

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028030

引用格式:王忠合,李晓婷,胡文梅,等.超高效液相色谱-高分辨质谱法测定肉类特征肽[J].食品与发酵工业,2021,47(18):258-266. WANG Zhonghe, LI Xiaoting, HU Wenmei, et al. Determination of peptide markers of meat species by ultra-high pressure liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 258-266.

超高效液相色谱-高分辨质谱法测定肉类特征肽

王忠合, 李晓婷, 胡文梅, 王军*

(韩山师范学院 食品工程与生物科技学院, 广东 潮州, 521041)

摘要 采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法测定 8 条肉类特征肽, 探讨色谱分离条件、净化方法和质谱参数对特征肽含量测定的影响。采用 C_{18} 柱分离, 以体积分数 0.1% 的甲酸水溶液和乙腈 (含体积分数 0.1% 甲酸) 为流动相梯度洗脱, 电喷雾正离子化检测, 采用飞行时间质谱的准多反应监测模式 (time-of-flight mass spectrometry-pseudo-multiple response monitoring, TOF-MRM) 采集方法定量测定。结果表明, 目标特征肽的母离子带 2 个或 3 个电荷的信号强度高、稳定性好, 二级质谱图中各肽段的碎片离子主要是 y 离子, 且母离子带 3 个电荷的肽段中也有带 2 个电荷的碎片离子, 使用 TOF-MRM 采集模式和目标增益采集数据可增加目标离子的灵敏度。优化后的梯度洗脱条件分离效果非常好, 质谱信号强, 8 条合成肽标准溶液的质量浓度和检测响应的线性关系良好, 其相关系数均大于 0.98; 检出限在 0.19 ~ 1.50 $\mu\text{g/L}$, TOF-MRM 法准确度高, 精密度和重复性均可满足要求。对牛肉丸制品中特征肽含量测定及鉴别发现, 七类样品中共检测出 5 条特征肽, 其种属来源分别为牛肉 2 条、猪肉 1 条、鸡肉 2 条, 这表明测定的牛肉丸样品中不同程度地混有鸡肉或猪肉, 且其混入量不等, 与牛肉丸价格高低无关, 而种属来源为鸭肉的 2 条特征肽未检出, 这表明测定的牛肉丸样品中未混入鸭肉。该文建立了一种肉类特征肽的检测方法, 为肉类蛋白质来源鉴定提供了有力的技术支持。

关键词 肉种属; 肽标志物; 高分辨质谱; 准多反应监测; 确证

近年来, 随着肉类价格差异不断扩大, 不法商家为了追求利益, 借机用价格低廉的鸡肉、马肉、鸭肉、鼠肉等肉类品种伪制牛羊肉制品, 该行为会影响食品安全。这些与价格、原料和宗教等有关的食物掺假事件, 不仅侵害了消费者的权益和食品公平交易, 还严重威胁到了人们的身体健康和宗教信仰^[1-3]。未标识的食品成分往往成为潜在的安全隐患, 如过敏原及有毒成分会影响消费者的健康, 错误的标签也可能会违背特定群体的饮食习惯。对食品的种类、优劣、真伪的鉴别, 尤其是对肉类的鉴别, 均依赖于可靠的检测方法, 基于高分辨质谱的蛋白质组学方法检测蛋白或多肽, 具有灵敏度高、稳定性强等优点, 可以实现多物种的同时测定, 并且能够对物种的特征蛋白或多肽进行明确鉴定, 在鉴别肉类掺假等领域中具有广泛的应用范围。

采用质谱法鉴别肉种属的关键技术就是特征肽段的筛选, 但部分潜在的特征肽段在色谱洗脱中出峰时间太早或太晚甚至残留在柱上, 在质谱检测中部分

特征肽常常以相对低的丰度存在, 而且食品样品的基质复杂, 高丰度的非目标冗余肽段及盐等干扰物质的存在会严重影响质谱信号, 加之基质的抑制作用, 通过质谱检测复杂的食品样品中特定的肽段仍然是一个巨大的挑战。采用高分辨质谱法筛选潜在的特征肽, 三重四极杆质谱法定量测定同位素标记或未标记的肽为肉类掺假检测提供了强有力的支撑, 但是高分辨质谱法筛选出的潜在特征肽并不是都适合作为标记肽, 如采用高分辨质谱法筛选到 7 种潜在的特征肽, 在三重四极杆质谱中的多重反应监测法 (multiple reaction monitoring, MRM) 采集检测中只有 4 种特征肽可检测到^[4], 采用 MRM 法检测时需要保证特征肽可检测出, 信号丰度较好且专属性强。

高分辨率质谱 (high resolution mass spectrometry, HRMS) 已在多个研究领域得到广泛应用, 在目标物筛查以及杂质鉴定中, HRMS 的使用对定性筛查和结构确认产生了革命性影响。虽然三重四极杆质谱仪仍是定量分析的“黄金标准”, 但是随着 HRMS 技术

第一作者: 博士, 副教授 (王军副教授为通讯作者, E-mail: wangjun19811210@163.com)

基金项目: 广东省基础与应用基础研究项目 (2018A0303070006); 广东省教育厅特色创新项目 (2015KTCX088); 广东省科技发展专项资金项目 (2016A020210135); 2020 年度烹饪科学四川省高等学校重点实验室开放基金项目 (PRKX2020Z04)

收稿日期: 2021-05-18, 改回日期: 2021-06-03

的发展,其选择性、动态范围、线性、灵敏度等有了很大的提升,从而提高了 HRMS 在定量分析中的应用。在复杂基质干扰物存在的情况下,三重四极杆质谱仪法将面临极大挑战,而有着与之显著不同特性的 HRMS 数据采集则具有出色的选择性和灵敏度,从而成功实现定量分析。飞行时间质谱平台功能强大的数据采集模式、灵活性和出色的采集速度为科学家们的研究提供极大帮助,特别是具有目标增益功能的飞行时间质谱的准多重反应监测模式 (time-of-flight mass spectrometry-pseudo-multiple reaction monitoring, TOF-MRM)。在这种新的数据采集模式下,四极杆选择母离子,并选择性地在碰撞室中进行碎裂,TOF 可选择性的增加目标碎片的占空比,提高响应和选择性。TOF-MRM 模式可用于完整离子 (母离子 > 母离子,未使用碰撞能) 或碎片离子 (母离子 > 碎片离子,使用碰撞能) 的采集,HRMS 平台定量分析的选择性和灵敏度可大幅提升,从而提高 HRMS 定量分析性能^[5-8]。TOF-MRM 的定量分析功能让科学家们可以使用类似 MRM 的工作流程进行定量分析,拓展了 HRMS 平台在定量分析中的应用,不仅可以进行常规的定性分析,更可直接应用于低检出限 (limit of detection, LOD) 的定量分析。

本实验选取 4 种肉类中的 8 条特征肽为目标物,研究超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法 (ultra-high pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-QTOF MS) 检测参数、色谱分离条件、预处理等参数对特征肽检测的影响,以期建立高效率、高灵敏的肉类制品中特征肽的检测方法,为建立肉类掺假的检测方法提供数据和理论支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

胰蛋白酶 (牛胰腺来源, 10 000 活力单位/mg 蛋白)、正己烷 (色谱级) 等, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 尿素、碳酸氢铵、硫脲、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、碘代乙酰胺、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G250 等试剂 (纯度 ≥ 99%), 固相萃取空柱 (3 mL), 生工生物工程 (上海) 有限公司; 质谱级乙腈、甲酸和甲醇, 美国 Fisher 公司; 氨水 (质谱级), 美国 Waters 公司; 合成肽, 上海强耀生物科技有限公司; 超纯水 (≥ 18 MΩ · cm), 实验室自制; 牛肉、猪肉、鸡肉、鸭肉, 当地超市; 肉丸制品, 当地市场; 亮氨酸脑啡

肽 (质谱级)、CAX 阳离子交换小柱 (3 mL/200mg)、亲水/亲油平衡 (hydrophile-lipophile balance, HLB) 固相萃取柱 (3 mL/200mg), 美国沃特世有限公司; *N*-丙基乙二胺键合固相萃取填料、ENVI-18 固相萃取填料, 美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器与设备

Waters I-Class Plus 超高效液相色谱仪 (由二元泵、柱温箱、自动进样器、脱气机等组成)、Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪 [带电喷雾电离源 (electrospray ionization, ESI)], 美国沃特世有限公司; JY3002 电子天平, 美国梅特勒-托利多仪器有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 巩义市予华仪器有限责任公司; ZX4 漩涡振荡器, 意大利 VELP 公司; JSP-200 型高速多功能粉碎机, 浙江省永康市金穗机械制造有限公司; Milli Q 超纯水机, 美国密理博有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白提取

先将原料肉搅碎, 再称取 0.5 g 肉样于 10 mL 离心管中, 加入 4 mL 提取缓冲液 (0.3 mol/L KCl、0.3 mol/L KH₂PO₄、pH 6.5, 或 6 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、50 mmol/L Tris-HCl), 用旋涡混合器混匀 5 min, 超声处理 30 min, 在室温下于 10 730 × *g* 离心 40 min, 收集上清液, 转移到 10 mL 离心管中并涡旋 1 min。随后, 将提取物在室温下 1 315 × *g* 离心 3 min, 以消除先前步骤中可能产生的泡沫。该上清液即为牛肉蛋白原样液, 采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量, 于 4 °C 下保存。

1.3.2 蛋白酶解

取 0.1 mL 提取液用 0.4 mL 缓冲液混合稀释加入到试管中, 然后加入 2.4 mL 浓度为 30 mmol/L 碳酸氢铵混合均匀, 将提取物在 90 °C 下加热 30 min, 以使溶液中的蛋白质变性, 冷却至室温, 随后添加 50 mmol/L 二硫苏糖醇使其最终浓度为 5 mmol/L。添加 150 mmol/L 碘代乙酰胺使蛋白质烷基化, 最终浓度为 15 mmol/L, 暗处反应 30 min。随后, 添加 1.5 mL 浓度为 1 mg/mL 的胰蛋白酶溶液 (用 30 mmol/L 碳酸氢铵配制), 立即将酶解液涡旋 1 min, 置于 37 °C 酶解 12 h。

1.3.3 肽段纯化

将酶解液过固相萃取柱进行脱盐处理, 先用 3 mL 甲醇洗涤和活化萃取柱, 然后用 3 mL 体积分数 1% 的甲酸平衡。将酶解液过柱, 并用 0.5 mL 体积分数为 1% 的甲酸冲洗柱子, 将洗涤液装入小柱, 以定

量转移样品。然后用 1 mL 体积分数为 1% 的甲酸洗涤小柱。最后,将肽用 3 mL 的乙腈-水混合物(体积比 1:1,含体积分数 0.1% 甲酸)洗脱到离心管中,分 2 次重复洗脱,第 1 次加 2 mL 混合洗脱液,第 2 次加 1 mL 混合洗脱液,在第 1 次洗脱液后,将小柱浸泡 10 min 以使肽完全洗脱^[9]。随后,将全部洗脱液在氮气流中吹干,分析前将纯化物用 0.5 mL 的乙腈-水混合物(体积比 3:97,含 0.1% 甲酸)复溶,涡旋 30 s,过 0.22 μm 滤膜,上机检测。

1.3.4 色谱-质谱条件

色谱条件:色谱柱 Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm),柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样室温度 10 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.2 mL/min;流动相 A 为 0.1% (体积分数)甲酸-水溶液,流动相 B 为 0.1% (体积分数)甲酸-乙腈溶液;梯度洗脱时间分别探讨 15、20、30、35 min,具体洗脱程序如表 1 所示。

质谱条件:正离子(ESI^+)灵敏度模式,毛细管电压 3.0 kV,离子源温度 130 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度 400 $^{\circ}\text{C}$;锥孔气流速 60 L/h,脱溶剂气流速 800 L/h,扫描时间 0.2 s,数据格式为棒状图,一级母离子扫描范围 m/z 为 400 ~ 1 500,二级碎片离子扫描范围 m/z 为 50 ~ 2 000,前 1 min 和后 6 min 的流动相进废液不采集信号;MS/MS 优化采集方法:根据各肽段的理论值(表 2),母离子 m/z 分别固定设为 576.32(pep1)、

554.79 (pep2)、603.34 (pep3)、672.36 (pep4)、573.31 (pep5)、525.28 (pep6)、534.30 (pep7)、563.80 (pep8),不加碰撞能;二级碎片离子碰撞能 CE 值分别设 10、15、20、25、30、35、40 eV。TOF-MRM 定量采集方法:母离子质量数分别设为 384.55(pep1)、554.79 (pep2)、603.34 (pep3)、672.36 (pep4)、573.31 (pep5)、525.28 (pep6)、534.30 (pep7)、376.20 (pep8),并选择目标增益功能;各肽段碎片定量离子和碰撞能采用优化后的值。采用质量锁定技术测定准确质量数,以 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的亮氨酸脑啡肽溶液为锁定质量溶液,流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$,电压为 0.53 kV,每隔 30 s 采集 1 次,在正离子模式下产生 m/z 556.277 1 的离子^[10]。

表 1 液相洗脱程序

Table 1 Gradient elution program employed for the separation of peptides

流动相 B/ %	洗脱时间/min		
	洗脱程序 1	洗脱程序 2	洗脱程序 3
5	0	0	0
5	1	1	1
30	30	20	15
80	35	25	20
80	38	28	23
5	38.1	28.1	23.1
5	40	30	25

表 2 TOF-MRM 测定肉种属用的各特征肽段的信息

Table 2 Details of marker peptides determined by TOF-MRM in meat species determination

编号	肽段序列	m/z (电荷)	碎片离子及电荷	氨基酸位置	蛋白来源	Uniprot 登录号	肉种属
pep1	NALAHALQSAR	576.317 628(2^{+}) 384.547 511(3^{+})	y6 645.367 849 $^{+}$	[1 327, 1 337] [1 329, 1 339] [1 664, 1 675]	Myosin-7 Myosin heavy chain 6 Myosin heavy chain 15	Q9BE39 F1 N2G0 F1MU39	鸡肉 牛肉
			y8 853.463 875 $^{+}$				
			y7 782.426 761 $^{+}$				
			y5 574.330 736 $^{+}$				
			y9 483.777 608 $^{++}$				
pep2	AAIAQAGYTDK	554.785 295(2^{+}) 370.192 622(3^{+})	y7 391.717 019 $^{++}$	[229, 239] [1 037, 1 048]	Beta-enolase Myosin-binding protein C, fast-type	P07332 P16419	鸡肉
			y8 853.405 023 $^{+}$				
			y6 654.309 331 $^{+}$				
			y5 583.272 218 $^{+}$				
			y3 363.187 974 $^{+}$				
pep3	FISLLDELQK	603.342 446(2^{+}) 402.564 056(3^{+})	y8 945.525 138 $^{+}$	[252, 261]	Apolipoprotein A-I	U5YS24	鸭肉
			y6 745.409 046 $^{+}$				
			y5 632.324 982 $^{+}$				
pep4	LADNLDL- GAAAAK	672.361 898(2^{+}) 448.577 024(3^{+})	y6 488.283 262 $^{+}$	[264, 277]	Apolipoprotein A-I	U5YS24	鸭肉
			y9 817.441 408 $^{+}$				
			y8 702.414 465 $^{+}$				
pep5	ALEDQLSELK	573.306 06(2^{+}) 382.539 799(3^{+})	y8 961.483 667 $^{+}$	[1 254, 1 263]	Myosin-I	Q9BE40	牛肉
			y7 832.441 074 $^{+}$				
			y4 476.271 489 $^{+}$				

续表 2

编号	肽段序列	m/z (电荷)	碎片离子及电荷	氨基酸位置	蛋白来源	Uniprot 登录号	肉种属
pep6	YTPVEAIEK	525.279 314(2 ⁺) 350.521 968(3 ⁺)	y7 785.440 346 ⁺ y7 393.223 811 ⁺⁺ y6 688.387 582 ⁺ y5 589.319 168 ⁺	[241, 249]	Complement component C ₉	Q3MHN2	牛肉
pep7	TLAFLFAER	534.297 841(2 ⁺) 356.534 320(3 ⁺)	y7 853.456 664 ⁺ y6 782.419 551 ⁺ y5 635.351 137 ⁺	[619, 617]	Myosin-4	Q9TV62	猪肉
pep8	SALAHVQSSR	563.801 811(2 ⁺) 376.203 633(3 ⁺)	y6 647.347 114 ⁺ y7 784.406 026 ⁺ y7 392.706 651 ⁺⁺	[1 939, 1 949] [1 937, 1 947]	Myosin-1 Myosin-4	Q9TV61 Q9TV62	猪肉

1.3.5 基质效应(matrix effect, ME)评价

分别准确称取牛肉丸样品 9 份,加缓冲液(0.3 mol/L KCl、0.3 mol/L KH₂PO₄、pH 6.5)提取,离心后取上清液过 HLB 柱净化,收集流出液过 0.22 μm 微孔滤膜,作为样品溶液。取净化后的样品溶液 1.6 mL,加入 0.4 mL 的混合标准肽工作溶液至终质量浓度为 2.88 ~ 1 250 μg/L,注入 UPLC-QTOF MS 测定,分别作基质匹配和溶剂外标曲线。ME 以基质匹配标准曲线的斜率与溶剂曲线斜率的比值评定^[11],比值 > 1,表现为基质增强效应;比值 < 1 则为基质抑制效应,用 ME 表示,ME 计算如公式(1)所示:

$$ME/\% = \frac{\text{基质匹配标准曲线斜率}}{\text{溶剂标准曲线斜率}} \times 100 \quad (1)$$

1.4 数据处理

采用 Waters 公司的 MassLynx 4.1 软件,通过提取 MS/MS 采集方法中各通道母离子及碎片离子的质谱图,调节碰撞能量以获得各衍生产物的信号强度高、稳定性好的离子碎片,并筛选出定量离子对。TOF-MRM 定量采集图选用 ApexTrack 的积分方法,适当调整积分参数的方式完成色谱积分,根据质谱图中碎片离子峰的强度进行定量分析^[10]。实验结果以平均值 ± 标准偏差表示,采用 SPSS 17.0 进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为检验标准。

2 结果与分析

2.1 质谱参数的选择

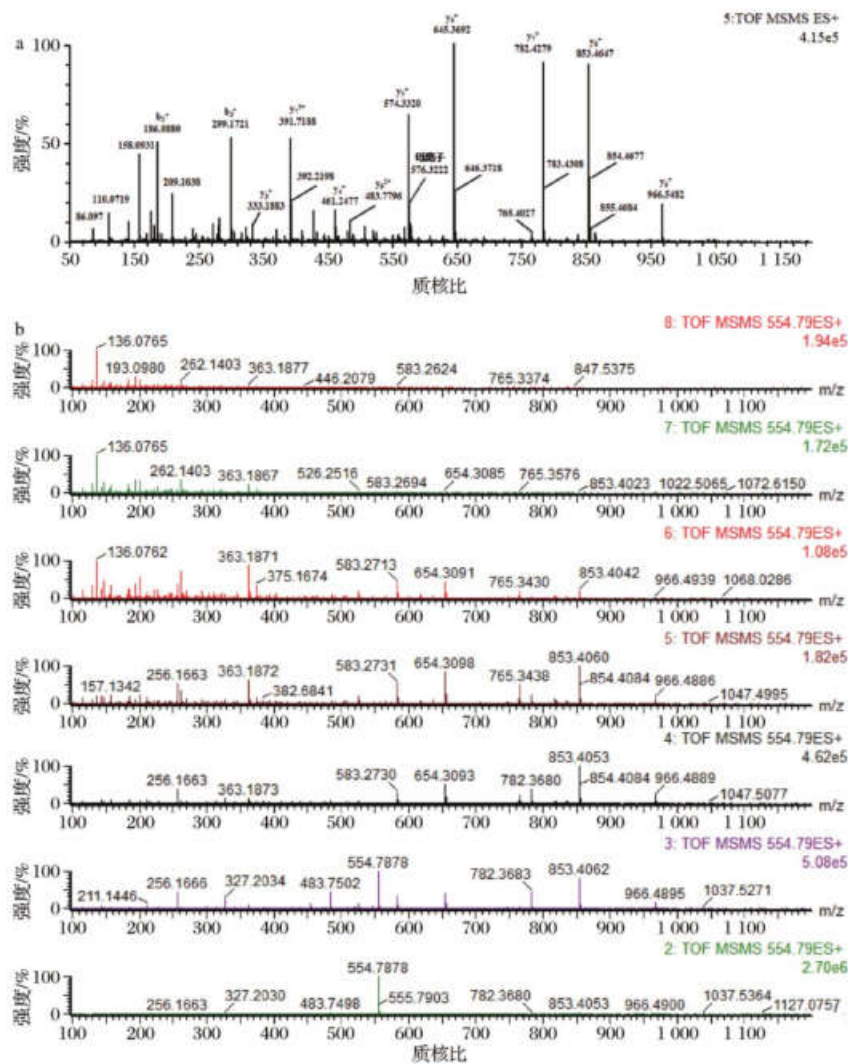
分别取合成肽的母液 1.0 mL,分别加入 3% 乙腈水(含 0.1% 甲酸)复溶液稀释成浓度为 0.1 mg/L 的肽标准溶液,将各肽标准溶液注入进样器中,色谱分离后在正离子模式下进行 MS/MS 扫描,得到各肽的母离子及碎片离子峰的扫描图,如图 1 所示。毛细管电压、锥孔电压和碰撞能量是影响质谱测定结果的重要因素,锥孔电压直接影响各组分的灵敏度^[10],过高

的锥孔电压会导致分子离子在离子源内发生碰撞解离,从而影响母离子的丰度,进而影响检出限和灵敏度。锥孔电压 40 V 且不加碰撞能量下采集的质谱图中各肽母离子带 2 个或 3 个电荷的信号强度高、稳定性好,施加碰撞能量后采集的二级质谱图中各肽段的碎片离子主要是 y 离子,且母离子带 3 个电荷的肽段所得碎片离子中伴有带 2 个电荷的碎片离子形成,如表 3 和图 1-a 所示。各肽段施加不同碰撞能量对碎片离子质谱图的影响如图 1-b 所示,随着施加碰撞能量的增大,各肽段的母离子信号强度降低、碎片离子信号强度增加,如前所述主要以 y 离子形式存在,分别选择 576.32²⁺(pep1)、554.79²⁺(pep2)、603.34²⁺(pep3)、672.36²⁺(pep4)、573.31²⁺(pep5)、525.28²⁺(pep6)、534.30²⁺(pep7)、563.80²⁺(pep8)作为各肽段定量分析的母离子,使用 TOF-MRM 采集模式和目标增益采集数据,该模式下四极杆中选择母离子,仪器的目标增益功能可增加目标离子的灵敏度,从而大大增强了定量分析的灵敏度和选择性。优化后的定量分析的碎片离子和碰撞能如表 3 所示。

2.2 色谱条件的优化

质量浓度为 0.1 mg/L 的肽混合标准溶液 1.0 mL,分别采用 1.3.4 中的 3 种洗脱梯度进行色谱分析,TOF-MRM 质谱模式采集,检测结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,不同梯度洗脱分离的 8 种特征肽的分离效果差异较大,大部分肽的色谱图的峰形较好,各特征肽的信号强度较强,信号稳定,30 min 洗脱程序的分离效果更好,但特征肽 1 和特征肽 6 的分离效果较差,分离度仅为 0.99,而特征肽 7 和特征肽 3 的出峰时间较晚,分离效果非常好,因而可以在此基础上进行优化,压缩前 5 min 和最后 10 min 程序洗脱的时间,拉长中间程序洗脱的时间,优化后的洗脱程序如表 4 所示。



a-碎片离子形成;b-碰撞能优化

图1 肽中碎片离子形成和碰撞能优化

Fig. 1 Fragment ion formation in marker peptides and optimization of collision energy in MS/MS acquisition modes

注:图1-b中2至8通道分别施加10、15、20、25、30、35、40 eV碰撞能

2.3 质谱参数的优化

由图3可以看出,特征肽 pep8 和 pep1 的信号强度较弱,这主要是因为是在 MS/MS 模式下设定带2价电荷的母离子,而 TOF-MRM 模式下 pep8 和 pep1 的母离子有带2价电荷的母离子和带3价电荷的母离子,二者共存,且带3价电荷的母离子的信号强度更大,因而特征肽 pep8 和 pep1 的母离子需要选带3价电荷的离子作为目标母离子,信号强度分别增强3.8和6.6倍,优化后的各特征肽 TOF-MS/MS 图谱如图4所示,分离效果好、信号稳定。

表3 八条特征肽段测定结果

Table 3 Measured results of eight marker peptides

肽段编号	肽段序列	实测 m/z (偏差 ppm)	实测碎片离子 (偏差 ppm)	最优碰撞能/eV
pep1	NALAHALQSAR	576.321 2 ²⁺ (-6.20)	y6 645.369 1+ (-1.94)	25
			y8 853.464 7+ (-0.97)	
			y7 782.427 9+ (-1.46)	
			b0 906.476 0+ (-0.27)	
			y9 483.776 5+ (+2.29)	
			y8 427.237 2+ (+3.80)	
pep2	AALQAQYTDK	554.787 7 ²⁺ (-4.34)	y7 391.718 8+ (+4.55)	25
			y8 853.405 023+ (-0.64)	
			y10 1037.526 4+ (-0.19)	
			y9 966.487 5+ (1.64)	
			y7 782.367 9+ (0.01)	
			y6 654.309 2+ (0.20)	
			y5 583.272 5+ (-0.48)	
			y3 363.187 3+ (1.86)	

续表3

肽段编号	肽段序列	实测 m/z (偏差 ppm)	实测碎片离子 (偏差 ppm)	最优碰撞能/eV
pep3	FISLLDELQK	603.347 1 ²⁺ (-7.71)	y8 945.529 0 + (-4.08)	20
			y7 858.496 4 (-3.83)	
			y6 745.411 8 + (-3.69)	
			y5 632.327 5 + (-3.98)	
pep4	LADNLTGAAAAK	672.365 6 ²⁺ (-5.51)	y6 488.283 6 + (-0.69)	25
			y9 817.442 6 + (-1.46)	
			y8 702.416 7 + (-3.18)	
			y13 615.816 0 + (6.28)	
			y12 580.299 7 + (2.77)	
pep5	ALEDLSELK	573.310 2 ²⁺ (-7.22)	y8 961.483 667 + (-3.57)	20
			y7 832.441 074 + (-4.48)	
			y6 717.416 7 + (-3.58)	
			y5 589.357 9 + (-3.98)	
			y4 476.271 489 + (-2.75)	
pep6	YTPVEAIEK	525.281 7 ²⁺ (-4.54)	y7 785.440 2 + (0.19)	15
			y7 393.225 2 + (-3.53)	
			y6 688.386 2 + (2.01)	
			y5 589.318 1 + (1.81)	
pep7	TLAFLFAER	534.302 5 ²⁺ (-8.72)	y7 853.459 5 + (-3.32)	15
			y8 966.540 6 + (0.13)	
			y6 782.422 5 + (-3.77)	
			y5 635.353 3 + (-3.40)	
			y4 522.270 1 + (-5.80)	
			y3 375.200 5 + (-4.91)	
			b5 546.329 9 + (-2.36)	
			b6 693.397 4 + (-0.54)	
			b8 893.475 3 + (1.60)	
			b4 433.245 3 + (-1.74)	
pep8	SALAHAVQSSR	563.804 1 ²⁺ (-4.06)	y6 647.346 1 + (1.57)	30
			y9 968.530 4 + (-3.30)	
			y8 855.440 7 + (2.85)	
			y7 784.404 9 + (1.44)	
			y5 576.311 1 + (-1.91)	
			y4 477.241 2 + (0.81)	
			b6 551.293 9 + (-0.50)	
			y9 484.768 4 + (-2.39)	
			y8 428.227 1 + (-4.42)	

注:加粗标记的碎片离子为定量离子

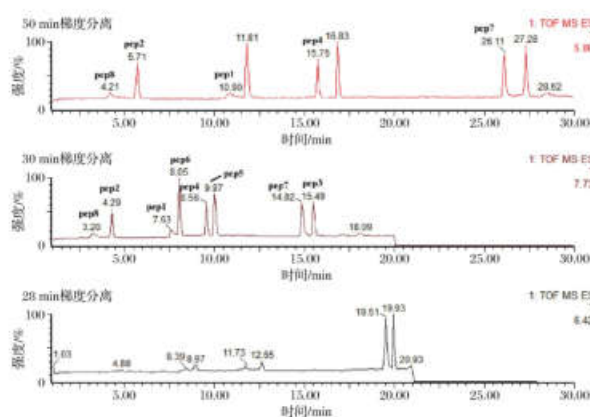


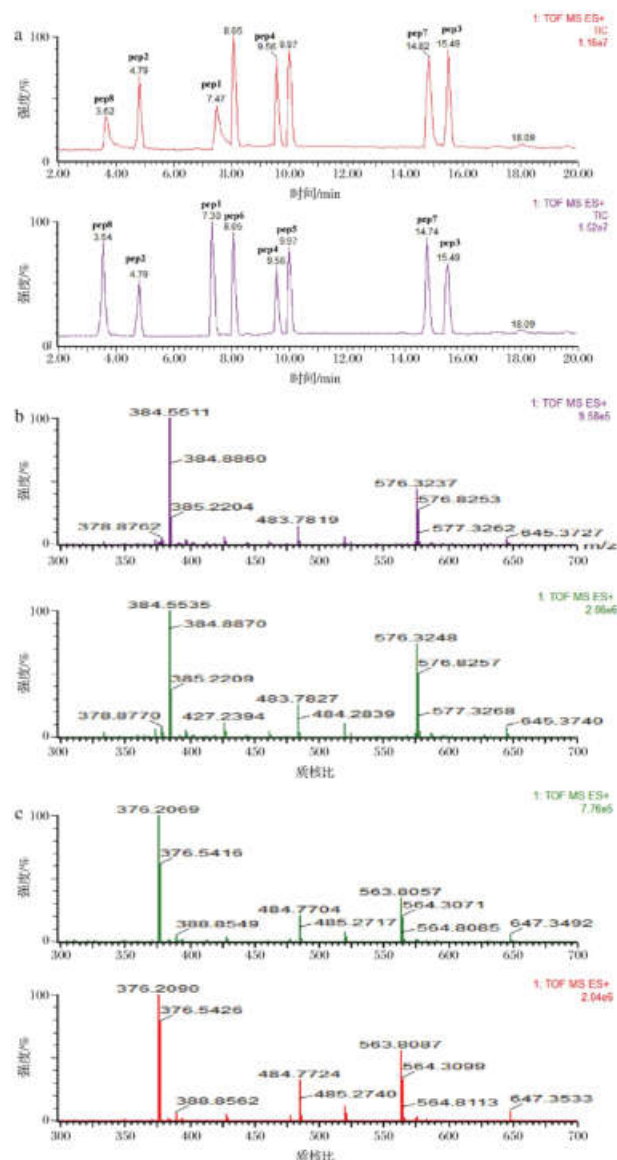
图2 液相色谱梯度洗脱程序的优化

Fig.2 Optimization of gradient elution procedure in liquid chromatography

表4 优化后的8种特征肽液相色谱分离洗脱程序

Table 4 Optimized elution procedure of 8 marker peptides by liquid chromatography separation

流动相 B/%	洗脱时间/min
5	0
5	1
10	5
20	10
30	20
80	25
80	28
5	28.1
5	30



a - 特征肽测定的色谱-质谱图; b - 特征肽 pep1 的母离子质谱图; c - 特征肽 pep8 的母离子质谱图

图3 母离子对 TOF-MRM 定量分析的影响

Fig.3 Effect of parent ions on TOF-MRM quantitative analysis

2.4 方法学考察

移取适量的特征肽混合标准工作溶液,按照 1.3 的方法处理,配制系列浓度的特征肽混合标准溶液测定,各特征肽的检测结果如表 5 所示。由于所添加的 2 种特征肽为样品中的内源性物质,因此标准曲线是在扣除基质本底后绘制而成,其余特征肽可直接绘制标准曲线。LOD 和定量限(limit of quantitation, LOQ)是通过在空白样品中添加目标组分的方法分别依据其特征离子色谱峰的信噪比(S/N)大于 3 和 10 而测定的^[12]。8 种目标特征肽的线性相关系数均大于 0.98,样品中各测定的目标特征肽均在线性范围内。一般情况下,ME 在 85%~115% 时不存在明显的基质效应。据此判断,本检测方法对特征肽 1、3、4 有较

强的抑制效应,而对其他特征肽的基质效应不显著(表 5)。

表 5 特征肽测定的回归方程、检出限、定量限及 ME

Table 5 Regression equation, detection limit, quantitation limit and ME for determination of marker peptides

目标物	回归方程	回归系数 R^2	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	LOD/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	LOQ/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	ME/ %
pep1	$y = 177\,221.1x - 9\,036.7$	0.987 7	2.44~312.5	0.74	2.44	79.0
pep2	$y = 382\,847.4x - 4\,458.7$	0.994 8	4.88~1\,250	1.50	4.88	102.7
pep3	$y = 886\,536x - 13\,832$	0.998 8	2.44~1\,250	0.74	2.44	83.7
pep4	$y = 2 \times 10^6x - 37\,536.5$	0.989 2	4.88~1\,250	0.74	2.44	80.1
pep5	$y = 2 \times 10^6x - 11\,478.4$	0.993 4	2.44~1\,250	0.19	0.63	112.6
pep6	$y = 2 \times 10^6x + 9\,625.6$	0.985 8	2.44~1\,250	0.19	0.63	112.4
pep7	$y = 4\,222.9x - 208.5$	0.985	4.88~1\,250	1.50	4.88	89.3
pep8	$y = 3 \times 10^6x - 135\,002.7$	0.998 4	2.44~1\,250	0.19	0.63	107.6

注: y 为峰强度; x 为标准肽溶液的浓度, $\mu\text{g}/\text{L}$

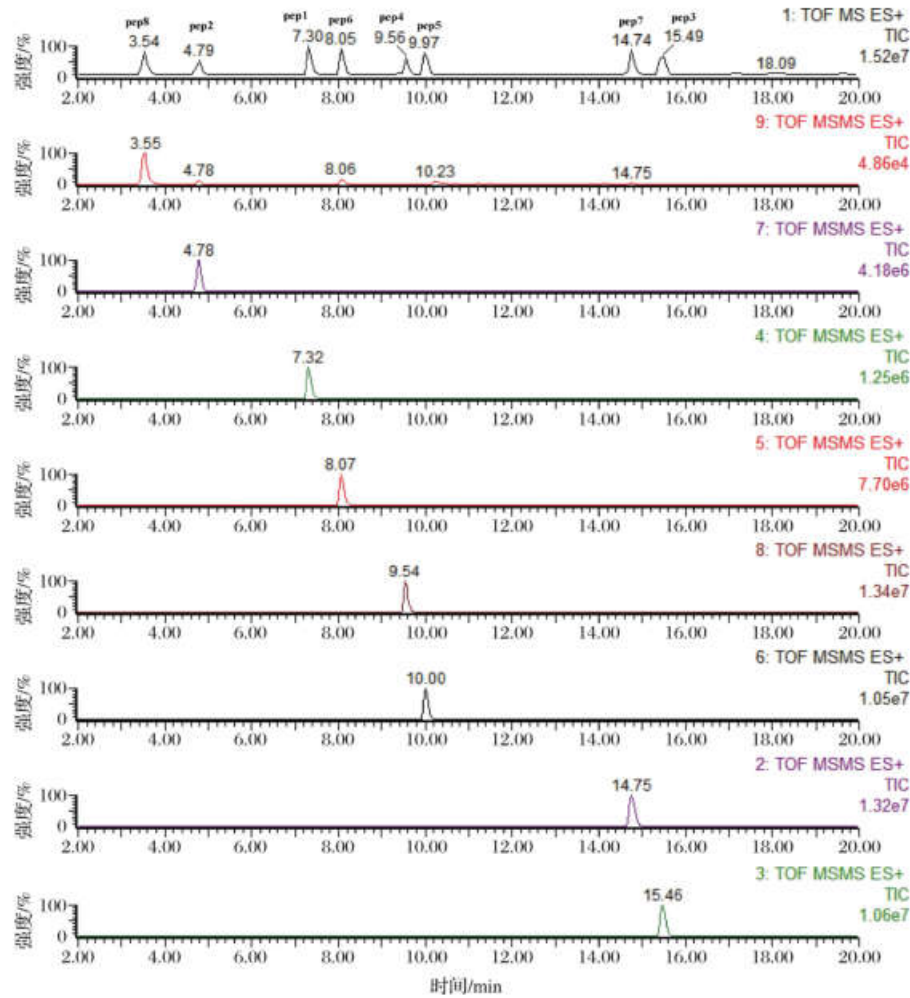


图 4 优化后的肽测定图谱

Fig.4 The optimized peptide chromatogram

2.5 方法的回收率、精密度及其稳定性

移取适量的特征肽混合标准工作溶液,加入到肉样品中,配制低、中、高 3 个质量浓度水平(1、10、50

倍定量限)的添加试验,按照 1.3.1 的方法处理,回收率和精密度实验测定结果如表 6 所示。各特征肽目标物的加标回收率为 61%~102%,相对标准偏差

(relative standard deviations, RSD) < 10%, 可用于肉及肉制品样品中特征肽含量的测定。

表6 样品中特征肽测定的添加回收率及 RSD

Table 6 Recoveries and RSD of marker peptides spiked in meat samples

特征肽	低加标量		中加标量		高加标量	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
pep1	94.4	3.5	93.8	2.4	92.9	1.9
pep2	84.0	5.4	87.9	6.2	91.6	2.5
pep3	90.9	3.2	97.4	5.4	83.5	2.1
pep4	101.4	6.3	72.4	4.2	79.1	5.0
pep5	72.5	8.4	61.3	4.3	80.5	2.3
pep6	89.3	7.9	80.4	2.9	72.4	4.5
pep7	78.3	4.2	77.2	4.1	61.3	7.0
pep8	95.1	6.5	103.5	9.8	98.2	1.5

2.6 实际样品的测定

为了验证所建立分析方法的适用性,对市场上随机抽取的7种价位的35份牛肉丸样品进行检测,结果如表7所示。结果显示,本次抽样筛查的牛肉丸样品中共检出5条特征肽,其种属来源分别为牛肉2条、猪肉1条、鸡肉2条,这表明牛肉丸样品中不同程度地混有其他种类的肉,其混入量不等,与牛肉丸的价格高低无关。鸭肉中的2条特征肽没检出,可能是牛肉丸样品中未混入鸭肉,而另1条猪肉特征肽未测到,可能是与该特征肽在猪不同部位的肉中的分布有关,有待深入探讨,后续论文另有研究报道。并且采用四极杆串联轨道阱中的信息依赖性、信息非依赖性、平行反应模式等采集模式及PCR方法进行对比,测定结果与本方法吻合,进一步证明了所建方法的可靠性。

表7 牛肉丸样品中特征肽测定的结果 单位:mg/g

Table 7 Determination of marker peptides in beef meatballs

牛肉丸 样品	pep1	pep2	pep3	pep4	pep5	pep6	pep7	pep8
1	1.05 ± 0.03	2.59 ± 0.14	/	/	2.89 ± 0.31	2.12 ± 0.23	/	/
2	1.18 ± 0.06	2.36 ± 0.09	/	/	2.68 ± 0.26	1.97 ± 0.19	/	/
3	0.69 ± 0.02	2.22 ± 0.18	/	/	2.72 ± 0.23	1.99 ± 0.28	/	/
4	0.30 ± 0.01	/	/	/	1.59 ± 0.16	1.18 ± 0.09	/	2.59 ± 0.04
5	1.51 ± 0.09	2.65 ± 0.20	/	/	3.11 ± 0.09	2.28 ± 0.17	/	/
6	0.78 ± 0.05	0.77 ± 0.08	/	/	2.39 ± 0.16	2.48 ± 0.11	/	/
7	0.63 ± 0.02	/	/	/	1.56 ± 0.23	1.16 ± 0.16	/	2.84 ± 0.49

3 结论

8条目标特征肽的母离子带2个或3个电荷的信号强度高、稳定性好,施加碰撞能量后采集的二级质谱图中各肽段的碎片离子主要是y离子,且母离子带3个电荷的肽段所得碎片离子也有带2个电荷的碎片离子,使用TOF-MRM采集模式和目标增益采集数据可增加目标离子的检测灵敏度,从而大大增强了定量分析的灵敏度和选择性。优化后梯度对8条特征肽的洗

脱分离效果非常好,特征肽8和特征肽1的母离子选带3价电荷的离子,优化后的质谱信号稳定、检出限低,相关系数在0.99左右,各特征肽目标物的加标回收率为61%~102%,RSD<10%,可用于肉及肉制品中特征肽含量的测定及肉类掺假鉴别。市场上7种价位的牛肉丸中共检出5条特征肽,其中2条来源于鸡肉、1条来源于猪肉,这表明牛肉丸样品中不同程度地混有鸡肉或猪肉,且其混入量不等、与价格高低无关,这进一步证明了所建方法的可靠性与可应用性。

参 考 文 献

- [1] MEDINAS, PERESTRELO R, SILVA P, et al. Current trends and recent advances on food authenticity technologies and chemometric approaches[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 85(3): 163-176.
- [2] BÖHME K, CALO-MATA P, BARROS-VELÁZQUEZ J, et al. Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 110(1): 221-232.
- [3] PREMANANDH J. Horse meat scandal-A wake-up call for regulatory authorities[J]. Food Control, 2013, 34(2): 568-569.
- [4] SARAH S A, FARADALILA W N, SALWANI M S, et al. LC-QTOF-MS identification of porcine-specific peptide in heat treated pork identifies candidate markers for meat species determination[J]. Food Chemistry, 2016, 199(5): 157-164.
- [5] KIM K H, AHN Y H, JI E S, et al. Quantitative analysis of low-abundance serological proteins with peptide affinity-based enrichment and pseudo-multiple reaction monitoring by hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 882(4): 38-48.
- [6] WATSON A D, GUNNING Y, RIGBY N M, et al. Meat authentication via multiple reaction monitoring mass spectrometry of myoglobin peptides[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(20): 10315-10322.
- [7] KIM G-D, SEO J-K, YUM H-W, et al. Protein markers for discrimination of meat species in raw beef, pork and poultry and their mixtures[J]. Food Chemistry, 2017, 217(2): 163-170.
- [8] NALAZEK-RUDNICKA K, KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA I, WASIK A, et al. MRM-MS of marker peptides and their abundance as a tool for authentication of meat species and meat cuts in single-cut meat products[J]. Food Chemistry, 2019, 283(6): 367-374.
- [9] 古淑青, 詹丽娜, 赵超敏, 等. 基于液相色谱-串联质谱法的肉类特征肽段鉴别及掺假测定[J]. 色谱, 2018, 36(12): 1269-1278.
- [10] GU S Q, ZHAN L N, ZHAO C M, et al. Identification of meat marker peptides and detection of adulteration by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(12): 1269-1278.
- [11] 王忠合, 李晓婷, 胡文梅, 等. 超高压液相色谱-高分辨质谱法检测单丛乌龙茶中氨基酸[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(21): 207-214.
- [12] WANG Z H, LI X T, HU W M, et al. Determination of amino acids in Oolong tea by ultra-high pressure liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(21): 207-214.
- [13] PRANDI B, VARANI M, FACCINI A, et al. Species specific

marker peptides for meat authenticity assessment: A multispecies quantitative approach applied to Bolognese sauce[J]. Food Control, 2019, 97(10):15–24.

[12] VON BARGEN C, DOJAHN J, WAIDELICH D, et al. New sensi-

tive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in Halal beef [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(49): 11 986–11 994.

Determination of peptide markers of meat species by ultra-high pressure liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry

WANG Zhonghe, LI Xiaoting, HU Wenmei, WANG Jun*

(College of Food Engineering and Biotechnology, Chaozhou 521041, China)

ABSTRACT Eight marker peptides in meat were identified and quantitatively determined by ultra-high pressure liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, and the effects of chromatographic separation conditions and mass spectrometry parameters on the determination of marker peptides in meat were investigated. The samples were separated by a C_{18} column, and gradient elution was performed with 0.1% formic acid in water and acetonitrile (containing 0.1% formic acid) as mobile phase. Then, the electrospray positive ion mode (ESI^+) was used to detect the marker peptides, and quantitative analysis and data collection were performed by pseudo-multiple reaction monitoring by time-of-flight mass spectrometry (TOF-MRM). Results showed that the parent ions of the targeted marker peptides had a 2^+ or 3^+ charge, which showed high signal intensity and good stability. And the fragment ions of each marker peptide in the mass spectrometry was mainly y ion. Moreover, the fragment ions with 3^+ charge were accompanied by the formation of 2^+ charges. The TOF-MRM acquisition mode and target enhancement increased the detection sensitivity of target ions. Under the optimized conditions, the separation of 8 marker peptides was good and the mass signals were strong. There was a good linear relationship between the concentration of 8 marker peptides standards and detection response, and the correlation coefficients were greater than 0.98. The limit of detection (LOD) for analysts was in the range of 0.19–1.50 $\mu\text{g/L}$, and the optimized TOF-MRM method was successfully applied to the analysis of marker peptides in meat samples due to the high accuracy, precision and repeatability. The application of marker peptides on 7 class beef meatball products showed that five marker peptides could be detected including 2 beef, 1 pork and 2 chicken meat, which indicated that cheaper chicken or pork was spiked in beef meatball samples. The abundance of marker peptides had no correlation with the price. However, no duck-specific marker peptides were found. The established species-specific peptide detection method provided powerful technical support for the identification of protein species origin.

Key words meat species; marker peptides; high resolution mass spectrometry; pseudo-multiple reaction monitoring; authentication