天平:X5105 型,瑞士 Mettler Toledo 公司;

恒温水浴振荡器:DKZ-2 型,上海一恒科学仪器有限公司;

高速离心机:Sigma2-16P 型,德国 Sigma 公司。

1.2 方 法

1.2.1 标准溶液的配制

(1) 标准储备液:分别称取适量特征肽标准品,用 0.2% 甲酸—5% 乙腈混合水溶液配制成 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,转移至塑料管中, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存。

(2) 内标储备液:分别称取适量内标物,用 0.2% 甲酸—5% 乙腈混合水溶液配制成 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标准溶液,转移至塑料管中, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存。

试验前,用 0.2% 甲酸—5% 乙腈混合水溶液稀释,分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合内标中间液,再用 0.2% 甲酸—5% 乙腈混合水溶液稀释配制成质量浓度分别为 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000 ng/mL 的特征肽标准曲线(含 50 ng/mL 内标)。

1.2.2 样品前处理 称取 0.1 g(精确到 0.000 1 g)样品,加入 30 mL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液,涡旋混合器上混匀 1 min,超声提取 30 min,转移至 50 mL 容量瓶,用碳酸氢铵溶液定容。移取 200 μL 样液,加入 50 μL 混合内标溶液(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),加入 100 μL 二硫蔗糖醇溶液(100 mmol/L), $60\ ^\circ\text{C}$ 恒温反应 1 h,冷却,加入 200 μL 碘乙酰胺溶液(100 mmol/L), $30\ ^\circ\text{C}$ 下避光反应 30 min,冷却,加入 10 μL 胰蛋白酶溶液(1.0 mg/mL), $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴过夜,冷却,加入 440 μL 5% 甲酸溶液,混匀,10 000 r/min 离心 5 min,过

0.22 μm 水系微孔滤膜,得试样测定液。

1.2.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~3 min, 5% B; 3~6 min, 5%~40% B; 6~7 min, 40%~70% B; 7~8 min, 70% B; 8.1~10 min, 5% B。流速 0.25 mL/min;柱温 40 °C;进样量 5 μL。

1.2.4 质谱条件

(1) 高分辨质谱条件:正离子模式扫描;毛细管电压 3 kV;毛细管温度 320 °C;气化温度 350 °C;鞘气压 4.1 MPa;辅助气压 1.5 MPa;全扫描模式,扫描范围 *m/z* 300~2 000;分辨率 35 000。

(2) 三重四级杆串联质谱条件:ESI 离子源,正离子;多反应监测(MRM);电喷雾电压(IS)5 000 V;气帘气(CUR)0.14 MPa;雾化气(GS₁)0.34 MPa;辅助加热气(GS₂)0.38 MPa;碰撞气(CAD)0.05 MPa;离子源温度(TEM)450 °C;母离子均带双电荷[M+2H]²⁺,特征肽及内标的质谱参数见表 1。

1.2.5 数据处理 利用 Proteome Discover 2.1 软件及 Uniprot 蛋白质组学数据库进行肽段鉴定。定量测定 LC-MS/MS 原始数据均使用 Analyst 1.5 和 Quantitate 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 特征肽的选择

选择碱性牛胰蛋白酶对蛋白质进行酶切,通过高分辨质谱进行全扫描,经 Proteome Discoverer 2.1 软件及 Uniprot 蛋白质组学数据库分析比对,确定乳凝集素、嗜乳脂蛋白、黄嘌呤脱氢酶、黏蛋白-1 和亲脂素存在的肽段。同时根据文献^[9-10,17-20]的筛选原则,选择特异性强和灵敏度高的肽段作为特征肽用于定量分析。由表 2 可知,最终确定乳凝集素、嗜乳脂蛋白、黄嘌呤脱氢酶、黏蛋白-1 和亲脂素的特征肽段序列分别是 QFQFIQVAGR、TPLPLAGPPR、VSLSTTGfYR、EGTTAEWVK 和 DSVASTITGVVDR。

2.2 特异性验证

选择 α-乳清蛋白、乳铁蛋白、酪蛋白、免疫球蛋白 G

表 1 5 种特征肽及内标的质谱参数[†]

Table 1 Mass spectrometric parameters of five characteristic peptides and internal standards

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/V
MUC1-EK	510.9	147.1*	130	21
		484.0	130	23
MUC1-EKH	513.9	487.0*	130	25
		638.5	130	25
BTN-TR	510.1	707.5*	130	27
		312.1	130	25
BTN-TRH	513.4	707.5*	130	27
		354.5	130	29
XDH-VR	566.3	187.1*	130	25
		173.1	130	40
XDH-VRH	569.0	193.2*	130	27
		288.2	130	26
ADPN-DR	660.5	284.1*	130	31
		245.2	130	32
ADPN-DRH	663.5	646.4*	130	26
		290.4	130	32
PAS6/7-QR	597.4	588.4*	130	27
		530.3	130	28
PAS6/7-QRH	599.5	590.5*	130	25
		534.5	130	27

† *为定量离子。

和大豆蛋白等不同类型蛋白进行特异性试验,样品按 1.2.2 的方法进行前处理,在相同 LC-MS/MS 仪器条件下进行分析,结果显示,以上蛋白均不存在干扰峰,即不存在所选特征肽段,说明所选肽段为乳脂球膜蛋白的特异肽段。

2.3 内标物的选择

应用 LC-MS/MS 法对样品的酶解产物进行检测时,对结果影响最大的为基质效应,因此,需加入内标物质进行校正。根据内标的选择原则^[20],选择与特征肽段相似

表 2 通过筛选得到的各蛋白特征肽段信息

Table 2 Information of characteristic peptides for each protein obtained through screening

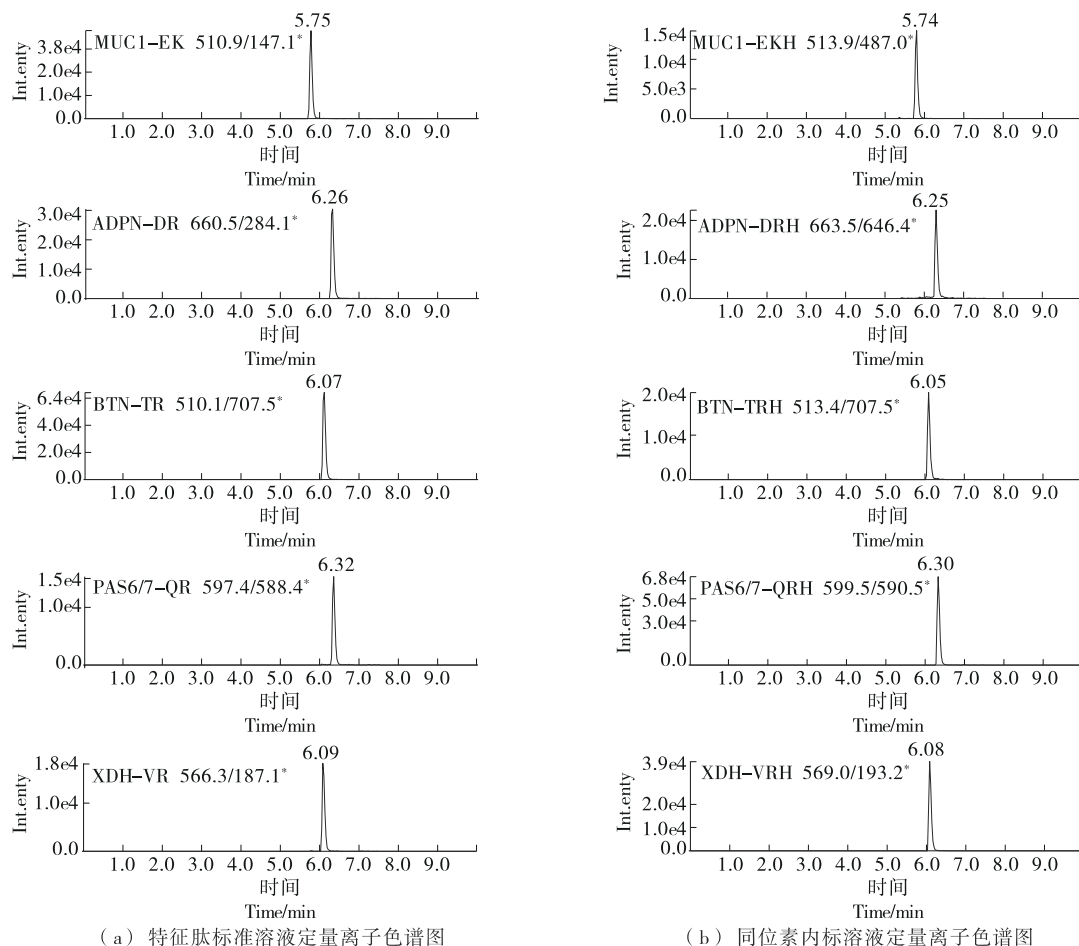
蛋白质	特征肽	肽段序列	理论质量数	肽段位置
乳凝集素	PAS6/7-QR	QFQFIQVAGR	1 193.642 5	207~216
嗜乳脂蛋白	BTN-TR	TPLPLAGPPR	1 018.604 3	411~420
黄嘌呤脱氢酶	XDH-VR	VSLSTTGfYR	1 130.584 0	1 125~1 134
黏蛋白-1	MUC1-EK	EGTTAEWVK	1 020.499 6	438~446
亲脂素	ADPN-DR	DSVASTITGVVDR	1 319.680 1	128~140

的氨基酸序列作为内标。内标肽段 XDH-VRH、MUC1-EKH、ADPN-DRH、BTN-TRH、PAS6/7-QRH 为合成的同位素内标物,与乳脂球膜蛋白的特征肽具有相似的色谱行为,且不存在干扰,可减少样品前处理和质谱离子化效

率等因素影响。

2.4 条件优化

2.4.1 质谱和色谱条件 5种特征肽及同位素内标混合标准溶液定量离子色谱图如图1所示。



(a) 特征肽标准溶液定量离子色谱图

(b) 同位素内标溶液定量离子色谱图

图1 5种特征肽标准溶液和同位素内标溶液定量离子色谱图

Figure 1 Quantitative ion chromatograms of five characteristic peptide standard solutions and isotope-labeled internal standard solutions

比较了 Agilent ZORBAX C₁₈柱、Shimadzu VP-ODS 和 Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱的分离效果。结果显示,各特征肽在 Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱上较易洗脱下来,且峰型较好,与样品中的杂峰能得到良好的分离。同时考察了 5 mmol/L 乙酸胺—乙腈、甲醇—水、0.1% 乙酸—乙腈和 0.1% 甲酸—乙腈等为流动相的分离效果,结果发现,采用 0.1% 甲酸—乙腈作为流动相时,峰型较好,且质谱响应灵敏度较高。由于电喷雾离子模式为正离子模式,在流动相中加入少量酸能使离子化效率增强。因此,选择 0.1% 甲酸—乙腈作为流动相梯度洗脱。

2.4.2 前处理条件

(1) 还原温度和酶解温度:根据文献[10,17—19],二

硫苏糖醇作为还原剂的还原反应温度有 37, 56, 60 °C 等,牛胰蛋白酶的酶解温度均为 37 °C。由图 2 可知,当还原温度为 60 °C,酶解温度为 37 °C 时,酶解反应效果最佳。

(2) 酶浓度和酶解时间:根据胰蛋白酶使用说明书,牛胰蛋白酶与底物的料液比范围为 1:20~1:250 (g/mL),酶解时间因目标化合物不同而有所差异。为确定最佳酶与底物料液比和酶解时间,分别比较了料液比为 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:100, 1:200 (g/mL), 酶解时间为 4, 8, 12, 16 h 下的酶解效果。由图 3 可知,当牛胰蛋白酶与底物料液比为 1:40 (g/mL) 时,酶解反应效果最佳。

(3) 终止酶解试剂:根据文献[10,17—19],一般是将酶解液的 pH 值调至酸性 (pH 约为 2),使胰蛋白酶失活。

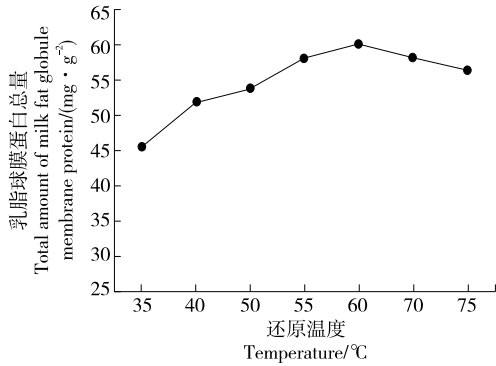


图 2 温度对还原反应的影响

Figure 2 Effect of temperature on reduction reaction

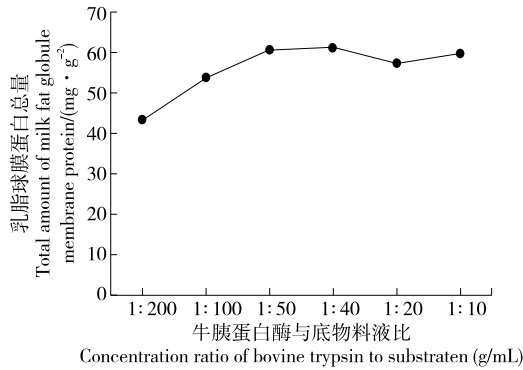


图 3 酶与底物料液比对酶切反应的影响

Figure 3 Effect of enzyme-to-substrate ratio on the enzymatic digestion reaction

表 3 特征肽的线性方程、相关系数以及对应蛋白质的检出限和定量限

Table 3 Linear equations, correlation coefficients, and corresponding detection and quantification limits for characteristic peptides

特征肽	线性方程	相关系数(R^2)	对应蛋白质	蛋白检出限/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	蛋白定量限/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
MUC1-EK	$Y=0.067X+0.0414$	0.9992	黏蛋白-1	0.114	0.356
BTN-TR	$Y=0.0931X-0.0611$	0.9999	嗜乳脂蛋白	0.116	0.364
ADPN-DR	$Y=0.0302X-0.00762$	0.9998	亲脂素	0.075	0.234
PAS6/7-QR	$Y=0.0268X-0.0182$	0.9998	乳凝集素	0.079	0.248
XDH-VR	$Y=0.0131X+0.0247$	0.9986	黄嘌呤脱氢酶	0.260	0.811

2.5.3 方法回收率及精密度 由表 4 可知,低、中、高 3 个添加水平的回收率为 82.5%~105.6%,精密度(RSD)为 2.2%~10.3%,表明在内标物条件下,可以有效消除基质效应和减少过程损失,加标回收率和精密度良好,检验方法准确可靠。

2.6 实际样品

为验证方法的适用性,对 5 批次含有不同乳脂球膜蛋白的原料乳粉按照试验建立的方法进行处理,检测的乳脂球膜蛋白总含量与标签标示值相近(见表 5),表明试验

试验选择甲酸溶液为终止酶解试剂,同时优化甲酸溶液浓度,得到最佳浓度为 1.0 mol/L,该浓度下一方面可以终止酶反应,另一方面可中和酶解液中的碳酸氢铵溶液,使溶液呈酸性,延长色谱柱使用寿命和提高特征肽的质谱响应。在酸性条件下,特征肽易电离,响应值增大。试验发现,特征肽质谱响应信号受 pH 值影响的顺序依次为 PAS6/7>BTN>XDH>ADPN>MUC1。

2.5 方法学验证

2.5.1 乳脂球膜蛋白含量的确定 乳经酶解后得到各特征肽含量分别为 $X_{\text{MUC1-EK}}$ 、 $X_{\text{BTN-TR}}$ 、 $X_{\text{ADPN-DR}}$ 、 $X_{\text{PAS6/7-QR}}$ 、 $X_{\text{XDH-VR}}$,各特征肽与蛋白的摩尔比为 1:1。因此,根据特征肽的量可以折算出各乳脂球膜蛋白含量: $W_{\text{黏蛋白-1}}=X_{\text{MUC1-EK}}\times 58\ 091.82/1\ 020.50$, $W_{\text{嗜乳脂蛋白}}=X_{\text{BTN-TR}}\times 59\ 276.71/1\ 018.60$, $W_{\text{亲脂素}}=X_{\text{ADPN-DR}}\times 49\ 368.08/1\ 319.680\ 1$, $W_{\text{乳凝集素}}=X_{\text{PAS6/7-QR}}\times 47\ 410.83/1\ 193.642\ 5$, $W_{\text{黄嘌呤脱氢酶}}=X_{\text{XDH-VR}}\times 146\ 790.47/1\ 130.584$,乳脂球膜蛋白总含量为各蛋白含量之和。

2.5.2 线性范围、检出限和定量限 配制 2.5~1 000.0 ng/mL 系列浓度的标准工作溶液进行分析,以质量浓度为横坐标,特征肽与同位素内标峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线。由表 3 可知,各标准曲线线性关系良好,相关系数 $R^2\geq 0.998$ 。以信噪比为 3:1 和 10:1 检测方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ),各特征肽的检出限为 0.002 mg/g,定量限为 0.006 25 mg/g;对应的各蛋白检出限为 0.075~0.260 mg/g,定量限为 0.234~0.811 mg/g。

方法可用于原料乳粉中乳脂球膜蛋白的检测。

3 结论

建立了一种高效液相色谱—串联质谱法定量测定原料乳粉中乳脂球膜蛋白的分析方法,筛选出乳凝集素、嗜乳脂蛋白、黄嘌呤脱氢酶、黏蛋白-1 和亲脂素的特征肽段,并采用合成同位素内标特征肽,解决了蛋白质定量分析过程中酶切与质谱检测易受基质效应干扰的问题。结果表明,当还原温度为 60 °C,酶解温度为 37 °C,牛胰蛋白

表4 原料乳粉中乳脂球膜蛋白加标平均回收率和精密度
Table 4 Average recovery and precision of added milk fat globule membrane proteins in raw milk powder

蛋白质	添加浓度/(mg·g ⁻¹)	平均回收率/%	精密度/%
黏蛋白-1	0.356	85.6	6.8
	1.780	93.5	3.5
	3.560	96.4	4.8
嗜乳脂蛋白	0.364	91.9	2.5
	1.820	95.6	4.3
	3.640	98.6	2.2
亲脂素	0.234	93.4	4.8
	1.170	90.7	2.8
	2.340	95.7	3.6
乳凝集素	0.248	88.8	10.3
	1.240	103.1	5.2
	2.480	96.2	3.7
黄嘌呤脱氢酶	0.811	82.5	7.1
	4.060	91.9	6.7
	8.110	105.6	3.7

表5 不同批次原料乳粉中乳脂球膜蛋白含量

Table 5 Content of milk fat globule membrane proteins in raw milk powder from different batches

样品号	标签标示值/(mg·g ⁻¹)	测定值/(mg·g ⁻¹)
1	47.8	45.9±2.5
2	57.6	56.2±1.8
3	53.2	52.3±3.5
4	42.6	43.1±4.2
5	31.8	30.1±1.3

酶与底物液比为1:40(g/mL)、酶解时间为16h时,酶解效果最好。各特征肽在2.5~1000.0ng/mL范围内线性关系良好,对应各蛋白检出限为0.075~0.260mg/g,定量限为0.234~0.811mg/g。试验方法的回收率为82.5%~105.6%,相对标准偏差为2.2%~10.3%,精密度和准确度满足检测要求。综上,试验方法具有前处理简单、选择性好、定量结果准确等优点。后续将对奶粉中乳脂球膜蛋白含量测定进行方法适用性研究。

参考文献

[1] D'ALESSANDRO A, SCALONI A, ZOLLA L. Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview[J].

Journal of Proteome Research, 2010, 9(7): 3339-3373.

[2] DEWETTINCK K, ROMBAUT R, THIENPONT N, et al. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(5): 436-457.

[3] HARI S, OCHIAI R, SHIOYA Y, et al. Safety evaluation of the consumption of high dose milk fat globule membrane in healthy adults: a double-blind, randomized controlled trial with parallel group design[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2015, 79(7): 1172-1177.

[4] MANONI M, DI LORENZO C, OTTOBONI M, et al. Comparative proteomics of milk fat globule membrane (MFGM) proteome across species and lactation stages and the potentials of MFGM fractions in infant formula preparation[J]. Foods, 2020, 9(9): 1251.

[5] 王紫薇, 罗洁, 彭海鑫, 等. 乳脂肪球膜的研究进展[J]. 中国奶牛, 2014(18): 34-39.

WANG Z W, LUO J, PENG H X, et al. A review of developments in milk fat globule membrane[J]. China Dairy Cattle, 2014(18): 34-39.

[6] 杨洁, 齐策, 韦伟, 等. 人乳脂肪球的研究进展[J]. 中国油脂, 2018, 43(5): 33-38.

YANG J, QI C, WEI W, et al. Advances in human milk fat globules[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(5): 33-38.

[7] JUVARAJAH T, WAN-IBRAHIM W I, ASHRAFZADEH A, et al. Human milk fat globule membrane contains hundreds of abundantly expressed and nutritionally beneficial proteins that are generally lacking in caprine milk[J]. Breastfeeding Medicine, 2018, 13(9): 631-637.

[8] LI S S, YANG Y X, CHEN C, et al. Differences in milk fat globule membrane proteins among Murrah, Nili-Ravi and Mediterranean buffaloes revealed by a TMT proteomic approach [J]. Food Research International, 2021, 139: 109847.

[9] BRINK L R, LÖNNERDAL B. Milk fat globule membrane: the role of its various components in infant health and development [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 85: 108465.

[10] 谈婷, 罗毅皓, 孙万成. 牦牛酥油乳脂肪球膜蛋白分离纯化和蛋白组鉴定及功能分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(13): 163-172.

TAN T, LUO Y H, SUN W C. Isolation, purification, proteome identification and functional analysis of yak butter milk fat globular membrane protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(13): 163-172.

[11] 姚磊. 乳脂肪球膜蛋白的研究与应用进展[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(12): 117-121.

YAO L. The research of milk fat globule membrane protein

- and its development[J]. *China Food Additives*, 2020, 31(12): 117-121.
- [12] 康巧娟, 华家才, 李琳瑶, 等. 乳脂肪球膜(MFGM)的研究进展及其在婴幼儿配方奶粉中应用[J]. *现代食品*, 2021, 27(18): 31-37.
- KANG Q J, HUA J C, LI L Y, et al. Research progress of milk fat globule membrane and its application in infant formula[J]. *Modern Food*, 2021, 27(18): 31-37.
- [13] 杨梅, 彭秀明, 武俊瑞, 等. 人乳与牛乳乳脂肪球膜蛋白质组的对比研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(8): 284-289, 89.
- YANG M, PENG X M, WU J R, et al. Comparative study on milk fat globule membrane proteomes in human and bovine milk[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(8): 284-289, 89.
- [14] 蒋知坊, 陈甜甜. 食品分析中蛋白质检测技术与应用研究[J]. *中国食品工业*, 2024(16): 107-109.
- JIANG Z F, CHEN T T. Study on protein detection technology and its application in food analysis[J]. *China Food Industry*, 2024(16): 107-109.
- [15] 王雪焦, 廉玮歆, 张心壮. 乳制品中蛋白质含量测定方法的研究进展[J]. *乳品与人类*, 2023(5): 52-59.
- WANG X J, LIAN W X, ZHANG X Z. Research progress on protein content determination methods in dairy products[J]. *Dairy and Humans*, 2023(5): 52-59.
- [16] 陈钦, 周朗君, 陈梓敬, 等. 在线二维液相色谱法同时测定乳制品中乳铁蛋白及免疫球蛋白G[J]. *食品与机械*, 2024, 40(9): 61-65, 98.
- CHEN Q, ZHOU L J, CHEN Z J, et al. Online simultaneous determination of lactoferrin and immunoglobulin G in dairy products by two-dimensional liquid chromatography[J]. *Food & Machinery*, 2024, 40(9): 61-65, 98.
- [17] 李贺, 腾飞. 乳脂肪球膜蛋白组成及其功能特性[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(3): 37-42, 47.
- LI H, TENG F. Composition and functional properties of milk fat globule membrane protein[J]. *China Dairy Industry*, 2022, 50(3): 37-42, 47.
- [18] 景萌娜, 张咚咚, 姜铁民, 等. 基于 NanoLC-Orbitrap MS 技术分析牛乳中的乳脂肪球膜蛋白质[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(4): 244-252.
- JING M N, ZHANG D D, JIANG T M, et al. Analysis of the bovine milk fat globule membrane protein based on NanoLC-Orbitrap MS technology[J]. *Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(4): 244-252.
- [19] 袁明美, 封聪, 王守云, 等. LC-MS/MS 法测定牛乳及其制品中 β -乳球蛋白的含量[J]. *化学研究*, 2017, 28(2): 219-223.
- YUAN M M, FENG C, WANG S Y, et al. Determination of bovine β -lactoglobulin in dairy products by LC-MS/MS[J]. *Chemical Research*, 2017, 28(2): 219-223.
- [20] 胡蓓, 张京顺, 柯星, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿配方奶粉中酪蛋白磷酸肽含量[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 286-291.
- HU B, ZHANG J S, KE X, et al. Determination of casein phosphopeptides in infant formula by HPLC-MS/MS[J]. *Food Science*, 2018, 39(18): 286-291.