

液相色谱串联质谱对掺假牛肉的鉴别及定量研究

张颖颖, 赵文涛, 李慧晨, 马燕红, 郭文萍, 李莹莹

(中国肉类食品综合研究中心, 北京 100068)

摘要: 本文以差异蛋白质组学为理论研究基础, 利用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)实现了对猪肉或鸡肉掺假的牛肉的定性鉴别及定量分析。首先采用高分辨质谱仪(nLC-QE)分别找出牛肉、猪肉和鸡肉的相对专属性多肽链, 并对其进行二级扫描, 得到了三个物种的特异性离子对, 进一步利用 HPLC-MS/MS 的多反应监测模式(MRM)对掺杂猪肉或鸡肉的牛肉进行特异性离子对验证, 分别选择了牛肉、猪肉和鸡肉的 9、8 和 7 条多肽进行定性研究; 并与聚合酶链式反应(PCR)技术进行比对, 得到的结果一致; 此外将鸡肉和猪肉以 0.5、1.0、5.0、10.0、25.0%的比例掺杂于牛肉中, 各选择 3 组离子对进行定量分析, 其各自的线性相关系数均大于 0.99, 最低定量限为 0.5%。由此表明, 液相色谱串联质谱的方法可以快速地对牛肉中的猪肉和鸡肉进行鉴别并能准确定量分析。

关键词: 质谱; 物种掺假; 多肽检测; 定量分析

文章编号: 1673-9078(2017)2-230-237

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.035

Identification and Quantification of Adulterated Beef by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Ying-ying, ZHAO Wen-tao, LI Hui-chen, MA Yan-hong, GUO Wen-ping, LI Ying-ying

(China Meat Research Center, Beijing 100068, China)

Abstract: Differential proteomics was used as the basis for theoretical study, while high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was employed to identify and quantify beef adulterated with pork and chicken. First, polypeptides relatively specific to beef, pork, and chicken were identified using a high-resolution mass spectrometer (nLC-QE), followed by product ion scan to determine the specific ion pairs in the three types of meats. These specific ion pairs were then detected in the beef adulterated with pork or chicken using HPLC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode, and a qualitative study was carried out using nine, eight, and seven quantitative peptides from beef, pork, and chicken, respectively. The results were compared with those obtained from polymerase chain reaction (PCR), and the results were found to be consistent with each other. Chicken and pork were blended in beef in proportions of 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, and 25.0%, and three quantitative peptides specific to each type of meat were selected to perform the quantitative analysis. The linear correlation coefficient for each quantitative ion pair was more than 0.99, and the limit of quantitation was 0.5% blending. The results showed that the HPLC-MS/MS method can quickly and efficiently identify pork and chicken in beef, and can be used for accurate quantitative analysis.

Key words: mass spectrometry; species adulteration; peptide detection; quantitative analysis

2013年5月8日, 国务院总理李克强在国务院主持常务会议时特别提出“严厉打击肉类产品掺假售假等违法违规行为”。这从侧面反映出, 国内的肉类掺假事件已不是个别现象了。在国内居民餐桌上, 肉种以牛肉、猪肉和鸡肉居多, 但由于猪肉和鸡肉的价格较牛肉便宜, 个别商贩用猪肉或鸡肉替代牛肉出售以牟取暴利, 不仅影响市场公平, 损害消费者利益, 还影响部分信仰宗教的居民的日常饮食^[1]。

随着蛋白质组学的研究发展, 相关的蛋白表达技

收稿日期: 2016-01-23

作者简介: 张颖颖(1990-), 女, 硕士, 研究方向: 食品安全与检测

通讯作者: 李莹莹(1984-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品安全与检测

术已基本成熟, 为解决物种掺假问题提供了一种新思路。通过高分辨质谱技术寻找不同物种的相对专属性多肽, 再利用三重串联四级杆液质进行定性及定量, 能够避免其他物种鉴别方法-凝胶电泳^[2]、酶联免疫法(ELISA)^[3]和聚合酶链式反应(PCR)^[4,5]的不足, 即凝胶电泳检出限高; ELISA对相近物种易发生交叉反应而造成假阳性问题^[6]; PCR所测定的DNA链在肉类加工过程中易降解^[7,8], 痕量定量分析不足^[9]及复杂基质干扰^[10]等问题。其优点包括: 不受食品加工的影响, 因为多肽的稳定性较DNA链强^[11]; 通过多条肽链进行定性和定量, 既能保证结果的准确性, 又可避免假阳性现象; 样品处理相对简单, 可实现多个物种同时

测定。

本实验室已利用该方法实现了 HPLC-MS/MS 对鸭肉掺假羊肉的鉴别及定量分析,并得到了良好的结果^[12]。本文主要针对国内食用量较大的牛肉、猪肉和鸡肉的掺假样品进行定性及定量研究,并应用于实际样品检测,其结果与 PCR 一致。该方法的线性关系良

好,最低可定量至 0.5%的掺假,灵敏度高,检出限低,可用于日常食品检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表 1 样品来源

Table 1 Sample source

样品类型	序号	样品名称	公司
猪肉	1	湘村黑猪肉	北京湘村高科生态农业有限公司
	2	猪肉	四川省绵竹市德康生猪养殖有限公司
	3	壹号土猪	广东壹号食品股份有限公司北京分公司
牛肉	1	牛肉	河北大厂回族自治县福盛源肉类有限公司
	2	祁连牦牛	青海祁连县有机畜牧业办公室
鸡肉	1	鸡肉	河北大厂回族自治县福盛源肉类有限公司
	2	草原兴发绿乌鸡	高碑店市双双合盛养殖有限责任公司

胰蛋白酶为测序级(美国 Promega 公司),二硫苏糖醇(DTT)为生化级(美国 Promega 公司);碘乙酰胺(IAA)及三氟乙酸(TFA)均为生化级(美国 Sigma 公司);甲酸、乙酸(HAC)及乙腈(ACN)均为色谱纯(德国 Merck 公司);HLB 固相萃取柱(美国 waters 公司);尿素、硫脲及盐酸均为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司)。

生鲜猪肉、牛肉和鸡肉购买于不同产地的公司,见表 1。

1.2 仪器与设备

液质联用高分辨系统(美国 Thermo Fisher 公司),配有 EasynLC 1000 液相系统和 Q Exactive HF 质谱平台;液质联用三重串联四极杆系统 TSQ ultra EMR 液相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo Fisher 公司),配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur 1.2 数据处理系统;往返式水浴恒温摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司);Ultra-Turrax T25 均质器(德国 IKA 公司);20PR-520 离心机(日本 Hitachi 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备^[13]

样品制备分为三步:蛋白提取、酶解和除盐。

蛋白提取:准确称取 2 g 绞碎肉样,加入 5 mL 提取溶液(0.05 mol/L Tris-HCl, 7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, pH 8.0),冰水浴下均质,再以 5 mL 提取溶液清洗刀头,合并溶液,涡旋,4 °C、12000 r/min 离心 20 min。

酶解:取上清液用紫外法测定提取溶液中的蛋白

含量,移取适量上清液,加入 DTT 溶液,涡旋(混合溶液中 DTT 的浓度为 5 mmol/L),56 °C 振荡反应 1 h;放置室温后,加入 IAA 溶液,涡旋混匀(溶液中 IAA 的浓度为 10 mmol/L),暗处反应 30 min;取出,加入 DTT 溶液(最终浓度为 5 mmol/L),暗处反应 15 min;加入 5~6 倍溶液体积的缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0);按照蛋白/胰蛋白酶为 50/1 的比例加入胰蛋白酶溶液,调节 pH 为 8.0、37 °C 过夜反应。

除盐:放置室温后,用 0.5% TFA 调节 pH<2,以终止酶解反应。依次用乙腈、50%乙腈/水和 0.1% TFA 活化 HLB 固相萃取柱,上样,依次用 3~5 倍柱体积的 0.1% TFA、2 倍柱体积的 0.5% HAC 淋洗,之后用 1 mL、60% ACN+0.5% HAC 洗脱,过 0.22 μm 滤膜,待分析。

1.3.2 高分辨液质联用仪^[12]

1.3.2.1 仪器条件

表 2 nLC-QE 流动相及梯度洗脱程序

Table 2 Mobile phase and elution gradient program for

nLC-QE		
t/min	A phase (0.1% FA)	B phase (0.1% ACN)
0	97	3
2	92	8
48	78	22
53	60	40
55	20	80
59	20	80
61	100	0
65	100	0

色谱条件: C₁₈ 色谱柱,内径 75 μm,流动相及梯

度洗脱见表 2。

质谱条件: 喷雾电压 2100 V, 毛细管温度 275 °C, Full Scan 分辨率 60000, 扫描质量范围为 350~1600, AGC 值为 1E6, IT 时间为 50 ms, 二级扫描, topN 为 30, 分辨率为 15000, AGC 值为 1E5, IT 时间为 60 ms, NCE 为 27。

1.3.2.2 数据分析

用 Maxquant 对肉类样品进行了非标记定量分析, 检索数据库为 Uniprot 全库, 最多漏切位点设为 2, 可变修饰为 Oxidation (Methionine), Acetylation (Protein N-term), 固定修饰为 Carbamidomethyl (Cysteine)。勾选异亮氨酸等于亮氨酸设置 (I=L), peptide for quantitation 选择 all。其他参数为 Maxquant 默认值。

1.3.3 液质联用三重串联四极杆质谱分析^[12]

1.3.3.1 仪器条件

色谱条件: 色谱柱 Hypersil GOLD C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm); 流速 0.2 mL/min; 柱温 40 °C, 进样量 50 μL; 流动相及梯度洗脱程序见表 3。

质谱条件: 喷雾电压 3500 V; 鞘气 38 Arb; 辅气 15 Arb; 离子传输管温度 275 °C; 离子源雾化温度 380 °C; 采集周期为 0.3 s; 碰撞气为 1.5 mTorr; Q1

和 Q3 分辨率都为 0.7。

表 3 HPLC-MS/MS 流动相及梯度洗脱程序

Table 3 Mobile phase and gradient elution program for HPLC-MS/MS

t/min	A phase (0.1% FA/H ₂ O)	B phase (0.1% FA/ACN)
0	97	3
0.2	90	10
16	60	40
17	20	80
17.5	20	80
18.5	97	3
20	97	3

1.3.3.2 定性分析

通过 nLC-QE 找出牛肉、猪肉及鸡肉每个物种的特征性多肽, 进行二级扫描后得到离子对与碰撞能量信息, 生成最后的采集方法。将该采集方法导入 HPLC-MS/MS 中, 对牛肉、猪肉、鸡肉分别进行 MRM 扫描, 通过对比每组离子对的保留时间、响应强度等, 对每个物种的特异性离子对进行筛查, 以确定定性及定量离子对。该方法的离子对信息见表 4。

表 4 牛肉、猪肉及鸡肉 MRM 采集参数

Table 4 MRM parameters of beef, pork, and chicken

肽段编号	母离子	子离子	离子丰度比	保留时间	离子模式	碰撞能量
beef_1	475.76	608.71	32	8.53	+	19
	475.76	709.82*	100	8.53	+	19
	475.76	808.95	35	8.53	+	19
beef_2	582.67	494.56	14	8.83	+	23
	582.67	595.67	17	8.83	+	23
	582.67	952.04*	100	8.83	+	23
beef_3	663.79	407.53	28	11.28	+	26
	663.79	563.71	6	11.28	+	26
	663.79	662.84*	100	11.28	+	26
beef_4	681.78	446.52	80	14.57	+	26
	681.78	674.77	64	14.57	+	26
	681.78	787.92*	100	14.57	+	26
beef_5	744.37	446.52	24	8.64	+	29
	744.37	604.68	43	8.64	+	29
	744.37	760.86*	100	8.64	+	29
beef_6	784.86	425.46	65	13.24	+	30
	784.86	554.58	30	13.24	+	30
	784.86	717.75*	100	13.24	+	30
beef_7	831.92	522.59	45	12.64	+	32
	831.92	621.73*	100	12.64	+	32

转下页

接上页						
	831.92	736.81	25	12.64	+	32
	902.01	487.53	94	11.30	+	34
beef_8	902.01	558.61	87	11.30	+	34
	902.01	744.77*	100	11.30	+	34
	1023.10	449.48*	100	11.46	+	35
beef_9	1023.10	520.56	48	11.46	+	35
	1023.10	736.75	40	11.46	+	35
	470.75	496.58*	100	3.72	+	19
pig_1	470.75	611.67	38	3.72	+	19
	470.75	698.75	36	3.72	+	19
	536.78	587.65	25	7.13	+	22
pig_2	536.78	644.70	100	7.13	+	22
	536.78	830.91*	52	7.13	+	22
	547.32	487.62*	100	8.46	+	22
pig_3	547.32	624.75	36	8.46	+	22
	547.32	737.91	56	8.46	+	22
	658.21	416.50	15	6.44	+	26
pig_4	658.21	602.66	87	6.41	+	26
	658.21	659.71*	100	6.44	+	26
	676.81	407.53	10	11.32	+	26
pig_5	676.81	520.69	41	11.32	+	26
	676.81	847.08*	100	11.32	+	26
	717.86	559.72	28	15.07	+	28
pig_6	717.86	672.88	27	15.07	+	28
	717.86	1172.40*	100	15.07	+	28
	879.98	484.61	34	8.94	+	33
pig_7	879.98	680.86	5	8.94	+	33
	879.98	777.98*	100	8.94	+	33
	941.60	475.56*	100	18.39	+	35
pig_8	941.60	574.69	22	18.39	+	35
	941.60	702.82	28	18.36	+	35
	609.67	418.43	18	9.93	+	24
chicken_1	609.67	531.58	25	9.93	+	24
	609.67	727.83*	100	9.93	+	24
	718.37	448.45*	100	8.00	+	28
chicken_2	718.37	549.56	29	8.00	+	28
	718.37	680.75	70	8.03	+	28
	783.40	498.56*	100	5.60	+	30
chicken_3	783.40	629.76	42	5.60	+	30
	783.40	972.15	58	5.60	+	30
	794.93	407.53	80	10.49	+	30
chicken_4	794.93	520.69*	100	10.49	+	30
	794.93	664.82	74	10.49	+	30

转下页

接上页						
	812.36	502.59	72	6.95	+	31
chicken_5	812.36	617.67	46	6.95	+	31
	812.36	817.87*	100	6.95	+	31
	833.91	506.62*	100	7.33	+	32
chicken_6	833.91	634.75	10	7.38	+	32
	833.91	781.92	5	7.36	+	32
	1061.71	505.59	4	13.71	+	35
chicken_7	1061.71	576.67	32	13.69	+	35
	1061.71	689.82*	100	13.71	+	35

注: *表示每个物种的定量离子。

1.3.3.3 定量分析

将猪肉、鸡肉及牛肉分别提取的多肽溶液按照猪、鸡的比例为 0.5%、1.0%、5.0%、10.0%和 25.0%依次进行混合,通过 HPLC-MS/MS 的 MRM 扫描,绘制每组定量离子的标准曲线。分别以多肽混合比例为横坐标,以所选取的猪肉、鸡肉或牛肉的多肽选择离子峰面积为纵坐标,进行曲线拟合。对一定比例的混合肉样按照 1.3.1 的样品制备方法进行制备,测得的数据带入标准曲线进行计算,从而得出各肉种的掺入比例。

2 结果与讨论

2.1 样品处理条件的优化

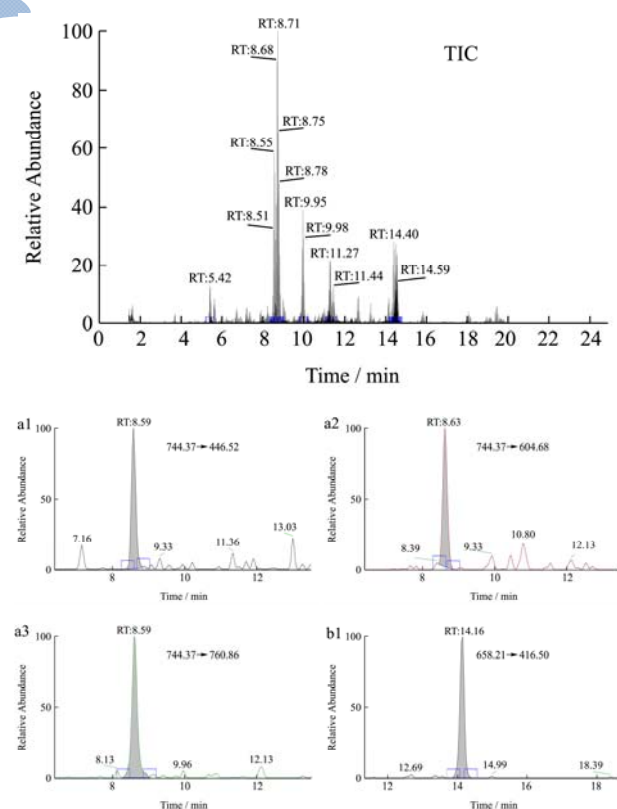
蛋白提取: 肉类样品基质复杂,需优化提取溶液以最大化地提取蛋白。高浓度的尿素能有效地使蛋白质变性,尤其破坏非共价键结合的蛋白质,可以提高蛋白质的可溶性;而加入硫脲,两者联合发挥协同作用,更增强了溶解疏水蛋白质的能力;此外,蛋白质变性后,打开多肽链成为无规构象,也便于后续溶剂接近基团进行反应。冰水浴中均质,既破坏组织细胞,释放蛋白,又可尽量减少细胞内的酶解反应。

蛋白酶解: 离心后,为保证 LC-MS/MS 的最终上样量为 40~50 μg ,需测定提取溶液中蛋白的含量以判定蛋白移取量。为便于后续蛋白酶解,需打开蛋白的三维结构,即加入 DTT 来还原蛋白体系中的双硫键,生成巯基,常温下需几个小时才能完全反应,因此通过提高反应温度至 56 $^{\circ}\text{C}$ 来加快反应速率,但是温度不能高于 60 $^{\circ}\text{C}$,避免赖氨酸与蛋白 N-末端发生氨甲酰化。而还原后的蛋白很不稳定,极易氧化至双硫键,为避免巯基氧化,并促使反应向预计的方向发展,通过加入 IAA 与巯基反应生成稳定基团来实现。IAA 首先会与蛋白分子中的巯基发生反应,因此只要保证 IAA 的浓度大于蛋白中的巯基的浓度,反应即会向正方向发展,因此加入的 IAA 的浓度是 DTT 的 2 倍。

IAA 见光易分解,且分解物会对蛋白产生不良影响,因此需要避光反应,最好用锡箔纸包住反应容器。反应结束后,再加入 DTT 淬灭 IAA 反应,IAA 在溶液中是多量,通过 IAA 与 DTT 反应来终止整个反应。酶解之前,按 5~6 倍稀释溶液,以降低提取液中尿素的浓度,避免其促使胰蛋白酶发生变性。根据移取的蛋白量,按照蛋白:酶为 50:1 (质量比) 的比例添加胰蛋白酶,过夜反应。

除盐: 提取溶液中的 Tris 盐是不能进入质谱体系的,因此通过 HLB 固相萃取柱除去盐类。

2.2 高效液相色谱串联质谱对不同物种的异性离子对的筛查



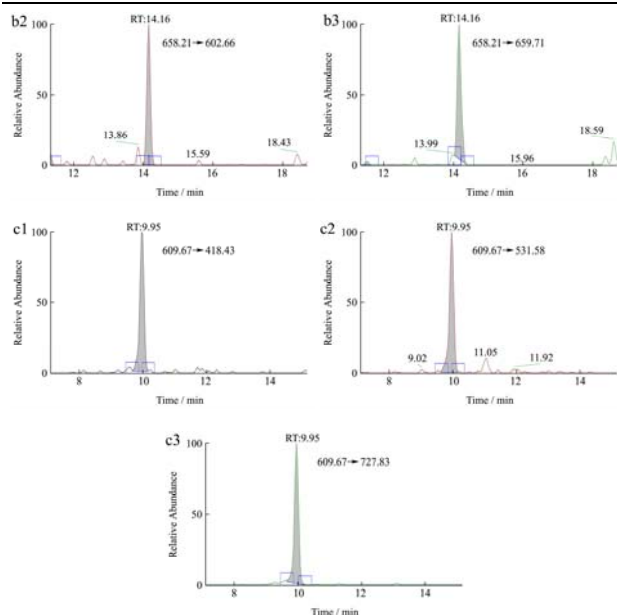


图1 牛肉、猪肉与鸡肉总离子流图和提取离子流图

Fig.1 TIC and MRM chromatograms of beef, pork, and chicken

注: a1~a3 为 Beef_5, b1~b3 为 Pig 4, c1~c3 为 Chicken_1

高分辨质谱的分辨率高, 能够得到准确的质量数, 即每个碎片的分子式, 通过谱库检索, 便可知母离子的结构, 因此需用高分辨质谱来采集物种的相对专属性多肽, 最终鉴定到的各个物种相对于其他物种专属性的多肽条数为: 鸡 339 条, 猪 426 条, 牛 337 条。三重串联四级杆液质联用仪的分辨率低, 不能进行新物质研究, 但是其定量准确, 普及度相对较高, 便于日常食品检测, 因此将 nLC-QE 采集的数据应用在 HPLC-MS/MS 中, 对掺假样品进行定性及定量分

析。而在 nLC-QE 所获得的物种特异性离子对, 应用在 HPLC-MS/MS 时, 由于分辨率、离子源等仪器条件的不同, 会造成保留时间及响应值等的差异, 因此本文在进行肉类掺假实验前对已筛选的离子对进行确认。通过考察每组特异性离子对的保留时间、子离子匹配度及响应强度, 猪、牛和鸡分别选择了 25、23、22 组特异性离子对, 再经过多种不同物种样品的实验确认, 选择各物种所测样品中均存在的离子对信息, 最终牛肉、猪肉和鸡肉分别以 9、8 和 7 组特异性离子对作为定性离子对, 因此当各物种所有的特异性离子对均存在时, 才能准确说明该物种的存在性。此外在定性离子对中筛选响应强度高、线性好的离子对应用于定量分析, 且为避免由于复杂基质干扰而影响多肽定量, 最终各物种分别选择了 3 组离子对作为定量离子对 (见表 4), 且对实际样品进行定量时, 应取各物种三个多肽结果的平均值作为最终结果。图 1 分别为牛肉、猪肉及鸡肉的总离子流图 (TIC 图), 以及多肽 beef_5、pig_4 与 chicken_1 的三个子离子的选择离子流图。

2.3 方法的线性和灵敏度

按照 1.3.1 中的样品制备方法, 将分别制备的牛肉、猪肉和鸡肉的多肽溶液, 按照猪肉、鸡肉分别为 0.5、1.0、5.0、10.0 及 25.0% 的比例进行混合, 利用 MRM 扫描方法, 按照表 4 中的离子分别进行定性和定量。通过表 5 可知, 所选择的 9 组离子对线性关系良好, 其线性相关系数均达到 0.99 以上, 最低可以定量至 0.5% 的猪肉和鸡肉掺假, 灵敏度较高。

表 5 定量分析选择的离子对信息以及线性关系

Table 5 Ion-pair information for quantitative analyses and linear relationships

肽段编号	母离子	定量离子	定性离子	线性方程	线性相关系数
Pig_3	547.32	487.62	624.75; 737.91	$Y=4423.08+18281.6*X$	0.9976
Pig_6	717.86	1172.40	559.72; 672.88	$Y=74645.5+141367*X$	0.9962
Pig_7	879.98	777.98	484.61; 680.86	$Y=-8926.05+50892.1*X$	0.9986
Chicken_1	609.67	727.83	418.43; 531.58	$Y=-5562.16+209382*X$	0.9993
Chicken_4	794.93	520.69	407.53; 664.82	$Y=3894.05+3280.42*X$	0.9996
Chicken_6	833.91	506.62	634.75; 781.92	$Y=5971.12+1928.28*X$	0.9957
Beef_4	681.78	787.92	446.52; 674.77	$Y=51414.4+9157.87*X$	0.9998
Beef_7	831.92	621.73	522.59; 736.81	$Y=45274+5724.16*X$	0.9988
Beef_8	902.01	744.77	487.53; 558.61	$Y=-75716.2+5171.49*X$	0.9992

2.4 方法准确性

为了考察该方法的准确性及抗干扰性, 将猪肉、鸡肉、鸭肉及牛肉按照一定的比例称样, 采用 1.3.1 的方法进行样品制备, 利用表 5 的线性来计算各肉种

的回收率, 见表 6, 其每组定量离子的回收率均在 90~125%。此外添加鸭肉后, 在分析猪、鸡和牛时也未出现干扰离子。由此说明该方法的准确性较高, 抗干扰能力强, 可以用于牛肉中猪肉和鸡肉的定量分析检测。

表6 混合肉样中各种成分含量测定结果

Table 6 Percentages of all ingredients in meat mixtures

肉种	真实值/%	肽段	测定值/%	回收率/%	平均回收率/%
Pig	1.0	Pig_3	1.22	122.20	115.70
		Pig_6	1.16	115.80	
		Pig_7	1.29	109.20	
	5.0	Pig_3	6.13	122.60	104.40
		Pig_6	4.37	87.42	
		Pig_7	5.15	103.10	
	10.0	Pig_3	10.72	107.20	105.10
		Pig_6	10.05	100.50	
		Pig_7	10.77	107.70	
Chicken	0.5	Chicken_1	0.67	133.40	108.80
		Chicken_4	0.51	102.40	
		Chicken_6	0.45	90.60	
	5.0	Chicken_1	5.66	113.20	108.30
		Chicken_4	4.53	90.60	
		Chicken_6	6.06	121.20	
	10.0	Chicken_1	12.54	125.40	104.80
		Chicken_4	9.35	93.49	
		Chicken_6	9.54	95.38	
Beef	25.0	Beef_4	20.88	83.53	91.02
		Beef_7	25.58	102.30	
		Beef_8	21.80	87.21	
	85.0	Beef_4	88.24	103.80	104.50
		Beef_7	89.80	105.60	
		Beef_8	88.56	104.20	
	97.0	Beef_4	93.86	96.76	100.10
		Beef_7	102.82	106.00	
		Beef_8	94.50	97.42	

2.5 实际样品测定

将本研究的方法应用至实际样品的测定,一种是能力验证样品,一种是实际购买样品,并与PCR结果进行对比,由于当前PCR的定量技术还不成熟,准确性有待考证,且国家及行业也未有相应的定量标准,因此,对实际样品的测定仅在定性方面与PCR进行对比。

本单位利用PCR技术在中国检验检疫科学研究院(检科院)申请肉种鉴别的相关能力验证,按照上述方法对剩余样品进行实验,测得的结果含有鸡、牛和羊的成分,该结果与PCR检测结果及检科院的真实结果一致。此外,在周边的大型超市中购买了商品化的熟肉制品-牛肉干,一是以猪肉为原料的风味牛肉干(样1),另一是牛肉干(样2),牛肉干基质复杂,食

品添加剂及各种调料较多,对检测会有一定的干扰。结果显示,样1溶液中不仅测出猪肉多肽,还有牛肉,不过猪肉占绝大多数;样2中仅测出猪肉,未测出牛肉,因此判定此商品是以猪肉代替牛肉的假冒产品。上述样品均与PCR进行了比对,结果一致。这说明,该方法能够准确地鉴别肉制品中的牛肉、猪肉和鸡肉。

3 结论

本文建立了一种基于差异蛋白质组学理论基础,用于鉴别及定量猪肉、鸡肉和牛肉的HPLC-MS/MS检测方法。分别选取了猪肉、鸡肉和牛肉的8、7和9组特异性定性离子对及各3组定量离子对,每组定量离子的线性关系均在0.99以上,最低可定量至0.5%的猪肉和鸡肉掺假;所测得的实际样品的检测结果与PCR的结论相符,说明该方法不受其他物种干扰,能

够准确地进行物种判别;且该方法操作相对简便,能够实现多物种同时测定,可用于日常肉种检测。

参考文献

- [1] Nakyinsige K, Man Y B C, Sazili A Q. Halal authenticity issues in meat and meat products [J]. *Meat Science*, 2012, 91(3): 207-214
- [2] Patterson R L S, Jones S J. Review of current techniques for the verification of the species origin of meat [J]. *Analyst*, 1990, 115(5): 501-506
- [3] Asensio L, Gonzalez I, Garcia T, et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Food Control*, 2008, 19(1): 1-8
- [4] Köppel R, Eugster A, Ruf J, et al. Quantification of meat proportions by measuring DNA contents in raw and boiled sausages using matrix-adapted calibrators and multiplex real-time PCR [J]. *Journal of AOAC International*, 2012, 95(2): 494-499
- [5] Soares S, Amaral J S, Oliveira M B, et al. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products [J]. *Meat Science*, 2013, 94(1): 115-120
- [6] Hsieh Y H P, Sheu S C, Bridgman R C. Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats [J]. *Journal of Food Protection*, 1998, 61(4): 476-481
- [7] Musto M, Faraone D, Cellini F, et al. Changes of DNA quality and meat physicochemical properties in bovine supraspinatus muscle during microwave heating [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94(4): 785-791
- [8] Ulca P, Balta H, Cagin I, et al. Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods [J]. *Meat Science*, 2013, 94(3): 280-284
- [9] Murray S R, Butler R C, Hardcare A K, et al. Use of quantitative real-time PCR to estimate maize endogenous DNA degradation after cooking and extrusion or in food products [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2007, 55(6): 2231-2239
- [10] Woolfe M, Primrose S. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud [J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(5): 222-226
- [11] Buckley M, Melton N D, Montgomery J. Proteomics analysis of ancient food vessel stitching reveals >4000 year old milkprotein [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, 27(4): 531-538
- [12] 李莹莹,张颖颖,丁小军,等.液相色谱串联质谱法对羊肉中鸭肉掺假的鉴别[J].*食品科学*,2016,37(6):204-209
LI Ying-ying, ZHANG Ying-ying, DING Xiao-jun, et al. High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the detection of adulterated duck in lamb [J].*Chinese Food Chemistry*, 2016, 37(6): 204-209
- [13] Villen J, Gygi S P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(10): 1630-1638